

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Síntese de novas Diidropirimidinonas e Pirrolo[3,4-*d*]-
pirimidinodionas visando compostos com
atividade antiparasitária**

Kamilla Rodrigues Rogerio

2015



UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SÍNTESE DE NOVAS DIIDROPIRIMIDINONAS E PIRROLO[3,4-d]-
PIRIMIDINODIONAS VISANDO COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIPARASITÁRIA**

KAMILLA RODRIGUES ROGERIO

Sob a Orientação do Professor
Cedric Stephan Graebin

e Co-orientação do Professor
Leonardo J. M. Carvalho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica

Seropédica, RJ
2015

541.39

R722s

T

Rogerio, Kamilla Rodrigues, 1991-

Síntese de novas diidropirimidinonas e pirrolo[3,4-d]-pirimidinodinas visando compostos com atividade antiparasitária / Kamilla Rodrigues Rogerio - 2015.

138 f.: il.

Orientador: Cedric Stephan Graebin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 62-67.

1. Reações químicas - Teses. 2. Malária - Teses. 3. Plasmodium falciparum - Teses. 4. Química orgânica - Teses. I. Graebin, Cedric Stephan, 1981-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

KAMILLA RODRIGUES ROGERIO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Curso de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/03/2015

Prof. Dr. Cedric Stephan Graebin – ICE - UFRRJ
(Orientador)

Dr. Leonardo J. M. Carvalho – IOC - Fiocruz
(Co-orientador)

Dra. Núbia Boechat – Farmanguinhos - Fiocruz

Prof. Dr. Mariano Gustavo Zalis – IBCCF - UFRJ

Prof. Dr Marco Edilson Freire de Lima – ICE – UFRRJ (suplente)

“Loucura? Sonho? Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira – mas já tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum.”

(Monteiro Lobato)

“Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

Dedico este trabalho a meu amado avô
Sebastião Rodrigues (*in memoriam*),
que do céu me abençoa, me inspira e
me guia por bons caminhos. Porque o
amor não conhece o limite da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar e guiar meus passos. Pela proteção e inspiração em todos os momentos.

A família pelo amor e apoio durante todos os anos e em todos os momentos. Por todas as orações, confiança, palavras de conforto e de ânimo.

Ao Rodrigo, pelo apoio, compreensão e por me fazer acreditar que tudo daria certo. Por me dar força nos momentos difíceis e não permitir que eu ao menos pensasse em desistir. Obrigado pela amizade, início de tudo, e amor dedicado.

Aos amigos que de perto ou de longe se fizeram presentes, obrigada pela compreensão, apoio, amizade, orações e torcida.

Ao Professor Cedric Graebin, não só pela orientação, mas também pelos conhecimentos compartilhados, apoio, confiança, compreensão, conselhos e pela enorme paciência. Agradeço pela excelente formação como futura pesquisadora e como pessoa, pela grande oportunidade de poder ter desenvolvido este trabalho em conjunto, sem seu apoio ele jamais teria chegado até aqui. Obrigada pela grande pessoa e pelo excelente pesquisador, e orientador, que é.

Ao Pesquisador Leonardo Carvalho, por ter aceitado fazer parte deste trabalho, pelos ensinamentos, disposição em ensinar, pela confiança que a mim foi depositada, apoio e ajuda no desenvolvimento de todo o trabalho.

Ao Dr. Claudio Ribeiro e a Dra Fátima Cruz por terem aberto as portas de seu laboratório para que a realização de parte deste trabalho se tornasse possível.

À Dra Antoniana Krettli por ter aberto seu laboratório, pela excelente recepção e ótimo treinamento oferecido, além da cessão dos anticorpos utilizados. E as meninas, Carol, Julia, Nicolli, Isabela, Tayara e Giovana, do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou, pela ajuda imensurável.

À querida Rosane, pelas discussões enriquecedoras, conhecimento compartilhado, conselhos, por me ouvir e incentivar nos momentos mais complicados, cessão de material e grande ajuda no desenvolvimento desta dissertação. Obrigada pela pessoa que é, por fazer de seus alunos pessoas melhores e pela didática incomparável praticada em suas aulas.

Ao Marco Edilson, pela cessão de reagentes, conhecimento compartilhado, incentivo e pela enorme disposição e boa vontade em ajudar sempre.

Ao professor Aurélio Baird, pelo compartilhamento do laboratório de síntese, disponibilidade e boa vontade.

A professora Áurea Echevarria, pela cessão de reagentes e apoio na reforma do laboratório.

Ao professor Arthur Kummerle, pela cessão de reagentes e sugestões.

À Luiza Domingues, pela ajuda na síntese dos compostos. Agradeço sua dedicação, compromisso, responsabilidade e iniciativa. Sua ajuda durante esses anos de mestrado foi de vital importância, muito obrigada.

Ao Cesare, pelo treinamento inicial em cultivo e pela ajuda durante os experimentos, além das importantes discussões que acrescentaram muito a este trabalho.

À Raquel Curtinhas pela ajuda com a cultura sempre que precisei e a Natália Ketrin pelas ricas discussões que muito agregaram ao trabalho

Aos colegas do laboratório de Pesquisas em Malária, pela ajuda em experimentos, discussões, risadas, incentivo, torcida e pelo convívio agradável no laboratório.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Química da UFRRJ, por compartilharem seus ensinamentos e experiência, pela constante disposição em ajudar e nos fazer crescer como profissionais.

À FAPERJ, CAPES e ao CNPq pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa.

RESUMO

ROGERIO, Kamilla Rodrigues. **Síntese de novas pirrolo [3,4-d]-pirimidinonas visando compostos com atividade antiparasitária**. 2015. 127p Dissertação (Mestrado em química). Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A malária configura-se como a doença negligenciada que mais causa mortes no mundo, tendo poucas opções de tratamento e sendo muitas vezes tóxicas. É vital no atual cenário mundial a busca de novos medicamentos eficazes e de baixa toxicidade para seu tratamento, é neste cenário que surgem as diidropirimidinonas (DHPM) sintetizadas através da reação multicomponente de Biginelli que têm despontado como potenciais candidatos a antimaláricos assim como os compostos bicíclicos sintetizados a partir delas. Destacam-se principalmente por serem reações limpas (não gerando subprodutos), versáteis (variação sistemática de reagentes) e passíveis de automação. Duas famílias de compostos foram sintetizadas através da reação clássica de Biginelli no Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal (LaDMol-QM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e suas atividades foram avaliadas no Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz contra formas sanguíneas de *Plasmodium falciparum* e citotoxicidade em BGM - célula renal basal de macaco verde africano. A rota sintética escolhida se mostrou eficaz gerando produtos com alta pureza e quantidades suficientes para serem levadas para os testes biológicos, estes foram realizados e tiveram como resultado 3 DHPM ativas, não tóxicas com índice de seletividade maior que 10, tornando-se assim protótipos para otimização estrutural afim de melhorar a atividade.

Palavras-chave: Reações multicomponentes, Biginelli, Malária, *Plasmodium falciparum*

ABSTRACT

ROGERIO, Kamilla Rodrigues. **Synthesis of new pyrrolo [3,4-d]-pyrimidinones compounds targeting antiparasitic activity.** 2015. 127p Thesis (Master in Chemistry). Institute of Exact Sciences. Department of Chemistry. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Malaria is characterized as a neglected disease, being responsible for more deaths worldwide than other neglected ones, with few treatment options which are often toxic. The search for new effective antimalarial drugs that present low toxicity is vital in the current world scenario. Heterocycles such as Dihydropyrimidinones (DHPM) synthesized by the Biginelli multicomponent reaction have emerged as potential candidates for antimalarials as well as bicyclic compounds synthesized from them. Those multicomponent reactions stand out mainly for being clean reactions (not generating by-products), versatile (systematic variation of reagents) and susceptible to automation processes. Two families of compounds were synthesized using the classical Biginelli protocol and its activities were evaluated against *Plasmodium falciparum* blood form parasites and its cytotoxicity was tested with Baseline kidney African Green Monkey (BGM) cell culture. The synthetic route chosen was effective, leading to products with high purity and moderate yields. After the pharmacological assays, three (3) DHPM derivatives were identified as active against the parasite, presenting low toxicity and a selectivity index greater than 10, thus becoming potential prototypes structural optimization in order to improve the activity.

Keywords: multicomponent reactions, Biginelli, Malaria, Plasmodium falciparum

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Alcalóide natural com núcleo DHPM (ALVIM, 2013)..... | 1 |
| Figura 2: Gráfico que indica o crescimento em número de publicações contendo a reação de Biginelli nos últimos anos. Fonte: SciFinder | 2 |
| Figura 3: Em (a) o parasito sob a forma de trofozoíto jovem (anel), esquizonte (b), merozoítos saindo de um esquizonte em rompimento (c) e forma sexual do parasito (gametócito) (d) (Fonte: Aatoria própria - Fotos obtidas durante o cultivo do parasito no laboratório..... | 3 |
| Figura 4: Fêmea do mosquito capaz de transmitir a malária (FIOCRUZ)..... | 3 |
| Figura 5: Casos confirmados a cada 1000 habitantes no ano de 2013. (WHO, 2014)..... | 4 |
| Figura 6: Decaimento dos casos de malária até 2013(PINA-COSTA et al, 2014). | 4 |
| Figura 7: Ciclo biológico do <i>Plasmodium falciparum</i> (DANIEL, 2012)..... | 6 |
| Figura 8: Planta de onde o produto natural quinina é extraído (Dos Santos, 2012)..... | 7 |
| Figura 9: Estrutura química dos principais antimaláricos quinolínicos e análogos (LEITE, 2013; DOS SANTOS, 2012) | 8 |
| Figura 10 : Artemisinina (9) e alguns de seus derivados semi-sintéticos: o artesunato (10) e artemeter (11) | 9 |
| Figura 11: Planta de onde é extraída a artemisinina..... | 9 |
| Figura 12: Principais antifolatos utilizados no tratamento de malária | 10 |
| Figura 13: Antibióticos usados no tratamento de malária | 11 |
| Figura 14: (a) Reação clássica de Strecker, (b) Reação clássica de Hantzsch, (c) Reação clássica de Biginelli, (d) Reação clássica de Mannich, (e) Reação clássica de Passerini e (f) Reação clássica de Ugi (KURTI & CZAKÓ, 2005). | 14 |
| Figura 15: Algumas DHPM com atividades farmacológicas relatadas na literatura..... | 17 |
| Figura 16: Planejamento experimental de síntese | 18 |
| Figura 17: Reações realizadas em vials com tampa de rosca sob aquecimento. | 23 |
| Figura 18: (a) troca do meio de cultura, (b) esfregaço sanguíneo, (c) coloração por Giemsa, (d) kit de panótipo rápido e (e) leitura da lâmina em microscópio. (Fonte: autoria própria). .. | 44 |
| Figura 19: Preparo de placa para teste..... | 45 |
| Figura 20: Placa após a adição de TMB (coloração azul) e placa após adição de ácido sulfúrico (coloração amarela) | 46 |
| Figura 21: Ensaio de MTT | 47 |
| Figura 22: Compostos inéditos sintetizados neste trabalho..... | 48 |
| Figura 23: Espectro COSY que mostra o acomplamento entre N-H e o hidrogênio enantiotópico do composto 28h (evidenciado na figura)..... | 52 |
| Figura 24: Proposta de mecanismo para síntese das pirrolo[3,4-d]-pirimidinodionas..... | 53 |
| Figura 25: Curvas dose-resposta de (a) composto ativo abaixo de 10µM, (b) composto ativo entre 10 e 50 µM, (c) composto não ativo abaixo de 50µM e (d) composto controle | 55 |
| Figura 26: Compostos sintetizados com resultados promissores para futuras otimizações | 59 |
| Figura 27: Semelhanças estruturais existentes | 60 |

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

DNDi – Drogas para doenças negligenciadas (do inglês *Drug for Neglected Disease initiative*)
OMS / WHO - Organização Mundial de Saúde / *World Health Organization*
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
MS- Ministério da Saúde
DHFR - diidrofolato redutase
DHPS - diidropteroato sintase
DHPM – Diidropirimidinonas
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
CH₃CN- acetonitrila
TFA – ácido trifluoracético
SBF – soro fetal bovino
BGM - célula renal basal de macaco verde africano
DMSO – dimetilsulfóxido
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-Il)-2,5-difeniltetrazólio
IS – Índice de seletividade
MDL₅₀ – mínima dose que causa 50% de letalidade
IC₅₀ – concentração que causa 50% de inibição
ELISA – ensaio de imunoadsorção ligado a enzimas (do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
HRPII – Proteína rica em histidine II (do inglês *Histidine-rich protein II*)
PBS – Tampão de Fosfato e salina
PBS-T – Tampão de Fosfato e salina com Tween 20 à 0,05%
RPMI – Meio de Cultura (*Roswell Park Memorial Institute*)
IPA - incidência parasitária anual
RMC- reações multicomponente
RMN – ressonância magnética nuclear
FT-IV- infravermelho com Transformações de Fourier

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 | Doenças Negligenciadas e Malária..... | 3 |
| 2.1.1 | Malária no Brasil..... | 4 |
| 2.1.2 | Ciclo biológico do parasito..... | 5 |
| 2.1.3 | Aspectos clínicos..... | 6 |
| 2.1.4 | Principais antimaláricos..... | 6 |
| 2.1.4. | Principais mecanismos de ação..... | 11 |
| 2.1.6 | Resistência do <i>Plasmodium falciparum</i> aos antimaláricos..... | 12 |
| 2.2 | Reações Multicomponentes (RMC)..... | 12 |
| 2.2.1 | Reação de Biginelli..... | 15 |
| 2.3 | DHPM - Monastrol..... | 16 |
| 3 | OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS..... | 18 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 18 |
| 3.2 | Objetivos Específicos..... | 18 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 20 |
| 4.1 | Síntese dos Compostos Planejados..... | 20 |
| 4.1.1 | 1,4-diidropirimidi-2-onas (DHPM)..... | 20 |
| 4.1.2 | Síntese das pirrolo[3,4-d]-pirimidinodionas..... | 20 |
| 4.2 | Elucidação Estrutural..... | 21 |
| 4.3 | Ponto de fusão..... | 21 |
| 4.4 | Confirmação da Pureza dos Compostos..... | 21 |
| 4.5 | Teste antiplasmodial <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> | 21 |
| 4.6 | Ensaio <i>in vitro</i> de Citotoxicidade..... | 22 |
| 4.7 | Índice de Seletividade..... | 22 |
| 5 | EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 5.1 | Metodologia geral de síntese das DHPM..... | 23 |
| 5.2 | Metodologia geral de síntese das pirrolo[3,4-d]-pirimidinodionas..... | 23 |
| 5.3 | Elucidação estrutural e pureza dos compostos..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 5.4 Metodologia geral do teste <i>in vitro</i> antiplasmodial e de citotoxicidade | 43 |
| 5.4.1 Cultivo contínuo do <i>Plasmodium falciparum</i> | 43 |
| 5.4.2 Sincronização do cultivo | 44 |
| 5.4.3 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia..... | 45 |
| 5.4.4 Preparo das placas para teste imunoenzimático anti-HRP2 | 45 |
| 5.4.5 Teste imunoenzimático anti-HRP2..... | 45 |
| 5.4.6 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC ₅₀) | 46 |
| 5.4.7 Cultivo de linhagens celulares..... | 46 |
| 5.4.8 Preparo das placas para o ensaio de citotoxicidade..... | 46 |
| 5.4.9 Ensaio de citotoxicidade utilizando o MTT | 47 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 6.1 Síntese..... | 48 |
| 6.2 Elucidação estrutural..... | 50 |
| 6.3 Avaliação da atividade antiplasmodial e citotoxicidade dos compostos | 55 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 61 |
| 8 PERSPECTIVAS | 61 |
| 9 BIBLIOGRAFIA..... | 62 |
| 10 ANEXOS..... | 68 |

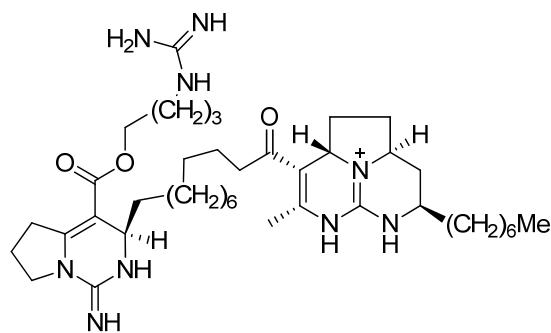
1_INTRODUÇÃO

A malária é uma doença dita negligenciada devido à falta de investimento por parte da indústria farmacêutica mundial em novas alternativas necessárias para o controle das mesma (GRAEBIN, 2009).

Segundo a *Drug for Neglected Disease initiative* (DNDi)(2009): 40% da população mundial corre o risco de contrair malária. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) por ano cerca de 700 mil pessoas chegam a óbito por causa da malária, porém essa distribuição não é homogênea pelo mundo. Aproximadamente 90% das mortes ocorrem no continente africano e 4% no sudeste da Ásia (LEITE *et al*, 2013; AGUIAR, *et al* 2012). Hoje no mundo a investigação de novos fármacos não tem como foco principal as doenças de países em desenvolvimento (MAGALHÃES, 2010).

As diidropirimidinonas (DHPM) despontaram como sistemas *N*-heterocíclicos que possuem diversas propriedades, podendo-se destacar: atividade antiviral (KIM *et al*, 2012), anticancerígena (RAJU *et al*, 2011), antifúngica (Singh *et al*, 2008), entre outras. Além disto, alguns derivados de DHPMs são constituintes do alcaloide marinho natural Batzelladina A ((1) (Figura 1)), capaz de inibir a associação da glicoproteína de membrana do HIV (gp-120) com a células humanas CD4, possuindo assim, capacidade terapêutica antiviral (ALVIM, 2013, KUMAR *et al*, 1995). A classe de Batzelladinas pode ser também obtida através de síntese total, onde a construção do núcleo diidropirimidinona do alcaloide é feito através de uma variação de Biginelli (OVERMAN & ARON, 2003).

O interesse nas reações de Biginelli aumentou significativamente devido à descoberta da possibilidade de geração de moléculas com importantes atividades biológicas, como pode ser observado no gráfico (Figura 2) feito na base de dados Scopus utilizando a palavra chave “Biginelli reaction” no título ou abstract¹.



Batzelladina A
(1)

Figura 1: Alcalóide natural com núcleo DHPM (ALVIM, 2013).

¹ Pesquisa realizada em 04/02/15 em www.scopus.com

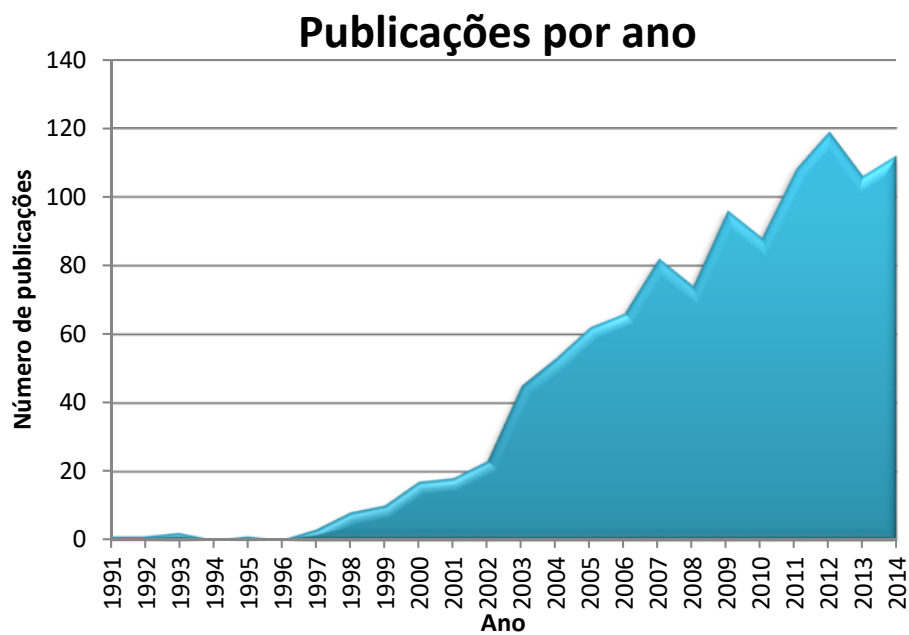


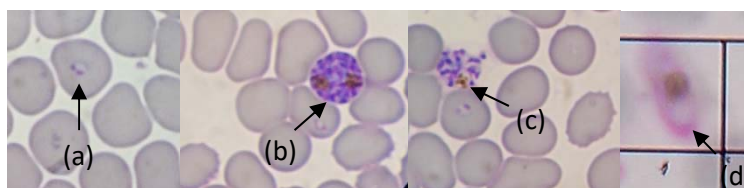
Figura 2: Gráfico que indica o crescimento em número de publicações contendo a reação de Biginelli nos últimos anos. Fonte: SciFinder

Diante do atual cenário mundial torna-se de extrema importância a pesquisa de novos fármacos no tratamento de doenças negligenciadas e a reação de Biginelli tem se mostrado uma ferramenta útil e essencial nessa busca.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças Negligenciadas e Malária

A malária é considerada ainda hoje como a mais importante endemia parasitária do mundo. É uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* (**Figura 3**), transmitida por vetores, ou seja, pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (**Figura 4**). Caso não seja tratada de forma adequada e rápida, a malária humana pode se tornar grave e acarretar a morte do paciente (COURA, 2013).



Plasmodium falciparum

Figura 3: Em (a) o parasito sob a forma de trofozoíto jovem (anel), esquizonte (b), merozoítos saindo de um esquizonte em rompimento (c) e forma sexual do parasito (gametócito) (d) (Fonte: Autoria própria - Fotos obtidas durante o cultivo do parasito no laboratório)



Anopheles

Figura 4: Fêmea do mosquito capaz de transmitir a malária (FIOCRUZ)

A doença é considerada endêmica em 104 países. A África é o continente mais afetado, concentrando 90% das mortes e o restante espalhados entre o mediterrâneo, o sudeste asiático e os países amazônicos da América do Sul. Cerca de 3,3 bilhões de pessoas, quase metade da população mundial, está exposta à transmissão da malária em áreas de risco. Aproximadamente 700 mil pessoas morrem vítimas da malária todos os anos (WHO, 2014).

2.1.1 Malária no Brasil

No Brasil a malária figura com uma das principais doenças parasitárias (TEIXEIRA, 2011). Segundo dados divulgados através do “World Malaria Report 2014” registraram-se 177.767 casos de malária com 41 mortes no ano de 2013. A grande maioria dos casos de transmissão da doença se concentrou na Região Amazônica, considerada uma área endêmica no país, estando a maior parte dos casos notificados nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá e Roraima como pode ser visto na **Figura 5**.



Figura 5: Casos confirmados a cada 1000 habitantes no ano de 2013. (WHO, 2014).

O Brasil possui um sistema eficaz no controle de malária com ampla oferta de diagnóstico e tratamentos gratuitos realizados pelo sistema único de saúde (SUS), o que condiz com a queda no número de casos nos últimos anos como pode ser observado na **Figura 6**, principalmente no que diz respeito ao *P. falciparum* (PINA-COSTA *et al*, 2014).

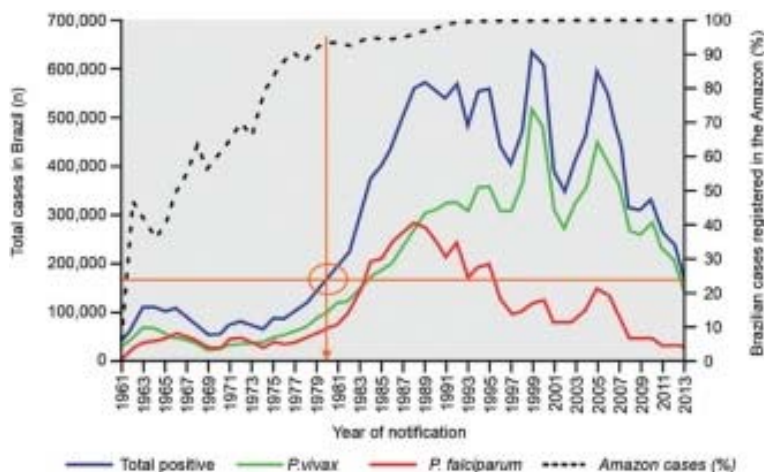


Figura 6: Decaimento dos casos de malária até 2013(PINA-COSTA *et al*, 2014).

As espécies de *Plasmodium* que são capazes de infectar o homem, até 2008, eram quatro: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. No ano de 2008 foi descrita a possibilidade de infecção humana por uma quinta espécie: o *P. knowlesi*, um plasmódio de macacos (COX-SINGH *et al*, 2008).

No Brasil, a malária é causada por três espécies de *Plasmodium*: *P. vivax* (que responde por cerca de 83% dos casos registrados), o *P. falciparum* (que causa cerca de 16% dos casos) e *P. malariae* (uma pequena proporção de casos). Não ocorrendo transmissão por *P. ovale* e *P. knowlesi* (OLIVEIRA-FERREIRA *et al*, 2010).

Alguns casos ocorrem também fora da área de transmissão ativa e tem características muito específicas. No Rio de Janeiro que é a cidade mais visitada do Brasil, casa de 20% dos brasileiros que viajam ao exterior, e também é sede da Fundação Oswaldo Cruz e do CPD-Mal (Centro de Referência da Malária na Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde), 1505 casos foram descritos entre 1990 e 2008, uma média de 79 casos por ano. Em virtude disso espera-se então que os casos diagnosticados na cidade sejam oriundos da Amazônia ou da África. No entanto, apesar de o Rio de Janeiro não ser considerado área endêmica de malária, dos 29 casos relatados entre 2001-2008, 30% foram autóctones, sendo originados do município de Nova Friburgo. (OLIVEIRA-FERREIRA *et al*, 2010).

2.1.2 Ciclo biológico do parasito

A primeira proposta de que o agente responsável pelos sintomas causados pela malária seria um parasito ocorreu em 1846, porém somente em 1880 foram observados pela primeira vez parasitos vivos, encontrados no sangue de um soldado infectado pela malária. O responsável por esta observação foi Charles Louis Alphonse Laveran, que fez também a descoberta das quatro formas do parasito: anel, trofozoíto, esquizonte e gametócito. Anos depois, em 1897, William George MacCallum e Eugene L. Opie encontraram pela primeira vez o parasito no estômago de mosquitos anofelinos (FRANÇA *et al*, 2008).

O ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* é bastante complexo em virtude de se dividir em várias fases e entre dois hospedeiros: o mosquito e um vertebrado. A infecção tem início com a picada de um mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectada, ao se alimentar do sangue suas glândulas salivares liberam esporozoítos na pele ((a), Figura 7) e que depois de invadirem a corrente sanguínea rapidamente invadem as células do fígado iniciando assim a infecção. Já nas células do fígado os esporozoítos vão sofrer diferenciação e se multiplicar assexuadamente dando origem a milhares de merozoítos ((b) Figura 7) que invadem eritrócitos e continuam se multiplicando. É nesta fase que se manifestam os sintomas da malária. A duração do estágio eritrocítico vai variar de acordo com a espécie, sendo de 72 h para o *P. malariae* e de 48h para os *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (COURA, 2013; FRANÇA *et al*, 2008; CUNICO *et al*, 2008).

Nem todos os merozoítos vão se reproduzir de forma assexuada, alguns deles se desenvolvem em gametócitos ((c) Figura 7) (formas sexuais) que serão aspirados quando houver outra picada de *Anopheles* infectando assim outro mosquito e dando início ao seu ciclo sexual no estômago do mosquito. Outros ainda (no caso de *P. vivax* e *P. ovale*) evoluem para hipnozoítos, forma latente do parasito, cuja reativação é responsável pelas chamadas recaídas da doença (COURA, 2013; FRANÇA *et al*, 2008; CUNICO *et al*, 2008).

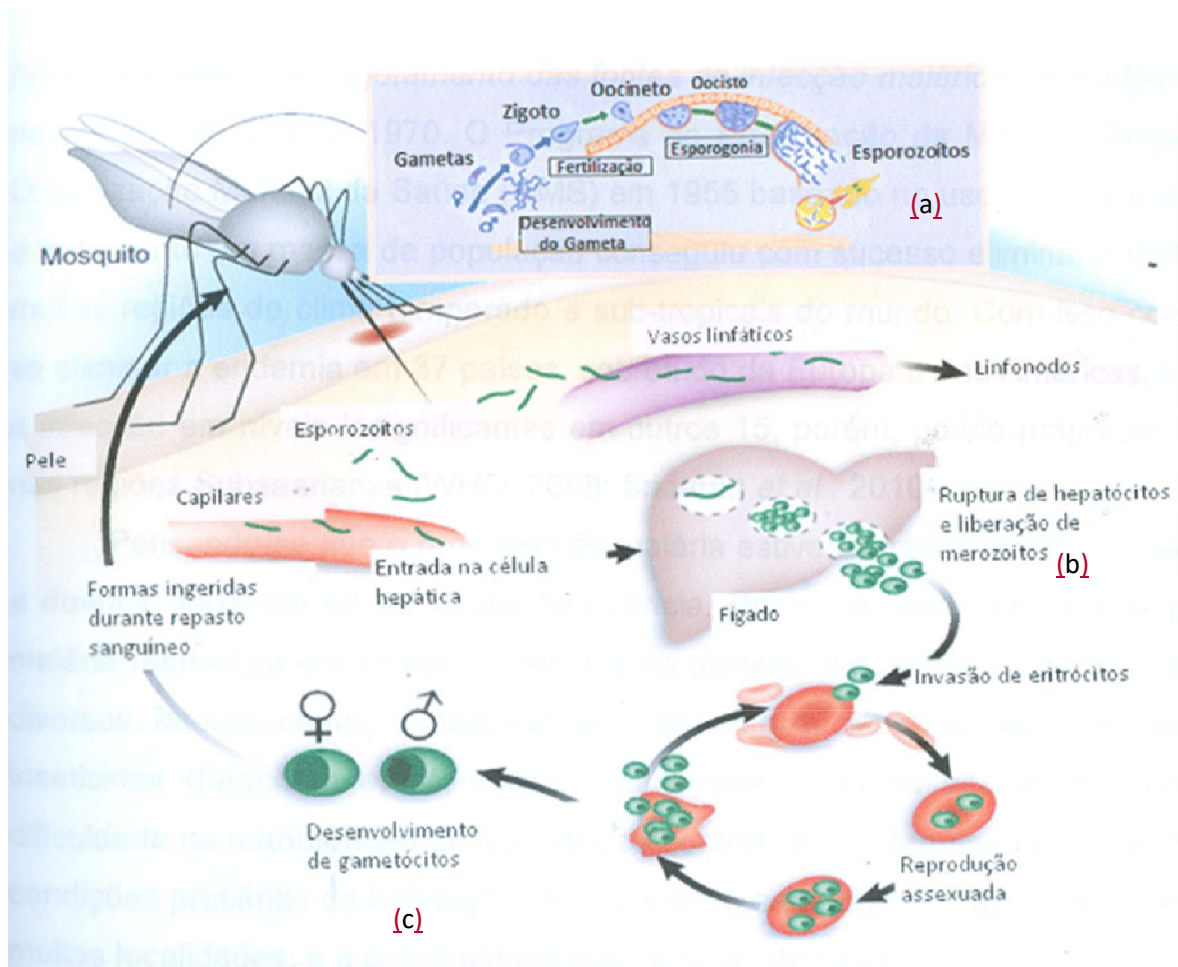


Figura 7: Ciclo biológico do *Plasmodium falciparum* (DANIEL, 2012).

2.1.3 Aspectos clínicos

Os sintomas iniciais da malária são semelhantes aos de qualquer infecção viral leve, sendo às vezes motivo para confundir o diagnóstico inicial, dentre eles: mal estar, febre, cefaleia, diarreia e vômito. A febre e calafrios são associados com a ruptura sincronizada dos eritrócitos infectados. Caso não seja realizado o tratamento adequado, o paciente pode apresentar graves complicações, como edema pulmonar, complicações renais, icterícia e obstrução de vasos sanguíneos no cérebro, acarretando até a morte. O principal causador da malária grave ou maligna é o *P. falciparum*, sendo o responsável pelas formas cerebral, renal e pulmonar da doença (BAIO, 2011; FRANÇA *et al*,2008).

2.1.4 Principais antimaláricos

Os fármacos utilizados para o tratamento da malária podem ser divididos em: quinolínicos e análogos, antifolatos, endoperóxidos e antibióticos (LEITE *et al*, 2013).

2.1.4.1 Quinolínicos e análogos

As aminoquinolinas pertencem ao grupo de fármacos capazes de interferir no metabolismo da glicose em diferentes pontos e na habilidade do parasito em se alimentar

(digerir a hemoglobina) ou intoxicando-o com o produto da sua digestão, a ferriprotoporfirina-IX. Estes compostos são ativos contra formas eritrocíticas do *Plasmodium falciparum* e do *Plasmodium vivax* (FRANÇA *et al*, 2008).

O antimalárico mais antigo pertence à classe dos quinolínicos e tem seu uso iniciado em 1640, quando Huan Del Vego utilizou a casca de Cinchona para tratar a malária pela primeira vez (BAIO 2011). Posteriormente descobriu-se que o composto ativo presente na casca da Cinchona (**Figura 8**) é o alcalóide natural quinina ((**2**) **Figura 9**). Utilizado por muito tempo, a quinina teve seu uso diminuído devido ao surgimento de cepas resistentes.



Cinchona officinalis

Figura 8: Planta de onde o produto natural quinina é extraído (Dos Santos, 2012).

Durante a segunda guerra mundial houve grande dificuldade em se obter extrato de *Cinchona* (devido à invasão da ilha de Java pelo exército japonês), incentivando assim a obtenção por via sintética de outros fármacos capazes de tratar a malária (CUNICO *et al*, 2008).

A cloroquina ((**3**) **Figura 9**) é um dos fármacos sintéticos mais eficazes. Sintetizada na década de 30 por alemães, apresenta baixo custo em sua produção, é bem tolerada pelo organismo, sendo inclusive considerada segura no tratamento de mulheres grávidas, sem apresentar efeitos tóxicos nas doses recomendadas para tratamento e extremamente eficaz na cura da doença, sendo assim por muito tempo eleita como medicamento de primeira escolha até o surgimento de cepas resistentes. Atua na fase esquizonte do ciclo do *Plasmodium*. Infelizmente atualmente a resistência existe em todos os países endêmicos, com exceções apenas de alguns da América central. Seu mecanismo de ação é semelhante ao da quinina (CUNICO *et al*, 2008; FRANÇA *et al*, 2008).

Utilizada no tratamento da malária causada por cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, a mefloquina ((**4**) **Figura 9**) precisa apenas de um décimo da dose recomendada de quinina para o tratamento. Porém apresenta alguns efeitos colaterais: complicações gastrointestinais, tonturas e efeitos psicológicos, não podendo ser utilizada no tratamento de pacientes com histórico de epilepsia ou desordens psiquiátricas. Já existem relatos de cepas resistentes (CUNICO *et al*, 2008; FRANÇA *et al*, 2008).

A amodiaquina ((**5**) **Figura 9**) tem sido uma alternativa para o tratamento de malária causada por *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina, porém é menos efetiva e mais tóxica do que esta (FRANÇA *et al*, 2008).

A Pamaquina e a primaquina ((**6**) e (**7**) **Figura 9**) são 8-aminoquinolinas eficazes contra os estágios sexuais do parasito, constituindo a única classe gametocida de fármacos.

A pamaquina é o mais antigo antimalárico da classe tendo sido sintetizada na década de 1920 na Alemanha. A primaquina é utilizada amplamente contra hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*. É a mais utilizada do grupo, porém em geral não é administrada sozinha, sendo co-administrada com um fármaco esquizotônico (FRANÇA *et al*, 2008).

A lumefantrina ((8) **Figura 9**) foi sintetizada na China e apresenta uma alta similaridade estrutural, físico- química e de mecanismo de ação com a mefloquina. Tem sido muito utilizada em associação com o artemeter é uma importante e muito utilizada associação conhecida como (“Coartem”). O elevado custo da produção da lumefantrina limita seu uso (VAROTTI, 2008).

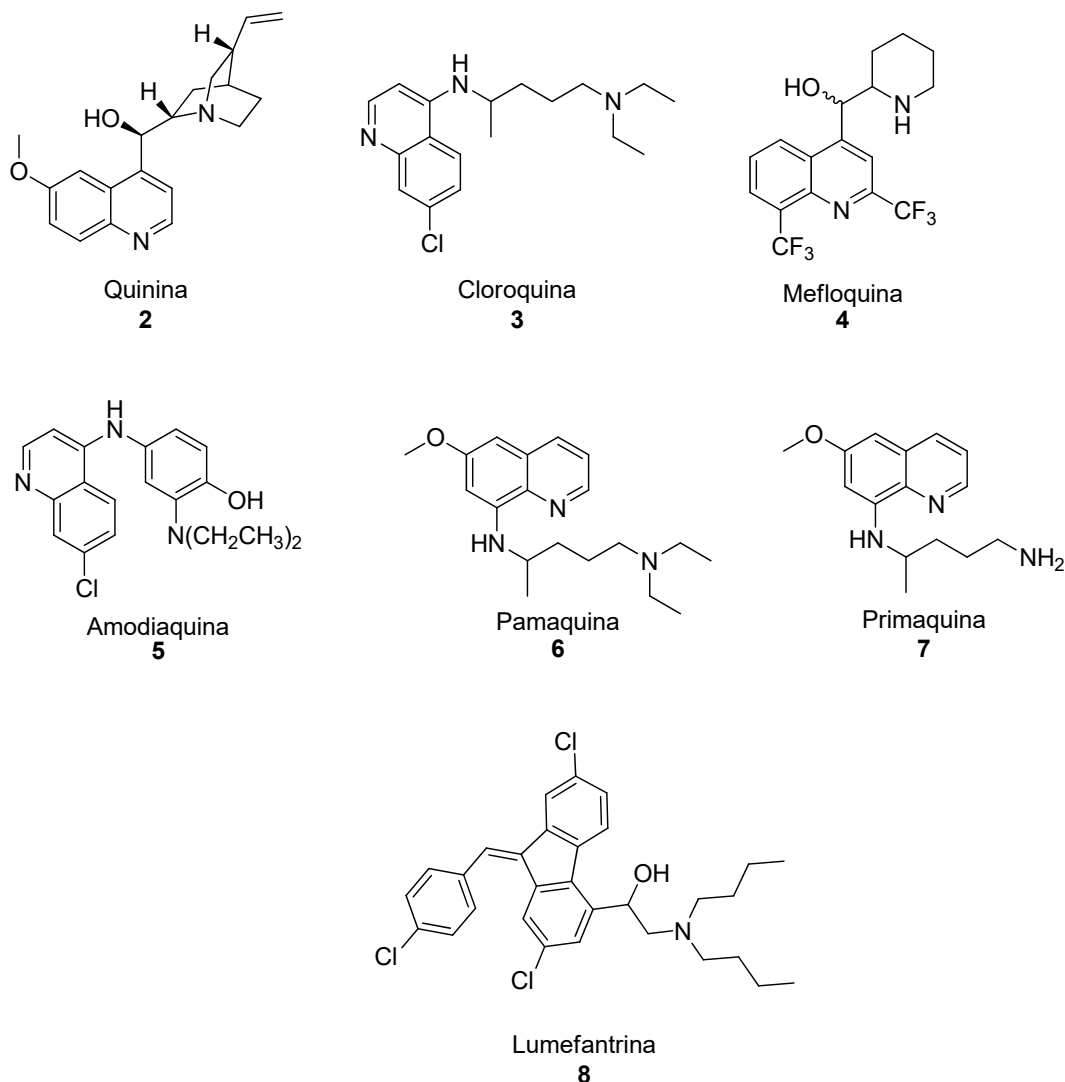


Figura 9: Estrutura química dos principais antimaláricos quinolínicos e análogos (LEITE, 2013; DOS SANTOS, 2012)

2.1.4.2 Endoperóxidos

A artemisinina ((9) **Figura 10**) é um produto natural encontrado em uma árvore chinesa chamada “qinghao su” (*Artemisia annua*) (**Figura 11**) (WHO, 2006). Dos medicamentos disponíveis para o tratamento de malária a artemisinina tem um papel de destaque porque a resistência dos plasmódios não tem uma relevância clínica considerável,

por ser o mais rápido na eliminação dos parasitos, sendo indicado nos casos de malária grave. Relatos de resistência de *P. falciparum* aos derivados da artemisinina são recentes e trazem grande preocupação. É utilizada em combinação com outros antimaláricos e alguns casos de resistência começaram a surgir. Dos derivados semi-sintéticos provenientes da artemisina, sem dúvida os mais importantes são o artesunato ((10) **Figura 10**) por possuir rápida atividade antimalárica, ausência de resistência clínica importante e por ser solúvel em água o que facilita o desenvolvimento de formulações e o artemeter ((11) **Figura 10**) muito utilizado em combinações (AQUINO, 2010).

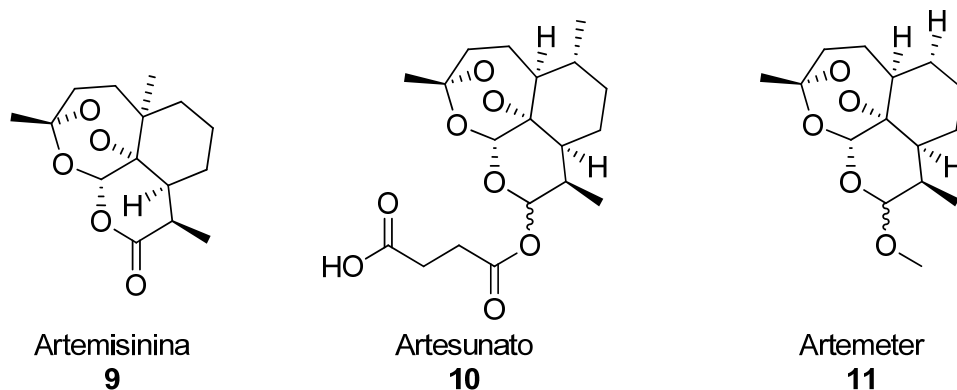


Figura 10 :Artemisinina (9) e alguns de seus derivados semi-sintéticos: o artesunato (10) e artemeter (11)



Artemisia annua

Figura 11: Planta de onde é extraída a artemisinina

2.1.4.3 Antifolatos

São excelentes esquizotomicidas no sangue, alguns apresentam elevada toxicidade para o homem e tem pouca tolerância oral. Podem ser usados para o tratamento de diversas doenças, como o câncer (GANGJEE *et al*, 2006). Os antifolatos podem agir em dois momentos da síntese do ácido fólico: inibindo a diidropteroato sintase causando a interrupção da formação do ácido diidrofolico, como é o caso da sulfadoxina ((12) **Figura 12**) e da dapsona ((13) **Figura 12**); ou inibindo a diidrofolato redutase impedindo assim a conversão do ácido diidrofolico em tetraidrofolato, importante cofator na síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos, a pirimetamina ((14) **Figura 12**) é um dos mais importantes representantes do grupo juntamente com o proguanil ((15) **Figura 12**) que é um pró-fármaco que é

metabolizado em cicloguanil ((**16**) **Figura 12**), importante na profilaxia por ser pouco tóxico e por agir destruindo parasitos durante a passagem para a corrente sanguínea antes que invadam as hemácias. Infelizmente hoje são pouco utilizados devido a facilidade dos parasitos em desenvolverem resistência a esta classe de medicamentos (LEITE, 2013; FRANÇA *et al*, 2008; CUNICO *et al*, 2008).

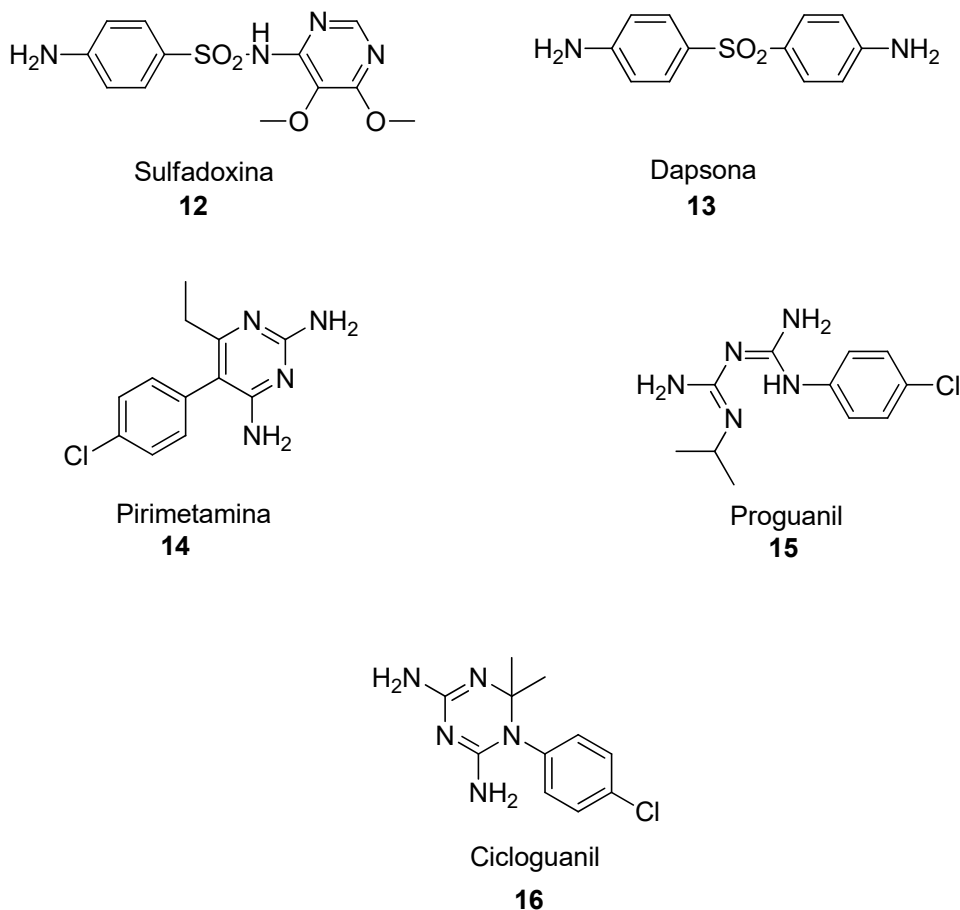


Figura 12: Principais antifolatos utilizados no tratamento de malária

2.1.4.5 Antibióticos

Atuam dentro no apicoplasto, organela indispensável para sobrevivência do parasito, onde inibem a tradução de proteínas resultando na morte da descendência dos parasitos tratados com antibióticos, o atraso na resposta a perturbação causada na organela é conhecida como “morte retardada”. O apicoplasto é um importante alvo terapêutico e já é relatado na literatura que parasitos mutantes sem esta organela não são viáveis (GREEWOOD *et al*, 2008; RALPH *et al*, 2004). Os principais antibióticos utilizados no tratamento da malária são a tetraciclina e a doxiciclina ((**17**) e (**18**) **Figura 14**) (LEITE *et al*, 2013).

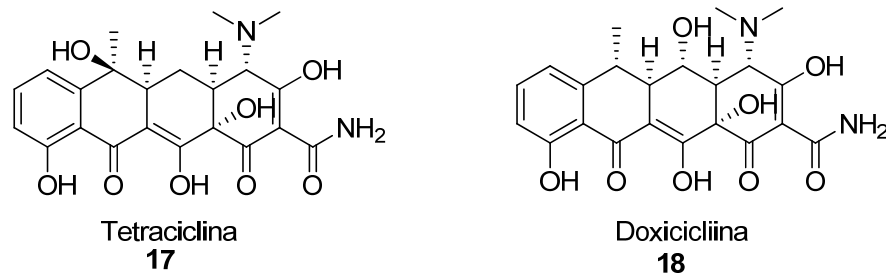


Figura 13: Antibióticos usados no tratamento de malária

2.1.4.6 Combinações de antimaláricos

Devido aos relatos de resistência aos antimaláricos, atualmente a indicação da OMS é a combinação de pelo menos dois fármacos que tenham diferentes mecanismos de ação, assim como diferentes alvos biológicos, afim de que seja retardado o desenvolvimento de resistência a cada fármaco separadamente. As sugestões são artemeter e lumefantrina (AL), artesunato e amodiaquina (AS+AQ), artesunato e sulfadoxina-pirimetamina (AS+SP) e artesunato e mefloquina (AS+MQ), sendo o último a combinação mais usada atualmente. Sua utilização acelera a resposta terapêutica, evita o surgimento de resistência, assim como a recrudescência. (ANGUS *et al*, 2002; WHO, 2010).

No Brasil o Ministério da Saúde institui uma política nacional de tratamento de malária que disponibiliza gratuitamente os medicamentos usados no país nas unidades do Sistema Único de Saúde (SUS) (LEITE *et al*, 2013).

2.1.4. Principais mecanismos de ação

2.1.5.1 Inibidores da ação da hemozoína

A degradação da hemoglobina humana é o que fornece ao parasito dentro da hemácia os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e posterior reprodução. Durante esse processo há a liberação do grupo heme que é extremamente tóxico ao parasito, já que gera espécies reativas de oxigênio, por isto o grupo heme é agregado em um pigmento insolúvel e que não apresenta toxicidade para o mesmo: a hemozoína (CUNICO *et al*, 2008).

Alguns antimaláricos agem de maneira a impedir essa polimerização da hemozoína, intoxicando assim o parasito. Dentre eles estão os derivados quinolínicos. Já os derivados de artemisinina sofrem clivagem oxido-redutiva de seus peróxidos que vão interagir também com o grupo heme que gerará um radical livre que mata o parasito (CUNICO *et al*, 2008).

2.1.5.2 Inibidores da síntese do ácido fólico

Diferente do homem que obtém o ácido fólico através de sua alimentação, o plasmódio é capaz de sintetiza-lo e para isto eles fazem uso de derivados dos ácidos *p*-aminobenzóicos em uma etapa inicial e os fármacos análogos a estes ácidos atuam inibindo a síntese já que competem pelo sítio ativo da enzima diidropteroato sintase responsável pela síntese. Um fármaco importante atuante nesta etapa é a sulfadoxina, numa etapa posterior de síntese atua a

enzima diidrofolato redutase e é nesta etapa que a pirimetamina age inibindo a síntese (CUNICO *et al*, 2008).

2.1.5.3. Inibição da síntese de proteínas no apicoplasto

A real função do apicoplasto ainda não está totalmente definida, mas se sabe que é uma organela indispensável à sobrevivência do parasito. A exata causa da morte do parasito quando as funções do apicoplasto são interrompidas ainda é desconhecida, o que se sabe é que ela é indispensável para a viabilidade de uma infecção já que qualquer perturbação faz com que o crescimento do parasito continue normalmente, porém novas invasões da célula hospedeira (essenciais para a continuação do ciclo) resultem na morte do parasito (RALPH *et al*, 2004).

2.1.6 Resistência do *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos

“A resistência aos antimaláricos é definida como a habilidade que tem uma cepa do parasito, para sobreviver e/ ou se multiplicar apesar de a administração e absorção de um medicamento em doses iguais ou superiores às usualmente recomendadas, dentro dos limites de tolerância do indivíduo” (COURA, 2013; CARVALHO, 2008).

A resistência do *Plasmodium* pode acontecer de três formas distintas: independente dos medicamentos através de mutações, embora seja um evento raro; através de modificações no sítio alvo do medicamento, este é o caso da resistência a pirimetamina que é justificada por uma mutação pontual do gene que codifica a diidrofolato redutase (DHFR) que altera a forma do sítio da ligação enzimática e deixa o sítio mais específico ao PABA e das sulfas onde a mutação do gene que codifica a diidropteroato sintase (DHPS) ocorre; e modificação nos mecanismos celulares que afetem a concentração intraparasitária, como é o caso da mutação que ocorre no gene que codifica um transportador no vacúolo digestivo do parasito e o torna resistente a cloroquina (COURA, 2013; CUNICO *et al*, 2008).

Independente do mecanismo de surgimento da resistência nos parasitos o fato é que a exposição a doses não letais de fármacos faz com que sejam selecionados os parasitos que sejam capazes de crescer naquela dosagem, o que implica diretamente em uma probabilidade maior da transmissão dos parasitos mais resistentes que causaria a disseminação de uma cepa resistente (COURA, 2013). Esta é uma das maiores causas da falha dos esforços para controle da malária em muitos países, somado a virulência do *Plasmodium falciparum* faz com que se caracterize como uma grave ameaça a saúde pública global (PINHEIRO *et al*, 2013).

Por conta do fracasso nos programas de controle de vetores e da propagação da resistência aos antimaláricos, ainda existe uma expansão da malária pelo mundo. Os medicamentos existentes muitas vezes são tóxicos, de eficácia insatisfatória e algumas vezes permitem recaída (devido aos hipnozoítas). Sendo assim a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos é hoje um dos maiores desafios no controle de malária (PINHEIRO *et al*, 2013).

