

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

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da
mefloquina

Maité Iyarreta Veitía

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

ORIENTADOR:

Profa. Dra Maria Amélia Barata da Silveira

São Paulo
-2002-

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

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da
mefloquina

Maité Iyarreta Veitía

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

ORIENTADOR:

Profa. Dra Maria Amélia Barata da Silveira

São Paulo
-2002-

17.623

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005471

Ficha Catalográfica

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

I97p Iyarreta Veitia, Maité
Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos
derivados da mefloquina / Maité Iyarreta Veitia. --
São Paulo, 2002.
247p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Silveira, Maria Amélia Barata da

1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2.
Malária : Medicina 3. Fármaco : Síntese : Química farmacêutica
I. T. II. Silveira, Maria Amélia Barata da, orientador.

615.19 CDD

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados da
mefloquina

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira
Orientador/presidente

Profa. Dra. Líliana Marzorati

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

Prof. Dr. Carlos Alberto Brandt

Prof.Dr. Marcos Boulos

São Paulo, _____ de _____

*"Hay hombres que luchan un día
y son buenos,
Hay otros que luchan un año
y son mejores,
Hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos,
Pero hay los que luchan toda la vida
Esos son los imprescindibles."*

B. Brecht

Aos meus pais Felicia e Erundino,

Ao meu irmão Ernesto,

Ao Stephane,

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Não é possível terminar um trabalho desta natureza sem agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram uma contribuição ao seu desenvolvimento.

Minha gratidão à Profa. Maria Amélia Barata da Silveira por me acolher no seu grupo de pesquisa e me oferecer a sua orientação durante estes quatro anos.

Ao Prof. Carlos A. Brandt meus mais sinceros agradecimentos por sua ajuda inestimável durante o tempo todo e por me mostrar o caminho fascinante da Química Orgânica.

Agradeço às professoras da disciplina de Química Farmacêutica, Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira e Profa. Dra. Veni Nakasone pelas suas críticas e conselhos oportunos.

Às Doutoras Karin Kingartem, Sílvia di Santi e a técnico Priscila Ávila da SUCEN pela valiosa ajuda na realização do estudo biológico.

Aos meus colegas da pós-graduação e alunos de iniciação científica pelo convívio cotidiano, especialmente a: Ana, Eliseu, Michelli, Diogo, Roberto, Camila, Kerly, Lica, Sabrina, Talita, Mayra, Karen, Ale e Sergio. Às técnicas Kátia e Inês e as funcionárias Luza, Dona Cida e Dona Lia.

Aos meus amigos cubanos (Cristina, Frank, Vilma, Nelson, Daniel, Modesto, Efrain), colombianos (Marta, Julio, El Pollo, Alfredo, Victor, Gloria), chilenos (Marcela, Verônica, Pedro), argentinos (Ruben, Mónica, Aida, Magdalena), peruanos (Pilar e César), uruguaios (Marcelita) e brasileiros (Dina, Vicente, Laura, Zenaide) que foram "minha família" durante todo este tempo e com os que partilhei momentos de infinita alegria.

Aos meus pais por ser minha fonte inspiradora e por me dar sempre forças para seguir adiante.

Ao Stephane pelo amor e carinho durante este último ano e por me proporcionar momentos tão felizes.

À CAPES pela bolsa outorgada e às entidades CNPq e FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todos, muito obrigada,

Maité

INDICE

	PAG
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
I INTRODUÇÃO.....	1
II OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	3
III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1 MEFLOQUINA.....	6
1.1 Generalidades.....	6
1.2 Farmacocinética.....	7
1.3 Efeitos adversos.....	8
1.4 Mecanismo de ação.....	8
1.5 Resistência.....	13
1.6 Relação estrutura-atividade.....	17
1.7 Síntese da mefloquina e compostos relacionados.....	20
1.8 Terapias combinadas.....	31
2 ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS.....	33
2.1 Generalidades.....	33
2.2 Farmacocinética.....	34
2.3 Toxicidade da artemisinina e compostos relacionados.....	36
2.4 Mecanismo de ação.....	37
2.5 Resistência.....	41
2.6 Relação estrutura-atividade.....	42
2.7 Síntese da artemisinina e compostos relacionados.....	46
IV PLANEJAMENTO SINTÉTICO DOS NOVOS DERIVADOS.....	54
1 Generalidades sobre o planejamento de fármacos.....	54
2 Planejamento sintético dos novos compostos antimaláricos.....	57
V MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
1 Materiais.....	62
1.1 Fármacos.....	62
1.2 Reagentes e solventes (parte sintética e analítica).....	62
1.3 Reagentes e solventes (parte biológica).....	64
1.4 Equipamentos (parte sintética e analítica).....	65

1.5	Equipamentos (parte biológica).....	65
2	Métodos.....	66
2.1	Síntese das 4-hidroxiquinolinas.....	66
2.1.1	Preparação da 2-metil-4-hidroxiquinolina.....	66
2.1.2	Preparação da 2-metil-4-hidroxi-7-cloroquinolina.....	68
2.1.3	Preparação da 2-metil-4-hidroxi-5-trifluormetil-8-cloro quinolina.....	69
2.1.4	Preparação da 2-trifluormetil-4-hidroxiquinolina.....	70
2.1.4.1	Preparação do trifluoroacetato de etila.....	70
2.1.4.2	Preparação do trifluoroacetoacetato de etila.....	71
2.1.5	Preparação da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina.....	72
2.1.5.1	Preparação do 2-acetil-4-pentenoato de etila.....	72
2.1.6	Síntese da 2-metil-4-aminoquinolina.....	74
2.1.7	Preparação do 3-(<i>N</i> -2-metilquinolino)-butenoato de etila.....	75
2.2	Síntese do 3-(<i>N</i> -3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila....	76
2.2.1	Preparação do etoximetilenomalonato de etila.....	76
2.2.1.1	Preparação do ortoformiato de etila.....	76
2.3	Preparação do 3-(<i>N</i> -3-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila.....	79
2.4	Preparação do 3-(<i>N</i> -2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-2-carbetoxi- propanoato de etila. (via "one pot").....	79
2.5	Preparação do 3-(<i>N</i> -3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi- propanoato de etila. (via "one pot").....	80
2.6	Síntese das 4-haloquinolinas.....	81
2.6.1	A partir das 2-metil-4-hidroxiquinolinas.....	81
2.6.1.1	Síntese da 2-metil-4-cloroquinolina.....	81
2.6.1.2	Síntese da 2-metil-4-bromoquinolina.....	82
2.6.1.3	Síntese das 2-metil-4-bromo-8-cloroquinolina.....	82
2.6.2	A partir dos aminometilenomalonatos.....	83
2.6.2.1	Preparação da 3-carbetoxi-4 cloroquinolina.....	83
2.6.2.2	Preparação da 3-carbetoxi-8-cloro-4-bromoquinolina	84
2.6.2.3	Preparação da 3,5-carbetoxi-4-cloroquinolina.....	84
2.7	Síntese da cetona	85
2.7.1	Preparação da 3-carbetoxi-2-oxo-benzilquinolina ("one pot").....	85
2.7.1.2	Preparação do brometo de isopropila.....	85

2.7.1.3	Preparação do sal $\text{CuCN} \cdot 2\text{LiCl}$	86
2.7.2	Preparação da 3-carboxi-2-oxo-benzilquinolina (estanana).....	87
2.7.3	Preparação da cetona a partir da 2-metil-4-bromoquinolina (Grignard)..	88
2.7.4	Preparação da cetona a partir da 2-metil-4-bromoquinolina (estanana)....	88
2.7.5	Preparação do derivado cetônico da mefloquina.....	90
2.8	Preparação do alceno.....	92
2.8.1	Preparação do sal de fosfônio.....	92
2.8.1.1	Preparação do étermonoclorometílico.....	92
2.8.1.2	Preparação do cloreto de metoximetiltrifenilfosfônio.....	93
2.8.2	Reação de Wittig usando acetilpiridina.....	94
2.8.3	Reação de Wittig-Horner usando acetilpiridina.....	94
2.8.3.1	Preparação do trietilfosfito.....	94
2.8.3.2	Preparação do metoximetildietilfosfonato.....	95
2.8.4	Síntese da 2-metil-4-alilquinolina.....	96
2.9	Métodos analíticos.....	97
2.10	Estudo biológico <i>in vitro</i>	99
2.10.1	Escolha dos compostos e doseamento das placas.....	99
2.10.2	Cultivo <i>in vitro</i> e microteste de sensibilidade.....	101
2.10.3	Interpretação dos resultados do teste.....	103
VI	RESULTADOS.....	104
1.	Resultados do estudo químico.....	104
2.	Resultados do estudo biológico.....	169
VII	DISCUSSÃO.....	171
1	Discussão dos resultados do estudo químico.....	171
1.1	Preparação das 4-hidroquinolinas.....	171
1.2	Preparação dos aminometilenomalonatos.....	183
1.3	Preparação das 4-haloquinolinas.....	188
1.4	Preparação da cetona.....	192
1.5	Preparação do alceno.....	202
2	Discussão dos resultados do estudo biológico.....	208
VIII	CONCLUSÕES.....	213
IX	PERSPECTIVAS.....	214
X	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	215

RESUMO

RESUMO

A existência de cepas de plasmódio resistentes aos fármacos utilizados no tratamento da malária é uma das causas da gravidade e aumento da incidência desta doença infecciosa no mundo. Por esta razão, muitas pesquisas estão sendo feitas visando à síntese de compostos novos que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos já tradicionais.

Considerando que mefloquina e artemisinina são utilizadas como associação no tratamento da malária, este trabalho teve como objetivo o planejamento, síntese e avaliação biológica de novos antimaláricos estruturalmente relacionados com estes fármacos.

O planejamento sintético iniciou-se com a preparação de β -enaminoésteres acíclicos a partir da reação entre a anilina e β -cetoésteres (acetoacetato de etila e trifluoroacetoacetato de etila) e o β -cetoéster α -alquenilado, 2-acetil-4-pentenoato de etila. Os β -enaminoésteres formados após ciclização com difeniléter renderam as 4-hidroxiquinolinas respectivas. Estas foram os produtos de partida para a obtenção dos diferentes derivados. Também foram planejados compostos quinolínicos funcionalizados na posição 3. Estes compostos foram sintetizados a partir de enaminas preparadas por meio de processo "one pot", utilizando a amina correspondente e malonato de etila.

A obtenção de derivados a partir do cloridrato de mefloquina e da 4-acetilpiridina foi planejada. Tentou-se oxidar a mefloquina visando à preparação posterior de um alceno que derivaria em trioxano e a 4-acetilpiridina foi usada como modelo para otimizar a obtenção do alceno usando a reação de Wittig ou Wittig e Horner.

Onze dos produtos sintetizados foram ensaiados biologicamente frente a cepas de *Plasmodium falciparum* (K1 e Palo Alto) utilizando a microtécnica de Rieckmann. Alguns mostraram resultados promissores.

ABSTRACT

ABSTRACT

Malaria treatment has become a difficult and complex task, among other causes, due to limitations of chemotherapy to struggle against the increase of *Plasmodium* resistances species, despite the wide drug diversity. For this reason, the researches have been focused on development of new antimalarials with more efficacy and on the establishment of the related antimalarial drug action mechanism.

Considering mefloquine combinations with a variety of artemisinin-derived agents have been used in areas where multidrug resistant strains of *P. falciparum* are notoriously difficult to treat, the purpose of this work was the design, synthesis and biological evaluation of new antimalarial compounds related chemically with these compounds.

The synthetic design started with the preparation of acyclic β -enamino esteres from aniline and β -ketoesteres. The 4-hydroxyquinolines were prepared by cyclization of the β -enamino esters with phenyl ether. These hydroxyquinolines were the starting compounds used to prepare the different derivatives. Quinolinic rings, functionalized in the 3 position, were also design from enamino compounds prepared by an "one pot" procedure from the corresponding amine using ethyl malonate.

The preparation of new compounds from mefloquine hydrochloridrate and 4-acetylpyridine was also design. Mefloquine was oxidized in order to introduce an alkene group, that would be transformed in trioxane ring and 4-acetylpyridine was used as model in the preparation of the alkene using Wittig our Wittig-Horner reaction.

The antimalarial activity of eleven compounds was evaluated *in vitro* against two *Plasmodium falciparum* isolates (K1 and Palo Alto) by Rieckmann microtechnique. Some of them showed promising results.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A malária é doença infecciosa tropical grave, transmitida ao homem, através da picada do mosquito do gênero *Anopheles*. As espécies de protozoários do gênero *Plasmodium* que infectam o homem são: o *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, sendo o *P. falciparum* o responsável por mais de 90% dos casos graves de malária e morte nas áreas afetadas (Win *et al.*, 1992; W.H.O., 2002).

A malária é problema de saúde pública em cerca de 100 países, principalmente nos países mais pobres das áreas tropicais da África, Ásia e América Latina, significando quase 40% da população mundial (mais de dois bilhões de pessoas). Estima-se que a incidência devida à malária no mundo é da ordem de 273 milhões de casos clínicos por ano e aproximadamente 1,09 milhões de pessoas morrem anualmente de malária como único agente patológico ou em combinação com outras doenças. O maior número de mortes acontece em crianças de menos de cinco anos de idade (WHO, 2002). Outro grupo de alto risco inclui as mulheres durante a gravidez, os viajantes não-imunes e pessoas que trabalham nas áreas endêmicas (Casteel, 1996; Trigg e Kondrachine, 1998; Rietveld, 1999).

No Brasil, a malária constitui a maior e mais expressiva das endemias brasileiras. Na década de 1940 esta doença acometia cerca de seis milhões de brasileiros por ano em todas as regiões. O intenso trabalho de controle desenvolvido por meio da Campanha Erradicação da Malária (CEM), possibilitou controle relativo da doença, passando a apresentar menos de 100 mil casos anuais e restringindo-se às áreas de proximidade da floresta na Amazônia (FUNASA, 2002; Loiola *et al.*, 2002).

Na década de 70/80 os projetos de desenvolvimento na Amazônia, com abertura de estradas, construções de hidrelétricas, expansão de áreas de garimpo, entre outros, promoveram alterações ambientais importantes e

exposição de grandes grupos populacionais às áreas de risco. Esta situação provocou a dispersão da malária pela região Norte e Centro-Oeste com aumento significativo de casos, passando-se a registrar patamares de 450 a 500 mil casos anuais (FUNASA, 2002; Loiola *et al.*, 2002).

Estes fatores sócio-econômicos assim como as condições climáticas peculiares da Amazônia (grande área florestal dotada de hidrografia exuberante, chuvas torrenciais e enchentes, que favorecem a manutenção de extensos criadouros de anofelinos; temperatura e umidade do ar elevadas) têm sido responsáveis pelo incremento de casos nos últimos anos, particularmente em 1999, com mais de 630 mil casos registrados (34% a mais em relação ao ano de 1998) (FUNASA, 2002; Loiola *et al.*, 2002).

Atualmente, a malária no Brasil concentra-se na região da Amazônia Legal, particularmente nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia, que, juntos respondem por quase 75% do total de casos registrados na região no ano 2001 (383,654 casos) (FUNASA, 2002; Loiola *et al.*, 2002).

Por outro lado, o tratamento da malária nos últimos anos tornou-se cada vez mais complexo devido, principalmente, às limitações da quimioterapia para enfrentar o aumento das espécies de *Plasmodium* resistentes (Trigg, Kondrachine, 1998, Casteel, 1996), além de existirem regiões onde o mosquito *Anopheles* já desenvolveu resistência aos inseticidas usados no seu extermínio (W.H.O., 2002).

Por estas razões, muitos esforços devem ser feitos à procura de novas moléculas, sintéticas ou naturais, com mecanismos de ação inéditos, para enfrentar o problema da resistência e controlar as pandemias cada vez mais graves ocasionadas pelo *Plasmodium falciparum* (A-Karim *et al.*, 1991; Geenwood, 1995; Berger, 1998; Mons *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 1998; Trigg e Kondrachine, 1998; Durreheim, 1999).

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

II. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Este trabalho tem como objetivo o planejamento, síntese e avaliação de novos antimaláricos derivados da mefloquina e artemisinina. Pretende-se partir do antimalárico mefloquina e inserir em sua estrutura grupos funcionais que reconhecidamente conferem propriedades antimaláricas aos derivados da artemisinina.

Com isto, espera-se que a atividade antimalárica da mefloquina seja acrescida da atividade inerente a estes grupos funcionais. Estas substâncias novas, além de serem agentes potencialmente antimaláricos, poderão servir como modelos para o estudo das relações entre estrutura-atividade, ferramenta essencial para o entendimento do mecanismo de ação dos fármacos e sua interação com receptores, fornecendo desta forma subsídios para o planejamento racional.

Além disso, como será necessária a obtenção de toda a molécula com a finalidade de produzir funções reativas em pontos chave da estrutura, é também nosso objetivo o barateamento de todo o processo sintético, por meio da utilização de matérias-primas mais simples.

O primeiro tratamento registrado para a malária data do século XVII, feito pelos missionários jesuítas, que aprenderam com os índios sul-americanos o uso da casca da árvore *Cinchona sp.* A quinina, alcalóide isolado desta planta é o fármaco antimalárico mais antigo que se conhece (Casteel, 1996).

Anos mais tarde, a profilaxia e tratamento da malária foram transformados pela descoberta de compostos sintéticos, que mostraram potente atividade antimalárica. Esta produção, iniciada na Alemanha, intensificou-se no início da Primeira Grande Guerra Mundial, em que a malária provocou efeitos devastadores e teve continuidade durante a

Segunda Guerra Mundial pelos Estados Unidos e Inglaterra (Mukherjee, 1991; Geenwood, 1995; Köning e Wright, 1996; W.H.O., 2002).

Em 1971, cientistas chineses descreveram uma nova molécula com atividade antimalárica potente conhecida como Qinghaosu (artemisinina). Este composto foi extraído da *Artemisia annua*, planta usada na medicina popular chinesa desde 2000 a.C. no tratamento de estados febris, inclusive os provocados pela malária (Lee *et al.*, 1989; Mukherjee, 1991; Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1993).

Apesar de o número de fármacos antimaláricos existentes (quinina, cloroquina, mefloquina, sulfas, certos antibióticos e derivados da artemisinina) ser expressivo, o ressurgimento global da malária tem sido inevitável devido, entre outras causas, à existência de espécies de parasitas resistentes aos fármacos empregados. A resistência aos novos antimaláricos tem se desenvolvido rapidamente, em parte, pelo fato de muitos deles estarem relacionados à mesma enzima alvo ou processo biológico (Trigg e Kondrachine, 1998; Wirth, 1999; W.H.O., 2002).

Outrossim, os parasitas têm genomas extremamente complexos, possuindo facilidade de alterar seu metabolismo nos micro-ambientes de diferentes hospedeiros. Isto dificulta o estudo dos mecanismos de ação exatos dos fármacos antimaláricos no metabolismo do parasita. Também, relata-se a diminuição na capacidade do parasita em acumular o composto ativo. Existem evidências indicando que as espécies de *Plasmodium falciparum* resistentes têm a característica de acumular menos fármaco. Tudo isto acompanhado ao tratamento terapêutico indiscriminado e incompleto em muitas ocasiões, faz da resistência uma das causas da disseminação da malária no mundo (Casteel, 1996).

A resistência *in vivo* tem sido relatada para quase todos os antimaláricos em uso, incluindo resistência frente à artemisinina (Chawira *et*

al., 1986). Como resultado, diversas pesquisas estão sendo feitas visando à síntese de novos compostos com características estruturais e mecanismos de ação diferentes dos já existentes com o intuito de prevenir o aparecimento de novos casos de resistência (Torok e Ziffer, 1995a; Venugopalan *et al.*, 1995; Pu, Ziffer, 1995; Posner *et al.*, 1996; Posner e O'Dowd, 1998; Posner *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de uma vacina pode ser uma possibilidade para o tratamento profilático da malária. Porém, até o presente momento, não existe nenhuma vacina que ofereça proteção de imunidade total em caso de exposições futuras. A primeira tentativa foi realizada por purificação de três proteínas derivadas de merozoítos, ligadas com seqüências derivadas do domínio repetido da proteína CS do *P.falciparum*. Estudos recentes demonstraram a baixa imunogenicidade desta vacina, que induzia somente uma resposta humoral temporária (seis meses). Apesar de existir muita controvérsia, esta primeira tentativa aportou experiência valiosa na condução dos futuros estudos na procura de uma vacina efetiva, que provoque resposta imune, nas diferentes etapas da infecção (W.H.O., 2002).

De qualquer forma, apesar de todos os problemas associados à resistência, a quimioterapia ainda permanece como uma das poucas armas efetivas na luta contra a malária. É por isso que a pesquisa atual deve ser conduzida, em primeiro lugar, ao desenvolvimento de novos antimaláricos de maior eficácia e, em paralelo, ao estabelecimento do mecanismo de ação dos fármacos já existentes (Wirth, 1999).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. MEFLOQUINA

1.1 Generalidades

A mefloquina é um derivado 4-quinolinometanol, estruturalmente relacionado com a quinina. Devido à sua grande atividade em modelos animais, foi um dos compostos escolhidos entre mais de 300 derivados quinolínicos testados pelo Instituto das Forças Armadas Walter Reed, nos Estados Unidos, durante a Guerra de Vietnã, como alternativa de uso no tratamento da malária resistente à cloroquina. Introduzido no mercado em 1985 pela F. Hoffmann-La Roche com o nome de Lariam® é, provavelmente, um dos mais estudados entre os compostos antimaláricos (Pinder e Burger, 1968; Lim, 1985; Karle e Karle, 1991; Casteel, 1996).

Quimicamente a mefloquina é o 2,8-bis(trifluorometil)- α -(2-piperidil-4-quinolinometanol) (FIGURA 1).

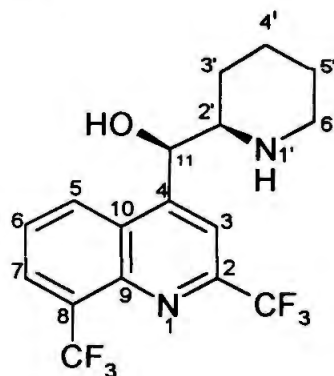


FIGURA 1. Estrutura da mefloquina.

É agente oral eficaz contra as etapas intra-eritrocíticas do ciclo de vida do plasmódio. Não tem efeitos sobre os gametócitos maduros. Apesar de acarretar mudanças notáveis nas formas pré-eritrocíticas, os efeitos

não são suficientes para impedir o desenvolvimento posterior no tecido do parasita (Goldman, 1999; Casteel, 1996; Desneves *et al.*, 1996; Boulard *et al.*, 1986).

1.2 Farmacocinética

A mefloquina é muito bem absorvida do trato gastrointestinal. A absorção é favorecida pela ingestão de alimentos, sendo as concentrações máximas atingidas entre 8 e 24 horas. Em pacientes intensamente comprometidos (como naqueles com malária cerebral), a absorção pode ser incompleta. Distribui-se amplamente em vários órgãos e tecidos, concentrando-se nos eritrócitos. Sua ligação às proteínas é muito alta (98%), atingindo concentrações plasmáticas máximas (290 a 340 ng/mL com dose de 250 mg e 540 a 1240 ng/mL com dose de 1g) em 7 a 24 horas. A biodisponibilidade é maior que 85%, a meia-vida aparente de distribuição é, em média, de 20 L/kg e a meia-vida de eliminação é relativamente longa (13 a 24 dias). Isto pode acarretar como resultado o aparecimento de resistência (Casteel, 1996; Korolkovas, 2000).

A mefloquina é metabolizada no fígado e excretada de forma preferencial pela biliar e fezes de forma muito lenta, em parte como glucoronídeo, e 5% pela urina, na forma íntegra (Casteel, 1996). O metabólito principal é a carboximefloquina, que é inativa contra *Plasmodium falciparum* (Håkanson *et al.*, 1990).

Estudos mostram que a quinina e o cetoconazol inibem o metabolismo da mefloquina nos microsomas hepáticos (Bangchang, *et al.*, 1992).

Devido à ausência de formulação parenteral, os estudos farmacocinéticos da mefloquina foram realizados por meio de administração oral (Nosten e

Price, 1995; Karbawang *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1994; Karbawang e Na-Bangchang, 1994; Karbawang e White, 1990).

Notam-se diferenças significativas nas propriedades farmacocinéticas do fármaco tanto entre voluntários sãos e pacientes quanto entre grupos étnicos (Casteel, 1996).

1.3 Efeitos adversos

Em estudos animais, mostrou baixa toxicidade. Entretanto, a incidência de efeitos adversos no homem pode ser considerada alta. Dentre estes podem ser citados náuseas, vômitos, mialgia, anorexia, diarreia, dor abdominal, cefaléia, zumbido e exantemas (Fontanet e Walker, 1993; Kuile *et al.*, 1995).

Em estudos com mulheres grávidas expostas à mefloquina foi relatado aumento do risco de natimortalidade durante a gestação (Nosten *et al.*, 1999).

São relatados efeitos graves sobre o sistema nervoso central tais como: ansiedade, depressão, sonolência, mareia, alucinações e ocasionalmente estados psicóticos ou convulsões. Geralmente os sintomas aparecem no início do uso do fármaco. Não deve ser administrada em pessoas com convulsões, epilepsia ou que padecem de disfunções psiquiátricas graves, pois pode ocorrer agravamento dos sintomas (Casteel, 1996; Goldman, 1999; Heeringa e Groothesst, 2000; Korolkovas, 2000).

1.4 Mecanismo de ação

Existem várias hipóteses que tentam explicar o mecanismo de ação dos compostos quinolínicos antimaláricos. A hipótese mais antiga estabelece

a intercalação na molécula do DNA do protozoário, evitando a sua replicação e, conseqüentemente, a síntese protéica por meio da destruição do ribossomo (Ginsburg e Geary, 1987; Korolkovas, 1988; Casteel, 1996).

Estudos feitos por Davidson e colaboradores, em 1975, negam radicalmente esta hipótese. Eles analisaram a ligação de vários compostos antimaláricos quinolínicos ao DNA, entre eles a mefloquina. Os resultados experimentais obtidos sugeriram que os grupos trifluormetila nas posições 2 e 8 do anel quinolínico da mefloquina (FIGURA 1) provocam interações estéricas, desfavoráveis, que impedem as possíveis interações hidrofóbicas da molécula durante a sua intercalação com as bases de DNA.

Uma segunda hipótese tenta explicar o mecanismo de ação dos compostos antimaláricos quinolínicos por meio das características básicas fracas que apresentam. Eles são capazes de atravessar rapidamente as membranas na forma de base livre, sendo protonados no interior do vacúolo digestivo do parasita. Esta protonação provoca uma diminuição da permeabilidade, resultando em acumulação do antimalárico. O grau de acúmulo está correlacionado diretamente com o gradiente de pH entre o compartimento ácido e o meio extracelular. A rápida protonação da base livre acumulada acarreta alcalinização temporária do compartimento ácido e conseqüentemente a inibição das enzimas vacuolares que participam no processo de digestão da hemoglobina (Ginsburg e Geary, 1987; Korolkovas, 1988; Ginsburg *et al.*, 1989; Ginsburg e Krugliak, 1992; Casteel, 1996).

A hipótese mais aceita até hoje para explicar o mecanismo de ação da mefloquina e compostos relacionados está associada à possibilidade destes compostos em interferir no processo de destoxificação do heme pelo parasita (FIGURA 2) (Slater e Cerami, 1992; Casteel, 1996; Hawley *et al.*, 1998; Raynes, 1999).

Durante o catabolismo da hemoglobina no interior do vacúolo do parasita forma-se a ferriprotoporfirina IX ou heme. O plasmódio, através da hemepolimerase, transforma o heme em composto polimérico inerte conhecido como hemozoína ou pigmento malárico (Ginsburg e Krugliak, 1992; Casteel, 1996; Raynes, 1999).

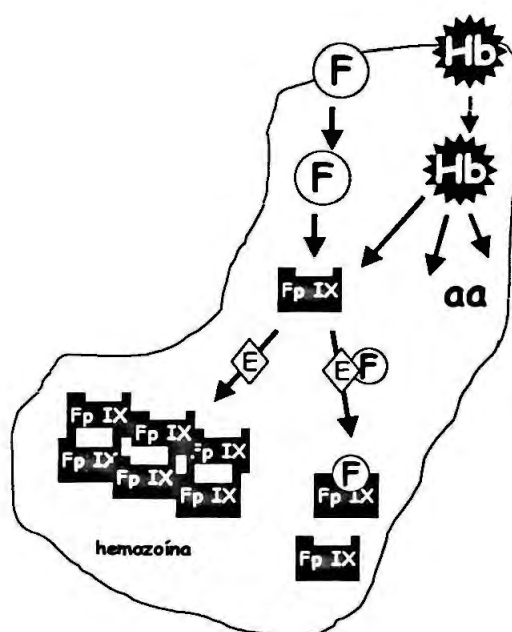


FIGURA 2. Mecanismo de ação da mefloquina por inibição da heme polimerase ou formação de complexo tóxico com o heme no interior do vacúolo digestivo. (F: fármaco, Hb: Hemoglobina, E: enzima, FpIX: ferriprotoporfirina IX, aa: aminoácido) (Raynes, 1999).

Na atualidade, a composição exata da hemozoína e sua formação permanecem ainda em controvérsia. Entretanto, estudos recentes de difração de raios X têm caracterizado este polímero como um complexo de coordenação não-covalente, em que o íon ferro de uma fração heme está sendo quelado pela cadeia de ácido propiônico da fração heme adjacente,

enquanto o outro grupo propiônico está formando uma ligação de hidrogênio com o outro grupo funcional propiônico de um segundo complexo, formando assim uma estrutura dimérica (FIGURA 3) (Ridley *et al.*, 1995, Bohle *et al.*, 1997; Raynes, 1999).

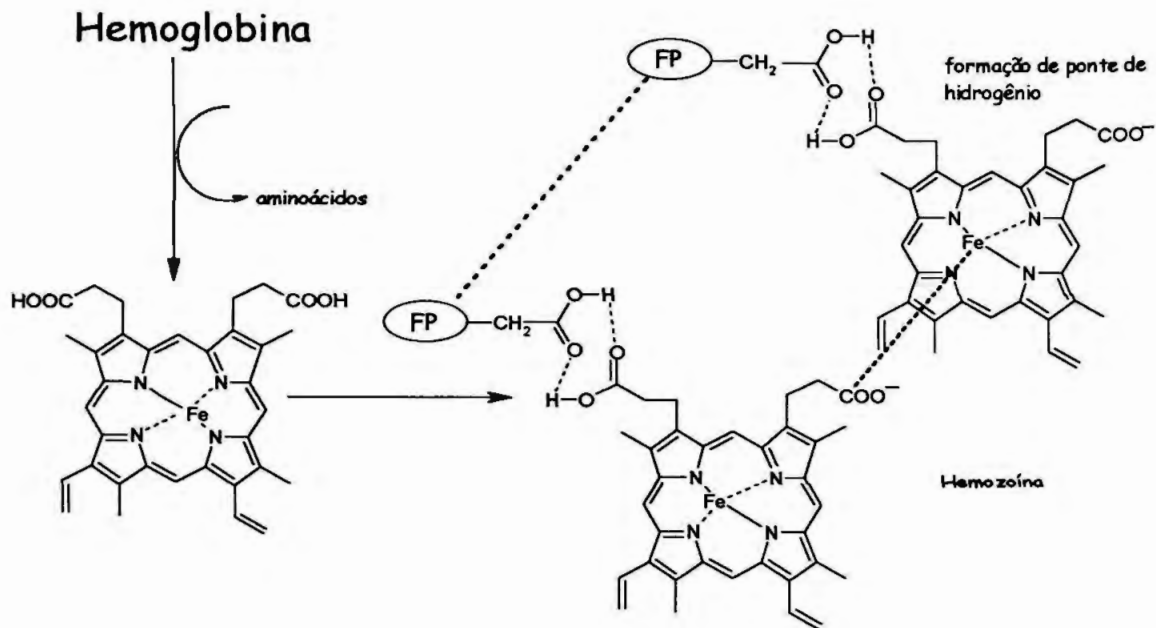


FIGURA 3. Estrutura proposta para a hemozoína. FP: núcleo de ferriprotoporfirina IX (Raynes, 1999).

A polimerização da ferriprotoporfirina IX à hemozoína no plasmódio é catalisada pela hemepolimerase. Estudos sugerem que os compostos quinolínicos formam um complexo com o heme resultando composto tóxico para o parasita ou inibem diretamente a hemepolimerase, levando ao acúmulo de heme tóxico (Slater e Cerami, 1992; Raynes, 1999).

Muitos estudos continuam sendo feitos com o objetivo de estabelecer o mecanismo de ação da mefloquina e compostos relacionados. A identificação e caracterização de proteínas envolvidas na absorção e na ação deste fármaco poderiam ajudar muito na compreensão do mecanismo de ação dos compostos quinolínicos e poderia fornecer dados de valor

inestimável para o planejamento racional de novos derivados antimaláricos (Desneves *et al.*, 1996).

Relacionado com isto, Desneves e colaboradores em 1996, empregaram o *N*-[4-[1-hidroxi-2-(dibutilamino)etil]quinolino-8-il]-4-azido-2-salicilamida, um análogo quinolinometanol fotorreativo que mostrou atividade antimalárica potente contra espécies de *Plasmodium falciparum* sensíveis à mefloquina, para identificar possíveis interações da mefloquina com proteínas no soro, nas membranas de eritrócitos não infectados e de eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum*. Este estudo revelou que a mefloquina interage com a apolipoproteína-A1 (apo-A1), considerada como a principal lipoproteína sérica de alta densidade. Os pesquisadores sugeriram que esta proteína serve como depósito sérico importante para a mefloquina, que é molécula bastante hidrofóbica. A especificidade de ligação da mefloquina à apo-A1 pode ser muito importante na liberação deste fármaco nos eritrócitos infectados. Por outro lado, também se verificou que as membranas dos eritrócitos possuem sítios de ligação de alta afinidade para a mefloquina através de uma proteína identificada como band 7.2b ou estomatina, a qual parece estar relacionada com a reordenação dos fosfolipídios e pode interagir preferencialmente com ligantes hidrófobos, como a mefloquina. A grande afinidade pela estomatina pode proporcionar um reservatório de fármaco, contribuindo para que o seu tempo de meia vida seja muito longo (Desneves *et al.*, 1996).

Foi relatada a alta afinidade da mefloquina com outras duas proteínas, presentes em três sub-espécies diferentes de *Plasmodium falciparum*, com massa molecular aparente de 22 e 36 kDa. Foi sugerido que estas duas proteínas podem estar envolvidas na absorção do fármaco ou podem representar alvos macromoleculares da ação contra o plasmódio. Os

estudos para a identificação e caracterização destas proteínas estão sendo ainda desenvolvidos (Desneves *et al.*, 1996).

1.5 Resistência

Depois que o primeiro caso de resistência à mefloquina foi relatado na Tailândia em 1982, o surgimento de cepas de plasmódio resistentes a este fármaco tem sido observado em várias regiões do mundo (Smrkovski *et al.*, 1985; Suebsaeng *et al.*, 1986; Karbawang *et al.*, 1994; Childs *et al.*, 1991; Mockenhaupt, 1995; Noronha *et al.*, 2000).

Os principais fatores que provocam o desenvolvimento de resistência à mefloquina são os seguintes (Mockenhaupt, 1995):

1. Pressão do fármaco
2. Resistência cruzada com outros antimaláricos
3. Resistência inata

O termo pressão do fármaco faz referência à existência de subconcentrações de princípio ativo no sangue, que levam ao desenvolvimento de resistência. As concentrações de mefloquina menores que aquelas necessárias para clarear as parasitemias podem selecionar cepas de parasitas com sensibilidade reduzida. O período crítico para este mecanismo tem sido relatado como o tempo durante o qual a concentração do fármaco fica entre a concentração mínima inibitória (MIC) (mínima concentração que causa a completa inibição do crescimento do parasita) e da EC50 (efetiva concentração que provoca a inibição de 50% do crescimento do parasita). Para a mefloquina este período dura mais de um mês (Wernsdorfer, 1991; Mockenhaupt, 1995).

Portanto, a automedicação, dose inadequada, vômitos depois da ingestão de mefloquina e diarreia durante os primeiros dias da terapia podem favorecer o desenvolvimento de resistência devido aos baixos níveis do fármaco no sangue. Qualquer que seja a razão para baixa concentração sanguínea da mefloquina, uma vez que a concentração fica abaixo da MIC, os parasitas que surgem a partir da reinfeção não serão eliminados, devido à exposição à pressão do fármaco. Desta maneira, o uso pouco criterioso pode levar ao aumento de resistência (Mockenhaupt, 1995).

A resistência cruzada com outros antimaláricos pode ser o resultado ou da falha no tratamento em áreas onde a mefloquina nunca foi usada ou pela continuada distribuição da resistência. A mefloquina tem características estruturais semelhantes às dos antimaláricos quinolínicos (quinina, cloroquina e primaquina). Existem estudos que correlacionam as respostas *in vitro* da cloroquina à mefloquina (Kilimali *et al.*, 1989).

Entretanto existem também trabalhos que relatam ausência de correlação entre as respostas ou que mostram uma correlação inversa, em que os parasitas resistentes à mefloquina têm sensibilidade aumentada à cloroquina (Oduola *et al.*, 1988; Childs *et al.*, 1991; Peel *et al.*, 1993).

A resistência natural ou inata está ainda em discussão. Vários estudos têm relatado casos de resistência à mefloquina em áreas onde o fármaco não foi utilizado ou foi usado somente em estudos clínicos controlados (portanto o efeito de pressão do fármaco pode ser descartado nestes casos) (Suebsaeng *et al.*, 1986; Brasseur *et al.*, 1992).

Outrossim, a resistência cruzada pode ser responsável por este fenômeno em algumas áreas. Conhece-se a existência de genes que mediam a resistência quando são amplificados e alguns estudos têm demonstrado que a mefloquina é capaz de induzir esta amplificação (Wilson *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1993).

Entretanto, tanto halofantrina quanto a quinina também possuem esta propriedade. De qualquer forma já que nem a resistência cruzada nem os dados genéticos excluem a possibilidade de resistência inata, novas pesquisas serão necessárias para elucidar esta questão (Mockenhaupt, 1995).

A dificuldade principal na elucidação dos mecanismos de resistência aos fármacos antimaláricos quinolínicos (entre eles a mefloquina) resulta do fato de não se conhecer exatamente o mecanismo de ação mediante o qual eles atuam. Muitos estudos sugerem que o efeito da mefloquina no plasmódio é semelhante ao da cloroquina, tendo como alvo o vacúolo digestivo do parasita (Mockenhaupt, 1995).

Estudos feitos por vários pesquisadores mostram que cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina (CRPF) acumulam menos fármaco no interior do vacúolo que as cepas sensíveis. Relata-se que as cepas de CRPF liberam cloroquina entre 40 e 50 vezes mais rápido e que este fluxo pode ser inibido por bloqueadores do canal do cálcio, tais como o verapamil (Martiney *et al.*, 1995).

O mecanismo proposto para que isto aconteça é semelhante àquele que ocorre nas células tumorais dos mamíferos multi-resistentes (MDR), em que uma bomba dependente de ATP localizada na membrana plasmática expelle os quimioterápicos da célula. Esta bomba tem sido definida como glicoproteína P (Krogstad *et al.*, 1987).

Por outro lado, dois genes, *pfmdr1* e *pfmdr2* têm mostrado homologia com genes das células tumorais MDR. O gene *pfmdr1* codifica um homólogo 162 kDa da glicoproteína P (Pgh1), que está localizado principalmente no vacúolo digestivo do parasita. Existem evidências que a Pgh1 está envolvida no transporte dependente de nucleotídeo através da membrana e tem sido estabelecida uma relação entre a amplificação de *pfmdr1* e a resistência à

cloroquina. Entretanto, a explicação de que o grande fluxo de cloroquina fora do vacúolo seja o responsável pela resistência de cepas de plasmódio ao fármaco não é pacífica (Mockenhaupt, 1995; Wilson *et al.*, 1989).

Outros mecanismos são desencadeadores de resistência (Krogstad *et al.*, 1988):

- Barreira de permeabilidade que reduz a acumulação do fármaco no vacúolo;
- Existência de enzimas que inativam o fármaco;
- Alteração no sistema vacuolar do parasita, que consegue funcionar normalmente apesar de o pH estar acima de 6.

Pesquisas que têm avaliado a atividade da mefloquina em cepas de CRPF relatam diferenças entre a resistência à mefloquina e a resistência à cloroquina. O fluxo de fármaco que acontece em cepas de CRPF não tem sido observado para compostos como a mefloquina, halofantrina e quinina (Krogstad *et al.*, 1988).

Por outro lado, vários são os estudos que relatam relação entre a resistência à mefloquina e a amplificação do *pfmdr1*. Wilson e colaboradores, em 1989, compararam um clone sensível com um clone resistente à mefloquina selecionado por pressão do fármaco. O clone resistente mostrou um aumento entre 2 a 4 vezes no número de cópias de *pfmdr1* e um nível significativamente alto do correspondente mRNA comparado com o clone sensível. Por outro lado, comparação de um clone sensível com um resistente, derivado da pressão do fármaco em cepas isoladas, demonstrou que o nível de expressão do mRNA foi maior em cepas resistentes que em cepas sensíveis (Wilson *et al.*, 1989).

1.6 Relação estrutura-atividade

Vários são os estudos que têm permitido estabelecer alguns aspectos da relação entre a estrutura química e atividade antimalárica da mefloquina (Sweeney, 1981; Karle e Karle, 1991; Casteel, 1996).

I. A atividade farmacológica da molécula desaparece quando os grupos amina e hidroxila são acetilados. A formação de *O*-metil ou *O*-etil derivados, assim como a conversão do grupo 2-piperidina saturado a um grupo 2-piridínico não saturado resulta em perda de atividade (Sweeney, 1981; Casteel, 1996).

São vários os estudos que relatam a importância deste requerimento estrutural na atividade antimalárica. Sugere-se que estes grupos hidroxila e amina, além de terem uma localização específica determinada, precisam estar livres para formar ligações de hidrogênio com os constituintes celulares. Desta forma a atividade antimalárica pode depender da habilidade da mefloquina em ligar-se através de ligações de hidrogênio ao componente celular e, portanto de interagir por formação de ligações de hidrogênio ao sítio receptor (Chien e Cheng, 1973; Chien e Cheng, 1976; Karle e Karle, 1991).

II. Outros estudos, além de apoiar a hipótese de que estes compostos podem formar ligações de hidrogênio com componentes celulares para ter o efeito antimalárico, sugerem que a interação é feita por meio de uma geometria específica (Karle e Karle, 1991).

A estrutura tridimensional da mefloquina define a interação física da molécula com a célula alvo e no transporte mediante proteínas. Karle e Karle, em 1991, com o objetivo de determinar a conformação preferida da mefloquina na sua interação com o receptor, compararam a sua estrutura em

forma de base livre e em forma de sal, em três ambientes cristalinos diferentes. Eles determinaram a estrutura cristalina do (\pm)-metilsulfonato de mefloquina monohidratado por difração de raios X e a compararam com as estruturas cristalinas do cloridrato de mefloquina e da base livre, previamente determinadas para, desta forma, estabelecer a orientação do anel piperidínico em relação ao anel de quinolina ou do grupo hidroxila. Segundo o resultados obtidos, a conformação da mefloquina foi essencialmente a mesma em todos os casos, independente da molécula estar na forma de sal ou na forma de base livre. Estas similaridades entre as conformações cristalinas estabelecem uma conformação preferida para a mefloquina, a qual tem as seguintes características.

- O anel da quinolina e de piperidina estão colocados um em relação ao outro num ângulo de 68° a 77° .
- O anel de quinolina é equatorial ao anel de piperidina,
- O átomo de nitrogênio no grupo alifático é gauche em relação ao grupo hidroxila, estando posicionado tão perto quanto possível do anel quinolínico,
- A distância do nitrogênio do anel saturado ao oxigênio do grupo hidroxila é de 2,73 a 2,85 Å.

Esta conformação da mefloquina pode ser superposta com a conformação cristalina do sal de quinidina de tal forma que a formação das ligações de hidrogênio nas duas moléculas podem estar em idênticas direções. Estas conformações podem definir a geometria da formação das ligações de hidrogênio entre o receptor e os compostos antimaláricos como a mefloquina (Karle e Karle, 1991).

III. Os grupos trifluormetila conferem atividade antimalárica elevada (Casteel, 1996).

A presença de grupos trifluormetila na posição 2 do anel quinolínico conserva a elevada atividade antimalárica sem fototoxicidade. Estes grupos conferem estabilidade à molécula sendo comprovado que essas posições do anel quinolínico constituem alvos do metabolismo do fármaco. Compostos relacionados à mefloquina que apresentam um grupo arila na posição 2 do anel quinolínico também apresentaram atividade antimalárica aumentada, porém também níveis de fototoxicidade muito altos (Casteel, 1996).

Por outro lado, outros estudos quantitativos da relação entre a estrutura da molécula e sua atividade farmacológica demonstraram uma relação não linear entre a atividade antimalárica de compostos relacionados com a mefloquina e a carga atômica líquida baseada em cálculos semi-empíricos (Polam *et al.*, 1989).

Nguyen-Cong e Rode, em 1996, baseados nestes fatos, construíram modelos não-lineares previsíveis, utilizando técnica de regressão não-paramétrica chamada Expectativas Condicionais Alternativas (ACE). Eles compararam os resultados do melhor modelo ACE com os melhores resultados dos modelos alcançados pelo método da Regressão Linear Múltipla (MLR) e pelo método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Este estudo revelou que a ACE pode ser uma técnica adequada para estabelecer QSAR e prever a atividade farmacológica dos compostos. Por outro lado, o modelo final obtido, baseado em 21 observações, não avaliou as interações por ligação de hidrogênio relatadas por outros autores como fundamentais na interação da mefloquina com o seu sítio receptor, considerando a importância da interação hidrófóbica (Nguyen-Cong e Rode, 1996).

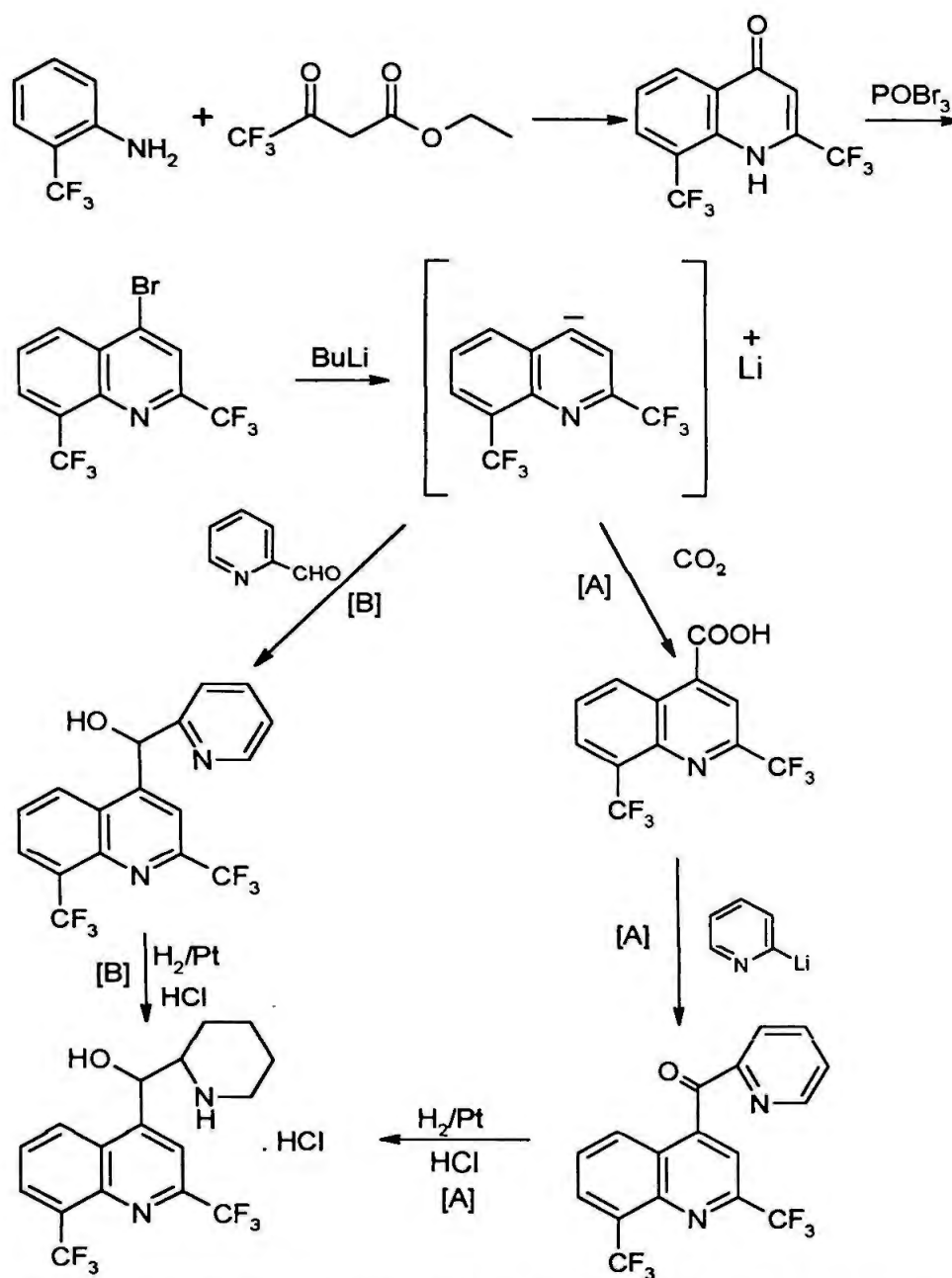


FIGURA 5. Síntese da mefloquina, segundo Ohnmacht et al. 1971. (Via A) e segundo Grethe e Mitt, 1978 (Via B).

Síntese aprimorada foi patenteada em 1978, por Grethe e Mitt. Eles transformaram a 4-bromoquinolina intermediária em derivado de lítio, que, tratado com 2-piridinacarboxaldeído e seguido por hidrogenação do α -(2-piridil)-2,8-bis(trifluorometil)-4-quinolinometanol resultante, levou ao cloridrato

de mefloquina, isolando somente o racemato *eritro* (FIGURA 5, via B) (Lim, 1985).

Anos mais tarde, pesquisadores do Laboratório F. Hoffmann-La Roche, na síntese do cloridrato de mefloquina aplicaram o rearranjo de Wittig de aril éteres para dar arilcarbinóis como intermediários (FIGURA 6) (Adam, 1989).

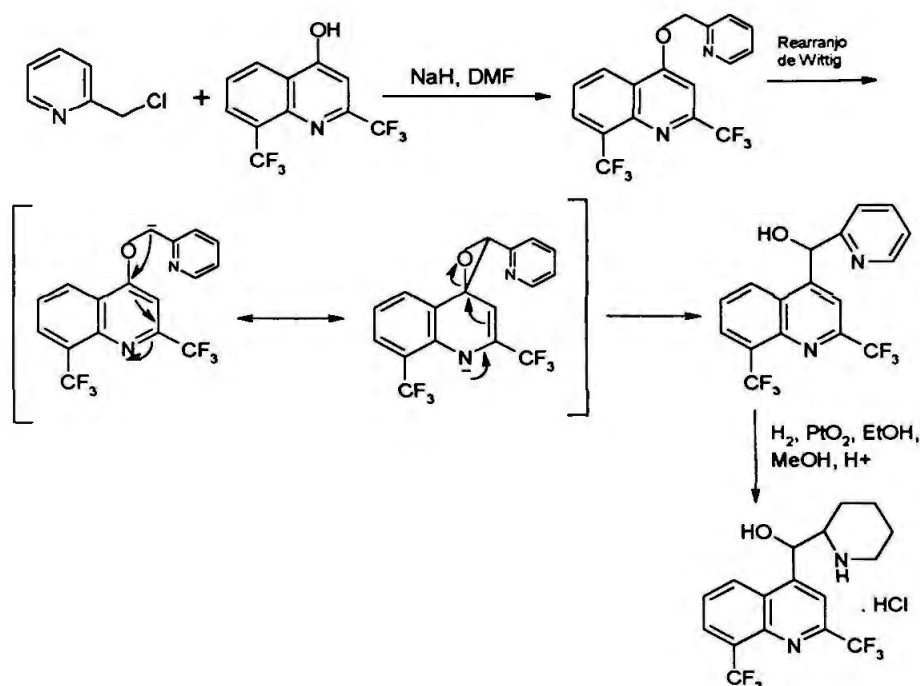


FIGURA 6. Síntese do cloridrato de mefloquina, via rearranjo de Wittig.

Este grupo obteve o éter quinolínico com 90% de rendimento a partir da reação da 2-clorometilpiridina e a 2,8-trifluorometil-4-hidroxiquinolina. Posteriormente, o submeteram à ação de bases fortes como o fenilítio, *n*-butilítio ou NaNH₂ em tetraidrofurano ou benzeno. Testaram várias temperaturas variando entre -78 °C e 60 °C. Entretanto, as misturas obtidas, fortemente coradas, resultaram em produtos graxos e de decomposição. Em outras tentativas de síntese, estes autores trataram o éter com NaH em THF ou DMF, porém o carbinol foi isolado com 10 % de

rendimento. Estes resultados levaram à procura de condições mais suaves na geração do carbânio intermediário (Adam, 1989).

Considerando que o grupo C-SiR₃ não é mais que um carbânio protegido, que pode ser facilmente desprotegido, usando quantidades catalíticas de íon fluoreto, estes pesquisadores introduziram um grupo -SiR₃ para facilitar o rearranjo e assim a formação do carbinol (FIGURA 7) (Adam, 1989).

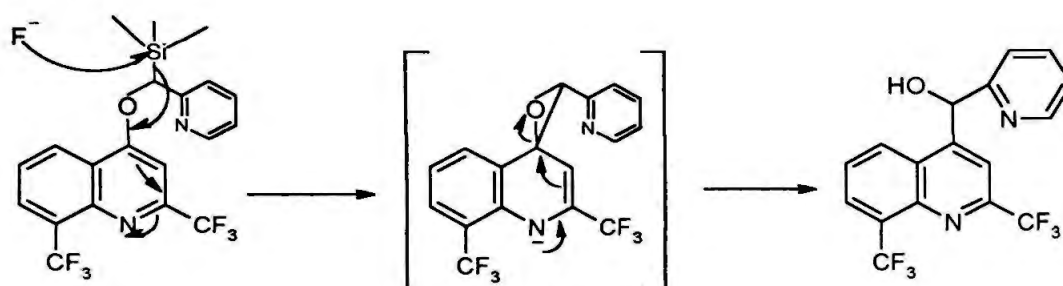


FIGURA 7. Formação do carbânion usando íon fluoreto como catalisador.

Os derivados de silício foram sintetizados a partir do tratamento do éter com *n*-butillítio à temperatura de -78 °C em THF. Em seguida, o ânion obtido foi submetido à sililação com trimetilclorossilano (TMCS) ou *t*-butildimethylclorossilano (TBDMSCI) (FIGURA 8) (Adam, 1989).

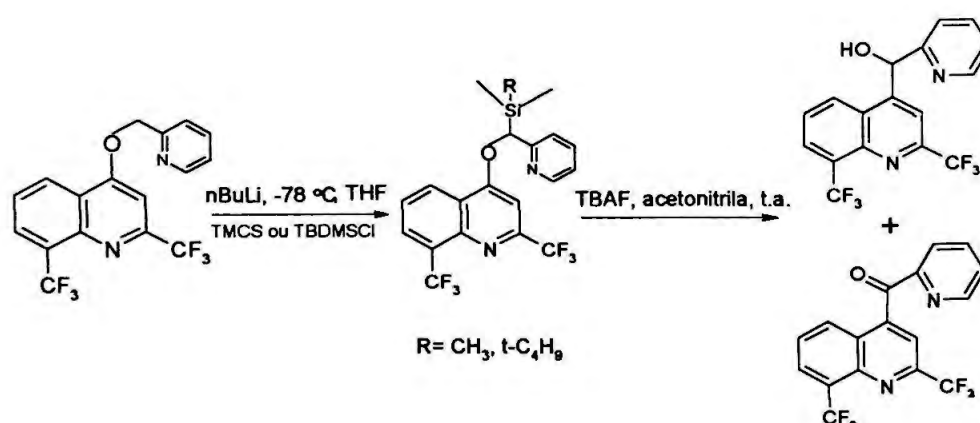


FIGURA 8. Síntese da mefloquina através de derivados de silício.

Os derivados de silício, purificados por cromatografia flash e obtidos em forma de óleos com 70% de rendimento, foram tratados com quantidades catalíticas de TBAF (0,2-0,5 equivalentes) em acetonitrila à temperatura ambiente. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia em camada delgada até que o material de partida fosse consumido rapidamente. Os resultados demonstraram a obtenção de mistura quantitativa do carbinol desejado e cetona (FIGURA 8) (Adam, 1989).

Segundo estes autores, a quantidade de cetona obtida dependeu da quantidade de TBAF empregada, do tempo de reação e da velocidade de agitação. A síntese da cetona resultou da oxidação do carbinol. A formação da cetona foi também explicada pelo fato de que carbânios gerados sob certas condições de transferência de fase como, por exemplo, na presença de éter coroa, são rapidamente oxidados pelo ar. Por outro lado, estes autores comprovaram que a velocidade da oxidação era dependente da rápida agitação devido ao aumento da absorção do oxigênio. Finalmente a hidrogenação catalítica da cetona levou à formação da mefloquina (Adam, 1989).

Devido à dificuldade em gerar o carbânio utilizando *n*-butilítio à temperatura de -78°C estes pesquisadores relataram outra rota sintética mais eficiente e de alto rendimento. Basearam a síntese da cetona numa decianação oxidativa de nitrilas secundárias catalisada por base (FIGURA 9) (Adam, 1991).

A síntese chave deste método foi a oxidação do 4-quinolil-2-piridilacetoneitrila preparada a partir da 2-piridilacetoneitrila e a 4-cloroquinolina, rendendo 91% do produto final (Adam, 1991).

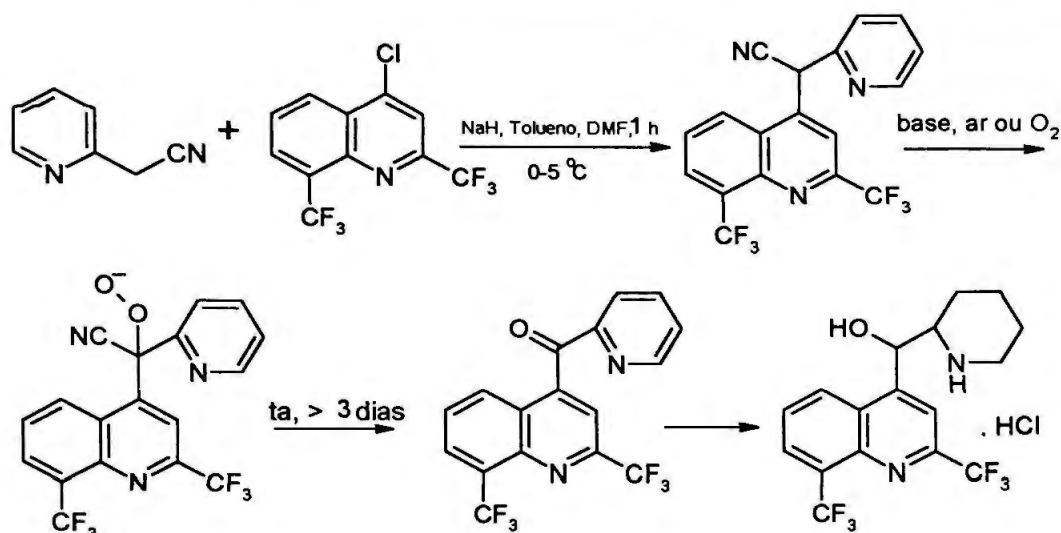


FIGURA 9. Síntese do cloridrato de mefloquina através da nitrila como intermediário.

Trataram a nitrila com 2,7 equivalentes de KOH em acetonitrila na presença de oxigênio durante várias horas à temperatura ambiente. Apenas traços da cetona foram detectados depois de 6 horas de reação e a oxidação foi completada três dias depois à temperatura ambiente. O final do processo de oxidação foi indicado através da mudança de cor de vermelho a amarelo. Na tentativa de diminuir o tempo da reação borbulharam ar ou oxigênio nas soluções e pesquisaram diferentes tipos de solventes e de bases, porém os resultados não foram satisfatórios. Apesar de ser inovadora a rota auto-oxidativa para sintetizar a mefloquina, a utilidade sintética parece ser limitada. Por este motivo eles planejaram uma nova alternativa (FIGURA 10) (Adam, 1991).

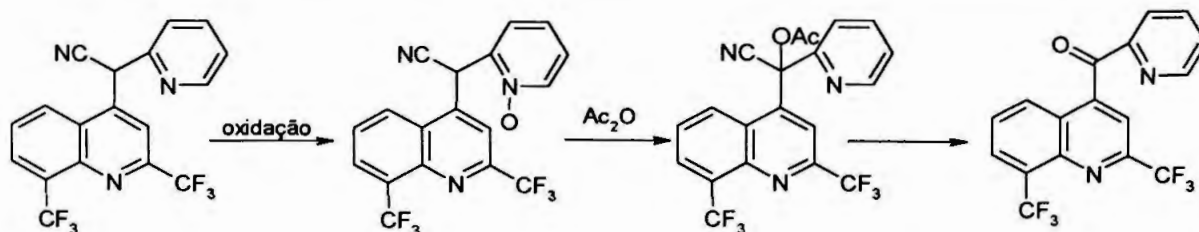


FIGURA 10. Síntese do cloridrato de mefloquina através da formação do *N*-óxido.

A idéia inicial destes autores foi a síntese do *N*-óxido com posterior rearranjo levando ao α -acetato na presença de anidrido acético. Trataram a nitrila com um equivalente de ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) à temperatura ambiente em éter, obtendo somente um produto (FIGURA 11) (Adam, 1991).

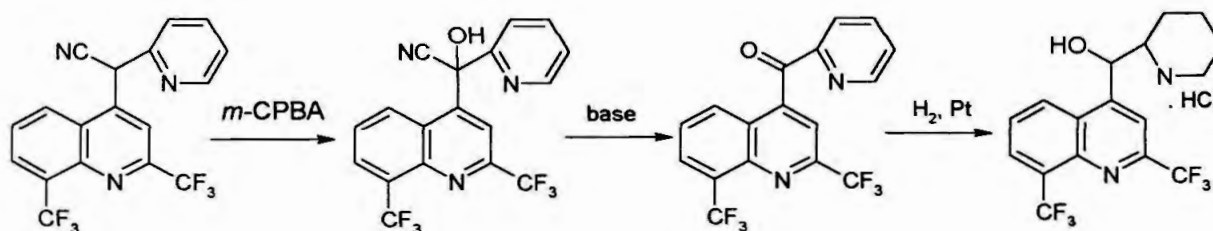


FIGURA 11. Síntese do cloridrato de mefloquina através da formação da cianidrina.

De forma inesperada, ao invés de se obter o *N*-óxido obtiveram a cianidrina, que foi isolada quantitativamente como cristais transparentes. Depois de tratarem a cianidrina com hidróxido de sódio obtiveram a cetona de maneira quantitativa (Adam, 1991).

Devido ao custo elevado do ácido *m*-cloroperbenzóico, outros agentes oxidantes foram explorados, como por exemplo, a combinação de H_2O_2 e

ácido acético. Estas condições levaram a altos e médios rendimentos. A temperatura e o tempo de reação demonstraram ser parâmetros críticos na formação da cetona. Utilizando tempos de reação maiores ou temperaturas mais altas, a cetona foi formada por meio de seu *N*-óxido. A hidrogenação catalítica da cetona levou ao cloridrato de mefloquina em 80% de rendimento (Adam, 1991).

Em 1992, Yadavalli e colaboradores aprimoraram um processo sintético utilizando tosilato de quinolina (I) como intermediário (FIGURA 12).

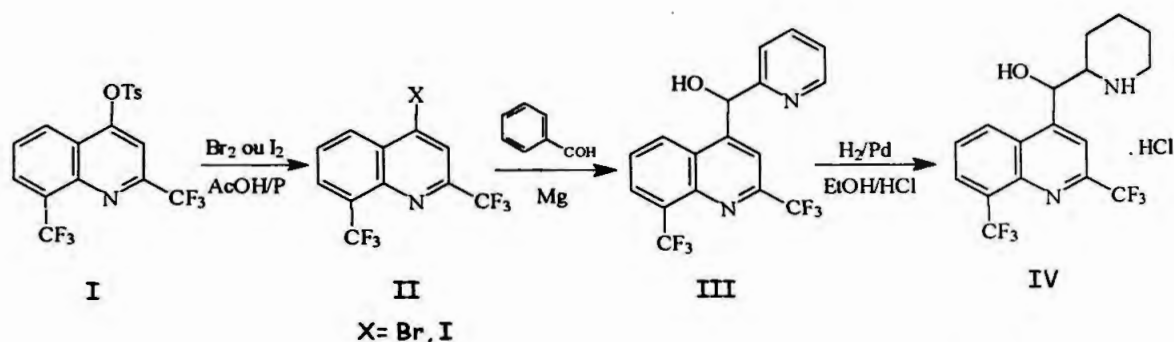


FIGURA 12. Processo sintético aprimorado do cloridrato de mefloquina utilizando como intermediário um tosilato quinolínico.

A partir da reação do tosilato de quinolina (I) com bromo ou iodo em ácido acético na presença de fósforo vermelho, eles obtiveram derivados bromados ou iodados respectivamente (II). A reação destes derivados com piridina 2-carboxialdeído na presença de Mg levou ao intermediário quinolínico (III), que, depois de hidrogenação catalítica originou o cloridrato de mefloquina (IV) (Yadavalli, 1992).

Na procura de métodos mais convenientes e simples, Kumar e colaboradores, em 1996, relataram uma nova síntese baseada na abordagem sulfóxido-Grignard (FIGURA 13) (Kumar *et al.*, 1996).

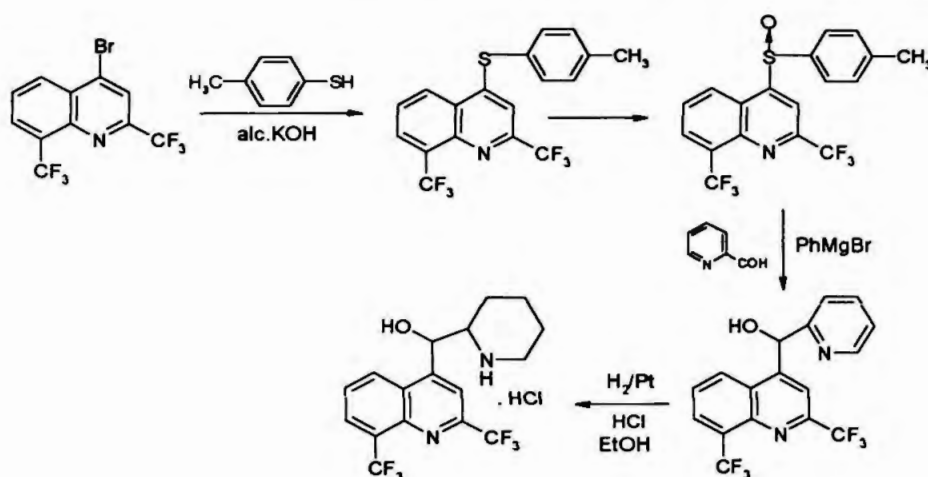


FIGURA 13. Síntese do cloridrato de mefloquina proposta por Kumar e colaboradores em 1996.

Estes pesquisadores prepararam a 4-quinolina-*p*-tolilsulfeto (95% de rendimento) a partir da reação da 2,8-*bis*(trifluormetil)-4-bromoquinolina com *p*-toluenotiol na presença de hidróxido de potássio. O sulfeto foi submetido à oxidação com *m*-CPBA em clorofórmio a 0°C, obtendo-se o sulfóxido correspondente com 90% de rendimento (Kumar *et al.*, 1996).

O grupo sulfóxido foi facilmente deslocado com PhMgBr para gerar o reagente de Grignard correspondente. Para conseguir isto, adicionaram a solução do sulfóxido em THF ao PhMgBr, na faixa de temperaturas entre 0°C e ambiente, com posterior adição, "in situ", do 2-piridinocarboxaldeído. Isto os levou à obtenção do carbinol correspondente, com 55% de rendimento, que, por hidrogenação catalítica posterior formou o cloridrato de mefloquina desejado (Kumar *et al.*, 1996).

Por outro lado, outros estudos têm sido realizados visando à obtenção de novas moléculas com atividade antimalárica estruturalmente relacionadas com a mefloquina. As modificações moleculares descritas para quinolinometanóis têm dado maior ênfase na modificação ao nível do anel quinolínico do que em relação ao grupamento básico (Adam, 1992).

Considerando tal fato, Adam em 1992 sintetizou isômero *eritro* (\pm)2,8-bis(trifluorometil)- α -(2-pirrolidinil)-4-quinolinometanol (*nor*-mefloquina), que apresenta como diferença em relação à mefloquina um anel pirrolidínico no lugar do piperidínico (FIGURA 14) (Adam, 1992).

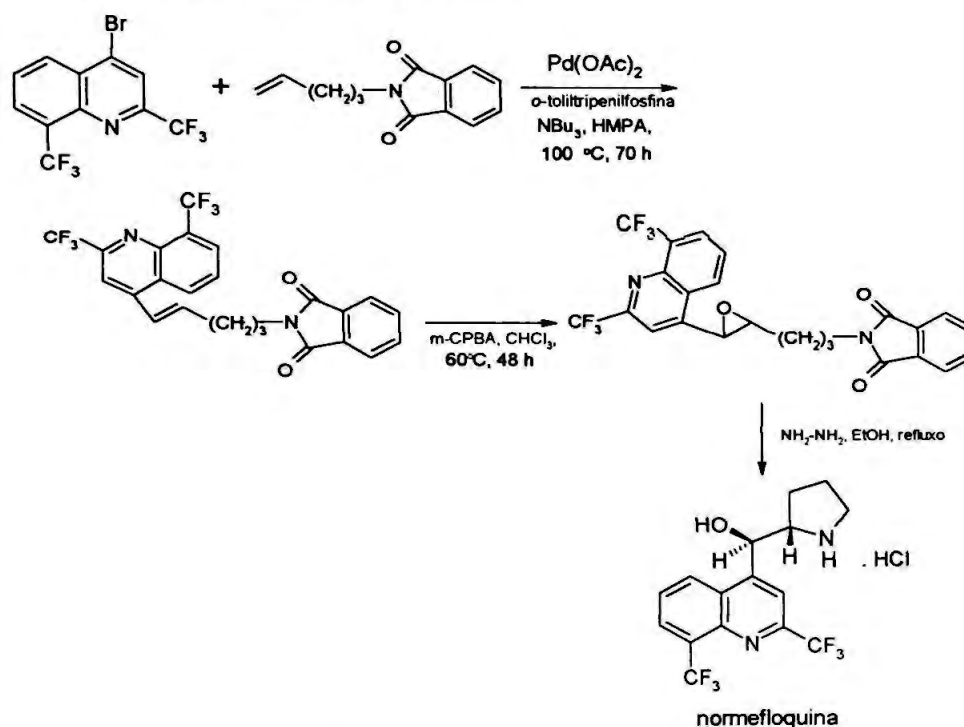


FIGURA 14. Síntese da normefloquina.

Estes autores prepararam a normefloquina em três etapas. A primeira etapa consistiu na reação de substituição vinílica de Heck catalisada por paládio, em que fizeram reagir a 4-bromoquinolina com uma olefina monossustituída gerando a *trans*-olefina. Esta última foi isolada na forma de cristais transparentes e com rendimento de 58%, usando cromatografia flash. Na segunda etapa trataram a olefina com excesso de *m*-CPBA em clorofórmio resultando no epóxido *trans*. Apesar da lenta epoxidação, isolou-se o produto em forma cristalina com 77% de rendimento. Finalmente realizaram uma hidrazinólise acompanhada pela abertura intramolecular espontânea do epóxido com o grupo amino livre,

levando à forma *eritro* da normefloquina. O rendimento geral do processo foi de 32% (Adam, 1992).

Posteriormente, testaram a atividade antimalárica da normefloquina *in vivo* contra cepas de *Plasmodium berghei* mostrando ser tão potente quanto a mefloquina (Adam, 1992).

Dois anos mais tarde, estes mesmos autores aplicaram a substituição vinílica de Heck, catalisada por paládio para sintetizar estereoespecificamente um análogo quinuclidínico da mefloquina (FIGURA 15) (Adam, 1994).

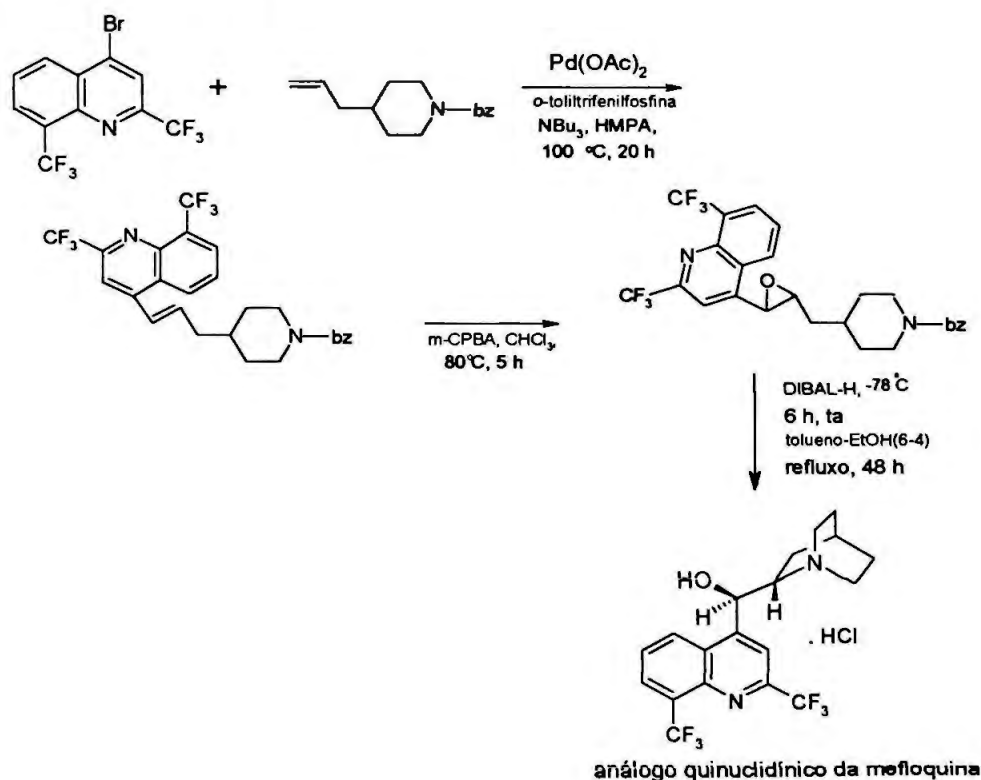


FIGURA 15. Síntese do análogo quinuclidínico da mefloquina.

Reagiram a olefina piperidínica previamente sintetizada com a 4-bromoquinolina (reação de Heck), levando à formação de uma *trans* olefina, isolada em forma de cristais com 43% de rendimento. Na etapa seguinte epoxidaram este produto com *m*-CPBA em 1,2-dicloroetano. Este

processo foi estereosseletivo na abertura do epóxido, que foi isolado com 47% de rendimento (Adam, 1994).

Nas duas últimas etapas, fizeram a redução e clivagem do grupo protetor *N*-benzoíla utilizando excesso de hidreto de diisobutilalumínio a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em segundo lugar refluxaram o epóxido resultante em mistura de tolueno e etanol (6:4) durante 48 horas. A mistura obtida foi purificada através de cromatografia flash, resultando no derivado quinuclidínico da mefloquina (Adam, 1994).

1.8 Terapias combinadas

O fato de que o tempo de meia-vida de eliminação da mefloquina é muito alto, significa que tratamentos únicos são factíveis. Entretanto, o fato de o fármaco permanecer muito mais tempo no sangue pode acarretar o desenvolvimento de resistência pelo parasita (Mockenhaupt, 1995; Korolkovas, 2000).

Para diminuir o desenvolvimento da resistência à mefloquina, recomendou-se a terapia combinada. A combinação da mefloquina com pirimetamina e sulfadoxina (Fansimef) é amplamente usada no sudeste asiático. Estudos clínicos iniciais confirmaram a eficácia desta tripla combinação na prevenção e tratamento da malária *falciparum* resistente, bem como a diminuição da resistência à mefloquina. Parece não existir interações farmacocinéticas entre os compostos. Infelizmente, esta estratégia não funcionou muito bem, já que durante o período de 6 anos em que foi usada somente nesta combinação, a resistência da malária à mefloquina aumentou rapidamente. Por outro lado, provocou também reações dermatológicas graves devido aos compostos de pirimetamina e sulfadoxina e aparente perda da vantagem terapêutica em comparação com a mefloquina

sozinha. Devido a todas estas desvantagens, esta tripla combinação não é mais recomendada pela Organização Mundial da Saúde para o tratamento da malária (Goldman, 1999; W.H.O., 2002).

Mefloquina com halofantrina foi outra das combinações usadas. Com a descoberta de que podia estar associada a cardiotoxicidade letal, seu uso foi desaconselhado (Goldman, 1999).

Na atualidade, as combinações mais promissoras são aquelas que incluem derivados da artemisinina. Isto tem sido o objetivo de muitos estudos nas áreas onde existem espécies de *Plasmodium falciparum* resistentes e, portanto, de difícil tratamento. A ação rápida dos derivados da artemisinina elimina grande porcentagem dos parasitas. Isso permite que, de maneira mais efetiva, a mefloquina circulante possa atuar sobre os parasitas remanescentes (W.H.O., 2002).

Artesunato/mefloquina (Casteel, 1996; Luxemburger *et al.*, 1994; Klayman, 1985) e artemeter/mefloquina (Casteel, 1996) são as novas combinações mais promissoras. Na maioria dos casos, a eficácia da combinação foi muito melhor que com a mefloquina sozinha ou outros tratamentos, como por exemplo, quinina/tetraciclina (W.H.O. 2002). Além de melhorar a eficácia do tratamento, diminui consideravelmente os efeitos adversos da mefloquina (Cumming *et al.*, 1997; Korolkovas, 2000).

Estudos farmacocinéticos destas combinações mostraram que a biodisponibilidade da mefloquina foi menor em presença do artesunato ou artemeter. Para eficácia máxima pode ser necessária a administração de doses de artemisinina seguida por mefloquina (Karbawang *et al.*, 1994).

2. ARTEMISININA E SEUS DERIVADOS

2.1 Generalidades

A artemisinina e seus derivados são parte do grande arsenal terapêutico na luta contra a malária. O fato de serem compostos promissores, como nova classe de antimaláricos não-alcaloídicos de ação rápida, tem estimulado sua síntese extensiva (Torok e Ziffer, 1995a; Venugopalan *et al.*, 1995; Pu e Ziffer, 1995) e a pesquisa de seu mecanismo de ação (Klayman, 1985; Meshnick *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1992; Casteel, 1996; Cumming *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 1999;).

Por milênios, os chineses utilizaram preparações da planta *Artemisia annua* (Qinghao), da família *Compositae*, como um remédio para a febre. Ao final dos anos 60, quando as espécies de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina começaram a ser cada vez mais prevalentes, pesquisadores chineses começaram a trabalhar para identificar os componentes ativos do Qinghao. Em 1972, isolaram um sólido cristalino enantiomericamente puro, o qual foi denominado qinghaosu (artemisinina), uma lactona sesquiterpênica não-alcaloídica 1,2,4-trioxano (FIGURA 16) (Klayman *et al.*, 1984; Hien e White, 1993; Gulati *et al.*, 1996; Cumming *et al.*, 1997).

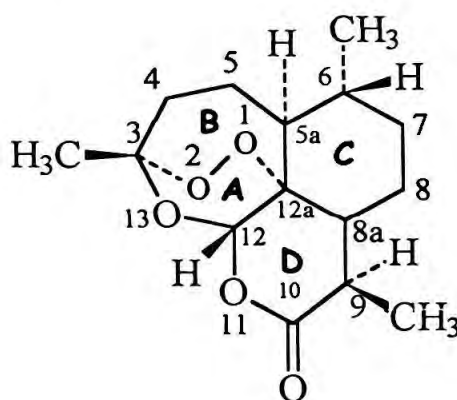


FIGURA 16. Estrutura da artemisinina.

2.2 Farmacocinética

Pouco tempo depois da sua descoberta, a artemisinina distinguiu-se como antimalárico promissor nas fases sangüíneas do *P. falciparum*. Em muitos estudos com animais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e em estudos com humanos mostrou ser muito potente contra espécies resistentes de plasmódio (Casteel, 1996).

Em estudos feitos com a artemisinina em cultura de tecido de fígado de rato, somente foram recuperados 8,3% do composto inicial depois de 1 hora, o que sugere que o fígado é o sítio mais provável onde acontece o metabolismo do fármaco. Estudos semelhantes foram feitos com tecidos de rins e pulmão, na garganta e na corrente sangüínea, evidenciando um metabolismo menor (Klayman, 1985).

Em outros estudos farmacocinéticos, [³H]-artemisinina foi administrada a camundongos pela via oral. O composto mostrou rápida absorção, alcançando o maior nível sangüíneo em uma hora. O tempo de meia-vida no sangue foi aproximadamente de 4 horas e a excreção de aproximadamente 80% da dose oral aconteceu em 24 horas (Klayman, 1985).

Em estudos clínicos preliminares, feitos na China, foram tratados com artemisinina mais de 2100 pacientes infectados com *P. vivax* ou com *P. falciparum* sensíveis à cloroquina. Devido à pouca solubilidade da artemisinina em água, a administração foi efetuada através de injeção intramuscular (i.m.), em diferentes formulações. A cura clínica de todos os pacientes foi definida pela normalização da temperatura corporal. Por outro lado, as formas assexuadas do parasita no sangue desaparecem muito mais rápido que no tratamento com a cloroquina (Brossi *et al.*, 1988; Cumming *et al.*, 1997).

A artemisinina foi usada com sucesso no tratamento de mais de 100 pacientes infectados com *P. falciparum* resistente à cloroquina e também foi

efetiva em pacientes com malária cerebral, curando mais do 90% dos pacientes tratados (Casteel, 1996; Cumming *et al.*, 1997).

Três metabólitos da artemisinina foram extraídos com acetato de etila da urina de pacientes tratados: desoxiartemisinina, diidrodesoxiartemisinina e um composto conhecido como cristal-7 (FIGURA 17) (Klayman, 1985).

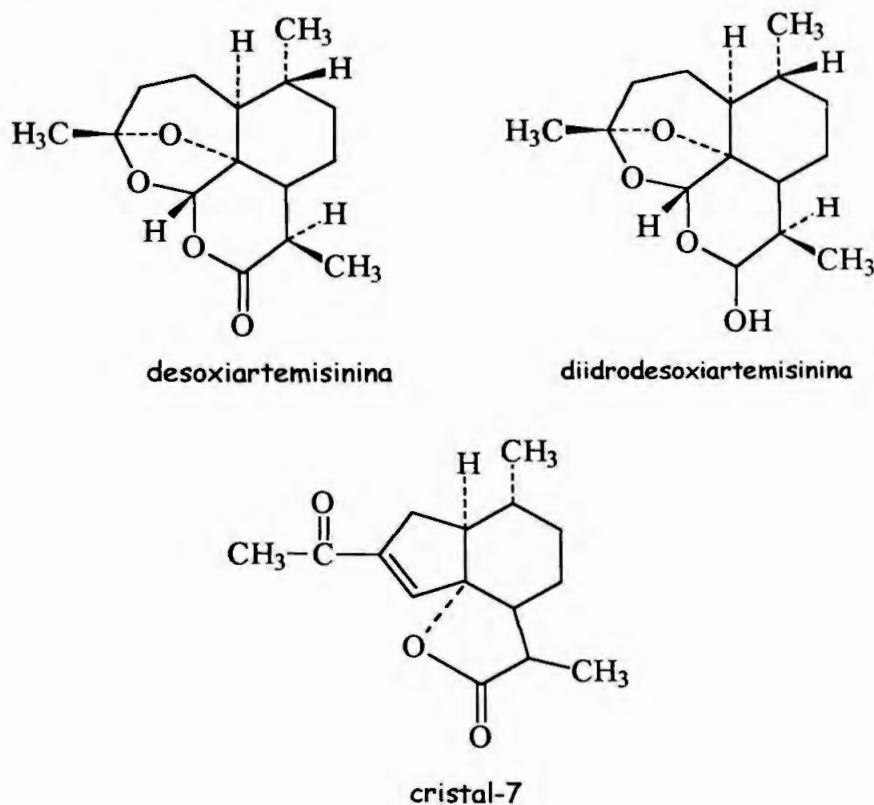


FIGURA 17. Metabólitos da artemisinina

A característica comum destes compostos é a perda do grupo peróxido. Estes metabólitos são inativos contra *P.berghei* em camundongos. Tanto a artemisinina quanto a diidrodesoxiartemisinina são detectáveis e separáveis em quantidades nanomolares a partir de seus derivados diacetilfluoresceínicos (Klayman, 1985). A diidroartemisinina (FIGURA 18) foi identificada como metabólito ativo na urina de pacientes tratados com artemisinina.

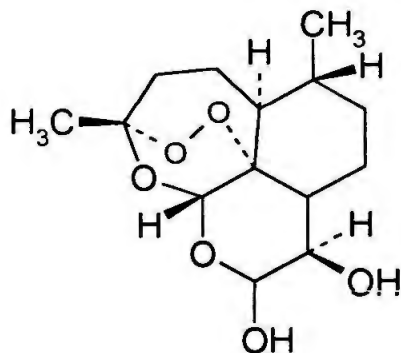


FIGURA 18. Estrutura da diidroartemisinina.

Apesar destes estudos clínicos, o valor prático da artemisinina como agente terapêutico está limitado devido a vários fatores: 1-Alta velocidade de recrudescência; 2- Altas doses são necessárias devido a sua escassa atividade por via oral; 3- Curto tempo de vida meia; 4-Limitada solubilidade tanto em água quanto em óleo. Procurando diminuir estes problemas muitas modificações da artemisinina, assim como sínteses de um grande número de análogos estão sendo realizadas (Casteel, 1996).

2.3 Toxicidade da artemisinina e compostos relacionados

Mais de um milhão de pessoas na Ásia, África e América Central já foram tratados com diferentes doses de artemisinina e seus derivados e nestes casos não foi relatada toxicidade significativa (White, 1994; Meshnick *et al.*, 1996).

Entretanto, alguns estudos em animais revelaram resultados questionáveis. Por exemplo, ratos em que se administraram 25 mg/kg/dia de artemeter e arteter mostraram anormalidades cardíacas e neurotoxicidade num período de duas semanas. Por outro lado, a administração de análogos da artemisinina, em doses de 20 mg/kg/dia, em cães provocou disfunções

nerológicas progressivas, que levaram à morte em aproximadamente uma semana (Brewer *et al.*, 1994). Devido aos efeitos neurotóxicos da artemisinina e seus análogos nos estudos com animais, as ações destes antimaláricos nas células neuronais *in vitro* foram estudadas (Wesche *et al.*, 1996). Os fármacos inibiram tanto a proliferação das células neuronais, quanto o desenvolvimento de neurite em concentrações de até 10 nM. Isto é comparável com o nível efetivo destes fármacos *in vitro* contra muitas espécies de *P. falciparum* (Fishwick *et al.*, 1995).

Estudos feitos com macacos saudáveis nos quais se administraram diariamente, durante duas semanas 200 mg/kg de artemisinina, mostraram anormalidades cardíacas fatais em 75% dos animais. Esta dose diária é da mesma ordem que a dose necessária para curar os macacos infectados com *P. cynomolgi* em três dias sem a recrudescência resultante (Cumming *et al.*, 1997).

Por outro lado, altas doses de artemisinina (25 mg/kg/dia) provocaram efeitos teratogênicos, quando administradas em camundongos e ratas, com uma semana de gravidez, na metade ou em suas últimas etapas da gravidez (Cumming *et al.*, 1997).

De maneira geral, os estudos com a artemisinina e seus derivados relacionados aos efeitos tóxicos envolveram altas doses terapêuticas ou tratamento crônico durante períodos mais longos que o necessário para a eficácia curativa, ou ambos. O fato é que até hoje a artemisinina e seus derivados são antimaláricos promissores de rápida ação e com toxicidade mínima aparente em humanos (Cumming *et al.*, 1997).

2.4 Mecanismo de ação

Vários estudos têm demonstrado que a artemisinina possui atividade parasiticida contra o *P. falciparum* na etapa eritrocítica, tanto *in vitro* quanto

in vivo (Meshnick *et al.*, 1996). As mudanças morfológicas observadas no parasita pelos efeitos da artemisinina incluem ruptura das membranas do vacúolo alimentício (Maeno *et al.*, 1993). Esta ruptura libera enzimas digestivas que provocam danos no citoplasma do parasita. Entretanto, não está demonstrado que o efeito antimalárico da artemisinina seja o resultado de efeito direto na estrutura da membrana (Browning e Bisby, 1989).

Alguns estudos têm relatado que eritrócitos não infectados com *P. falciparum* concentram a artemisinina duas vezes menos que os eritrócitos infectados (Gu *et al.*, 1983; Ellis *et al.*, 1985). A diidroartemisinina marcada se liga a proteínas e componentes lipídicos em preparações de isolados de membranas de células vermelhas infectadas. Esta associação é totalmente diferente em células vermelhas intactas (Gu *et al.*, 1984). Uma explicação a este fato está na distribuição alterada da membrana lipóide dos eritrócitos infectados, que promove maior afinidade de ligação ao fármaco (Casteel, 1996).

Por outro lado, não têm sido relatadas interações entre a artemisinina e o DNA (Casteel, 1996). Outros trabalhos revelam que ela inibe a formação da hemozoína no catabolismo da hemoglobina pelo parasita (Meshnick *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1992; Pandey *et al.*, 1999).

Todos os resultados de estudos realizados com relação à ação antimalárica da artemisinina indicam ser mediada por radicais livres. O íon ferro do heme acumulado no parasita, como resultado da digestão da hemoglobina, reage com a artemisinina para gerar radicais livres pela ruptura homolítica do endoperóxido (Krungrarai e Yuthavong, 1987; Meshnick *et al.*, 1991, Zhang *et al.*, 1992; Meshnick *et al.*, 1993). Os derivados radicálicos da artemisinina têm sido detectados por espectroscopia de ressonância eletroparamagnética (Meshnick *et al.*, 1993).

Pesquisas realizadas tentando explicar este mecanismo, indicam a formação inicial de radicais centrados no oxigênio que sofrem posteriormente abstração do hidrogênio para dar um radical centrado no carbono (FIGURA 19) (Posner e Oh, 1992).

Outros estudos sugerem a possibilidade de que o radical A (FIGURA 19) seja responsável no mecanismo de ação (Posner *et al.*, 1994).

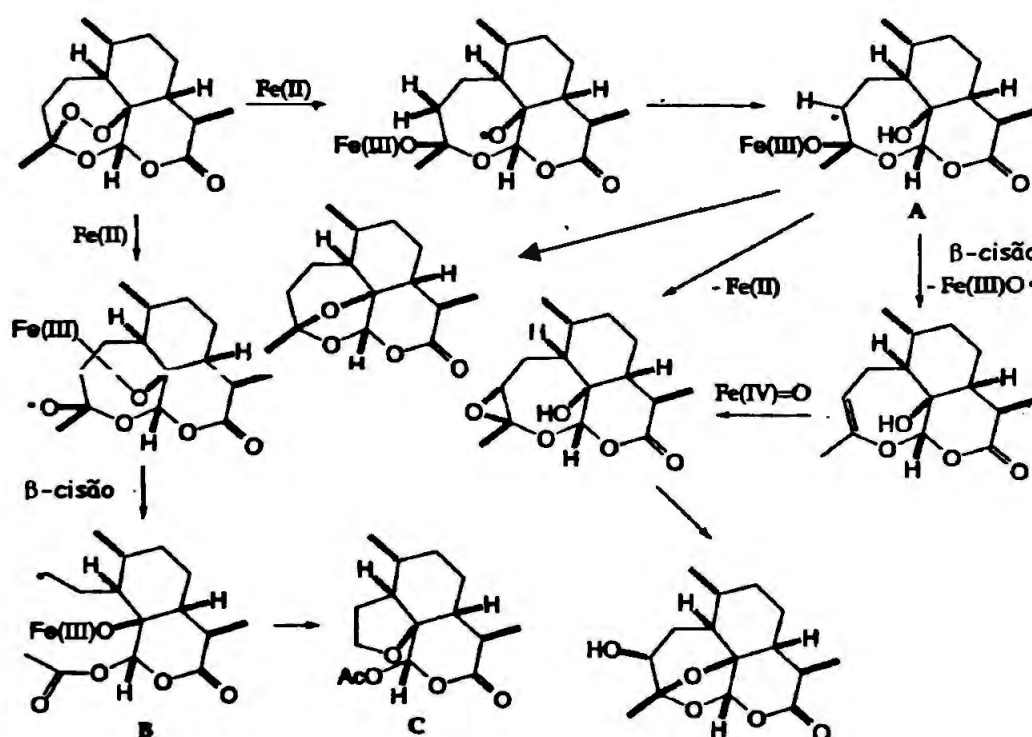


FIGURA 19. Intermediários propostos na ação biológica da artemisinina.

Isto sugeriu a preparação de uma série de análogos com um hidrogênio na posição 4α e outros com hidrogênio na posição 4β (FIGURA 20). Os compostos foram testados farmacologicamente, sendo os 4α entre 12 e 200 vezes mais ativos que seus epímeros correspondentes. Estes resultados sugerem a presença de um hidrogênio na posição 4α para uma boa atividade antimalárica (Posner *et al.*, 1995a).

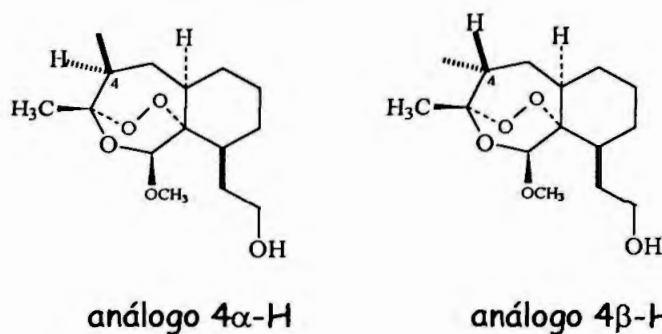


FIGURA 20. Análogos da artemisinina 4 α -H e 4 β -H.

Uma fração tetracíclica intacta parece ser necessária para a formação do aduto com a hemina (forma oxidada do heme, ferro III). A rota proposta mostra que o radical B reage com a hemina. Na ausência da hemina o radical cicliza a um produto de degradação tetraidrofurano C (FIGURA 19) (Posner *et al.*, 1994).

Uma segunda seqüência de degradação da artemisinina sugere a complexação entre o ferro e a ponte peróxido seguido por uma clivagem heterolítica (FIGURA 21) (Haynes e Vonwiller, 1996).

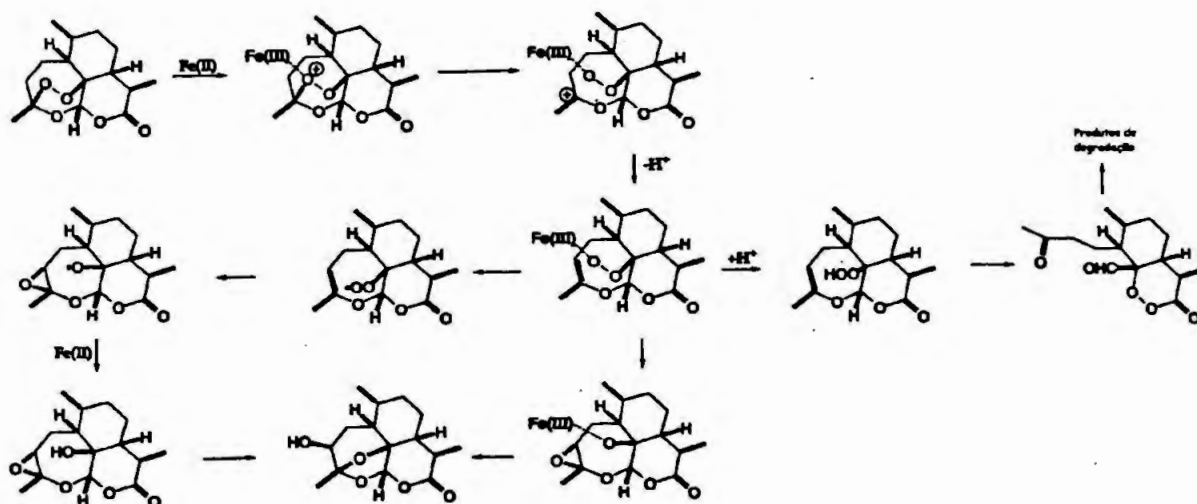


FIGURA 21. Intermediários propostos na ação biológica da artemisinina.

Pesquisas preliminares *in vitro* revelaram que a artemisinina causa mudanças estruturais no retículo endoplasmático, mitocôndrias e nas membranas nucleares do plasmódio. Estas mudanças indicam que o próximo passo no mecanismo de ação proposto para estes compostos é a alquilação de proteínas (Cumming *et al.*, 1997). Um estudo relatou que na presença de hemina os resíduos da artemisinina se ligam covalentemente à albumina humana, provavelmente por meio de grupos amina e tiol (Yang *et al.*, 1994).

Outro estudo demonstrou que a artemisinina e derivados endoperóxidos reagem com proteínas específicas do parasita para formar espécies covalentes. Neste estudo *in vitro* foram tratados eritrócitos infectados com isolados de *P. falciparum* utilizando concentrações antimaláricas efetivas de [³H]-arteeter, [³H]-diidroartemisinina e [³H]-arteflano. Os resultados revelaram 6 proteínas marcadas: Duas bandas maiores (25, 50, 65 e 200 kDa) e duas menores (32 e 42 KDa). Estas proteínas alquiladas não são as mais abundantes nos parasitas, sugerindo que a interação entre o composto e as proteínas é altamente específica (Asawamahasakda *et al.*, 1994). Algumas destas proteínas estão sendo alvos de pesquisa na procura de uma vacina para o tratamento de malária (Cumming *et al.*, 1997).

2.5 Resistência

A par de a artemisinina e seus derivados semi-sintéticos possuem grande potencial como antimaláricos deve se prestar muita atenção para garantir que o parasita não desenvolva resistência a esta nova classe de compostos (Peters, 1990). De fato, já existem alguns relatos onde vários isolados de *P.falciparum* resistentes à artemisinina têm sido desenvolvidos *in vitro* por meio do uso de agentes mutagênicos (Inselburg, 1985).

Por outro lado, 4 cepas de *P. falciparum* isolados de pacientes com malária na África, quando foram comparados com a cepa D6 sensível à cloroquina, demonstraram resistência à artemisinina *in vitro* (Oduola *et al.*, 1992). Em outro estudo, uma cepa de *P. falciparum*, altamente resistente à artemisinina, foi isolada de um viajante de África (Cumming *et al.*, 1997).

2.6 Relação estrutura-atividade

A estrutura da artemisinina é única entre os compostos antimaláricos, apresentando uma ponte endoperóxido (C-O-O-C) bastante característica (FIGURA 16) (Casteel, 1996).

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas visando à síntese de moléculas estruturalmente relacionadas com a artemisinina, muitas delas apresentando estruturas mais simples, porém conservando, como característica comum, o grupamento peróxido (Jefford *et al.*, 1988; Posner *et al.*, 1994; Pu *et al.*, 1995; Torok e Ziffer, 1995a; Posner *et al.*, 1995a; Posner *et al.*, 1996; Posner e O'Dowd, 1998; Posner *et al.*, 1998).

O estudo de vários análogos e derivados da artemisinina tem permitido o desenvolvimento de algumas relações estrutura-atividade (Klayman, 1985; Avery *et al.*, 1995; Posner *et al.*, 1995b; Casteel, 1996; Avery *et al.*, 1996; Zouhiri *et al.*, 1998; Cumming *et al.*, 1998).

I. O endoperóxido é essencial para a atividade.

Compostos desta classe com ausência da ponte peróxido são inativos. Por exemplo, a desoxiartemisinina (FIGURA 22), em que a ponte dioxi foi reduzida à monoxi, é completamente inativa frente a cepas de *P. falciparum* W-2 e D-6 (Klayman, 1985).

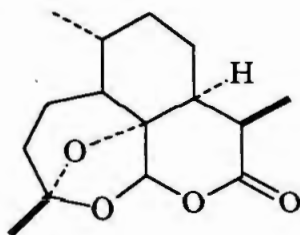


FIGURA 22. Estrutura da desoxiartemisinina.

II. O endoperóxido é necessário, porém não é suficiente para a atividade antimalárica.

Testes biológicos de peróxidos sintéticos simples, como o peróxido de hidrogênio e o hidroperóxido de *ter*-butila, evidenciaram fraca atividade antimalárica *in vivo* frente a diferentes cepas de plasmódio. Outrossim, compostos como o ascaridol (FIGURA 23) e 1-2-4 trioxanos bicíclicos não mostraram atividade na dose máxima tolerada. Isto demonstra que o grupo peróxido é necessário, porém, não é suficiente para a atividade antimalárica (Jefford *et al.*, 1988).

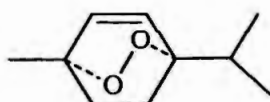


FIGURA 23. Estrutura do ascaridol.

III. A atividade antimalárica depende da disposição espacial das funções endoperóxido, cetal, acetal e lactona.

Considerando estes resultados e visando à definição do grupo farmacofórico alguns pesquisadores têm sugerido a relação entre a atividade antimalárica e a disposição espacial das funções endoperóxido, cetal, acetal e lactona. Alguns pesquisadores têm proposto que devido à forte relação entre a lipofilicidade da molécula e a sua atividade

antimalárica, é de grande importância a posição da ligação peróxido em relação aos grupamentos hidrófobos da molécula (Avery *et al.*, 1987; Kepler, 1988).

IV. Esteres, éteres e carbonatos de artemisinina têm mostrado apreciável atividade antimalárica.

Vários estudos têm mostrado que o aumento da solubilidade na água de análogos da artemisinina diminui a atividade biológica. Entretanto outros não concordam com esta afirmação.

Vários derivados da diidroartemisinina, análogo lactônico da artemisinina (FIGURA 24), mostraram maior potência que esta última tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Cumming *et al.*, 1997).

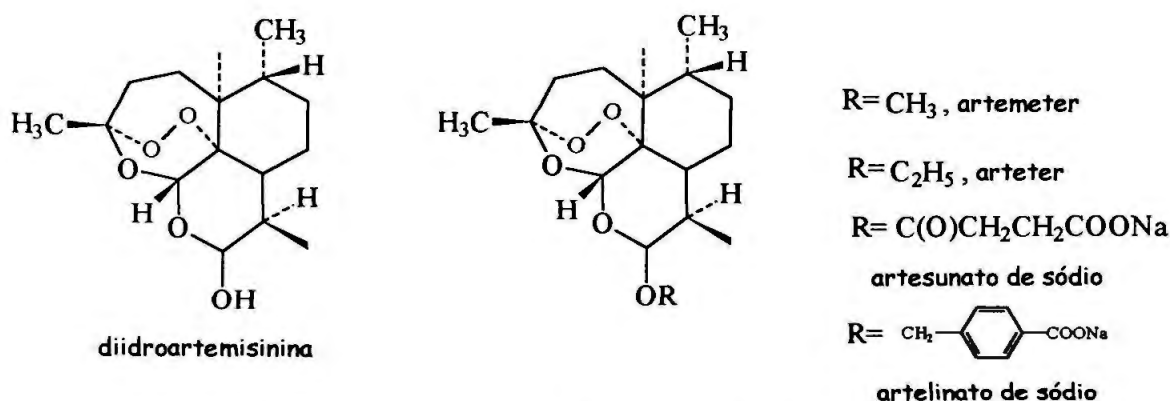


Figura 24. Diidroartemisinina e alguns de seus derivados antimaláricos.

Numa série de derivados da diidroartemisinina, ésteres carboxilato mostraram atividade antimalárica significativamente maior que o correspondente ácido carboxílico (Lin e Miller, 1995). Isto significa que para muitos derivados, a lipofilicidade é importante para manter a atividade antimalárica, ainda que isto possa contribuir à toxicidade (Lin *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990; Lin e Miller, 1995).

Outros derivados da diidroartemisinina que mostraram maior atividade antimalárica são o artemeter e arteeter. Eles são mais lipossolúveis que o produto natural e são indicados na forma de injeções intramusculares em tratamentos clínicos financiados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Cumming *et al.*, 1997).

Outrossim, existem contradições com relação a esta afirmação já que os derivados artesunato e artelinato de sódio (FIGURA 24), são muito solúveis em água, porém são muito ativos. Estes compostos são administrados via intravenosa, segundo indicações da OMS e do Instituto de Pesquisa Walter Reed (Cumming *et al.*, 1997).

V. Mudanças no anel D da artemisinina influenciam na atividade antimalárica.

- a- O anel D intacto assim como sua função oxigenada, seja alcoxi ou carbonílica, não é requisito indispensável para atividade antimalárica, porém acentua a atividade (FIGURA 16) (Casteel, 1996).
- b- Redução do tamanho do anel D de 6 a 7 átomos de carbono resulta em diminuição da atividade, provavelmente como resultado de mudanças conformacionais (Casteel, 1996).

VI. Outras relações estrutura atividade.

- a- A adição de grupamentos alquílicos na artemisinina não apresenta grandes vantagens no aprimoramento da atividade. Pequenos grupos, metil, etil e propil podem aumentar a potência, entretanto o efeito diminui rapidamente (Casteel, 1996).
- b- A substituição do O 11 do grupo lactônico da artemisinina por nitrogênio rende lactamas e isto origina derivados com atividade antimalárica maior ou comparável com a artemisinina (Avery *et al.*, 1995, Torok e Ziffer, 1995b).

2.8 Síntese da artemisinina e compostos relacionados

A artemisinina é extraída principalmente das partes aéreas da *Artemisia annua*. Pequenas quantidades também podem ser isoladas a partir da *Artemisia apiacea* e a *Artemisia lancea* (Klayman *et al.*, 1984; Casteel, 1996).

A extração deste composto é realizada em baixas temperaturas. O rendimento depende da espécie da planta, da etapa de desenvolvimento, das condições do solo, e das condições ambientais. O rendimento máximo observado é de 1% do peso da planta seca. Entretanto, valores entre 0,01 e 0,5% de artemisinina são os mais comuns (Klayman *et al.*, 1984; Casteel, 1996).

A artemisinina já foi preparada por síntese total em diferentes laboratórios (Schmid e Hofheinz, 1983; Avery *et al.*, 1987; Butler e Wu, 1992; Liu *et al.*, 1993; Constantino *et al.*, 1996).

Schmid e Hofheinz, em 1983, sintetizaram a artemisinina a partir do (-)-isopulegol (FIGURA 25). O passo chave da síntese foi a fotooxigenação do metilviniléter, em que foi obtida uma mistura de produtos. Esta mistura bruta foi tratada com ácido rendendo, através do fechamento do anel, a formação da ligação endoperóxido. A artemisinina na forma cristalina foi obtida em 30% de rendimento. Esta síntese permitiu estabelecer a estereoquímica absoluta da artemisinina.

Outros autores realizaram a síntese total esterosselativa da artemisinina a partir da (R)-(+)-pulegona, incorporando o grupo peróxido por meio da ozonólise do vinilsilano. O passo chave da reação é a ozonólise do vinilsilano e a ciclização seletiva para resultar no endoperóxido. A artemisinina foi obtida com rendimento de 37% (FIGURA 26) (Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1987).

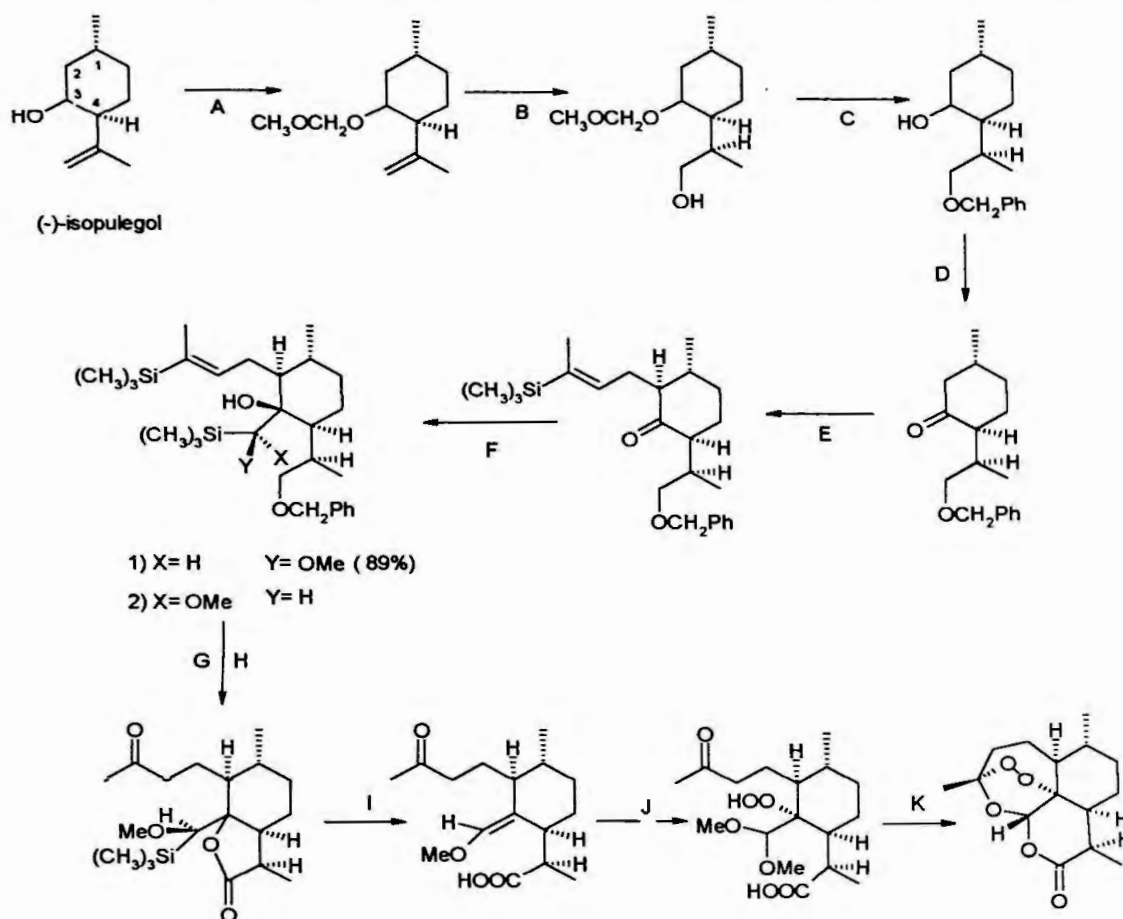


FIGURA 25. Síntese da artemisinina realizada por Schmid e Hofheinz em 1983. A: $\text{ClCH}_2\text{OCH}_3$, $\text{PhN}(\text{CH}_3)_2$, CH_2Cl_2 , t.a.; B: B_2H_6 , THF, 0°C ; C: PhCH_2Br , KH, 4:1 THF:DMF, 0°C / CH_3OH , HCl, 40°C , 5 h; D: PCC, CH_2Cl_2 , t.a.; E: LDA, THF, 0°C / 3-iodo-1-metil-1-propeniltrimetilsilano; F: metoxi(trimetilsilil)metilida de lítio, THF, -78°C ; G: Li, NH_3 /PCC excesso, CH_2Cl_2 , 15 h; H: *m*-CPBA CH_2Cl_2 , TFA, CH_2Cl_2 ; 0°C , 3 min; I: $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, t.a., 2h; J: Foto-oxigenação, -78°C , metanol; K: HCOOH , CH_2Cl_2 ; 0°C , 24h.

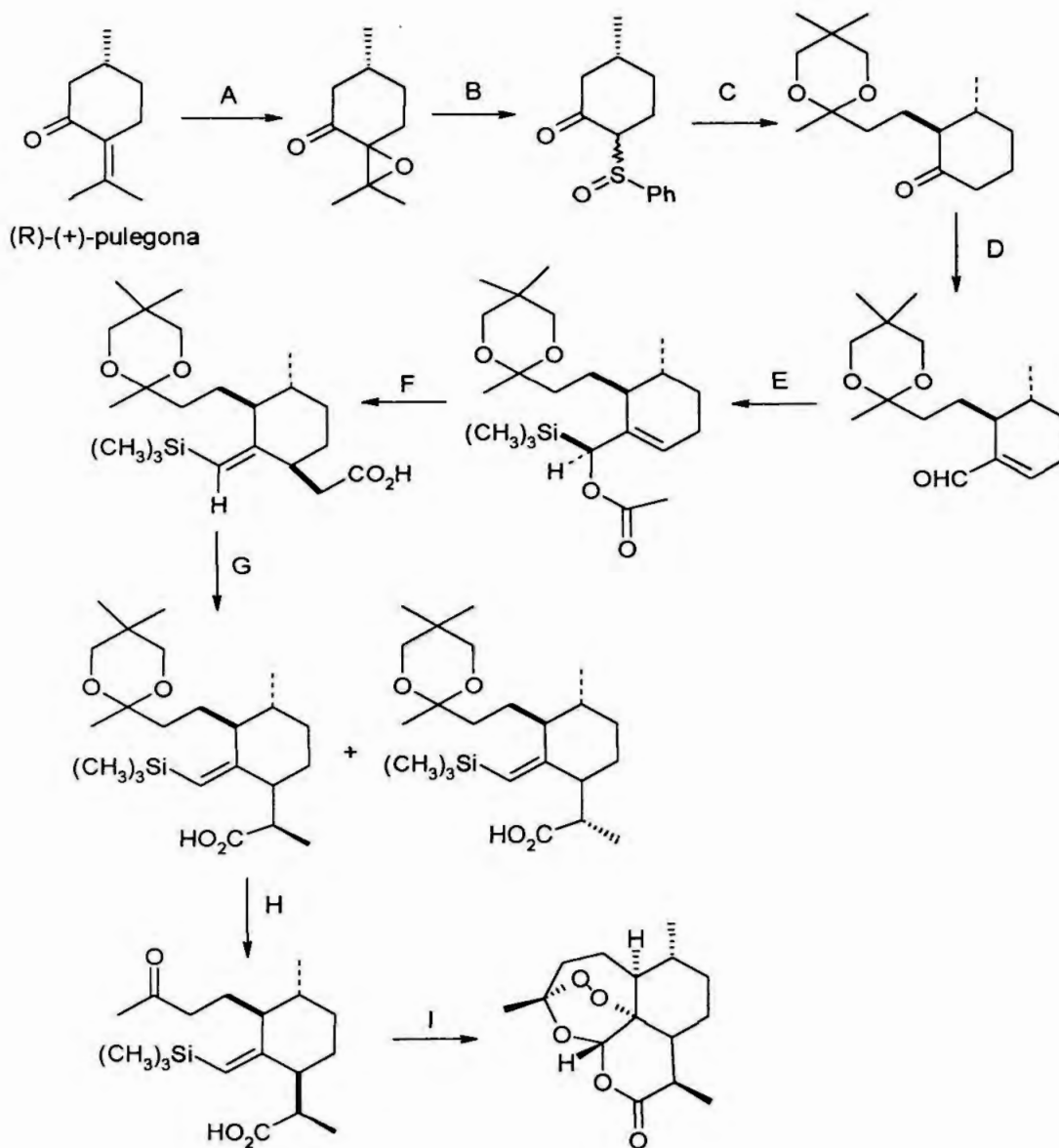


FIGURA 26. Síntese total da artemisinina a partir da (R)-(+)-pulegona. **A:** HOOH alcalino, THF; **B:** NaSPH, THF/ *m*-CPBA, CH₂Cl₂, -78 °C. **C:** LDA, HMPA, THF, -78 °C, 2-(2-bromoetil)-2,5,5-trimetil-1,3-dioxano/Al(Hg); THF, H₂O **D:** NH₂NHTs, pyr, THF/ *n*-BuLi, TMEDA, DMF; **E:** (Me₃Si)₃Al. OEt₂, pentano, -78 °C, Ac₂O, DMAP, 20°C; **F:** LICA, THF, -78 °C to -20 °C; **G:** Me₂SO₄, K₂CO₃, acetona /LICA, THF, 0°C, CH₃I, 0°C **H:** KOH, MeOH/ ácido oxálico aquoso, sílica gel, CH₂Cl₂, 20 °C; **I:** O₃, MeOH, -78 °C / CHCl₃, CF₃CO₂H, H₂O.

Usando metodologia semelhante, estes pesquisadores também prepararam derivados da artemisinina: (+)-9-desmetilartemisinina (39%) (FIGURA 27) (Avery *et al.*, 1987) e a (+)-6,9-didesmetilartemisinina (53%) (FIGURA 28) (Avery *et al.*, 1989).

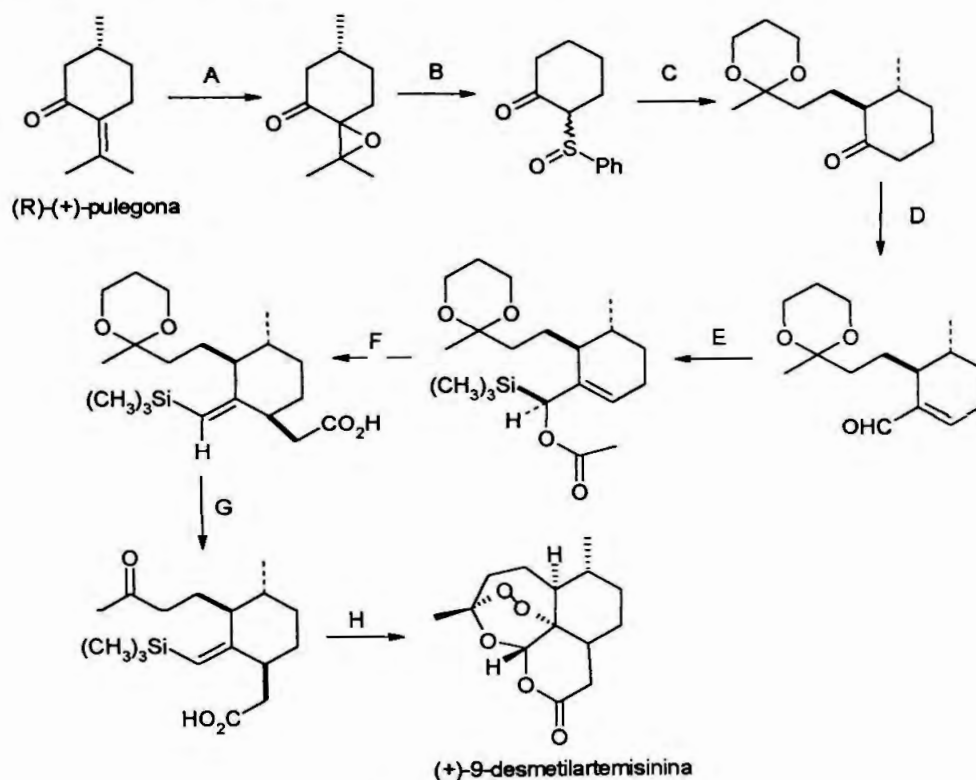


FIGURA 27. Síntese (+)-9-desmetilartemisinina a partir da (R)-(+)-pulegona. A: HOOH alcalino, THF; B: NaSPh, THF/ *m*-CPBA, CH₂Cl₂, -78 °C. C: LDA, HMPA, THF, -78 °C, 2-(2-bromoetil)-2,5,5-trimetil-1,3-dioxano/ Al(Hg); THF, H₂O D: NH₂NHTs, pyr, THF/ *n*-BuLi, TMEDA, DMF; E: (Me₃Si)₃Al, OEt₂, pentano, -78 °C, Ac₂O, DMAP, 20 °C; F: LICA, THF, -78 °C to -20 °C; G: ácido oxálico aquoso, sílica gel, CH₂Cl₂, 20 °C; H: O₃, MeOH, -78 °C / CHCl₃, CF₃CO₂H, H₂O.

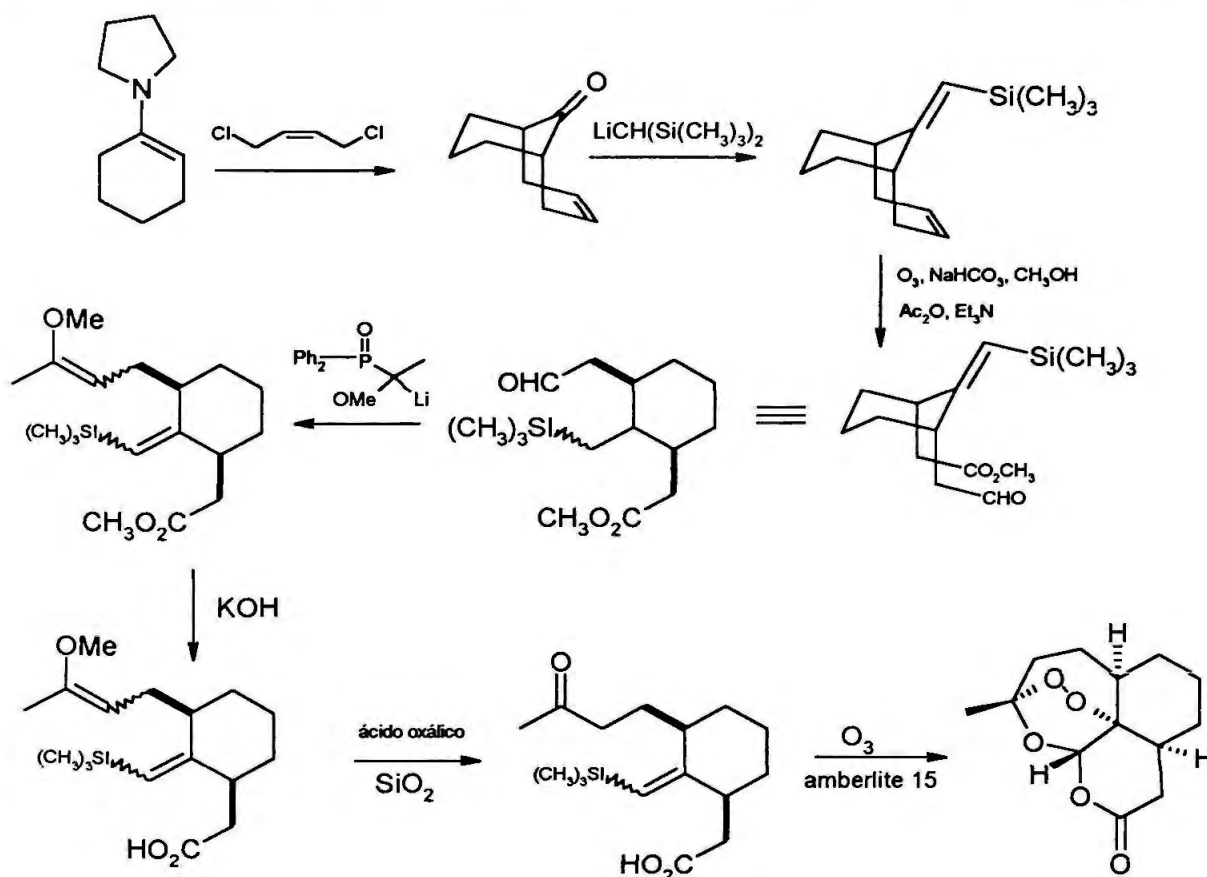


FIGURA 28. Síntese da (+)-6,9-didesmetilartemisinina.

A síntese da (+)-6,9-didesmetilartemisinina foi realizada visando preparar derivados mais simples da artemisinina sem centros assimétricos (ausência grupos metila no carbono 6 e no carbono 9). Este composto mostrou atividade antimalárica significativa contra isolados de *P. falciparum* (Avery *et al.*, 1989).

Por outro lado, na procura de uma nova rota sintética da artemisinina pesquisadores da Universidade de Alberta realizaram a síntese total da (+) artemisinina a partir do (-)- β pipeno utilizando ciclização de Diels-Alder intermolecular. A artemisinina foi obtida com rendimento de 30% (FIGURA 29) (Liu *et al.*, 1993).

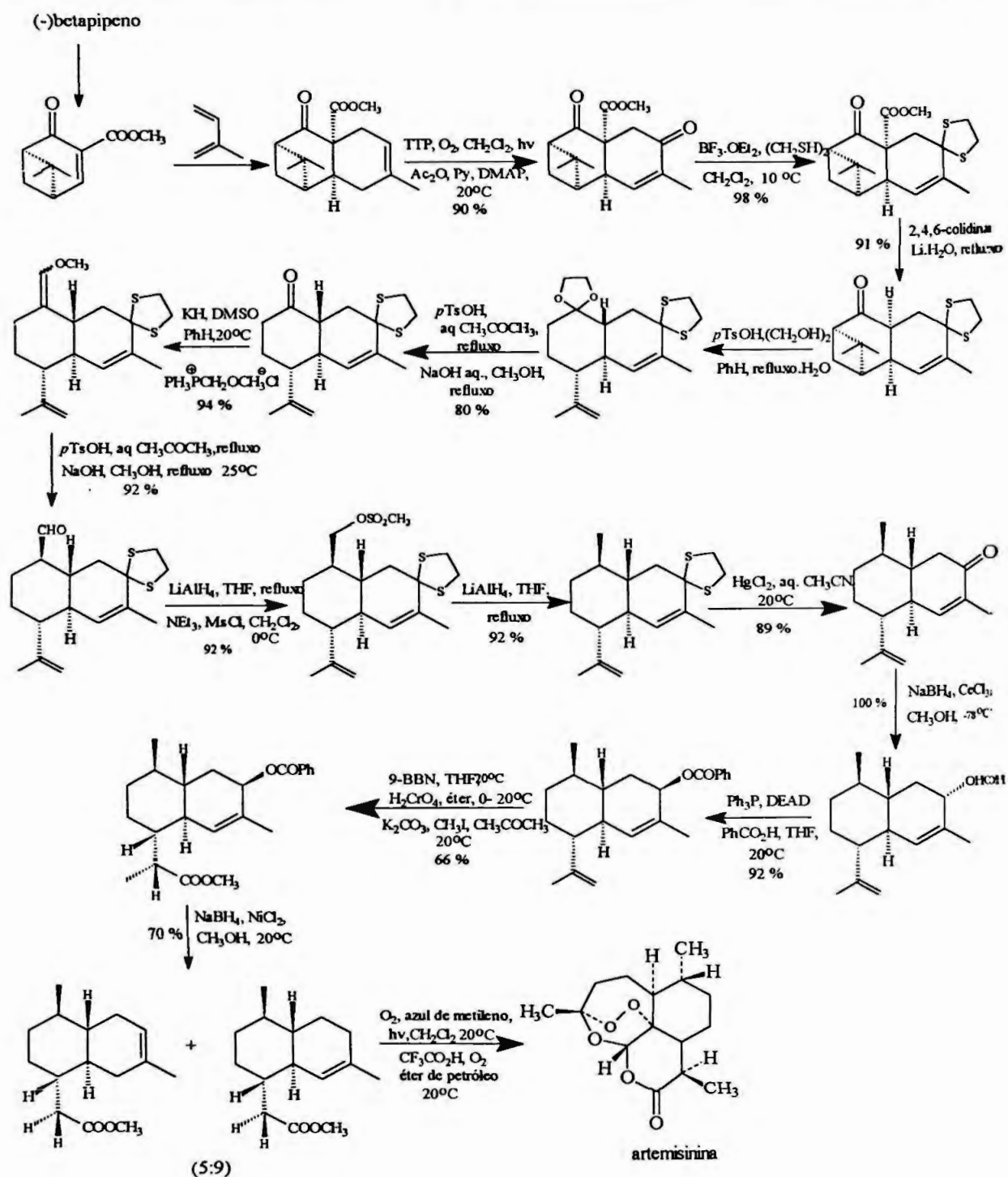


FIGURA 29. Síntese da artemisinina a partir do (-)-β pipeno.