2.2 Reações Multicomponentes (RMC)

Atualmente a idealidade de uma síntese não é vinculada apenas a bons rendimentos e pureza de produto final. Com o desenvolvimento da química verde, hoje relaciona-se também os fatores ambientais. Tendo em vista a necessidade dos processos químicos tornarem-se mais

benignos em relação ao meio ambiente, as reações multicomponentes têm sido vistas como um dos pontos fundamentais do que seria uma “síntese ideal”, pelo fato destas reações apresentarem número reduzido de etapas, gerarem menos resíduos (fator ambiental) e terem uma maior eficiência (fator econômico) (ROCHA *et al*, 2008).

Um dos princípios mais relevantes da química verde é diretamente relacionado a alta eficiência de síntese, que se reflete na importante economia atômica que o uso das RMCs proporciona. A porcentagem desta economia pode ser calculada levando-se em consideração a massa molar do produto desejado na reação e a soma das massas molares de todos os reagentes envolvidos na síntese, como pode ser visto na equação (ANASTAS *et al*, 1998)

$$\% \text{ de economia atômica} = (\text{Massa molar do produto} / \text{soma da massa molar dos reagentes utilizados}) \times 100$$

As RMC são reações que partem de três ou mais reagentes, de modo a se obter um produto final que, de preferência, contenha todos ou a maior parte dos átomos de carbono envolvidos em sua formação (BATALHA, 2012). Possuem uma alta economia atômica já que, com exceção das moléculas de água que são eliminadas, todos os átomos dos reagentes se encontram no produto final.

Por serem bastante flexíveis permitem a geração de moléculas contendo uma variedade de grupos funcionais, assim como a criação de uma coleção de estruturas (quimioteca) através de uma variação sistemática de reagentes, possibilitando produzir bibliotecas de moléculas diversificadas e estruturalmente distintas em poucas etapas sintéticas, as quais podem apresentar atividade biológica ou serem modificadas para tal fim. (SENA, 2012)

No âmbito da química orgânica, as reações representam processos mais limpos, já que são reações mais simples, feitas em um único recipiente e que em alguns casos ainda se enquadram em outros conceitos de química verde. No âmbito medicinal representam um grande potencial na pesquisa de novos candidatos a fármacos já que é possível obter desde compostos simples até compostos de grande complexidade estrutural, em poucas etapas de síntese (BATALHA, 2012).

A evolução das RMCs pode ser vista na literatura científica a partir de 1850 com a publicação da reação de Strecker ((**a**) **Figura 14**) (STRECKER,1850). A partir de 1882 outras importantes reações foram reportadas como as de Hantzsch ((**b**) **Figura 14**) (HANTZSCH, 1882), Biginelli ((**c**) **Figura 14**) (BIGINELLI,1893), Mannich ((**d**) **Figura 14**) (MANNICH, 1917), Passerini ((**e**) **Figura 14**) (PASSERINI, 1921), Ugi ((**f**) **Figura 14**) (UGI,1959), entre outros. Por muitos anos elas permaneceram inexploradas devido à falta de interesse comercial em relação a seus produtos de síntese. A descoberta de importantes atividades biológicas de produtos gerados a partir dessas reações, somado a suas vantagens sobre a síntese linear fez com que o estudo das mesmas entrasse em expansão.

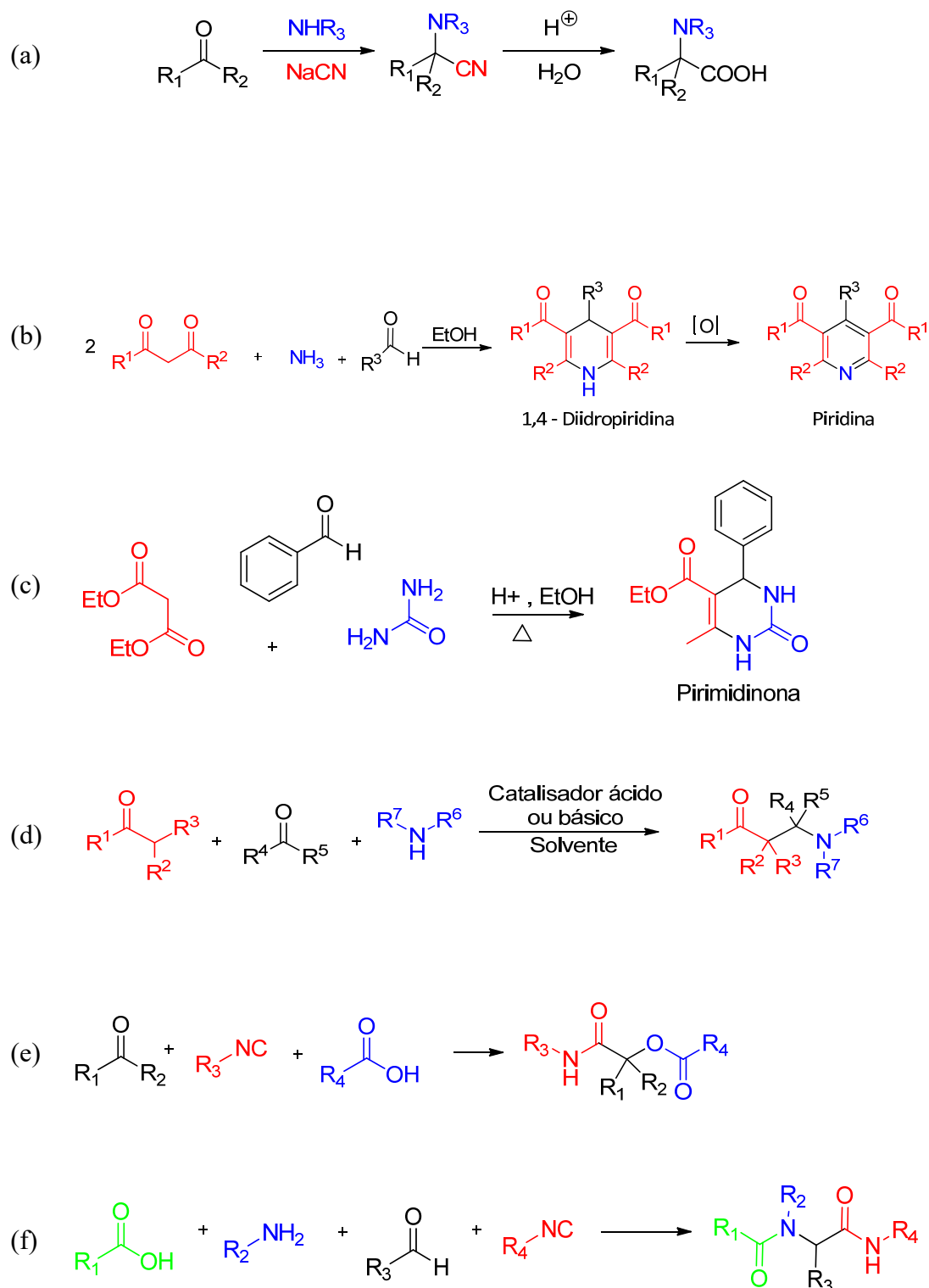
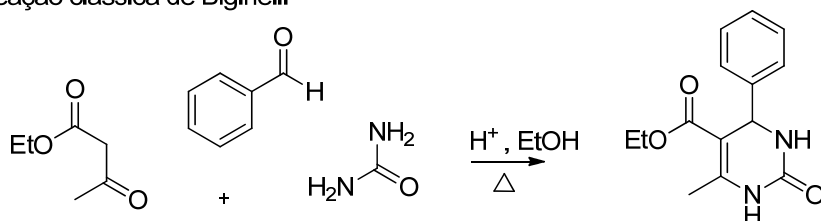


Figura 14: (a) Reação clássica de Strecker, (b) Reação clássica de Hantzsch, (c) Reação clássica de Biginelli, (d) Reação clássica de Mannich, (e) Reação clássica de Passerini e (f) Reação clássica de Ugi (KURTI & CZAKÓ, 2005).

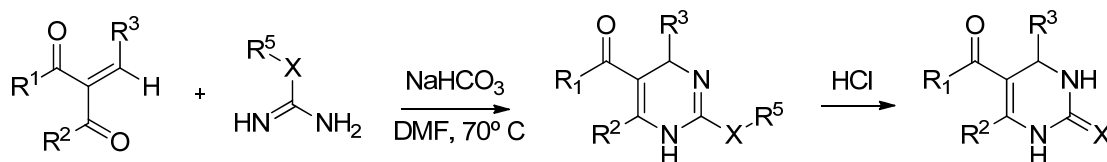
2.2.1 Reação de Biginelli

O químico italiano Pietro Biginelli (1860-1937) foi, em 1891, o primeiro a sintetizar a diidropirimidinona (DHPM) através da reação tricomponente envolvendo a condensação de um aldeído aromático, uréia e acetoacetato de etila. A reação foi conduzida com catálise ácida, sob refluxo, em solvente polar, como pode ser visto no **Esquema 1** (KURTI & CZAKÓ, 2005). Posteriormente, Atwal modificou a reação preparando uma enona que, após isolamento e purificação, foi reagida com uréias protegidas ou derivados de tiouréia na presença de bicarbonato de sódio para formação de uma primeira diidropirimidina que é, então, convertida para o correspondente DHPM sob desproteção em meio ácido (**Esquema 1**) (RAMOS, 2012; KURTI & CZAKÓ, 2005). A reação deixa então de ser uma RMC perdendo assim as principais vantagens, porém esta modificação possibilita que algumas diidropirimidinonas, que antes não se era capaz de obter com sucesso na multicomponente, possam ser sintetizadas.

Reação clássica de Biginelli



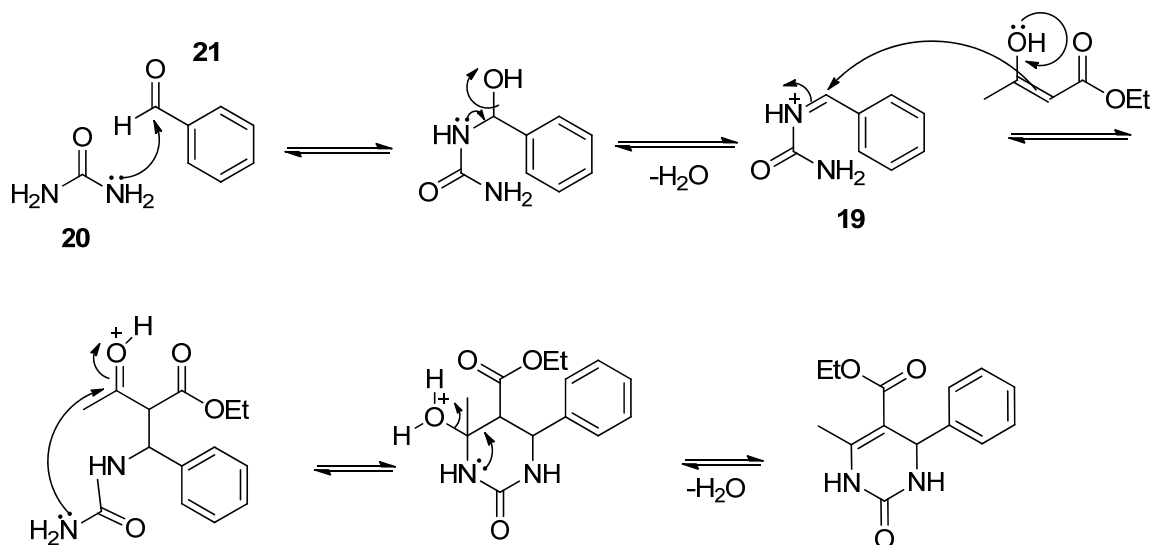
Modificação de Atwal



R¹ = OEt, NHPH, NEt₂, alquil, SEt; R² = alquil, aril, CH₂Br; R³ = aril, heteroaril, alquil; R⁴ = Me, Ph, H;
R⁵ = Me, quando X=O; R⁵ = p-OCH₃C₆H₄

Esquema 1: Síntese clássica de Biginelli e modificação de Atwal

Muito se discutiu na literatura, durante anos, sobre qual o mecanismo envolvido na reação. Algumas possibilidades foram levantadas e somente em 1997 o mecanismo foi elucidado, quando foi feita a investigação utilizando-se ressonância magnética nuclear de ¹³C e ¹H, através de experimentos de trapeamento, utilizando-se CD₃OH como solvente na presença de quantidade catalítica de HCl, à temperatura ambiente, e verificou-se que a etapa chave era a formação do intermediário imínio (**19**) do **Esquema 2**, proveniente da condensação da uréia (**20**) e do aldeído (**21**), posteriormente o intermediário imínio faz uma condensação Knoevenagel com o acetoacetato de etila, no **Esquema 2**. Pode-se ver todas as possibilidades discutidas e as setas em vermelho indicam o caminho verificado através dos experimentos (KAPPE & STADLER, 2004).



Esquema 2: Mecanismo de reação de Biginelli (Adaptado de KAPPE & STADLER, 2004).

A reação de Biginelli permite o emprego de derivados funcionalizados nos três componentes utilizados. Vários compostos β -dicarbonílicos, derivados alquilados (simétricos ou não-simétricos) da uréia ou da tiouréia e aldeídos alifáticos e aromáticos diversos podem ser empregados nessa reação. Além disso, derivados halogenados do acetoacetato de etila podem ser utilizados, permitindo outras modificações nas diidropirimidinonas após a reação de Biginelli (KAPPE, 2000). A escolha destas modificações muitas vezes é direcionada por modelagem molecular contra alvos específicos (TERRACCIANO et al, 2015).

Quanto ao modo de proceder a síntese existem revisões na literatura que exemplificam uma gama de catalisadores como AcOH, BiONO₃, CdCl₂, Ce(NO₃)₃, Bi(OTf)₃, CaAl₂Si₇O₁₈ · 6H₂O, H₃PW₁₂O₄₀, H₃PMo₁₂O₄, dentre muitos outros e uma gama de solventes dentre os quais estão: etanol, acetonitrila e água. Existem ainda metodologias que fazem uso de microondas e do ultrassom para a realização da síntese. Pode-se ainda utilizar fase sólida (YANG et al, 2015; KOLOSOV et al, 2009).

A escolha do método sintético depende da disponibilidade dos reagentes, e de particularidades dos aldeídos e compostos dicarbonílicos empregados na reação.

2.3 DHPM - Monastrol

Diversas atividades são relatadas na literatura para as DHPM, tais como: antiviral (KIM et al, 2012), bloqueadora do canal de cálcio (KAPPE, 2000), anticancerígena (RAJU et al, 2011), antifúngica (Singh et al, 2008), entre outras. Destaca-se importantes atividades sobre *Leishmania donovani* ((22) Figura 16) com um IC₅₀ = 23Mm (CHIANG et al, 2009) e antimalária contra *Plasmodium falciparum* ((23) Figura 16) com IC₅₀ = 0,2 μ M (SINGH et al, 2009).

O monastrol (24, Figura 16), uma DHPM que é sintetizada a partir da reação de Biginelli, se tornou um destaque entre os heterociclos nitrogenados sintéticos e possibilitou a criação de uma vasta biblioteca de análogos com o intuito de descobrir fármacos eficazes e seletivos contra diversas doenças. Este heterociclo foi identificado através de *screening* de uma biblioteca de 16.320 compostos apresentando atividade citotóxica. Ensaios posteriores

demonstraram que a atividade citotóxica do monastrol deve-se à especificidade do composto sobre a proteína motora (miosina-cinase) Eg5 (MAYER *et al*, 1999). Desde então, o monastrol tem sido utilizado como composto-protótipo para a síntese de novas DHPMs com potencial atividade farmacológica (PETERS *et al*, 2005; GODOI *et al*, 2005).

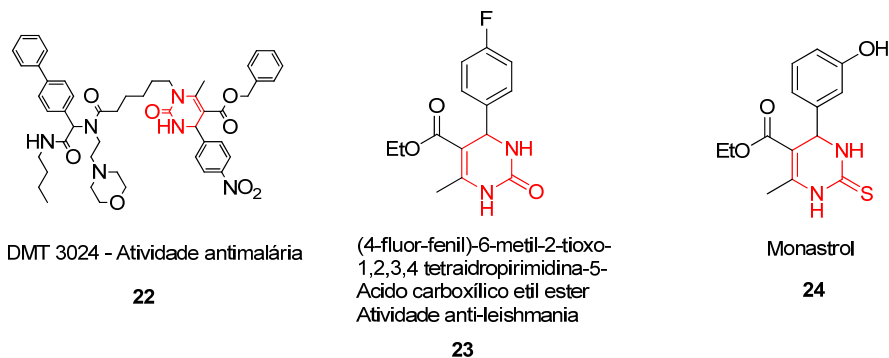


Figura 15: Algumas DHPM com atividades farmacológicas relacionadas na literatura

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com utilidade no tratamento de malária a partir do planejamento, síntese e avaliação de análogos do monastrol visando novos compostos bioativos com potencial terapêutico para o tratamento da Malária.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Síntese de diidropirimidinonas e de compostos bicíclicos do tipo pirrolo[3,4-*d*]-pirimidinodionas a partir da reação de Biginelli (**Figura 17**) visando novos compostos com potencial atividade antimalárica.

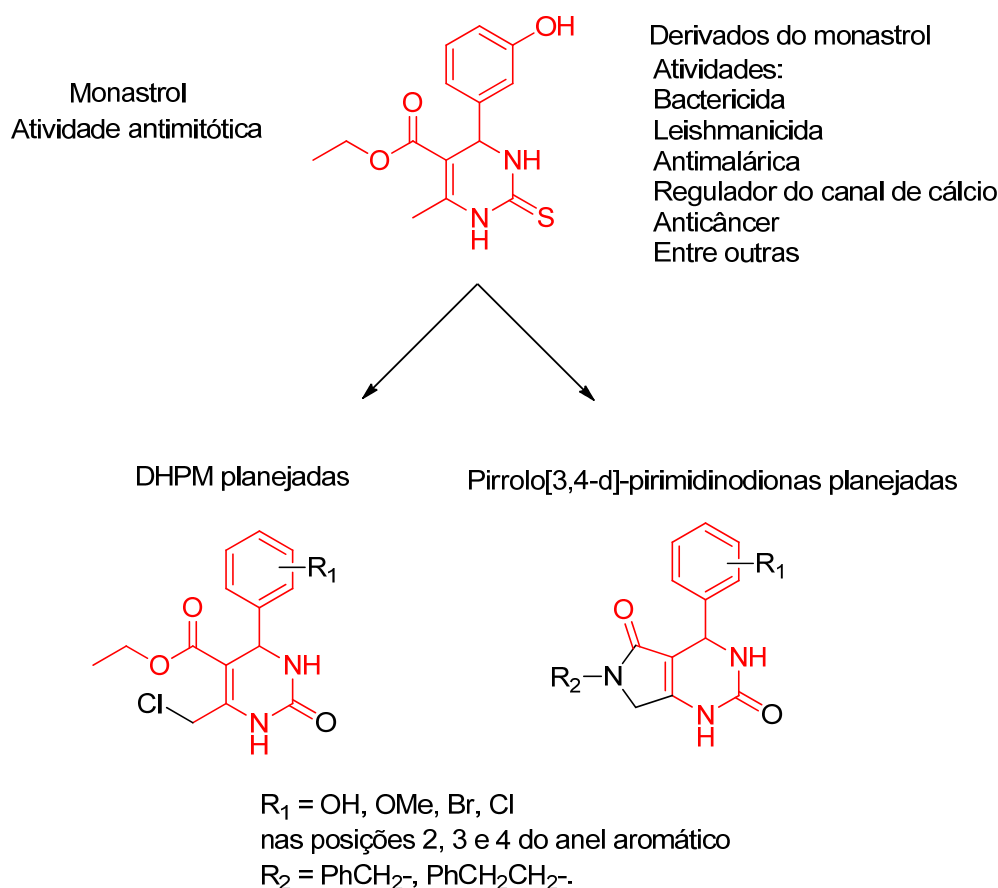


Figura 16: Planejamento experimental de síntese

Na síntese das DHPMs se realizará o isosterismo trocando o enxofre pelo oxigênio, além de substituir a metila pelo grupo clorometileno de forma a facilitar a ciclização posterior das moléculas. Nos compostos bicíclicos se utilizará a benzilamina e a feniletilamina de forma a se poder avaliar como a homologação de carbono interfere na possível atividade dos compostos.

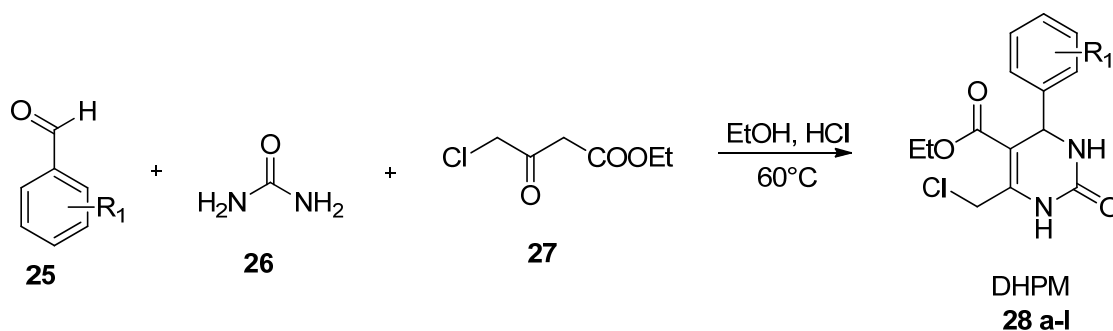
- b) Avaliação do potencial antimalárico das substâncias sintetizadas.
- c) A partir dos resultados dos ensaios biológicos, a construção de relações entre a estrutura dos compostos e a atividade dos mesmos, de modo a obterem-se parâmetros para a futura otimização destes compostos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese dos Compostos Planejados

4.1.1 1,4-diidropirimidi-2-onas (DHPM)

Fez-se uso da metodologia relatada por Pérez e colaboradores (2002) para a obtenção das DHPM (**28 a-l**). A primeira etapa desta síntese, como pode ser visto no **Esquema 3**, consiste na reação entre um aldeído aromático (**25**), a uréia (**26**) e o 4-Cloroacetoacetato de etila (**27**) na presença de HCl como catalisador e etanol como solvente.

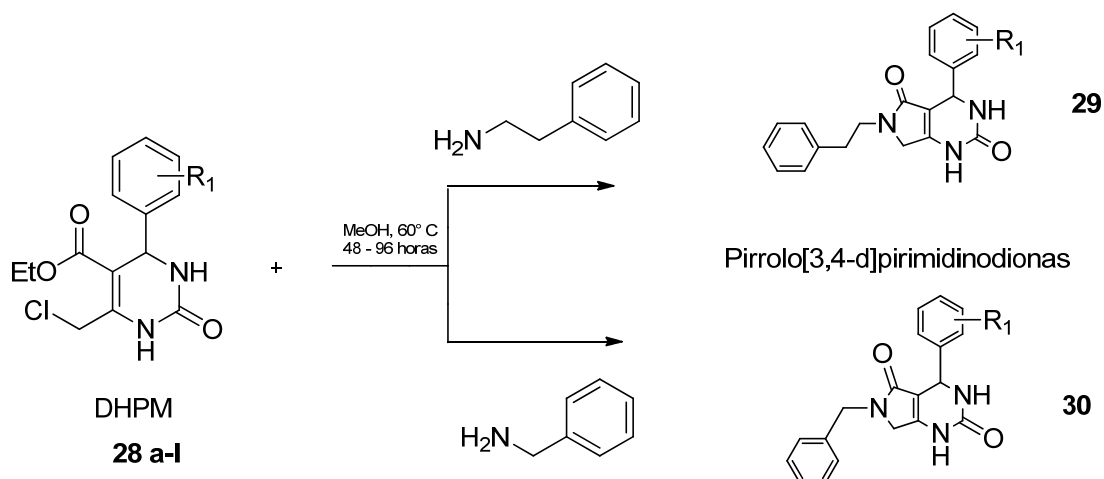


R₁ = H (a), 4-OMe (b), 3-Br (c), 4-Cl (d), 2-OMe (e), 4-Br (f), 3,4,5 -tri-OMe(g), 2-Cl (h), 2,4-di-OMe (i), 4-NO₂ (j), 3,4-di-OMe (k), 4-OH-3OMe (l)

Esquema 3: Metodologia utilizada na síntese das DHPM.

4.1.2 Síntese das pirrolo[3,4-d]-pirimidinodionas

A presença do cloro nas DHPM permite o emprego de aminas em uma reação de substituição nucleofílica seguida de ciclização intramolecular *one-pot* gerando a família planejada de pirrolo[3,4-*d*]pirimidinodionas nas condições mostradas no **Esquema 4**.



R₁ = H (a), 4-OMe (b), 3-Br (c), 4-Cl (d), 2-OMe (e), 4-Br (f), 3,4,5-triOMe(g), 2-Cl (h), 2,4-diOMe (i), 4-NO₂ (j), 3,4-diOMe (k), 4-OH-3OMe (l)

Esquema 4: Metodologia utilizada na síntese das pirrolo[3,4-d]-pirimidinodionas

4.2 Elucidação Estrutural

A elucidação estrutural de todos os compostos foi feita utilizando-se as técnicas de infravermelho com transformada de Fourier, no aparelho Bruker Vertex-70, ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, utilizando-se DEPT 135, utilizando-se aparelhos Avance 400 MHz e Avance 500 MHz, utilizando-se como padrão o TMS, pertencentes à Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Química da UFRRJ.

4.3 Ponto de fusão

O ponto de fusão foi aferido utilizando-se medidor de ponto de fusão MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA.

4.4 Confirmação da Pureza dos Compostos

Realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o aparelho Shimadzu LC-20AT com detector do tipo DAD SPD-M20A, coluna Chromolith-Merck- C18. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila e foi utilizado o método isocrático – Fase móvel = 60% (AcCN) e 40% (H₂O +TFA 0.01%) com fluxo de 2 mL/min.