Outros constituintes da *Artemisia annua*, além da artemisinina, têm sido explorados na semi-síntese da artemisinina e compostos relacionados.

Entre eles, o ácido artemisínico (FIGURA 30), que é 8 a 10 vezes mais abundante que a artemisinina (Jung *et al.*, 1986).

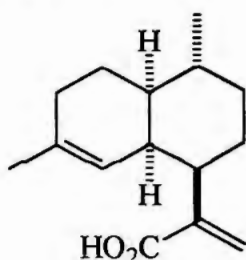


FIGURA 30. Estrutura do ácido artemisínico.

A síntese parcial da artemisinina, a partir do ácido artemisínico ou diidroartemisínico, foi relatada por vários autores (Roth e Acton, 1989; Roth e Acton, 1991; Lansbury e Nowak, 1992).

Embora alguns dos resultados obtidos tanto na síntese quanto na semi-síntese sejam interessantes, a fonte mais econômica para se obter artemisinina ou para sua conversão em artesunato, arteter ou artemeter continua sendo a extração da planta *Artemisia annua* (Casteel, 1996).

Na procura de novos derivados da artemisinina e considerando que a função endoperóxido constitui o grupo farmacofórico fundamental, Posner e seu grupo de pesquisa planejaram vários endoperóxidos estruturalmente simples que têm mostrado alta atividade antimalárica *in vitro* (Posner *et al.*, 1992; Posner *et al.*, 1996; Posner e O'Dowd, 1998; Posner *et al.*, 1998).

Estes peróxidos foram preparados em dois passos a partir de arilmetilcetonas facilmente disponíveis (FIGURA 31). Estes autores avaliaram a atividade antimalárica *in vitro*, estabeleceram correlações de relação estrutura atividade e o possível mecanismo de ação destes compostos por meio da formação de radicais livres (Posner e O'Dowd, 1998; Posner *et al.*, 1998).

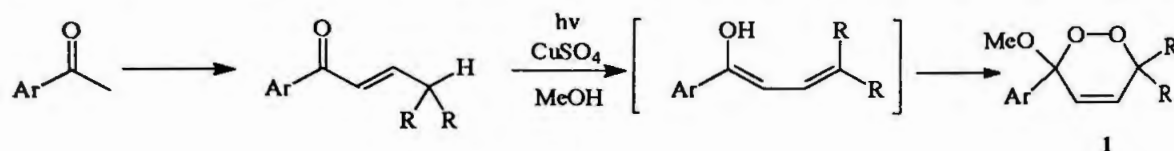


FIGURA 31. Síntese de peroxicetais cíclicos por Posner e colaboradores.

O resultado da atividade biológica assim como dos rendimentos obtidos para cada composto são relatados na TABELA 1.

TABELA 1. Valores de IC_{50} dos peroxicetais cíclicos sintetizados por Posner e colaboradores.

Peroxi cetal	Ar	R,R	IC_{50} , (nM)	Rendimento (%)
1a	Ph	Me, Me	1100	19
1b	Ph	cicloptila	190	24
1c	Ph	cicloexila	280	20
1d	Ph	cicloptila	220	14
1e	4-MeOPh	ciclobutila	160	6
1f	4-MeOPh	cicloexila	180	61
1g	4-MeOPh	cicloptila	210	29
1h	3,4,5-(MeO) ₃ Ph	cicloptila	120	13
1i	4-CF ₃ OPh	cicloptila	61	26
1j	4-ClPh	cicloptila	58	23
1k	4-FPh	cicloptila	85	31
1l	4-MeSPh	cicloptila	78	10
1m	4-MeS(O ₂)Ph	cicloptila	31	100
1n	4-EtPh	cicloptila	180	23
1o	4-MeSPh	cicloexila	160	34
1p	4-MeS(O ₂)Ph	cicloexila	56	93
1q	4-O ₂ NPh	cicloexila	46	4
1r	4-ClPh	cicloexila	100	23
1s	4-FPh	cicloexila	200	24
1t	4-F ₃ CPh	cicloexila	140	16
artemisinina			8.4 ± 1.2	

Sete peroxicetais cíclicos mostraram valores de IC_{50} entre 31-85 nM contra *P. falciparum*.

*PLANEJAMENTO SINTÉTICO DOS
NOVOS DERIVADOS*

IV. PLANEJAMENTO SINTÉTICO DOS NOVOS DERIVADOS

1. Generalidades sobre o planejamento de fármacos.

Várias são as estratégias utilizadas no planejamento de novos protótipos e, conseqüentemente, de novos fármacos. Uma das mais modernas consiste no planejamento assistido por computador, conhecido também na literatura como planejamento racional. Para desenvolver este tipo de planejamento é importante conhecer a interação entre a estrutura do ligante e do sítio receptor (enzima, canal iônico, proteína, etc) (Cohen, 1996; Barreiro e Manssour, 2001).

Quando a estrutura do receptor é conhecida, o planejamento é direto. Baseado na estrutura da macromolécula, determinada por cristalografia de raios X, estabelece-se a melhor complementaridade geométrica e eletrônica entre o ligante e seu receptor. Por outro lado, podem ser modificados a estrutura do ligante, seus substituintes e sua conformação, assim como é possível simular as condições mais favoráveis para a interação ("docking"). Este planejamento direto é limitado pelo pouco conhecimento que se tem das estruturas tridimensionais de sítios receptores. Quando isto acontece, a abordagem é feita através de um planejamento indireto. Neste caso, compara-se um conjunto de ligantes seletivos para um receptor determinado visando revelar a informação molecular que os compostos tenham em comum; na realidade seria determinar o grupo farmacofórico (Cohen, 1996).

O planejamento assistido por computador tem valor limitado. Os estudos de modelagem molecular somente identificam novos ligantes de sistemas biológicos já conhecidos. Por outro lado os estudos quantitativos

de relação estrutura-atividade (QSAR) somente conseguem otimizar series já descobertas (Cohen, 1996).

Na atualidade, uma das abordagens mais promissoras na pesquisa de novos compostos antimaláricos é o planejamento de novos protótipos a partir de inibidores de proteases que interfiram no processo de digestão da hemoglobina pelo parasita e conseqüentemente na sua fonte de nutrientes. As estruturas das proteases plasmepsinas (I e II) e da falcipaina têm sido determinadas por homologia com proteases humanas. A partir deste conhecimento, usando a modelagem molecular e química combinatória como ferramentas, têm sido planejados novos protótipos peptídicos estruturalmente relacionados com os substratos ou inibidores naturais destas enzimas (Ring *et al.*, 1993; Domínguez *et al.*, 1997; Westling *et al.*, 1997; Haque *et al.*, 1999; Radding, 1999).

Destarte, embora o planejamento racional seja um caminho promissor na procura de alternativas para o tratamento da malária, ainda permanece, como estratégia na pesquisa dos novos compostos antimaláricos, a melhoria dos fármacos já existentes (Barreiro e Manssour, 2001).

O objetivo desta estratégia consiste em partir de princípios ativos já conhecidos e preparar, através de diferentes modificações químicas, novas moléculas visando aumentar a potência, melhorar a especificidade na ação, melhorar o perfil de segurança, ou que a formulação seja de melhor manuseio e conseqüentemente melhor aceita pelo paciente. Este processo é conhecido como modificação molecular (Korolkovas, 1988; Barreiro e Manssour, 2001).

A modificação molecular é método de planejamento em que a partir de uma substância com atividade reconhecida, empregada ou não na terapêutica, são feitas modificações químicas permanentes em sua estrutura obtendo-se derivados com propriedades físico-químicas

alteradas, que muitas vezes, lhes conferem atividade biológica modificada ou superior em relação à substância de partida. No caso dos compostos antimaláricos um dos principais objetivos da modificação molecular é obter moléculas eficazes contra cepas de *Plasmodium* resistentes aos fármacos utilizados na quimioterapia (Korolkovas, 1988; Barreiro e Manssour, 2001).

Este tipo de planejamento tem várias vantagens: maior probabilidade de obter moléculas com propriedades farmacológicas semelhantes ou superiores às do protótipo, economia de tempo e dinheiro na síntese dos novos compostos, já que podem ser aproveitadas as mesmas rotas sintéticas, fornecer dados importantes para a elucidação da relação estrutura-atividade e permitir que possam ser aproveitados os mesmos testes biológicos utilizados para o protótipo (Korolkovas, 1988).

A hibridação molecular é um dos processos gerais de modificação molecular amplamente empregado no planejamento de novos ligantes. Consiste na associação de duas moléculas, com características estruturais e terapêuticas diferentes através de uma ligação covalente. Esta ligação não quebraria no organismo e a molécula agiria como molécula única no sítio receptor (Korolkovas, 1988).

Conceitos mais recentes de hibridação consideram este processo como a conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em única nova molécula (Barreiro e Manssour, 2001).

2. Planejamento sintético dos novos compostos antimaláricos

Devido ao grande aumento da resistência, envolvendo os compostos quinolínicos e antifolatos, na maior parte das áreas onde o *Plasmodium falciparum* é endêmico, existe necessidade iminente de planejar moléculas com novas estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação (A-Karim *et al.*, 1991; Geenwood, 1995; Berger, 1998; Durreheim, 1999; Mons *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 1998; Trigg e Kondrachine, 1998).

Nas últimas duas décadas, poucos compostos novos têm sido comercializados: aminoálcoois (mefloquina e halofantrina) e trioxanos sesquiterpênicos (derivados da artemisinina) e naftoquinonas (atovaquona), sendo cada vez mais curto o período entre a descoberta e sínteses dos compostos e o aparecimento de cepas resistentes (Mockenhaupt, 1995; Noronha *et al.*, 2000).

Atualmente, a mefloquina constitui um dos fármacos mais utilizados na terapêutica do tratamento da malária, embora existam vários estudos que relatam a existência de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes em diferentes partes do mundo (Smrkovski *et al.*, 1985; Suebsaeng *et al.*, 1986; Childs *et al.*, 1991; Karbawang *et al.*, 1994; Mockenhaupt, 1995; Noronha *et al.*, 2000). A hipótese mais aceita com relação a seu mecanismo de ação está relacionada com a inibição da hemepolimerase ou da formação de complexo tóxico com o heme durante o processo de digestão da hemoglobina no eritrócito pelo parasita (Ginsburg e Krugliak, 1992; Casteel, 1996; Raynes, 1999). Os estudos de relação estrutura-atividade revelaram o anel quinolínico como parte fundamental do grupo farmacofórico desta molécula (Korolkovas, 1988; Barreiro e Manssour Fraga, 2001).

Por outro lado, a artemisinina e seus derivados constituem fármacos novos de potencial promissor na luta contra a malária. Suas características

estruturais, bem peculiares, revelam o grupo endoperóxido como essencial na atividade antimalárica mediada através da formação de radicais livres, espécies reativas, capazes de alquilar proteínas essenciais para o parasita (Krungrarai e Yuthavong, 1987; Meshnick *et al.*, 1991, Zhang *et al.*, 1992 Meshnick *et al.*, 1993).

Considerando que tanto a mefloquina quanto a artemisinina agem por mecanismos de ação diferentes e que a associação destes fármacos é eficaz no tratamento da malária, nossa estratégia visa à obtenção de moléculas híbridas, contendo um grupo peróxido (presente na artemisinina e derivados) e um grupo quinolínico (presente na mefloquina). Espera-se então que a molécula resultante seja capaz de combinar no seu mecanismo de ação ambos efeitos, resultando em molécula muito mais ativa.

Baseada nesta mesma idéia uma nova molécula já foi planejada, sintetizada e avaliada farmacologicamente: o DU-1102, trioxaquina obtida por ligação covalente de uma 4-aminoquinolina e um grupo peróxido (FIGURA 32). O composto revelou ser muito ativo frente a isolados de *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} = 43$ nmol/L) (Dechy-Cabaret *et al.*, 2000; Basco *et al.*, 2001).

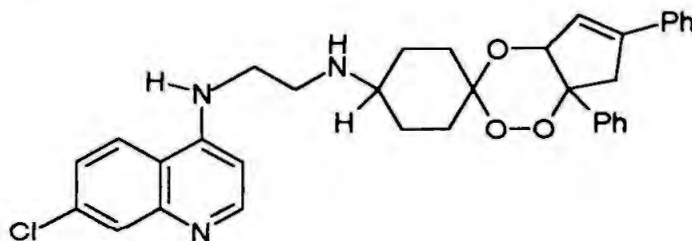
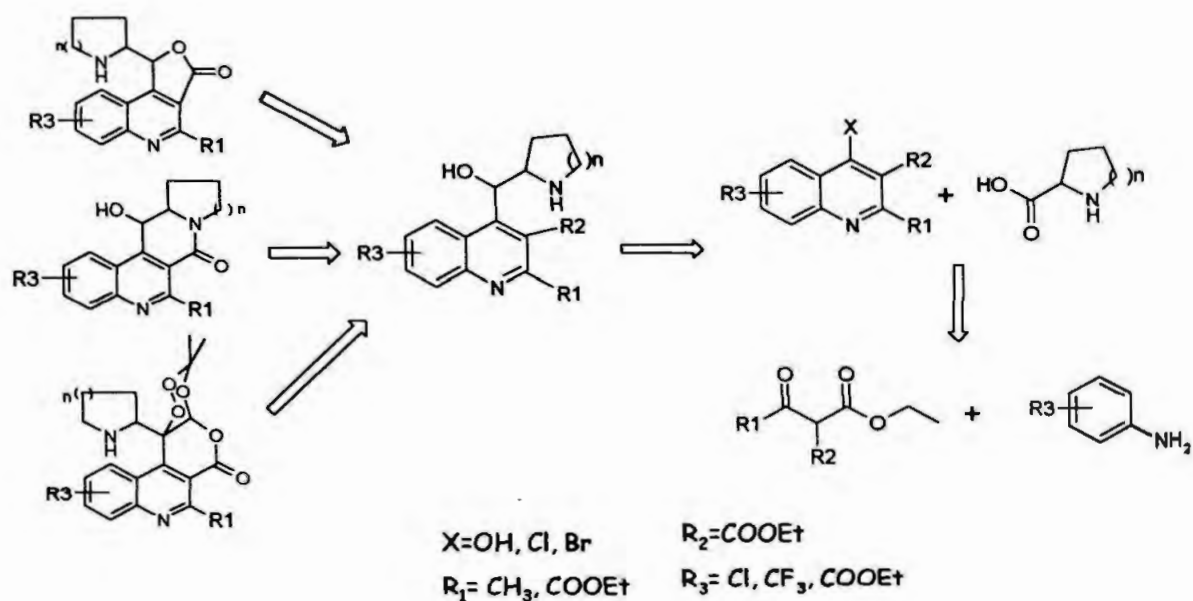


FIGURA 32. Estrutura química do DU-1102.

O esquema retrosintético do planejamento dos novos derivados é representado no ESQUEMA 1.



ESQUEMA 1

O planejamento sugere a introdução de grupo lactama na molécula, já que além do grupo endoperóxido ser essencial na atividade antimalárica, alguns estudos de relação estrutura-atividade já substituíram o átomo de oxigênio lactônico da artemisinina por nitrogênio. Esta conversão do grupo lactona em lactama (substituição isostérica) deu origem a vários derivados mais ativos que a artemisinina (Torok e Ziffer, 1995b; Avery *et al.*, 1995).

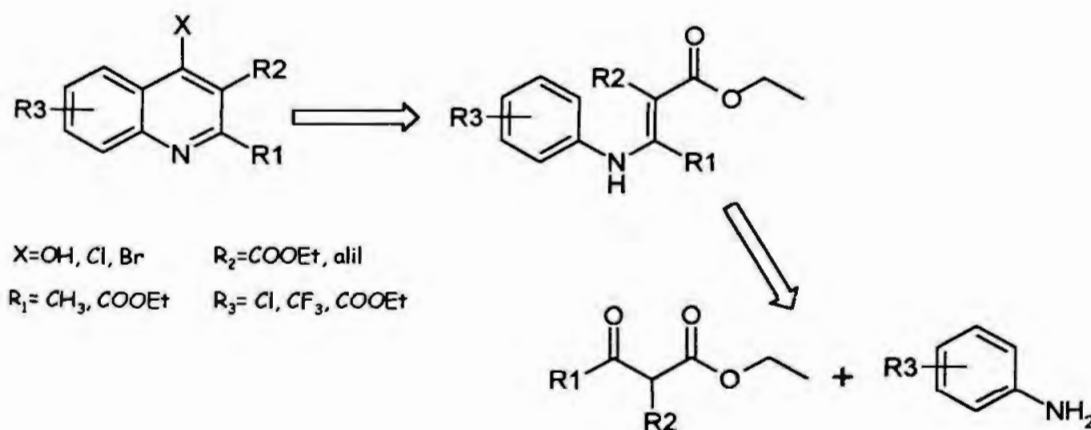
Por outro lado, sugere-se que o grupo básico (anel de piperidina) possa ser transformado em um anel de pirrolidina como na normefloquina (FIGURA 14). A normefloquina mostrou ser de potência comparável com a mefloquina em estudo com camundongos infectados com *Plasmodium berghei* (Adam, 1992).

Visando uma rota sintética mais econômica, a síntese das novas moléculas planejadas foi dividida em duas etapas:

1. Síntese da fração quinolílica funcionalizada.

2. Síntese da fração peróxido, lactona ou lactama ligada à fração quinolínica.

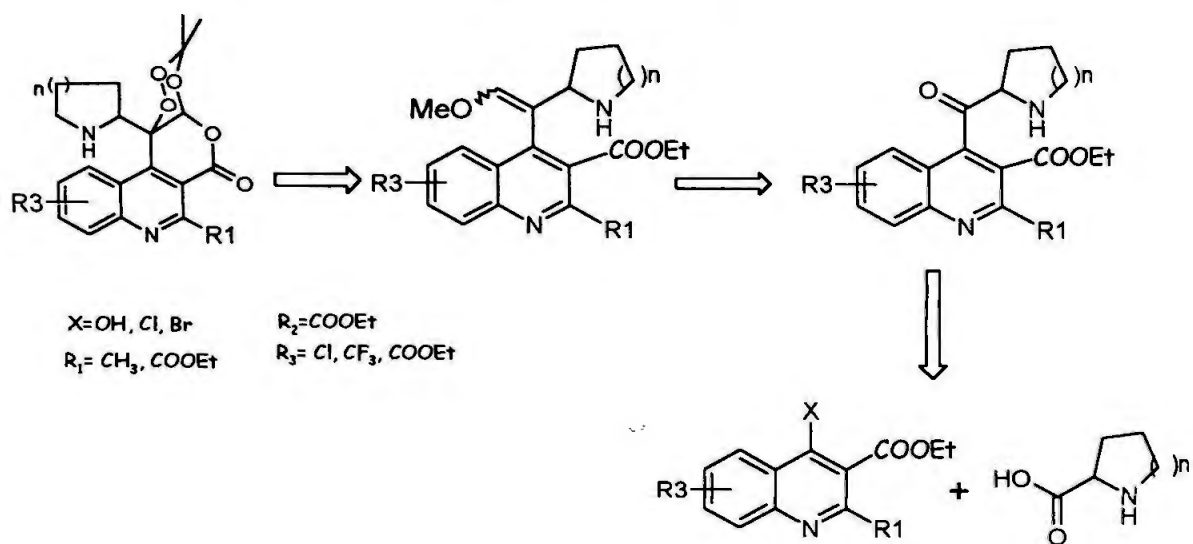
A síntese da fração quinolínica envolveu, por sua vez, várias etapas: síntese das enaminas ou de fenilaminometilenomalonatos, síntese das 4-hidroxiquinolinas e síntese das 4-haloquinolinas (ESQUEMA 2).



ESQUEMA 2

A síntese da fração peróxido na molécula foi planejada a partir da introdução de um alceno na estrutura por meio da reação de Wittig. Isto seria possível a partir da síntese prévia de uma cetona por reação de Grignard ou utilizando derivados de estanho.

A formação do grupo peróxido a partir do alceno foi idealizada por meio de ozonólise ou por irradiação com oxigênio singlete a -78°C segundo as condições já descritas na literatura (Avery *et al.*, 1989; Jung *et al.*, 1991; Posner *et al.*, 1992; Posner *et al.*, 1994) (ESQUEMA 3).



ESQUEMA 3

MATERIAIS E MÉTODOS

V. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1 Fármacos

- Cloridrato de mefloquina (MEPHA)
- Difosfato de cloroquina (Fundação para o remédio popular, FURP)

1.2 Reagentes e solventes (parte sintética e analítica)

- 3 trifluormetil-5-cloroanilina (ALDRICH)
- 3-cloroanilina (MERCK)
- Acetato de etila (MERCK)
- Acetilpiridina (ALDRICH)
- Acetoacetato de etila (MERCK)
- Ácido acético glacial (MERCK)
- Ácido clorídrico (MERCK)
- Ácido polifosfórico (ALDRICH)
- Ácido sulfúrico (MERCK)
- Ácido trifluoracético (ALDRICH)
- Álcool etílico absoluto (MERCK)
- Álcool isopropílico (MERCK)
- Álcool metílico absoluto (MERCK)
- Alumina neutra (MERCK)
- Anidrido acético (MERCK)
- Anilina (MERCK)
- Bicarbonato de sódio (SYNTH)
- Brometo de alila (MERCK)
- Butilítio 0,6 M (ALDRICH)
- Cianeto de cobre (MERCK)

- Cicloexanona (MERCK)
- Cloreto de benzoíla (MERCK)
- Cloreto de lítio (MERCK)
- Cloreto de sódio (MERCK)
- Cloreto de tionila (MERCK)
- Cloreto de tributilestanho (MERCK)
- Cloreto de zinco (LAPSFAR)
- Clorofórmio deuterado (ISOTEC)
- Clorofórmio p.a. (MERCK)
- Diclorometano (MERCK)
- Difeniléter (ALDRICH)
- Dimetilsulfóxido deuterado 99% (ISOTEC)
- Etanol (SYNTH)
- Éter etílico (MERCK)
- Formaldeído 37 % (SYNTH)
- Hexano (SYNTH)
- Hidróxido de lítio monoidratado (MERCK)
- Hidróxido de sódio (SYNTH)
- Iodeto de metila (MERCK)
- Iôdo (MERCK)
- Ligoína (SYNTH)
- Magnésio (FLUKA)
- Malonato de etila (MERCK)
- Oxibrometo de fósforo (MERCK)
- Oxicloreto de fósforo (MERCK)
- Parafina (SYNTH)
- Peneira molecular 5 Å (ALDRICH)
- Piridina (MERCK)

- Sódio metálico
- Sulfato de cálcio (MERCK)
- Sulfato de sódio anidro (NUCLEAR)
- Tetraidrofurano (SYNTH)
- Tolueno (SYNTH)
- Tribrometo de fósforo (ALDRICH)
- Trietilamina (MERCK)
- Trifenilfosfina (ALDRICH)
- Trióxido de cromo (MERCK)

Outros Materiais

- Cromatofolhas Al TLC, Sílica-gel 60 F254 (MERCK)
- Sílica-gel 60, tamanho de partícula 0,063-0,2000 mm (MERCK)

Todos os solventes comerciais utilizados foram previamente secos e purificados antes do uso, segundo os padrões estabelecidos pela literatura (Perrin *et al.*, 1980).

1.3 Reagentes e solventes (Parte Biológica)

- Bicarbonato de sódio (MERCK)
- Gentamicina (Laboratório Schering do Brasil)
- Hepes (Ácido *N*-[2-hidroxi-etil]piperazina-*N'*-2-etanosulfônico) (SIGMA)
- Hipoxantina (SIGMA)
- Nujol (Schering Plough S/A)
- RPMI 1640 (SIGMA)
- Sorbitol (SIGMA)

1.4 Equipamentos (Parte sintética e analítica)

- Aparelho de ponto de fusão Büchi Modelo Capilar
- Balança analítica Mettler Modelo AE 163
- Balança técnica Marte modelo AS5500C
- Cromatógrafo a gás HP 6890
- Espectrômetro Infravermelho BOMEM modelo Serie Michelson
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker ADPX-300
- Lâmpada de radiação ultravioleta 254/365 nm SPECTROLINE; modelo NF-260C para revelação de cromatograma
- Rotaevaporador R-114 Büchi
- Estufa para secagem Fanem modelo 515C
- Forno Kugelrohr Büchi modelo GKR-51
- Bomba de Seringa Orion modelo 341 B
- Aparelho de ultra-som modelo USC 700, Frequência 40 kHz, Potência 100 W
- Forno de microondas doméstico Electrolux modelo Me27f, 2450 MHz

• 1.5 Equipamentos (Parte biológica)

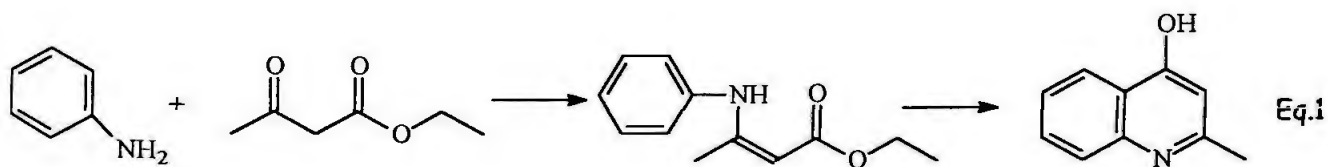
- Fluxo Laminar Veco, Modelo Vifs 12
- Estufa de cultura Fanem Ltda, Modelo 002CB
- Centrífuga FANEM
- Balança Analítica Apollo Metler A E163
- Microscópio Óptico Jenamed

2. Métodos

2.1 Síntese das 4-hidroxiquinolinas

Para preparar as 4-hidroxiquinolinas foram sintetizadas previamente as enaminas correspondentes. A preparação das enaminas utilizando drierite (sulfato de cálcio) foi baseada na metodologia descrita por Conrad-Limpach em 1887 e a preparação das enaminas utilizando alumina neutra foi baseada na metodologia de Brandt e colaboradores, 1991. O anel quinolínico foi preparado por ciclização térmica utilizando difeniléter (Hauser e Reynolds, 1948; Smith, 1994; March, 1992).

2.1.1 Preparação da 2-metil-4-hidroxiquinolina (equação 1)



Preparação do 3-(*N*-fenilamino)-butenoato de etila

Procedimento 1

Em balão de 250 mL, munido de condensador de refluxo e tubo secante, contendo 100 mL de etanol absoluto, foram adicionados anilina (100 mmol; 9,31 g) e acetoacetato de etila (100 mmol; 13,01 g). Posteriormente, foram colocadas 35 g de drierite e algumas gotas de ácido acético glacial como catalisador. foi mantida sob refluxo e com agitação constante durante 48 horas. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia gasosa. A mistura reacional foi filtrada e concentrada por

evaporação do solvente. A enamina obtida foi destilada sob pressão reduzida (0,1 mm Hg) e o produto foi analisado por RMN ^1H , RMN ^{13}C .

Procedimento 2

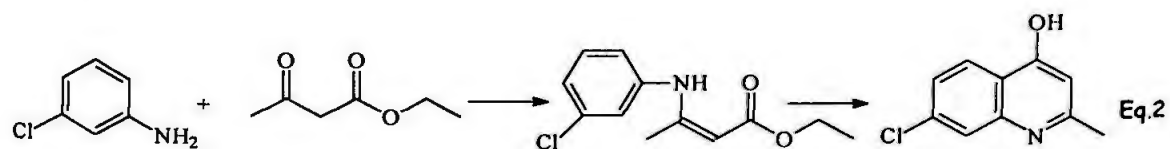
Em balão de 250 mL munido de condensador de refluxo foram colocados acetoacetato de etila (100 mmol; 13,01 g), anilina (100 mmol; 9,3 g) e 40 g de alumina neutra. A mistura reacional foi aquecida a 80 °C durante 24 horas. O acompanhamento da reação foi realizado por cromatografia gasosa. O resíduo foi lavado com clorofórmio, filtrado e o solvente evaporado. A enamina obtida foi destilada por pressão reduzida (0,1 mm Hg) e o produto final foi analisado por RMN ^1H , RMN ^{13}C .

Ciclização do 3-(*N*-fenilamino)-butenoato de etila

Procedimento

Em balão de 100 mL de três bocas, munido de termômetro, funil de adição e condensador de refluxo foram colocados 70 mL de difeniléter. O difeniléter foi aquecido à temperatura de 250 °C utilizando manta esférica. Em seguida, foi adicionado rapidamente o 3-(*N*-fenilamino)-butenoato de etila (57 mmol; 9,06 g). Após 2 horas de reação, a mistura foi mantida com agitação à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi lavada com hexano. Foi formado pó amarelo, que foi lavado várias vezes com hexano, filtrado e finalmente cristalizado de mistura de água e etanol (2:1). O produto puro foi analisado por RMN ^1H , RMN ^{13}C , espectrometria de infravermelho, ponto de fusão e análise elementar.

2.1.2 Preparação da 2-metil-4-hidroxi-7-cloroquinolina (equação 2)



Preparação do 3-(*N*-3-clorofenilamino)-butenoato de etila

Procedimento

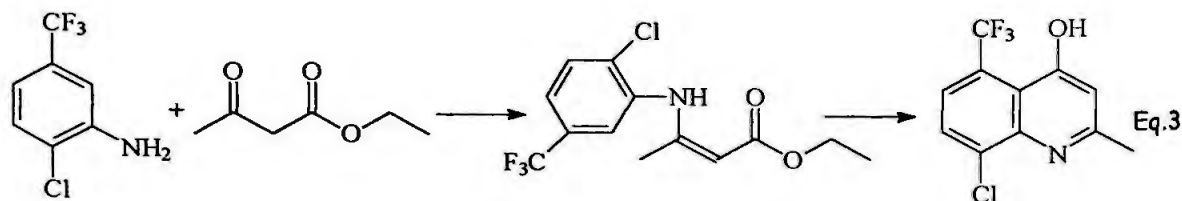
Em balão de 100 mL foram colocados acetoacetato de etila (100 mmol; 13,01 g) e *m*-cloroanilina (100 mmol; 12,76 g). Imediatamente foram adicionados 40 g de alumina neutra. A mistura resultante foi aquecida à temperatura de 80 °C durante 24 horas. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia gasosa. A mistura reacional foi extraída com clorofórmio, filtrada e o solvente evaporado. O produto foi destilado sob pressão reduzida (0,1 mmHg) e analisado por RMN ¹H.

Ciclização do 3-(*N*-3-clorofenilamino)-butenoato de etila

Procedimento

Em balão de três bocas munido de condensador de refluxo, funil de adição e termômetro foram aquecidos 50 mL de difeniléter à temperatura de 250 °C. Foi adicionado rapidamente 3-(*N*-3-clorofenilamino)-butenoato de etila (50 mmol; 10,57 g). Depois de uma hora e meia de reação, a mistura foi esfriada à temperatura ambiente e lavada com hexano. O sólido amarelo separado por filtração foi lavado várias vezes com hexano, filtrado e cristalizado de mistura de água e etanol (2:1). O produto cristalizado foi analisado por RMN ¹H, RMN ¹³C e espectrometria de infravermelho, ponto de fusão e análise elementar.

2.1.3 Preparação da 2-metil-4-hidroxi-5-trifluorometil-8-cloroquinolina (Equação 3)



Preparação do 3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-butenoato de etila.

Procedimento

Em balão de 100 mL foram colocados acetoacetato de etila (100 mmol; 13,01 g), 2-cloro-5-trifluoranilina (100 mmol; 19,56 g) e 40 g de alumina neutra. A mistura resultante foi aquecida a temperatura de 100 °C durante 48 horas. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia gasosa. A mistura resultante foi extraída com clorofórmio, filtrada de alumina e concentrada. O produto destilado de anilina foi caracterizado por RMN ¹H e espectrometria no infravermelho.

Ciclização do 3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-butenoato de etila

Procedimento

Em balão de três bocas munido de condensador de refluxo, funil de adição e termômetro foram aquecidos 50 mL de difeniléter à temperatura de 250°C. Em seguida foi adicionado rapidamente 3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-butenoato de etila (50 mmol; 15,38 g). Depois de uma hora e meia de reação a mistura foi esfriada à temperatura ambiente.

O sólido formado foi lavado várias vezes com hexano. O produto final foi analisado por RMN ^1H .

2.1.4 Preparação da 2-trifluormetil-4 hidroxiquinolina

O trifluoroacetato de etila empregado como derivado dicarbonílico foi preparado previamente no laboratório segundo a metodologia descrita por Burdon e Mcloughlin, em 1964. A esterificação do ácido trifluoroacético foi realizada via cloreto de ácido (Vogel, 1948).

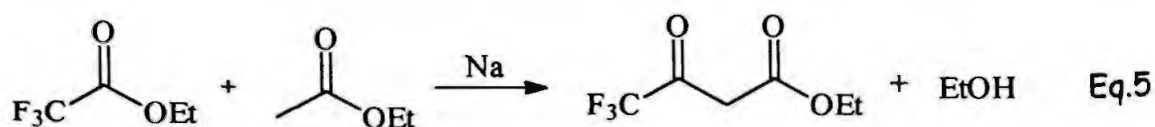
2.1.4.1 Preparação do trifluoroacetato de etila (Equação 4)



Procedimento

Em balão de duas bocas de 100 mL munido de dedo frio foram colocados ácido trifluoroacético (0,25 mol; 19,26 mL) e etanol seco (0,25 mol; 36,45 mL). A solução foi esfriada a $-40\text{ }^\circ\text{C}$. Foi adicionado, vagarosamente via seringa, cloreto de tionila (0,25 mol; 18,23 mL). A mistura foi agitada durante 4 horas nestas condições. A mistura resultante foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio e, em seguida, com solução saturada de cloreto de sódio. O produto final foi purificado por destilação e caracterizado por RMN ^1H e RMN ^{13}C .

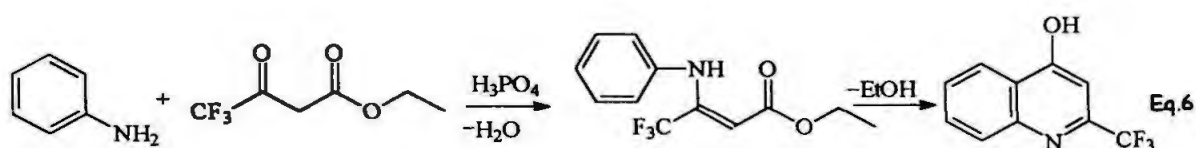
2.1.4.2 Preparação do trifluoroacetato de etila (Equação 5)



Procedimento

Em balão de 3 bocas de 250 mL munido de condensador de refluxo e funil de adição, foi colocado sódio metálico (0,14 atg; 3,35g). Foram adicionados rapidamente trifluoroacetato de etila (0,14 moles; 20,30 g) e acetato de etila (0,29 moles; 26,09 g). A reação é vigorosa e exotérmica. Em seguida foram colocados 100 mL de tetraidrofurano e a mistura de cor escura foi mantida em refluxo durante 14 horas. Transcorrido esse tempo, a mistura foi esfriada, diluída com 80 mL de éter etílico e lavada com 40 mL de solução de ácido sulfúrico 15%. A fase etérea foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada por evaporação do solvente. O produto final foi purificado por destilação a pressão reduzida (30 mmHg) e caracterizado por RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrometria de infravermelho.

Preparação da 2-trifluormetil-4-hidroxiquinolina (equação 6) (Steinacker e Joullié, 1965)



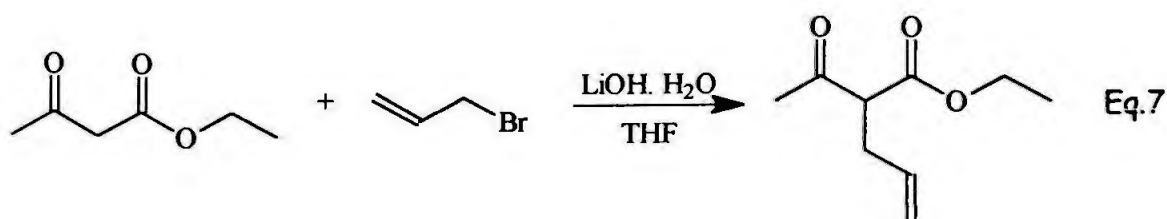
Procedimento

Em balão de três bocas munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram adicionados trifluoroacetato de etila (16,4 mmol; 3,02 g) e ácido polifosfórico (17 mL). A mistura foi agitada e aquecida a 100 °C. Foi adicionada, com auxílio de seringa, a anilina (19,7 mmol; 1,84 g). A reação foi mantida sob agitação à temperatura de 140-150 °C durante uma hora e trinta minutos. Após este tempo, a mistura foi esfriada à temperatura ambiente e logo em banho de gelo. Foi diluída com água e solução de NaOH 10%. O sólido bege formado foi coletado por filtração e dissolvido em 40 mL de uma solução 10% de NaOH fria. Pequenas quantidades de material insolúvel foram eliminadas por filtração e o filtrado foi acidificado até pH 5 com ácido acético glacial, formando assim um sólido que em seguida foi cristalizado de mistura de água e etanol (2:1). O produto final foi caracterizado por RMN ^1H , RMN ^{13}C , espectrometria no infravermelho e análise elementar.

2.1.5 Preparação da 2-metil-3-aliil-4-hidroxiquinolina

A síntese desta 4-hidroxiquinolina partiu da anilina e do β -cetoéster 2-acetil-4-pentenoato de etila. O éster alquilado foi preparado segundo a metodologia descrita por Antonioletti e colaboradores em 1992.

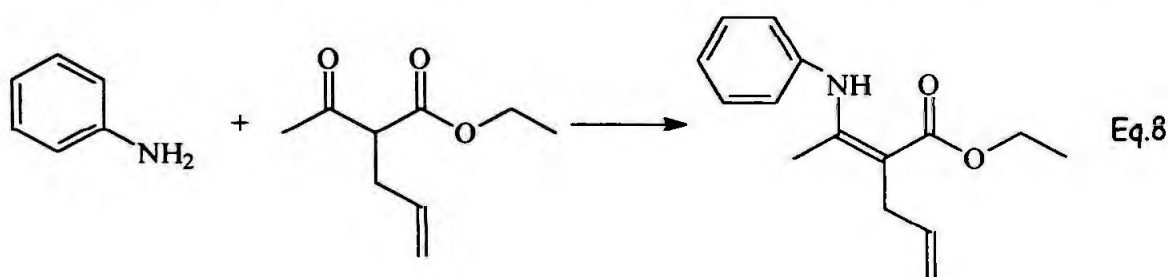
2.1.5.1 Preparação do 2-acetil-4-pentenoato de etila (Equação 7)



Procedimento

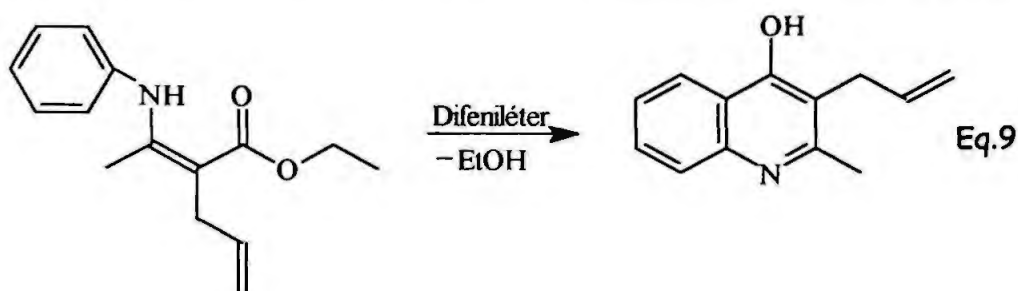
Em balão de duas bocas munido de condensador de refluxo e tubo secante foram adicionados acetoacetato de etila (100 mmol; 13,01 g) e hidróxido de lítio monoidratado (100 mmol; 4,20 g) em 40 mL de THF seco. A mistura foi aquecida durante uma hora à temperatura de 50 °C. A seguir, foi adicionado brometo de alila (100 mmol; 8,65 mL). A mistura reacional foi mantida à mesma temperatura e agitação constante durante 24 horas. A mistura resultante foi concentrada e logo depois extraída com éter etílico. O produto foi destilado por destilação sob pressão reduzida (16 mmHg). Foi caracterizado por RMN ¹H.

Preparação do 3-(*N*-fenilamino)-2-metil-3-alilbutenoato de etila (Equação 8)



Procedimento

Em balão de 25 mL munido de tubo secante, foram adicionados anilina (5 mmol, 0,41 g), 2-acetil-4-pentenoato de etila (5 mmol, 0,65 g) e 0,5 g de peneira molecular (5 Å). A mistura foi aquecida à temperatura de 90°C durante 3 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia gasosa e o produto destilado sob pressão reduzida (0,1 mmHg) e caracterizado por RMN ¹H.

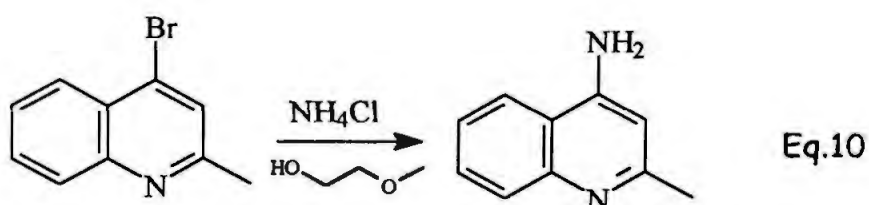
Ciclização do 3-(*N*-fenilamino)-2-metil-3-alilbutenoato de etila (Equação 9)

Procedimento

Em balão de três bocas munido de condensador de refluxo, funil de adição e termômetro foram aquecidos 10 mL de difeniléter à temperatura de 250 °C. Após isto, foi adicionado, rapidamente, 3-(*N*-fenilamino)-2-metil-3-alilbutenoato de etila (4,0 mmol; 0,98g). Depois de duas horas de reação a mistura foi esfriada à temperatura ambiente e lavada com hexano. O sólido marrom formado foi lavado várias vezes com hexano. Depois de separado por filtração, o produto foi cristalizado de mistura de água e etanol(2:1). O produto final foi caracterizado por RMN ^1H , e ponto de fusão.

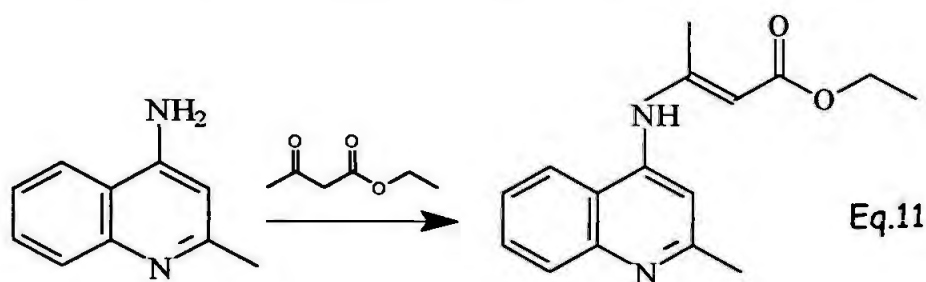
2.1.6. Síntese da 2-metil-4-aminoquinolina (Equação 10)

A 2-metil-4-aminoquinolina foi preparada segundo a metodologia descrita por Singh e colaboradores em 1971.



Procedimento:

Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo, foram adicionados 2-metil-4-bromoquinolina (1,5 mmol; 0,33 g) (preparado segundo o item 2.6.1.2) e cloreto de amônia (4,5 mmol; 0,24g) em 15 mL de monoclorometiléter. A mistura foi refluxada durante 24 horas à temperatura de 130 °C. O sal formado foi filtrado. O produto bruto foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com água e solução básica de NaOH e logo depois seca com sulfato de sódio anidro. O produto final foi caracterizado por RMN ^1H e RMN ^{13}C .

2.1.7 Preparação do 3-(*N*-2-metilquinolino)-butenoato de etila (Equação 11)**Procedimento 1 (Segundo a metodologia de Rechsteiner *et al.*, 1993)**

Em tubo de teflon foram colocados acetoacetato de etila (0,55 mmol; 0,072 g), 2-metil-4-aminoquinolina (0,50 mmol; 0,079 g) e 0,3 g de alumina neutra. A mistura reacional, colocada no centro do forno de microondas, foi submetida a irradiações durante 8 minutos, à potência de 540 W. O resíduo foi extraído com metanol, filtrado e o solvente evaporado. A produto foi analisado por RMN ^1H .

Procedimento 2

Idem ao procedimento 1. Foi utilizado neste caso tubo pyrex e potência de 630 W.

Procedimento 3

Em balão de 250 mL munido de condensador de refluxo foram colocados acetoacetato de etila (etila (0,55 mmol; 0,072 g), 2-metil-4-aminoquinolina (0,50 mmol; 0,079 g) e 0.3 g de alumina neutra. A mistura reacional foi aquecida a 80 °C durante 24 horas. O acompanhamento da reação foi realizado por cromatografia gasosa. O resíduo foi lavado com clorofórmio, filtrado e o solvente evaporado. O produto obtido foi analisado por RMN ¹H.

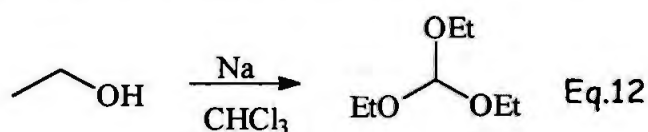
2.2 Síntese do 3-(*N*-3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila

O 3-(*N*-3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila foi preparado a partir da *m*-cloroanilina usando duas metodologias: 1- a partir do etoximetilenomalonato de etila (Fuson *et al.*, 1946; Parham e Reed, 1955); 2- a partir do ortoformato de etila, malonato de etila e cloreto de zinco (síntese "one pot") (Hermeecz *et al.*, 1992).

2.2.1 Preparação do etoximetilenomalonato de etila

Na preparação deste composto dicarbonílico foi necessária a preparação prévia do ortoformato de etila segundo a metodologia descrita por Sah e Ma, 1932.

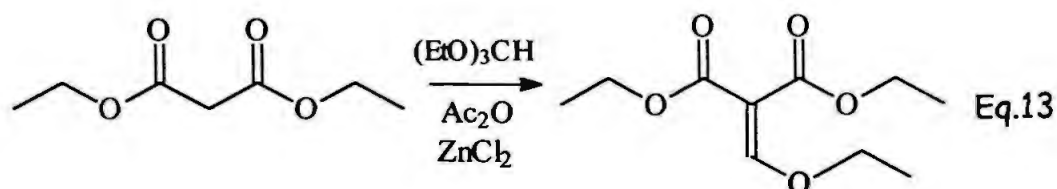
2.2.1.1 Preparação do ortoformato de etila (Equação 12)



Procedimento

Em balão de 1 L munido de condensador de refluxo e tubo secante colocou-se etanol seco (10,85 mol; 500 g) e foram adicionados lentamente 70 g de sódio metálico. Uma vez formado o etóxido de sódio, foi acrescentado o clorofórmio (12,56 mol; 150 g). A reação foi mantida sob agitação durante 24 horas. O cloreto de sódio formado foi separado por filtração e o filtrado destilado por destilação simples. O produto final foi caracterizado por RMN ^1H .

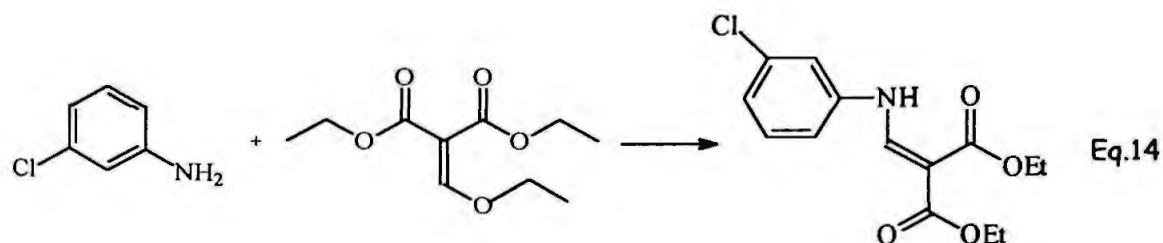
Preparação do etoximetilenomalonato de etila (equação 13)



Procedimento

Em balão de 250 mL munido de condensador de refluxo, foram adicionados anidrido acético (410 mmol; 41,86 g), ortoformato de etila (225 mmol; 33,35 g), malonato de etila (200 mmol; 32,03 g) e 0,012 g de cloreto de zinco como catalisador. A mistura foi aquecida durante 2 horas à temperatura de 102-115 °C. Posteriormente, foram adicionados anidrido acético (82,31 mmol; 8,40 g) e ortoformato de etila (45 mmol; 6,67 g). A mistura reacional foi agitada durante 19 horas à temperatura de 150-155 °C. O produto resultante foi destilado sob pressão reduzida (0,35 mmHg). O produto final foi analisado por cromatografia gasosa e caracterizado por RMN ^1H e espectrometria no infravermelho.

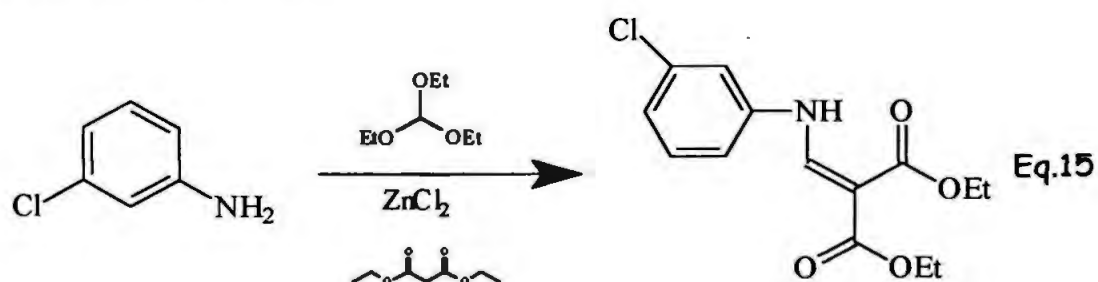
Síntese do 3-(*N*-3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (via etoximetilenomalonato de etila) (Equação 14)



Procedimento

Em balão de 25 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante foram misturados etoximetilenomalonato de etila (25 mmol; 5,40g) e *m*-cloroanilina (25 mmol; 3,19 g). A mistura foi agitada à temperatura de 130°C durante duas horas. O produto bruto foi destilado sob pressão reduzida (0,1 mm Hg) e caracterizado por RMN ¹H.

Síntese do 3-(*N*-3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (via "one pot") (Equação 15)

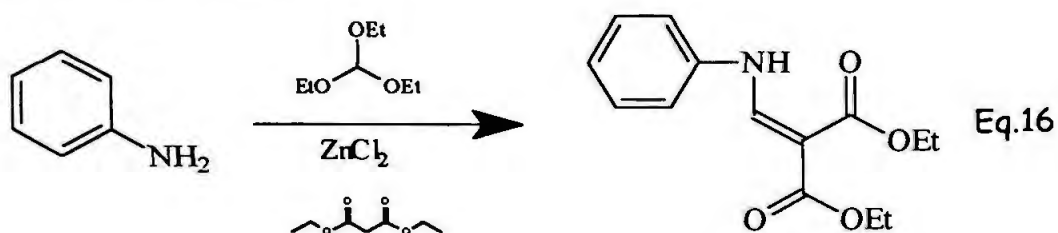


Procedimento

Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram adicionados: *m*-cloroanilina (10 mmol; 1,27g) e ortoformato de etila (5 mmol; 0,74 mmol). A mistura foi aquecida durante 2 horas à temperatura de 130 e 135°C. Posteriormente, foram adicionados ortoformato de etila (5 mmol; 0,74 mmol), malonato de etila, (5 mmol; 0,80 mmol) e 0,1 g de cloreto de zinco como catalisador. O aquecimento foi mantido durante

5 horas em temperatura constante. Numa terceira etapa, foram adicionados 5 mmol de malonato de etila. A mistura foi mantida nestas condições durante 15 horas. O produto bruto foi analisado por cromatografia gasosa e destilado de 3-cloroanilina. O produto final foi caracterizado por RMN ^1H .

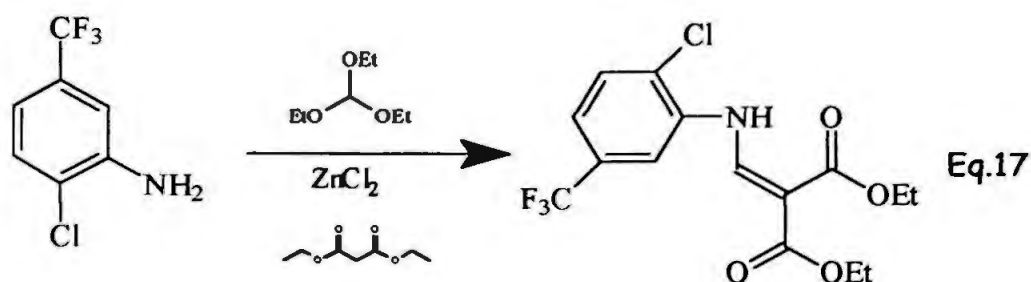
2.3 Preparação da 3-(*N*-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (via "one pot") (Equação 16)



Procedimento

Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram adicionados anilina (20 mmol; 1,86 g) e ortoformato de etila (10 mmol; 1,48 g). A mistura foi aquecida durante 2 horas à temperatura de 130 e 135 °C. Posteriormente, foram adicionados ortoformato de etila (10 mmol; 1,48 g), malonato de etila, (10 mmol; 1,60 g) e 0,2 g de cloreto de zinco como catalisador. A mistura foi aquecida durante 5 horas. Numa terceira etapa foram adicionados mais 10 mmol de malonato de etila. A mistura foi mantida nestas condições durante 15 horas. O produto bruto foi analisado por cromatografia gasosa e destilado de anilina residual. O produto final foi caracterizado por RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrometria de infravermelho.

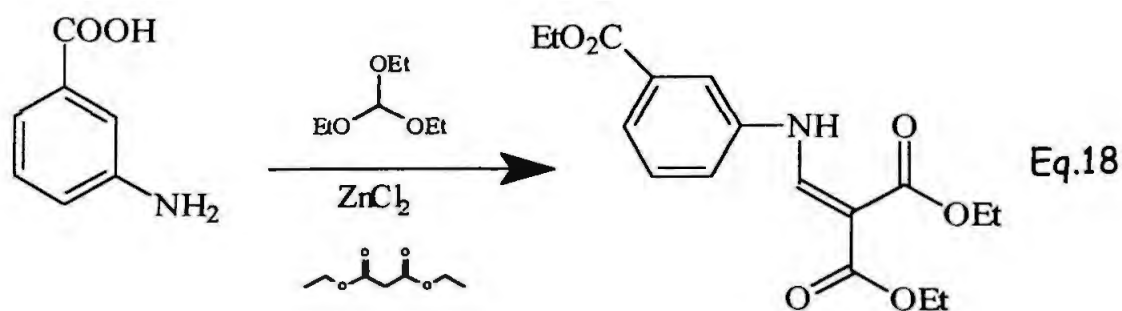
2.4 Preparação da 3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (via "one pot") (Equação 17)



Procedimento

Em balão de 250 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram colocados 2-cloro-5-trifluoroanilina (100 mmol; 19,56 g) e ortoformato de etila (50 mmol; 7,41 mmol). A mistura foi aquecida durante 2 horas à temperatura de 130 e 135°C. Posteriormente, foram adicionados ortoformato de etila (50 mmol; 7,41 g), malonato de etila, (50 mmol; 8,0 g) e 1 g de cloreto de zinco como catalisador. Foi mantido o aquecimento durante 5 horas em temperatura constante. Numa terceira etapa, foram adicionados mais 50 mmol de malonato de etila. A mistura foi mantida durante 15 horas em agitação a temperatura constantes. O produto bruto foi analisado por cromatografia gasosa e destilado da 2-cloro-5-trifluoroanilina residual. A caracterização final foi feita por RMN ^1H .

2.5 Preparação da 3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (via "one pot") (Equação 18)



Procedimento

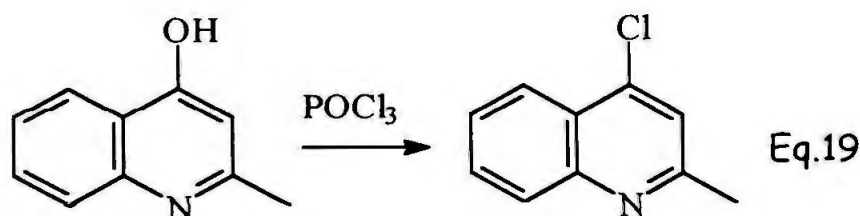
Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram adicionados ácido *m*-aminobenzóico (20 mmol; 2,74 g) e ortoformato de etila (10 mmol; 1,48 g). A mistura foi aquecida durante 2 horas à temperatura de 130 e 135 °C. Posteriormente, foram adicionados ortoformato de etila (10 mmol; 1,48 g), malonato de etila (10 mmol; 1,60 g) e 0,2 g de cloreto de zinco como catalisador. A reação foi aquecida durante 5 horas em temperatura constante. Numa terceira etapa, foram adicionados mais 10 mmol de malonato de etila aquecendo-se durante 15 horas. O produto final foi caracterizado por RMN ¹H, RMN ¹³C e espectrometria no infravermelho.

2.6 Síntese das 4-haloquinolinas

As cloroquinolinas foram sintetizadas por meio de uma adaptação da metodologia descrita por Antoine e colaboradores, 1972. Por outro lado, a síntese das bromoquinolinas foi realizada mediante adaptação da técnica descrita por Kaslow e Lawton, 1950.

2.6.1 A partir das 2-metil-4-hidroxiquinolinas

2.6.1.1 Síntese da 2-metil-4-cloroquinolina (Equação 19)

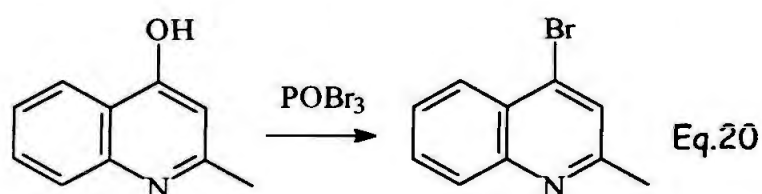


Procedimento

Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram adicionados 2-metil-4-hidroxiquinolina (9,48 mmol; 1,51 g;) e POCl₃

(161 mmol; 15 mL). A mistura foi aquecida durante 25 horas à temperatura de 100 °C. O excesso residual de POCl_3 foi eliminado por destilação simples. A mistura resultante foi extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água, solução saturada de bicarbonato de sódio e com solução saturada de NaCl. Foram secass com sulfato de sódio anidro e concentradas por evaporação. O produto bruto foi recristalizado de hexano e caracterizado por RMN ^1H , RMN ^{13}C e ponto de fusão.

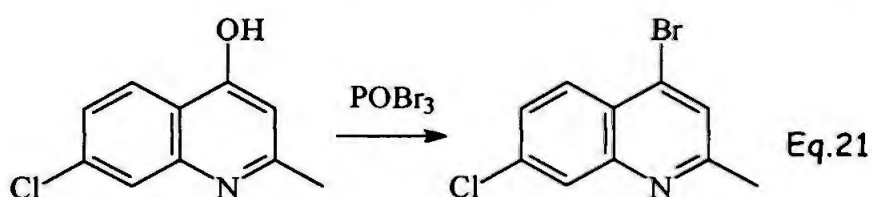
2.6.1.2 Síntese da 2-metil-4-bromoquinolina (Equação 20)



Procedimento

Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram aquecidos à temperatura de 135-140 °C, 2-metil-4-hidroxiquinolina (6,66 mmol; 1,05 g,) e POBr_3 (13,94 mmol, 3,99 g). Depois de 3 horas e meia, o excesso de POBr_3 foi eliminado por destilação sob pressão reduzida. A mistura foi extraída com ligroína, lavada com água, solução saturada de bicarbonato de sódio e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e logo concentrada por evaporação. O produto foi caracterizado por RMN ^1H , RMN ^{13}C e ponto de fusão.

2.6.1.3 Síntese da 2-metil-4-bromo-8-cloroquinolina (Equação 21)

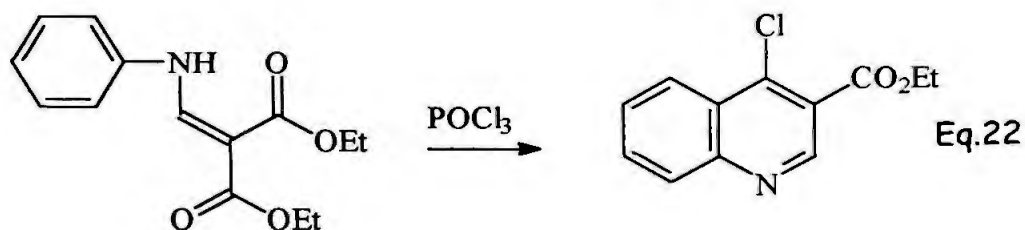


Procedimento

Em balão de 100 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram aquecidos, 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina (1,29 mmol; 0,25 g) e POBr_3 (0,50 g; 1,75 mmol) durante 3 horas e meia à temperatura de 135-140°C. Posteriormente, foi eliminado o excesso de POBr_3 por pressão reduzida. A mistura formada foi extraída com éter de petróleo, lavada com água, solução saturada de bicarbonato de sódio e solução saturada de NaCl. A fração orgânica foi seca com sulfato de sódio e concentrada por evaporação. O produto foi recristalizado de etanol e caracterizado por RMN ^1H e ponto de fusão.