4.5 Teste antiplasmodial *in vitro* contra *P. falciparum*

Os testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Malária (CPD-Mal) do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz. Iniciou-se o cultivo da cepa W2 de *P. falciparum* (resistente a cloroquina) segundo protocolo de Trager & Jansen (1976), quando alcançou-se boa parasitemia sincronizou-se afim de se obter as formas jovens do parasito conforme descrito na literatura por Lambros e Vanderberg (1979) e estas foram colocadas em microplacas juntamente com as drogas a serem testadas em diluições seriadas e o controle positivo (cloroquina) e incubou-se por 72 horas. Após, a avaliação foi realizada utilizando-se teste imunoenzimático anti-HRP-II seguindo protocolo de Noedl e colaboradores (2002), a

leitura das absorvâncias foi realizada à 450 nm em espectrofômetro de microplacas Espectramax 190 (leitor de ELISA) e a determinação de IC₅₀ foi feita através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear.

4.6 Ensaios *in vitro* de Citotoxicidade

Os testes foram realizados utilizando-se células BGM (célula renal basal de macaco verde africano) foi cultivada como recomendado (Calvo-Calle *et al.*, 1994) cultivadas em soro fetal bovino. As células foram colocadas em microplacas juntamente com as drogas a serem testadas em diluições e incubou-se por 24 horas. Após, a avaliação foi realizada utilizando-se o Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich) (DENIZOT & LANG, 1986), a leitura das absorvâncias foi realizada à 570 nm em espectrofômetro de microplacas Espectramax 190 (leitor de ELISA) e a determinação de IC₅₀ foi feita através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear.

4.7 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido calculando-se a razão entre o valor de mínima dose letal 50% (MDL₅₀) e o valor de IC₅₀. Compostos que tiveram valores maiores que 10 foram considerados seletivos, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas não seletivas (Bézivin *et al.*, 2003).

5 EXPERIMENTAL

5.1 Metodologia geral de síntese das DHPM

A reação foi realizada em vials com tampa de rosca (**Figura 17**), de maneira a realizar oito reações por vez otimizando assim o tempo, o que não seria possível com uso de balão, foram a ele adicionados o aldeído aromático, a uréia e 4-Cloroacetoacetato de etila na proporção de 1:1,08:1, respectivamente, 2 mL de etanol e 2 gotas de HCl concentrado. Os reagentes foram adquiridos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, ACROS Organics e Vetec Química Fina) e foram utilizados sem purificação prévia. A reação foi mantida a 60 °C durante 48 horas utilizando-se chapa de aquecimento IKA HS-7 com bloco e controle de temperatura a partir de um sensor de temperatura conectado a este bloco.



Figura 17: Reações realizadas em vials com tampa de rosca sob aquecimento.

O isolamento do produto foi realizado através de filtração do precipitado e lavagem com etanol gelado. Quando não houve precipitado formado espontaneamente durante o resfriamento, a solução foi vertida em gelo e depois filtrada.

O método de purificação empregado para remoção das impurezas foi adição de uma pequena porção de etanol aos compostos e realização de fervura por pelo menos 5 minutos, após o resfriamento a solução foi filtrada obtendo-se o produto purificado.

5.2 Metodologia geral de síntese das pirrolo[3,4-d]-pirimidinodionas

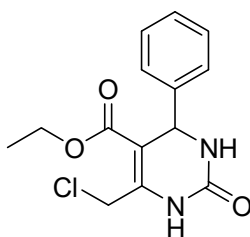
A reação foi realizada em vials com tampa de rosca (idêntico à reação anterior), no qual foram adicionados a DHPM, amina e trietilamina na proporção de 1:3:1, respectivamente, e posteriormente 1mL de metanol. A reação foi mantida a 60° C durante 48 - 96 horas, dependendo da DHPM de partida, em chapa de aquecimento IKA HS-7 com bloco.

Posteriormente foi feito o resfriamento da solução e filtração do precipitado. Quando não houve precipitado formado espontaneamente, a solução foi vertida em gelo e depois filtrada.

O método escolhido para a purificação dos compostos é a lavagem com metanol gelado.

5.3 Elucidação estrutural e pureza dos compostos

6-(clorometil)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28a)



Aldeído utilizado: benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 280°C Rendimento: 29,7% (0,35g)

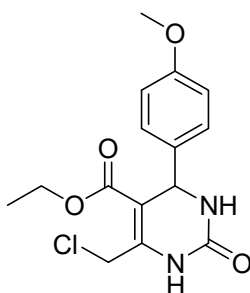
IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,12 (t, $J=7,2$ Hz, 3H), 4,05 (q, $J=7,2$ Hz, 2H), 4,6 (d, $J=10,7$ Hz, 1H) e 4,78 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 5,2 (sl, 1H), 7,26-7,36 (m, 5H), 7,87 (s, 1H), 9,87 (s, 1H)

^{13}C RMN (125MHz, DMSO- d_6): 14, 54,3, 60,4, 102, 126,8, 128, 129, 144, 146.5, 152,5

6-(clorometil)-4-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28b)



Aldeído utilizado: p-metóxi benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 280°C Rendimento: 22% (0,28g)

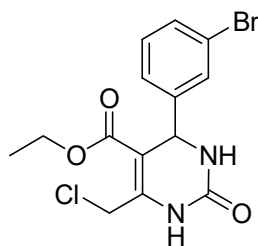
IV: 3300 cm⁻¹, 1710 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 1,13 (t, *J*=7,25 Hz, 3H), 3,73 (s, 3H), 4,04 (q, *J*= 6,9 Hz, 2H), 4,6 (d, *J*= 10,4 , 1H) e 4,76 (d, *J*= 10,7Hz, 2H), 5,14 (sl, 1H), 6,89 – 6,91 (2d, *J*=8,8Hz, 2H), 7,17-7,18 (2d, *J*=8.5Hz, 2H), 7,8 (s, 1H), 9,47 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 14,4, 53,7, 55,5, 60,4, 102, 114, 127, 136,5, 146,2, 152,5, 159, 164,7

4-(3-bromofenil)-6-(clorometil)-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidino-5-carboxilato de etila (28c)



Aldeído utilizado:3-Br benzaldeído

Estado físico: Sólido branco amarelado Pureza: 88%

Ponto de fusão: 172°C Rendimento: 38% (0,54g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1710 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

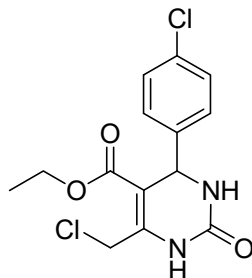
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 1,13 (t, *J*=6,94 Hz, 3H), 4,05 (m, *J*= 7,25 Hz, 2H), 4,6 (d, *J*= 10,7Hz, 1H), 4,77 (d, *J*= 10,4Hz, 1H), 5,2 (sl, 1H), 7,26 (d, *J*=7,57, 1H), 7,34 (t, *J*=7,8Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,49 (d, *J*=8,2, 1H), 7,92 (s, 1H), 9,6 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 14,3, 53,9, 60,5, 101, 122, 125, 129,7, 130, 131, 147, 147,1, 152,2, 164,4

Trata-se de um produto comercial.

6-(clorometil)-4-(4-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetraidropirimidino-5-carboxilato de etila (28d)



Aldeído utilizado: 4-Cl benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 178°C Rendimento: 24% (0,3g)

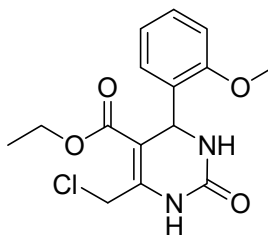
IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,12 (t, $J=7,25$ Hz, 3H), 4,05 (q, $J= 7,25$ Hz, 2H), 4,58 (d, $J= 10,7\text{Hz}$, 1H), 4,78 (d, $J= 10,7\text{Hz}$, 1H), 5,2 (sl, 1H), 7,27 (2d, $J=8,2\text{Hz}$, 2H), 7,42 (d, $J=8,5\text{Hz}$, 2H), 7,91 (s, 1H), 9,57 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,3, 53,7, 60,5, 101,7, 128, 129, 132,6, 143, 146,8, 152,3, 164,2

6-(clorometil)-4-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetraidropirimidino-5-carboxilato de etila (28e)



Aldeído utilizado: 2-metóxi benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 190°C Rendimento: 66% (0,8g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

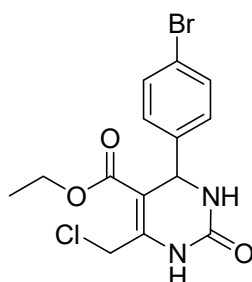
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,06 (t, $J=7,25$ Hz, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,93 (m, $J=7,26$ Hz, 2H), 4,66 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 4,76 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 5,53 (sl, 1H), 6,9 (t, $J=6,95$ Hz, 1H), 7 (d, $J=8,2$, 1H), 7,12 (2d, $J=6$ Hz, 1H), 7,24-7,28 (m, 1H), 7,45 (s, 1H), 9,41 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 13,7, 53,7, 53,77, 60,5, 101,7, 128,7, 128,9, 129, 129,2, 132, 143,3, 146,8, 152,3, 164,3

A literatura faz referência a esta molécula como um intermediário de reação sem fornecer seus espectros (CANTO *et al*, 2014).

4-(4-bromofenil)-6-(clorometil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28f)



Aldeído utilizado: 4-Br benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 177°C Rendimento: 17% (0,24g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

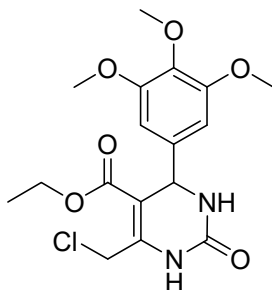
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,12 (t, $J=7,25$ Hz, 3H), 4,05 (q, $J=7,25$ Hz, 2H), 4,58 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 4,78 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 5,19 (sl, 1H), 7,21 (2d, $J=8,2$, 2H), 7,56 (2d, $J=8,5$ Hz, 2H), 7,90 (s, 1H), 9,57 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,3, 52,7, 60,5, 101,7, 121, 129, 131, 143,7, 146,8 152,3, 164,5

A literatura faz referência a esta molécula como um intermediário de reação sem fornecer seus espectros (KUSHNIR *et al*, 2009).

6-(clorometil)-4-(2,3,4-trimetoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28g)



Aldeído utilizado: 3,4,5- trimetóxi benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 190°C Rendimento: 63,2% (0,84g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

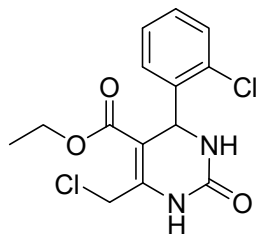
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,14 (t, $J=7,25$ Hz, 3H), 3,64 (s, 3H), 3,73 (s, 6H), 4,05 (q, $J=7,25$ Hz, 2H), 4,64 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 4,81 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 5,15 (sl, 1H), 6,57 (sl, 2H), 7,84 (s, 1H), 9,52 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,4, 54,1, 56,2, 60,4, 60,5, 101, 103, 137, 139,8, 152,5, 153,3, 164,3

A literatura não faz referências a essa molécula.

6-(clorometil)-4-(2-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28h)



Aldeído utilizado: 2-Cl benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 190°C Rendimento: 39% (0,6g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

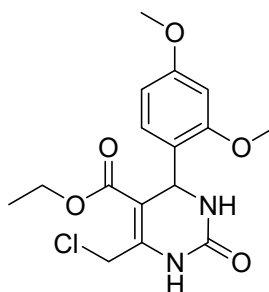
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,03 (t, $J=7,25$ Hz, 3H), 3,96 (q, $J= 7,25$ Hz, 2H), 4,70 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 4,77 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 5,69 (sl, 1H), 7,29-7,45 (m, 4H), 7,86 (s, 1H), 9,59 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,2, 51,8, 60,3, 60,5, 100, 128,3, 129,1, 129,8, 129,9, 132, 141, 147, 151,7, 164,3

Trata-se de um produto comercial.

6-(clorometil)-4-(2,4-dimetoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28i)



Aldeído utilizado: 2,4 – dimetóxi benzaldeído

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 175 °C Rendimento: 50% (0,2g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

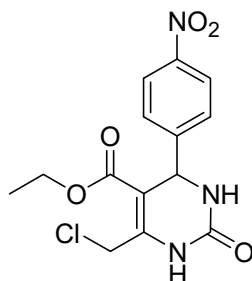
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,08 (t, $J=7,25$ Hz, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,98 (q, $J= 7,25$ Hz, 2H), 4,67 (d, $J= 10,4$ Hz, 1H), 4,74 (d, $J= 10,7$ Hz, 1H), 5,44 (sl, 1H), 6,45 (2d, $J=8,5$ Hz, 2H), 6,55 (sl, 1H), 7 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 9,37 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,4, 53,86, 55,83, 60,4, 102,2, 110,7, 112,2, 118,6, 136,8, 146,3, 148,7, 149, 152,5, 164,7

Trata-se de um produto comercial.

6-(clorometil)-4-(nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28j)



Aldeído utilizado: 4- nitro benzaldeído

Estado físico: Sólido amarelo

Pureza: 96.3%

Ponto de fusão: 225°C

Rendimento: 50% (0,34g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

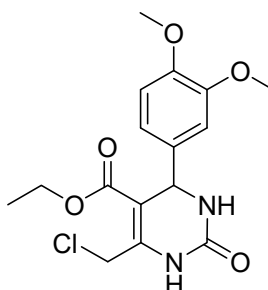
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,13 (t, $J=6,94$ Hz, 3H), 4,05 (q, $J=6,94$ Hz, 2H), 4,57 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 4,8 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 5,34 (sl, 1H), 7,54 (d, $J=7,8$ Hz, 2H), 8,24 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 8 (s, 1H), 9,68 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,3, 54, 60,6, 101, 124,4, 128,2, 147,38, 147,47, 151,4, 152,1, 164,4

Trata-se de um produto comercial.

6-(clorometil)-4-(3,4-dimetoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28k)



Aldeído utilizado: 3,4- dimetóxi benzaldeído

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 155°C

Rendimento: 53% (0,75g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

Dados obtidos:

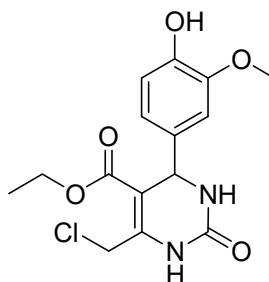
^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,08 (t, $J=7,25$ Hz, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,98 (q, $J=7,25$ Hz, 2H), 4,67 (d, $J=10,4$ Hz, 1H), 4,74 (d, $J=10,7$ Hz, 1H), 5,44 (sl, 1H), 6,45 (2d, $J=8,5$ Hz, 2H), 6,55 (sl, 1H), 7 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 9,37 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,4, 53,86, 55,83, 60,4, 102,2, 110,7, 112,2, 118,6, 136,8, 146,3, 148,7, 149, 152,5, 164,7

A literatura faz referência a esta molécula como um intermediário de reação sem fornecer seus espectros (VOVK *et al*, 2011).

6-(clorometil)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-
carboxilato de etila (28I)

tetrahidropirimidino-5-



Aldeído utilizado: Vanilina

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 83%

Ponto de fusão: 159°C

Rendimento: 60% (0,4g)

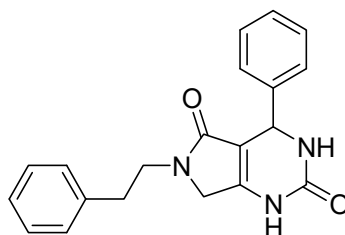
IV: 3300 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

Dados obtidos: ^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 1,14 (t, $J=6,94$ Hz, 3H), 3,73 (s, 3H), 4,05 (q, $J=6,94$ Hz, 2H), 4,7 (q, $J=10,4$ Hz, 2H), 5,1 (sl, 1H), 6,7 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 6,81 (d, $J=1,58$ Hz, 1H), 7,7 (s, 1H), 8,99 (s, 1H), 9,43 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 14,4, 53,96, 55,96, 60,4, 102,4, 111,1, 115,8, 118,9, 135,4, 146,1, 146,5, 147,8, 152,5, 164,7

Trata-se de um produto comercial.

4-fenil-6-(2-feniletíl)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29a)



DHPM utilizada: 28a

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 96.5%

Ponto de fusão: 290°C

Rendimento: 64% (0,2g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

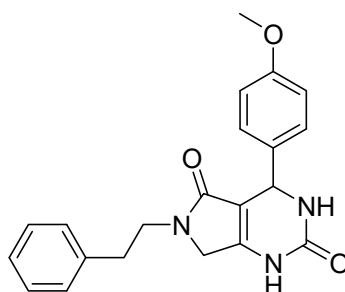
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 2,74 (t, *J*= 7,25Hz, 2H), 3,45 (m, 2H), 3,84 (s, 2H), 5,15 (sl, 1H), 7,18-7,37 (m, 10H), 7,53 (s, 1H), 9,52 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 34,7, 43, 47,7, 53,5, 103, 126,6, 126,9, 127,8, 128,8, 128,84, 129,1, 139,7, 144, 150,2, 152,3, 168,4

Trata-se de um produto comercial.

5.2.2 4-(4-metoxifenil)-6-(2-feniletíl)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29b)



DHPM utilizada: 28b

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 98,4%

Ponto de fusão: 260°C

Rendimento: 68.8% (0,12g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

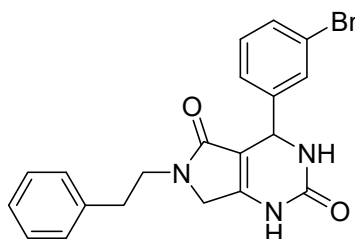
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 2,7 (t, $J=7,25\text{Hz}$, 2H), 3,4 (s, 2H), 3,7 (s, 3H), 3,8 (m, 2H), 5,11 (sl, 1H), 6,9-7,3 (m, 9H), 7,48 (s, 1H), 9,49 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 34,7, 43,1, 47,7, 52,9, 55,5, 103,9, 114,1, 126,6, 128, 128,5, 129,1, 136,2, 139,7, 149,9, 152,3, 159, 168,4

Trata-se de um produto comercial.

4-(3-bromofenil)-6-(2-feniletíl)-3,4,6,7-tetrahidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29c)



DHPM utilizada: 28c

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 99%

Ponto de fusão: 278°C

Rendimento: 54% (0,11g)

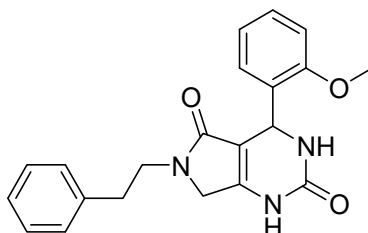
IV: 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 2,75 (t, $J=7,25\text{Hz}$, 2H), 3,48(m, 2H), 3,8 (sl, 3H), 5,21 (sl, 1H), 7,18-7,47(m, 9H_{aromáticos}+1H), 9,6 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 34,7, 43,1, 47,8, 53, 103, 122, 126, 126,6, 128,8, 129,6, 130,7, 131,1, 139,6, 146,6, 150,5, 152,1, 168,3

6-(2-feniletíl)-4-(2-metoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29e)



DHPM utilizada: 28d

Estado físico: Sólido amarelado

Pureza: 92.9%

Ponto de fusão: 210°C

Rendimento: 57.3% (0,1g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

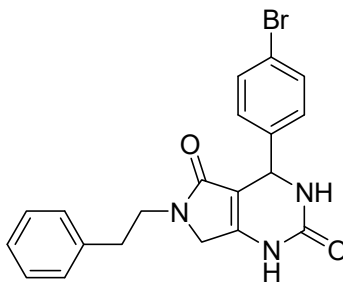
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 2,77 (t, *J*= 7,25Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,8(sl, 2H), 5,43 (sl, 1H), 6,92-7,31(m, 9H), 8,74 (s, 1H), 9,74 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 34,7, 43, 47,7, 48,5, 56, 102, 103, 120,8, 126, 128,4, 128,8, 129,1, 129,4, 139,7, 151, 152, 157, 168,4

Na há relatos na literatura sobre esta molécula.

4-(4-bromofenil)-6-(2-feniletil)-3,4,6,7-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-*d*]pirimidino-2,5-diona (29f)



DHPM utilizada: 28f

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 305°C

Rendimento: 70% (0,13g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

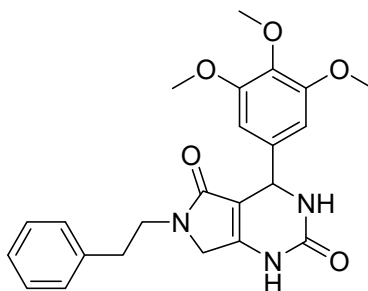
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 2,72 (t, *J*= 7,25Hz, 2H), 3,46(m, 2H), 3,86 (s, 2H), 5,18 (sl, 1H), 7,17-7,58 (m, 9H_{aromáticos} + 1H), 9,58 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 34,7, 43,1, 47,7, 53, 103,1, 120,9, 126,6, 128,8, 129,1, 129,2, 131,7, 139,7, 143,3, 150,3, 152, 168

Na há relatos na literatura sobre esta molécula.

6-(2-feniletíl)-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29g)



DHPM utilizada: 28g

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 240°C Rendimento: 70% (0,2g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

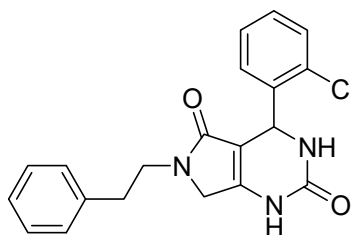
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 2,77 (t, *J*= 7,25Hz, 2H), 3,49(m, 2H), 3,64 (s, 3H), 3,74 (s, 6H), 3,86 (s, 2H), 5,16 (sl, 1H), 6,63 (sl, 2H), 7,19-7,28 (m, 5H), 7,53 (s, 1H), 9,52 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 34,7, 43,1, 47,7, 53,5, 56,3, 60,4, 103,3, 103,9, 126,6, 128,8, 129,1, 137,2, 139,6, 139,7, 150,3, 152,3, 153,2, 168,6

Não há relatos na literatura sobre esta molécula.

4-(2-clorofenil)-6-(2-feniletíl)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29h)



DHPM utilizada: 28h

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 300-310°C Rendimento: 55,6% (0,2g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

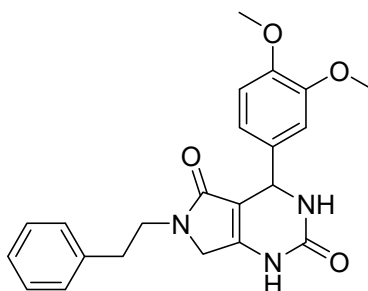
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 2,72 (t, *J*= 7,25Hz, 2H), 3,44(m, 2H), 3,87 (s, 2H), 5,58 (sl, 1H), 7,17-7,47 (m, 9H_{aromáticos}+1H), 9,61 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 34,7, 43,1, 47,8, 51,7, 102, 126,6, 127, 128,8, 129, 130, 132,4, 139,7, 140,3, 150,1, 151,8, 168

Trata-se de um produto comercial.

6-(2-feniletíl)-4-(3,4-dimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-*d*]pirimidino-2,5-diona (29k)



DHPM utilizada: 28k

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 156 °C

Rendimento: 54% (0,18g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

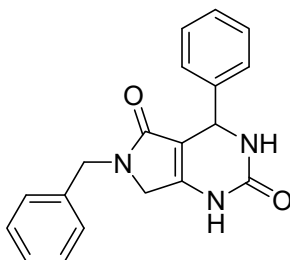
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 2,77 (t, *J*= 7,25Hz, 2H), 3,4(m, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,8 (s, 2H), 5,12 (sl, 1H), 6,75-6,95 (m, 3H) 7,15-7,30 (m, 5H), 7,49 (s, 1H), 9,49 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 34,7, 43, 47,7, 53, 55,8, 56, 103, 111, 112, 118, 126, 128,8, 129, 136,5, 139,7, 148,6, 148,9, 150, 168,6

Trata-se de um produto comercial.

6-(benzil)-4-fenil-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-*d*]pirimidino-2,5-diona (30a)



DHPM utilizada: 28a

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 270°C Rendimento: 62% (0,19g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 3,80 (d, *J*=18Hz, 1H), 3,9 (d, *J*=18Hz, 1H), 4,34 (d, *J*=15Hz, 1H), 4,53 (d, *J*=15Hz, 1H), 5,23 (sl, 1H), 7,1-7,39 (m, 10H), 7,6 (s, 1H), 9,55 (s, 1H)

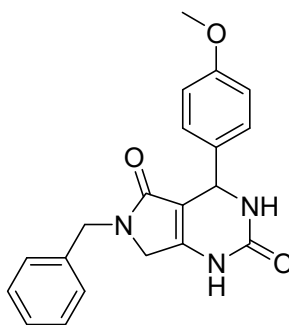
¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 45,1, 47,2, 53,6, 103,4, 126,9, 128, 128,9, 129, 138,5, 144, 150,6, 152,2, 168,7

Literatura (KAPPE *et al*, 2002):

¹H RMN (360MHz, DMSO-*d*₆): 3,78 (d, *J*=18,1Hz, 1H), 3,89 (d, *J*=18,1Hz, 1H), 4,33 (d, *J*=15,2Hz, 1H), 4,52 (d, *J*=15,2Hz, 1H), 5,22 (m, 2H), 7,16-7,38 (m, 10H), 7,52 (s, 1H), 9,51 (s, 1H)

¹³C RMN (90 MHz, DMSO-*d*₆): 45,1, 47,1, 53,5, 103,8, 127,2, 127,9, 128,2, 128,3, 129,1, 129,4, 138,9, 144,4, 151,1, 152,8, 169,4

6-(benzil)-4-(4-metoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-*d*]pirimidino-2,5-diona (30b)



DHPM utilizada: 28b

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 265°C Rendimento: 40% (0,07g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

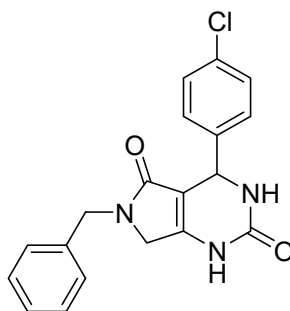
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 3,74(s, 3H), 3,77 (d, *J*=18Hz, 1H), 3,9 (d, *J*=18Hz, 1H), 4,34 (d, *J*=15Hz, 1H), 4,53 (d, *J*=15Hz, 1H), 5,18 (sl, 1H), 6,9 (d, *J*=8,5Hz, 2H), 7,18 (d, *J*=7Hz, 2H), 7,23-7,34 (m, 5H), 7,5 (s, 1H), 9,6 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 45,1, 47,2, 53, 55,5, 103,6, 114,2, 127,7, 128, 129, 136, 138,5, 150,4, 152,2, 159,1, 168,8

Trata-se de um produto comercial.

6-(benzil)-4-(4-clorofenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30d)



DHPM utilizada: 28d

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 215°C

Rendimento: 70% (0,18g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

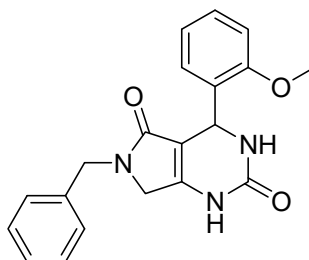
Dados obtidos:

^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 3,82 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 3,88 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 4,36 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H), 4,52 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H), 5,27 (sl, 1H), 7,19-7,43 (m, 9H), 7,63 (s, 1H), 9,58 (s, 1H)

^{13}C RMN (100MHz, DMSO- d_6): 45,2, 47,2, 53, 102,9, 127,6, 127,9, 128,8, 129, 132,4, 138,4, 142,8, 150,7, 152, 168,6

Trata-se de um produto comercial.

6-(benzil)-4-(2-metoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30e)



DHPM utilizada: 28e

Estado físico: Sólido amarelado

Pureza: 94.7%

Ponto de fusão: 142°C

Rendimento: 54% (0,14g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

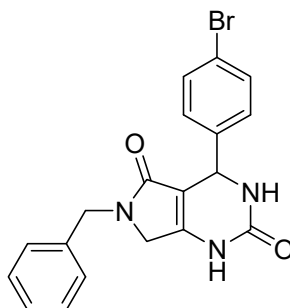
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 3,8 (s, 3H), 3,88 (m, 2H), 4,34 (d, *J*=15Hz, 1H), 4,48 (d, *J*=15Hz, 1H), 5,47 (sl, 1H), 6,9-7,3 (m, 9H_{aromático}+1H), 9,4 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 45,1, 47,2, 48,7, 56, 102,2, 111,9, 120,8, 127,6, 128,6, 129, 129,5, 131,1, 138,6, 151,5, 152,2, 157,2, 168,7

Não há relatos na literatura sobre esta molécula.

6-(benzil)-4-(4-bromofenil)-3,4,6,7-tetraidro-1*H*-pirrolo[3,4-*d*]pirimidino-2,5-diona (30f)



DHPM utilizada: 28f

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 280°

Rendimento: 70% (0,28g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

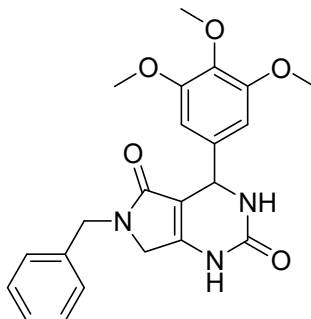
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 3,8 (d, *J*=18Hz, 1H), 3,9 (d, *J*=18Hz, 1H), 4,34 (d, *J*=15Hz, 1H), 4,52 (d, *J*=15Hz, 1H), 5,25 (sl, 1H), 7,18 (d, *J*=7Hz, 2H), 7,27-7,35 (m, 5H), 7,58 (d, *J*=8,5Hz, 2H), 7,6 (s, 1H), 9,6 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 45,1, 47,2, 53,1, 102,9, 121, 127,6, 127,9, 129, 131,7, 138,5, 143,3, 150,8, 152,1, 168,6

Não há relatos na literatura sobre esta molécula.

6-(benzil)-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30g)



DHPM utilizada: 28g

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 270°C

Rendimento: 40% (0,15g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

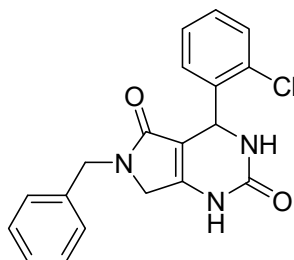
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 3,65 (s, 3H), 3,76 (s, 6H), 3,86 (m, 2H), 4,45 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H), 4,49 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H), 5,23 (sl, 1H), 6,86 (s, 2H), 7,19-7,34 (m, 9H), 7,58 (s, 1H), 9,54 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 45,1, 47,2, 53,5, 56,2, 60,4, 103, 104, 127,7, 127,9, 129, 129,2, 137,2, 138,6, 139,4, 150,9, 152,2, 153,2, 168,8

Trata-se de um produto comercial.

6-(benzil)-4-(2-clorofenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30h)



DHPM utilizada: 28h

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 258°C

Rendimento: 10% (0,03g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

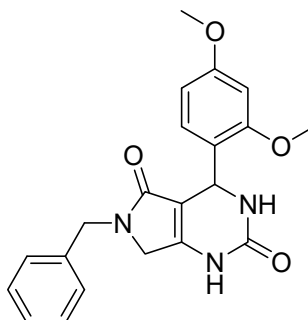
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 3,8 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 3,92 (d, $J=18\text{Hz}$, 1H), 4,33 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H) 4,5 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H), 5,64 (sl, 1H), 7,16-7,43 (m, 9H), 7,52 (s, 1H), 9,6 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 45, 47,2, 51,8, 102,9, 121, 127,6, 127,9, 129, 131,7, 138,5, 143,3, 150,8, 152,1, 168,6

Não há relatos na literatura sobre esta molécula.

6-(benzil)-4-(2,4-dimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30i)



DHPM utilizada: 28i

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 270°C

Rendimento: 84.4% (0,16g)

IV: 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1670 cm^{-1}

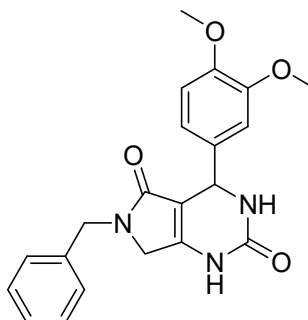
Dados obtidos:

^1H RMN (500MHz, DMSO- d_6): 3,76(s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,82-3,92 (m, 2H), 4,37 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H), 4,5 (d, $J=15\text{Hz}$, 1H), 5,4 (sl, 1H), 6,4 e 6,5 (2d, $J= 8,5\text{Hz}$, 2H), 6,57 (sl, 1H), 6,9-7,34 (m, 5H_{aromáticos}+1H), 9,4 (s, 1H)

^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6): 45,1, 47,2, 48,4, 55,7, 56, 99,1, 102,3, 105,1, 123,7, 127,6, 127,9, 129, 129,2, 138,6, 151,2, 152,2, 158,3, 160,3, 168,8

Não há relatos na literatura sobre esta molécula.

6-(benzil)-4-(3,4-dimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30k)



DHPM utilizada: 28k

Estado físico: Sólido branco

Pureza: 100%

Ponto de fusão: 278°C

Rendimento: 64.2% (0,24g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

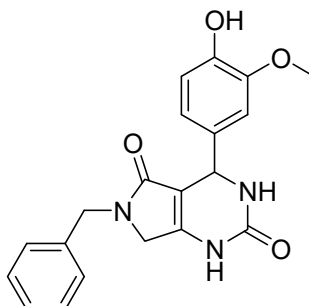
Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 3,74(s, 6H), 3,82 (d, *J*=18Hz, 1H), 3,88 (d, *J*=18Hz, 1H), 4,41(d, *J*=15Hz, 1H), 4,5 (d, *J*=15Hz, 1H), 5,2 (sl, 1H), 6,81 e 6,82 (2d, *J*= 8,5Hz, 2H), 6,93-6,98 (m, 2H), 7,18 (d, *J*=7Hz, 2H), 7,2-7,35(m, 3H), 7,54 (s,1H), 9,5 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 45,2, 47,2, 53,1, 56, 103,5, 110,9, 112,1, 118,6, 127,6, 127,9, 129, 136,4, 138,6, 148,6, 149, 150,5, 152,2, 168,8

A literatura faz referência a esta molécula como um intermediário de reação sem fornecer seus espectros (GEORGE *et al*, 1975).

6-(benzil)-4-(4-metoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30l)



DHPM utilizada: 281

Estado físico: Sólido branco Pureza: 100%

Ponto de fusão: 228°C Rendimento: 50% (0,16g)

IV: 3300 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ e 1670 cm⁻¹

Dados obtidos:

¹H RMN (500MHz, DMSO-*d*₆): 3,75(s, 3H), 3,8 (d, *J*=18Hz, 1H), 3,9 (d, *J*=18Hz, 1H), 4,4 (d, *J*=15Hz, 1H), 4,51 (d, *J*=15Hz, 1H), 5,14 (sl, 1H), 6,7 e 6,73 (2d, *J*=8,2Hz, 2H), 6,92 (s, 1H), 7,18-7,35 (m, 5H), 7,5 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 9,47 (s, 1H)

¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): 45,1, 47,1, 53,2, 56, 103,6, 111,4, 115,4, 119, 127,6, 127,9, 129, 135, 138,6, 146,4, 147,8, 150,4, 152,2, 168,9

Não há relatos na literatura sobre esta molécula.

5.4 Metodologia geral do teste *in vitro* antiplasmodial e de citotoxicidade

5.4.1 Cultivo contínuo do *Plasmodium falciparum*

Foi colocada em cultivos a cepa W2 (resistente à cloroquina), disponibilizada pelo Laboratório de Pesquisa em Malária (CPD-Mal), a metodologia utilizada no cultivo foi a de Trager & Jansen (1976) e o cultivo foi feito utilizando hemácias humanas provenientes de bolsas de sangue do tipo A+ cedidas pelo Instituto de Biologia do Exército (IBEx). O meio de cultivo utilizado foi RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 21 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 25 mM de hepes (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de gentamicina (Nova Farma), 11 mM de glicose (Sigma-Aldrich) e 10% de soro humano desativado. As culturas foram mantidas em frascos próprios para cultura, com um hematócrito ≈ 6% incubada a 37° C em atmosfera reduzida de oxigênio (aproximadamente 5% de CO₂, 90-92% de N₂ e 3-5% de O₂). A manutenção da cultura foi feita com a troca do meio a cada 24 horas e o acompanhamento realizado através de esfregaços sanguíneos corados com kit de panótipo rápido (Laborclin) ou pela técnica de coloração com Giemsa (Laborclin) e a parasitemia obtida através de observação ao microscópio óptico Nikon Eclipse 80i com objetiva de imersão (1.000x) (**Figura 18**) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Quando detectadas altas parasitemias diluições com hemácias não parasitadas foram realizadas.

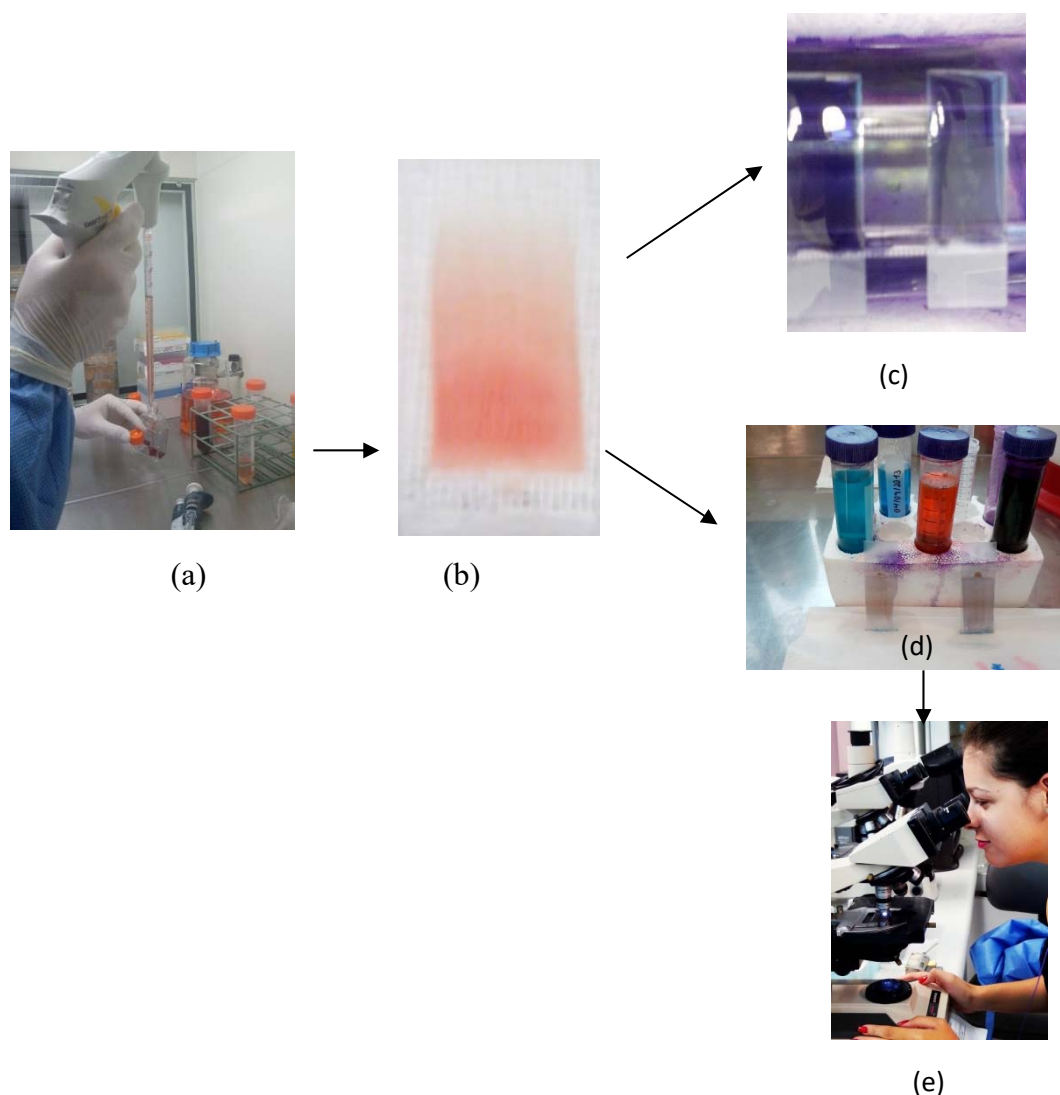


Figura 18: (a) troca do meio de cultura, (b) esfregaço sanguíneo, (c) coloração por Giemsa, (d) kit de panótipo rápido e (e) leitura da lâmina em microscópio. (Fonte: autoria própria).

5.4.2 Sincronização do cultivo

Para os testes *in vitro* a sincronização do cultivo é necessária para a obtenção de formas jovens (anéis), através de sincronização com sorbitol conforme descrito na literatura (Lambros e Vanderberg, 1979). Inicialmente foi feito um esfregaço sanguíneo para observação do estágio de amadurecimento do parasito e contagem da parasitemia. No momento em que a cultura apresentou predomínio de anéis a mesma foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante. Foi acrescentado 10 mL de D-sorbitol (5 % em glicose 0,5 %), e incubado a 37 °C por 10 minutos. Após foi levado a nova centrifugação por 5 min, retirou-se o sobrenadante e lavou-se com meio. Posteriormente é feito novo esfregaço para contagem da parasitemia. O hematócrito e a parasitemia, pré-determinados para o teste, foram ajustados com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas.

5.4.3 Preparo das placas para os ensaios de quimioterapia

Culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* foram distribuídas em microplacas de 96 poços (Corning) adicionando-se 180 μL /poço de meio de cultura RPMI contendo: 0,05 % de parasitemia e 1,5 % de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRP2 (Figura 19). Anteriormente à adição da suspensão dos parasitos, 20 μL dos compostos a serem testados foram adicionados a placa teste, em triplicata, e em diferentes concentrações seriadas (50 μM -0,8 μM). Os poços controles (seis por teste) continham hemácias infectadas sem adição dos compostos-testes (controle positivo). O antimalárico padrão, cloroquina (Sigma-Aldrich), foi testado em paralelo em todos os experimentos realizados, em diluições seriadas de 1000-1 nM. As placas-testes foram incubadas por 24 h a 37 °C, e o conteúdo de seis poços (controle positivo) foi retirado e congelado à -20°C para ser utilizado posteriormente como *background*. A placa foi novamente incubada por 48 h nas condições ideais para o crescimento do parasito. Após 72 h totais de incubação, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes a -70 °C para que houvesse a lise das hemácias.



Figura 19: Preparo de placa para teste

5.4.4 Preparo das placas para teste imunoenzimático anti-HRP2

Para a sensibilização das placas no teste anti-HRP2, 100 μL do anticorpo primário (MPFM-55A ICLLAB®, EUA) a 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram adicionados a cada poço da placa de ensaio (Maxysorp, Nunc, Denmark). Após incubação por 12-16 h a 4°C, o conteúdo dos poços foi descartado e 200 μL /poço de uma solução de bloqueio (PBS-BSA 2%) adicionada, sendo a placa mantida à temperatura ambiente por 2h. Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi novamente descartado e a placa lavada três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T).

5.4.5 Teste imunoenzimático anti-HRP2

No ensaio imunoenzimático anti-HRP2 (Noedl *et al.*, 2002) a cada poço da placa pré-sensibilizada foram adicionados 100 μL das amostras da cultura de *P. falciparum* hemolisadas. Em seis poços da placa foram adicionados 100 μL dos controles congelados nas primeiras 24 h (*background*). A placa foi então incubada por 1 h à temperatura ambiente, em câmara úmida, em seguida foi lavada três vezes com PBS-T, adicionando-se a cada poço 100 μL do anticorpo secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA) diluído a 1:5.000. Após incubação à temperatura ambiente por 1h, em câmara úmida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e 100 μL de uma solução de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) acrescentados a cada poço. A placa foi incubada por 5 a 10min à temperatura ambiente (Figura 20), ao abrigo da luz, e a reação interrompida adicionando-se 50 μL /poço de uma solução de ácido sulfúrico 1M (Figura 20). A leitura das absorbâncias foi realizada à 450 nm em espectrofotômetro de microplacas Spectramax 190 (leitor de ELISA).



Figura 20: Placa após a adição de TMB (coloração azul) e placa após adição de ácido sulfúrico (coloração amarela)

A partir do resultado obtido prosseguiu-se para o cálculo de concentração inibitória para 50 % do crescimento dos parasitos (IC_{50}).

5.4.6 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC_{50})

A inibição do crescimento de 50% dos parasitos foi determinada através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o programa Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), para determinar o valor de IC_{50} .

5.4.7 Cultivo de linhagens celulares

A linhagem celular de BGM (célula renal basal de macaco verde africano) foi cultivada como recomendado (Calvo-Calle *et al.*, 1994). A mesma foi mantida em garrafas, próprias para cultura, suplementadas em RPMI contendo 5 % de soro bovino fetal (SBF) e 40 mg/L de gentamicina. As células foram mantidas em estufa com 5 % de CO_2 , a 95 % de umidade e a 37 °C. O meio das garrafas foi substituído a cada dois dias. Após confluência de cerca de 80 %, a cultura de células foi repicada, ou utilizada na realização de ensaios de citotoxicidade. Quando necessário, o congelamento das células foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo 95 % de SBF e 5 % de DMSO.

5.4.8 Preparo das placas para o ensaio de citotoxicidade

Para o preparo das placas testes, as células foram lavadas com meio sem SBF, tratadas com 1 mL de tripsina-EDTA (Gibco) a 0,25 % e incubadas a 37 °C por 3 min, para que as células se descolassem da garrafa. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 9 mL de meio completo, seguido por centrifugação a 80 g por 5 min na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em meio completo contendo 5 % SBF. Após a contagem, em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para 5×10^3 /mL e 180 μ L acrescentados a cada poço da microplaca. As células foram incubadas por 12-16 h em estufa de CO_2 a 37 °C para adesão aos poços da microplaca. Em seguida, 20 μ L de meio completo contendo diferentes concentrações dos compostos (1000 - 1 μ g/mL) foram

adicionados aos poços da microplaca. As placas foram incubadas por 24 h à 37 °C, 5% de CO₂ e 95 % de umidade.

5.4.9 Ensaio de citotoxicidade utilizando o MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata, conforme descrito por Madureira e colaboradores (2002). Após o preparo das placas como descrito anteriormente, 20 µL de uma solução de Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich) na concentração de 5 mg/mL foram adicionados aos poços da placa (DENIZOT & LANG, 1986).

O sal MTT ((**30**) **Figura 21**) em solução apresenta coloração amarela e é incorporado pelas células viáveis que o reduzem em suas mitocôndrias através da desidrogenase succínica, reduzido ele é convertido em cristais de formazan ((**31**) **Figura 21**) de coloração púrpura que fica armazenada no citoplasma celular (BERRIDGE & TAN, 1993).

Após 3 h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e o corante presente nos fundos dos poços da placa diluído em uma solução de DMSO em um volume de 100 µL/poço (**Figura 21**). As microplacas foram então lidas em leitor de ELISA Spectramax 190, utilizando-se filtro de 570 nm.

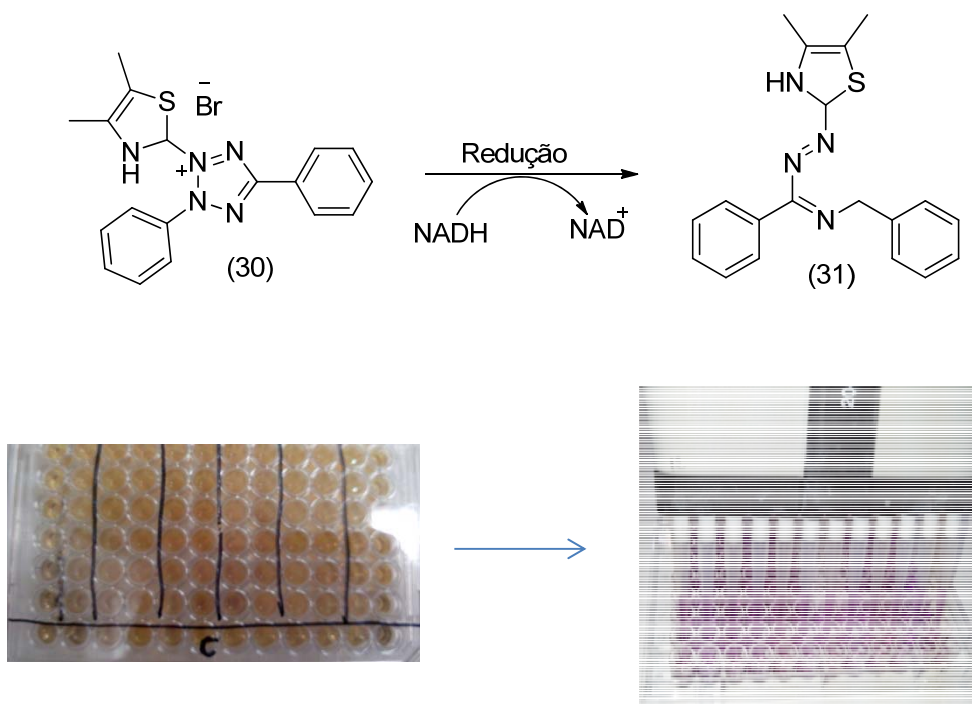


Figura 21: Ensaio de MTT

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese

Os compostos planejados foram sintetizados com sucesso e a confirmação de pureza dos mesmos foi verificada através da cromatografia líquida de alta eficiência, esta foi dificultada pela baixa solubilidade das moléculas nas condições utilizadas, porém através da observação do cromatograma (HPLC) verificou-se um mínimo de pureza de 80%. Obteve-se 100% de pureza nos compostos **28 a, b, d, e, f, g, h, i e k**; **29 f, g, h e k e 30 b, d, f, g, h, i, k e l**, ou seja, em 70% dos casos. Trinta moléculas foram sintetizadas, sendo 9 delas inéditas e suas estruturas podem ser observadas na **Figura 22**.

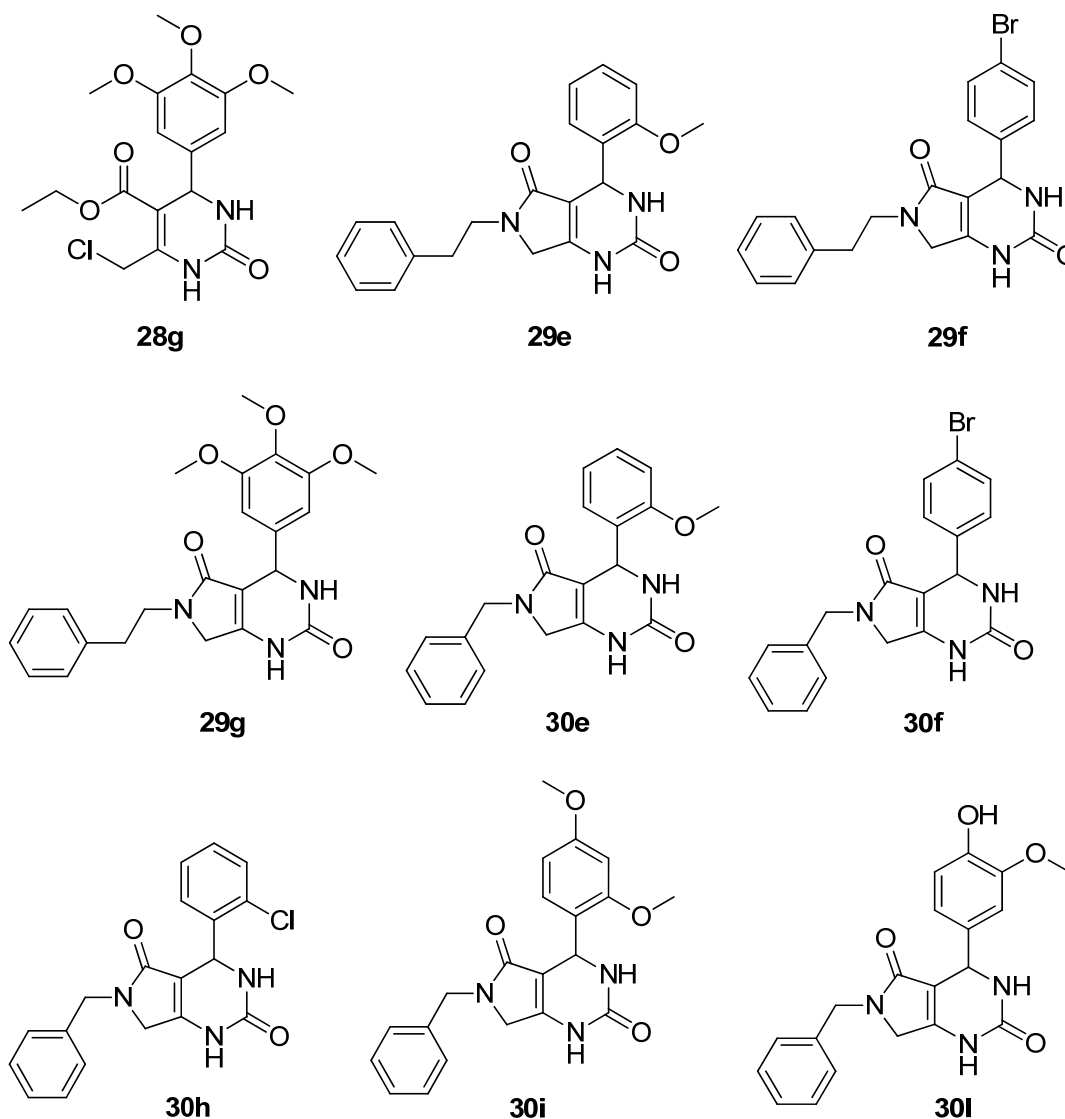
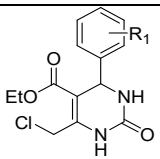
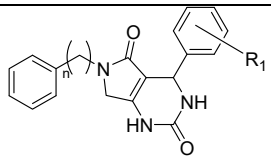


Figura 22: Compostos inéditos sintetizados neste trabalho

Os rendimentos obtidos na síntese variaram de insatisfatórios (10%) a bons (chegando a 84,4%), como pode ser visto na **Tabela 1**. Acredita-se que os mesmos possam vir a ser melhorados através da purificação prévia dos reagentes, já que existe a possibilidade de os aldeídos se oxidarem a ácidos carboxílicos na presença de ar, e os compostos oxidados não participarem da reação. Da mesma forma as aminas utilizadas na síntese dos compostos bicíclicos podem ser purificadas previamente.