2.6.2 A partir dos aminometilenomalonatos

2.6.2.1 Preparação da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina (Equação 22)

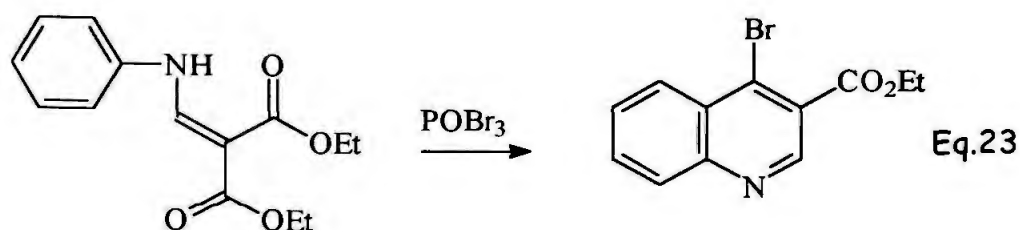


Procedimento

Em balão de 50 mL de duas bocas, munido de condensador de refluxo, foram adicionados 3-(*N*-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (3,8 mmol; 1,0g) e POCl_3 (96,5 mmol; 9,0 mL). A mistura foi refluxada durante 5 horas à temperatura de 106°C. O excesso de POCl_3 foi eliminado utilizando pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em 50 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi separada, lavada com solução de NaOH 10%, solução saturada de bicarbonato de sódio, solução saturada de NaCl. A fração orgânica foi coletada e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi concentrado por evaporação e o produto foi purificado por filtração através de coluna de sílica-gel usando como eluente hexano:acetato de etila

(2:1). O produto final foi caracterizado por RMN ^1H e RMN ^{13}C , análise elementar, espectrometria no infravermelho e ponto de fusão.

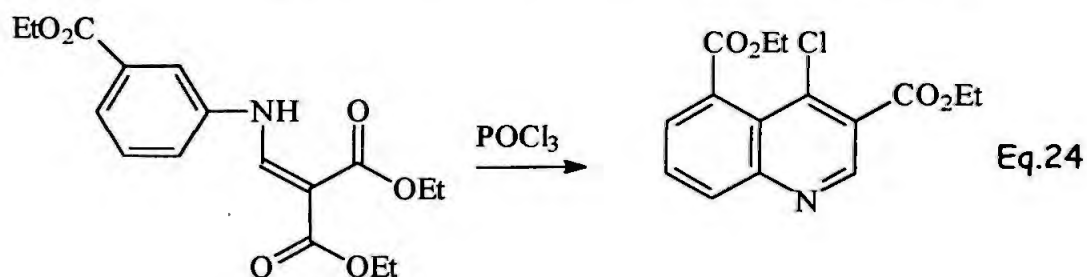
2.6.2.2 Preparação da 3-carbetoxi-4-bromoquinolina (Equação 23)



Procedimento

Em balão de 50 mL munido de condensador de refluxo e tubo secante, foram misturados o 3-(*N*-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (12,6 mmol; 3,31 g) e POBr_3 (42,27 mmol; 12,12 g). Depois de refluxar a mistura durante 17 horas à temperatura de $125\text{ }^\circ\text{C}$, o excesso de POBr_3 foi eliminado. Posteriormente, a mistura reacional foi extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de carbonato de sódio e cloreto de sódio. Foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada. O produto bruto resultante foi filtrado através de sílica-gel usando como eluente hexano:acetato de etila (2:1). O produto final foi caracterizado por RMN ^1H .

2.6.2.3 Preparação da 3,5-carbetoxi-4-cloroquinolina (Equação 24)



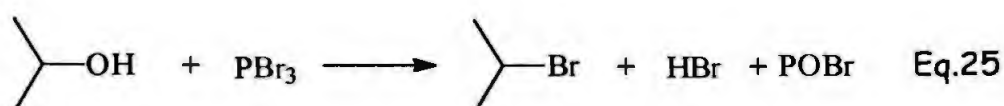
Procedimento

Em balão de 50 mL de duas bocas, munido de condensador de refluxo, foram misturados 3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (3,8 mmol; 1,17g) e POCl₃ (96,5 mmol; 9,0 mL). A mistura foi refluxada durante 5 horas à temperatura de 106 °C. Em seguida o excesso de POCl₃ foi eliminado. O resíduo foi dissolvido em 50 mL de clorofórmio, lavado com água, solução saturada de bicarbonato de sódio e com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada. O produto bruto resultante foi filtrado através de sílica-gel usando como eluente acetato de etila. O produto final foi caracterizado por RMN ¹H.

2.7 Síntese da cetona

2.7.1 Preparação da 3-carbetoxi-4-oxo-benzilquinolina (via Grignard) segundo uma modificação da metodologia descrita por Abarbri e colaboradores, 2000.

2.7.1.2 Preparação do brometo de isopropila (Equação 25)



Procedimento

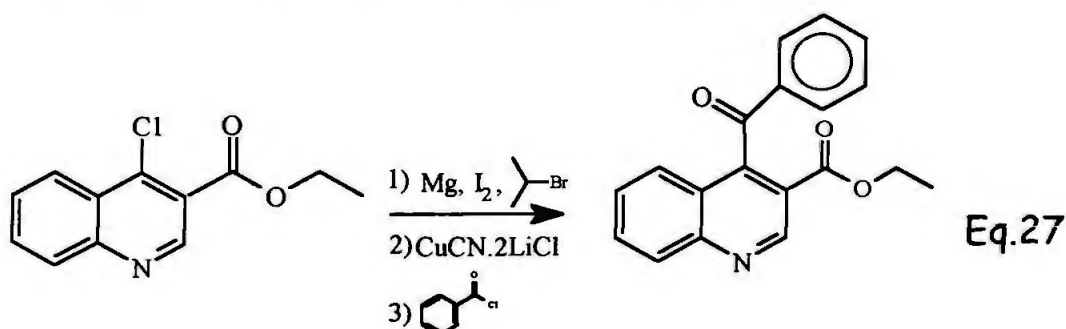
Em balão de 500 mL de 3 bocas munido de condensador de refluxo e funil de adição foi colocado álcool isopropílico (0,5 mol; 29,5 g). O balão foi esfriado a 15°C, e adicionou-se lentamente PBr₃ (0,25 mol, 67,67 g) durante meia hora. Logo depois da adição a reação foi mantida em temperatura ambiente durante três horas. O produto foi obtido por destilação simples. O produto final foi caracterizado por RMN ¹H.

2.7.1.3 Preparação do sal $\text{CuCN} \cdot 2\text{LiCl}$ (Equação 26)

Procedimento

Balão de três bocas contendo cloreto de lítio (1,34 mmol; 0,06g) foi aquecido durante 1 hora à temperatura de 120-130 °C sob pressão reduzida. O sal foi esfriado até temperatura ambiente e foram adicionados cianeto de cobre (0,67 mmol; 0,06g) e THF (2 mL), sob atmosfera de argônio. A reação exotérmica foi esfriada a -40 °C.

Síntese da 3-carbetoxi-4-oxo-benzilquinolina (Equação 27)

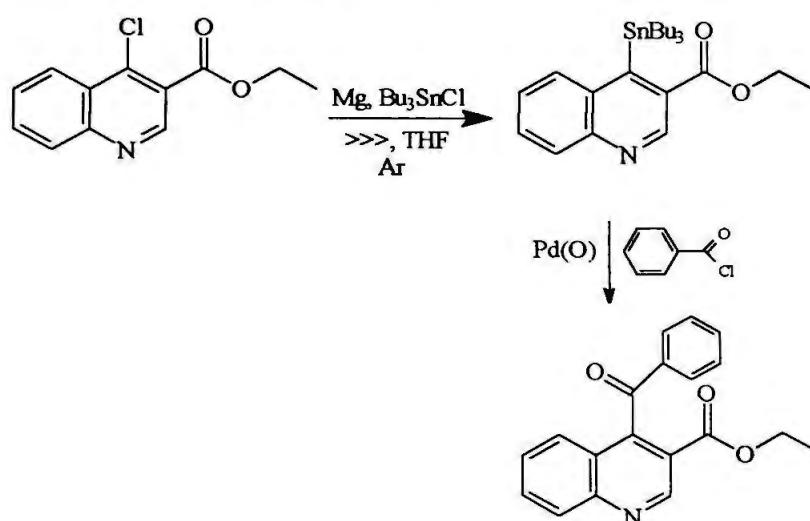


Procedimento

Em balão de 25 mL, sob atmosfera de argônio, foram adicionados magnésio (2,10 atg; 0,05 g) e alguns cristais de iodo em 10 mL de THF seco. Posteriormente, foi adicionado brometo de isopropila (1,9 mmol; 0,18 mL). A solução de isopropilmagnésio obtida foi adicionada vagarosamente à solução de 3-carbetoxi-4-cloroquinolina (1,74 mmol; 0,41g) em THF (5 mL) à temperatura de -40 °C, sob atmosfera de argônio. A mistura resultante foi agitada durante 30 minutos. Foi adicionado o $\text{CuCN} \cdot 2\text{LiCl}$ (2,3 mmol; 0,26 mL) preparado previamente. Após isto, foi adicionado cloreto de benzoíla

(2,3 mmol; 0,26 mL). A mistura foi agitada durante 5 horas à temperatura ambiente. O produto bruto foi caracterizado por RMN ^1H e espectrometria no infravermelho.

2.7.2 Preparação da 3-carbetoxi-4-oxo-benzilquinolina (via quinolinoestannana) (Segundo a metodologia descrita por Naruta e colaboradores, 1986)(Equação 28)



Eq.28

Preparação da 3-carbetoxi-4-tributilestanhoquinolina

Procedimento

Em balão de 25 mL foram colocados cloreto de tributilestanho (1,7 mmol; 0,46 mL), magnésio (2,2 mmol; 0,05 atg), e cristais de iôdo em 5 mL de THF. Adicionou-se, de forma lenta, uma solução de 4-cloro-3-carbetoxiquinolina (2 mmol; 0,47 g) em THF usando uma bomba de seringa. A reação foi realizada à temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio e com irradiação externa de ultra-som durante 90 minutos. O produto foi extraído com éter etílico e finalmente analisado por RMN ^1H .

2.7.3 Preparação da cetona a partir da 2-metil-4-bromoquinolina (via Grignard) (Equação 29)

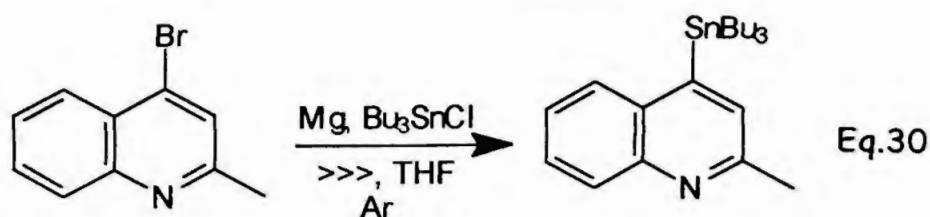


Procedimento

Em balão de 15 mL foram colocados magnésio (3,0 mmol; 0,07 atg), e cristais de iodo em 20 mL de THF. Posteriormente uma solução de 2-metil-4-bromoquinolina (1 mmol; 0,2 g) em THF previamente preparada, foi adicionada de maneira vagarosa sob atmosfera de argônio. Depois de 1 hora de reação a temperatura ambiente foi adicionado o cloreto de benzoíla (1,1 mmol; 0,15 g). Depois de duas horas a mistura reacional foi tratada com solução saturada de cloreto de amônio e extraída três vezes com éter. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e filtrada. O produto bruto foi analisado por RMN ^1H .

2.7.4 Preparação da cetona a partir da 2-metil-4-bromoquinolina. (via quinolinoestannana) (Segundo a metodologia descrita para alilestananas por Natura e colaboradores, 1986) (Equação 30)

Preparação da 2-metil-4-tributilestanhoquinolina

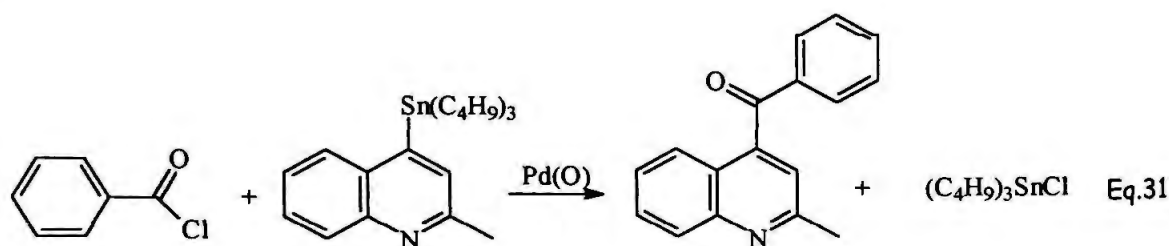


Preparação da 2-metil-4-tributilestanhoquinolina

Procedimento

Em balão de 25 mL foram colocados cloreto de tributilestanho (2,6 mmol; 0,7 mL), magnésio (3,41 mmol; 0,08 atg) e cristais de iodo em 20 mL de THF. Uma solução de 2-metil-4-bromoquinolina (3,1 mmol; 0,7 g) previamente preparada em THF, foi adicionada de maneira vagarosa à temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio e com irradiação externa de ultra-som. A reação foi mantida sob essas condições durante 3 horas e 20 minutos. À mistura reacional foi adicionada água e extraiu-se com éter etílico. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente rotoevaporado. O produto bruto foi purificado através de coluna cromatográfica. Foi usado hexano de forma exaustiva e logo depois acetato de etila. Analisou-se o produto final por RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Preparação da cetona (Equação 31)



Procedimento 1

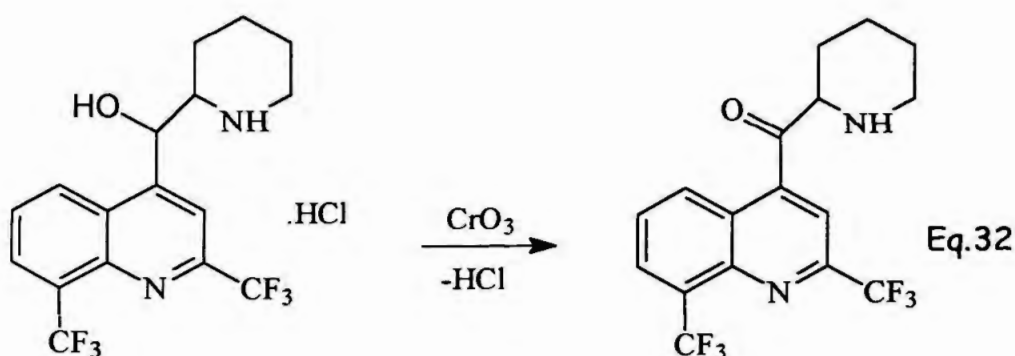
Em ampola de 6 mL foram colocadas quantidades equivalentes de cloreto de benzoila (1 mmol; 0,14 g) e da estanana (1 mmol; 0,42 g), em 1 mL de tolueno como solvente na presença de paládio de *tetrakis*-trifenilfosfina (0,01 mmol; 0,01 g) como catalisador. Antes de fechar a ampola a mistura foi borbulhada com argônio. Em seguida foi aquecida à temperatura de

140°C durante 16 horas. Transcorrido esse tempo, o solvente foi evaporado e a mistura analisada por CCD. O produto bruto foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando como eluente mistura de hexano-acetato (3:1). O produto foi analisado por RMN ^1H .

Procedimento 2

Idem ao procedimento 1. Foram utilizadas as mesmas quantidades. Somente foi utilizada temperatura de 80 °C.

2.7.5 Preparação do derivado cetônico da mefloquina. Segundo metodologia descrita por Chien e Cheng, 1973 (Equação 32).



Procedimento 1. Usando solução saturada de CrO_3

a) A partir da cloridrato de mefloquina

Em balão de 250 mL munido de tubo secante foi adicionado cloridrato de mefloquina (2,07g; 5 mmol) em 100 mL de ácido acético. Posteriormente, foi adicionada uma solução saturada de CrO_3 (2,0 g; 0,02 mmol). A mistura foi mantida, durante a noite, à temperatura ambiente. O excesso de agente oxidante foi destruído por adição de metanol. A mistura foi basificada com solução aquosa de hidróxido de sódio. O produto foi extraído com éter etílico. A fase orgânica foi lavada com solução de carbonato de sódio 5%, água e seca com sulfato de sódio anidro. Depois de filtrada, a fração etérea

foi concentrada e o produto cristalizado de metanol e água. O produto foi analisado por RMN ^1H e espectrometria no infravermelho.

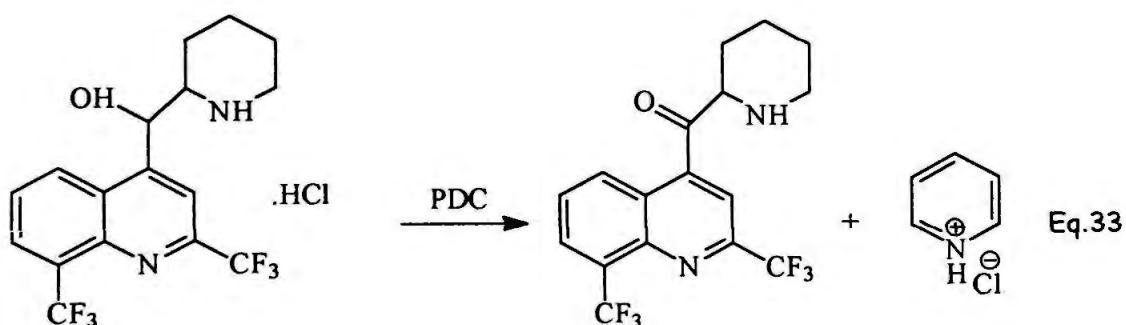
b) A partir da mefloquina base

Neutralização do cloridrato de mefloquina

Em balão de 250 mL munido de tubo secante foi adicionado cloridrato de mefloquina (10 mmol; 4,14g) em 100 mL de clorofórmio. Após dissolução, foi adicionado uma solução 10 % de bicarbonato de sódio (10 mmol; 8,40 mL) e agitou-se durante duas horas. O produto foi extraído com clorofórmio e lavado várias vezes com água. O solvente foi concentrado e o resíduo cristalizado de metanol e água. O produto foi caracterizado por RMN ^1H .

A mefloquina neutra (10 mmol; 3,78 g) foi oxidada com solução saturada de CrO_3 (20 mmol; 1,18 g). A mistura foi mantida durante a noite à temperatura ambiente. O excesso de agente oxidante foi destruído por adição de 2 mL de metanol. A mistura foi extraída com clorofórmio (5x40 mL). A fase aquosa foi alcalinizada com solução de NaOH 10 % e extraída com éter (4 x 100 mL). As frações etéreas foram lavadas com água, secas e evaporadas. As frações clorofórmicas foram tratadas de forma semelhante. Ambas frações foram concentradas e o resíduo foi cristalizado de metanol e água. O produto foi analisado por RMN ^1H e espectrometria no infravermelho.

Procedimento 2. Usando dicromato de piridínio (PDC) (Equação 33)



Preparação do dicromato de piridínio

À uma solução de 100 g de CrO_3 em 100 mL de água à temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$, foram adicionados 80,6 mL de piridina. Posteriormente, a solução foi diluída com 400 mL de acetona e esfriada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Três horas depois, cristais amarelo-alaranjados foram coletados, lavados com acetona e secados sob pressão reduzida.

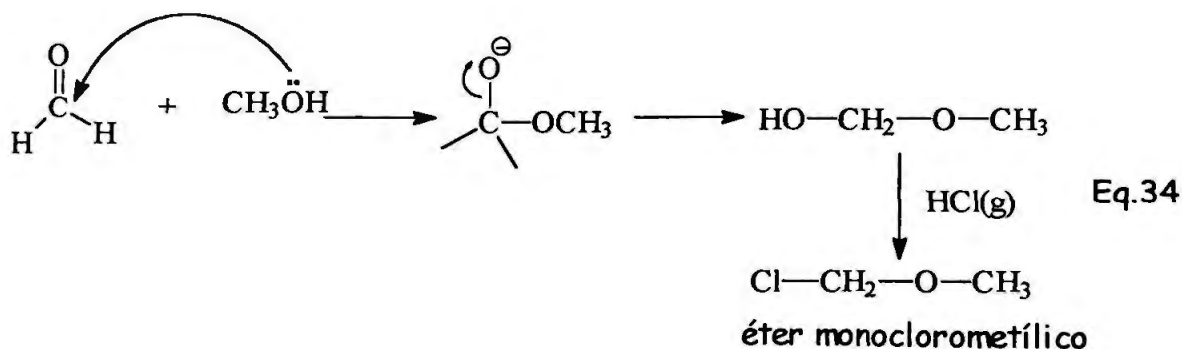
Preparação da cetona com PDC

Em balão de 100 mL munido de tubo secante foi adicionado de cloridrato de mefloquina (2,48 g; 6 mmol) em 30 mL de diclorometano. Posteriormente, foi adicionado PDC (3,38g; 9 mmol). A mistura foi mantida durante a noite à temperatura ambiente. Após este período foi diluída com éter etílico, filtrada e o solvente evaporado. O dicromato residual foi eliminado por filtração da solução etérea usando uma pequena quantidade de sílica-gel. O produto resultante foi cristalizado de metanol e água.

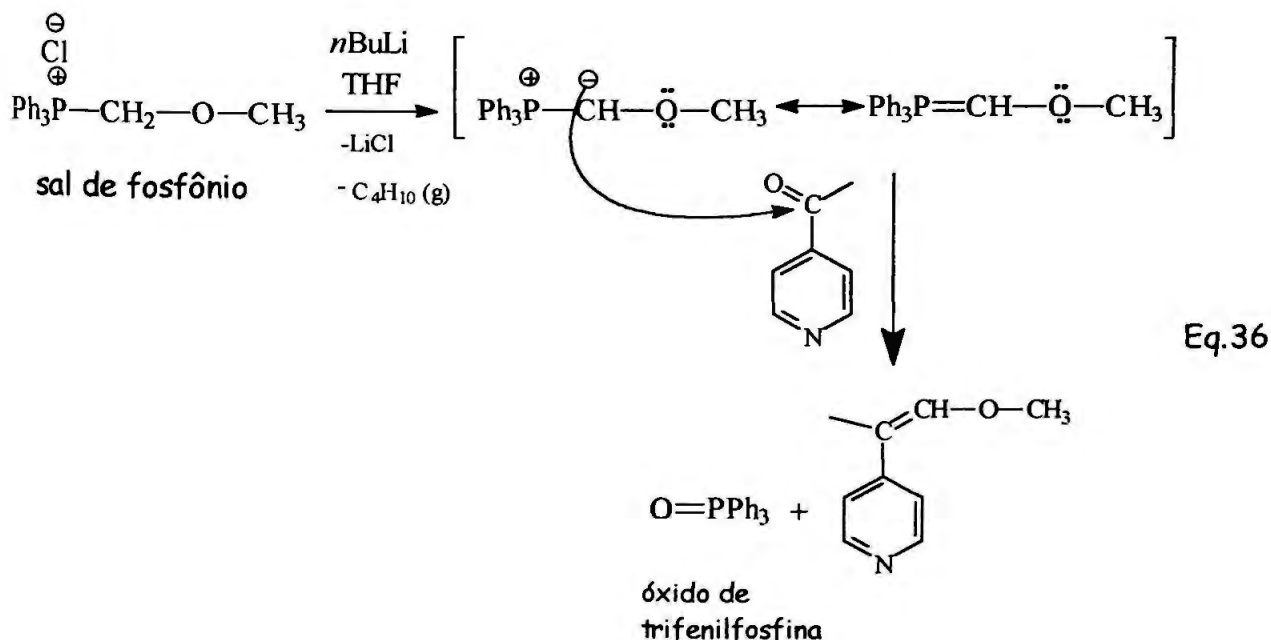
2.8 Preparação do alceno

2.8.1 Preparação do sal de fosfônio

2.8.1.1 Preparação do éter monoclorometílico (Equação 34) (Marvel e Porter, 1941)



2.8.2 Reação de Wittig usando acetilpiridina (Equação 36)

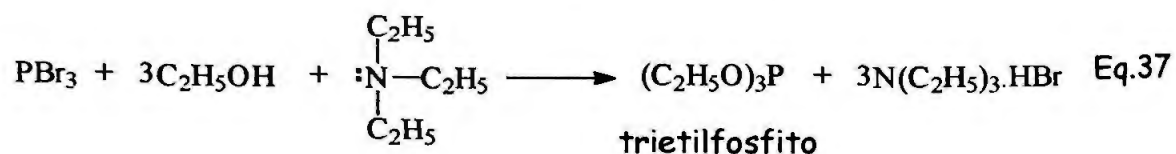


Procedimento

Em balão de 250 mL foram colocados 10,24 g do sal de fosfônio (30 mmol) em 100 mL de THF. Depois de esfriar a mistura a 0 °C foi adicionado *n*-BuLi (32mmol, 24 mL) lentamente. A solução vermelha resultante foi mantida a temperatura ambiente e agitada durante 3 horas. A mistura foi esfriada à temperatura de -78°C e foi adicionada acetilpiridina (20 mmol, 2,24 g). A mistura foi agitada durante 1 hora à temperatura de -78°C e mantida durante 10 horas à temperatura ambiente. Depois de transcorrido esse tempo a mistura reacional foi esfriada a 0°C e adicionada de água e extraída com éter. A fase aquosa foi lavada com éter. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, e o solvente evaporado. O produto final foi analisado por RMN ¹H.

2.8.3 Reação de Wittig-Horner usando acetilpiridina

2.8.3.1 Preparação do trietilfosfito (Equação 37) (Ford-Moore, 1963)



Procedimento

Em balão de 500 mL munido de condensador de refluxo e funil de adição foram colocados trietilamina (750 mmol; 75,89 g) e etanol absoluto (750 mmol; 34,55 g) em 225 mL de éter de petróleo. Em seguida, mantendo agitação eficiente, foi adicionada lentamente uma solução de PBr_3 (250 mmol; 67,67 g) em 90 mL de éter de petróleo. Formação copiosa de gás foi observada assim como a formação abundante de um precipitado branco. Durante a adição o balão é esfriado com água morna. Depois de duas horas à temperatura ambiente a mistura foi refluxada a 60 °C durante duas horas. Posteriormente, esfriada à temperatura ambiente e mantida durante a noite. O produto filtrado foi lavado com éter de petróleo e finalmente destilado à pressão de 20 mmHg. O produto final foi caracterizado por RMN ^1H .

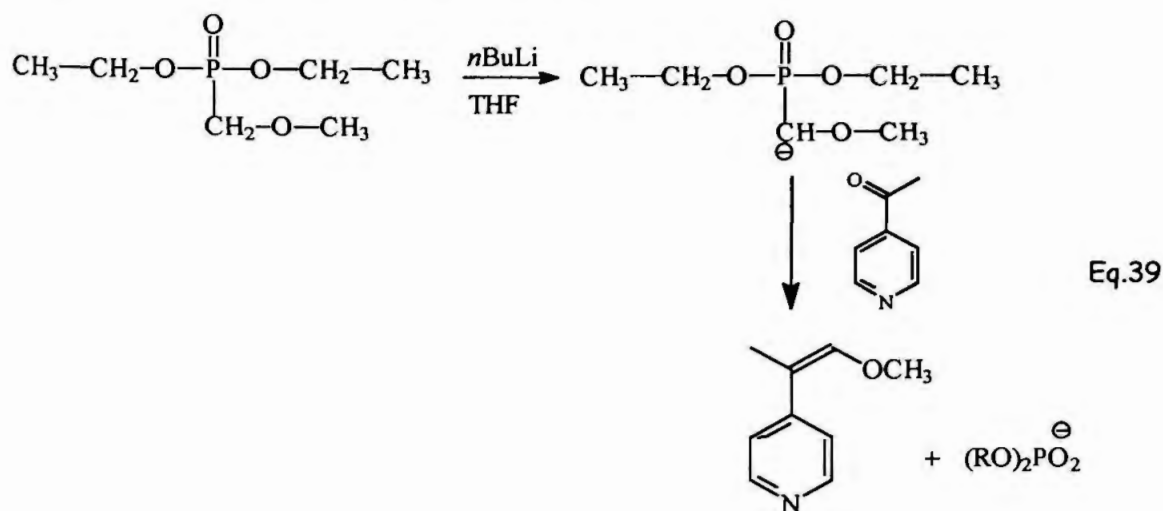
2.8.3.2 Preparação do metoximetildietilfosfonato (Equação 38) (Bhattachrya e Thyagarajan, 1981)



Procedimento

Em balão de 25 mL munido de dedo frio foram adicionados 2,44 g (15 mmol) de trietilfosfito e 1,21 g (15 mmol) de éter monoclorometílico. A mistura foi refluxada durante 3 horas e meia à temperatura de 150 °C. O produto final foi caracterizado por RMN ^1H .

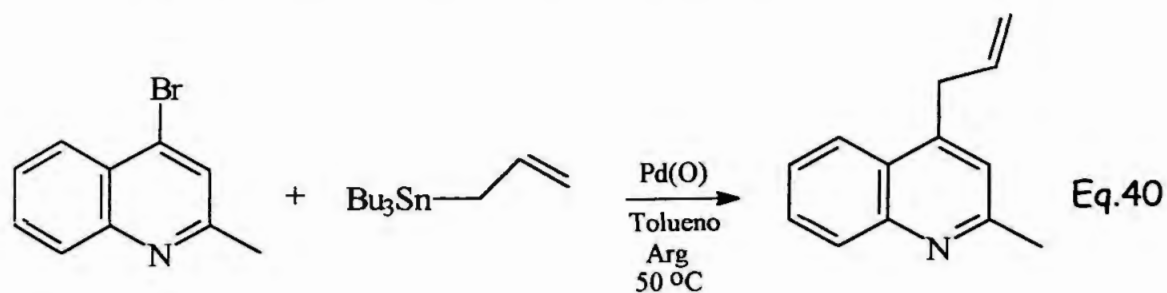
Reação de Wittig-Horner (Equação 39)



Procedimento

Em balão de 50 mL foi colocado fosfonato (5 mmol; 0,9 g) previamente preparado em 20 mL de THF, sob atmosfera de argônio. Posteriormente, à temperatura de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram adicionadas, durante 5 minutos quantidades equivalentes de *n*-BuLi (5 mmol; 3,8 mL). A mistura foi mantida nessa temperatura durante 1 hora e, posteriormente, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora e meia. Transcorrido esse tempo, a solução amarelada formada foi esfriada a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foi adicionada acetilpiridina (5 mmol; 0,61 g) de. Durante 1 hora a mistura reacional é agitada a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, posteriormente, mantida à temperatura ambiente durante 17 horas.

2.8.4 Síntese da 2-metil-4-alilquinolina (Equação 40)



Procedimento

Em balão de 25 mL de duas bocas munido de condensador de refluxo foram colocados 2-metil-4-bromoquinolina (0,5 mmol; 0,11 g), alguns cristais de 2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT) e paládio de *tetrakis*-trifenilfosfina (0,01 mmol; 0,01 g), em 4 mL de tolueno anidro (previamente borbulhado). Em seguida, foi adicionado alilbutilestanho (0,55 mmol; 0,18g). A temperatura foi aumentada até 50 °C deixando a reação durante 7 horas sob atmosfera de argônio. O solvente foi evaporado e o produto bruto purificado em coluna de sílica-gel, usando como eluente primeiramente éter de petróleo e logo mistura de éter de petróleo: acetato de etila (1:1). O produto final foi caracterizado por RMN ¹H.

2.9 Métodos analíticos

Cromatografia em camada delgada

Utilizaram-se cromatofolhas Al TLC, sílica-gel 60 f₂₅₄ (MERCK) para o acompanhamento das reações. Realizou-se a revelação por luz UV ou iôdo.

Cromatografia em coluna

Foi utilizada coluna de 40 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. Foi usada sílica-gel 60 f₂₅₄ (MERCK) como fase estacionária.

Cromatografia gasosa

As análises de pureza foram realizadas nos casos em que foi possível o uso da cromatografia gasosa, em equipamento HP 6890, empregando coluna de metilsilicone com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno; N₂(g) como fase móvel e um detector de ionização de chama (FID).

Espectrometria de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em aparelho Bruker ADPX-300 de 300 MHz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Todos os deslocamentos químicos estão registrados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), usado como padrão interno.

Espectrometria no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro BOMEM usando-se o método de pastilha de KBr ou método da cela de NaCl.

Ponto de fusão

As análises de ponto de fusão foram feitas em aparelho de ponto de fusão BÜCHI modelo capilar.

Análise elementar

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizados pela Central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo em analisador elementar Perkin Elmer 2400 CHN.

2.10 Estudo biológico *in vitro*

O estudo biológico foi realizado no Núcleo de Estudos em Malária da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) do Estado de São Paulo. Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar e em condições estéreis. Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados conforme microtécnica preconizada por Rieckmann e colaboradores em 1978. Foram utilizadas duas cepas: K1, originária da Tailândia e resistente à cloroquina e Palo Alto, originária de Uganda e sensível à cloroquina, fornecidas pelo "WHO REGISTRY OF STANDARD STRAINS OF MALARIA PARASITES" da Universidade de Edinburgh.

2.10.1 Escolha dos compostos e doseamento das placas

Os compostos foram escolhidos considerando-se as suas características estruturais, assim como os resultados relacionados ao rendimento e à pureza dos mesmos. O difosfato de cloroquina foi utilizado para o controle de sensibilidade dos isolados (FIGURA 33, TABELA 2).

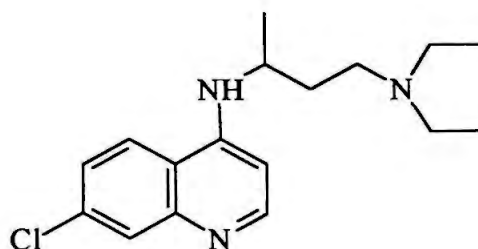
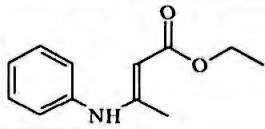
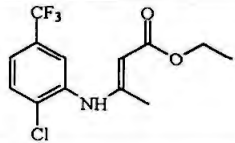
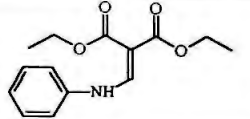
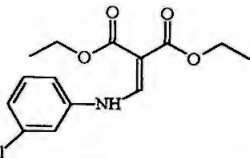
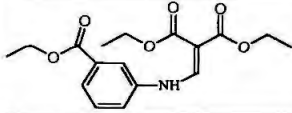
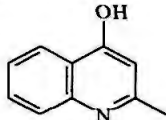
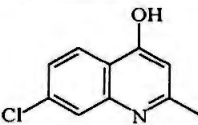
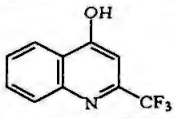
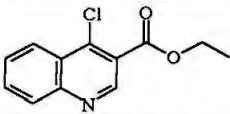
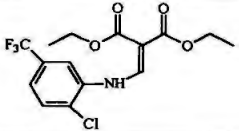
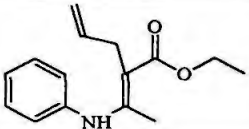


FIGURA 33. Estrutura da cloroquina.

TABELA 2. Estruturas e nomes químicos dos compostos ensaiados no estudo biológico

No	Compostos	Nome químico
1		3-(<i>N</i> -fenilamino)-butenoato de etila
2		3-(<i>N</i> -2-cloro-5-trifluorometilfenil amino)-butenoato de etila
3		3-(<i>N</i> -3-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila
4		3-(<i>N</i> -3-clorofenilamino)-2-carbetoxi -propanoato de etila
5		3-(<i>N</i> -3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila
6		2-metil-4-hidroxiquinolina
7		2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina
8		2-trifluormetil-4-hidroxiquinolina
9		3-carbetoxi-4-cloroquinolina
10		3-(<i>N</i> -2-cloro-5-trifluorometilfenil amino)-2-carbetoxi-propanoato de etila
11		3-(<i>N</i> -fenilamino)-2-metil-3-alilbutenoato de etila

Em placas de poliestireno de fundo chato para cultura de células foram colocados 100 μ l da solução aquosa dos compostos nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32 e 100 pmoles/alvéolo preparadas, a partir de uma solução estoque de 1000 pmoles/100 μ L em etanol.

Na placa com difosfato de cloroquina foram colocadas soluções nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32 pmoles/alvéolo a partir de uma solução estoque de 1000 pmoles/100 μ L em água bidestilada.

As placas foram mantidas a 37 °C em estufa para secagem e, posteriormente, a 4 °C até sua utilização.

2.10.2 Cultivo *in vitro* e microteste de sensibilidade

As cepas utilizadas no estudo estavam congeladas em nitrogênio líquido no Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN. Para o congelamento e descongelamento de cada isolado, foi utilizada a técnica descrita por Diggs e colaboradores, em 1975.

No congelamento foram utilizados 4 volumes de Glycerolyte (6,2 M de glicerol, 0,14 M de lactato de sódio e 5 mM de KCl, com suficiente NaHCO_3 para ajustar o pH para 7,2) para cada volume de hemácia.

As hemácias parasitadas foram descongeladas à temperatura ambiente e em seguida foram adicionados dois volumes de sorbitol a 27%. Após 10 minutos, foram adicionados dois volumes de sorbitol 5% e as hemácias foram incubadas por mais 10 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 1000 $\times g$ durante 8 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com um volume de sorbitol 5%.

Os parasitas foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES 25 mM, NaHCO_3 21 mM, hipoxantina 370 μ M, gentamicina 40 μ g/mL e 10% (v/v) soro humano A* ou O* fornecido pela Fundação Pró-

Sangue/Hemocentro de São Paulo e inativado 56°C. As hemácias A* ou O* , lavadas com meio incompleto, foram adicionadas ao meio de cultura para um hematócrito de 5%.

A cultura foi mantida a 37 °C em dessecador de vidro com atmosfera de CO₂ , segundo a técnica de Trager e Jensen, 1976. O meio de cultura foi trocado diariamente e a cultura foi diluída a cada 4 dias com hemácias não infectadas. O desenvolvimento e multiplicação dos parasitas foram acompanhados pela avaliação microscópica de esfregaços corados por Giemsa a 2% em solução tamponada pH 7.

Para a realização do microteste, foram utilizados parasitas no estágio de trofozoíta jovem. A sincronização foi realizada por tratamento com D-sorbitol segundo a metodologia descrita por Lambros e Vanderberg, em 1979. Uma suspensão de hemácias infectadas em hematócrito de 5% foi centrifugada durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em igual volume de D-sorbitol 5% e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente para ruptura das formas maduras. Logo em seguida as hemácias foram centrifugadas novamente, lavadas com meio incompleto e colocadas em cultura.

Após a determinação da parasitemia, as hémacias infectadas foram diluídas com hemácias não infectadas para obter uma parasitemia entre 0,5-1%. Em cada alvéolo foram adicionados 100 µl da solução de parasitas.

Para cada incubação foi realizado um controle sem adição de composto e um teste de sensibilidade à cloroquina. As microplacas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de CO₂ por 24-36 horas. Após esse intervalo, lâminas do controle foram realizadas para constatar a presença de esquizontes.

Os testes contendo número igual ou superior a 10% de esquizontes em 200 formas assexuadas foram considerados válidos. Neste caso, gotas espessas foram realizadas com a papa de hemácias de todos os alvéolos.

2.10.3 Interpretação dos resultados do teste.

Os resultados dos testes *in vitro* foram analisados através da determinação da inibição da formação de esquizontes em cada concentração, de cada composto testado, em relação ao controle. A concentração mínima inibitória (MIC) foi definida como a concentração mais baixa do composto que inibiu completamente a maturação de esquizontes.

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

1. Resultados do estudo químico

Em continuação, são apresentados os dados físico-químicos e espectrométricos dos compostos obtidos. Os dados estão sempre apresentados na seguinte ordem, quando todos presentes:

Rendimento

Aspecto

Ponto de fusão ou ebulição

Análise elementar

Espectro de RMN ^1H

Espectro de RMN ^{13}C

Infravermelho

As abreviações dos sinais no espectro de RMN ^1H são:

s: singleto

d: dubleto

dd: duplo dubleto

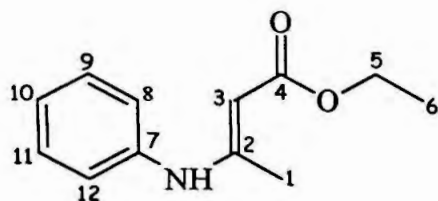
t: tripleto

q: quarteto

qt: quinteto

st: sexteto

ht: hepteto

3-(*N*-fenilamino)-butenoato de etila

$C_{12}H_{17}NO_2$ MM= 205,25 g/mol

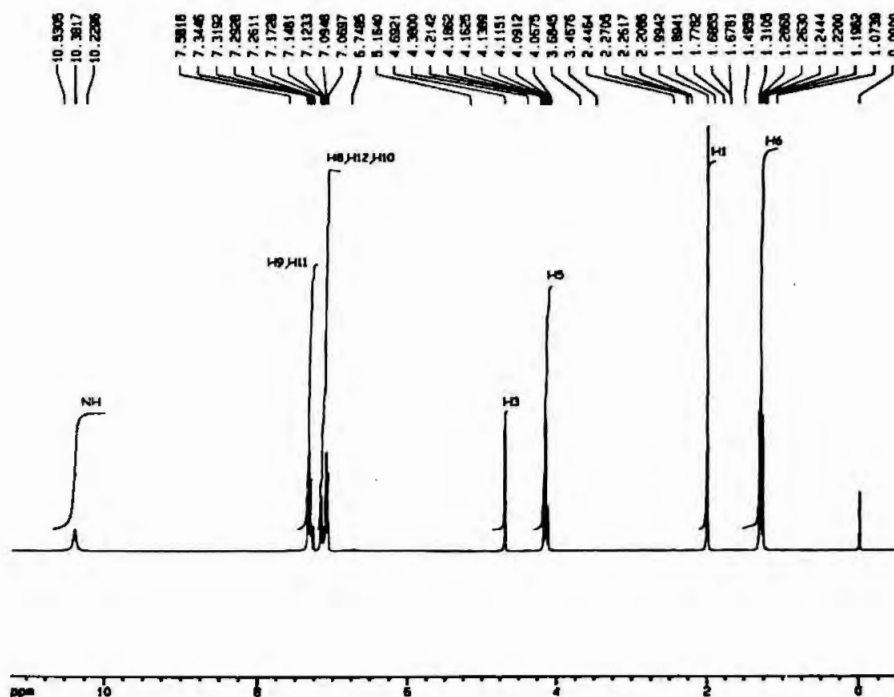
Rendimento: 11,23 g; 54,8% (Procedimento 1)

15,97 g; 77,9% (Procedimento 2)

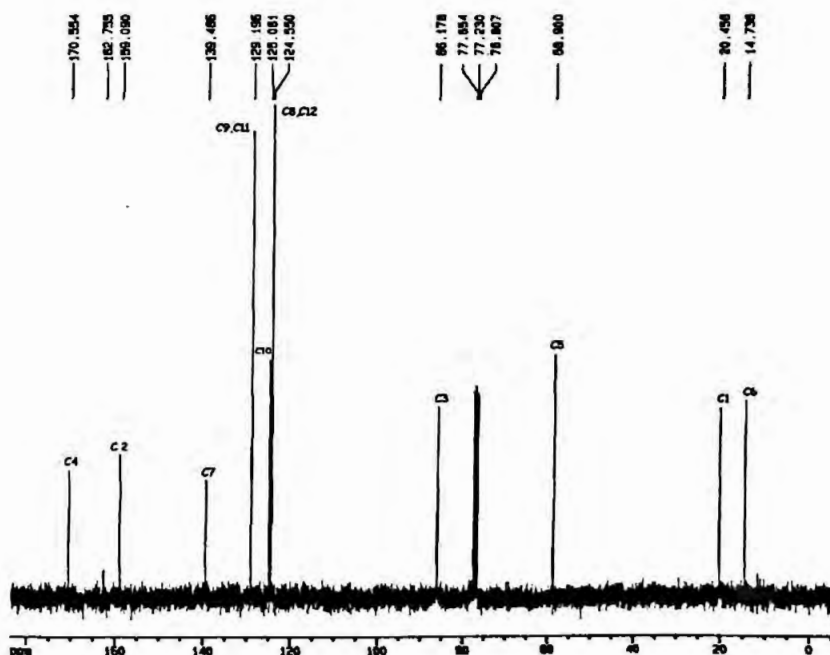
Aspecto: Líquido amarelo e aparência viscosa

Ponto de ebulição: 110 °C (0,1 mm Hg)

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
1,24 (t, 3 H, $J=7,1$ Hz):(H-C6)	14,74 (C6)	159,09 (C2)
1,99 (s,3H):(H-C1)	20,46(C1)	170,55 (C4)
4,17(q, 2H, $J=7,1$ Hz):(H-C5)	58,9(C5)	
4,69 (s, 1H): (H-C3)	86,18(C3)	
7,08 (d, 2H, $J=7,5$ Hz): (H-C8,C12)	124,55(C8,C12)	
7,15 (t, 1H, $J=7,5$ Hz):(H-C10)	125,06(C10)	
7,32 (t, 2H, $J=7,5$ Hz):(H-C9,C11)	129,19(C9,C11)	
10,38 (largo, 1H)(H-NH)	139,49(C7)	

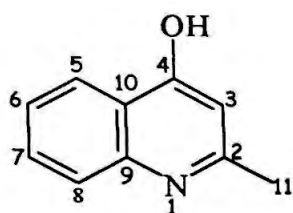


ESPECTRO 1. Espectro de RMN¹H do 3-(N-fenilamino)-butenoato de etila.



ESPECTRO 2. Espectro de RMN¹³C do 3-(N-fenilamino)-butenoato de etila.

2-metil-4-hidroxiquinolina



$C_{10}H_9NO$ MM= 159,19 g/mol

Rendimento: 3,95 g; 43,58%

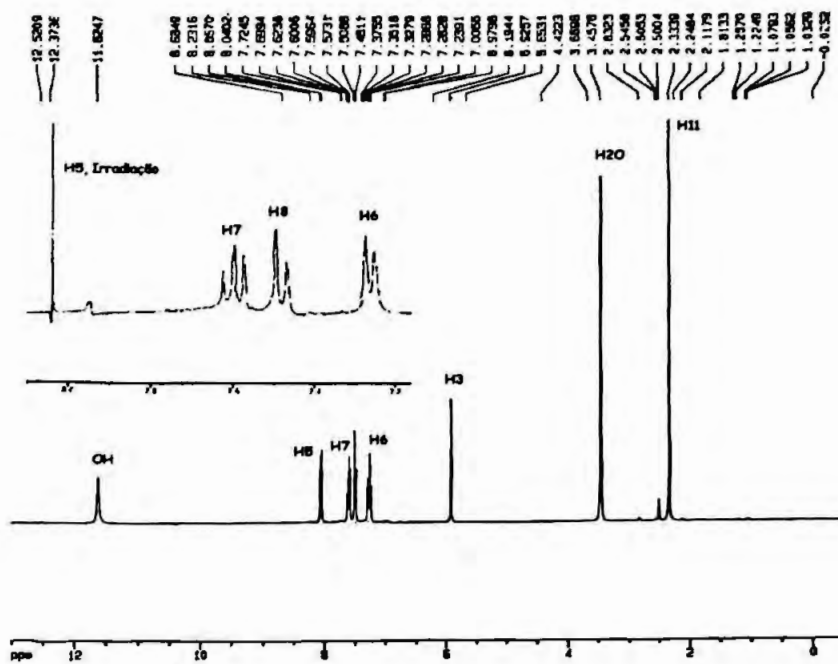
Aspecto: sólido cristalino de cor amarela

Ponto de fusão: 240-243 °C

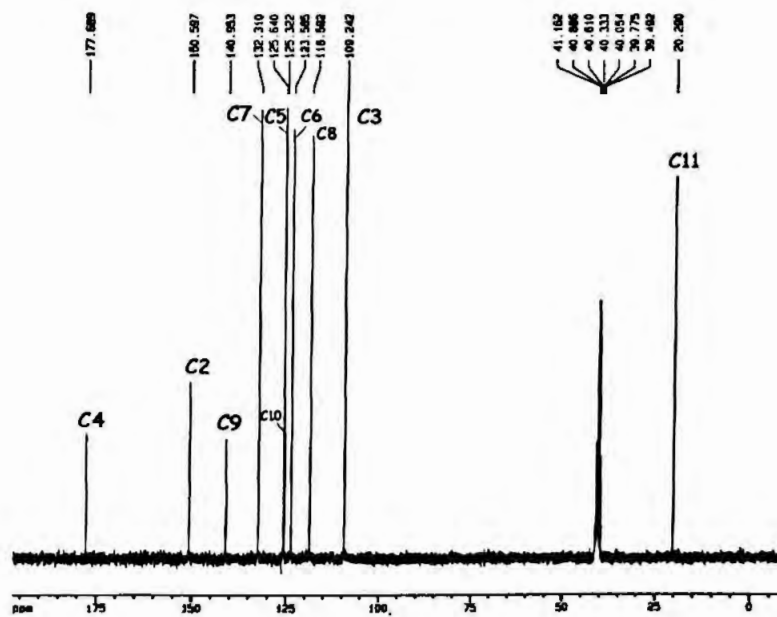
Análise elementar:

%	Teórico	Experimental
C	75,47	75,50
H	5,66	5,93
N	8,80	8,71

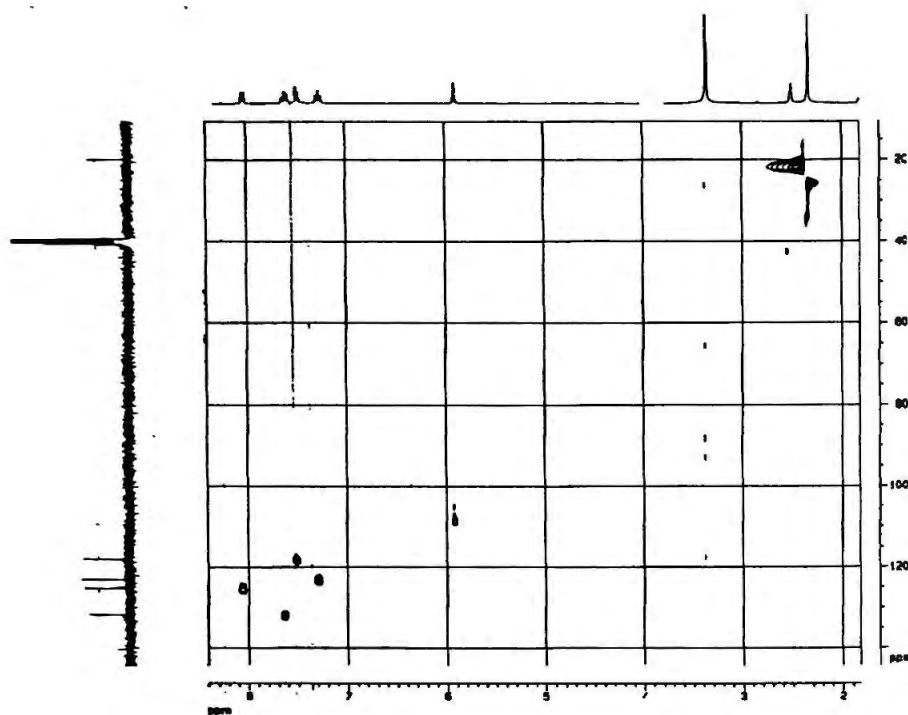
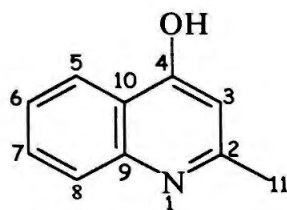
1H RMN (DMSO-D ₆) δ (ppm)	^{13}C RMN (DMSO-D ₆) δ (ppm)	IV (cm ⁻¹) (KBr)	
2,33(s,3H):(H-C11)	20,29 (C11)	140,95(C9)	760 $\delta=C-H$ (1) 1606 $\nu C=C$ (8)
5,92(s,1H): (H-C3)	109,24 (C3)	150,60(C2)	786 $\delta=C-H$ (2) 1646 $\nu C=N$ (9)
7,26(+,1H, $J=8,0$ Hz):(H-C6)	118,59 (C8)	177,69(C4)	846 $\delta=C-H$ (3) 3060 $\nu=C-H$ (10)
7,49(d,1H, $J=8,0$ Hz):(H-C8)	123,58(C6)		870 $\delta=C-H$ (4) 3324 $\nu O-H$ (11)
7,59(+,1H, $J=8,0$ Hz):(H-C7)	125,32(C5)		1246 $\nu C-O$ (5)
8,05(d,1H, $J=8,0$ Hz):(H-C5)	125,64(C10)		1373 δsCH_3 (6)
11,62(largo,1H, H-O)	132,31(C7)		1469 $\nu C=C$ (7)



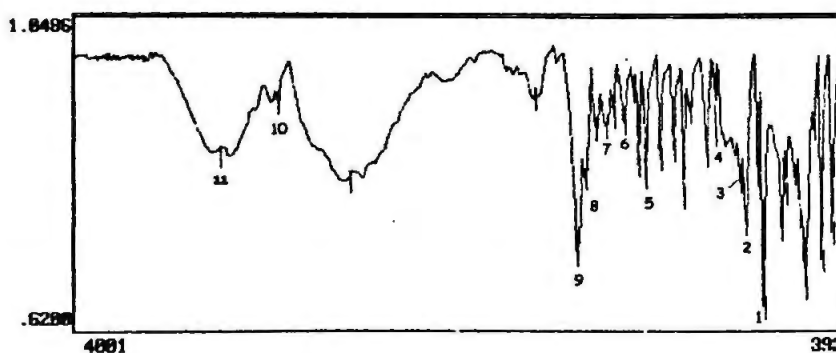
ESPECTRO 3. Espectro de RMN¹H da 2-metil-4-hidroxiquinolina.



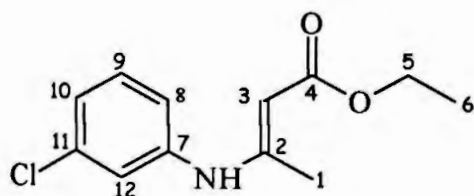
ESPECTRO 4. Espectro de RMN¹³C da 2-metil-4-hidroxiquinolina.



ESPECTRO 5. Espectro HMQC da 2-metil-4-hidroxiquinolina.



ESPECTRO 6. Espectro no infravermelho da 2-metil-4-hidroxiquinolina.

3-(*N*-3-clorofenilamino)-butenoato de etila

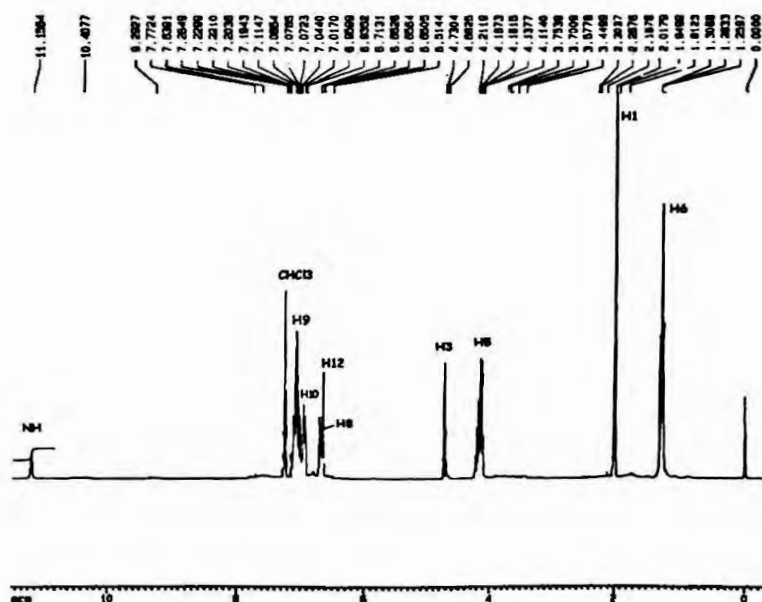
$C_{12}H_{14}ClNO_2$ MM= 251,5 g/mol

Rendimento: 21,65 g; 86,08%

Aspecto: Líquido amarelo

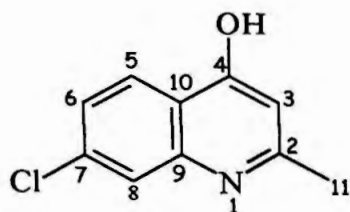
Ponto de ebulição: 125 °C (0,1 mm Hg)

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
1,28(t,3H, $J=7,1$ Hz):(H-C6)	6,70(d,1H, $J=7,2$ Hz):(H-C8)
2,02(s,3H):(H-C1)	6,94(d,1H, $J=7,2$ Hz):(H-C10)
4,15(q,2H, $J=7,1$ Hz):(H-C5)	7,07(t,1H, $J=7,2$ Hz):(H-C9)
4,73(s,1H):(H-C3)	11,15(largo, H-NH)
6,65(s,1H):(H-C12)	



ESPECTRO 7. Espectro de RMN 1H do 3-(*N*-3-clorofenilamino)-butenoato de etila.

2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina



$C_{10}H_8ClNO$ MM= 193,69 g/mol

Rendimento: 2,43 g; 25,10%

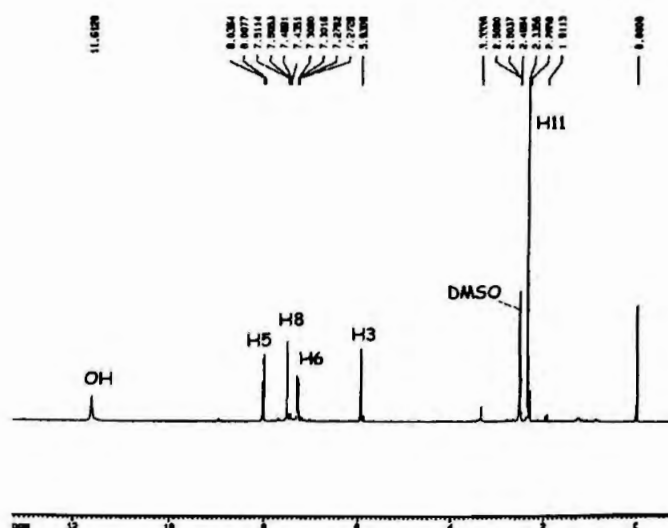
Aspecto: sólido amarelo

Ponto de fusão: 280 °C - 282 °C

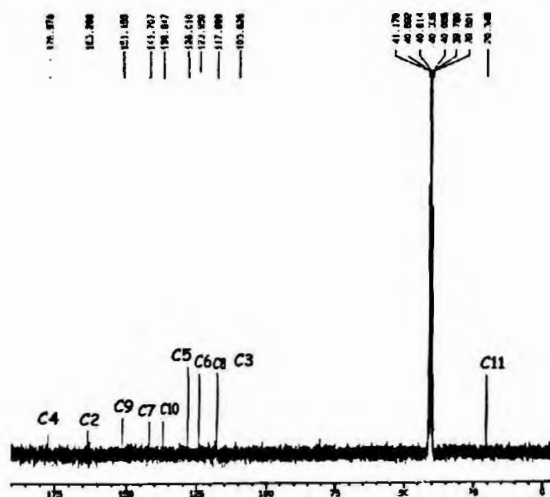
Análise elementar:

%	Teórico	Experimental
C	61,97	61,80
H	3,93	3,90
N	6,83	6,85

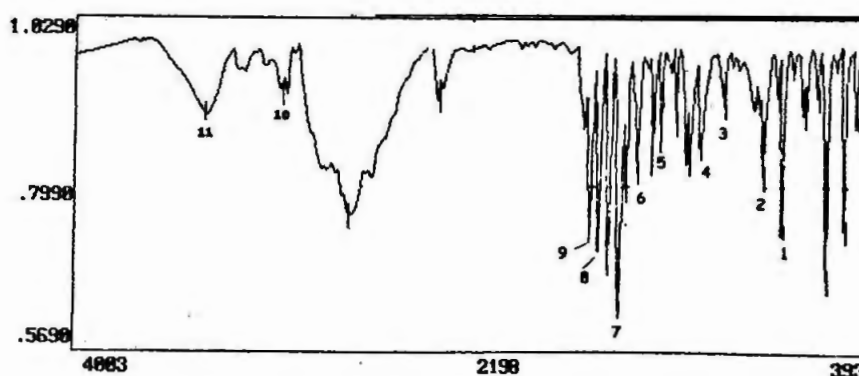
1H RMN(DMSO-D ₆) δ (ppm)	^{13}C RMN(DMSO-D ₆) δ (ppm)	IV(cm^{-1})(KBr)	
2,34(s,3H):(H-C11)	20,34 (C11)	163,21(C2)	761 $\delta=C-H$ (1) 1642 $\nu C=N$ (9)
5,93(s,1H): (H-C3)	109,83 (C3)	176,98(C4)	786 $\delta=C-H$ (2) 3077 $\nu=C-H$ (10)
7,29(dd,1H, $J_{6-5}=8,6$ Hz, $J_{6-8}=1,9$ Hz (H-C6)	117,69 (C8)		846 $\delta=C-H$ (3) 3432 $\nu O-H$ (11)
7,50(d,1H):(H-C8)	123,95(C6)		1029 $\nu C-Cl$ (4)
8,02(d,1H, $J=8,6$ Hz):(H-C5)	128,01(C5)		1245 $\nu C-O$ (5)
11,61(largo: H-OH)	136,85(C10)		1353 $\delta O-H$ (6)
	141,71(C7)		1472 $\nu C=C$ (7)
	151,16(C9)		1599 $\nu C=C$ (8)



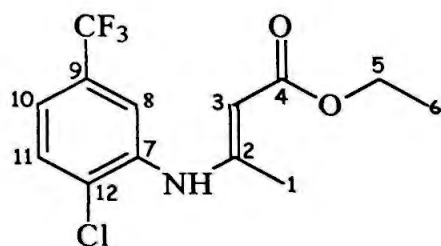
ESPECTRO 8. Espectro de RMN¹H da 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina.



ESPECTRO 9. Espectro de RMN¹³C da 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina.



Espectro 10. Espectro no infravermelho da 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina.