Tabela 1: Rendimentos sintéticos

|  | |  | | | |
|---|------------|--|---|------------|-----------|
| Grupo R ₁ | Composto | Rend. (%) | n | Composto | Rend. (%) |
| H | 28a | 30 | 2 | 29a | 64 |
| | | | 1 | 30a | 62 |
| 4-OMe | 28b | 22 | 2 | 29b | 68,8 |
| | | | 1 | 30b | 40 |
| 3-Br | 28c | 38 | 2 | 29c | 54 |
| | | | 1 | 30c | |
| 4-Cl | 28d | 24 | 1 | 30d | 70 |
| | | | 2 | 29e | 67 |
| 2-OMe | 28e | 66 | 1 | 30e | 43 |
| | | | 2 | 29f | 64 |
| 4-Br | 28f | 17 | 2 | 29g | 49 |
| | | | 1 | 30g | 40 |
| 3,4,5 – tri-OMe | 28g | 63 | 2 | 29h | 55,6 |
| | | | 1 | 30h | 10,3 |
| 2-Cl | 28h | 39 | 2 | 29i | 35 |
| | | | 1 | 30i | 84,4 |
| 2,4 - OMe | 28i | 49 | 2 | 29i | 35 |
| | | | 1 | 30i | 84,4 |

| | | | | | |
|-------------------|------------|----|---|------------|------|
| 4-NO ₂ | 28j | 50 | - | - | - |
| 3,4 - OMe | 28k | 53 | 2 | 29k | 54 |
| | | | 1 | 30k | 64,2 |
| 3-OMe,4-OH | 28l | 60 | 1 | 30l | 45 |

A mudança nos grupos funcionais (R₁) nos aldeídos aromáticos não mostrou correlação com os rendimentos obtidos, levando a crer que no caso das DHPM os substituintes do anel não influenciam na reação ou que a etapa lenta não seja a de ataque a carbonila. Em relação aos compostos bicíclicos os substituintes do anel não tiveram influência sobre o rendimento.

Na ciclização das moléculas não foi utilizada a anilina por já haver relatos na literatura de que a reação não acontece mesmo elevando-se a temperatura da etapa de ciclização a 250°C (KAPPE, 2002).

6.2 Elucidação estrutural

A elucidação estrutural foi realizada utilizando as técnicas de RMN e IV conforme descrito no item 4.2.

A utilização da espectroscopia na região do infravermelho possibilitou a confirmação dos grupos funcionais presentes nas moléculas. Os compostos têm em comum duas bandas características: 3300 cm⁻¹ para deformação axial de N-H e 1670 cm⁻¹ para deformação axial C=O do núcleo diidropirimidinona, tendo como banda diferencial a banda em 1710 cm⁻¹ para deformação axial C=O de éster presente nas DHPM e a banda em 1650 cm⁻¹ característica de deformação axial de carbonila de amida nos compostos bicíclicos que surge no espectro em detrimento da banda característica de éster que desaparece, indicando o sucesso da transformação do grupo funcional.

Os espectros de RMN são bastante característicos para cada família de moléculas. No caso das DHPM temos pontos importantes no RMN de hidrogênio que confirmam a síntese dos compostos planejados como se pode observar na **Tabela 2**.

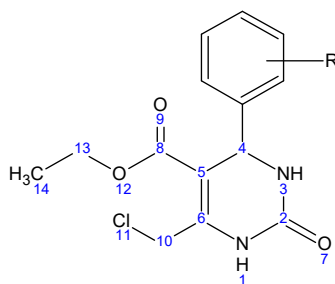


Tabela 2: Pontos característicos no RMN de ^1H

| Posição do H | δ ^1H (ppm)/ multiplicidade |
|--------------|--|
| 1 | 9,37 -9,6 / s |
| 2 | - |
| 3 | 7,39 – 8 / s |
| 4 | 5,1-5,2 / sl |
| 5 | - |
| 6 | - |
| 8 | - |
| 10 | 4,58-4,8 / 2d |
| 13 | 3,9-4,1 / q |
| 14 | 1 -1,2 / t |
| Aromáticos | 7 – 7,5/ dependente da posição do substituinte |

O primeiro sinal do espectro, em torno de 1 ppm, é um tripleto típico pertencente à metila que tem um metileno como vizinho e acopla com seus hidrogênios, da mesma forma os hidrogênios do metileno ao acoplarem aparecem como um quarteto em torno de 4 ppm.

Destaca-se os sinais H₂-10 que pela posição e proximidade do cloro faz com que cada um dos H se encontre em ambientes distintos resultando em 2 dupletos com valor de *J* correspondente ao de hidrogênios geminais de carbono sp³ (9-15Hz).

O sinal do hidrogênio enantiotópico aparece em torno de 5 ppm como um simpleto largo ou desdobrado devido a seu acoplamento com o hidrogênio N-H da posição 3 da molécula que aparece em torno de 7,8 ppm, este acoplamento pode ser observado através do espectro do experimento de COSY ^1H - ^1H na **Figura 23**.

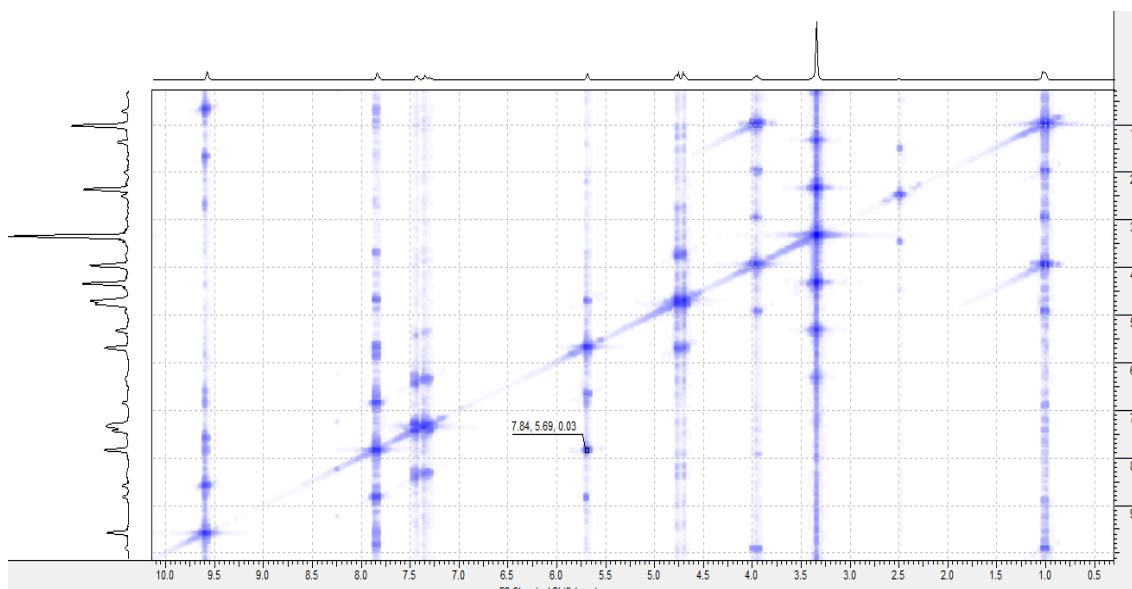


Figura 23: Espectro COSY que mostra o acomplamento entre N-H e o hidrogênio enantiotópico do composto 28h (evidenciado na figura).

Os hidrogênios do anel aromático formam um multipletos típico, que sofre pequenas variações de acordo com o substituinte e a posição do mesmo, mas sempre mantendo seus valores típicos entre aproximadamente 7 e 7,5 ppm. Os hidrogênios ligados a heteroátomo (N-H) tem seus picos em torno de 7,8 e 9,5 ppm e são simpletos típicos.

Para ajudar na elucidação dos compostos foi utilizado o experimento DEPT 135 que faz com que os picos de carbono primário e terciário estejam voltados para cima enquanto os carbonos secundários e quaternários estejam voltados para baixo facilitando assim a identificação dos picos.

A metila ligada ao grupo metileno aparecerá como um pico típico voltado pra cima absorvendo em torno de 15 ppm, enquanto a metila do grupo metoxila absorve em torno de 55 ppm devido à eletronegatividade do oxigênio, pelo mesmo motivo o grupo metileno ligado ao oxigênio absorve na mesma faixa, somente um pouco mais deslocado para a esquerda, em torno de 60 ppm. O metileno ligado a cloro soma-se ao sinal do metileno ligado ao oxigênio devido ao efeito da eletronegatividade do cloro sobre o mesmo.

Os carbonos quaternários presentes na ligação dupla (5 e 6) aparecem em região típica, de 100 a 150 ppm, no caso destes compostos um em torno de 100 e um em torno de 150 em razão dos grupos próximos a eles. Enquanto os carbonos quaternários presentes na carbonila irão aparecer na região típica, 150 a 185, no caso dos compostos sintetizados neste trabalho elas aparecem em torno de 150 e 165 ppm.

O carbono ligado ao hidrogênio enantiotópico aparece em torno de 52 ppm, sua quiralidade não influencia no deslocamento químico. Enquanto os carbonos da porção

aromática absorvem em torno de 128 ppm tendo seu deslocamento influenciado pelo substituinte presente no anel aromático.

A presença do cloro nas diidropirimidinonas permitiu empregar a feniletilamina e a benzilamina em uma reação de substituição nucleofílica com subsequente ciclização intramolecular *one-pot* (**Figura 24**) que gera a família de pirrolo[3,4-*d*]pirimidinodionas planejada, a síntese é realizada na presença de trietilamina.

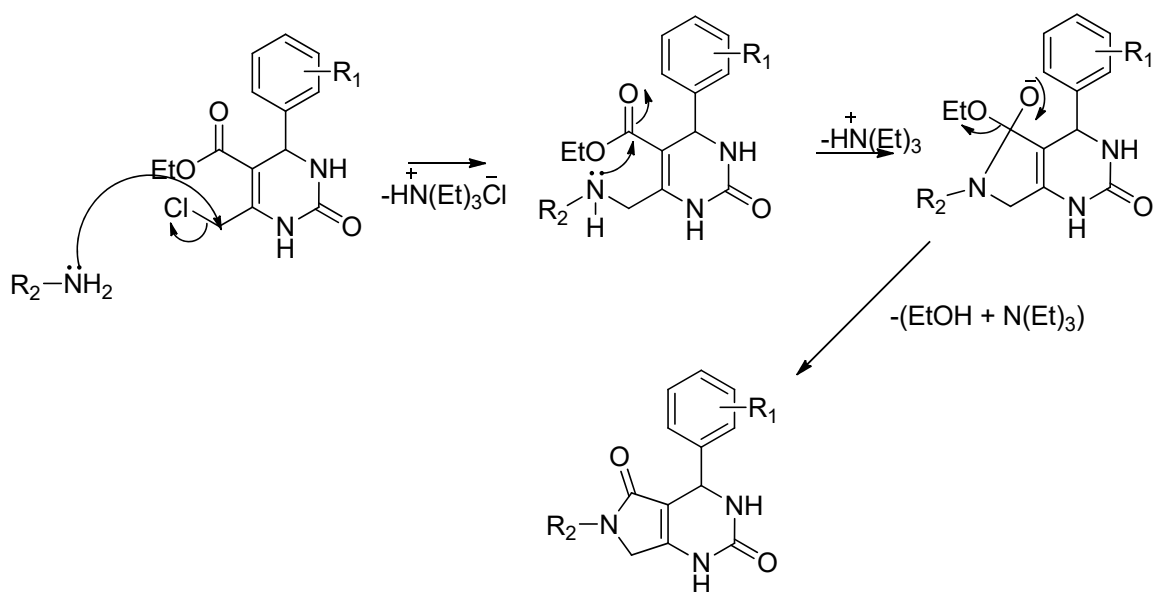


Figura 24: Proposta de mecanismo para síntese das pirrolo[3,4-*d*]-pirimidinodionas

Muitos pontos se mantêm nos espectros tanto de hidrogênio quanto de carbono, porém é importante destacar os pontos que confirmam a transformação do composto monocíclico em bicíclico, estes podem ser observados na **Tabela 3**.

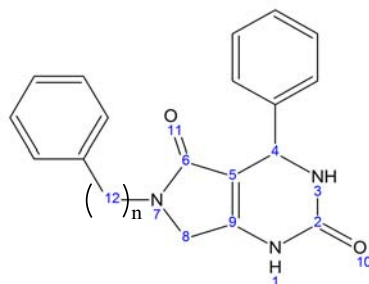


Tabela 3: Pontos característicos no RMN de ^1H

| Posição do ^1H | N=1 δ ^1H (ppm) | N=2 δ ^1H (ppm) |
|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 7,5 | 9,5 |
| 2 | - | - |
| 3 | 9,5 | 7,5 |
| 4 | 5,2 | 5 |
| 5 | - | - |
| 6 | - | - |
| 8 | 4,3 e 4,5 | 3,8 |
| 9 | - | - |
| 12 | 3,8 e 3,9 | 2,7 |
| Aromáticos | 7 – 7,5 | 7,1-7,5 |

Nos espectros de RMN de ^1H dessas moléculas existe a ausência de um dos pontos característicos das diidropirimidinonas que é o H-10 que aparecia como 2 dupletos por volta de 4,6 e 4,7. No caso dos derivados com benzilamina este conjunto de sinais dá lugar a 2 dupletos em torno de 3,8 e 3,9 com $J = 18$ Hz, o qual tende a coalescer tornando-se visualmente quase um quarteto, e 4,3 e 4,5 com $J = 15$ Hz, valores encontrados normalmente em hidrogênios geminais que se encontram em ambientes distintos por conta da conformação da molécula ou do posicionamento dos mesmos. No caso dos derivados da feniletilamina os 2 grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) conectando um anel benzênico e o nitrogênio aparecem como um multiplete em torno de 3,8 ppm e um tripleto largo em torno de 2,7 ppm, por conta dos ambientes químicos que os hidrogênios se encontram acontecem muitos desdobramentos e não observam-se os dois tripletos bem definidos que seriam esperados. Estas mudanças nos espectros confirmam claramente a ciclização da molécula. Novos sinais aparecem na região aromática sendo condizentes com o novo anel aromático pertencentes às aminas que se adicionam ao esqueleto da molécula.

Os sinais presentes no espectro de carbonos não mudam muito, novos sinais aparecem na região típica de aromático, os carbonos da etoxila deixam de existir assim como o metileno ligado a cloro. Os novos metilenos adicionados ao composto absorvem em região característica, em torno de 47 ppm no caso do metileno ligado a amida e variando de 35 a 50 no caso dos metilenos que conectam o anel aromático ao grupo N-H.

A técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS) não pode ser utilizada na elucidação dos compostos devido a falta de estabilidade térmica das 4-cloropirimidinonas que sofrem auto-ciclização em temperaturas acima de 160°C (KAPPE, 2002) e no caso das pirrolo[3,4-d]-pirimidinodionas devido ao seu alto peso molecular.

6.3 Avaliação da atividade antiplasmodial e citotoxicidade dos compostos

A atividade antiplasmodial *in vitro* dos compostos foi testada utilizando-se o clone W2, cloroquina resistente, de *P. falciparum* através de ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína rica em histidina e alanina (HRPII) específica do parasita que é essencial a sua sobrevivência. A partir das leituras de absorbância obtidas nos experimentos realizou-se a construção de curvas dose-resposta e seguiu-se o cálculo de IC₅₀ das moléculas, algumas delas podem ser vistas na **Figura 21**, curvas semelhantes foram construídas para as absorbâncias obtidas no ensaio citotóxico, feito utilizando-se o ensaio de MTT e a linhagem celular BGM, para a determinação do MDL₅₀ de cada composto.

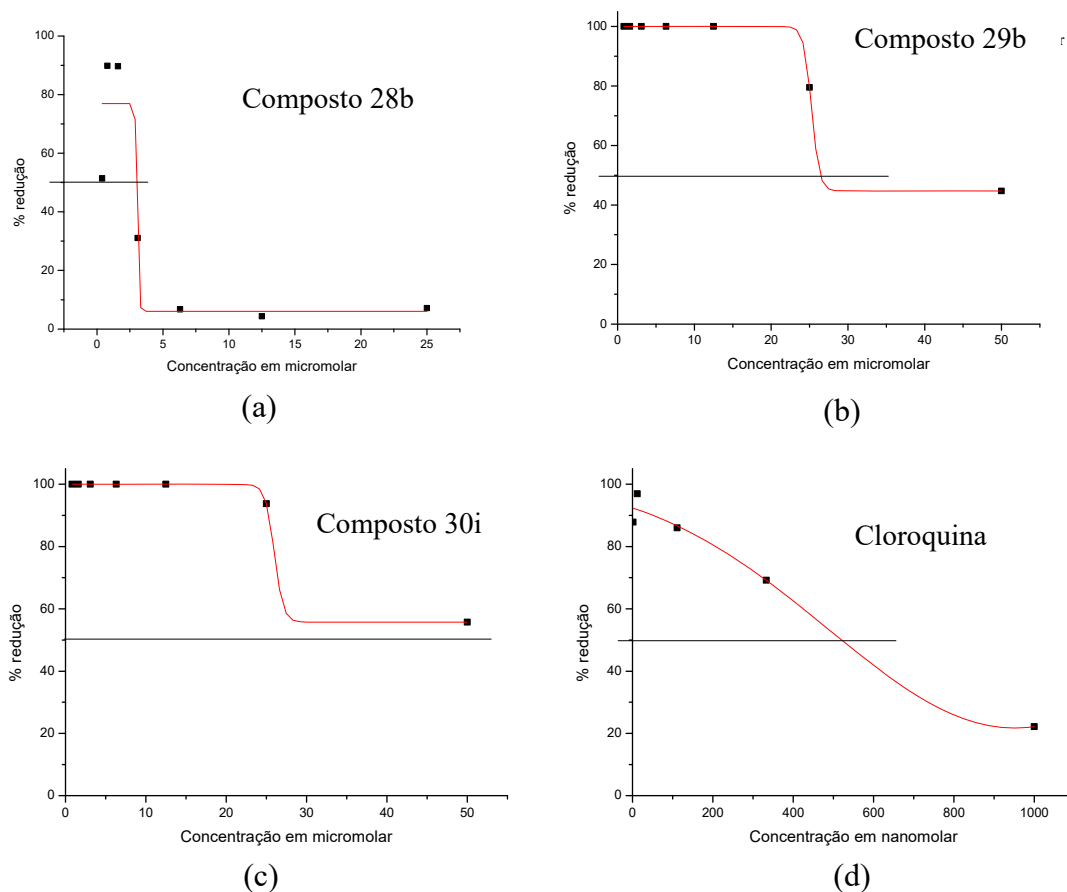
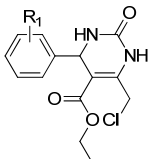
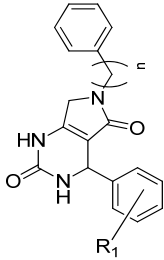
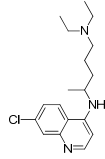


Figura 25: Curvas dose-resposta de (a) composto ativo abaixo de 10 μM, (b) composto ativo entre 10 e 50 μM, (c) composto não ativo abaixo de 50 μM e (d) composto controle

A **Tabela 4** reunindo os valores de IC_{50} , MDL_{50} e IS foi construída com os valores encontrados nas curvas, foi dividida em 3 partes: as DHPMe os compostos monocíclicos com $n=1$ e $n=2$.

Tabela 4: Resultados da atividade biológica e citotoxicidade

|  | |  | | | | |  | | | | | | |
|---|------------|--|------------------------|------|------------|-----------------------|---|-----|------------|-----------------------|------------------------|------|-----------------------|
| DHPM | | n = 2 | | | | | n = 1 | | | | | | |
| R ₁ | Composto | IC ₅₀ (μM) | MDL ₅₀ (μM) | IS | Composto | IC ₅₀ (μM) | MDL ₅₀ (μM) | IS | Composto | IC ₅₀ (μM) | MDL ₅₀ (μM) | IS | IC ₅₀ (μM) |
| H | 28a | 6,38 | 24,6 | 3,85 | 29a | >50 | >>10 | - | 30a | >50 | >>100 | - | 0,55 |
| 4-OMe | 28b | 2,98 | 57 | 19 | 29b | 26,4 | 24,6 | 0,9 | 30b | >50 | >>100 | - | |
| 3-Br | 28c | 6,17 | 21,7 | 3,5 | 29c | >50 | 6,9 | <0, | 30c | >50 | - | - | |
| 4-Cl | 28d | 1,96 | 2,5 | 1,27 | 29d | - | - | - | 30d | 45 | 86 | 1,9 | |
| 2-OMe | 28e | 12,2 | 23,8 | 1,95 | 29e | 22 | 56 | 2,5 | 30e | >50 | >>100 | - | |
| 4-Br | 28f | 1,76 | 22 | 12,5 | 29f | >50 | 18,6 | 2,5 | 30f | 26 | >>100 | >3,8 | |
| 3,4,5-tri-OMe | 28g | 24,1 | 21,7 | 0,9 | 29g | >50 | 6,2 | <0, | 30g | >50 | >>100 | - | |
| 2-Cl | 28h | 3,12 | 77 | 24,6 | 29h | >50 | >>10 | - | 30h | 26,7 | >>100 | >3,8 | |
| 2,4-di-OMe | 28i | 2,98 | 9,7 | 3,25 | 29i | - | - | - | 30i | >50 | >>100 | - | |
| 3,4-di-OMe | 28k | 6 | 26,2 | 4,4 | 29k | 25,6 | 8,9 | 0,3 | 30k | >50 | >>100 | - | |
| OMe,4- | 28l | 3 | 24,5 | 8,2 | 29l | - | - | - | 30l | >50 | >>100 | - | |

De modo geral os compostos apresentaram atividade antiplasmodial *in vitro*, embora com valores elevados (em micromolar). Analisando os resultados, observa-se que boa parte das DHPMs sintetizadas apresentaram valores de IC₅₀ entre 1 e 10 µM, com exceção apenas para os compostos **28e** e **g**. Visivelmente a estratégia de ciclização empregando aminas primárias (compostos **29** e **30**) fez com que o valor de IC₅₀ aumentasse em relação aos compostos monocíclicos (**28 a-l**), mostrando que esta modificação provavelmente não é boa para esta atividade. Mesmo assim, salienta-se que cinco derivados cíclicos (**29 k, b, e** e **30 f, h**) apresentaram um valor de IC₅₀ entre 20 e 30 µM.

Em relação à posição dos substituintes nos compostos sintetizados, não se observa, a princípio, uma influência do caráter eletrônico ou da posição dos substituintes na atividade, pois a tabela mostra grupos doadores e retiradores de elétrons nas posições 2, 3 e 4 do anel aromático apresentando valores de IC₅₀ entre 1 e 10 µM. Por exemplo, comparando-se os compostos **28d** e **28b** em que temos o grupo 4-Cl retirador de elétrons e 4-OMe doador de elétrons, respectivamente, observamos valores comparáveis de IC₅₀. Pode-se comparar também os compostos **28h** e **28d** em que temos o mesmo grupo retirador (Cl) ligado ao anel aromático modificando-se apenas a posição mas apresentando valores comparáveis de IC₅₀. Outro exemplo são os compostos **28b** e **28e** que tem o mesmo grupo doador (OMe) nas posições 2 e 4, mas IC₅₀ um pouco diferentes (12,2 e 2,98 respectivamente) mostrando que não existe uma relação direta entre o caráter eletrônico ou a posição do substituinte no anel. Observou-se que a tri-substituição não é favorável para a atividade, fazendo com que a DHPM tri-substituída tenha o maior valor de IC₅₀, comparável aos compostos bicíclicos.

Os melhores valores de IC₅₀ não são tão bons quando comparados aos antimaláricos utilizados como a artemisinina (IC₅₀= 49,4 nM), quinina (IC₅₀= 149 nM) e a cloroquina (IC₅₀ = 15,62 nM) sendo estes valores relativos a cepa sensível a cloroquina (WALSH et al, 2007) ou ainda quando comparados a outros compostos em estudo sejam eles híbridos ou análogos dos já existentes como é o caso de novos 4-aminoquinolínicos que tem sua atividade em concentrações nanomolares (MAQ e BAQ com IC₅₀ de 260 e 550nM, respectivamente) (AGUIAR *et al*, 2012). Mesmo com a atividade ainda em níveis não ótimos, podemos considerar o conjunto de resultados como promissor, pois futuras otimizações podem levar à melhoria da atividade biológica dos compostos.

Pôde-se observar que a ciclização na maior parte dos casos, com exceção das DHPM substituída em orto, no caso do cloro, e não substituída, diminuiu a toxicidade das pirrolo-[3,4-d]-pirimidinonas com substituinte benzilamina (n=1) e volta a aumentar nos derivados com substituintes feniletilamina (n=2). Este fato indica que, em termos de citotoxicidade, um número menor de carbonos na cadeia lateral é favorável para a diminuição da citotoxicidade. Em relação às DHPMs, não é possível estabelecer com este conjunto de dados experimentais uma relação direta entre a posição dos substituintes e a toxicidade apresentada pelos mesmos. Ao compararmos substituintes com caráter eletrônico diferente na posição 4 do anel aromático, como é o caso dos compostos **28b** e **28d**, substituídos por um grupo doador (OMe) e retirador (Cl) respectivamente observamos valores distintos (57 e 2,5 µM), o que é válido também quando comparamos os mesmos substituintes na posição 2 do anel (**28e** e **28h**), onde também se obtém valores que não são comparáveis (23,8 e 77). Quando confrontamos os valores do mesmo substituinte em posições distintas, casos dos compostos **28h** e **28d**, assim

como **28e** e **28b**, substituídos por Cl e OMe respectivamente, observamos valores não comparáveis, 77 e 2,5 μM no caso do cloro e 23,8 e 57 μM no caso do OMe. No caso de substituintes de mesmo caráter eletrônico, caso do cloro e do bromo, na mesma posição os valores de citotoxicidade são distintos (2,5 e 22 μM no caso de cloro e bromo na posição 4, respectivamente).