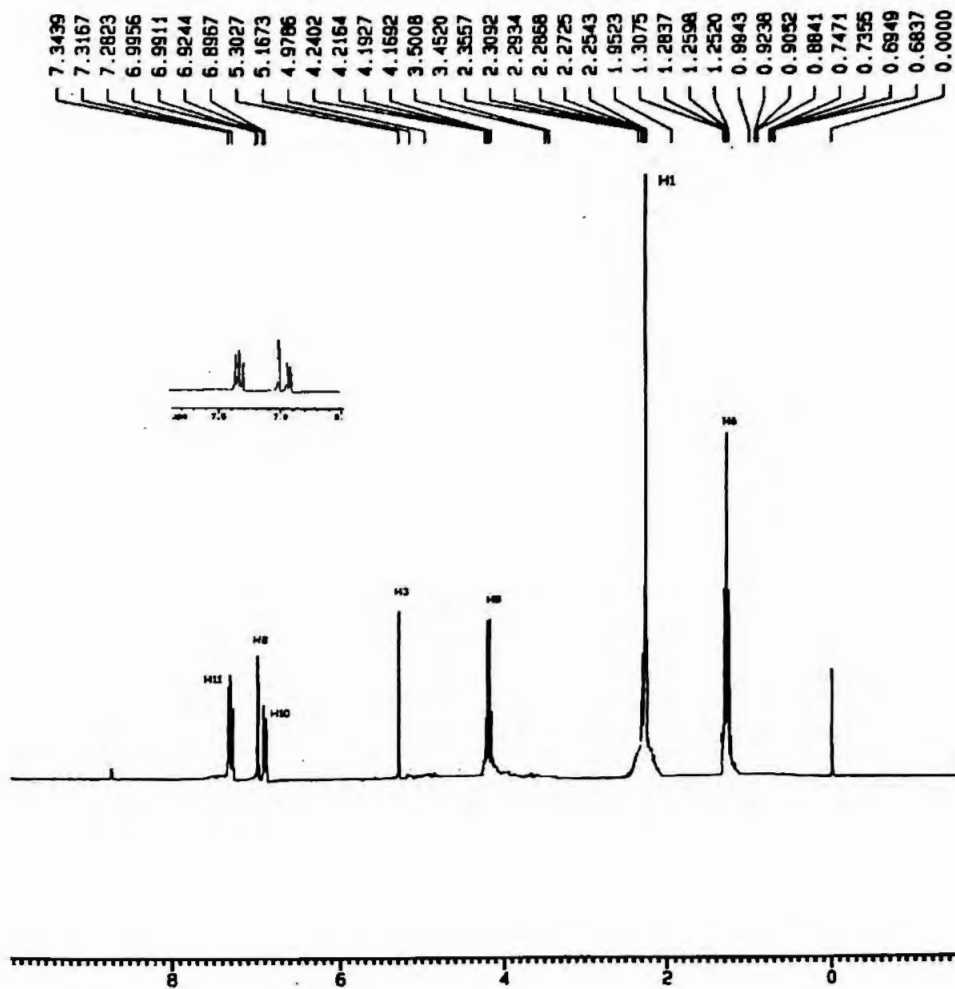
3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-butenoato de etila

$C_{13}H_{13}ClF_3NO_2$ MM= 307,7 g/mol

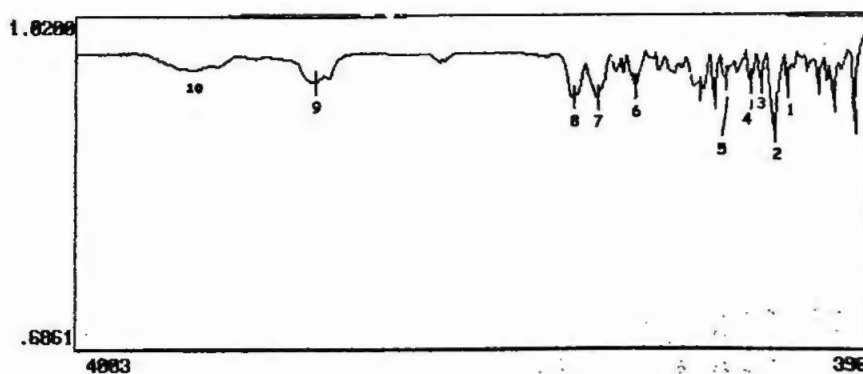
Rendimento: 20,2 g; 65,69%

Aspecto: Líquido amarelo de cheiro característico intenso

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (KBr)	
1,29(t,3H, $J=7,1$ Hz):(H-C6)	746 $\delta=C-H$ (1)	1726 $\nu C=O$ (8)
2,25(s,3H):(H-C1)	803 $\delta=C-H$ (2)	2924 $\nu C-H$ (9)
4,20(q,2H, $J=7,1$ Hz):(H-C5)	866 $\delta=C-H$ (3)	3500 $\nu N-H$ (10)
5,30(s,1H):(H-C3)	912 $\delta=C-H$ (4)	
6,90(dd,1H, $J_{10-11}=8,3$ Hz; $J_{10-8}=1,34$ Hz)(H-C10)	1028 $\nu C-Cl$ (5)	
6,99(d,1H,):(H-C8)	1443 $\nu C=C$ (6)	
7,35 (dd, 1H, $J=8,3$ Hz):(H-C11)	1620 $\nu C=C$ (7)	

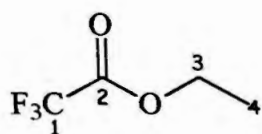


ESPECTRO 11. Espectro de RMN ^1H da 3-(N-2-cloro-5-trifluoro metilfenilamino)-butenoato de etila.



ESPECTRO 12. Espectro no infravermelho do 3-(N-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-butenoato de etila.

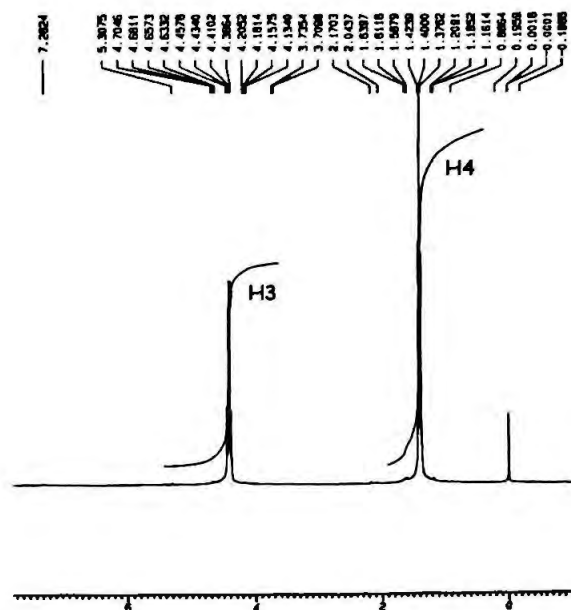
trifluorometil acetato de etila

 $C_4H_5O_2F_3$ MM= 142,07 g/mol

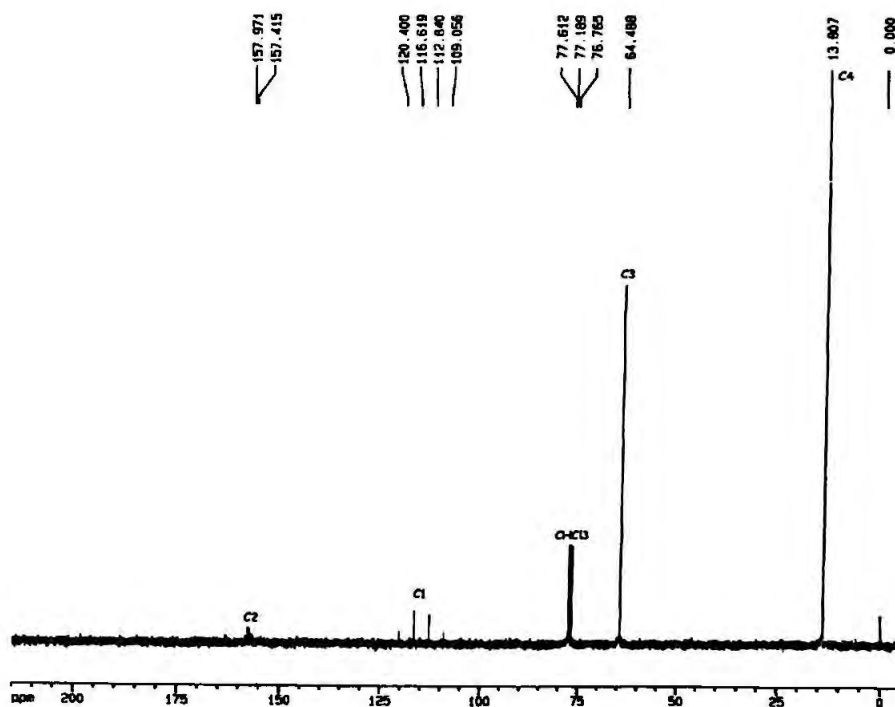
Rendimento: 26,63 g; 74,7%

Ponto de ebulição: 56-57 °C

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,40 (t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C4)	13,81 (C4)
4,42(q, 2H, $J= 7,1$ Hz):(H-C3)	64,49 (C3)
	115,0 (C1)
	157,7(C2)



ESPECTRO 13. Espectro de RMN¹H do trifluorometil acetato de etila.



ESPECTRO 14. Espectro de RMN¹³C do trifluorometil acetato de etila.

trifluorometilacetoacetato de etila

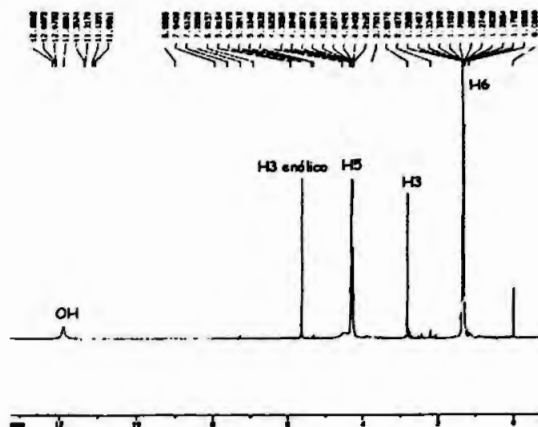
 $C_6H_7 O_3F_3$ MM= 184,11 g/mol

Rendimento: 5,15 g; 20%

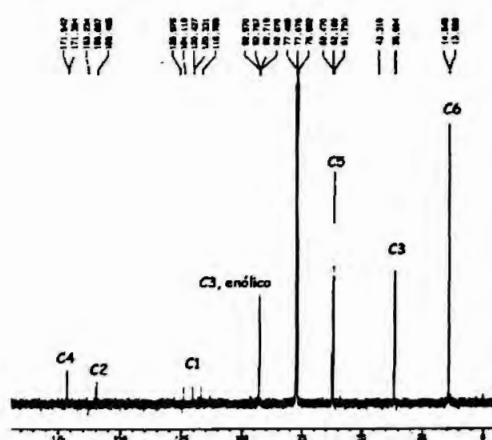
Aspecto: Líquido transparente

Ponto de ebulição: 130 °C (30 mm Hg)

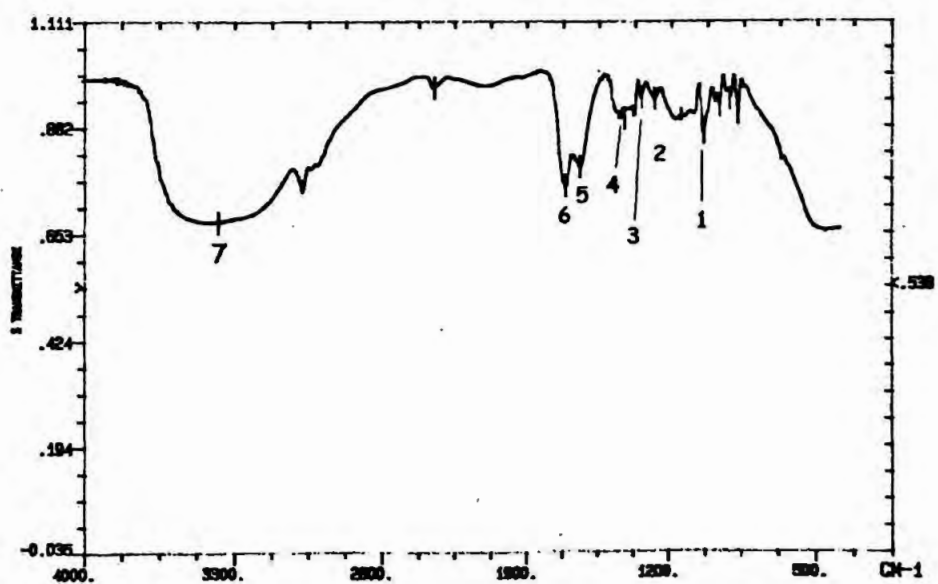
1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (NaCl)
1,33 (t, 3H, $J=6,1$ Hz);(H-C6)	14,04, 13,97 (C6)	1041 $\nu C-O$ (1)
2,8 (s, 2H);(H-C3)	36,50 (C3)	1279 $\nu C-O$ (2)
4,28 (q, 2H, $J=6,1$ Hz);(H-C5)	61,73, 62,18 (C5)	1342 $\nu C-O$ (3)
5,63 (s, 1H);(H-C3, enol)	92,74(C3)(forma enólica)	1428 $\delta C-O$ (4)
11,87(largo, H-OH)	122,27 (q, $J_{C-F} = 278,5$ Hz) (C1)	1644 $\nu C=C$ (5)
	159,6 (q, $J_{C-F} = 37$ Hz) (C2)	1716 $\nu C=O$ (6)
	171,4(C4)	3376 $\nu O-H$ (7)



ESPECTRO 15. Espectro de RMN¹H do trifluorometilacetato de etila.

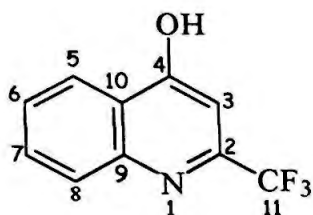


ESPECTRO 16. Espectro de RMN¹³C do trifluorometilacetato de etila.



ESPECTRO 17. Espectro no infravermelho do trifluorometilacetato de etila.

2-trifluormetil-4-hidroxiquinolina



$C_{10}H_6F_3NO$ MM= 213,16 g/mol

Rendimento: 3,42 g; 98%

Aspecto: sólido bege

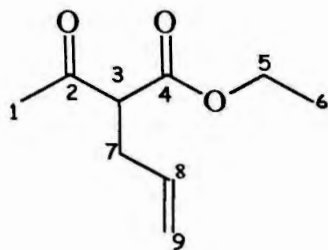
Ponto de fusão: 208-209 °C

Análise elementar:

%	Teórico	Experimental
C	56,34	56,37
H	2,81	2,82
N	6,57	6,55

1H RMN (DMSO-D6) δ (ppm)	^{13}C RMN (DMSO-D6) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (KBr)	
6,68 (s, 1H):(H-C3)	101,51 (C3)	128,04(C8)	721 $\delta=C-H$ (1) 1354 $\delta O-H$ (8)
7,34 (t, 1H, $J=7,1$ Hz):(H-C6)	123,30 (C6)	129,37(C7)	756 $\delta=C-H$ (2) 1477 $\nu C=C$ (9)
7,59(t,1H, $J=7,1$ Hz):(H-C7)	123,74 (C5)	149,09(C9)	793 $\delta=C-H$ (3) 1576 $\nu C=C$ (10)
7,76(d,1H, $J=7,1$ Hz):(H-C8)	126,33(C10)	172,10(C4)	850 $\delta=C-H$ (4) 1628 $\nu C=N$ (11)
8,22(d,1H, $J=7,1$ Hz):(H-C5)	125(q, J_{CF} 275,73 Hz)(C11)		1141 $\nu_{as}CF_3$ (5) 3091 $\nu=C-H$ (12)
	147,3(q, J_{CF} 31,26 Hz (C2)		1235 $\nu C-O$ (6) 3125 $\nu O-H$ (13)
			1319 $\nu_s CF_3$ (7)

2-acetil-4-pentenoato de etila



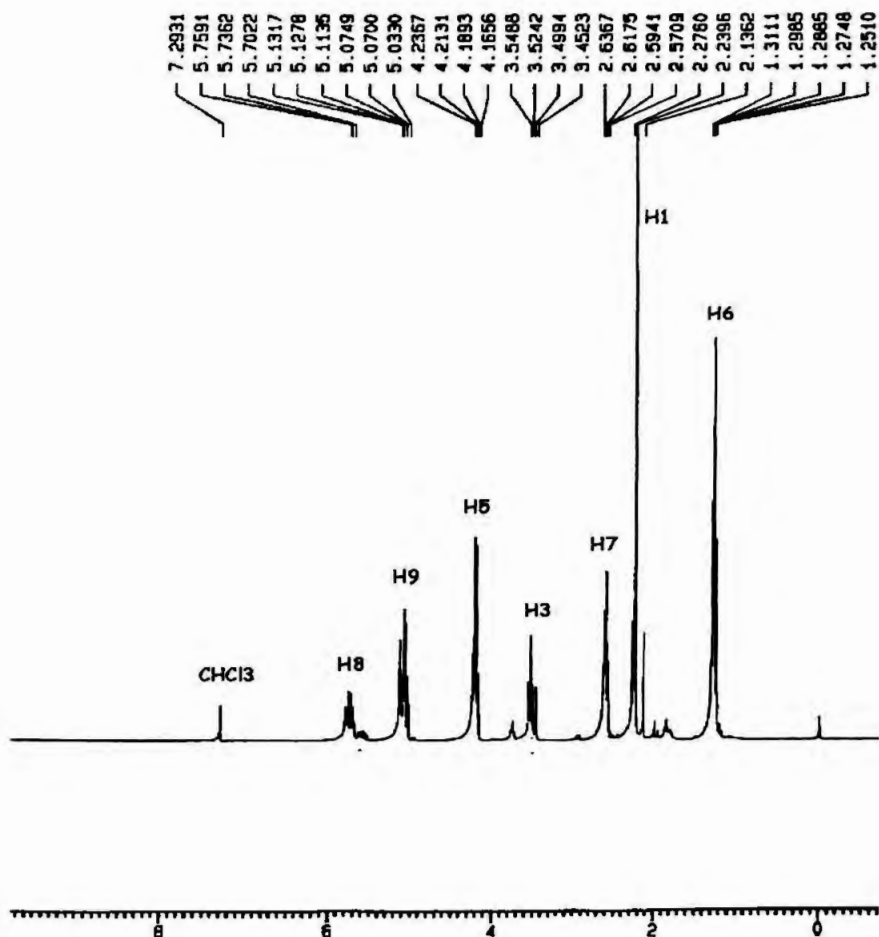
$C_9H_{14}O_3$ MM= 170,21 g/mol

Rendimento: 13,6 g, 80%

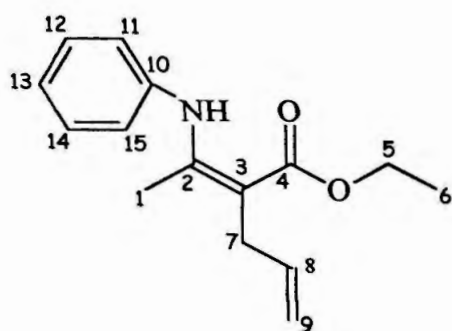
Aspecto: Líquido transparente

Ponto de ebulição: 115 °C (16 mmHg)

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,27 (t, 3H, $J=7,1$ Hz) (H-C6)
2,24 (s, 3H) (H-C1)
2,62 (t, 2H, $J=7,1$ Hz)(H-C7)
3,52 (t, 1H, $J=7,1$ Hz) (H-C3)
4,22 (q, 2H, $J=7,1$ Hz) (H-C5)
5,03-5,13 (m, 2H) (H-C9)
5,70-5,82 (m, 1H)(H-C8)



ESPECTRO 21. Espectro de RMN¹H do 2-acetil-4-pentenoato de etila.

3-(*N*-fenilamino)-2-metil-3-ailbutenoato de etila

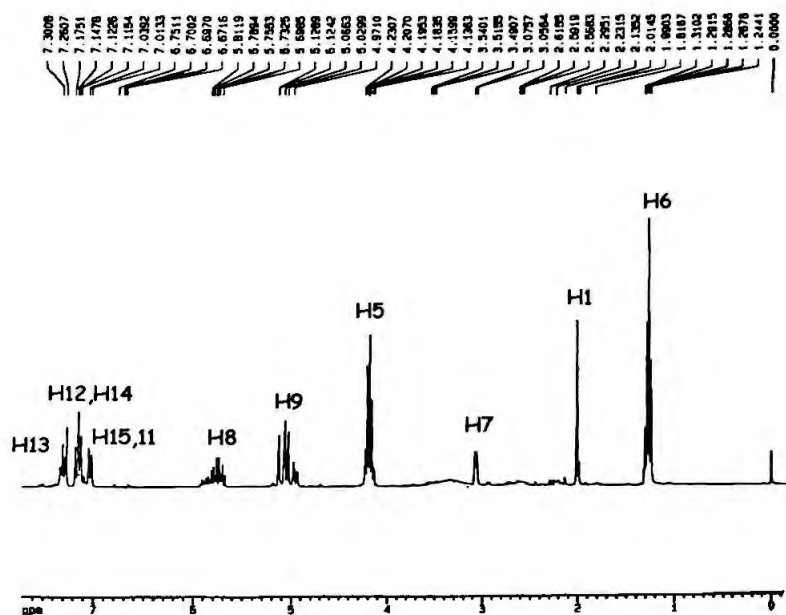
$C_{15}H_{19}NO_2$ MM= 245,320 g/mol

Rendimento: 0,85 g, 70%

Aspecto: Líquido transparente

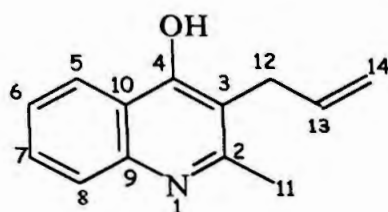
Ponto de ebulição: 130 °C (0,1 mm Hg)

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,27 (t, 3H, $J=7,1$ Hz)(H-C6)
2,01 (s, 3H) (H-C1)
3,06(d, 2H, $J=5,8$ Hz) (H-C7)
4,20 (q, 2H, $J=7,1$ Hz) (H-C5)
5,13- 5,01 (m, 2H) (C9)
5,67-5,9 (m, 1H) (C8)
7,02(d, 2H, $J=7,8$ Hz) (H-C11)(H, C15)
7,15(t, 1H, $J=7,8$ Hz) (H-C12)(H, C14)
7,30(t, 1H, $J=7,8$ Hz) (H-C13)
11,06 (s, 1H) (H-NH)



ESPECTRO 22. Espectro de RMN ^1H do 3-(N-fenilamino)-2-metil-3-ailbutenoato de etila.

2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina



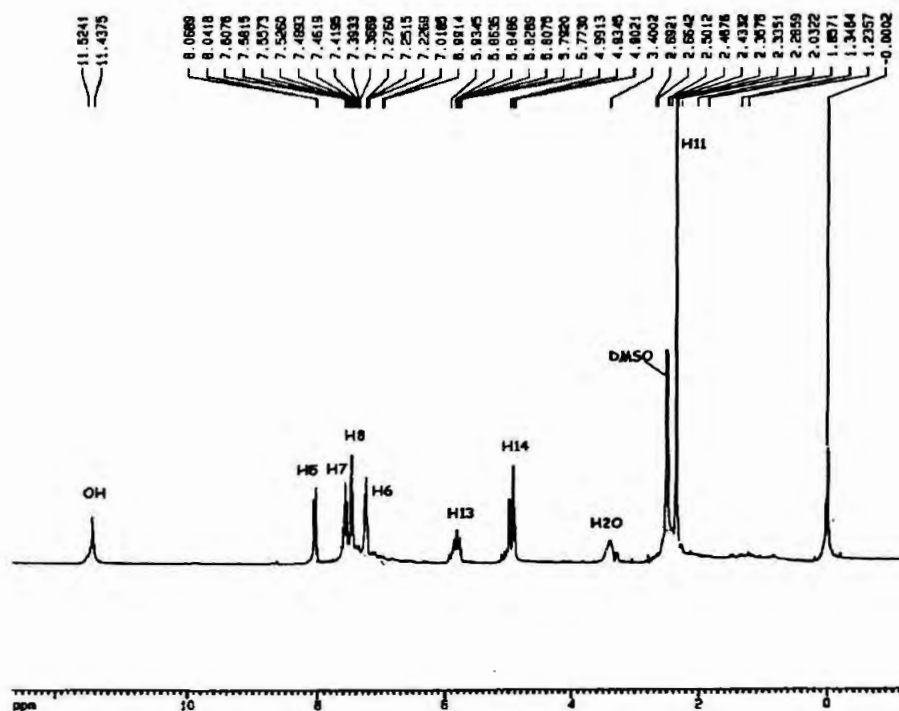
$C_{13}H_{13}NO$ MM= 199,25 g/mol

Rendimento: 0,5 g; 60%

Aspecto: sólido marrom

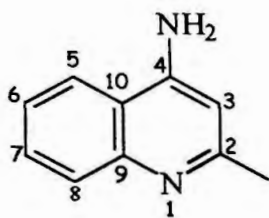
Ponto de fusão: 265-267 °C

1H RMN (DMSO- D_6) δ (ppm)
2,36(s, 3H) (H-C11)
3,29(d, 2H) (H-C12)
4,92(d,1H)(H-C14 <i>cis</i>) (9,7 Hz)
4,96 (d, 1H) (H-C14 <i>trans</i>) (18,0 Hz)
5,79-5,93(m, 1H) (H-C13)
7,23(t, 1H, $J= 7,47$ Hz)(H-C6)
7,47 (d, 1H, $J= 7,56$ Hz)(H-C8)
7,58 (t, 1H, $J= 7,56$ Hz)(H-C7)
8,05 (d, 1H, $J= 8,19$ Hz)(H-C5)
11,48 (largo, H-OH)



ESPECTRO 23. Espectro de RMN¹H da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina.

2-metil-4-aminoquinolina

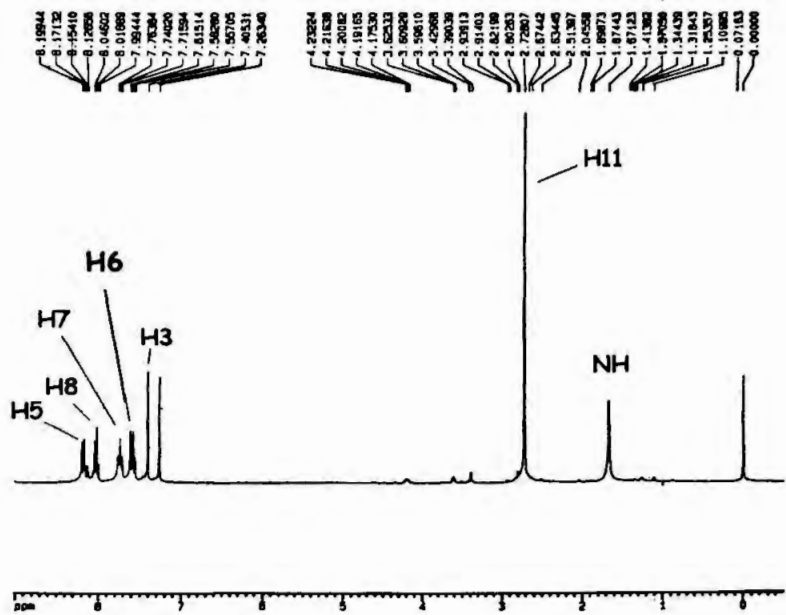


$C_{10}H_{10}N_2$ MM= 158,20 g/mol

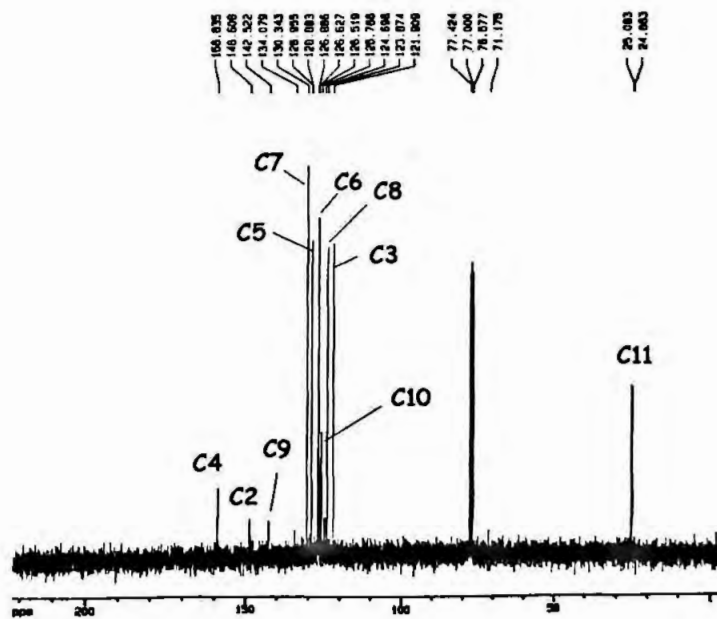
Rendimento: 0,073g; 92%

Aspecto: líquido amarelo

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
1,67 (s, 1H);(H-NH)	25,08 (C11)	142,52(C9)
2,73 (s,3H); (H-C11)	121,91 (C3)	148,61(C2)
7,40 (s,1H);(H-C3)	123,87 (C8)	158,83(C4)
7,58(+,1H, $J=8,2$ Hz);(H-C6)	125,77(C10)	
8,01(+,1H, $J=8,2$ Hz);(H-C7)	126,63(C6)	
8,14 (d,1H, $J=8,2$ Hz);(H-C8)	128,86(C5)	
8,18 (d,1H, $J=8,2$ Hz);(H-C5)	130,34(C7)	

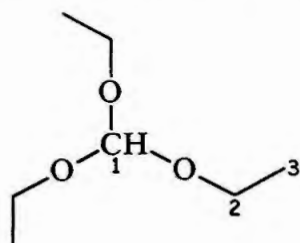


ESPECTRO 24. Espectro de RMN¹H da 2-metil-4-aminoquinolina.



ESPECTRO 25. Espectro de RMN¹³C da 2-trifluorometil-4-hidroxiquinolina.

ortoformato de etila

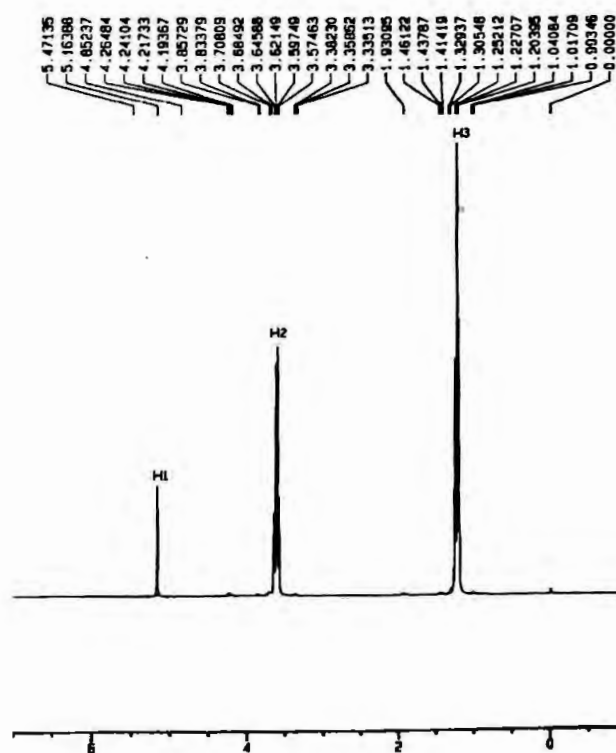
 $C_7H_{16}O_3$ MM= 148,20 g/mol

Rendimento: 414,8 g; 25,8%

Aspecto: Líquido transparente de cheiro irritante

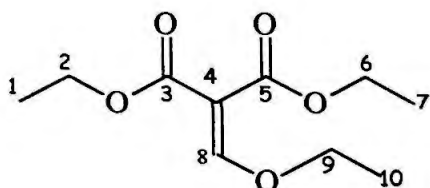
Ponto de ebulição: 135°C

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm)
1,23(t, 9H, $J=7,1$ Hz); (H-C3)
3,63(q, 6H, $J=7,1$ Hz); (H-C2)
5,16(s, 1H); (H-C1)



ESPECTRO 26. Espectro de RMN¹H do ortoformato de etila.

etoximetilenomalonato de etila



$C_{10}H_{16}O_5$; MM=216,23 g/mol

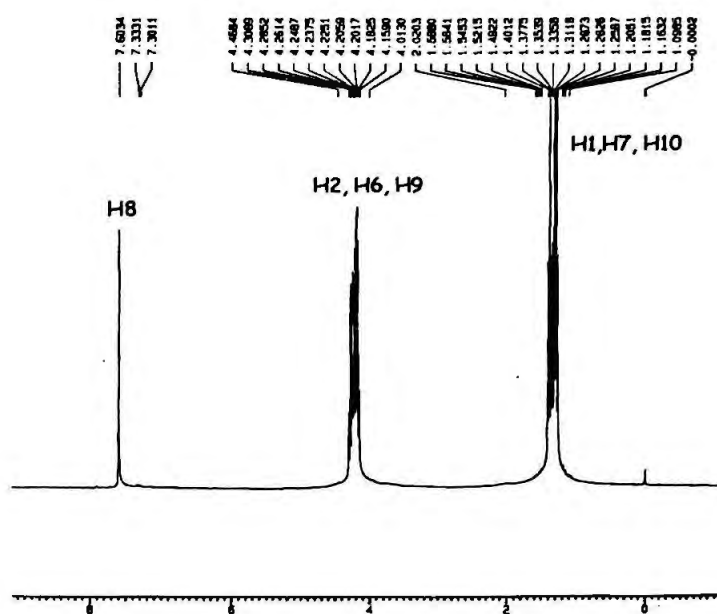
Rendimento: 17,29 g; 40%

Aspecto: Líquido transparente

Ponto de ebulição: 119 °C (0,35 mmHg)

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (NaCl)
1,28 (t, 3H, $J=7,2$ Hz):(H-C10)*	1016 $\nu C-O$ (1)
1,31 (t, 3H, $J=7,2$ Hz):(H-C7)*	1098 $\nu C-O$ (2)
1,38 (t, 3H, $J=7,2$ Hz):(H-C1)*	1286 $\nu C-O-C$ (3)
4,27(q, 2H, $J=7,2$ Hz):(H-C9)*	1628 $\nu C=C$ (4)
4,19(q, 2H; $J=7,0$ Hz)(H-C6)*	1728 $\nu C=O$ (5)
4,21 (q, 2H, $J=7,0$ Hz):(H-C2)*	
7,60(s, 1H):(H-C8)	

* Os sinais podem estar trocados

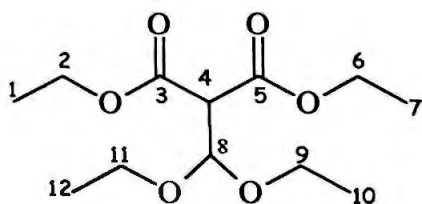


ESPECTRO 27. Espectro de RMN¹H do etoximetilenomalonato.



ESPECTRO 28. Espectro no infravermelho do etoximetilenomalonato.

dietoximetilmalonato de etila



$C_{12}H_{22}O_6$; MM=262,30 g/mol

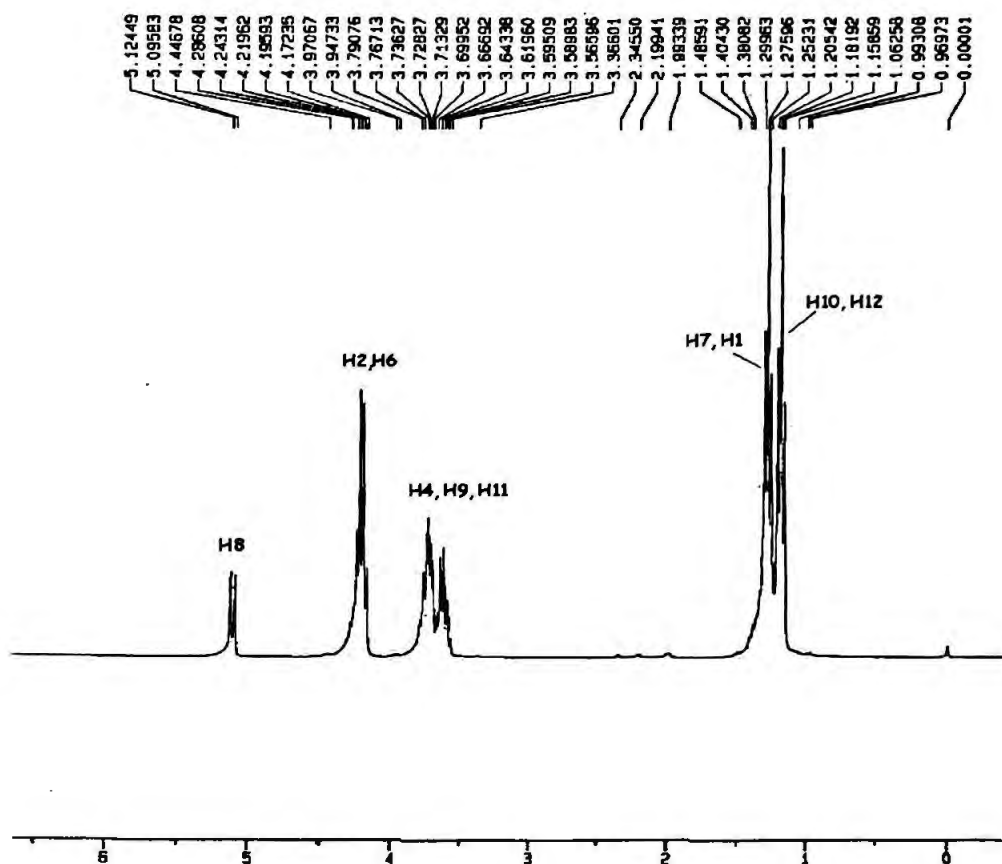
Rendimento: 18,36 g, 35%

Aspecto: Líquido transparente

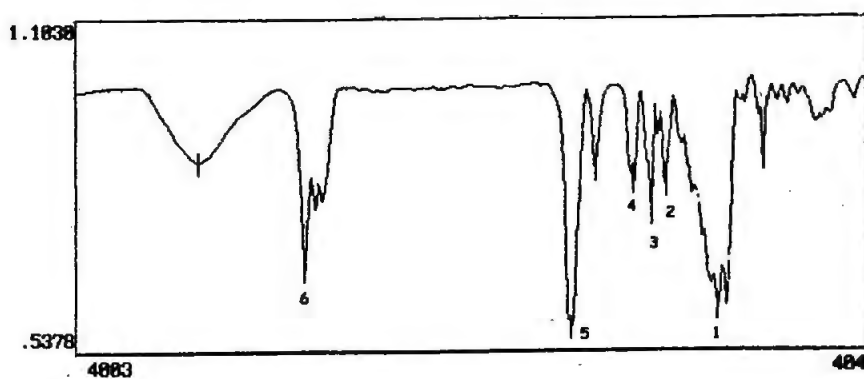
Ponto de ebulição: 101 °C (0,35 mmHg)

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (NaCl)	
1,18 (t, 6H, $J=7,1$ Hz);(H-C10, H-C12)*	1070 $\nu\text{C-O}$ (1)	2981 $\nu\text{C-H}$ (6)
1,27 (t, 6H, $J=7,1$ Hz);(H-C7, H-C1)*	1307 $\nu\text{C-O}$ (2)	
3,56-3,77 (m, 5H);(H-C4, C9, C11)	1374 $\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$ (3)	
4,20 (q, 4H, $J=7,1$ Hz);(H-C2, H-C6)	1461 $\delta_{\text{s}}\text{CH}_2$ (4)	
5,1 (d, 1H, $J=7,8$ Hz);(H-C8)	1744 $\nu\text{C=O}$ (5)	

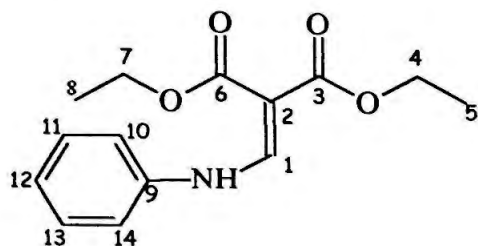
* Os sinais podem estar trocados



ESPECTRO 29. Espectro de RMN¹H do dietoximetilmalonato.



ESPECTRO 30. Espectro no infravermelho do dietoximetilmalonato.

3-(*N*-3-fenilamino)-2-carboxi-propanoato de etila

$C_{14}H_{17}NO_4$: MM=263,29 g/mol

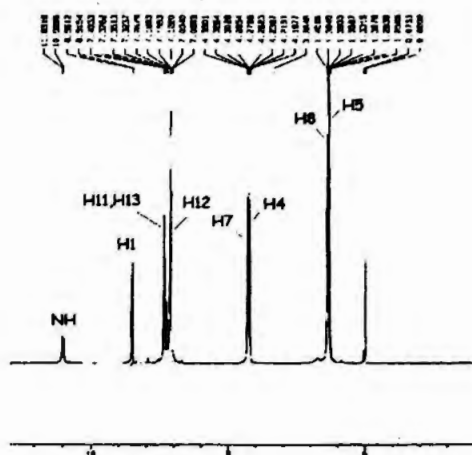
Rendimento: 4,67 g; 88,62%

Aspecto: Líquido transparente

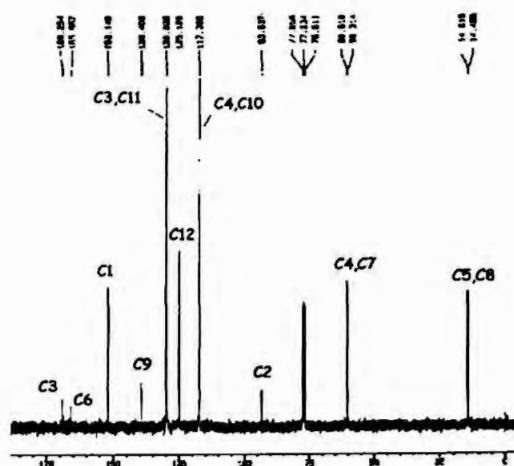
Ponto de ebulição: 101 °C (0,35 mmHg)

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (KBr)
1,33 (t,3H, $J=7,4$ Hz):(H-C5)*	14,49 e 14,61(C5,C8)	614 $\delta=C-H$ (1)
1,38(t, 3H, $J=7,4$ Hz):(H-C8)*	60,34 e 60,61(C4,C7)	690 $\delta=C-H$ (2)
4,25 (q,2H, $J=7,4$ Hz):(H-C4)*	93,64(C2)	850 $\delta=C-H$ (3)
4,31(q, 2H, $J=7,4$ Hz):(H-C7)*	117,37(C14,C10)	1650 $\nu C=O$ (4)
7,17(d,2H, $J=7,5$ Hz):(H-C14,H-C10)	125,13(C12)	1693 $\nu C=O$ (5)
7,18 (t, 2H, $J=7,5$ Hz):(H-C12)	130,01(C13,C11)	3054 $\nu=C-H$ (6)
7,37 (t, 1H, $J=7,5$ Hz):(H-C13, C11)	139,41 (C9)	3548 $\nu N-H$ (7)
8,54 (d, 1H, $J=13,5$ Hz):(H-C1)	152,14 (C1)	
11,0 (d,1H, $J=13,5$ Hz):(H-NH)	165,97 e 169,25 (C3, C6)	

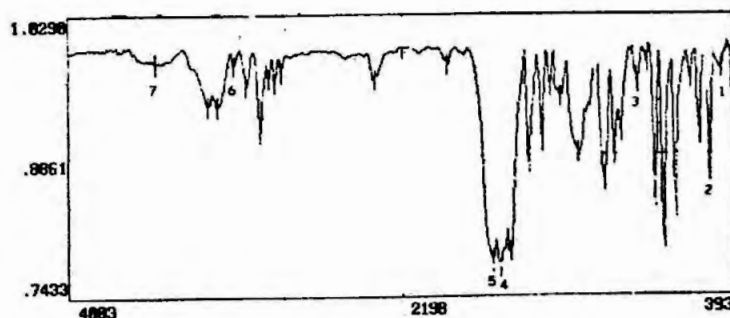
* Os sinais podem estar trocados



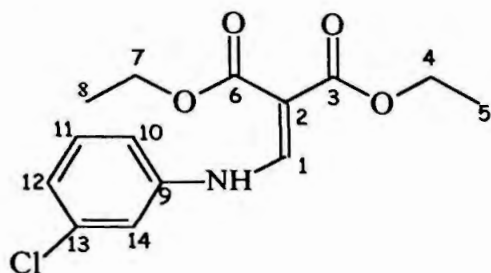
ESPECTRO 31. Espectro de RMN¹H do 3-(N-3-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila.



ESPECTRO 32. Espectro de RMN¹³C do 3-(N-3-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila.



ESPECTRO 33. Espectro no infravermelho do 3-(N-3-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila.

3-(*N*-3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila

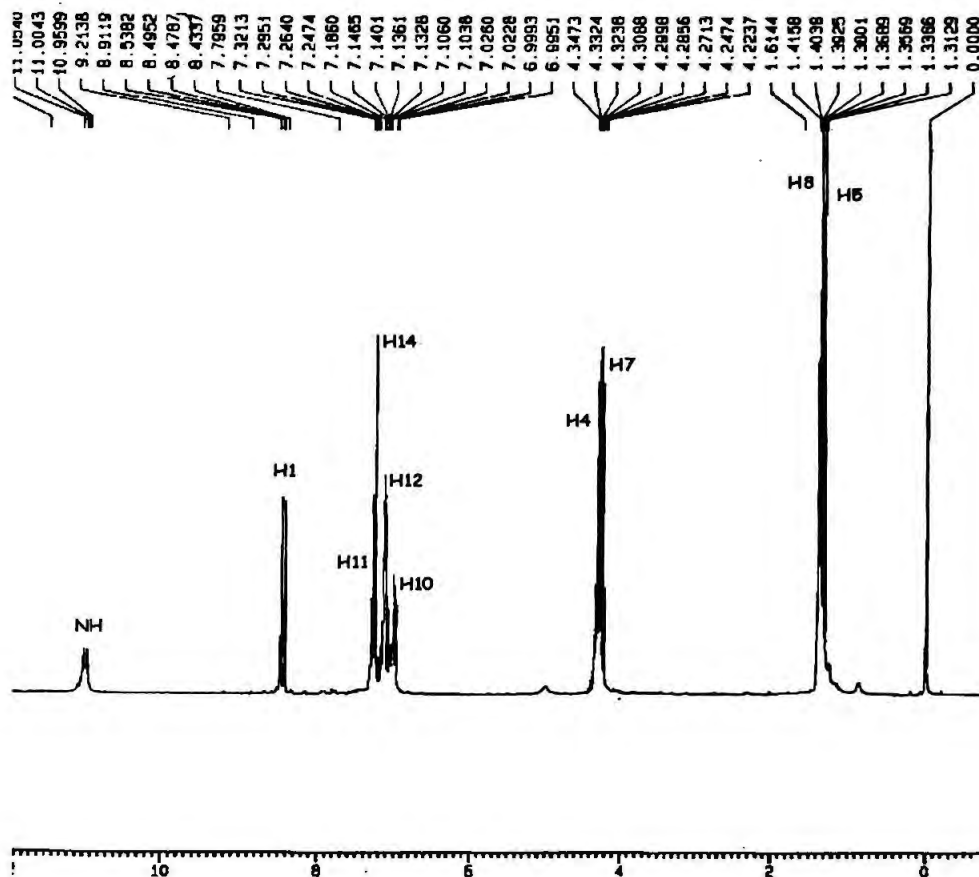
$C_{14}H_{16}NO_4$; MM=297,5 g/mol

Rendimento: 4,83g; 65% (via etilenetoximetilenemalonato)

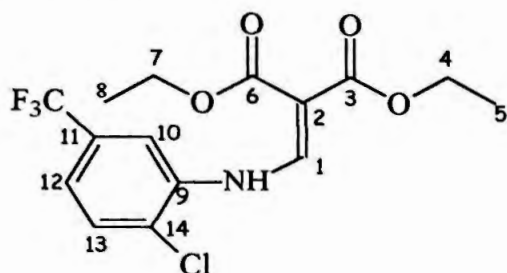
Rendimento: 2,49g; 83,97% (via reação "one pot")

Aspecto: Líquido viscoso de cor amarela

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,34 (t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C5)
1,38(t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C8)
4,26 (q, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C7)
4,31(q, 2H, $J= 7,1$ Hz):(H-C4)
6,99 (d, 1H, $J=8$ Hz):(H-C10)
7,02 (d, 1H, $J=8$ Hz):(H-C12)
7,14 (s, 1H):(H-C14)
7,29 (t, 1H, $J=8$ Hz):(H-C11)
8,45(d, 1H, $J=13,0$ Hz)(H, C1)
11,0(d, 1H, $J=13,0$ Hz):(H-NH)



ESPECTRO 34. Espectro de RMN¹H do 3-(N-3-clorofenilamino)-2-carboxi-propanoato de etila.

3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila

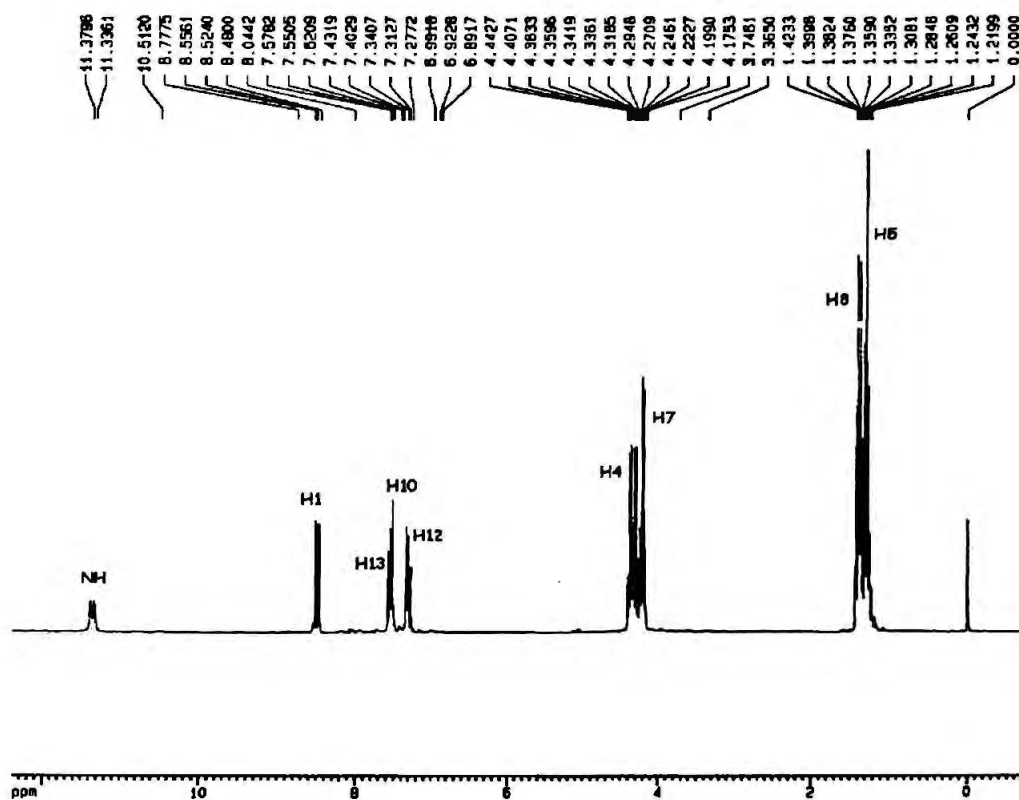
$C_{15}H_{15}ClF_3NO_4$; MM=365,5 g/mol

Rendimento: 33 g; 90%

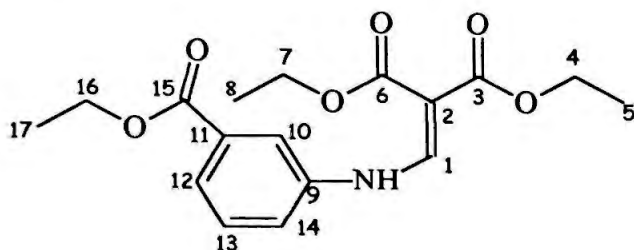
Aspecto: sólido amarelo

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,38 (t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C5) *
1,39 (t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C8) *
4,21 (q, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C7)*
4,37 (q, 2H, $J=7,1$ Hz):(H-C4) *
7,32 (d, 1H, $J=7,3$ Hz):(H-C12)
7,52 (s, 1H):(H-C10)
7,56 (d, 1H, $J=7,3$ Hz):(H-C13)
8,5 (d, 1H $J=13,0$ Hz):(H-C1)
11,35 (d, 1H, $J=13,0$):(H-NH)

* Os sinais podem estar trocados



ESPECTRO 35, Espectro de RMN ^1H do 3-(N-3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila.

3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila

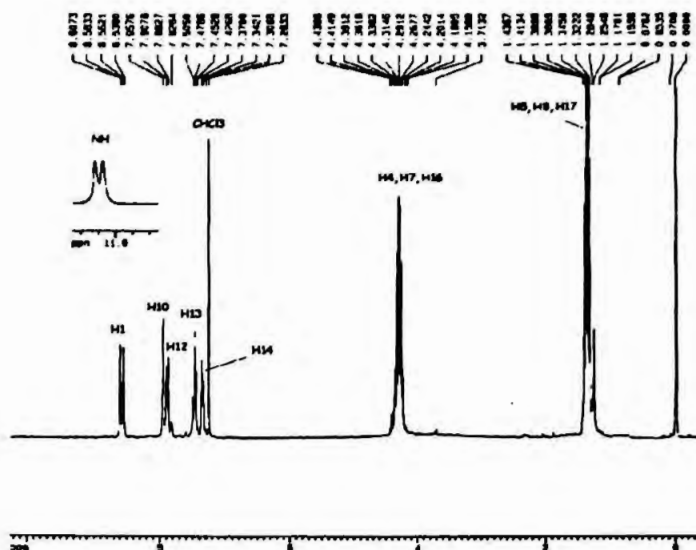
$C_{17}H_{21}NO_6$; MM=335,35 g/mol

Rendimento: 3,78g; 56,45%

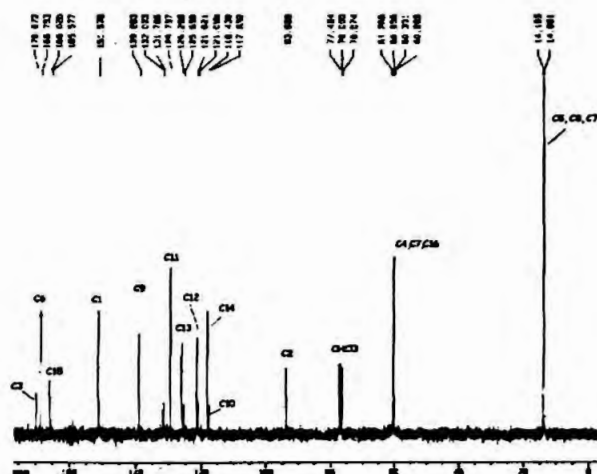
Aspecto: sólido bege

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm)	^{13}C RMN (CDCl_3) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (KBr)	
1,35 (t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C5)*	14,01(C5, C8, C17)	166,0 (C15)*	755 $\delta=\text{C-H}$ (1)
1,37(t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C8)*	60,56(C4, C7, C16)	168,7 (C6)*	792 $\delta=\text{C-H}$ (2)
1,39 (t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C17)*	93,96(C2)	170,1 (C3)*	893 $\delta=\text{C-H}$ (3)
4,16-4,36(m, 6H):(H-C4, C7, C16)	117,83(C10)		1096 $\nu\text{C-O}$ (4)
7,36 (d, 1H, $J=7,7$ Hz):(H-C14)	121,06(C14)		1260 $\nu\text{C-O-C}$ (5)
7,45 (t, 1H, $J=7,7$ Hz):(H-C13)	126,3(C12)		1424 $\nu\text{C=C}$ (6)
7,89 (d, 1H, $J=7,7$ Hz):(H-C12)	129,7 (C13)		1591 $\nu\text{C=C}$ (7)
7,95 (s, 1H):(H-C10)	131,8 (C11)		1641 $\nu\text{C=O}$ (8)
8,58 (d, 1H, $J=13,5$ Hz):(H-C1)	139,3 (C9)		1692 $\nu\text{C=O}$ (9)
11,1(d, 1H, $J=13,5$ Hz):(H-NH)	151,6 (C1)		2983 $\nu\text{C-H}$ (10)

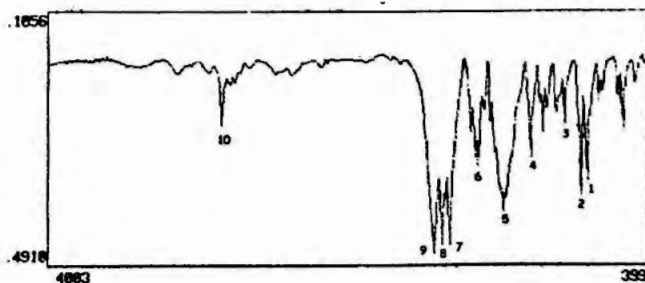
* Os sinais podem estar trocados



ESPECTRO 36. Espectro de RMN ¹H do 3-(N-3-carboxifenilamino)-2-carboxi-propanoato de etila.

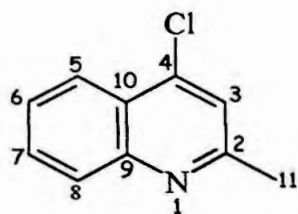


ESPECTRO 37. Espectro de RMN ¹³C do 3-(N-3-carboxifenilamino)-2-carboxi-propanoato de etila.



ESPECTRO 38. Espectro no infravermelho do 3-(N-3-carboxi fenil amino)-2-carboxi-propanoato de etila.

2-metil-4-cloroquinolina



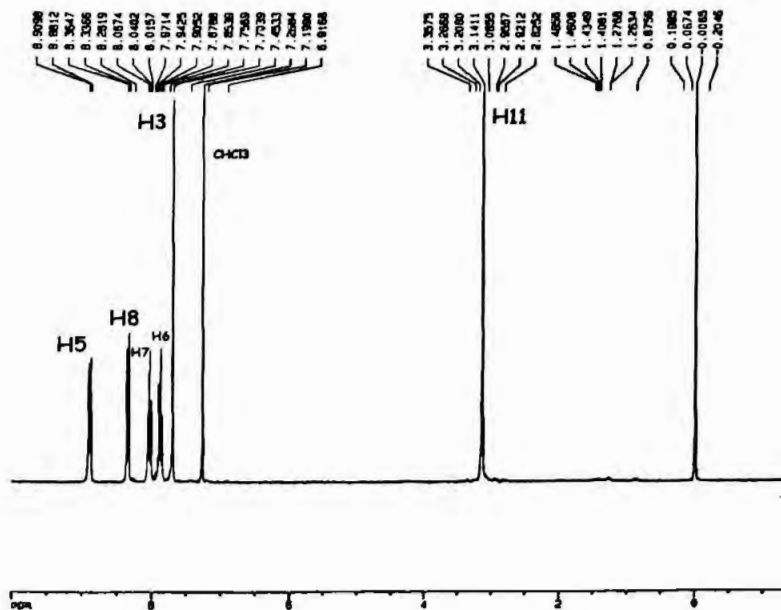
$C_{10}H_8ClN$; MM=177,63 g/mol

Rendimento: 1,08 g; 64,45%

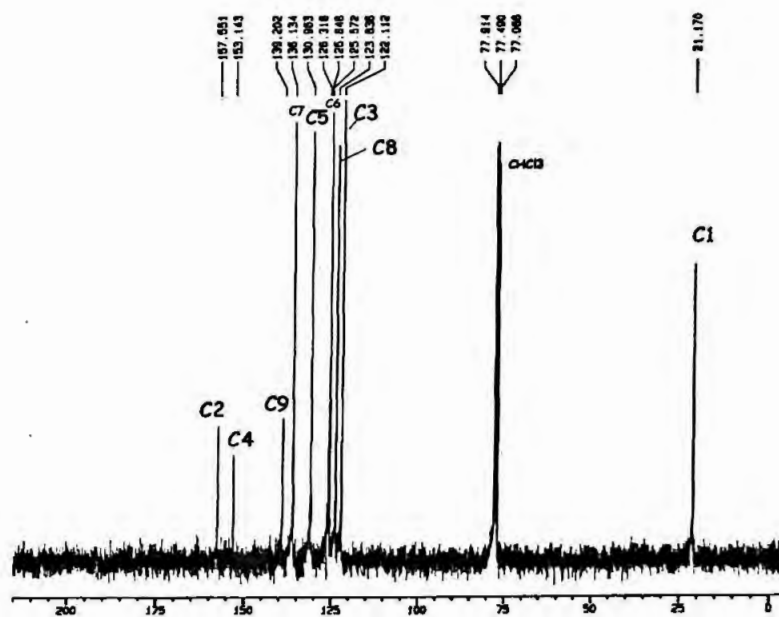
Aspecto: sólido amarelo

Ponto de fusão: 70-72 °C

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
3,14 (s, 3H):(H-C11)	21,17(C1)	136,13 (C7)
7,70 (s, 1H):(H-C3)	122,11(C3)	139,20 (C9)
7,88 (t, 1H, $J= 8,3$ Hz) (H-C6)	123,84(C8)	153,14 (C4)
8,04 (t, 1H, $J= 8,3$ Hz):(H-C7)	125,57(C6)	157,5 (C2)
8,35 (d,1H, $J= 8,3$ Hz):(H-C8)	125,85(C10)	
8,89 (d,1H, $J= 8,3$ Hz):(H-C5)	130,96 (C5)	

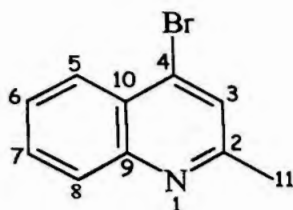


ESPECTRO 39. Espectro de RMN¹H da 2-metil-4-cloroquinolina



ESPECTRO 40. Espectro de RMN¹³C da 2-metil-4-cloroquinolina.