Devido às variações observadas nos resultados obtidos de citotoxicidade, mais estudos são necessários para identificar a causa da toxicidade destes compostos.

O índice de seletividade foi calculado dividindo-se o valor de MDL_{50} pelo valor de IC_{50} de cada composto. A análise mostrou 3 diidropirimidinonas com índice de seletividade acima de 10 (**28 b**, **f** e **h**), e duas pirrolo[3,4-*d*]-pirimidinodionas que apesar do alto valor de IC_{50} mostrou baixíssima toxicidade.

Para as pirrolo[3,4-*d*]-pirimidinodionas que tiveram seu IC_{50} acima de 50 μM e que tiveram MDL_{50} acima de 100 μM não foram feitos novos testes afim de se aferir o valor exato de IC_{50} e de MDL_{50} já que o alto valor de IC_{50} torna a sua possível utilização inviável.

Os compostos que apresentaram valores de IC_{50} abaixo de 10 μM e baixa toxicidade resultando num bom IS e protótipos para futuras otimizações podem ser vistos na **Figura 26**, eles possuem em comum o núcleo diidropirimidinona (grupo farmacofórico das moléculas) e substituintes com caráter eletrônico diferentes em diferentes posições.

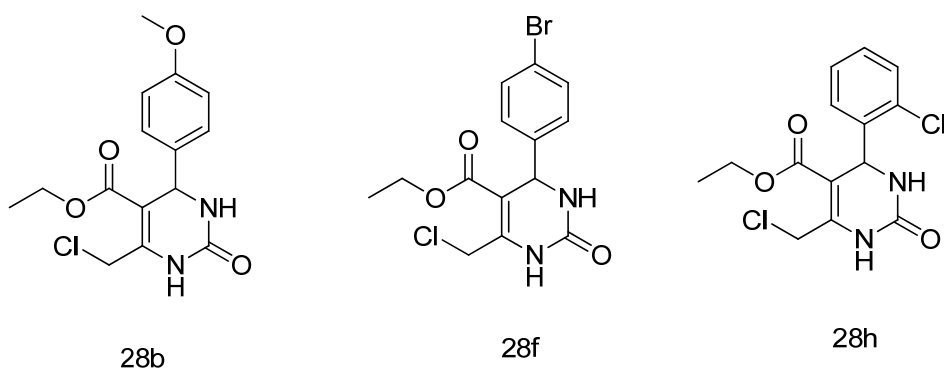


Figura 26: Compostos sintetizados com resultados promissores para futuras otimizações

O possível mecanismo de ação destas moléculas pode ser proposto tendo em vista que o protótipo utilizado para o planejamento de toda a rota sintética foi o monastrol (**22**) **Figura 27**) que possui íntima semelhança estrutural com as moléculas sintetizadas (**28**, **29** e **30**) **Figura 27**). Sabe-se que o monastrol é comprovadamente um inibidor da pteridina redutase de *Leishmania donovani* (KAUR *et al*, 2010) que é uma enzima capaz de agir como uma via alternativa para a redução do ácido fólico quando a diidrofolato redutase está inibida (por antifolatos, por exemplo), sendo os compostos inibidores desta enzima na maior parte das vezes eficazes contra vários parasitas protozoários. O metotrexato (**32**) **Figura 27**) é um composto já empregado na terapêutica como um importante agente antineoplásico, que age sobre a via dos folatos inibindo a diidrofolato redutase, apresentando uma grande semelhança estrutural com o ácido fólico e também uma certa semelhança molecular com as moléculas sintetizadas neste trabalho (**33**) **Figura 27**).

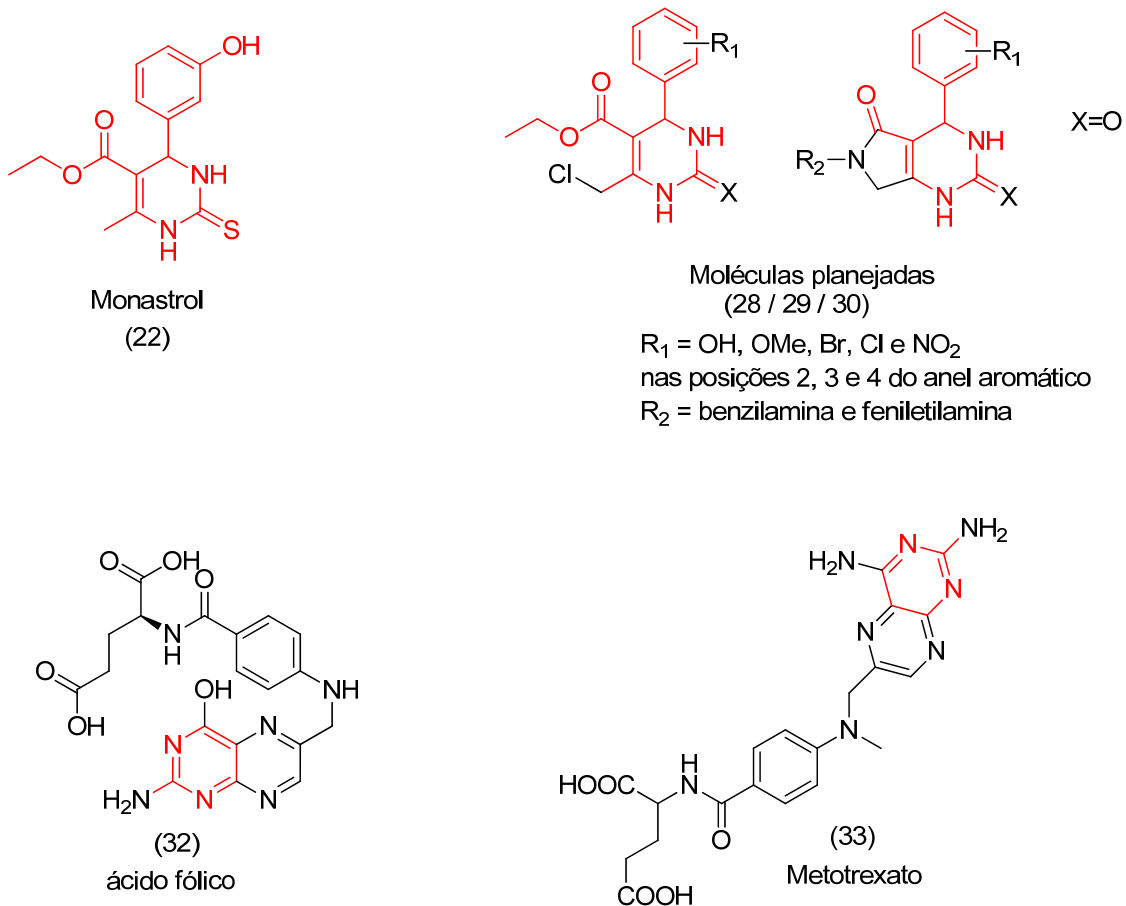


Figura 27: Semelhanças estruturais existentes

Como apresentado anteriormente, importantes compostos empregados na quimioterapia antimalárica são também pertencentes à classe dos antifolatos (pirimetamina, sulfadoxima, proguanil), o que pode sugerir que os compostos sintetizados possam estar agindo através dessa via. Entretanto, essa hipótese deve ser comprovada a partir de ensaios específicos com a enzima isolada e também através de modelagem molecular.

7 CONCLUSÕES

A reação de Biginelli se mostrou uma ferramenta útil na síntese de compostos com elevado grau de pureza em quantidades suficientes para os testes subsequentes. Foram sintetizadas com sucesso 18 pirrolo[3,4-d]pirimidinodionas, sendo 8 inéditas. A baixa toxicidade aliada aos dados de IC50 de 5 moléculas, norteiam para modificações estruturais voltadas para a melhoria da atividade antiplasmodial. Foram sintetizadas 12 DHPMs com sucesso, sendo uma inédita. Os dados de IC50 aliados a baixa citotoxicidade indicam que esses compostos são importantes protótipos para futuras otimizações estruturais.

PERSPECTIVAS

Realizar testes in vivo das moléculas sintetizadas que apresentaram bom valor de IC50 e baixa toxicidade utilizando modelo murino.

Otimizar as famílias de moléculas sintetizadas buscando-se melhores valores de IC50 e/ou menor toxicidade.

Investigar a atividade in vivo contra formas hepáticas de *P. berghei* em modelo murino.

Separar os enantiômeros por meio da técnica de HPLC com uso de coluna quiral e testá-los individualmente para avaliar o efeito da estereoquímica sobre a atividade e toxicidade.

9 BIBLIOGRAFIA

Agência Fiocruz de notícias – Disponível em <<http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> acesso em 24 de dezembro de 2014

Aguiar, A. C. C.; Rocha, E. M. D.; Souza, N. B. D.; França, T. C.; Krettli, A. U. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 831-845, **2012**

Alvim, H.G.O.; Efeito de líquido iônico sobre a reação de Biginelli em condições de catálise homogênea e heterogênea. 2013. 84 f. Dissertação (mestrado em Tecnologias Química e Biológica) - Instituto de química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013

Anastas, P. T.; Warner, J. C. Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press: New York, 1998, p.30

Angus, B.J.; Thaiaporn, I.; Chanthapadith, K.; Suputtamongkol, Y.; White, N.J. Oral Artesunate Dose-Response Relationship in Acute Falciparum Malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 778-782, **2002**.

Aquino, I.; Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos. 2010. 81f. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

Atwal, K. S., O'Reilly, B. C., Gougoutas, J. Z., Malley, M. F. Synthesis of substituted 1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-2-thioxo-5- pyrimidinecarboxylic acid esters. *Heterocycles*, v. 26, p. 1189-1192, **1987**.

Baio, P. A.; A Importância Do Conhecimento Clínico E Epidemiológico Da Malária nos Países Não Endêmicos: Perspectivas Futuras Para Europa. 2011. 54f. Dissertação (6º ano de Medicina Integrado Medicina) – Instituto de ciências biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, 2011.

Batalha, P.N.; Recentes Avanços em Reações Multicomponentes: Uma Perspectiva Entre os Anos de 2008 e 2011; *Rev. Virtual Quim.*, v. 4 (1), p. 13-45, **2012**.

Berridge, M.V. & Tan, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. V. 303, P. 474-482. **1993**

Bézivin C., Tomasi S., Lohézic-Le F.D., Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, v. 10, p. 499-503, **2003**.

Biginelli, P. The urea-aldehyde derivatives of acetoacetic esters. *Gazzetta Chimica Italiana* **1893**, 23, 360

Calvo-Calle J., Moreno A., Eling W., Nardin E. *In vitro* development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. *Exp Parasitol*, v. 79, p. 362-373, **1994**.

Canto, R.F.S.; Barbosa, F.A.R.; Nascimento, V.; Oliveira, A.S.; Brighente, I.M.C.; Braga, A.L. Design, synthesis and evaluation of selenodihydropyrimidinones as potential multi-targeted therapeutics for Alzheimer's disease. *Org. Biomol. Chem.*, v. 12, p. 3470–3477, **2014**.

Carvalho, G.A.L.P.; Análise molecular dos genes dhfr e dhps associados à quimioresistência a SP em amostras de *Plasmodium falciparum* de Luanda, Angola. 2008. 113f. Dissertação (Mestrado em biologia parasitária), Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, 2008.

Chiang, A.N.; Valderramos, J.; Balachandran, R.; Chovatiya, R. J.; Mead, B. P.; Schneider, C.; Bell, S.L.; Klein, M.G.; Hury, D.M.; Chen, X.S.; Day, B.W.; Fidock, D.A.; Wipf, P.; Brodsky, J.L. , Select pyrimidinones inhibit the propagation of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 1527–1533, **2009**.

Coura, J.R.; Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ª ed – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013

Cox-Singh, J.; Davis, T.M.; Lee, K.S.; Shamsul, S.S.; Matusop, A.; Ratnam, S.; Rahman, H.A.; Conway, D.J.; Singh, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* v. 46, p. 165-171. **2008**

Cunico, W.; Carvalho, S.A.; Gomes, C.R.B.; Marques, G.H. Fármacos antimalariais – história e perspectivas. *Rev. Bras. Farm.*, 89(1): 49-55, **2008**

Daniel, E. P. S. K.; Caracterização dos genes pfdhfr e pfdhps associados a quimiorresistência à sulfadoxina/pirimetamina em isolados de *Plasmodium falciparum* de Lubango, Angola. 2012. 83f. Dissertação (Mestrado em biologia parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, 2012

Denizot F and Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* v. 89, p.271-277. **1986**.

Dos Santos, N.P., Pinto, A.C., A mata é sua farmácia – a pesquisa de plantas brasileiras para o combate de doenças tropicais no século XIX. *Rev. Virtual Quim.*, v. 4 (2), p. 162-172, **2012**.

Drug for Neglected Disease initiative – disponível em << <http://www.dndi.org/> >>. Acessado em fevereiro de 2014

Fidock, D.A.; Rosenthal, P.J; Croft, S.L.; Brun, R.; Nwaka, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 509-520, **2004**.

França, T.C.C.; Santos, M.G.; Figueroa-Villar, J.D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 5, 1271-1278, **2008**

Galardo, A.K.R., A importância dos *Anopheles darlingi* root, 1926 e *Anopheles marajoara Galvão e Damasceno*, 1942 na transmissão de malária no município de Macapá/ AP – Brasil, 2010, 147f. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2010

Gangjee, A.; Jain, H. D.; Phan, J. Dual Inhibitors of Thymidylate Synthase and Dihydrofolate Reductase as Antitumor Agents: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Classical and Nonclassical Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine Antifolates. *J. Med. Chem.* v.49, p.1055-1065, **2006**

George, T.; Tahilramani, R.; Mehta, D.V. Condensed Heterocycles from 5-Ethoxycarbonyl-6-methyltetrahydropyrimidin-2-ones. *Synthesis*, **405**, **1975**.

Godoi, M.N., Costenaro, H.S.; Kramer, E.; Machado, P.S.; D'Oca, M.G.M. Síntese do monastrol e novos compostos de Biginelli promovida por In(OTf)₃; *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 6, 1010-1013, **2005**

Graebin, C. S.; Uchoa, F. D.; Bernardes, L. S. C.; Campo, V. L.; Carvallho, I.; Eifler-Lima, V. L. *Anti-infective Ag. Med. Chem.*, 8, 345, **2009**.

Greenwood, B. M.; Fidock, D. A.; Kyle, D. E.; Kappe, S. H. I.; Alonso, P. L.; Collins, F. H.; Duffy, P. E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 4, p. 1266-1276, **2008**.

Hantzsch, A. Synthesis of pyridine derivatives from acetoacetic ester and aldehydeammoniak. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1882**, 215, 1

Hay, S. I.; Guerra, C. A.; Tatem, A. J.; Noor, A. M.; Snow, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 4, n. 6, p. 327-336, **2004**.

Kappe, C. O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type — a literature survey. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 1043, **2000**.

Kappe, C. O., Stadler, A. The Biginelli dihydropyrimidinone synthesis. *Org. React.*, v. 63, p. 1-116, **2004**.

Kaur, J.; Sundar, S.; Singh, N. Molecular docking, structure–activity relationship and biological evaluation of the anticancer drug monastrol as a pteridine reductase inhibitor in a clinical isolate of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*, v. 65, p. 1742–1748, **2010**

Kim, J.; Ok, T.; Park, C.; So, W.; Jo, M.; Kim, Y.; Seo, M.; Lee, D.; Jo, S.; Ko, Y.; Choi, I.; Park, Y.; Yoon, J.; Ju, M. K.; Ahn, J.; Kim, J.; Han, S. J.; Kim, T. H.; Cechetto, J.; Namc, J.; Liuzzi, M.; Sommer, P.; No, Z. A novel 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one: HIV-1 replication inhibitors with improved metabolic stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 2522-2526, **2012**.

Kolosov, M.A.; Orlov V.D.; Beloborodov D.A.; Dotsenko V.V. A chemical placebo: NaCl as an effective, cheapest, non-acidic and greener catalyst for Biginelli-type 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones (-thiones) synthesis, *Mol Divers*, v.3, p.5–25. **2009**

Kumar, N. V.; Patil, A. D.; Kokke, W. C.; Bean, M. F.; Freyer, A. J.; Debrosse, C.; Mai, S.; Truneh, A.; Carte, B.; Novel Alkaloids from the Sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp120-Human CD4 Binding; *J. Org. Chem.*, 60, 1182-1188, **1995**.

Kurti, L.; Czako, B. *Strategic applications of name reactions in organic synthesis*. Elsevier Academic Press, Boston, 2005.

Kushnir, V. M.; Kushnir, O. V.; Vovk, M. V. Synthesis and growth-stimulating activity of 4-aryl-5-(ethoxycarbonyl)-6-[(triphenylphosphonio)methyl]-3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidinone chlorides. *Ukrainskii Khimicheskii Zhurna.* 75(11-12), 111-114. **2009**

Lambros C. e Vanderberg J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 65:418-420, **1979**.

Lebed' P, Kos P, Polovinko V, Tolmachev A, Vovk M. Synthesis of new polyfunctional 5,6,7,8-tetrahydroimidazo-[1,5- c]pyrimidin-5-ones by the aza-Wittig reaction followed by intramolecular cyclization and 1,3-prototropic shift. *Russian Journal Of Organic Chemistry.* 45, 6, 921-927, **2009**

Lee, K.; Cox-Singh, J.; Brooke, G.; Matusop, A.; Singh, B. Plasmodium knowlesi from archival blood films: Further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. *Int J Parasitol.* V. 39 (10), p. 1125–1128, **2009**.

Leite, F.H.A.; Fonseca, A.L.; Nunes, R.R.; Júnior, M.C.; Varottis F.P.; Taranto, A.G. Malária: Dos velhos fármacos aos novos alvos moleculares. *BBR – Biochemistry and biotechnology reports.* v.2, n.4, p. 59-76, **2013**

Madureira M. C., Martins A. P., Gomes M., Paiva J., Proença da Cunha A., Rosário V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S Tomé and Príncipe islands. *J. Ethnopharmacol* 8:23–29, **2002**.

Magalhães, J.L.; Estratégia governamental para internalização de fármacos & medicamentos em doenças negligenciadas. 2010. 84f. Tese (doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Mannich, C. Synthesis of β -ketonic bases. *Journal of the Chemical Society*, v. 112, p. 634. **1917**

Mayer, T.U. *et al.* Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotypic-based screen. *Science*, v. 286, p. 971-974. **1999**

Ministério da saúde – Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e manuais técnicos, 2ª edição. Brasília / DF. **2009**

Morel, CM; Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(8):1522-1523, ago, 2006

Noedl H. C., Wongsrichanalai R., Miller K., Myint S., Looareesuwan Y., Sukthana V., Wongchotigul H., Kollaritsch G., Wiedermann W., Wernsdorfer. 2002. *Plasmodium falciparum*: effect of anti-malarial drugs on the production and secretion characteristics of histidine-rich protein II. *Exp Parasitol* 102:157-163, **2002**.

Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M.V.; Brasil, P.; Ladislau, J.L.; Tauil, P.L.; Daniel-Ribeiro, C.T. Malaria in Brazil: an overview, *Malaria Journal*, 9:115, **2010**.

Overman, L. E.; Aron, Z.D. The tethered Biginelli condensation in natural product synthesis. *Chem. Commun.* p. 253–265, **2004**.

Passerini, M. Isonitriles. II. Compounds with aldehydes or with ketones and monobasic organic acids. *Gazzetta Chimica Italiana.* v.51, p.181. **1921**

Pérez, R.; Beryozkina, T.; Zbruyev, O. I.; Haas, W.; Kappe, C. O. *J. Comb. Chem.* 4, 501, **2002**.

Peters, T. *et al.* Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 372, p. 291-299, **2006**.

Pina-Costa, A.; Brasil, P.; Santi, S.M.; Araujo, M.P.; Suárez-Mutis, M.C.; Santelli, A.C.F.S.; Oliveira-Ferreira, J.; Lourenço-de-Oliveira, R.; DanielRibeiro, C.T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *MEM INST OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO*, v. 109(5), p. 618-633, **2014**

Pinheiro, P.N.Q. ; Schalcher, T. R. ; Ferreira, M. E. S. ; Campos, A. R. F.; Peniche, J.S.R. Quimioterapia da malária causada por *Plasmodium falciparum*. *Revista Paraense de Medicina*, v. 27, p. 63-67, **2013**.

Raju, B. C.; Rao, R. N.; Suman, P.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Shaik, T. B.; Kalivendi, S. V. Synthesis, structure–activity relationship of novel substituted 4H-chromen-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates as potential anti-mycobacterial and anticancer agentes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 2855-2859, **2011**.

Ralph, Stuart A.; van Dooren, Giel G.; Waller, Roos F.; Crawford, Michael J.; Fraunholz, Martin J.; Foth, Bernardo J.; Tonkin, Christopher J.; Roos, David S. & McFadden, Geoffrey I., Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Reviews*, 2:203-216, **2004**.

Ramos, L.M., Reações de Biginelli Promovidas por um novo Catalisador de Ferro Ionicamente Marcado. 2012.198f. Tese (doutorado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012

Rocha, D.R; Ferreira, V.F.; Santos, W.C.; Aspectos da Síntese Orgânica no desenvolvimento de Métodos e de Moléculas Biologicamente Ativas, *Revista Processos Químicos*, Jan / Jun de **2008**.

Sena, M.M.; Estudos Visando à Síntese de Organocatalisadores do Tipo Sulfonilamidas/Uréias Quirais e a Síntese Diastereosseletiva de Amino ésteres Secundários Não Naturais via Reações de Ugi (U-5C-4CR), Mediada por Ácidos de Lewis. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, 2012

Singh, O. M.; Singh, S. J.; Devi, M. B.; Devi, L. N.; Singh, N. I.; Lee, S. G. Synthesis and in vitro evaluation of the antifungal activities of dihydropyrimidinones. *Bioorg. Med. Chem.Lett.*, 18, 6462-6467, **2008**.

Singh, N. *et al* An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* over expressing pteridine reductase 1, *Parasitol Res*, 105:1317–1325, **2009**.

Strecker, A. The artificial synthesis of lactic acid and a new homologue of glycine. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, v.75, p. 27. **1850**

Teixeira, J.R.M.; Avaliação da Terapêutica da malária por *Plasmodium vivax*: perfil cinético da cloroquina e primaquina. 2011. 96f. Tese (Doutorado) –Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

Terraciano, S., Strocchia, M.; Chini, M.G.; Vassallo, A.; Vaccaro, M.C.; Piazz, F.D.; Leone, A.; Riccio, R.; Bruno, I.; Bifulco, G. Targeting the Hsp90 C-terminal domain by the chemically accessible dihydropyrimidinone scaffold. *Chem. commun.*, **2015**

Trager W e J. Jensen. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. v.193, p. 673-675, **1976**.

Ugi, I., Meyr, R., Fetzer, U., Steinbrückner, C. Studies on isonitriles. *Angewandte Chemie*, v. 71, p. 386. **1959**

Varotti, F.P. Quimioterapia antimalárica experimental e mecanismos de ação de antimaláricos envolvendo íon cálcio e prótons. 2008. 167f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008

Vovk, M.V. The preparative synthesis of 4-aryl(heteraryl)-5-ethoxycarbonyl-6-chloromethyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Journal of organic and pharmaceutical chemistry*. v.7.p. 26-29. **2009**

Vovk, M. V.; Lebid, P. S.; Kos, P. O. Condensed pyrimidine systems. 11. Synthesis of tetrahydro[1,3]thiazolo[3,4-c]pyrimidine derivatives. *Zhurnal Organichnoi ta Farmatsevtichnoi Khimii*, 9(2), 44-48, **2011**.

Yang, Y.; Fu, R.; Lai, W.; Ma, Y.; Chen, Z.; Zhou, J.; Chai, W., Wang, Q.; Yuan, R. Efficient and Green Microwave-Assisted Multicomponent Biginelli Reaction for the Synthesis of Dihydropyrimidinones Catalyzed by Heteropolyanion-Based Ionic Liquids Under Solvent-Free Conditions. *Synthetic Communications*. v. 45, p. 467-477. **2015**

Walsh, J. J., Coughlan, D., Heneghan, N., Gaynor, C., Bell, A., A novel artemisinin–quinine hybrid with potent antimalarial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v.17, p. 3599-3602. **2007**

World Health Organization: WHO – disponível em <<http://www.who.int/en/>> acesso em dezembro de 2013

World Health Organization: WHO monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua* L. 2006. – disponível em <<http://www.who.int/medicines/publications/traditional/ArtemisiaMonograph.pdf>> acesso em setembro de 2014

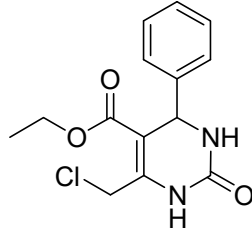
WHO- Guidelines for the treatment of malaria, 2nd ed., WHO, Geneve, 194 pp, 2010. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf?ua=1> Acesso em setembro de 2014.