2-metil-4-bromoquinolina



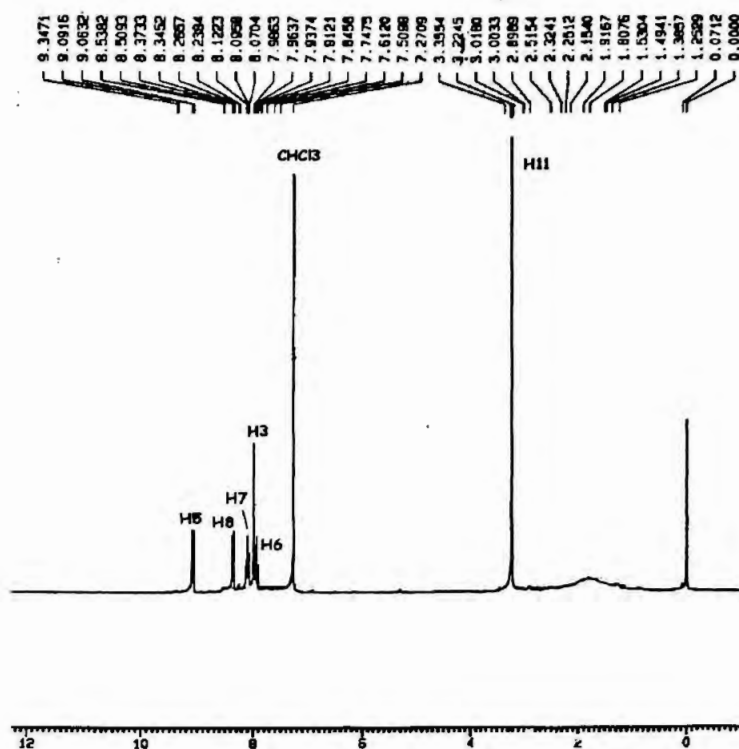
$C_{10}H_8BrN$; MM=222,08 g/mol

Rendimento: 0,96 g; 65%

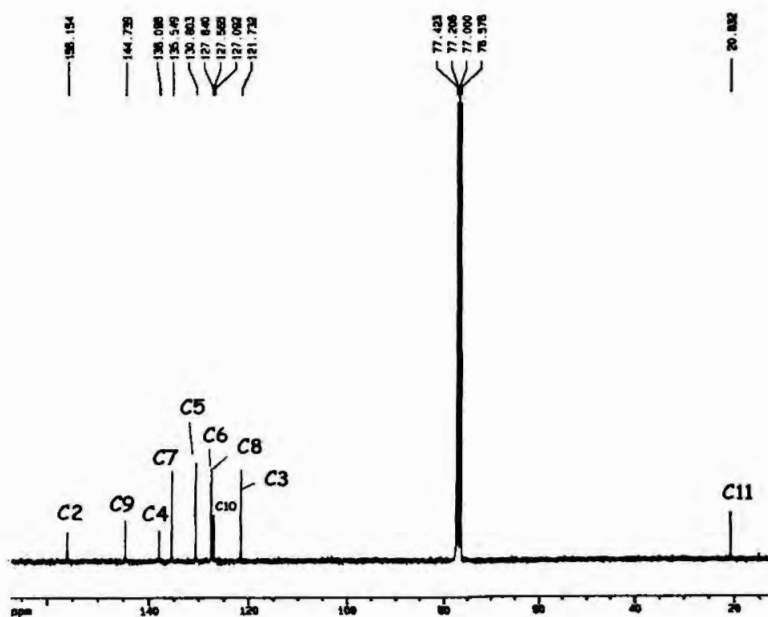
Aspecto: sólido marrom

Ponto de fusão: 75-76 °C

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
3,22 (s,3H):(H-C11)	20,83 (C11)	135,5 (C7)
7,94(t, 1H, J =8,0 Hz):(H-C6)	121,73 (C3)	138,1 (C4)
7,98(s, 1H):(H-C3)	127,09(C10)	144,7 (C9)
8,09(t, 1H, J = 8,0 Hz):(H-C7)	127,56(C8)	156,15 (C2)
8,35 (d,1H, J =8,0 Hz):(H-C8)	127,6(C6)	
9,07 (d, 1H, J =8,0 Hz):(H-C5)	130,8 (C5)	

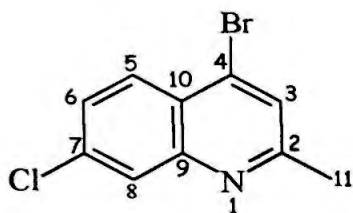


ESPECTRO 41. Espectro de RMN¹H da 2-metil-4-bromoquinolina



ESPECTRO 42. Espectro de RMN¹³C da 2-metil-4-bromoquinolina

2-metil-4-bromo-8-cloro quinolina



$C_{10}H_7BrClN$; MM=256,53 g/mol

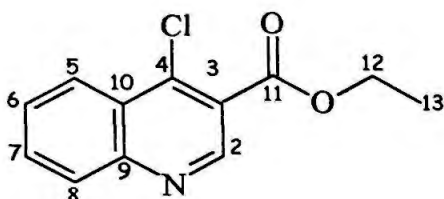
Rendimento: 0,15 g; 45,45%

Aspecto: sólido marrom

Ponto de fusão: 103-104 °C

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
2,70 (s, 3H);(H-C11)
7,55 (d, 1H, $J= 8,0$ Hz);(H-C6)
7,68 (s, 1H)(H-C3)
8,08 (s, 1H),(H-C8)
8,12 (d,1H, $J= 8,0$ Hz)(H-C5)

3-carbetoxi-4-cloroquinolina



$C_{12}H_{10}ClNO_2$; MM=235,5 g/mol

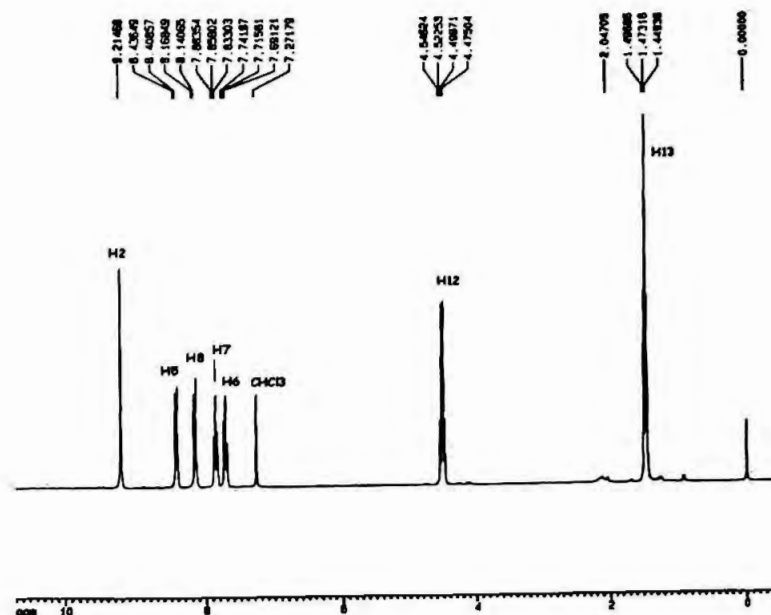
Rendimento: 0,39 g; 44,66%

Aspecto: sólido amarelo

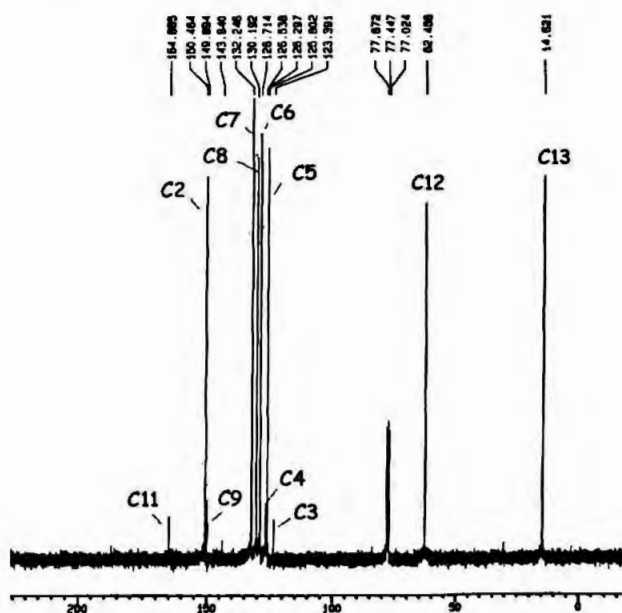
Ponto de fusão= 240-243 °C

%	Teórico	Experimental
C	61,10	60,1
H	4,24	4,20
N	5,94	5,89

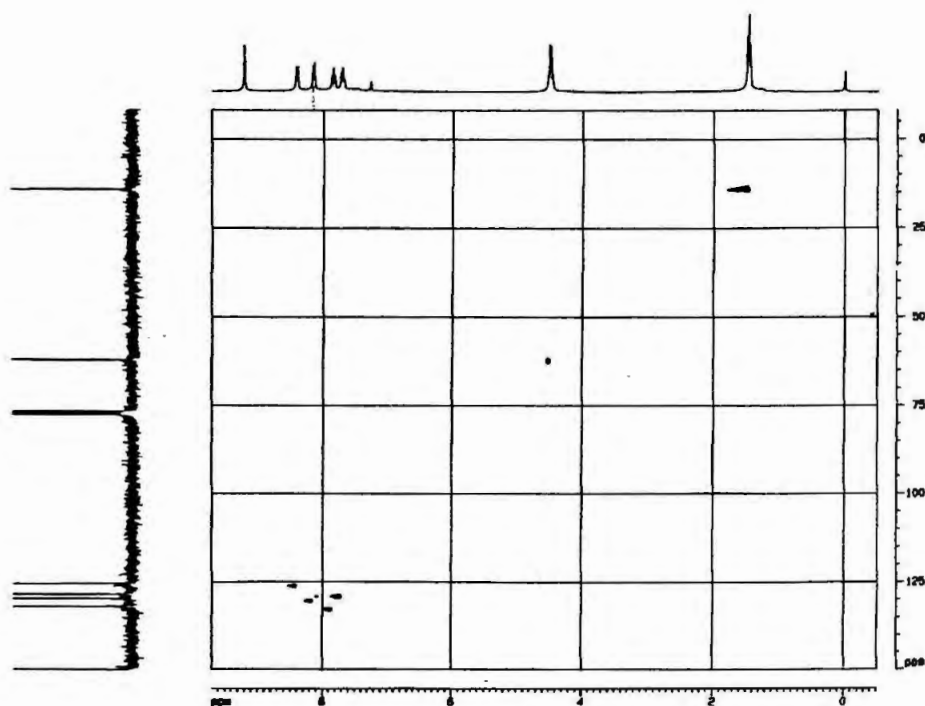
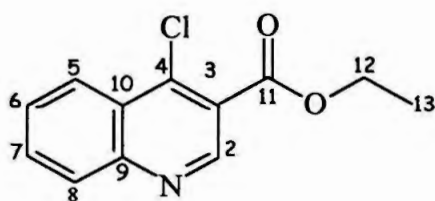
1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	IV (cm^{-1}) (KBr)
1,47 (t, 3H, $J=7,1$ Hz):(H-C13)	14,62(C13)	150,46 (C2)
4,51 (q, 2H, $J=7,1$ Hz):(H-C12)	62,46(C12)	164,88 (C11)
7,72 (t, 1H, $J=8,0$ Hz):(H-C6)	123,39(C3)	1024 vC-Cl (3)
7,86 (t, 1H, $J=8,0$ Hz):(H-C7)	125,80(C5)	1231 vC-O (4)
8,15 (d, 1H, $J=8,0$ Hz):(H-C8)	126,29(C10)	1482 vC=C (5)
8,42 (d, 1H, $J=8,0$ Hz):(H-C5)	126,54(C4)	1581 vC=C (6)
9,21 (s, 1H):(H-C2)	128,71(C6)	1612 vC=N (7)
	130,19 (C8)	1720 vC=O (8)
	132,25 (C7)	2979vC-H (9)
	149,89 (C9)	3005v=C-H (10)



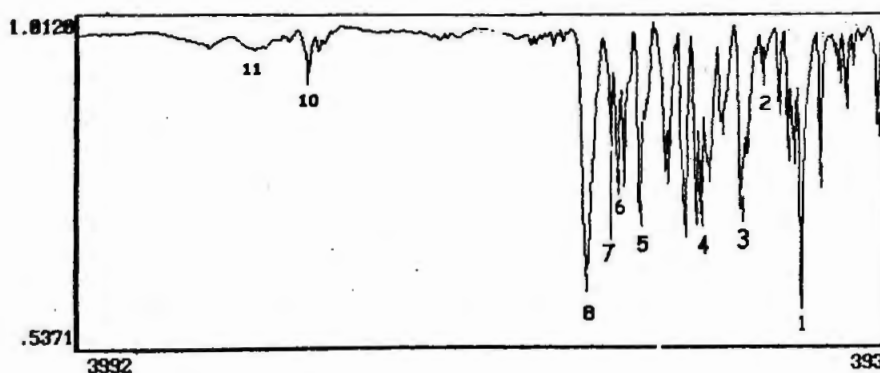
ESPECTRO 44. Espectro de RMN¹H da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina.



ESPECTRO 45. Espectro de RMN¹³C da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina.

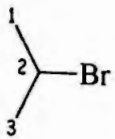


ESPECTRO 46. Espectro HMCQ da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina.



ESPECTRO 47. Espectro no infravermelho da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina.

brometo de isopropila

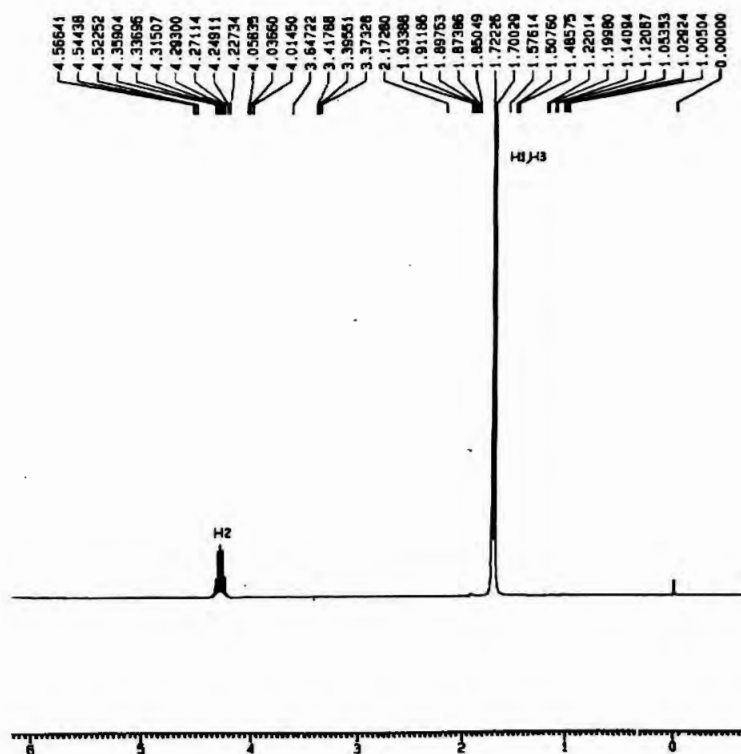
C₃H₇Br; MM=122,99 g/mol

Aspecto: líquido transparente

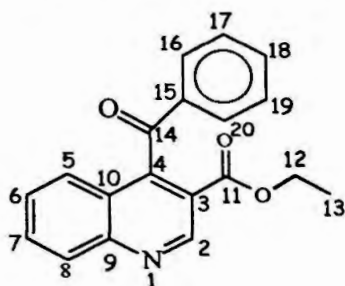
Rendimento: 14,29 g; 46,5%

Ponto de fusão= 56 °C

¹ H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)
1,71 (d, 6H, J=6,6 Hz):(H-C1;H-C3)
4,23-4,36 (ht, 1H, J=6,6 Hz):(H-C2)

ESPECTRO 48. Espectro de RMN¹H do brometo de isopropila.

3-carbetoxi-4-oxo-benzilquinolina

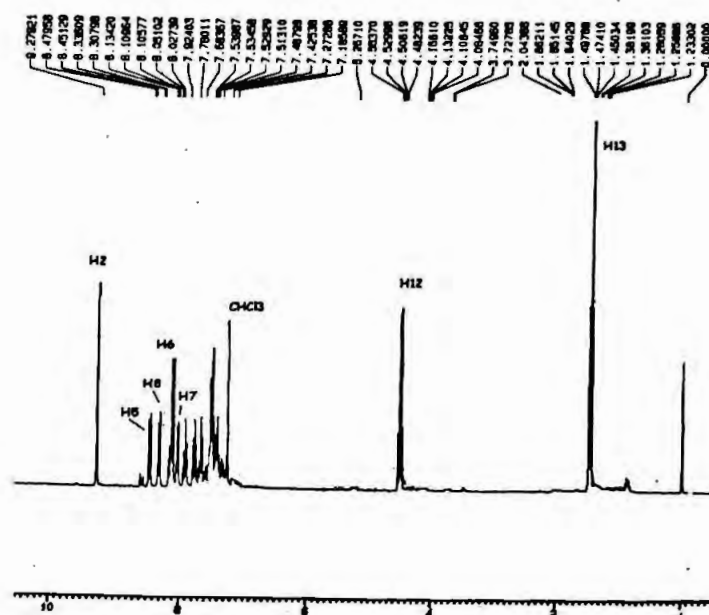


$C_{19}H_{15}NO_3$; MM=305,33 g/mol

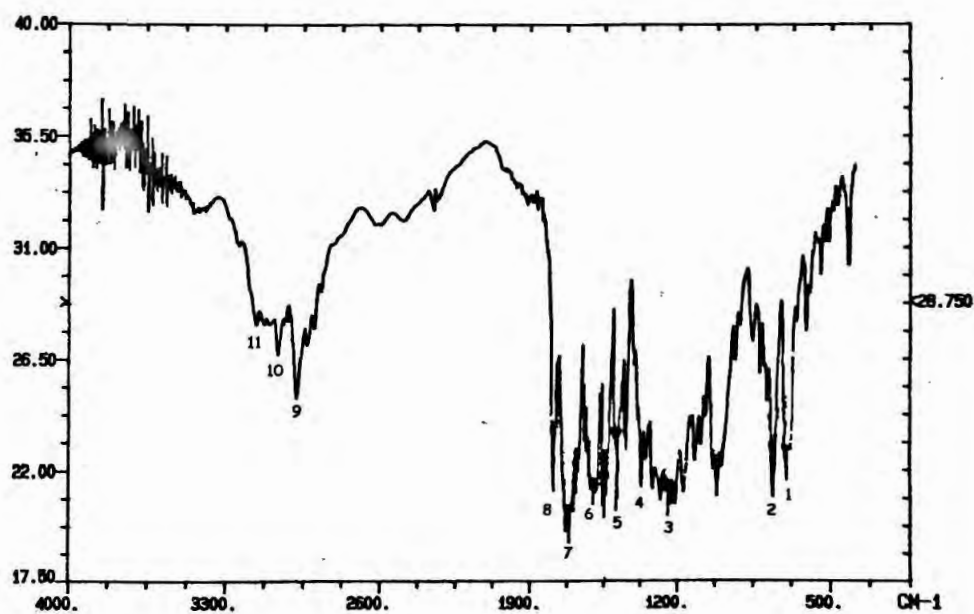
Rendimento (produto bruto): 0,3 g; 57,5%

Aspecto: semisólido amarelo

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	IV (cm^{-1})(KBr)
1,47 (t, 3H, $J=7,02$ Hz);(H-C13)	709 $\delta=C-H$ (1)
4,51 (q, 2H, $J= 7,0$ Hz); (H-C12)	773 $\delta=C-H$ (2)
7,86 (t, 1H, $J= 8,1$ Hz);(H-C7)	1246 $\nu C-O$ (3)
7,68(t, 1H, $J= 8,1$ Hz);(H-C6)	1498 $\nu C=C$ (4)
8,16 (d, 1H, $J=8,1$ Hz);(H-C8)	1537 $\nu C=C$ (5)
8,43 (d, 1H, $J=8,1$ Hz);(H-C5)	1613 $\nu C=C$ (6)
9,28 (s,1H);(H-C2)	1725 $\nu C=O$ (7)
	1788 $\nu C=O$ (8)
	2980 $\nu C-H$ (9)
	3068 $\nu=C-H$ (10)
	3163 $\nu=C-H$ (11)

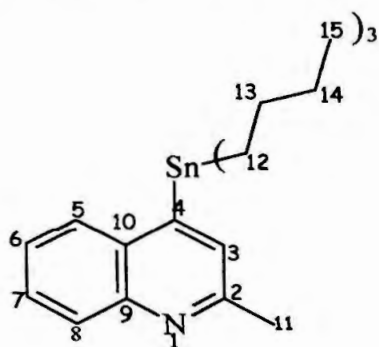


ESPECTRO 49. Espectro de RMN¹H do 3-carboxi-4-oxo-benzilquinolina.



ESPECTRO 50. Espectro de RMN¹H 3-carboxi-4-oxo-benzilquinolina.

2-metil-4-tributilestanhoquinolina



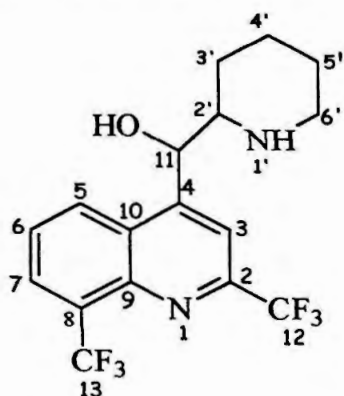
$C_{22}H_{35}NSn$; MM=432,12 g/mol

Rendimento: 0,73 g; 65,4%

Aspecto: líquido amarelo

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
0,92 (t, 6H, $J=8,0$ Hz);(H-C12)	13,98(C12)	129,36 (C8)
1,29-1,42 (m, 15H);(H-C15,14)	17,83(C15)	130,74 (C6)
1,64 (qt, 6H, $J=8,0$ Hz);(H-C13)	26,78(C14)	134,48 (C4)
2,73(s, 1H);(H-C11)	28,23(C13)	149 (C9)
7,58 (t, 1H, $J=8,1$ Hz);(H-C7)	28,53(C11)	159,17 (C2)
7,62 (s, 1H);(H-C3)	126,15 (C3)	
7,73 (t, 1H, $J=8,1$ Hz);(H-C6)	126,9 (C7)	
8,02 (d, 1H, $J=8,1$ Hz);(H-C8)	127,0 (C10)	
8,14(d, 1H, $J=8,1$ Hz);(H-C5)	127,3(C5)	

mefloquina base



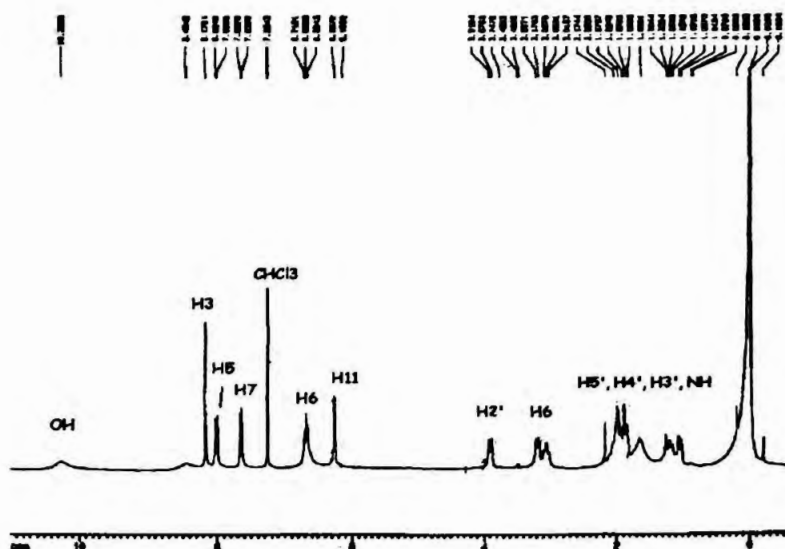
$C_{17}H_{16}NOF_6$; MM=378,3 g/mol

Rendimento: 3,7g; 98 %

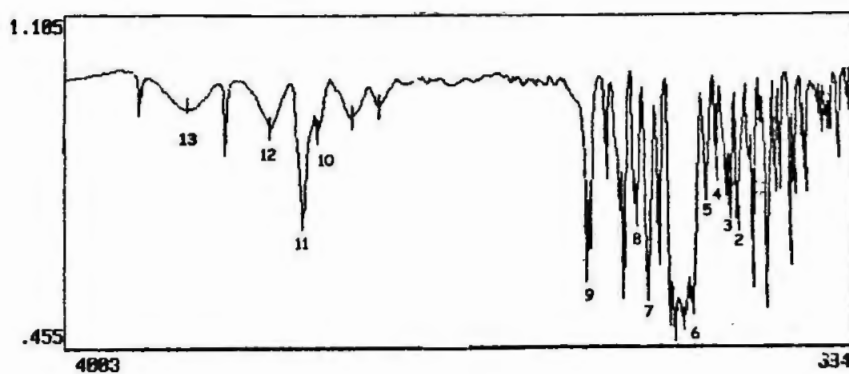
Aspecto: sólido branco cristalino

Ponto de fusão: 250-251 °C

$^1\text{H RMN (CHCl}_3\text{)} \delta \text{ (ppm)}$	IV (cm^{-1})(KBr)	
1,01-2,05(m, 7H);(H-C5',C4', C3', H-NH)	736 $\delta=\text{C-H (1)}$	2868 $\nu_s\text{C-H (10)}$
3,05 (t, 1H, $J=11$ Hz);(Hax-C6)	807 $\delta=\text{C-H (2)}$	2938 $\nu_{as}\text{C-H (11)}$
3,18 (d, 1H, $J=11$ Hz);(Heq-C6)	835 $\delta=\text{C-H (3)}$	3087 $\nu=\text{C-H (12)}$
3,89 (d, 1H, $J=12$ Hz);(H- C2')	856 $\delta=\text{C-H (4)}$	3461 $\nu\text{N-H ou O-H (13)}$
6,21 (s,1H) (H-C11)	1148 $\nu_{as}\text{CF}_3 \text{ (5)}$	
6,69 (t, 1H; $J=7,8$ Hz); (H-C6)	1312 $\nu_s\text{CF}_3 \text{ (6)}$	
7,65 (d,1H, $J=7,1$ Hz), (H-C7)	1429 $\nu\text{C=C (7)}$	
8,00 (d,1H, $J=7,1$ Hz), (H-C5)	1450 $\nu\text{C=C (8)}$	
8,17 (s, 1H); (H-C3)	1601 $\nu\text{C=C (9)}$	

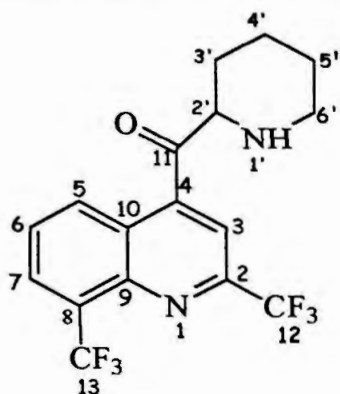


ESPECTRO 53. Espectro de RMN¹H mefloquina base.



ESPECTRO 54. Espectro de RMN¹H mefloquina base.

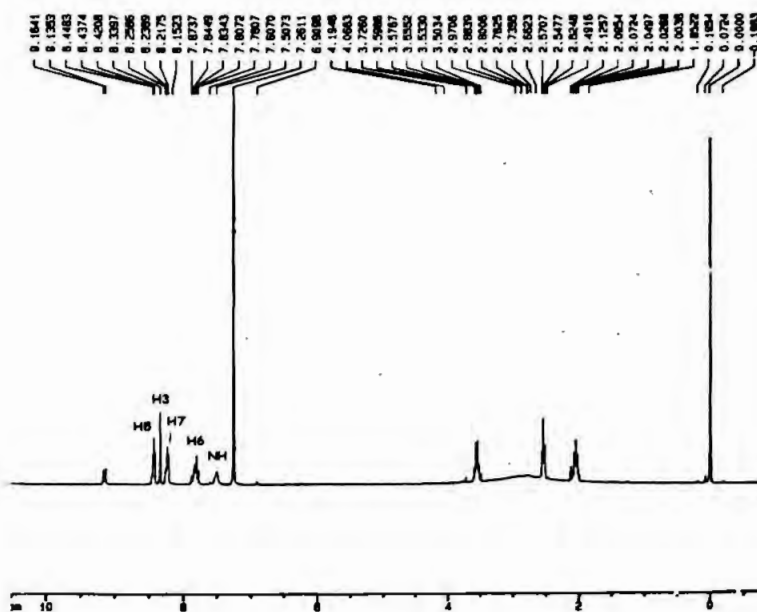
derivado cetônico da mefloquina

 $C_{17}H_{14}NOF_6$; MM=376,3 g/mol

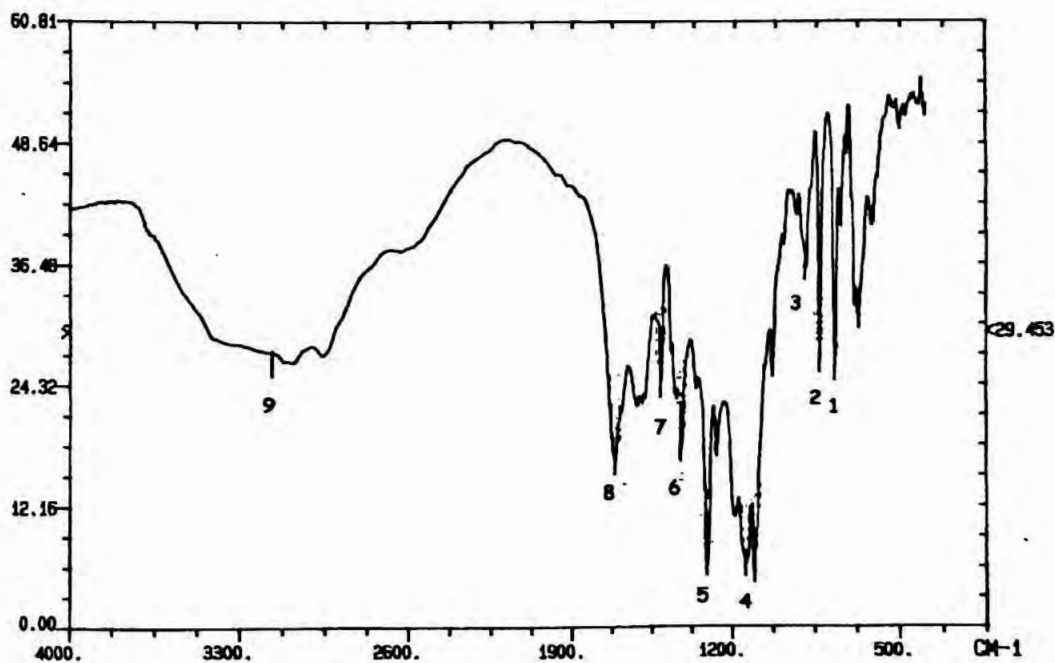
Rendimento: 0,75 g; 40%

Ponto fusão: 145 - 148°C

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	IV (cm^{-1})(KBr)	
2,02-2,09(m,3H)	772 $\delta=C-H$ (1)	3168 $\nu N-H$ (9)
2,49-2,57(m, 3H)	837 $\delta=C-H$ (2)	
3,50-3,59 (m, 3H)	898 $\delta=C-H$ (3)	
7,50 (s largo):(H-NH)	1146 $\nu_{as}CF_3$ (4)	
7,81 (t, 1H; $J=6,4$ Hz):(H-C6)	1312 ν_sCF_3 (5)	
8,22 (d, 1H; $J=6,4$ Hz):(H-C7)	1427 $\nu C=C$ (6)	
8,34 (s,1H) (H-C3)	1516 $\nu C=C$ (7)	
8,48(d, 1H; $J=6,4$ Hz):(H-C5)	1713 $\nu C=O$ (8)	

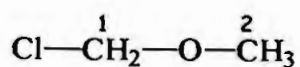


ESPECTRO 55. Espectro de RMN¹H do derivado cetônico da mefloquina.



ESPECTRO 56. Espectro de RMN¹H do derivado cetônico da mefloquina.

éter monoclorometílico

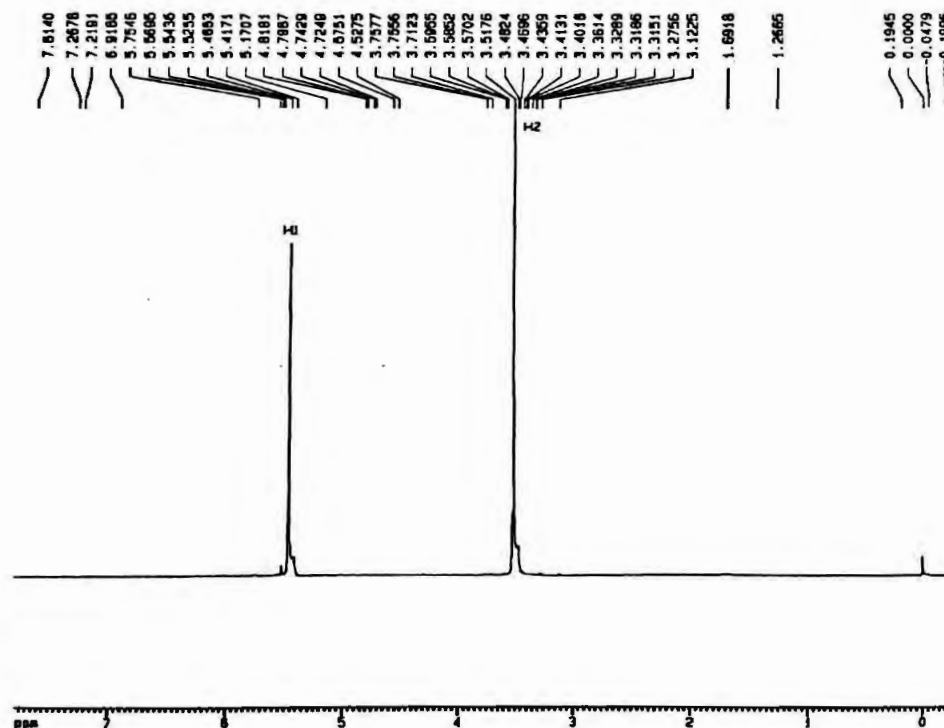
C₂H₅ClO; MM=80,51 g/mol

Rendimento: 43,88 g; 50%

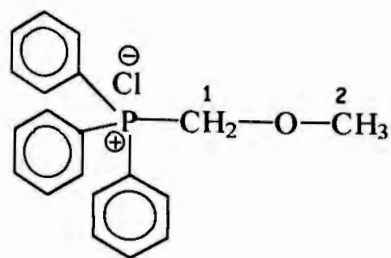
Ponto de ebulição= 50 - 51°C

Aspecto: líquido transparente

¹ H RMN (CDCl ₃) δ (ppm)
3,52(s, 3H); (H-C2)
5,46 (s, 2 H);(H-C1)

ESPECTRO 57. Espectro de RMN¹H do éter monoclorometílico.

cloreto de metoximetiltrifenilfosfônio



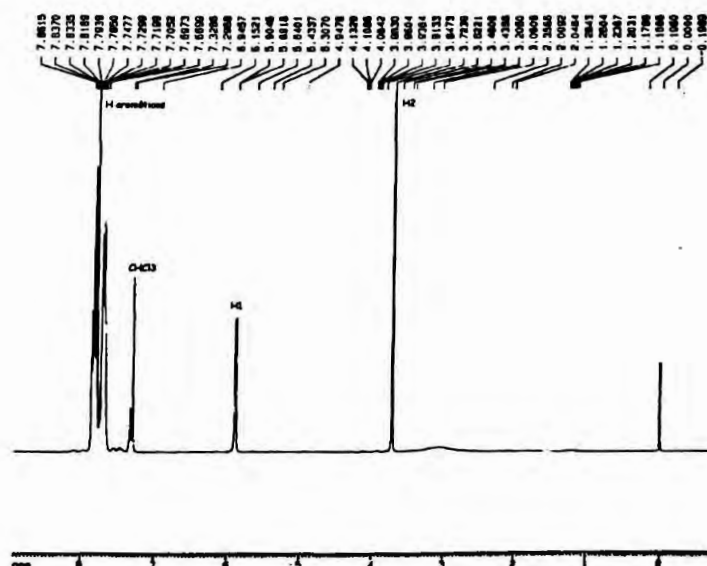
$C_{20}H_{20}ClOP$ MM= 342,5 g/mol

Rendimento: 25,34 g; 74%

Aspecto: sólido branco cristalino

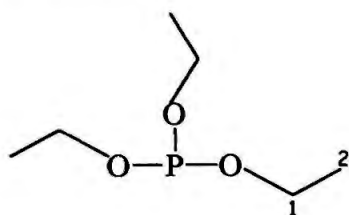
Ponto de fusão: 178-180 °C

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
3,72 (s, 3H); (H-C2)
5,90 (d, 2H);(H-C1)
7,67-7,86 (m,15H) (prótons aromáticos)



ESPECTRO 58. Espectro de RMN 1H do cloreto de metoximetil trifenilfosfônio.

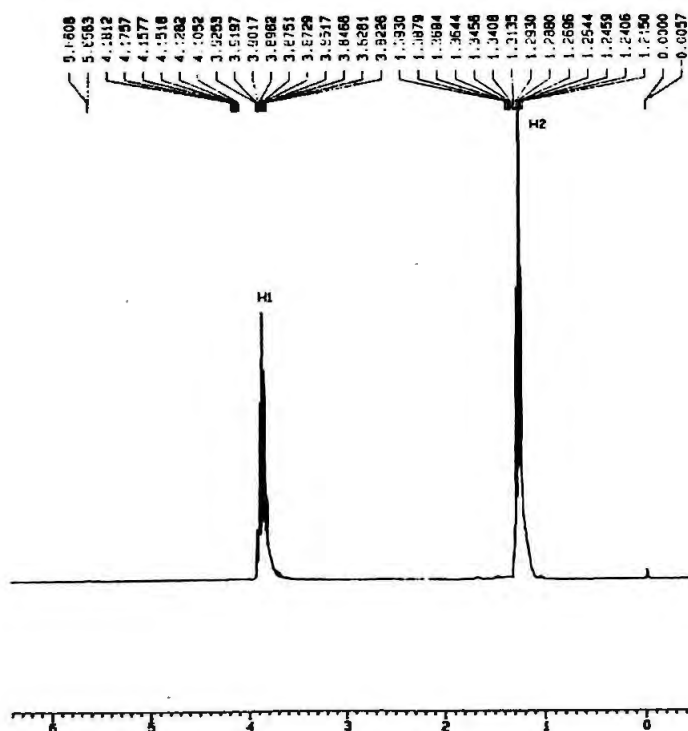
triethylfosfito


 $C_6H_{15}O_3P$ MM= 166,16 g/mol

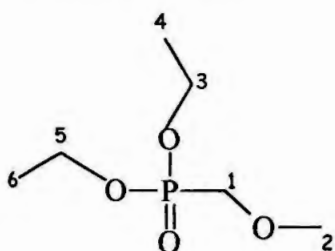
Rendimento: 16,62g; 40%

Aspecto: líquido

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,24-1,29(m, 9H):(H-C2)
3,82-3,92(m, 6H):(H-C1)

ESPECTRO 59. Espectro de RMN¹H do trietilfosfito

metoximetildietilfosfonato

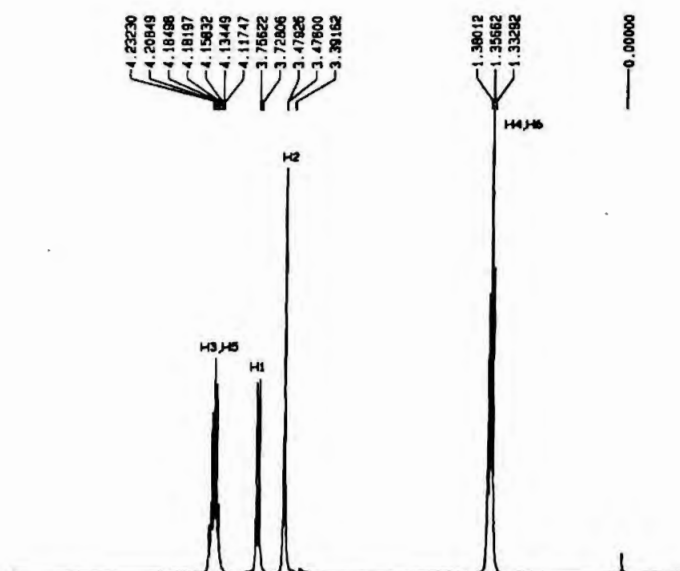


$C_6H_{15}O_4P$; MM= 181 g/mol

Rendimento: 2,3 g; 85%

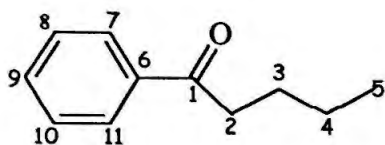
Aspecto: líquido

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)
1,36(t, 6H, $J=7,1$ Hz);(H-C4,C6)
3,48 (s, 3H, H-C2)
3,74 (d, 2H, $J_{C-P} = 8,5$ Hz), (H-C1)
4,17 (q, 4H, 1H, $J = 7,1$ Hz), (H-C5, C3)



ESPECTRO 60. Espectro de RMN 1H do trietilfosfito.

benzobutanocetona

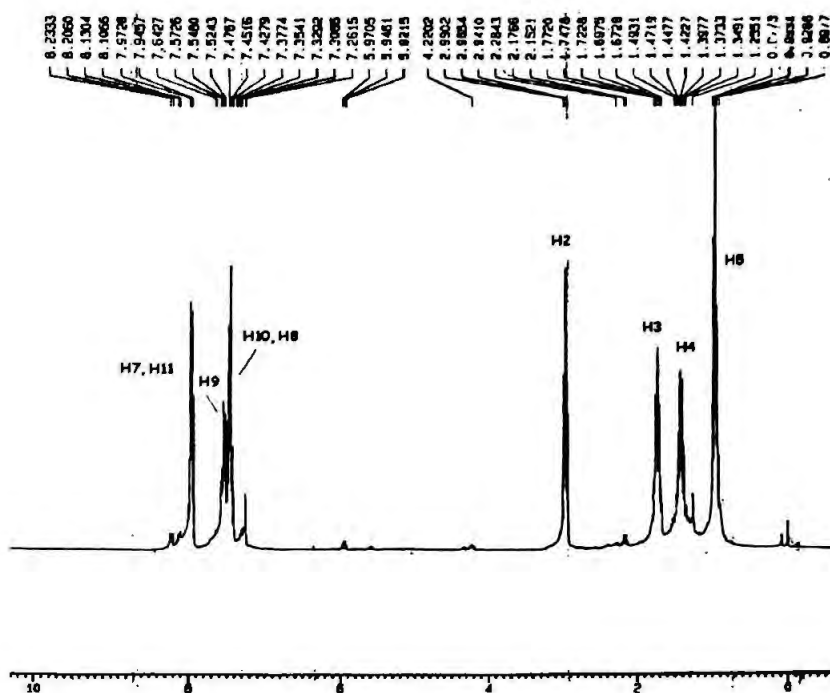


$C_{11}H_{14}O$; MM=162 g/mol

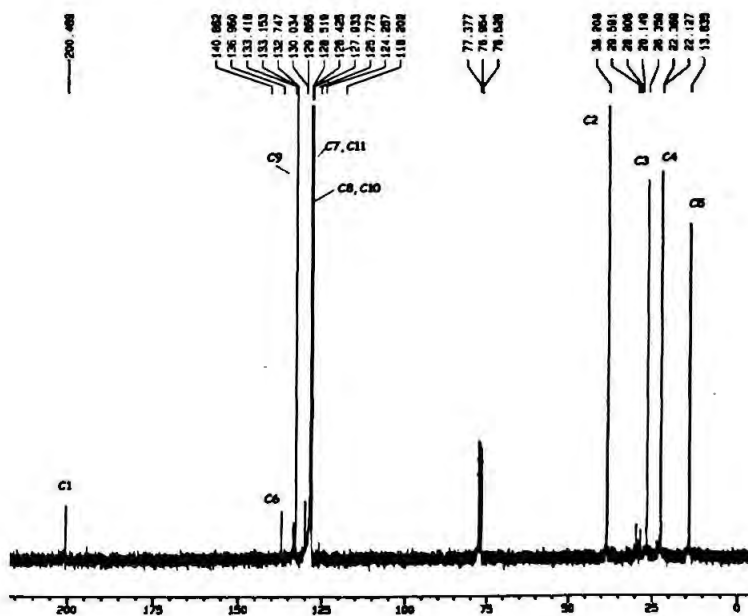
Rendimento: 0,12 g; 73%

Aspecto: líquido transparente

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
0,95 (t, 3H, $J=7,5$ Hz), (H-C5)	13,83 (C5)	136,96 (C6)
1,43 (sx, 2H $J=7,5$ Hz), (H-C4)	22,36 (C4)	200,49 (C1)
1,72 (qt, 2H, $J=7,5$ Hz), (H-C3)	28,15 (C3)	
2,96 (t, 2H, $J=7,5$ Hz)(H-C2)	38,21 (C2)	
7,43 (t, 2H, $J=8,13$ Hz), (H-C10,8)	127,93 (C7, C11)	
7,53 (t, 1H, $J=8,13$ Hz), (H-C9)	128,42 (C8, C10)	
7,96 (d, 2H, $J=8,13$ Hz), (H-C7,11)	132,7(C9)	

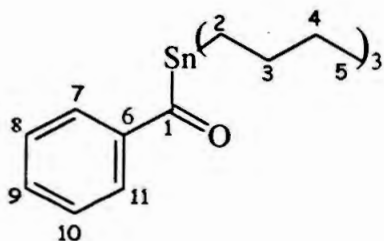


ESPECTRO 61. Espectro de RMN¹H do benzobutanocetona.



ESPECTRO 62. Espectro de RMN¹³C do benzobutanocetona.

éster de feniltributilestanho



$C_{19}H_{32}SnO$; MM= 395 g/mol

Rendimento: 0,16 g; 40%

Aspecto: líquido amarelo

1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ (ppm)	
0,92 (t, 6H, $J=7,8$ Hz), (H-C2)	13,61 C2	129,46(C8, C10)
1,34-1,42 (m, 15H), (H-C4, H-C5)	17,52 C5	163,63(C9)
1,62 (qt, 6H, $J=7,8$ Hz), (H-C3)	26,85 C4	171,13(C1)
7,53 (t, 2H, $J=7,38$ Hz), (H-C10,8)	27,88 C3	
7,68 (t, 1H, $J=7,38$ Hz), (H-C9)	127,07(C6)	
8,16 (d, 2H, $J=7,38$ Hz), (H-C7,11)	128,46(C8, C12)	

2. Resultados do estudo biológico

A concentração mínima inibitória (MIC) dos diversos compostos para cada cepa testada é apresentada no GRÁFICO 1 e na TABELA 3.

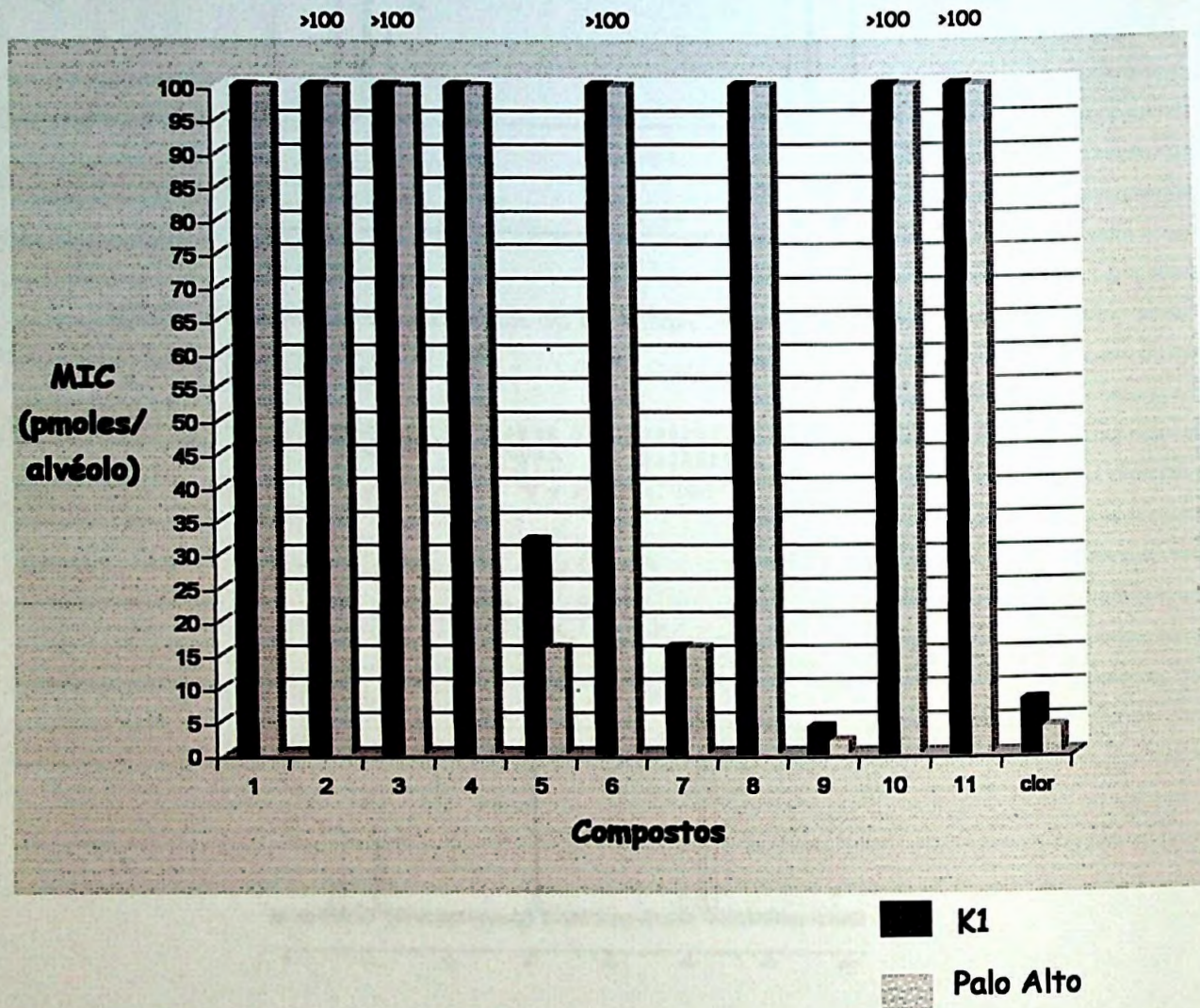
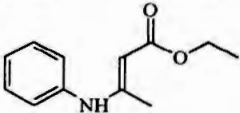
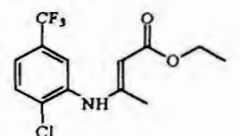
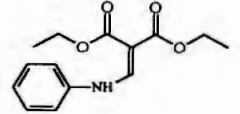
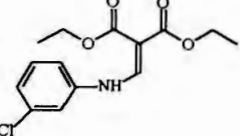
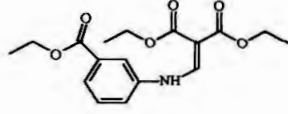
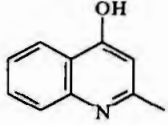
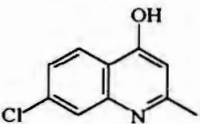
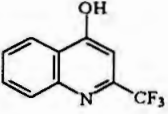
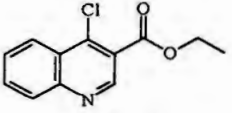
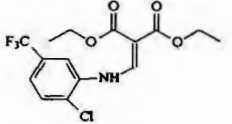
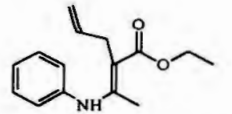
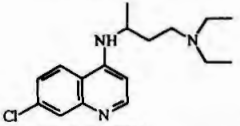


GRÁFICO 1. MIC dos compostos testados para as cepas K1 e Palo Alto. clor: cloroquina.

TABELA 3. MIC dos compostos testados para as cepas K1 e Palo Alto.

	Compostos	MIC (pmoles/alvéolo)	
		K1	Palo Alto
1		100	100
2		>100	>100
3		>100	>100
4		100	100
5		32	16
6		>100	>100
7		16	16
8		100	100
9		4	2
10		>100	>100
11		>100	>100
Cloroquina		8	4

DISCUSSÃO

VII. DISCUSSÃO

1. Discussão dos resultados do estudo químico

A modificação molecular foi utilizada como método de planejamento na preparação de novos compostos com atividade antimalárica. Nosso trabalho inicia-se com a síntese total de uma molécula estruturalmente relacionada com a mefloquina, visando um processo sintético mais barato.

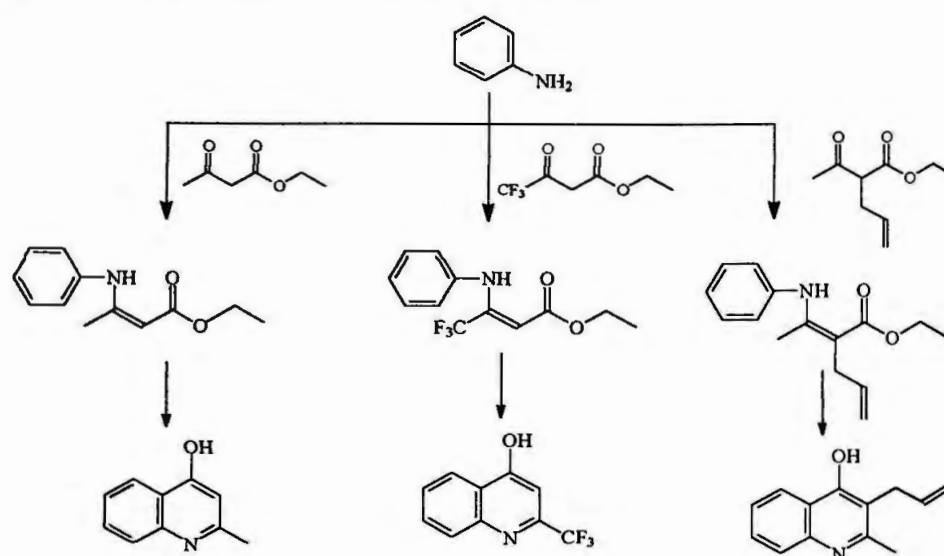
Devido à procura de novos compostos úteis no tratamento da malária tem sido amplamente reconhecido o valor dos derivados quinolínicos. A maioria destes compostos é preparada por meio das 4-hidroxiquinolinas (Price *et al.*, 1946; Hauser e Reynolds, 1948; Reynolds e Hauser, 1955b; March, 1992; Joule *et al.*, 1995; Smith, 1999). Destarte, o planejamento sintético iniciou-se com a síntese destes derivados.

1.1 Preparação das 4-hidroxiquinolinas

A preparação das 4-hidroxiquinolinas está descrita na literatura. Foi utilizado o método de Conrad-Limpach, onde a enamina é preparada previamente por reação de adição nucleofílica do grupo amino de uma amina aromática ao carbono da cetona do β -cetoéster. Ciclização de Friedel-Crafts da enamina dá origem à 4-hidroxiquinolina derivada (Gould, e Jacobs, 1939; Price *et al.*, 1946; Price e Roberts, 1946; Hauser e Reynolds, 1948; Reynolds e Hauser, 1955a; Reynolds e Hauser, 1955b; March, 1992; Joule *et al.*, 1995; Smith, 1999).

A anilina foi a mais simples das aminas aromáticas empregadas. A partir deste composto foram sintetizadas as 2-metil-4-hidroxiquinolina, 2-

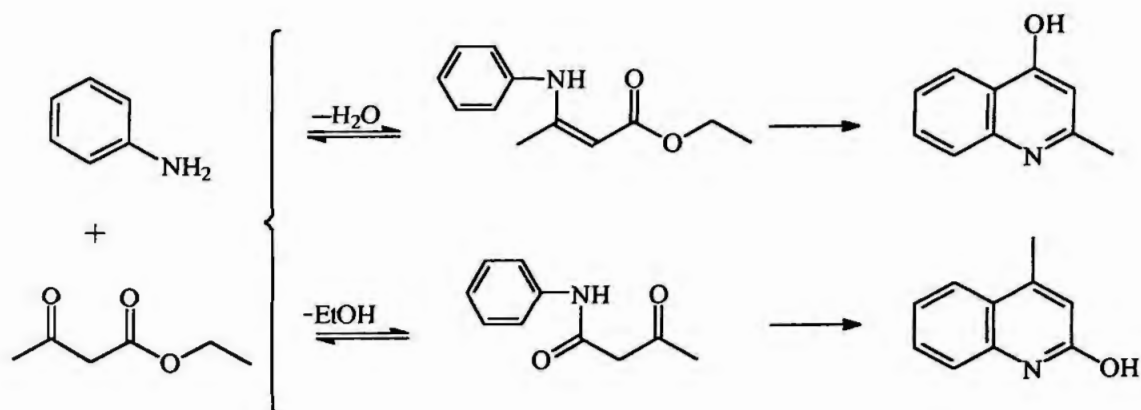
trifluor-4-hidroxiquinolina e 2-álil-4-hidroxiquinolina utilizando os β -enamino ésteres correspondentes (ESQUEMA 4).



ESQUEMA 4

Na preparação da 2-metil-4-hidroxiquinolina, a primeira dificuldade foi a síntese da enamina. As primeiras condições utilizadas consistiram na reação via Deam-Stark, porém os resultados obtidos nos espectros levaram à conclusão que existia mistura de dois compostos.

Relata-se na literatura que mudanças na temperatura podem influenciar de maneira tal que, ao invés de acontecer uma adição nucleofílica ao carbono da cetona do β -cetoéster com eliminação de água para render a enamina, a reação acontece via adição nucleofílica ao carbono de éster com eliminação de etanol, dando origem desta maneira à amida (ESQUEMA 5) (Hauser e Reynolds, 1948). A ciclização posterior da enamina levaria à 4-hidroxiquinolina desejada. Entretanto, a ciclização da amida levou à formação da 2-hidroxi-4-metilquinolina.



ESQUEMA 5

Este resultado nos motivou a fazer modificações no processo sintético, procurando novas alternativas que levassem exclusivamente à preparação da enamina.

Primeira tentativa foi a preparação da enamina a partir do acetoacetato de etila, anilina e sulfato de cálcio como agente desidratante, utilizando ácido acético como catalisador e etanol anidro como solvente. O rendimento do produto desejado foi de 54,8%, resultado comparável com aquele obtido por Hauser e Reynolds em 1948 (57%).

Por outro lado, já em 1991, Brandt e colaboradores, prepararam várias enaminas utilizando alumina neutra como agente desidratante, obtendo resultados muito promissores por meio de condições simples e de fácil manuseio. Aplicando esta metodologia ao nosso caso, foi feita a reação do acetoacetato de etila, anilina e alumina neutra. Isto levou à formação da enamina com excelente rendimento (77,9%).

A formação do 3-(*N*-fenilamino)-butenoato de etila pode ser corroborada pelo espectro de RMN ¹H (ESPECTRO 1). O próton olefínico do carbono 3 absorve na forma de singlete com deslocamento químico de 4,69 ppm. A ausência deste sinal indica a formação da amida. O valor do

ponto de ebulição corresponde ao valor relatado na literatura. (Hauser e Reynolds, 1948).

Uma vez sintetizada a enamina, a segunda dificuldade no processo sintético esteve relacionada com o rendimento na ciclização. O fechamento do anel foi realizado sob temperaturas entre 220-250 °C, em solvente de elevado ponto de ebulição. Foram testados parafina e difeniléter, obtendo-se os melhores resultados com este último.

O volume de solvente utilizado na ciclização pode variar consideravelmente na dependência da solubilidade da enamina. A pureza do produto ciclizado é, na maior parte dos casos, maior quando a ciclização é realizada em temperaturas altas, durante curto período de tempo do que quando é feita a temperaturas mais baixas durante longo período de tempo (Smith, 1994). O produto ciclizado precipita a partir da mistura da reação à temperatura ambiente na forma cristalina. A precipitação é completada pela adição de hexano. O produto foi obtido em rendimento de 43,58% e com ponto de fusão de 240-243 °C. Comparando com os dados da literatura, o rendimento obtido foi menor (50%) e o valor do ponto de fusão maior (229-230 °C) (Hauser e Reynolds, 1948).

A formação da 2-metil-4-hidroxiquinolina pode ser corroborada pela análise do espectro de RMN ¹H (ESPECTRO 3). Devido à influência do grupo hidroxila, o hidrogênio do carbono 3 está protegido e, portanto, absorve em campo mais alto ($\delta = 5,92$ ppm), quando se compara com a quinolina não-substituída. Devido à perda de etanol, os sinais de quarteto e tripleto dos carbonos 5 e 6 da enamina não aparecem no espectro da 4-hidroxiquinolina.

Para atribuir os sinais dos prótons dos carbonos 6 e 7, que absorvem na forma de tripleto, foi feita dupla irradiação do próton do carbono 5, que, devido à influência do grupo hidroxila, é o próton aromático observado na forma de dubleto em campo mais baixo (8,05 ppm). Logo após a dupla

irradiação, o sinal que absorve na forma de tripleto em 7,26 ppm transformou-se em dubleto. Desta maneira, este sinal foi atribuído para o próton do carbono 6 e o sinal na forma de tripleto em 7,59 ppm para o próton do carbono 7. Finalmente, depois de localizar todos os prótons, as atribuições dos átomos de carbono foram feitas com ajuda do espectro de HMQC, confirmando, deste forma a estrutura (ESPECTRO 5).

Os dados no infravermelho mostraram as bandas de absorção na região de 3324 cm^{-1} e 1373 cm^{-1} atribuídas ao grupamento hidroxila. A primeira delas atribui-se às vibrações de estiramento O-H (banda larga) e a segunda, a vibrações de deformação no plano do O-H. A banda de absorção de estiramento à frequência menor (normalmente para fenóis $\nu\text{ O-H} = 3610\text{ cm}^{-1}$) se justifica pelo enfraquecimento da ligação devido à formação de ligação de hidrogênio intermolecular (ESPECTRO 6).

Foi atribuída a banda 1246 cm^{-1} ao estiramento C-O e as bandas entre 700 e 900 cm^{-1} se atribuem às vibrações de deformação $\delta =\text{C-H}$ fora do plano. A banda de absorção em 760 cm^{-1} se atribui aos 4 hidrogênios adjacentes ao sistema aromático (hidrogênios dos carbonos 5, 6, 7 e 8) e a banda em 846 cm^{-1} ao hidrogênio isolado no sistema aromático (hidrogênio do carbono 3). A banda de absorção em 1373 cm^{-1} se atribui à deformação simétrica da metila. As bandas 1606 cm^{-1} e 1469 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de estiramento do anel aromático C=C e a banda a 3060 cm^{-1} , às vibrações de estiramento de carbonos insaturados sp^2 .

A importância biológica do grupo trifluorometila no anel quinolínico da mefloquina (o fármaco protótipo em estudo) é conhecida. Este grupo eletroceptor evita o metabolismo rápido da molécula da mefloquina nas posições 2 e 8 do anel quinolínico (Casteel, 1996). Por esta razão, achou-se interessante usar também como β cetoéster o trifluoroacetato de etila

obtendo-se, neste caso, uma 4-hidroxiquinolina com um grupo CF_3 na posição 2 do anel quinolínico.

Antes da preparação da 2-trifluormetil-4-hidroxiquinolina foi necessária a esterificação do ácido trifluoroacético para posterior preparação do β -cetoéster.

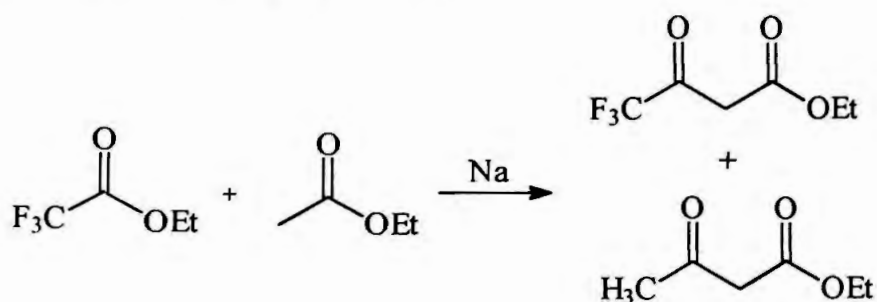
A esterificação do ácido trifluoroacético ocorre via formação do cloreto de ácido (Vogel, 1948). O intermediário formado é o cloreto de trifluoroacetila, suficientemente reativo para formar o éster através de reação de substituição nucleofílica. Algumas precauções foram consideradas na preparação do acetato. Devido ao fato de o cloreto intermediário ter um ponto de ebulição de $-27\text{ }^\circ\text{C}$, foi necessário utilizar um condensador de refluxo refrigerado com gelo seco (dedo frio) visando melhores rendimentos do produto.

O trifluoroacetoacetato de etila foi preparado por condensação de Claisen, a partir do acetato de etila e trifluoroacetato de etila, promovida pelo sódio metálico, segundo a metodologia descrita por Burdon e Mcloughlin, em 1964.

Apesar de se relatar a maior eficiência no uso de sódio como promotor da condensação em comparação com etóxido de sódio, os rendimentos obtidos foram muito baixos (20%), quando comparados com os rendimentos obtidos por Burdon e Mcloughlin em 1964 (61%). A causa principal deste baixo rendimento pode ser a ocorrência de produtos de autocondensação (além da formação do trifluoroacetoacetato de etila, formação do acetoacetato de etila) (ESQUEMA 6).

A análise do espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 15) demonstra a formação do trifluoroacetoacetato de etila e a existência deste composto na sua forma enólica (sinal na forma de singleto do próton do carbono 3 que

absorve em 5,63 ppm), assim como o próton do grupo hidroxila, que absorve na forma de singleto largo em 11,87 ppm.



ESQUEMA 6

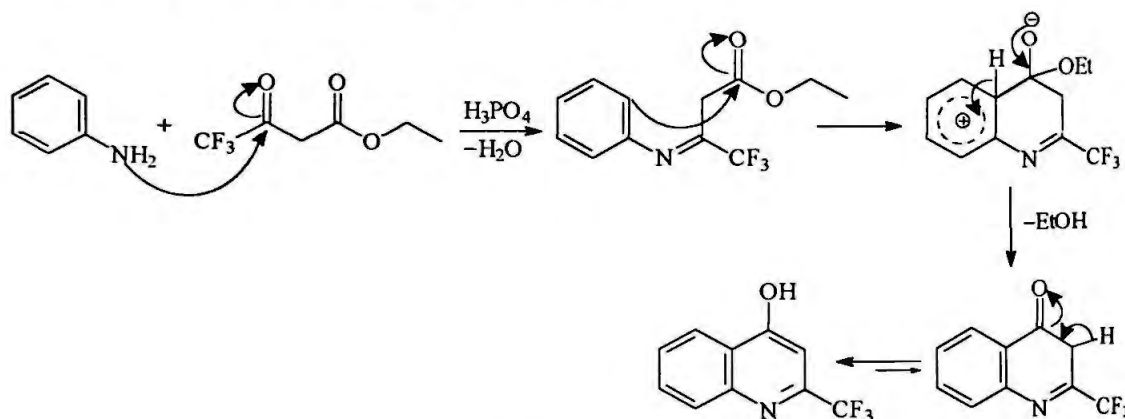
O espectro de carbono 13 confirma a formação do β -cetoéster e da forma enólica. O carbono 3 olefínico absorve em 92,74 ppm. Em 122,27 ppm e 159,6 ppm absorvem os carbonos 1 e 2, respectivamente, na forma de quarteto devido ao acoplamento com o átomo de flúor. No carbono 1, a constante de acoplamento é de 278,5 Hz e no carbono 2 a constante de acoplamento é menor (37 Hz) (ESPECTRO 16).

No espectro no infravermelho podem ser atribuídas as seguintes bandas de absorção: 1023 cm^{-1} e 1179 cm^{-1} , relacionadas com vibrações de estiramento C-O acopladas com C-C e em 1344 cm^{-1} atribuída às vibrações de estiramento de C-O de grupamento éster (ESPECTRO 17).

É observada uma banda de carbonila de cetona em 1717 cm^{-1} . Esta banda característica de compostos carbonílicos é larga, o que pode ser indício da presença de mais uma banda carbonílica, neste caso de éster. A banda em 1379 cm^{-1} foi atribuída a deformação fora do plano do grupo hidroxila e em 3431 cm^{-1} à vibração de estiramento de O-H (banda larga). Normalmente para enóis, esta banda ficaria na faixa de 3650-3600 cm^{-1} . Isto pode ser justificado pela formação de ligação de hidrogênio intermolecular ou pela conjugação que permite ligações com características

de dupla ligação. Isto leva a uma ligação mais fraca e, portanto, frequência menor.

A 2-trifluormetil-4-hidroxiquinolina foi preparada por condensação direta do trifluoroacetato de etila com anilina na presença de ácido polifosfórico à temperatura de 100 °C, segundo a metodologia descrita por Steinacker e Joullié, em 1965 (ESQUEMA 7).



ESQUEMA 7

Esta 4-hidroxiquinolina foi obtida com rendimentos superiores (98%) aos relatados por Steinacker e Joullié, em 1965 (58%). O ponto de fusão do composto obtido (208-209 °C) é comparável com o relatado na literatura (210-211 °C).

O ácido polifosfórico é reconhecido como um reagente excepcional de ciclização. Embora sejam apontadas na literatura algumas dificuldades experimentais relacionadas à necessidade de hidrolisar o excesso de reagente com água na hora da purificação (Uhlig e Snyder, 1960), no nosso caso a maior dificuldade esteve na retirada do solvente de ciclização empregado (ácido acético glacial).

Devido a sua grande viscosidade, o ácido polifosfórico constitui um meio pouco eficiente para cristalizar o produto, assim como impossibilita o isolamento dos produtos intermediários (neste caso o β -enaminocetoéster não pôde ser isolado). O ácido polifosfórico protona o oxigênio carbonílico

do grupo éster. Isto aumenta a deficiência eletrônica do carbono carbonílico que, posteriormente, sofre ataque nucleofílico do anel aromático, levando à formação do anel quinolínico.

A reação de condensação com trifluoroacetoacetato de etila é muito mais vantajosa em relação à condensação com acetoacetato de etila. Como foi mostrado no ESQUEMA 5, o acetoacetato de etila pode reagir com a amina aromática através de duas vias dando mistura de produtos.

No trifluoroacetoacetato de etila, o efeito fortemente eletroceptor do grupo trifluorometila faz com que o ataque nucleofílico aconteça seletivamente no grupo cetônico e, portanto, após ciclização à formação da 4-hidroxiquinolina correspondente, sem formação de produtos colaterais.

A análise do espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 18) corrobora a formação da 2-trifluorometil-4-hidroxiquinolina. Devido à influência dos grupos hidroxila e trifluorometila (ambos eletroceptores), o próton do átomo de carbono 3 absorve em campo mais baixo (6,68 ppm) em relação ao mesmo próton na molécula da 2-metil-4-hidroxiquinolina (5,92 ppm). No espectro de carbono 13 (ESPECTRO 19) também é confirmada a estrutura. Os átomos de carbono 2 e 11 absorvem na forma de quartetos devido ao acoplamento com os átomos de flúor, com constantes de acoplamento de 31,26 Hz e 275,73 Hz respectivamente.

No espectro no infravermelho (ESPECTRO 20) da 2-trifluor-4-hidroxiquinolina podem ser atribuídas várias bandas de absorção características desta estrutura: 3300 cm^{-1} e 1354 cm^{-1} , relacionadas com o grupamento hidroxila. A primeira devido às vibrações de estiramento O-H (banda larga) e a segunda às vibrações de deformação no plano de O-H. A frequência menor da banda de estiramento de hidroxila pode ser justificada pela formação de ligação de hidrogênio intermolecular.

A banda 1235 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-O acoplado com C-C. As bandas de absorção entre 700 cm^{-1} e 900 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de deformação $\delta =\text{C-H}$ fora do plano. Importante especificar, neste caso, que as bandas em 721 e 756 cm^{-1} podem ser atribuídas aos quatro prótons adjacentes ao sistema aromático e a banda em 850 cm^{-1} , a existência de um próton isolado. Duas bandas intensas estão relacionadas com o grupo trifluormetila: 1141 cm^{-1} , vibração assimétrica e 1319 cm^{-1} vibração simétrica. As bandas em 1628 cm^{-1} e 1477 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de estiramento do anel aromático C=C. A banda a 3091 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações de estiramento de carbonos insaturados sp².

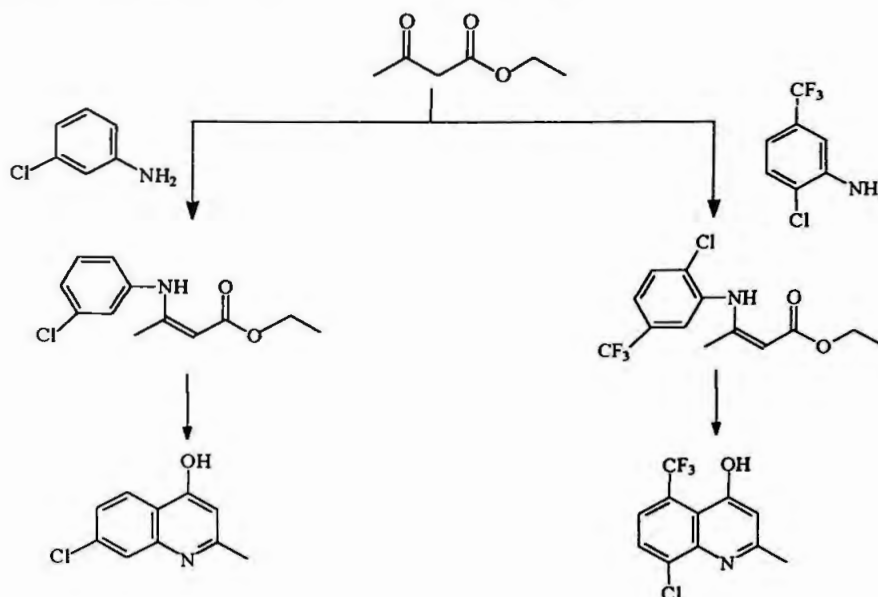
A 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina foi preparada visando utilizar a função olefínica presente na estrutura para futuras reações de formação de um trioxano com oxigênio singleto ou ozônio. O β -cetoéster empregado na preparação da enamina o 2-acetil-4-pentenoato de etila foi preparado utilizando a metodologia descrita por Antoniolleti e colaboradores, em 1992.

Este composto, utilizado como matéria-prima na síntese de outros produtos, tem sido preparado por outros autores via etóxido de sódio (Brandt *et al.*, 1991; Ferraz *et al.*, 1995). A metodologia empregada, utilizando LiOH.H₂O como promotor da alquilação, oferece bons rendimentos assim como condições de reação mais suaves e de menor custo. Entretanto, a proporção na obtenção do derivado dialquilado e α -monoalquilado- β -cetoéster com relação à metodologia com etóxido de sódio foi mantida.

A estrutura da 2-metil-3-alil-4-hidroxiquinolina pode ser confirmada através do espectro de RMN¹H (ESPECTRO 23). Podem ser atribuídos sinais de grupo alila, os prótons do carbono 12 absorvem na forma de dubleto a 3,29 ppm na região da água do dimetilsulfóxido. Os prótons do carbono 13

absorvem na forma de multipletos e os prótons do carbono 14 mostram sinal na forma de dois dubletos, próton *cis* em 4,92 ppm (9,7 Hz) e o próton *trans* em 4,96 ppm (18 Hz).

Outras aminas aromáticas (*m*-cloroanilina, e 2-cloro-5-trifluorometilanilina) foram utilizadas na síntese dos enaminoésteres a partir de acetoacetato de etila (ESQUEMA 8).



ESQUEMA 8

A formação da 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina é facilmente confirmada pelo espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 8). O próton do carbono 3 absorve em 5,93 ppm, na forma de singlete. Interessante assinalar o desdobramento do sinal dos prótons do carbono 6, que na realidade têm uma multiplicidade de duplo-dublete, mostrando um acoplamento maior entre os prótons do carbono 5 e o carbono 6 ($J=8,6$ Hz) e uma constante de acoplamento menor de 1,9 Hz entre o próton do carbono 6 e 8. Isto permite confirmar que o sinal em 7,29 ppm é realmente do próton do carbono 6. Por outro lado, devido ao efeito da hidroxila, os prótons do carbono 5 encontram-se menos protegidos em relação aos outros prótons aromáticos absorvendo a campo mais baixo (8,02 ppm).

No espectro infravermelho (ESPECTRO 10) da 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina podem ser atribuídas várias bandas características desta estrutura. As bandas de absorção na região de 3432 cm^{-1} e 1353 cm^{-1} estão relacionadas com o grupamento hidroxila. A primeira, relacionada com as vibrações de estiramento O-H (banda larga) e a segunda, com vibrações de deformação no plano de O-H. A banda 1245 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações de estiramento C-O. As bandas entre 700 cm^{-1} e 900 cm^{-1} , são atribuídas às vibrações de deformação $\delta =\text{C-H}$ fora do plano (banda em 846 cm^{-1} atribui-se ao hidrogênio isolado do sistema aromático). As bandas 1599 cm^{-1} e 1472 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de estiramento do anel aromático C=C e a banda em 3077 cm^{-1} a vibrações de estiramento de carbonos insaturados sp^2 .

Na síntese da 2-metil-4-hidroxi-5-trifluormetil-8-cloroquinolina não foram obtidos resultados satisfatórios. Foram utilizadas as mesmas condições de ciclização empregadas nas enaminas anteriores (difeníléter à temperatura de $250\text{ }^\circ\text{C}$) obtendo-se um sólido cor marrom, separado com hexano. Pela análise do espectro de RMN ^1H do produto bruto confirma-se a ciclização da enamina devido à presença dos prótons aromáticos do anel quinolínico. Outrossim, não foi possível a obtenção do produto quinolínico de forma pura.

Entretanto, a preparação do β -enaminoéster foi relativamente fácil. A formação do 3-(*N*-2-cloro-5-trifluormetilfenilamino)-butenoato de etila pode ser confirmada pelo espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 11). Os prótons aromáticos absorvem na forma de dubleto (próton do carbono 8) e de dois duplo dubleto em 6,90 ppm (próton do carbono 10) e 7,35 ppm (próton do carbono 11).

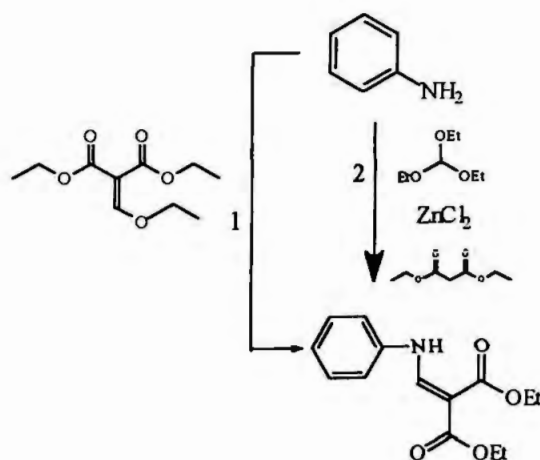
A atribuição do próton do carbono 10 foi feita em 6,90 ppm devido ao fato que o sinal é mais largo e, portanto estaria desdobrado pelo

acoplamento em *orto* com o próton do carbono 11 ($J=8,3$ Hz) e o acoplamento meta com os prótons do carbono 8. No caso do próton 11 seria acoplamento *orto* com os prótons do carbono 10 e de acoplamento para com o carbono 8 (acoplamento *orto* \rightarrow *meta* \rightarrow *para*).

No espectro no infravermelho (ESPECTRO 12), as bandas mais características desta enamina são: bandas de absorção entre 700 cm^{-1} e 900 cm^{-1} devido a vibrações de deformação $\delta =\text{C-H}$ fora do plano. As bandas 1443 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de estiramento do anel aromático $\text{C}=\text{C}$. Bandas na região de 1726 cm^{-1} relacionadas com as vibrações de estiramento $\text{C}=\text{O}$ bem características de éster. A banda a 3500 cm^{-1} relacionada com as vibrações de estiramento de N-H.

1.2 Preparação dos fenilaminometilenomalonatos

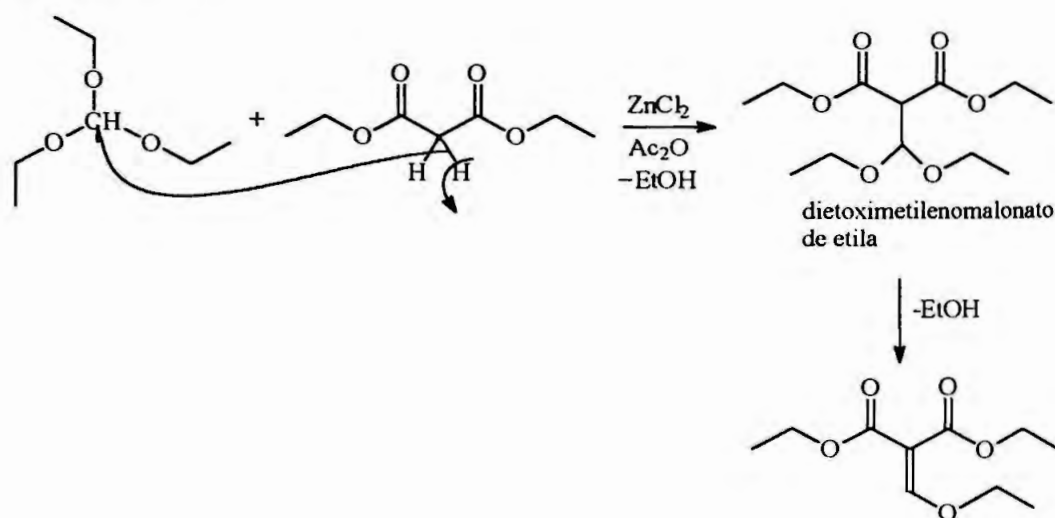
Para a síntese de quinolinas funcionalizadas na posição 3 do anel com um grupo carboxi foram preparadas previamente etoximetilenomalonato enaminas utilizando duas rotas sintéticas: 1-Reação entre uma amina aromática e etoximetilenomalonato de etila; 2-Síntese "one pot" (ESQUEMA 9).



ESQUEMA 9

Na primeira metodologia sintética foi necessária a síntese do etoximetilenomalonato. A sua preparação já foi descrita na literatura com rendimentos de 50-60% (Fuson *et al.*, 1946; Parham e Reed, 1955).

A reação consiste em uma condensação de Claisen entre o ortoformato de etila e malonato de etila na presença de $ZnCl_2$ como catalisador. A função do anidrido é remover o etanol formado. (ESQUEMA 10).



ESQUEMA 10

Dois produtos são formados: o etoximetilenomalonato de etila (119 °C) e dietiletoximetilmalonato (101 °C). Devido a terem pontos de ebulição próximos foi necessário destilar várias vezes para a obter o produto desejado puro.

A formação dos produtos foi confirmada pelos espectros de RMN 1H e Infravermelho. No espectro de RMN 1H do etoximetilenomalonato de etila (ESPECTRO 27) atribui-se o sinal em 7,60 ppm, na forma de singlete, ao próton olefínico do carbono 8. No espectro do dietoximetilmalonato de etila (ESPECTRO 29), o próton do carbono 8 absorve na forma de dublete ($J= 7,8$ Hz), pelo acoplamento com o próton do carbono 4. O próton do

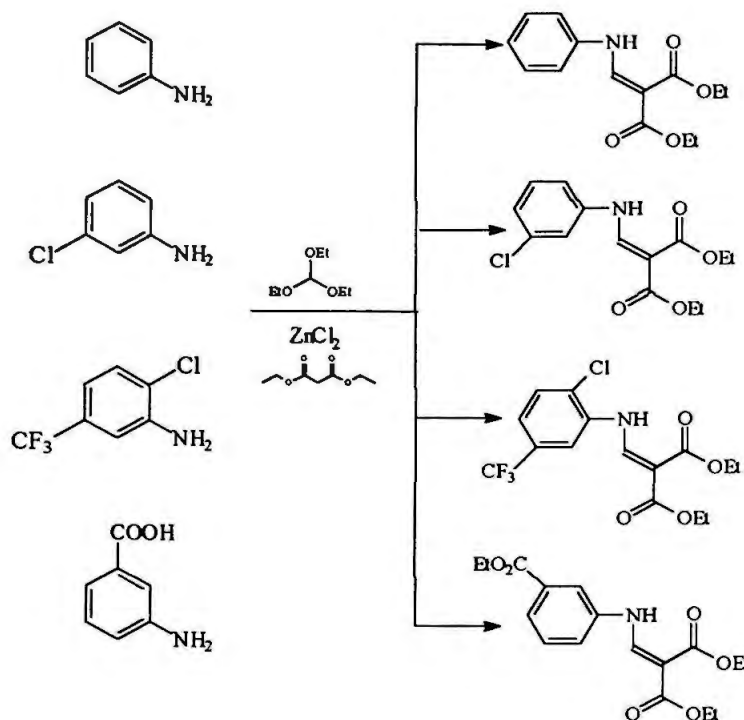
carbono 4 absorve também na forma de dubleto, estando o sinal incluído no multiplete entre 3,56 e 3,77 ppm.

No espectro no infravermelho do etoximetilenomalonato de etila (ESPECTRO 28) podem ser atribuídas bandas de absorção na região de 1016 a 1190 cm^{-1} , relacionadas com vibrações de estiramento C-O que podem ser de éster ou éter e a banda que absorve em 1728 cm^{-1} é atribuída às vibrações de estiramento de grupo carbonila de éster. A banda em 1286 cm^{-1} pode ser atribuída a banda de estiramento C-O de éter assimétrico ou éster.

No espectro infravermelho do dietoximetilmalonato uma análise similar pode ser feita (ESPECTRO 30). As bandas de absorção na região de 1070 cm^{-1} e 1307 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento C-O, que podem ser de éster ou éter e uma banda muito intensa a 1744 cm^{-1} de vibração de carbonila de éster.

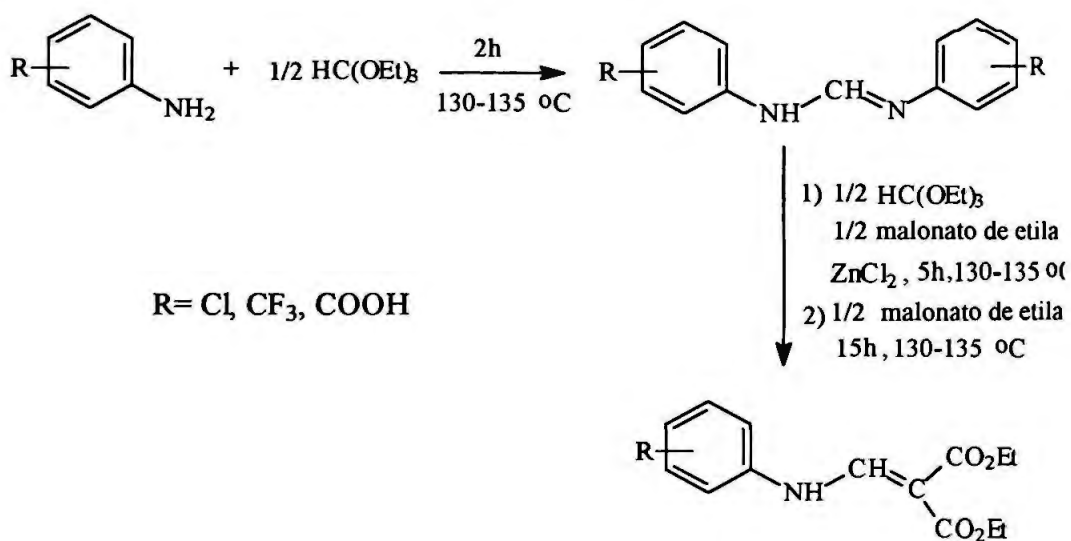
Os fenilaminometilenomalonatos podem também ser sintetizados por meio de um processo "one-pot" diretamente a partir da amina, malonato de etila e ortoformato de etila em quantidades equivalentes utilizando ZnCl_2 como catalisador (Hermezc *et al.*, 1992).

Alem da anilina, outras aminas aromáticas foram empregadas (ESQUEMA 11). A síntese do 3-(*N*-3-fenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila e do 3-(*N*-3-clorofenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila já foi relatado na literatura (Price *et al.*, 1946; Price e Roberts, 1955; Frank e Mészáros, 1977). Não foram encontrados relatos sobre a síntese do 3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila e 3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila.



ESQUEMA 11

As amins aromáticas reagem primeiramente com ortoformato de etila para dar *N,N'*-diarilformamidinas, que tratadas com ortoformato de etila e malonato na presença de $ZnCl_2$, rendem os respectivos arilfenilaminometilenomalonatos (ESQUEMA 12).



ESQUEMA 12

A constante de acoplamento $J_{\text{NH-CH}}$ é grande, em torno de 13 Hz. Isto indica a orientação *trans* do hidrogênio ligado ao nitrogênio com relação ao hidrogênio vinílico, ocorrendo em ambas configurações.

O espectro infravermelho da 3-(*N*-3-fenilamino)-2-carbetoxipropanoato de etila (ESPECTRO 33) oferece dados interessantes, que podem ser confirmados com os dados da literatura. O predomínio de uma ou outra configuração pode ser confirmado pelas frequências do grupo carbonila no espectro. Em compostos com configuração *Z,Z*, em que pode existir um forte acoplamento entre os grupos carbonila (1650 cm^{-1} e 1693 cm^{-1}) à diferença nos valores da frequência de absorção que pode ser de $50\text{-}60\text{ cm}^{-1}$. No nosso caso é de aproximadamente 50 cm^{-1} . Aquela carbonila que forma ligação de hidrogênio com o NH absorve em frequência menor e a outra carbonila em maior.

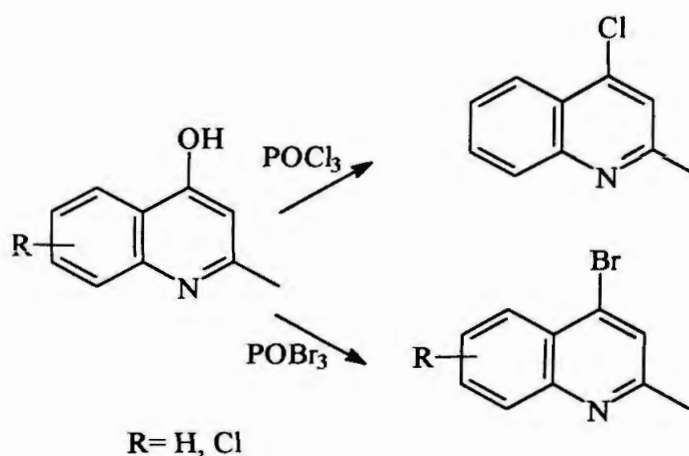
Outras bandas de absorção podem ser atribuídas: na região entre 690 cm^{-1} e 900 cm^{-1} bandas de vibrações de deformação =C-H fora do plano, banda em 3054 cm^{-1} vibrações de estiramento =C-H aromático e banda a 3548 cm^{-1} que podem ser vibrações de estiramento de grupo NH.

1.3 Preparação das 4-haloquinolinas

As haloquinolinas assim como as 4-hidroxiquinolinas constituem intermediários sintéticos importantes na síntese de derivados antimaláricos quinolínicos. Elas foram sintetizadas a partir da 4-hidroxiquinolina ou através de ciclização direta com POCl_3 ou POBr_3 .

As 4-hidroxiquinolinas utilizadas foram: a 2-metil-4-hidroxiquinolina e a 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina. No primeiro caso foi empregado POCl_3 para preparar a 4-cloro-2-metilquinolina e POBr_3 para preparar a 4-

bromo-2-metilquinolina. No segundo caso foi usado somente o POBr_3 (ESQUEMA 14).



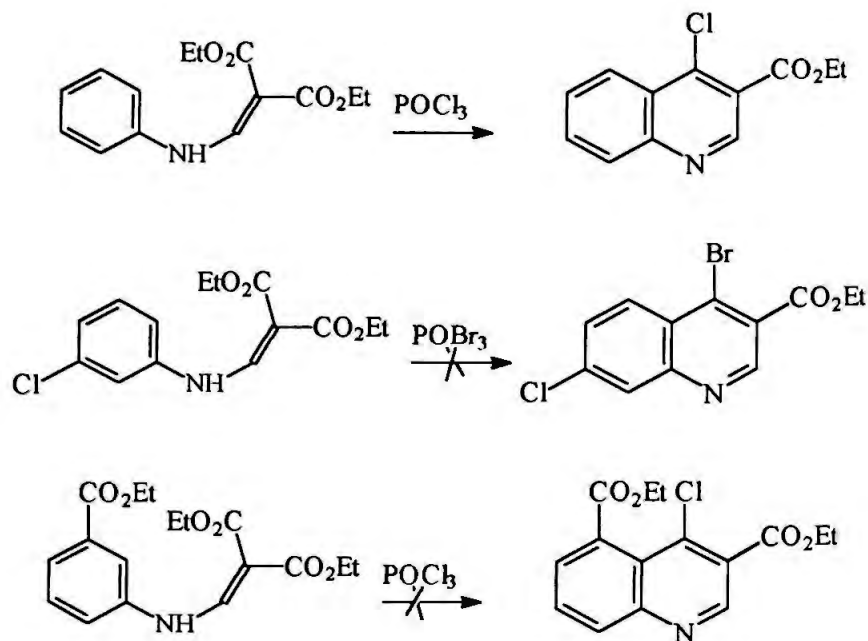
ESQUEMA 14

O mecanismo destas reações é substituição nucleofílica interna da hidroxila pelo cloro ou bromo.

A análise dos espectros de RMN ^1H (ESPECTRO 39 e ESPECTRO 41) confirma a formação destes compostos. Os prótons do carbono 3 das 4-haloquinolinas, 2-metil-4-cloroquinolina e 2-metil-4-bromoquinolina absorvem respectivamente em campos mais baixos (7,70 ppm e 7,98 ppm), se comparados com o mesmo próton na 2-metil-4-hidroxiquinolinas (5,92 ppm). O sinal da hidroxila desaparece.

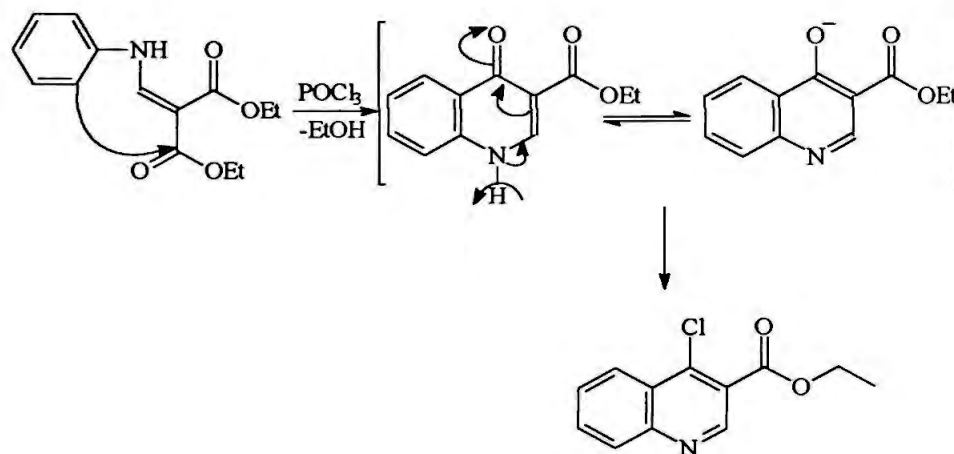
No espectro de carbono 13 o carbono 4 absorve em campo mais alto (139,20 ppm na 2-metil-4-cloro quinolina e 138,1 ppm na 2-metil-4-bromo quinolina), quando comparado com a 2-metil-4-hidroxiquinolina (177,69 ppm) (ESPECTRO 40).

As 3-carbetoxi-4-haloquinolinas foram sintetizadas a partir da ciclização direta dos fenilaminometilenomalonatos com oxiclreto de fósforo ou de bromo (ESQUEMA 15).



ESQUEMA 15

Este tipo de reação consiste em substituição nucleofílica do anel aromático com perda de etanol e posterior substituição da hidroxila por cloro. O mecanismo proposto desta reação é mostrado no ESQUEMA 16.



ESQUEMA 16

Estas quinolinas têm a presença de um grupo carbetoxi na posição 3 do anel quinolínico, importante para funcionalizações posteriores da molécula.

A ciclização direta com POCl_3 evitaria a síntese das 4-hidroxiquinolinas. Os melhores resultados obtidos foram da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina. A purificação do produto bruto foi feita por filtração utilizando coluna com sílica-gel. A preparação deste composto encontra-se relatado na literatura por vários autores (Markees, 1966; Agui *et al.*, 1971; Frank e Mészáros, 1977).

A estrutura da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina pode ser confirmada pelos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e HMQC (ESPECTRO 44, 45, 46). No espectro de RMN ^1H , o próton do carbono 2 absorve na forma de singlete em 9,21 ppm.

Para atribuir os sinais dos prótons dos carbonos 6 e 7, que absorvem na forma de tripleto, foi feita uma dupla irradiação no próton 5, que absorve na forma de dubleto, em campo mais baixo (8,42 ppm). O sinal que absorve na forma de tripleto em 7,72 ppm transformou-se em dubleto, atribuindo-se então este sinal para o próton do carbono 6 e a outro sinal na forma de tripleto para o próton do carbono 7.

No espectro no infravermelho (ESPECTRO 47) são atribuídas as bandas de absorção entre 700 cm^{-1} e 900 cm^{-1} às vibrações de deformação $\delta =\text{C-H}$ fora do plano. A banda em 763 cm^{-1} atribuída à presença de 4 prótons adjacentes no anel e em 862 cm^{-1} à presença de um próton isolado. A banda que absorve em 1720 cm^{-1} é característica de vibrações de estiramento C=O de éster e a banda em 1231 cm^{-1} está relacionada com estiramento C-O . Bandas a 1482 cm^{-1} e 1612 cm^{-1} representam as vibrações de estiramento do anel aromático C=C . A banda acima de 3000 cm^{-1} é atribuída às vibrações de estiramento de carbonos insaturados sp^2 .

Na síntese das 3-carbetoxi-4-bromoquinolina e 3-carbetoxi-4 cloro-5-carbetoxiquinolinas não se obtiveram os resultados esperados. A análise de ressonância dos produtos brutos demonstrou a ocorrência da ciclização

da enamina. Por ocasião da purificação dos compostos por cromatografia em coluna, os resultados não foram satisfatórios.

Utilizando a 2-metil-4-bromoquinolina como material de partida foi sintetizada a 2-metil-4-aminoquinolina, com o intuito de formar posteriormente uma enamina. A síntese deste composto já foi relatada na literatura empregando uma metodologia diferente à nossa (4-amino-2-methyl-chinolin..., 1935)

A análise do espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 24) confirma-se a formação deste composto. O próton do carbono 3 absorve em campo mais alto (7,40 ppm) em relação ao mesmo próton na 3-metil-4-bromoquinolina (7,98 ppm) utilizada como material de partida. O sinal do NH em 1,67 pm desaparece quando são adicionadas algumas gotas de água deuterada.

No espectro de RMN ^{13}C da 2-metil-4-aminoquinolina, o carbono 4 absorve em campo mais baixo (142,52 ppm) em relação à 2-metil-4-bromoquinolina (138,1 ppm) (ESPECTRO 25).

As tentativas de síntese do 3-(*N*-2-metilquinolino)-butenoato de etila não foram satisfatórias. Além do método tradicional, utilizando a alumina neutra, foi realizada tentativa empregando irradiação de microondas. Em todos os casos o material de partida permaneceu inalterado, evidenciando baixa reatividade da amina quinolínica.

Tentativas posteriores para preparar fenilaminometilenomalonatos quinolínicos poderão ser feitas a partir da aminoquinolina, malonato de etila e ortoformato de etila por meio de uma reação "one pot".

1.4 Síntese da cetona

O objetivo de sintetizar uma cetona como intermediário sintético é a preparação posterior de um alceno. O uso da reação de Grignard na

preparação de cetonas é limitado devido à tendência da cetona sofrer adição do reagente de Grignard e formar álcoois terciários.

Outrossim, o reagente de Grignard tem sido utilizado, com certo sucesso, na preparação de cetonas aromáticas, alicíclicas e cetonas alifáticas estericamente impedidas, com rendimentos entre 30% e 70% a partir de cloreto de ácido (Cason e Krais, 1961). Para garantir melhores rendimentos na obtenção da cetona é necessário utilizar excesso do cloreto de ácido e utilizar compostos organometálicos de cobre, zinco e cádmio (Shirley, 1954).

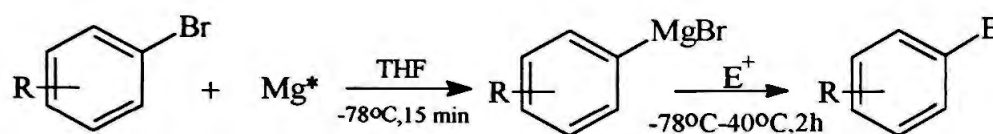
Na literatura tem sido relatada a preparação de reagentes de Grignard por reação de iodetos heteroarilicos, brometos e cloretos funcionalizados com grupos ciano e éster, com brometo de isopropilmagnésio em tetraidrofurano, na presença de $\text{CuCN} \cdot 2\text{LiCl}$ como catalisador (Abarbri, *et al.*, 2000).

Devido à presença do grupo éster na 4-cloro-3-carbetoxiquinolina, a realização de reação de Grignard a temperaturas altas não é possível. Portanto, foi aplicada a metodologia relatada por Abarbri e colaboradores, em 2000. Foi preparado previamente o reagente de Grignard com brometo de isopropila com o objetivo de favorecer a formação do Grignard quinolínico por meio de metalo-desalogenação (intercâmbio de halogênio por um metal procedente de um composto organometálico). Isto acontece a baixa temperatura ($-40\text{ }^\circ\text{C}$).

Embora tenham sido feitas as atribuições aos possíveis prótons da molécula, a análise do espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 49) da possível cetona (produto bruto) não ficou ainda muito clara. Pela análise do espectro no infravermelho (ESPECTRO 50), a molécula apresenta uma banda intensa de estiramento de carbonila em 1725 cm^{-1} . Necessita-se otimizar a

metodologia da reação e confirmar por outros métodos, como por exemplo, RMN ^{13}C a estrutura cetona.

Outros estudos têm apresentado a preparação de reagentes de Grignard por adição oxidativa direta a arilbrometos que apresentam grupos nitrila, éster ou cloreto, utilizando magnésio altamente reativo e baixas temperaturas ($-78\text{ }^\circ\text{C}$) (ESQUEMA 17) (Lee *et al.*, 2000).

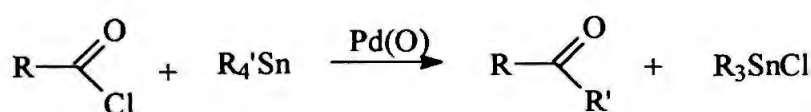


ESQUEMA 17

Aproveitando estas condições, utilizamos a 2-metil-4-bromoquinolina como substrato. Os resultados obtidos pelos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C do produto bruto não oferecem dados suficientes para afirmar que a cetona foi obtida. Um dos inconvenientes no desenvolvimento experimental pode ser o fato de não ser ter utilizado o magnésio altamente reativo (magnésio Rieke).

Considerando os resultados pouco alentadores da reação de Grignard, outras possibilidades de preparar a cetona foram procuradas.

A reação de acoplamento de cloretos de ácido com compostos organoestanho catalisados por paládio tem demonstrado muita eficiência na preparação de cetonas com grande rendimento (Kosugi *et al.*, 1977; Labadie *et al.*, 1983; Labadie e Stille, 1983) (ESQUEMA 18).

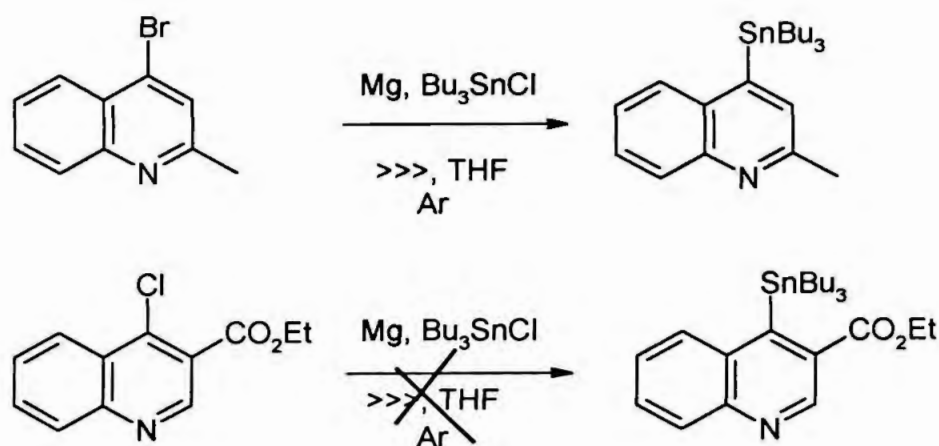


ESQUEMA 18

As condições de reação são suaves e é especialmente útil quando funções tais como éster, nitrila, nitro, halogênio ou aldeído estão presentes, já que não são afetados e não precisariam, portanto, de proteção prévia (Stille, 1985; Labadie *et al.*, 1983).

Em primeiro lugar, foi necessária a síntese da estanana. Para isto, empregou-se a metodologia descrita na preparação de alilestananas por Naruta e colaboradores, em 1986.

Duas tentativas de sínteses de estananas foram feitas: a primeira, a partir da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina e a segunda a partir da 2-metil-4-bromoquinolina (ESQUEMA 19).



ESQUEMA 19

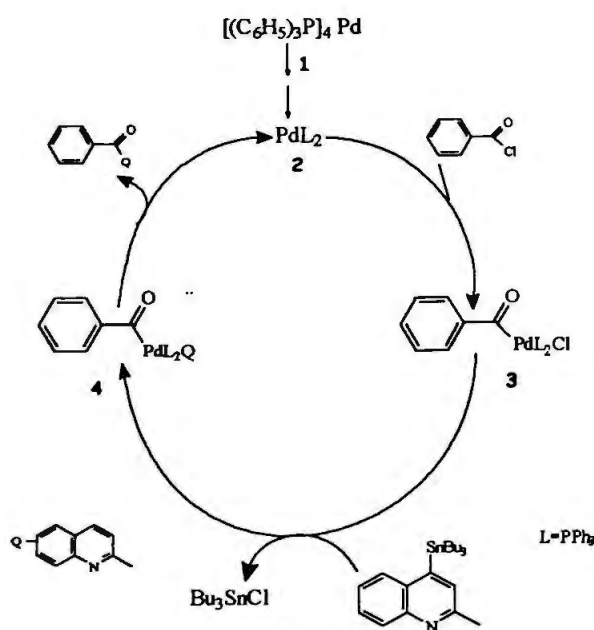
A análise de RMN ¹H e de RMN ¹³C do produto obtido a partir da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina revelou que não houve mudanças nos prótons aromáticos em relação ao material de partida. Isto indicou a baixa reatividade do cloreto. Portanto, houve, simplesmente a mistura de reagentes.

Outrossim, a preparação da 2-metil-4-tributylestanoquinolina mostrou resultados satisfatórios. Comparando o espectro deste composto (ESPECTRO 51) com o espectro de RMN ¹H da 2-metil-4-bromoquinolina

(ESPECTRO 41), mudanças foram observadas em todos os sinais dos prótons aromáticos. Os prótons da estanana absorvem em campo mais alto. No espectro de carbono 13 observou-se o efeito do estanho em cadeia alifática, o carbono na posição α 12 fica mais protegido e os carbonos na posição β e γ (carbonos 13 e 14) ficam mais desprotegidos.

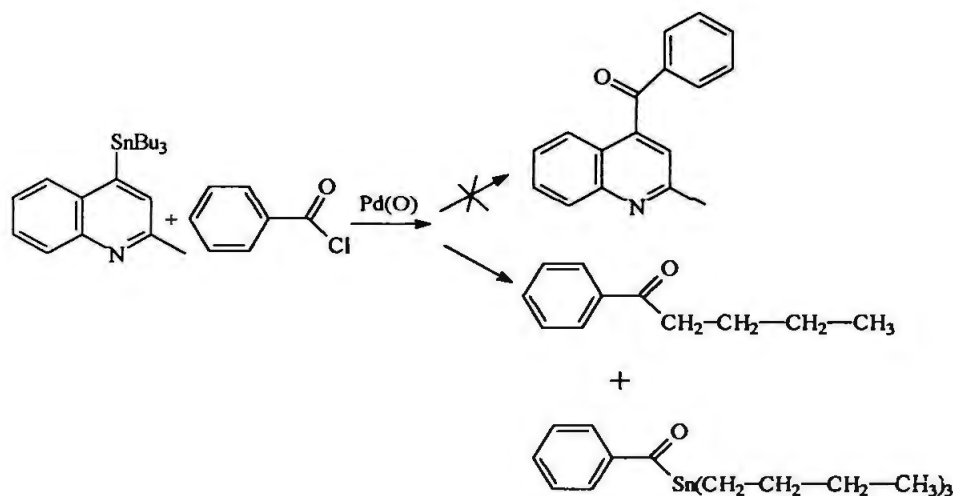
A tentativa de síntese da cetona foi realizada por aquecimento da 2-metil-4-tributilestanhoquinolina e do cloreto de benzofila na presença de paládio *tetrakis* trifenilfosfina à temperatura de 140 °C.

O mecanismo proposto para esta reação aparece representado no ESQUEMA 20. O paládio de *bis*-(trifenilfosfina) (2), gerado a partir do paládio *tetrakis*trifenilfosfina (1), sofre adição oxidativa do cloreto de ácido para render o complexo acilcloropaládio (3). A reação de transmetalacão entre este complexo e a estanana origina um composto de acilaarilpaládio (IV) (4), que por eliminação redutiva, rende a cetona e regenera 2. A reação de transmetalacão ocorre por ataque eletrofílico do complexo de acilcloropaládio (3) ao carbono ligado ao estanho (ESQUEMA 20).



ESQUEMA 20

A análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (ESPECTRO 61 e ESPECTRO 62) dos produtos obtidos revelou a obtenção de fenilbutilacetona em 73%. Estes resultados mostraram que o ataque eletrofílico do complexo de acilcloropaládio aconteceu em um dos átomos de carbono do grupo butila ligado ao átomo de estanho e não ao átomo de carbono aromático do anel quinolínico, como era esperado (ESQUEMA 21).



ESQUEMA 21

A reação foi realizada novamente mudando-se as condições experimentais. Neste caso, diminuiu-se a temperatura até $80\text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos revelaram, além da formação da benzobutanocetona, a formação do éster de estanho (ESQUEMA 21).

A estrutura foi caracterizada por RMN ^1H e RMN ^{13}C (ESPECTRO 63 e ESPECTRO 64).

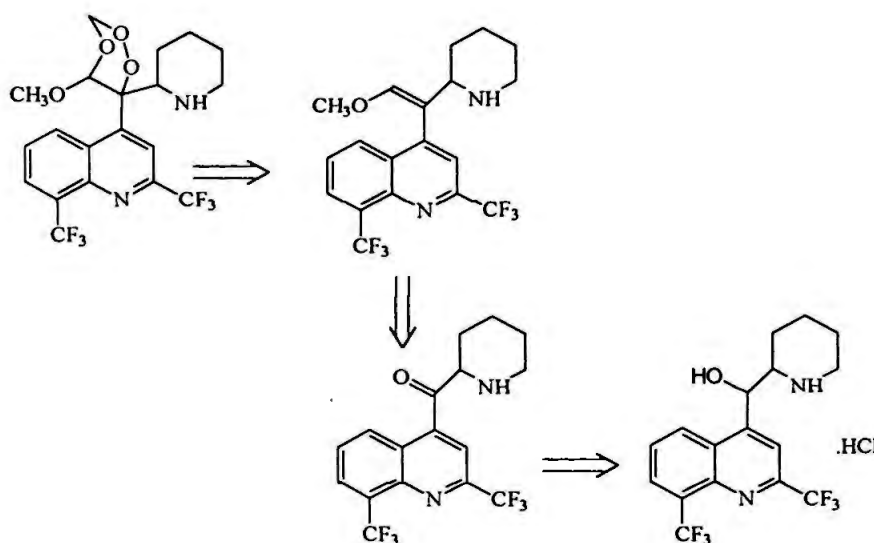
Os resultados obtidos demonstraram que além da transferência não desejada de um dos grupos butila da estanana de partida para o cloreto de benzoíla para formar a benzobutanocetona, a ligação quinolina-estanho quebra. Outrossim, não ocorre a transferência do grupo quinolínico e sim o do grupo butilestanho ao cloreto de ácido, rendendo éster de estanho.

Na reação de acoplamento, o composto organoestanho transfere rapidamente o primeiro grupo orgânico do estanho. Entretanto, a transferência do segundo grupo é 100 vezes mais lenta a partir do cloreto de alquil estanho. Na literatura se relata a ordem de transferência de diferentes grupos orgânicos a partir de estananos não-simétricas em reações de acoplamento com cloreto de ácido. Esta transferência pode acontecer seletivamente na seguinte ordem $RC\equiv C \rightarrow RCH=CH \rightarrow Ar \rightarrow RC=CH-CH_2 \sim ArCH_2 \gg \gg C_nH_{2n+1}$. A velocidade de transferência do grupo metila é menor. Desta maneira, em estananos assimétricas, como é o nosso caso, o grupo diferente ao grupo butila deve ser transferido exclusivamente. Por outro lado, esta seqüência pode ser influenciada pela natureza do solvente, a concentração dos compostos reagentes e da concentração do catalisador. (Stille, 1985, Pereyre *et al.*, 1987).

Estudos realizados sobre compostos organometálicos relataram a preparação de cetonas com rendimentos superiores a 70% a partir de estananos quinolínicos (2-trimetilestanhoquinolina e 3-trimetilestanhoquinolina) com cloreto de benzoíla utilizando benzeno como solvente (Yakamoto e Yanagi, 1982).

Infelizmente, no nosso estudo a transferência do anel quinolínico não aconteceu nas condições empregadas. Na literatura não se encontrou referência em que a partir de uma 4-tributilestanhoquinolina o anel quinolínico seja transferido seletivamente. Isto pode ser indicativo que as 4-trialquilestanho quinolinas são mais resistentes à acilação.

No ESQUEMA 22 representa-se a modificação molecular planejada para a molécula da mefloquina. A primeira etapa do planejamento consistiu em um processo de oxidação para preparar o derivado cetônico que, posteriormente, poderia ser transformado em derivado com grupo trioxano na molécula.



ESQUEMA 22

O primeiro procedimento empregado para sintetizar a cetona consistiu na reação do cloridrato de mefloquina com solução saturada de CrO_3 segundo a metodologia descrita por Chien e Cheng em 1973 na oxidação de fenantrenoamino álcoois.

A principal dificuldade desta reação, além do baixo rendimento (40%), foi o difícil tratamento da mistura reacional para eliminar o excesso de agente oxidante.

O produto obtido foi caracterizado por meio de RMN ^1H , (ESPECTRO 55), espectrometria (ESPECTRO 56) no infravermelho e ponto de fusão. No espectro de ressonância não aparecem os sinais do próton do carbono 11 e do grupo hidroxila. Outrossim, não conseguimos explicar o porquê do tipo de absorção dos prótons do anel piperidínico (com relação ao cloridrato de mefloquina) na forma de 3 multipletos na região entre 2,02 e 3,59 ppm.

O espectro no infravermelho mostrou diferenças com o material de partida, revelando como característica mais importante a banda de

absorção em 1713 cm^{-1} que representa vibração de carbonila de cetona. Por outro lado, o produto mostrou ponto de fusão na faixa de $145\text{-}148\text{ }^{\circ}\text{C}$, bem diferente ao cloridrato de mefloquina ($253\text{-}255\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Tentando melhorar as condições experimentais, outras alternativas foram realizadas utilizando o dicromato de piridínio (PDC) como agente oxidante. O PDC oxida com alta eficiência ampla variedade de álcoois a grupos carbonílicos, em solução de diclorometano, sendo assim menos drásticas as condições de reação (Corey e Schmidt, 1979; Chien *et al.*, 1980).

Já que o PDC com o cloridrato de mefloquina não ocorre da forma esperada, pensou-se na possibilidade de neutralizar previamente o sal tentando evitar a possível interferência do HCl na reação.

A neutralização foi realizada satisfatoriamente com rendimentos de 98%. A mefloquina neutralizada foi facilmente identificada pela análise dos espectros de RMN ^1H (ESPECTRO 53), Infravermelho (ESPECTRO 54) e ponto de fusão.

O espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 , quando comparado com o cloridrato de mefloquina, apresenta como diferença maior a mudança no deslocamento químico no próton do carbono 11 que absorve na forma de dubleto (FIGURA 34). Na mefloquina base, o sinal do próton do carbono 11 absorve em campo mais alto (5,37 ppm). Este mesmo próton no cloridrato de mefloquina absorve em campo mais baixo (6,83 ppm).

Por outro lado, os valores de ponto de fusão obtidos para a mefloquina base ($173\text{-}175\text{ }^{\circ}\text{C}$) são diferentes aos valores de ponto de fusão citados na literatura para a cloridrato de mefloquina ($253\text{-}255\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Lim, 1985).

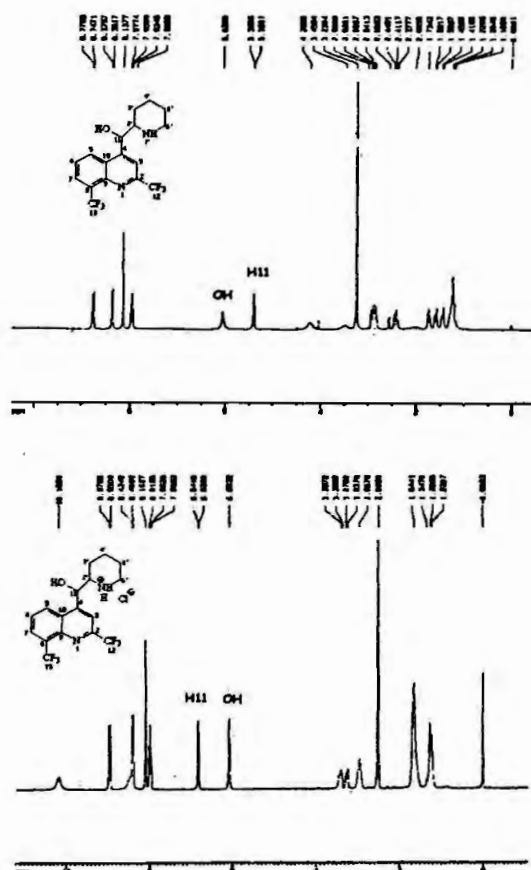


FIGURA 34. Espectros em DMSO-d₆ da mefloquina base e do cloridrato de mefloquina.

Uma vez neutralizado o cloridrato, foi feita a reação de oxidação entre a mefloquina base e a solução saturada de CrO₃. Mais uma vez, os resultados não foram alentadores, mesmo alterando-se a temperatura (35 °C). Depois da extração com éter e evaporação da fase orgânica, a solução ficou de cor esverdeada, indicando presença ainda de resíduos de cromato.

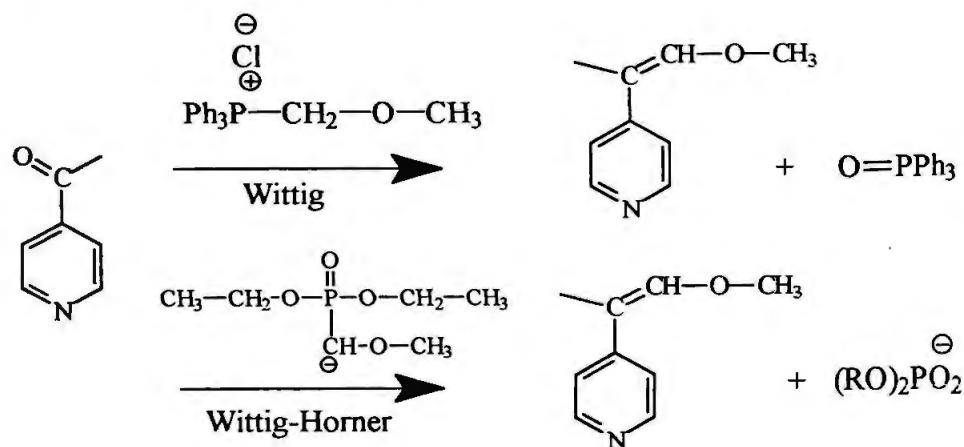
Estes resultados poderiam ser explicados pelo fato de que vários são os fatores que podem ter influenciado no desenvolvimento satisfatório da reação. Por exemplo, a natureza do agente oxidante, do solvente empregado, as concentrações dos reagentes e da temperatura da reação. Portanto,

novas tentativas poderiam ser feitas com o objetivo de aprimorar as condições experimentais e mudar alguns destes parâmetros.

1.5 Preparação do alceno

Uma vez sintetizada a cetona, o próximo passo sintético é a preparação de um alceno, que posteriormente, por meio de uma reação de ozonólise ou com oxigênio singleto permitiria a formação de um trioxano.

Considerando que na literatura são apresentadas moléculas com atividade antimalárica com núcleo piridínico como a 4-dietilamino-1'-metilbutilaminopiridina e a 4-[3'-(dietilamino)metil-4'-hidroxianilino]piridina (Hawley *et al.*, 1998) utilizou-se a acetilpiridina como cetona padrão para tentar otimizar as condições de reação para formar o alceno via reação de Wittig ou Wittig-Horner (ESQUEMA 23).



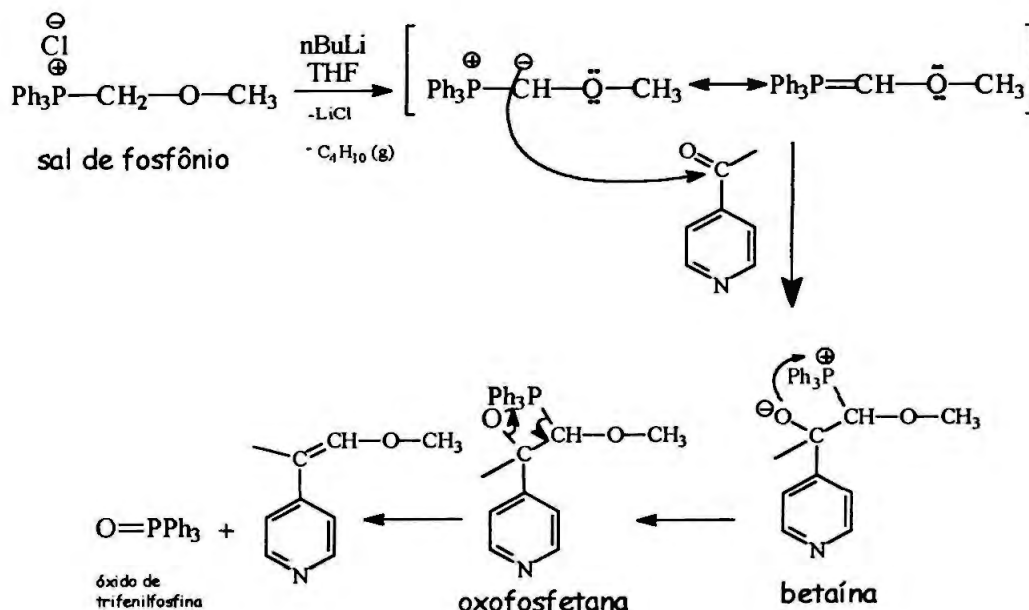
ESQUEMA 23

Segundo os dados da literatura, parece interessante o fato de o alceno final ter como substituinte um grupo metoxi. Portanto, para realizar a reação de Wittig foi necessário primeiramente sintetizar o sal de

fosfônio correspondente, neste caso o cloreto de metoximetiltrifenilfosfônio com síntese prévia do éter monoclorometílico.

Na reação de Wittig, a acetilpiridina reage com a ilida de fósforo (fosforana) resultando em olefina. A fosforana é preparada através do tratamento de um sal de fosfônio com *n*-butilítio. Por sua vez, o sal de fosfônio foi sintetizado a partir de trifenilfosfina e o éter monoclorometílico (ESQUEMA 24).

A obtenção tanto do éter quanto do sal pode ser confirmada pela análise dos espectros de RMN ^1H (ESPECTRO 57 e ESPECTRO 58 respectivamente). No cloreto de metoximetiltrifenilfosfônio o grupo trifenil desprotege os prótons dos carbonos adjacentes (próton do carbono 1) na forma de dubleto em 5,90 ppm, devido ao acoplamento geminal P-H.



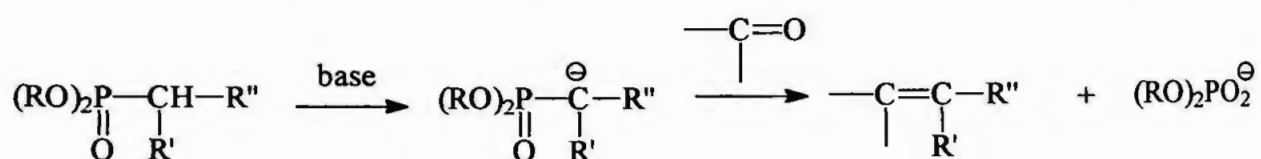
ESQUEMA 24

O mecanismo proposto sugere que a ilida age como carbânio e ataca o carbono carbonílico da cetona para formar um intermediário instável chamado betaína. A betaína é transformada em um sistema instável cíclico

de 4 membros, a chamada oxafosfetana, que espontaneamente perde óxido de trifenilfosfina e forma um alceno.

Os resultados obtidos na reação de Wittig não foram satisfatórios. A dificuldade principal esteve na separação do produto formado do óxido de trifenilfosfina insolúvel.

Devido aos resultados pouco alentadores da reação de Wittig tentou-se uma modificação desta reação, conhecida como reação de Wittig e Horner, onde a ilida é preparada a partir de fosfonatos (ESQUEMA 25).



ESQUEMA 25

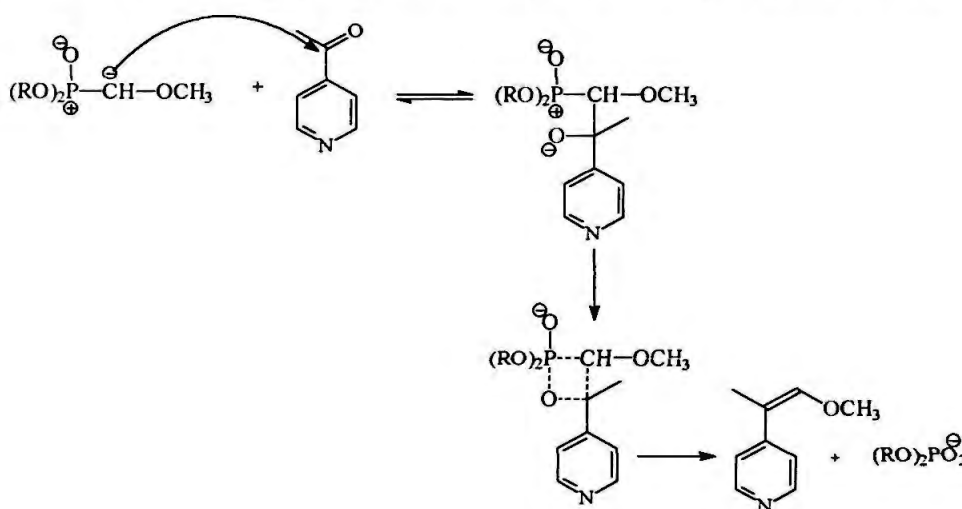
Esta reação oferece algumas vantagens em relação à reação de Wittig (Boutagy e Thomas, 1974). Em primeiro lugar, os carbânios formados a partir de fosfonatos são muito mais nucleofílicos que as ilidas preparadas a partir do sal de fosfônio, reagindo, com ampla variedade de aldeídos e cetonas. Por outro lado, o íon dialquilfosfato, formado a partir dos fosfonatos, é solúvel na água e, portanto permite fácil separação da olefina do meio reacional. Também os fosfonatos são facilmente sintetizados por meio da reação de Arbuzov (Bhattacharya e Thyagarajan, 1981).

Para realizar esta reação foi necessária a síntese prévia do trietilfosfito e logo depois do metoximetildietilfosfonato, utilizando o éter monoclorometílico.

A obtenção, tanto do trietilfosfito quanto do metoximetildietilfosfonato, pode ser facilmente confirmada pela análise dos espectros de RMN ^1H (ESPECTRO 59 E ESPECTRO 60). No espectro do

metoximetildietilfosfonato os prótons do carbono 1 adjacentes ao átomo de fósforo estão mais desprotegidos e absorvem em campo mais alto (3,74 ppm) com constante de acoplamento de 8,5 Hz.

O mecanismo é análogo ao mecanismo da reação de Wittig, e compreende duas etapas. A primeira, onde o carbânio reage com o composto carbonílico de maneira reversível para formar a betaína e a segunda onde a betaína é transformada irreversivelmente na olefina e no íon dialquilfosfato pela transferência do oxigênio ao átomo de fósforo (ESQUEMA 26).



ESQUEMA 26

Apesar das vantagens da reação de Wittig-Horner com relação à reação de Wittig, a tentativa de transformar a acetilpiridina em cetona não apresentou os resultados esperados. No espectro de ressonância de próton foram observados sinais dos compostos de partida assim como pequena formação do composto desejado.

A explicação destes resultados poderia ser atribuída à formação de um carbânio pouco estável. Relata-se na literatura que quando o fosfonato apresenta um grupo eletroatraente no átomo de carbono α ao átomo de fósforo, por exemplo, CO_2R , COR , $CONHR$, CN , SO_2R , $PO(OR)_2$ a formação do ânion pode acontecer exotermicamente à temperatura ambiente

utilizando bases tais como hidreto de sódio, sodamida e alcóxidos metálicos. Estes grupos são capazes de estabilizar o ânion por ressonância e os rendimentos na obtenção de olefinas são bons. Outrossim, nos alquilfosfonatos, aqueles onde o substituinte do átomo de carbono adjacente ao fósforo é hidrogênio, um grupo alquila ou um outro grupo que não estabilize por ressonância (como é o caso do grupo metoxila, no nosso fosfonato), formam carbânios instáveis e, portanto, a dificuldade em formar a olefina a partir de aldeídos ou cetonas será maior. Estes grupos não seriam capazes de estabilizar o carbânio por ressonância o que conduz a rendimento muito pequeno do produto desejado.

Na literatura relata-se a formação de ligação carbono-carbono utilizando uma reação de trialquilalilestananas com haletos orgânicos, em que o átomo de halogênio é substituído pelo grupo alil utilizando paládio ou 2,2'-azobis-isobutironitrila (AIBN) como catalisador (Keck e Yates, 1982).

Aproveitando estas referências bibliográficas e na tentativa de introduzir um grupo alil na posição 4 do núcleo quinolínico visando a introdução posterior de um trioxano na molécula, foi feita a reação da 2-metil-4-bromoquinolina com alilbutilestanho. Esperava-se a formação da espécie radicalar no passo de iniciação, no átomo de carbono 4 da bromoquinolina, e a posterior adição da alilestanana seguida da β cisão do radical tributilestanho.

Os produtos de partida foram usados em quantidades equivalentes, reagindo durante 7 horas à temperatura entre 50 °C e 60 °C. Segundo os resultados obtidos não houve reação. O espectro do produto bruto mostrou mistura dos materiais de partida. Devido a estes resultados tentou-se mais uma vez a reação mudando a temperatura (100 °C) e o tempo de reação (18 horas). Na análise do produto final, para nossa surpresa, ao invés de ocorrer substituição do átomo de bromo do anel pelo grupo alil, ocorreu a

substituição do estanho pelo átomo de bromo, desta forma o produto formado foi a estanana. Isto foi confirmado pela RMN ^1H (ESQUEMA 27, FIGURA 35).

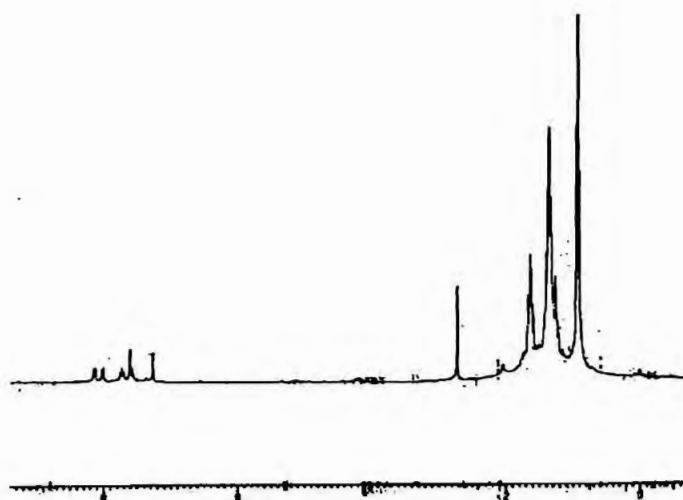
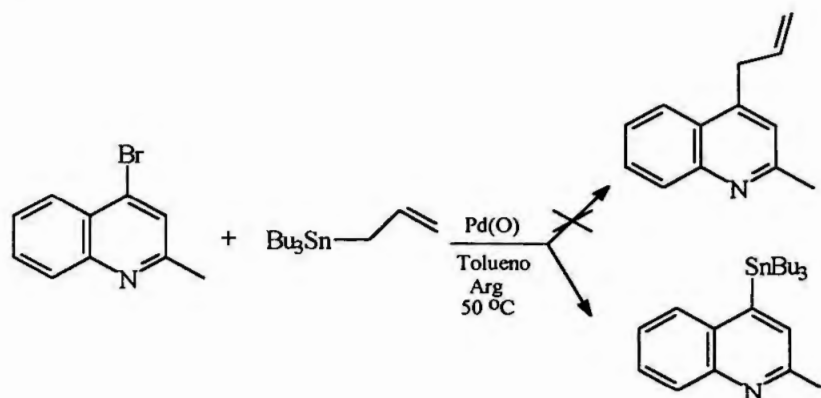


FIGURA 35. Espectro de RMN ^1H do produto obtido na reação da 2-metilbromoquinolina e aliltributilestanho.

Apesar de não serem obtidas as moléculas propostas inicialmente no planejamento, foram sintetizados satisfatoriamente intermediários sintéticos (enaminas, fenilaminometilenomalonatos, hidroxí e cloroquinolinas) que posteriormente foram ensaiados biologicamente.

2. Discussão dos resultados do estudo biológico

Os compostos escolhidos (FIGURA 34, TABELA 2) para o teste biológico foram testados em duas cepas K1 e Palo Alto. O controle de sensibilidade dos isolados foi realizado com o difosfato de cloroquina.

O valor do MIC para a cloroquina é de 5,7 pmol/alvéolo (1,6 $\mu\text{mol/L}$) (Philipps *et al.*, 1998). Portanto, cepas que têm MIC acima deste valor são resistentes e cepas que têm MIC abaixo são sensíveis à cloroquina. Em nosso estudo o valor do MIC para o isolado de K1 foi de 8 pmoles/alvéolo (3,2 $\mu\text{mol/L}$) e para o isolado de Palo Alto foi de 4 pmoles/alvéolo (0,8 $\mu\text{mol/L}$), corroborando assim a sensibilidade das cepas testadas (K1, resistente e Palo Alto, sensível à cloroquina).

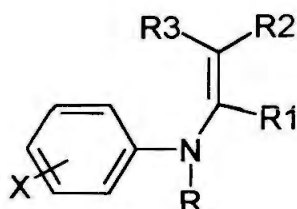
Dos compostos ensaiados os melhores resultados foram obtidos para o 3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (Composto 5); 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina (Composto 7) e 3-carbetoxi-4-cloroquinolina (Composto 9) que mostraram valores de MIC para K1 de 32, 16 e 4 pmoles respectivamente e para Palo Alto de 16, 16 e 2 pmoles respectivamente (GRÁFICO 1, TABELA 3).

Dos aminometilenomalonatos testados (Compostos 3, 4, 5, 10), o 3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila (Composto 5) mostrou os melhores resultados. Entretanto, os valores de MIC foram maiores quando comparados com o da cloroquina tanto para K1 quanto para Palo Alto. Outrossim, o Composto 4 provocou inibição total do crescimento dos parasitas na concentração de 100 pmoles, enquanto os compostos 3 e 10 não inibiram o crescimento em nenhuma das concentrações ensaiadas (MIC > 100 pmoles).

A diferença estrutural destes compostos está na substituição no anel aromático. O Composto 3 não tem substituinte, entretanto o composto 4 e

composto 5 possuem substituições na posição *meta* (-Cl e éster respectivamente). O Composto 10 possui uma substituição na posição *meta* (-CF₃) e outra na posição *orto* (-Cl). No Composto 5 o fato de ter mais um grupo éster na estrutura aumenta o número de grupos oxigenados na molécula e isto parece ser favorável à atividade antimalárica.

Um estudo foi encontrado sobre síntese de aminometilenomalonatos e sua avaliação biológica como herbicidas mostrando baixa toxicidade (FIGURA 36) (Walworth, 1976).



X= Alcoxi, alquil, halogênio, NO₂

R, R₁= H ou CH₃

R₂, R₃= CN, CO₂Et

FIGURA 36. Aminometilenomalonatos com atividade herbicida.

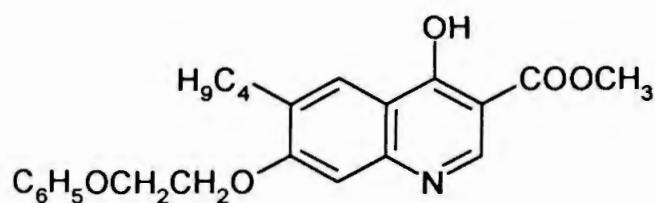
As enaminas ensaiadas (Composto 1, 2 e 11) não mostraram muita atividade para K1 e Palo Alto. O 3-(*N*-fenilamino)-butenoato de etila (Composto 1) mostrou inibição do crescimento dos parasitas na concentração de 100 pmoles. Porém, as enaminas 3-(*N*-2-cloro-5-trifluorometilfenil amino)-butenoato de etila e 3-(*N*-fenilamino)-2-metil-3-alilbutenoato de etila não mostraram atividade nas concentrações ensaiadas.

Não foram encontrados na literatura relatos sobre atividade biológica de compostos tipo enamina.

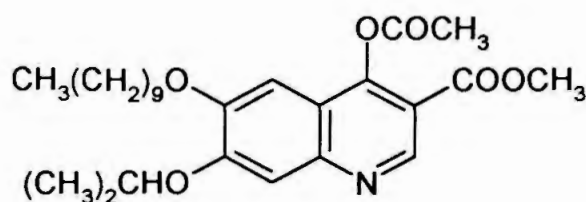
Das 4-hidroxiquinolinas testadas (Compostos 6, 7 e 8), a 2-metil-4-hidroxiquinolina não apresentou atividade frente a nenhuma das cepas ensaiadas. Porém, a 2-trifluormetil-4-hidroxiquinolina mostrou inibição do crescimento na concentração de 100 pmoles. Os melhores resultados obtidos foram para o (2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina) (Composto 7) com MIC de 16 pmoles para K1 e 16 pmoles para Palo Alto.

São muitos os relatos da literatura com relação à síntese e atividade biológica das 4-hidroxiquinolinas. Estes compostos têm sido avaliados como antiprotozoários, especificamente como coccidiostáticos contra as espécies de *Eimeria* (Patchett, *et al.* 1970; May and Baker Ltd., 1968; Rosi e Wilhelm, 1969), como antivirais, contra vírus que causam influenza (May and Baker Ltd., 1970); antiinflamatórios (Shionogi & Co., 1964) e antimicrobianos (Nakagome *et al.*, 1971).

Outros derivados de hidroxiquinolinas (ésteres quinolínicos) têm mostrado grande potencial antimalárico. Em estudo realizado por Puri e Dutta, em 1990, de dois quinolinocarboxilatos, WR 194095 e WR 197236 (FIGURA 37) não foram observadas recaídas quando foram administrados em macacos *Rhesus* infectados com *Plasmodium cynomolgi* B. Estes compostos foram curativos em doses diárias, intramusculares, de 15 mg/kg durante 7 dias e não foram observadas recaídas durante um período de 120 dias (Puri e Dutta, 1990). Por outro lado, a importância do grupo éster em compostos antimaláricos quinolínicos tem sido enfatizada por Ryley e Peter, em 1970, quando vários ésteres quinolínicos mostraram atividade esquizonticida sangüínea contra *Plasmodium berghei* e *Plasmodium cynomolgi*.



WR 197236



WR 194905

FIGURA 37. Estrutura química de WR 194095 e WR 197236.

O composto ensaiado com melhores resultados foi a 3-carbetoxi-4-cloroquinolina (valores de MIC melhores que a cloroquina tanto para K1 quanto para Palo Alto). A síntese deste composto encontra-se relatada na literatura por vários autores (Agui *et al.*, 1971; Markees, 1966; Frank e Mészáros, 1977), porém nenhum estudo foi encontrado relacionado à atividade biológica deste composto.

A atividade biológica de derivados de 4-cloroquinolinas tem sido descrita na literatura por vários autores. Relata-se atividade coccidiostática (Mészáros *et al.*, 1970; e Norwich Pharmacal. Co., 1966), atividade contra *Tricomonas vaginalis* e atividade amebicida contra cepas de *Entamoeba histolytica* (Beuglemans *et al.*, 1988).

Considerando os relatos da literatura e os resultados obtidos neste estudo, pesquisas posteriores poderão ser feitas visando à síntese de derivados da 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina (Composto 7) e do 3-(N-3-

carbetoxifenilamino)-2-carbetoxy-propanoato de etila (Composto 5) com o objetivo de obter novos derivados com maior atividade antimalárica.

Por outro lado, novos estudos devem ser realizados (em camundongos ou macacos) para a 3-carbetoxy-4-cloroquinolina (Composto 9), com o objetivo de confirmar a atividade antimalárica, assim como para avaliar a toxicidade deste composto.

As moléculas híbridas planejadas a partir da estrutura da mefloquina e da artemisinina não foram preparadas a partir das metodologias sintéticas empregadas. O planejamento foi cumprido até a etapa de funcionalização do anel quinolínico, que envolveu a síntese de vários intermediários sintéticos (enaminas, fenilaminometilenomalonatos, hidroxiquinolinas e haloquinolinas). Os derivados tipo enamina e fenilaminometilenomalonatos nunca foram testados antes contra a malária. Portanto, foi interessante o ensaio da atividade antimalárica destes compostos que constituem intermediários na síntese de compostos quinolínicos, de reconhecida atividade antimalárica.

Por outro lado, os resultados obtidos serão muito úteis para o desenvolvimento de trabalhos futuros. Por uma parte para dar continuidade ao planejamento das moléculas híbridas e por outro lado para estudar mais aprofundadamente os intermediários quinolínicos (em especial a 3-carbetoxy-4-cloroquinolina) e fenilaminometilenomalonatos como moléculas potencialmente antimaláricas.

CONCLUSÕES

VIII. CONCLUSÕES

- Não foi possível a obtenção das moléculas híbridas planejadas a partir da estrutura da mefloquina e da artemisinina por meio das metodologias sintéticas empregadas. O planejamento envolveu a síntese de vários intermediários sintéticos: enaminas, fenilaminometilenomalonatos, hidroxiquinolinas e haloquinolinas.
- Onze compostos intermediários foram ensaiados biologicamente frente a cepas de *Plasmodium falciparum*, utilizando microtécnica de Rieckmann.
- Entre os fenilaminometilenomalonatos e hidroxiquinolinas sintetizados, os melhores resultados no estudo biológico foram obtidos para 3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila ($MIC_{K1} = 32$ pmoles e $MIC_{Palo Alto} = 16$ pmoles) e 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina ($MIC_{K1} = 16$ pmoles e $MIC_{Palo Alto} = 16$ pmoles)
- Obteve-se o produto 3-carbetoxi-4-cloroquinolina através de ciclização com $POCl_3$, apresentando excelente atividade contra *P. falciparum* resistente e sensível à cloroquina ($MIC_{K1} = 4$ pmoles e $MIC_{Palo Alto} = 2$ pmoles).

PERSPECTIVAS

IX. PERSPECTIVAS

- A presença do grupo carbetoxi na posição 3 do anel quinolínico permitirá futuras funcionalizações da molécula (formação de anéis lactama e/ou lactonas), interessantes do ponto de vista farmacológico.
- Procurar novas metodologias para sintetizar a cetona, seja a partir da mefloquina base ou a partir do anel quinolínico funcionalizado. Posteriormente poderão ser sintetizados os alcenos que servirão como intermediários na síntese dos trioxanos.
- Realizar estudos de QSAR utilizando como base 3-carbetoxi-4-cloroquinolina com o intuito de estudar o efeito de diferentes tipos de substituições no anel quinolínico na atividade antimalárica.
- Considerando os resultados do estudo biológico para a 2-metil-7-cloro-4-hidroxiquinolina e 3-(*N*-3-carbetoxifenilamino)-2-carbetoxi-propanoato de etila, poderão ser feitos estudos de QSAR a partir de uma série de compostos derivados de 4-hidroxiquinolinas e fenilaminometilenomalonatos, visando à síntese de moléculas mais ativas.
- Realizar ensaios biológicos *in vivo* (em camundongos ou macacos) da 3-carbetoxi-4-cloroquinolina a fim de confirmar a atividade, assim como estudos que permitam avaliar a toxicidade.
- Realizar estudos que permitam estabelecer o mecanismo de ação dos compostos que mostraram atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

4-amino-2-methyl-chinolin, 4-amino-chinaldin $C_{10}H_{10}N_2$. Apud: Beil. Berlin, v.22, p.453, 1935.

ABARBRI, M., THIBONNET, J., BERILLON, L., DEHMEL, F., ROTTLÄNDER, M., KNOCHEL, P. Preparation of new polyfunctional magnesiated heterocycles using a chlorine-, bromine-, or iodine-magnesium exchange. J. Org. Chem., Columbus, v.65, n.15, p.4618-4634, 2000.

ADAM, S. A straightforward and high yielding synthesis of mefloquine-II. Tetrahedron, Oxford, v.47, n.36, p.7609-7614, 1991.

ADAM, S. A Nor-mefloquine: stereospecific synthesis and biological properties. Bioorg. Med. Chem. Lett., Oxford, v.2, n.1, p.53-58, 1992.

ADAM, S. A stereospecific synthesis of a quinuclidinyl analogue of mefloquine-IV. Tetrahedron, Oxford, v.50, n.11, p.3327-3332, 1994.

ADAM, S. An expedient and high yielding synthesis of mefloquine via fluoride ion-catalyzed wittig rearrangement I. Tetrahedron, Oxford, v.45, n.5, p.1409-1414, 1989.

AGUI, H., MITANI, T., NAKASHITA, M., NAKAGOME, T. Studies on quinoline derivatives and related compounds. I. A new synthesis of 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acids. J. Heterocycl. Chem., Odessa, v.8, n.3, p.357-365, 1971.

* De acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2001

- A-KARIM, A., FAROUK, A., MAHMOUD, H.K. Drug use and abuse and the pharmacist's role during the 1988 disaster in Sudan. Int. Pharm. J., The Hague, v.5, n.2, p.62-66, 1991.
- ANTOINE, M., CHABASSIER, M.S., GEIGER, M.S., BLEVEC, J.L., COENT, J.L., PESSON, M., RICHER, M.D. Acides m-dioxino quinoléine carboxyliques à action antibactérienne. I. Chim. Ther., Paris, n.6, p.434-443, 1972.
- ANTONIOLETTI, R.; BONADIES, F.; ORELLI, L. O.; SCETTRI, A.. Selective C-Alkylation of 1,3-dicarbonyl compounds. Gazz. Chim. Ital., Milan, n. 1, v.122, p.237-238. 1992
- ASAWAMAHASAKDA, W., ITTARAT, I., PU, Y.M., ZIFFER, H., MESHNICK, S.R. Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.38, n.8, p.1854-1858, 1994.
- AVERY, M.A., CHONG, W.K.M., JENNINGS-WHITE, C. Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin, the antimalarial constituent of *artemisia annua*. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.114, n.3, p.974-979, 1992.
- AVERY, M.A., JENNINGS-WHITE, C., CHONG, W.K.M. Simplified analogues of the antimalarial artemisinin: synthesis of 6,9-desmethyларtemisinin. J. Org. Chem., Columbus, v.54, n.8, p.1792-1795, 1989.

- AVERY, M.A., JENNINGS-WHITE, C., CHONG, W.K.M. The total synthesis of (+)-artemisinin and (+)-9-desmethylartemisinin. Tetrahedron Lett., Oxford, v.28, n.40, p.4629-4632, 1987.
- AVERY, M.A., GAO, F., CHONG, W.K.M., MEHROTRA, S., MILHOUS, W.K. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 1. Synthesis and comparative molecular field analysis of C-9 analogs of artemisinin and 10-deoxyartemisinin. J. Med. Chem., Columbus, v.36, n.26, p.4264-4275, 1993.
- AVERY, M.A., MEHROTRA, S., JOHNSON, T.L., BONK, J.D., VROMAN, J.A., MILLER, R. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 5. Analogs of 10-deoxyartemisinin substituted at C-3 and C-9. J. Med. Chem., Columbus, v.39, n.21, p.4149-4155, 1996.
- AVERY, M.A., BONK, J.D., CHONG, K.M., MILLER, R., MILHOUS, W., GOINS, K., VENKATESAN, S., WYANDT, C., KHAN, I., AVERY, B.A. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 2. Effect of heteroatom substitution at O-11: synthesis and bioassay of N-alkyl-11-aza-9-desmethylartemisinins. J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.26, p.5038-5044, 1995.
- BANGCHANG, K., KARBWANG, J., BACK, D. Mefloquine metabolism by human liver microsomes: effect of other antimalarial drugs. Biochem. Pharmacol., New York, v.43, n.9, p.1957-1961, 1992.

- BARREIRO, E.S., MANSSOUR FRAGA, C.A. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: ARTEMED, 2001. 243p.
- BASCO, L.K., DECHY-CABARET, O., NDOUNGA, M., MECHE, F.S., ROBERT, A., MEUNIER, B. *In vitro* activities of DU-1102, a new trioxaquinone derivative against *Plasmodium falciparum* isolates. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.45, n.6, p.1886-1888, 2001.
- BERGER A. Protection against malaria. Br. Med. J., London, v.317, n.28, p.1508, 1998.
- BEUGELMANS R., BOIS-CHOUSSY M., GAYRAL, P., RIGOTHIER, M.C. Synthèse par SRN^1 et évaluation de l'activité amoebicide de nouveaux dérivés quinoléiniques. Eur. J. Med. Chem., Paris, v.23, n.5, p.539-546, 1988.
- BHATTACHARYA, A.K., THYAGARAJAN, G. The Michaelis-Arbuzov rearrangement. Chem. Rev., Columbus, v.81, n.4, p.415-430, 1981.
- BOHLE, D.S.I., DINNEBIER R.E., MADSEN, S.K., STEPHENS, P.W. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. J. Biol. Chem., Bethesda, v.272, n.2, p.713-716, 1997.
- BOULARD, B.Y., LANDAU, I., MILTGEN, F., PETERS, W., ELLIS, D.S. The chemotherapy of rodent malaria XLI. Causal prophylaxis part V. Effect of mefloquine on exoerythrocytic schizogony in *Plasmodium*

- yoelli yoelli*. Ann. Trop. Med. Parasitol., Basingstoke, v.80, n.6, p.577-580, 1986.
- BOUTAGY, J., THOMAS, R. Olefin synthesis with organic phosphonate carbanions. Chem. Rev., Columbus, v.74, n.1, p.87-99, 1974.
- BRANDT, C.A., AMARAL, J.A., ZELNIK, R. A novel approach to pyrroles by iodocyclization of 2-alkenyl enamines. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 14, Caxambu, 1991. Resumos. Caxambu: SBQ, 1991. res.QO-016.
- BRASSEUR, P., KOVAMONO, J., MOYOU-SOMO, R., DRUILHE, P. Multi-drug resistant falciparum malaria in Cameroon in 1987-1988. II. Mefloquine resistance confirmed *in vivo* and *in vitro* and its correlation with quinine resistance. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.46, n.1, p.8-14, 1992.
- BREWER, T.G., PEGGINS, J.O., GRATE, W.J., PETRAS, J.M., LEVINE, B.S., WEINA, P.J., SWEARENGEN, J., HEIFER, M.H., SCHUSTER, B.G. Neurotoxicity in animals due to arteether and artemether. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.88, suppl.1, p.S33-S36, 1994.
- BROSSI, A., VENUGOPALAN, B., DOMINGUES, G.L., YEH, H.J.C., FLIPPEN-ANDERSON, J.L., BUCHS, P., LUO, X.D. Artemether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. J. Med. Chem., Columbus, v.31, n.3, p.645-650, 1988.

- BROWNING, P.M., BISBY, R.H. Qinghaosu does not affect the major thermotropic phase transition in model membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine. Mol. Biochem. Parasitol., Shannon, v.32, n.1, p.57-60, 1989.
- BURDON, J., MCLOUGHLIN, V. The sodium-promoted Claisen ester condensations of ethyl perfluoroalkanecarboxylates. Tetrahedron, Oxford, v.20, p.2163-2166, 1964.
- BUTLER, A.E., WU, Y.L. Artemisinin (qinghaosu): a new type of antimalarial drug. Chem. Soc. Rev., Letchworth, v.21, n.2, p.85-95, 1992.
- CASON, J., KRAIS, K. Ketone synthesis by the Grignard reactions with acid chlorides in presence of ferric chloride. J. Org. Chem., Columbus, v.26, n.6, p.1768-1772, 1961.
- CASTEEL, D.A. Antimalarial agents. In: WOLFF, M.E., ed. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. 5.ed. Dee Ann Casteel. New York: John Wiley, 1996. v.5, cap.59, p.3-91.
- CHAWIRA, A.N., WARHURST, D.C., PETERS, W. Qinghaosu resistance in rodent malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.80, n.3, p.477-480, 1986.
- CHIEN, P.L., CHENG, C.C. Difference in antimalarial activity between certain amino alcohol diastereomers. J. Med. Chem., Columbus, v.19, n.1, p.170-172, 1976.

- CHIEN, P.L., CHENG, C.C. Further side chain modification of antimalarial phenantrene amino alcohols. J. Med. Chem., Columbus, v.16, n.10, p.1093-1096, 1973.
- CHIEN, Y.S., LIU, W.Y., CHEN, S. Pyridinium chlorochromate adsorbed on alumina as a selective oxidant for primary and secondary alcohols. Synth. Commun., New York, v.10, p.223-224, 1980.
- CHILDS, G.E., BOUDREAU, F.E., WIMONWATTRATEE, T., PANG, L., MILHOUS, W.K. *In vitro* and clinical correlates of mefloquine resistance of *Plasmodium falciparum* in eastern Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.44, n.5, p.553-559, 1991.
- COHEN, N.C. The molecular modeling perspective in drug design In: _____, ed. Guidebook on molecular modeling in drug design. San Diego: Academic Press, 1996. cap.1, p.1-17.
- CONSTANTINO, M.G., BELTRAME, M., GIL, J. A novel asymmetric total synthesis of (+) artemisinin. Synth. Commun., New York, v.26, n.2, p.223-224, 1996.
- COREY, E.J., SCHMIDT, G. Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. Tetrahedron Lett., Oxford, n.5, p.399-402, 1979.
- CUMMING, J.N., PLOYPRADITH, P., POSNER, G. Antimalarial activity of artemisinin (Qinghaosu) and related trioxanes: mechanism (s) of action. Adv. Pharmacol., New York, v.37, p.253-297, 1997.

- CUMMING, J.N., WANG, D., PARK, S.B., SHAPIRO, T.A., POSNER, G.H. Design, synthesis, derivatization, and structure-activity relationships of simplified, tricyclic, 1, 2,4-trioxane alcohol analogues of antimalarial artemisinin. J. Med. Chem., Columbus, v.41, n.6, p.952-964, 1998.
- DAVIDSON, M., GRIGGS, B., BOYKIN, D., WILSON, W. Mefloquine, a clinically useful quinolinemethanol antimalarial which does not significantly bind to DNA. Nature, London, v.254, n.5495, p.632-634, 1975.
- DECHY-CABARET, O., BENOIT-VICAL, F., ROBERT, A., MEUNIER, B. Preparation and antimalarial activities of "trioxaquines", new modular molecules with a trioxane skeleton linked to a 4-aminoquinoline. ChemBioChem, Weinheim, v.1, n.4, p.281-283, 2000.
- DESNEVES, J., THORN, G., BERMAN, A., GALATIS, D., GRECA, N.L., SINDING, J., FOLEY, M., DEADY, L., COWMAN, A.F., TILLEY, L. Photoaffinity labeling of mefloquine-binding proteins in human serum, uninfected erythrocytes and *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Mol. Biochem. Parasitol., Shannon, v.82, n.2, p.181-194, 1996.
- DIAS, R.S., FREITAS, A.C., BARREIRO, E.J., GOINS, D.K., MCCHESENEY, J.D. Synthesis and biological activity of new potential antimalarial: 1H-pyrazolo (3,4-b) pyridine derivatives. Boll. Chim. Farm., Milan, v.139, n.1, p.14-20, 2000.

DIGGS, C., JOSEPH, K., FLEMMINGS, B., SNODGRASS, R., HINES, F. Protein synthesis *in vitro* by cryopreserved *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.24, n.5, p.760-763, 1975.

DOMINGUEZ, J.N., LOPEZ, S., CHARRIS, J., IARRUSO, L., LOBO, G., SEMENOV, A., OLSON, J.E., ROSENTHAL, P.J. Synthesis and antimalarial effects of phenothizine inhibitors of *Plasmodium falciparum* Cysteine Protease. J. Med. Chem., Columbus, v.40, n.26, p.2726-2732, 1997.

DURREHEIM, D.N. Prophylaxis against malaria. Br. Med. J., London, v.318, n.24, p.1139-1140, 1999. Disponível em: <http://www.bmj.com/cgi/content/full>. Acesso em: 22 jul. 1999.

EDWARDS, G., WINSTANLEY, P.A., WARD, S.A. Clinical pharmacokinetics in the treatment of tropical diseases: some applications and limitations. Clin. Pharmacokinet., Auckland, v.27, n.2, p.150-165, 1994.

ELLIS, D.S., LI, Z.L., GU, H.M., PETERS, W., ROBINSON, B.L., TOVEY, G., WARHURST, D.C. The chemotherapy of rodent malaria XXXIX. Ultra structural changes following treatment with artemisinin of *Plasmodium berghei* infection in mice, with observations of the localization of [³H] dihydroarteimsinin in *P. falciparum in vitro*. Ann. Trop. Med. Parasitol., Basingstoke, v.79, n.4, p.367-374, 1985.

FERRAZ, H.M.C., OLIVEIRA, E.O., PAYRET-ARRUA, M.E., BRANDT, M.E. A new and efficient approach to cyclic β enamino ketones by iodine-

promoted cyclization. J. Org. Chem., Columbus, v.60, n.22, p.7357-7359, 1995.

FISHWICK, J., MCLEAN, W.G., EDWARDS, G., WARD, S.A. The toxicity of artemisinin and related compounds on neuronal and glial cells in culture. Chem.-Biol. Interact., Shannon, v.96, n.3, p.263-271, 1995.

FONTANET, A.L., WALKER, A.M. Predictors of treatment failure in multiple drug-resistant falciparum malaria: results from a 42 day follow-up of 224 patients in eastern Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.49, n.4, p.465-472, 1993.

FORD-MOORE, A.H., PERRY, B.J. Triethyl phosphite (ethyl phosphite). Org. Synth., New York, v.4, p.955-956, 1963.

FRANK, J., MÉSZÁROS, Z. Alkylation of quinolines with trialkyl phosphates. Tetrahedron Lett., Oxford, n.51, p.4545-4546, 1977.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Malária. Situação atual da doença. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/>. Acesso em: 14 jan. 2002.

FUSON, R.C., PARHAM, W.E., REED, L.J. Alkylation of ethyl malonate with diethoxymethyl acetate. J. Org. Chem., Columbus, v.11, n.2, p.194-198, 1946.

- GEENWOOD, D. Historical perspective, conflicts of interest: the genesis of synthetic antimalarial agents in peace and war. J. Antimicrob. Chemother., Oxford, v.36, n.5, p.857-872, 1995.
- INGSBURG, H., NISSANI, E., KRUGLIAK, M. Alkalinization of the food vacuole of malaria parasites by quinoline drugs and alkylamines is not correlated with their antimalarial activity. Biochem. Pharmacol., New York, v.38, n.16, p.2645-2654, 1989.
- INGSBURG, H., GEARY, T.G. Current concepts and new ideas on the mechanism of action of quinoline-containing antimalarials. Biochem. Pharmacol., New York, v.36, n.10, p.1567-1576, 1987.
- INGSBURG, H., KRUGLIAK, M. Quinoline-containing antimalarials-mode of action, drug resistance and its reversal: an update with unresolved puzzles. Biochem. Pharmacol., New York, v.43, n.1, p.63-70, 1992.
- GOLDMAN, A. Current views on malaria prophylaxis. Disponível em: <http://www.pol-it.org//malaria.htm>. Acesso em: 6 set. 1999.
- GOULD, R.G., JACOBS, W.A. The synthesis of certain substituted quinolines and 5,6-benzoquinolines. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.61, n.10, p.2890-2895, 1939.
- GU, H.M., WARHURST, D.C., PETERS. W. Rapid action of Qinghaosu and related drugs on incorporation of [³H] isoleucine by Plasmodium falciparum *in vitro*. Biochem. Pharmacol., New York, v.32, n.17, p.2463-2466, 1983.

- GU, H.M., WARHURST, D.C., PETERS, W. Uptake of [³H] dihydroartemisinin erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* *in vitro*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.78, n.2, p.265-270, 1984.
- GULATI, A., BHAREL, S., SRIVASTAVA, P., ABDIN, M.Z., JAIN, S.K. Experimental studies on *Artemisia*, a herbal remedy to malaria. Fitoterapia, Amsterdam, v.67, n.5, p.403-409, 1996.
- HÅKANSON, A., LANDBERG-LINDGREN, A., BJÖERK-MAN, A. Comparison of the activity *in vitro* of mefloquine and two metabolites against *Plasmodium falciparum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.84, n.4, p.503-504, 1990.
- HAQUE, T.S., SKILLMAN, A.G., LEE, C.E., HABASHITA, H., GLUZMAN, I.Y., EWING, T.J.A., GOLDBERG, D.E., KUNTZ, I.D., ELLMAN, J.A. Potent, low-molecular-weight non-peptide inhibitors of malarial aspartyl protease plasmepsin II. J. Med. Chem., Columbus, v.42, n.8, p.1428-1440, 1999.
- HAUSER, C.R., REYNOLDS, G.A. Reactions of β -keto esters with aromatic amines. Syntheses of 2-and 4-hydroxyquinoline derivatives. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.70, n.7, p.2402-2404, 1948.
- HAWLEY, S.R., BRAY, P.B., MUNGTHIN, M., ATKINSON, J.D., O'NEILL, M.P., WARD, S.A. Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium*

falciparum in vitro. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.42, n.3, p.682-686, 1998.

HAYNES, R.K., VONWILLER, S.C. The behaviour of qinghaosu (artemisinin) in the presence of non-heme iron (II) and (III). Tetrahedron Lett., Oxford, v.37, n.2, p.257-260, 1996.

HEERINGA, M., GROOTHEEST, V.A. Side effects do not warrant restrictions on use: mefloquine for malaria prophylaxis. Pharm. Weekbl., The Hague, v.135, n.2, p.788-792, 2000.

HERMECZ, I., KERESZTÚRI, G., VASVÁRI-DEBRECZY, L. Aminometylenemalonates and their use in heterocyclic synthesis. Adv. Heterocycl. Chem., San Diego, v.54, p.1-429, 1992.

HIEN, T., WHITE, N.J. Qinghaosu. Lancet, London, v.341, n.6, p.603-608, 1993.

INSELBURG, J. Induction and isolation of artemisinin-resistant mutants of *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.34, n.3, p.417-418, 1985.

JEFFORD, C.W., Mc GORAM, E.C., BOUKOUVALAS, J., RICHARDSON, D., ROBINSON, B.L., PETERS, W. Synthesis of new 1,2,4-trioxanes and their antimalarial activity. Helv. Chim. Acta, Zurich, v.71, p.1805-1812, 1988.

JOULE, J.A., MILLS, K., SMITH, G.F. Quinolines and isoquinolines: reactions and synthesis. In: _____. Heterocyclic chemistry. 3.ed. London: Chapman and Hall, 1995. p.121-145.

JUNG, M., YU, D., BUSTOS, D., ELSOHLY, H.N., McCHESNEY, J.D. A concise synthesis of 12-(3'-hydroxy-n-propyl)-deoxoartemisinin. Bioorg. Med. Chem. Lett., Oxford, v.1, n.12, p.741-744, 1991.

JUNG, M., ELSOHLY, H.N., CROOM, E.M., MCPHAIL, A.T., MCPHAIL, D.R. Practical conversion of artemisinin and into desoxyartemisin. J. Org. Chem., Columbus, v.51, n.26, p.5417-5419, 1986.

KARBAWANG, J., NA BANGCHANG, K., THANAVIBUL, A., BLACK, D., BUNNAG, D., HARINASUTA, T. Pharmacokinetics of mefloquine alone or in combination with artesunate. Bull W. H. O., Geneva, v.72, n.1, p.83-87, 1994.

KARBAWANG, J., NA BANGCHANG, K., THANAVIBUL, A., DITTA-IN, M., HARINASUTA, T. A comparative clinical trial of two different regimens of artemether plus mefloquine in multidrug resistant falciparum malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.89, n.3, p.296-298, 1995.

KARBAWANG, J., WHITE, N.J. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. Clin. Pharmacokinet., Auckland, v.19, n.4, p.264-279, 1990.

KARLE, J.M., KARLE, I.L. Crystal structure and molecular structure of mefloquine methylsulfonate monohydrate: implications for a malaria

receptor. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.35, n.11, p.2238-2245, 1991.

KASLOW, C.E., LAWTON, W.R. Substituted bromoquinolines. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.72, n.4, p.1723-1724, 1950.

KECK, G.E., YATES, J.B. Carbon-carbon bond formation via the reaction of trialkylallylstannanes with organic halides. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.104, n.21, p.5829-5831, 1982.

KEPLER, J.A., PHILIP, A., LEE, Y.W., MOREY, M.C., CARROL, F.L. 1,2,4-trioxanes as potencial antimalarial agents. J. Med. Chem., Columbus, v.31, n.4, p.713-716, 1988.

KILIMALI, V.A.E.B., MKUFYA, A.R., KILAMA, W.L. Low resistance of *Plasmodium falciparum* to mefloquine in tanga region Tanzania. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.83, n.2, p.162-164, 1989.

KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. Science, Washington, v.228, n.4703, p.1049-1055, 1985.

KLAYMAN, D.L., LIN, A.J., ACTON, N., SCOVILL, J.P., HOCH, J.M., MILHOUS, W.K., THEOHARIDES, A.D. Isolation of artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. J. Nat. Prod., Columbus, v.47, n.4, p.715-717, 1984.

KÖNING, M.G., WRIGHT, A.D. Novel potent antimalarial diterpene isocyanates, isothiocyanates, and isonitriles from the tropical marine

- sponge *Cymbastela hooperi*. J. Org. Chem., Columbus, v.61, n.10, p.3259-3267, 1996.
- KOROLKOVAS, A. Dicionário terapêutico Guanabara:1999/2000. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.10.17-10.18.
- KOROLKOVAS, A. Essentials of medicinal chemistry. 2.ed. New York: John Wiley, 1988. 1204p.
- KOSUGI, M., SHIMIZU, Y., MIGITA, T. Alkylation, arylation, and vinylation of acyl chlorides by means of organotin compounds in the presence of catalytic amounts of tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0). Chem. Lett., Tokyo, n.12, p.1423-1224, 1977.
- KROGSTAD, D.J., GLUZMAN, I.Y., KYLE, D.E., ODUOLA, A.M.J., MARTIN, S.K., MILHOUS, W.K., SCHLWISNGER, P.H. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance Science, Washington, v.238, n.4831, p.1283-1285, 1987.
- KROGSTAD, D.J., SCHKESINGER, P.H., HERWALDT, B.L. Antimalarial agents: mechanism of chloroquine resistance. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.32, n.6, p.799-801, 1988.
- KRUNGKARAI, S.R., YUTHAVONG, Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.81, n.5, p.710-714, 1987.

KUILE, F., LUXEMBURGER, C., NOSTEN, F., THWAI, K.L., CHONGSUPHAJAI SIDDHI, T., WHITE, N.J. Predictors of mefloquine treatment failure: a prospective study of 1590 patients with uncomplicated falciparum malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, n.89, v.6, p.660-664, 1995.

KUMAR, M.S., NAGESHWAR, Y.V.D., MESHARAM, H.M. A facile and alternative method for the synthesis of mefloquine. Synth. Commun., New York, v.26, n.10, p.1913-1919, 1996.

LABADIE, J.W., STILLE, J.K. Mechanisms of the palladium-catalyzed coupling of acid chlorides with organotin reagents. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.105, n.19, p.6129-6137, 1983.

LABADIE, J.W., TUETING, D., STILLE, J.K. Synthetic utility of the palladium-catalyzed coupling reaction of acid chlorides with organotin. J. Org. Chem., Columbus, v.48, n.24, p.4634-4648, 1983.

LAMBROS, C., VANDERBERG, J.P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J. Parasitol., Lawrence, v.65, n.3, p.418-420, 1979.

LANSBURY, P.T., NOWAK, D.M. An efficient partial synthesis of (+)-artemisinin and (+)-deoxyartemisinin. Tetrahedron Lett., Oxford, v.33, n.8, p.1029-1032, 1992.

- LEE, I., ELSOHLY, H., CROOM, E.M., HUFFORD, C.D. Microbial metabolism studies of the antimalarial sesquiterpene Artemisinin. J. Nat. Prod., Columbus, v.52, n.2, p.337-341, 1989.
- LEE, J.S., ORTIZ, R., GUIJARRO, A., WURST, J., RIEKE, R.D. Low-temperature formation of functionalized Grignard reagents from direct oxidative addition of active magnesium to Aryl Bromides. J. Org. Chem., Columbus, v.65, n.17, p.5428-5430, 2000.
- LIM, P. Mefloquine hydrochloride. Anal. Profiles Drug Subst., San Diego, v.14, p.157-180, 1985.
- LIN, A.J., KLAYMAN D.L., MILHOUS, W.K. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. J. Med. Chem., Columbus, v.30, n.11, p.2147-2150, 1987.
- LIN, A.J., LI, L.Q., KLAYMAN, D.L., GEORGE, C.F., FLIPPEN-ANDERSON, J.L. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. 3. Aromatic amine analogues. J. Med. Chem., Columbus, v.33, n.9, p.2610-2614, 1990.
- LIN, A.J., MILLER, R.E. Antimalarial activity of new dihydroartemisinin derivatives. 6. alpha-Alkylbenzylic ethers. J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.5, p.764-70, 1995.
- LIN, A.J., LEE, M., KLAYMAN, D.L. Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. 2. Stereospecificity of the

- ether side chain. J. Med. Chem., Columbus, v.32, n.6, p.1249-1252, 1989.
- LIU, H.J., YEH, W.L., CHEW, S.Y. A total synthesis of the antimalarial natural product (+)-Qinghaosu. Tetrahedron Lett., Oxford, v.34, n.28, p.4435-4438, 1993.
- LOIOLA, C., MANGABEIRA DA SILVA, C.J., TAUIL, P.L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. Rer. Panam. Salud. Pública, Rio de Janeiro, v.13, n.4, p.235-243, 2002.
- LUXEMBURGER, C., KUILE, F.O., NOSTEN, F., DOLAN, G., BRADOL, J.H., PHAIPUN, T., CHONG-SUPHAJASIDDHIR, T., WHITE, N.J. Single day mefloquine-artesunate combination in the treatment of multi-drug resistant falciparum malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.88, n.2, p.213-217, 1994.
- MAENO, Y., TOYOSIHIMA, T., FUJIOKA, H., ITO, Y., MESHNICK, S.R., BENAKIS, A., MILHOUS, W.K., AIKAWA, M. Morphological effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.49, n.4, p.485-491, 1993.
- MARCH, J. Advanced organic chemistry: reactions, mechanism, and structure. 4.ed. New York: John Wiley, 1992. p.956-963.
- MARKEES, D.G. The thermal decomposition of ethyl 4-quinolone carboxylates and related compounds. J. Org. Chem., Columbus, v.31, n.12, p.4253-4255, 1966.

- MARTINEY, J.A., CERAMI, A., SLATER, F.G. Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. J. Biol. Chem., Bethesda, v.270, n.38, p.22393-22398, 1995.
- MARVEL, C.S., PORTER, P.K. Monochloromethy ether. Org. Synth., New York, v.1, p.377-379, 1941.
- MAY AND BAKER Ltd. Antiprotozoal 4-hydroxy-6-7-bis(alkoxy)quinoline-3-carboxylates. Fr. Pat. 1,531,495, 1968. 11p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.71, abstr. n.70509n, 1969.
- MAY AND BAKER Ltd. Antiviral quinoline derivatives. Fr. Pat. M.7611, 1970. 16p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.77, abstr. n. 19548w, 1972.
- MESHNICK, S.R., YANG Y.Z., LIMA, V., KUYPERS, F., KAMCHONWONGPAISAN, S., YUTHAVONG Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.37, n.5, p.1108-1114, 1993.
- MESHNICK, S.R., TAYLOR, T.E., KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. Microbiol. Rev., Washington, v.60, n.2, p.301-315, 1996.
- MESHNICK, S.R., THOMAS, A., RANZ, A., XU, C.M., PAN, H.-Z. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemo in its

- mechanism of antimalarial action. Mol. Biochem. Parasitol., Shannon, v.49, n.2, p.181-189, 1991.
- MÉSZÁROS, Z., SZENTMIKLOSI, P., FRANK, J., CSASZAR, J., KORMOCZY, G. Coccidiostatic 4-chloro-6, 7-methylenedioxyquinoline-3-carboxylic esters. Hung Teljes, 512, 1970. 13p. Apud: Chem. Abstr., Colombus, v.74, abstr. n.111927e, 1971.
- MOCKENHAUPT, F. Mefloquine resistance in plasmodium falciparum malaria. Parasitol. Today, Oxford, v.11, n.7, p.248-253, 1995.
- MONS, B., KLASSEN, E., VAN KESSEL, R., NCHINDA, T. Partnership between south and north crystallizes around malaria. Science, Washington, v.219, n.23, p.498-499, 1998.
- MUKHERJEE, T. Antimalarial herbal drugs: a review. Fitoterapia, Amsterdam, v.62, n.3, p.197-204, 1991.
- NAKAGOME, T., AGUI, H., MITANI, T., NAKASHITA, M. Antimicrobial 1-alkyl-6,7-methylenedioxy-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acids. Ger. Offen. 2,033,971, 1971. 43p. Apud: Chem. Abstr., Colombus, v.75, abstr. n.140823u, 1971.
- NARUTA, Y., NISHIGAICHI, Y., MARUYAMA, K. Extremely facile and stereoselective preparation of allylstannanes with use of ultrasound. Chem. Lett., Tokyo, n.11, p.1857-1860, 1986.

- NGUYEN-CONG, V., RODE, B.M. Quantum pharmacological analysis of structure-activity relationships for mefloquine antimalarial drugs using optimal transformations. J. Chem. Inf. Comput. Sci., Columbus, v.1, n.36, p.114-117, 1996.
- NORONHA, E., ALECRIM, M., ROMERO, G., MACÊDO, V. Resistência à mefloquina do tipo RIII em crianças com malária falciparum em Manaus, AM, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.201-205, 2000.
- NORWICH PHARMACAL Co. 6,7-dialkoxy-4-hydroxyquinoline-3-carboxylates. Belg. 670,520, 1966. 19p. Apud: Chem. Abstr., Colombus, v.65, abstr. n.15350h, 1966.
- NOSTEN, F., PRICE, R. New antimalarials: a risk-benefit analysis. Drug Saf., Auckland, v.12, n.4, p.264-273, 1995.
- ODUOLA, A.M.J., MILHOUS, W.K., WEATHERLY, N.F., BOWDRE, J.H., DESJARDINS, R.E. *Plasmodium falciparum*. induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure *in vitro*. Exp. Parasitol., Orlando, v.67, n.2, p.354-360, 1988.
- ODUOLA, A.M.J., SOWUNMI, A., MILHOUS, W.K., KYLE, D.E., MARTIN, R.K., WALKER, O., SLAKO, L.A. Innate resistance to new antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. from Nigeria. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.86, n.2, p.123-126, 1992.

- OHNMACHT, C.J., PATEL, A.R., LUTZ, R.E. Antimalarials. 7. bis(trifluoromethyl)- α -(2-piperidyl)-4-quinolinemethanols. J. Med. Chem., Columbus, v.14, n.10, p.926-928, 1971.
- PANDEY, A.V., TEKWANI, B.L., SINGH, T.L., CHAUHAN, U.S. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. J. Biol. Chem., Bethesda, v.274, n.27, p.19383-19388, 1999.
- PARHAM, E., REED, L. Ethyl ethoxymethylenemalonate. Org. Synth., New York, v.3, p.395-397, 1955.
- PATCHETT, A.L., CLARK, R.L., ROGERS, E.F. Anticoccidial 7-alkylamino-4-hydroxyquinoline-3-carboxylates. U.S. Pat. 3,542,781, 1970. 7p. Apud: Chem. Abstr., Colombus, v.74, abstr. n.141569g, 1971.
- PEEL, S.A., MERRIT, S.C., HANDY, J., BARIC, R. Derivation of highly mefloquine-resistant lines from *Plasmodium falciparum in vitro*. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.48, n.3, p.385-397, 1993.
- PEREYRE, M., QUINTARD, J.P., RAHM, A. Tin in organic synthesis. London: Butterworth, 1987. 342p.
- PERRIN, D.D., ARMAREGO, W.L.F., PERRIN, D.R. Purification of laboratory chemicals. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1980. 568p.
- PETERS, W. The prevention of antimalarial drug resistance. Pharmacol. Ther., New York, v.47, n.3, p.499-508, 1990.

- PHILIPPS, J., RADLOFF, P.D., WERNSDORFER, W., KREMSNER, P.G. Follow-up of the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarials in Gabon. Am. J. Trop. Med. Hyg., Northbrook, v.58, n.5, p.612-618, 1998.
- PHILLIPS-HOWARD, P.A., WOOD, D. The safety of antimalarial drug in pregnancy. Drug Saf., Auckland, v.14, n.3, p.131-145, 1996.
- PINDER, R.M., BURGER A. Antimalarials. II α -(2-piperidyl)- α (2-pyridyl)-2-trifluoromethyl-4-quinolinemethanols. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.11, n.2, p.267-269, 1968.
- POLAM, S., KOKPOL, S., HANNONGBUA, S., ROBE, B.M. Quantum pharmacological analysis of structure-activity relationships for mefloquine antimalarial drugs. Anal. Sci., Tokyo, v.5, n.36, p.641-644, 1989.
- POSNER, G.H., MCGARVEY, D.J., OH, C.H., KUMAR, N., MESHNICK, S.R., ASAWAMAHASADKA, W.A. Structure-activity relationships of lactone ring-opened analogs of antimalarial 1, 2, 4 trioxane artemisinin. J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.4, p.607-612, 1995a.
- POSNER, G.H., O'DOWD, H. An antimalarial active cyclic peroxy ketal. Heterocycles, Tokyo, v.47, n.2, p.643-646, 1998.
- POSNER, G.H., O'DOWD, H., PLOYPRADITH, P., CUMMING, J.N., XIE, S., SHAPIRO, T.A.F. Antimalarial cyclic peroxy ketals. J. Med. Chem., Columbus, v.41, n.12, p.2164-2167, 1998.

POSNER, G.H., OH, C.H. A regiospecifically oxygen-18-labeled 1,2,4-trioxane: a simple chemical model system to probe the mechanism(s) for the antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu). J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.114, n.23, p.8328-8329, 1992.

POSNER, G.H., OH, C.H., GERENA, L., MILHOUS, W.K. Extraordinarily potent antimalarial compounds: new, structurally simple, easily synthesized, tricyclic 1,2,4 trioxanes. J. Med. Chem., Columbus, v.35, n.13, p.2459-2467, 1992.

POSNER, G.H., OH, C.H., WANG, D., GERENA, L., MILHOUS, W.K., MESHNICK, S.R., ASAWAMAHASADKA, W. Mechanism-based design, synthesis, and *in vitro* antimalarial testing of new 4-methylated trioxanes structurally related to artemisinin: the importance of a carbon-centered radical for antimalarial activity. J. Med. Chem., Columbus, v.37, n.9, p.1256-1258, 1994.

POSNER, G.H., WANG, D., CUMMING, J.N., OH, C.H., FRENCH, A.N., BODLEY, A.L., SHAPIRO, T.A. Further evidence supporting the importance of and restrictions on a carbon-centered radical for high antimalarial activity of 1,2,4-trioxanes like artemisinin J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.13, p.2273-2275, 1995b.

POSNER, G.H., WANG, D., GONZALEZ, L., TAO, X., CUMMING, J.N., KLINEDINST, D., SHAPIRO, T.A. Mechanism-based design of simple, symmetrical, easily prepared, potent antimalarial endoperoxides. Tetrahedron Lett., Oxford, v.37, n.6, p.815-818, 1996.

- PRICE, C.C., LEONARD, N.J., REITSEMA, R.H. Synthesis of 4-hydroxyquinolines. V. A direct synthesis from β -anilino acrylates. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.68, n.7, p.1256, 1946.
- PRICE, C.C., ROBERTS, R.M. 4-7-dichloroquinoline. Org. Synth. Collective. New York, v.3, p.272-275, 1955.
- PRICE, C.C., ROBERTS, R.M. The synthesis of 4-hidroxyquinolines. I. Through ethoxymethylenemolonic ester. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.68, n.7, p.1204-1208, 1946.
- PU, Y.M., TOROK, D.S., ZIFFER, H. Synthesis and antimalarial activities of several fluorinated artemisinin derivatives. J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.20, p.4120-4124, 1995.
- PU, Y.M., ZIFFER, H. Synthesis and antimalarial activities of 12 β - allyldeoxoartemisinin and its derivatives. J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.4, p.613-616, 1995.
- PURI, S.K., DUTTA, G.P. Quinolines esters as potential antimalarial drugs effect on relapses of *Plasmodium cynomolgui* infections in monkeys. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.84, n.6, p.755-756, 1990.
- RADDING, J. Development of anti-malarial inhibitors of hemoglobinas. Annu. Rep. Med. Chem., San Diego, cap.16, v.34, n.28, p.159-168, 1999.
- RAYNES, K. Bisquinoline antimalarials their role in malaria chemotherapy. Int. J. Parasitol., Oxford, v.29, n.3, p.367-379, 1999.

- RECHSTEINER, B., TEXIER-BOULLER, F., HAMELIN, J. Synthesis in dry media coupled with microwave irradiation: application to the preparation of enaminketones. Tetrahedron Lett., Oxford, v.34, n.32, p.5071-5074, 1993.
- REID, A.J.C., WHITTY, C.J.M., AYLES, M.H., JENNINGS, R.M., BOVILL, A.B., FELTON, J.M., BEHRENS, H., BRYCESON, A.D.M., MABEY, D.C.W. Malaria at christmas: risks of prophylaxis versus risks of malaria. Br. Med. J., London, v.317, n.28, p.1506-1508, 1998.
- REYNOLDS, G.A., HAUSER, C.H. 2-methyl-4-hydroxyquinoline. Org. Synth., New York, v.3, p.593-594, 1955b.
- REYNOLDS, G.A., HAUSER, C.H. Ethyl β -anilincrotonate. Org. Synth., New York, v.3, p.374-375, 1955a.
- RIDLEY, R.G., DORN, A., MUTILE, H., KANSY, M. Haem polymerization in malaria. Nature., London, v.378, p.138-139, 1995.
- RIECKMANN, K.H., CAMPBELL, G.H., SAX, L.J., MREMA, J.E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an *in vitro* microtechnique. Lancet, London, v.1, n.8054, p.22-23, 1978.
- RIETVELD, A. Frequently-asked questions about malaria. Disponível em: <http://www.utbreak.org/cgi-unreg/dynaserve.exe/Malaria/faq.html>. Acesso em: 3 ago. 1999.

- RING, C.S., SUN, E., MCKERROW, J.H., LEE, G.K., ROSENTHAL, P.J., KUNTZ, I.D., COHEN, F.E. Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Washington, v.90, n.8, p.3583-3587, 1993.
- ROSSI, A., WILHELM, M. Bacteriolytic quinoline derivatives. *Ger., Offen.* 1,814,187, 1969. 48p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.71, abstr. n.91339x, 1979.
- ROTH, R.J., ACTON, N. A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin. J. Nat. Prod., Columbus, v.52, n.5, p.1183-1185, 1989.
- ROTH, R.J., ACTON, N. A facile semisynthesis of the antimalarial drug Qinghaou artemisinin. J. Chem. Educ., Washington, v.68, n.7, p.612-613, 1991.
- RYLEY, J.F., PETERS, W. The antimalarial activity of some quinolone esters. Ann. Trop. Med. Parasitol., Basingstoke, v.64, n.2, p.209-222, 1970.
- SAH, P.P.T., MA, T.S. Esters of orthoformic acid. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.54, n.7, p.2964-2965, 1932.
- SCHMID, G., HOFHEINZ, W. Total synthesis of Qinghaosu. J. Am. Chem. Soc., Columbus, v.105, n.3, p.624-625, 1983.
- SHIONOGI & Co. N-Substituted 4(1H)-quinolone derivatives. Japan. Pat. JP 15,821 ('66), 1964. 4p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.66, abstr. n.18680u, 1964.

- SHIRLEY, D.A. The synthesis of ketones from acid halides and organometallic compounds of magnesium, zinc, and cadmium. Org. React., New York, v.8, n.2, p.28-58, 1954.
- SINGH, T., STEIN, R.G., HOOPS, J.F., BIEL, J.H., HOYA, W.K., CRUZ, D. Antimalarials 7-chloro-4-(substituted amino) quinolines. J. Med. Chem., Columbus, v.14, n.4, p.283-286, 1971.
- SLATER A.F.G., CERAMI, A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malarial parasites. Nature, London, v.355, n.6356, p.167-169, 1992.
- SMITH, M.B. Organic synthesis. New York: Mc Graw-Hill, 1994. 1595p.
- SMRKOWSKI, L.L., BUCK, R.L., ALCANTARA, A.K., RODRIGUEZ, C.S., UYLANGCO, C.V. Studies of resistance to chloroquine, quinine, amodiaquine and mefloquine among Philippine strains of *Plasmodium falciparum*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.79, n.1, p.37-41, 1985.
- STEINACKER, A., JOULLIÉ, M. Synthesis and properties of fluorine-containing heterocyclic compounds. I. Trifluoromethylquinolines (1). J. Heterocycl. Chem., Odessa, v.2, n.2, p.113-119, 1965.
- STILLE, J.K. Palladium catalyzed coupling of organotin reagents with organic electrophiles. Pure Appl. Chem., Research Triangle Park, v.57, n.12, p.1771-1780, 1985.

- SUEBSAENG, L., WERNSDORFER, W.H., ROONEY, W. Sensitivity to quinine and mefloquine of *Plasmodium falciparum* in Thailand, Bull. W. H. O., Geneva, v.64, n.5, p.759-765, 1986.
- SWEENEY, T.R. The present status of malaria chemotherapy mefloquine, a novel antimalarial. Med. Res. Rev., New York, v.1, n.3, p.281-301, 1981.
- TOROK, D.S., ZIFFER, H. Synthesis and antimalarial activities of N-Azaartemisinins. J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.26, p.5045-5050, 1995b.
- TOROK, D.S., ZIFFER, H. Synthesis and reactions of 11-azaartemisinin and derivatives. Tetrahedron Lett., Oxford, v.36, n.6, p.829-832, 1995a.
- TRAGER, W., JENSEN, J.B. Human malaria in continuous culture. Science, Washington, v.193, n.4254, p.673-675, 1976.
- TRIGG, P.I., KONDRACHINE, A. Commentary: malaria control in the 1990s. Bull. W. H. O., Geneva, v.76, n.1, p.11-16, 1998.
- UHLIG, F., SNYDER, H.R. Polyphosphoric acid as a reagent in organic chemistry. Adv. Org. Chem., Columbus, v.1, n.35, p.35-81, 1960.
- VENUGOPALAN, B., BAPAT, C.P., KARNIK, P.J., CATTERJEE, D.K., IYER, N., LEPCHA, D. Antimalarial activity of novel ring-contracted artemisinin derivatives. J. Med. Chem., Columbus, v.38, n.11, p.1922-1927, 1995.

VOGEL, A.I. Preparation and reactions of aliphatic compounds. In: _____. A text-book of practical organic chemistry, including qualitative organic analysis. London: Longmans, Green, 1948. p.1012.

WALWORTH, B.L. Herbicidal methods employing anilino compounds. U.S. Pat. 3,981,717, 1976. 8p. Apud: Chem. Abstr., Columbus, v.86, abstr. n.1100v, 1977.

WERSDORFER, W.H. The development and spread of drug-resistant malaria. Parasitol. Today, Oxford, v.7, n.11, p.297-303, 1991.

WESCHE, D.L., DECOSTER, M.A., TORTELLA, F.C., BREWER, T.G. Neurotoxicity of artemisinin analogos *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother., Washington, v.38, n.8, p.1813-1819, 1996.

WESTLING, J., YOWELL, A.C., MAJER, P., WERICKSON, J.W., DAME, J.B., DUNN, B.M. *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae*: a comparison of the active site properties of plasmepsins cloned and expressed from three different species of the malaria parasite. Exp. Parasitol., Orlando, v.87, n.3, p.185-193, 1997.

WHITE, N.J. Artemisinin: current status. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., London, v.88, suppl.1, p.3-4, 1994.

WILSON, C.M., SERRANO, A.E., WASLEY, A., BOGENSCHUTS, M.P., SHANKAR, A.H., WIRTH, D.F. Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. Science, Washington, v.244, n.4909, p.1184-1186, 1989.

- WILSON, C.M., VOLKAMAN, S.K., THAITONG, S., MARTIN, R.K., KYLE, D.E. MILHOUS, W.K., WIRTH, D.F. Amplification of *pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. Mol. Biochem Parasitol., Shannon, v.57, n.1, p.151-160, 1993.
- WIN, K., THAN, M., THWE, Y. Partnership between south and north crystallizes around malaria. Bull. W. H. O., Geneva, v.70, n.23, p.777-782, 1992.
- WIRTH, D.F. Malaria: a third world disease in need of first world drug development. Ann. Rep. Med. Chem., San Diego, n.34, cap.33, p.349-358, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria prevention and Control. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/malaria.html>. Acesso em: 20 mai. 2002.
- YADAVALLI, N., HARSHADAS, M., PRALHAD, S. An improved process for the preparation of mefloquine hydrochloride. Indian Ind., Madras, Pat.170916, A 13 JUN 8 pp, 1992. Apud: MEDLINE. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 2 set. 1999.
- YANG, Y.Z., LITTE, B., MESHNICK, S.R. Alkylation of proteins by artemisinin: effects of heme, pH, and drug structure. Biochem. Pharmacol., New York, v.48, n.3, p.569-573, 1994.

-
- YAKAMOTO, Y., YANAGI, A. Studies on organometallic compounds. III. Reaction of trimethylstannylazines with acyl chlorides: a novel C-C bond formation of pyridine nuclei. Chem. Pharm. Bull., Tokyo, v.30, n.6, p.2003-2010, 1982.
- ZHANG, F., GOSSER, D.K., MESHNICK, S.R. Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (Qinghaosu). Biochem. Pharmacol., New York, v.43, n.8, p.1805-1809, 1992.
- ZOUHIRI, F., DESMAËLE, D., D'ANGELO, J., RICHE, C., GAY, F., CICÉRON, L. Artemisinin tricyclic analogos: role of a methyl group at C-5a. Tetrahedron Lett., Oxford, v.39, n.19, p.2969-2972, 1998.