WHO-. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010, WHO, Geneve, 121 pp., 2010

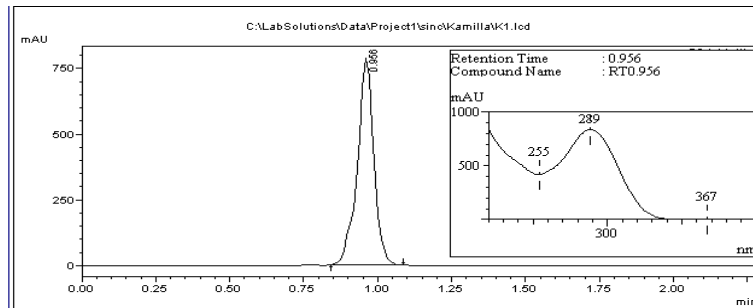
World Malaria report 2014 – disponível em <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/> acesso em 30 de janeiro de 2015

10 ANEXOS

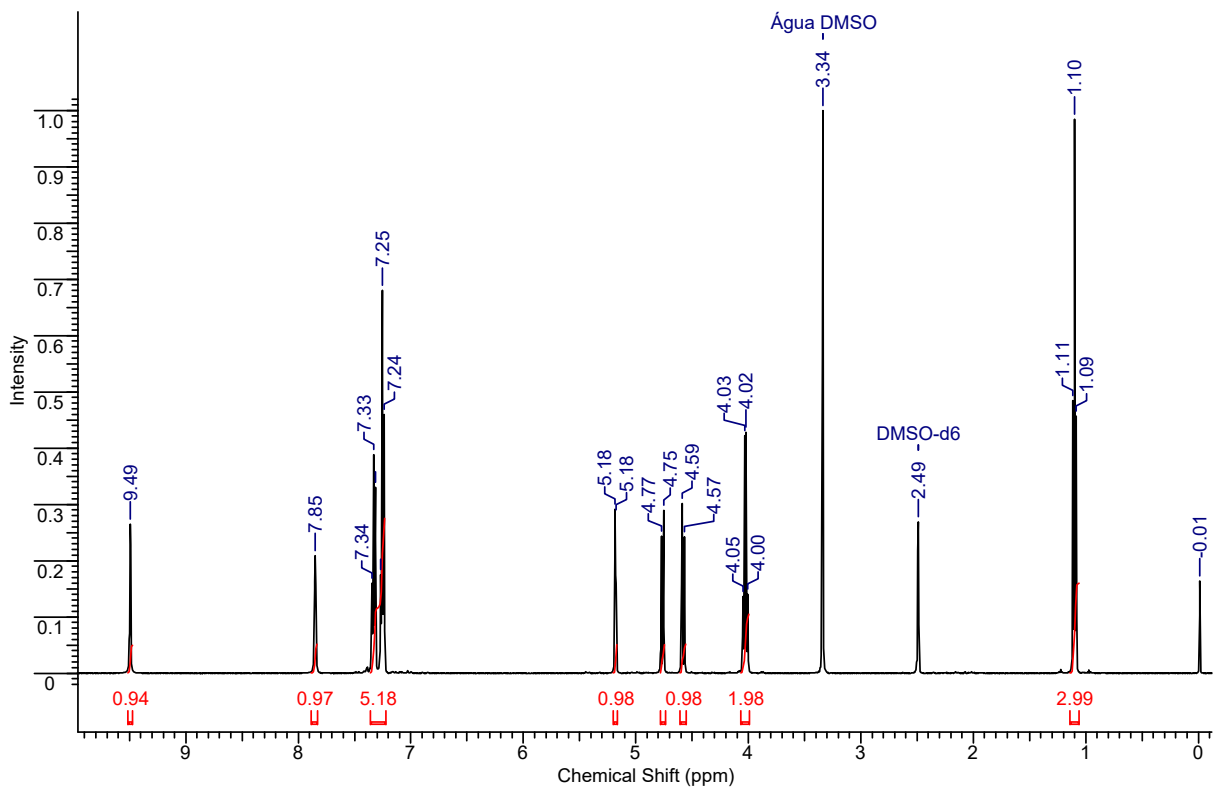
- 6-(clorometil)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28a)



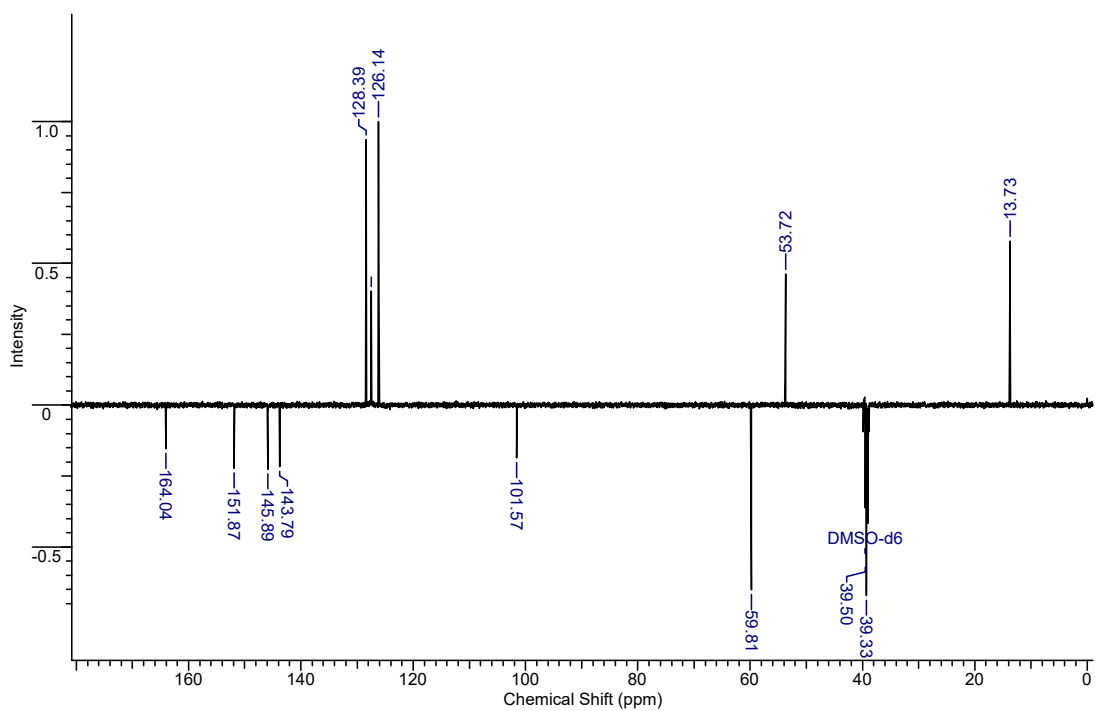
Cromatograma



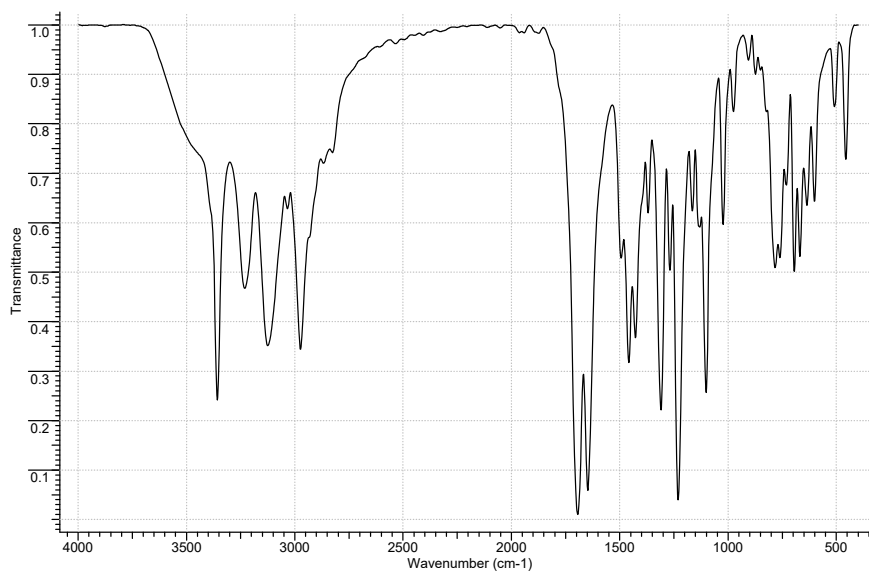
RMN de ^1H



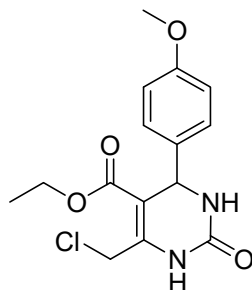
RMN de ^{13}C



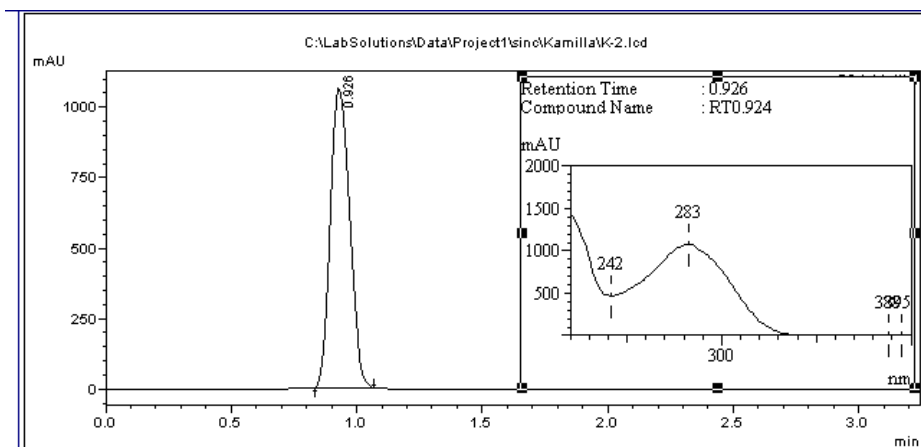
IV



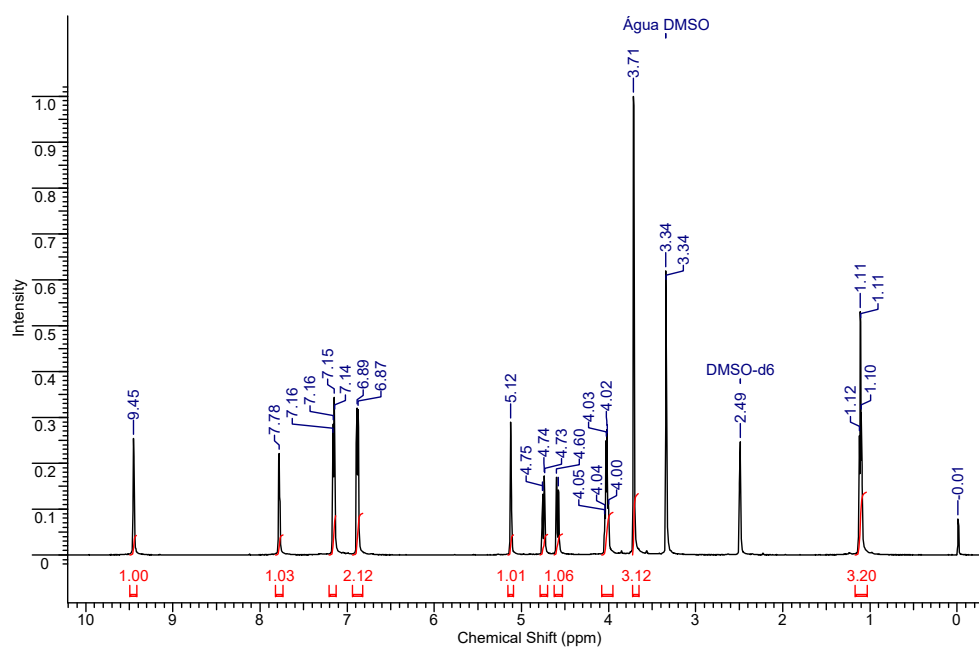
- 6-(clorometil)-4-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetraidropirimidino-5-carboxilato de etila (28b)



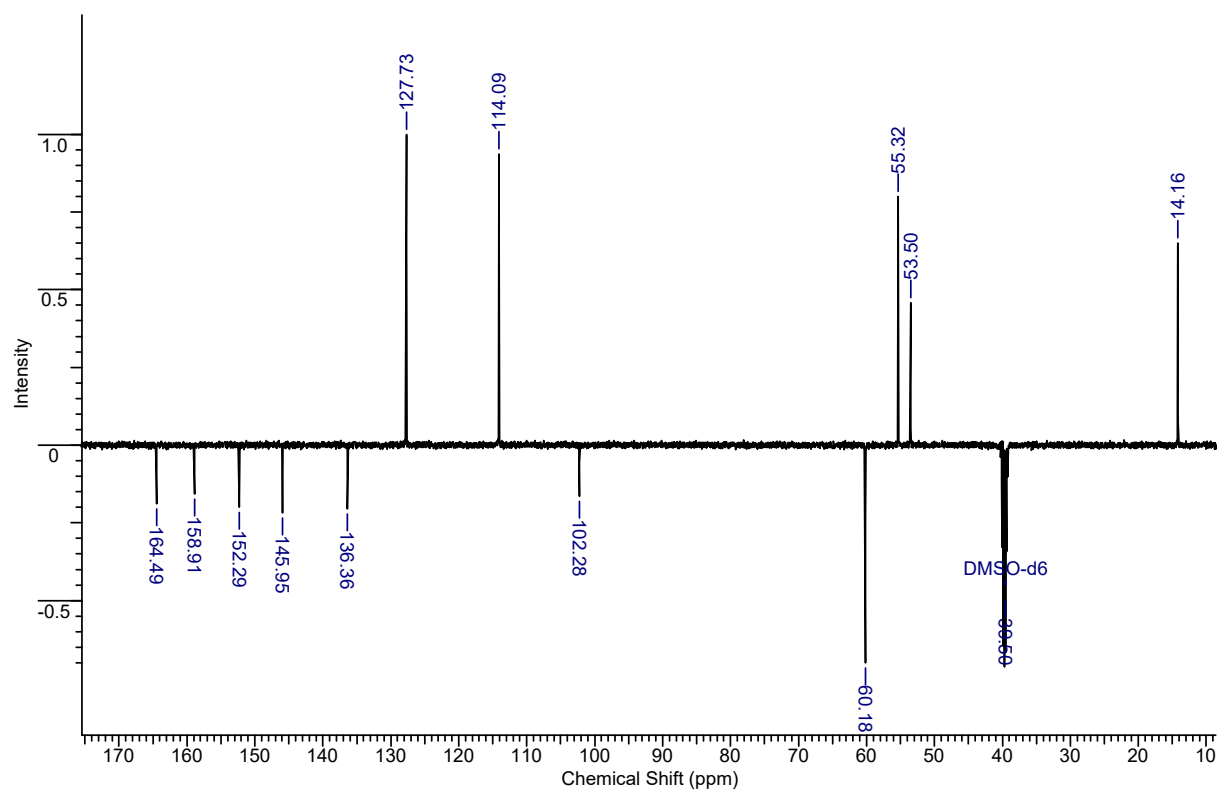
Cromatograma



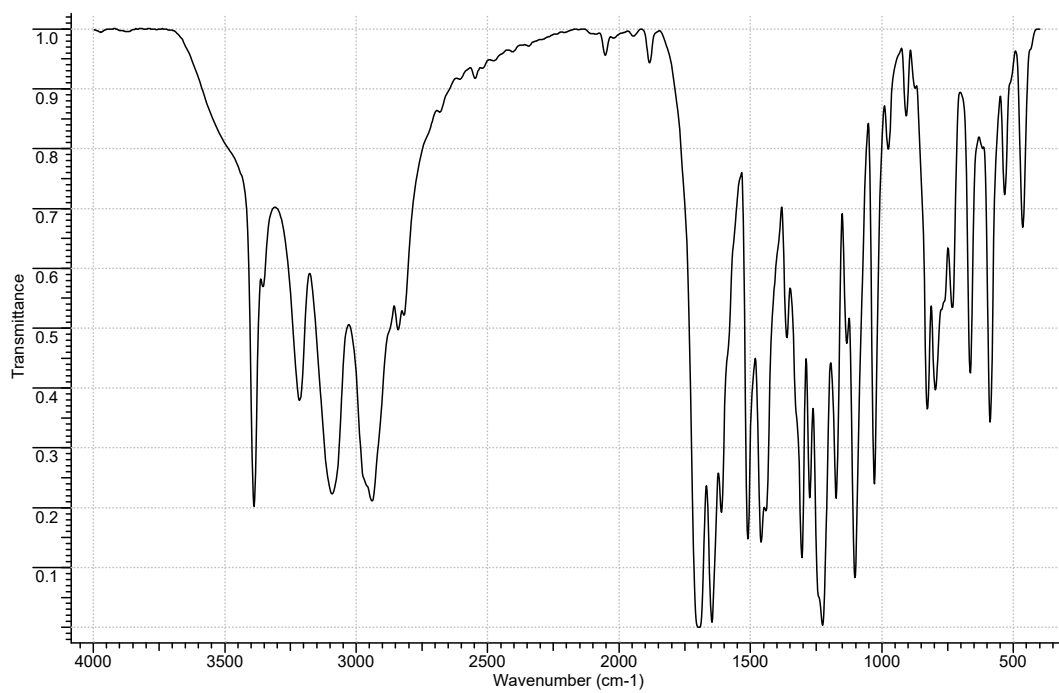
RMN de ^1H



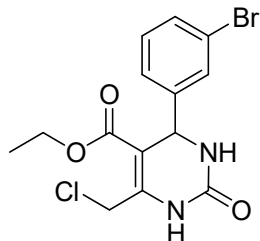
RMN de ^{13}C



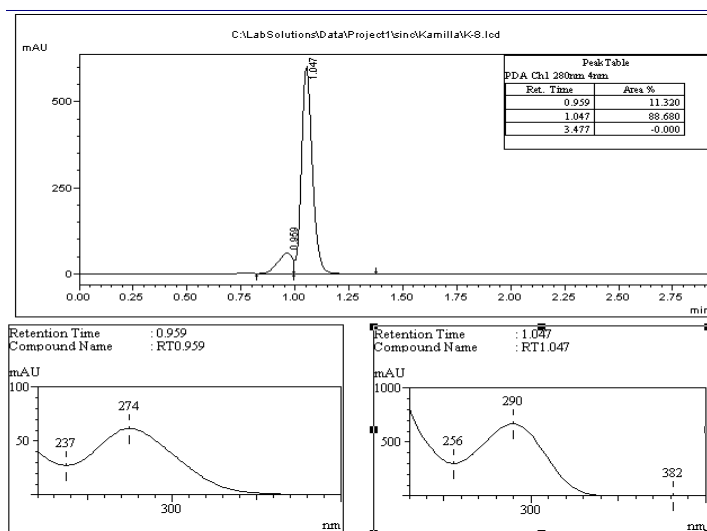
IV



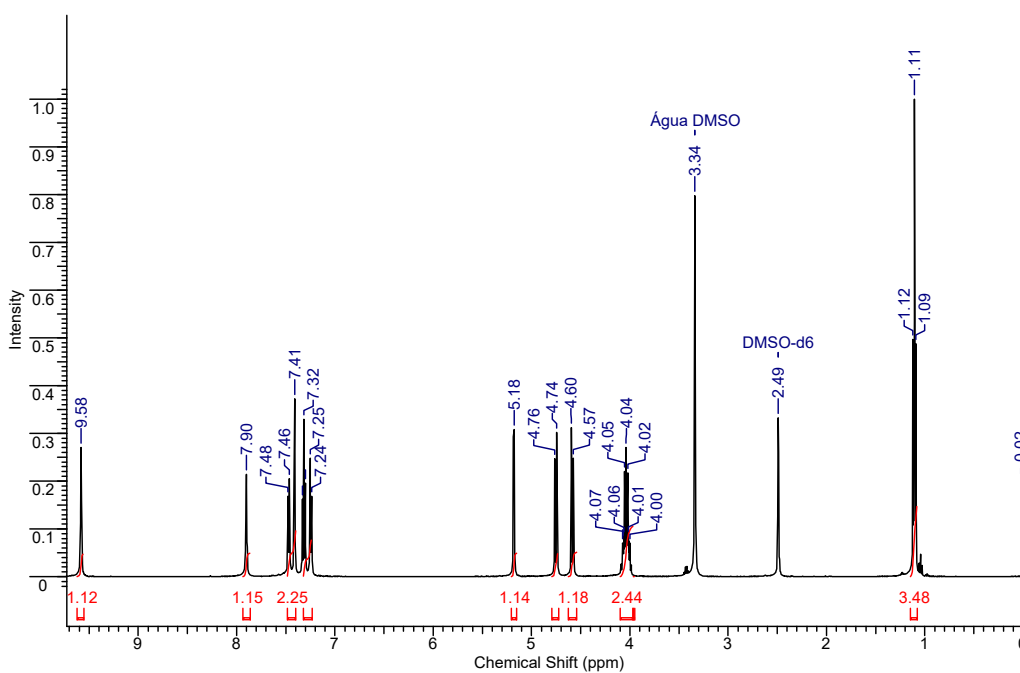
4-(3-bromofenil)-6-(clorometil)-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidino-5-carboxilato de etila (28c)



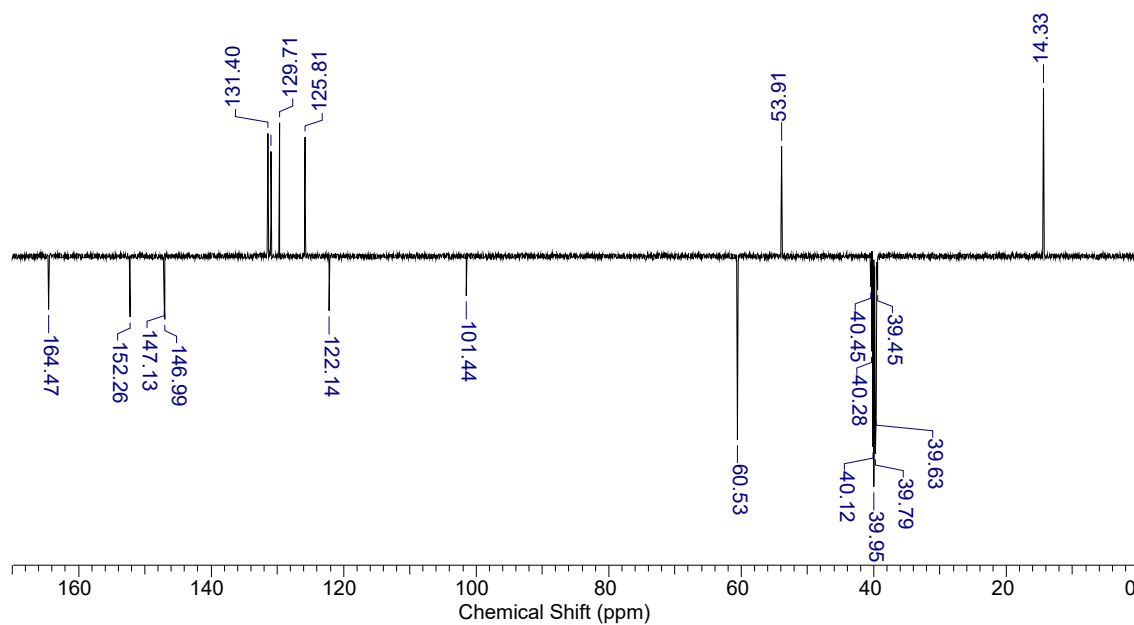
Cromatograma



RMN de ¹H



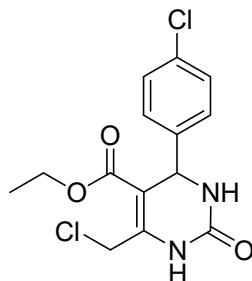
RMN de ^{13}C



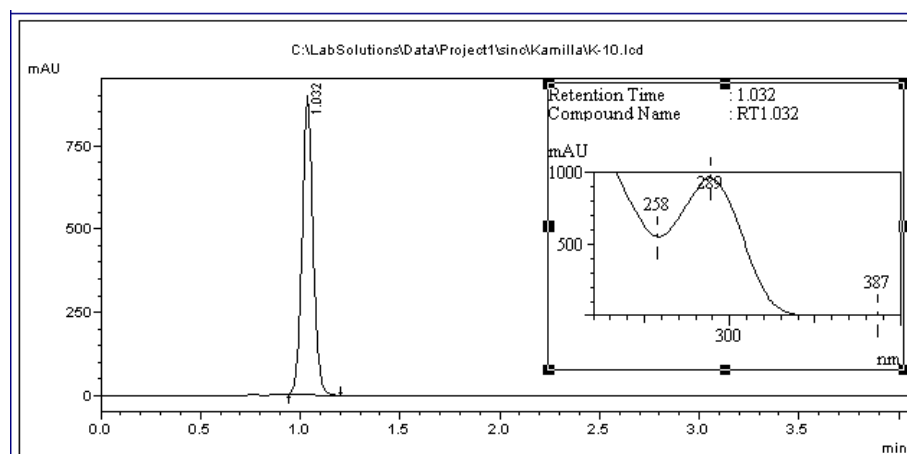
IV



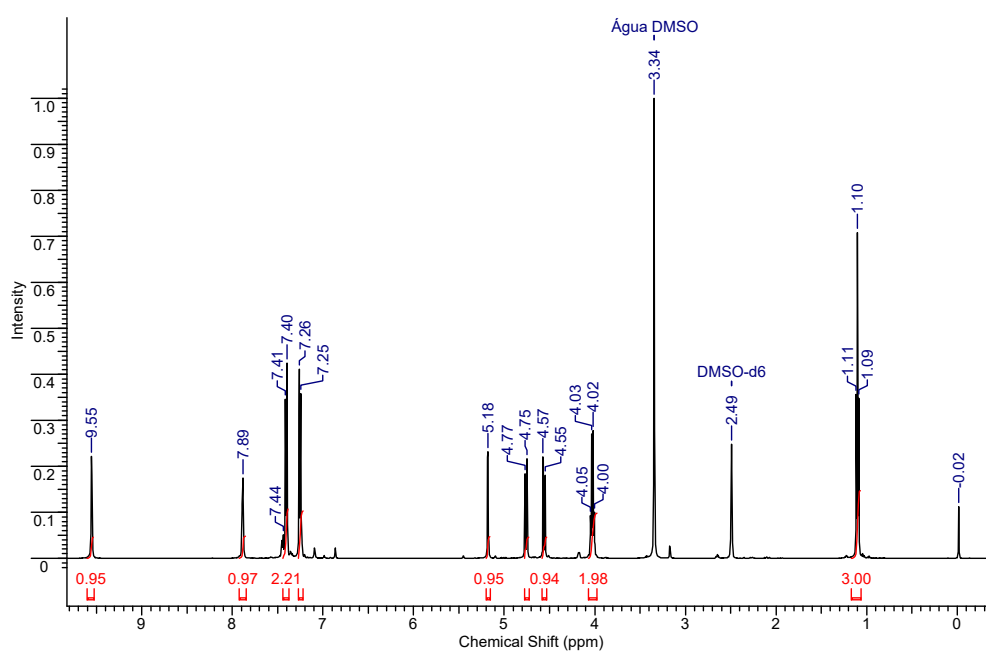
- 6-(clorometil)-4-(4-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetraidropirimidino-5-carboxilato de etila (28d)



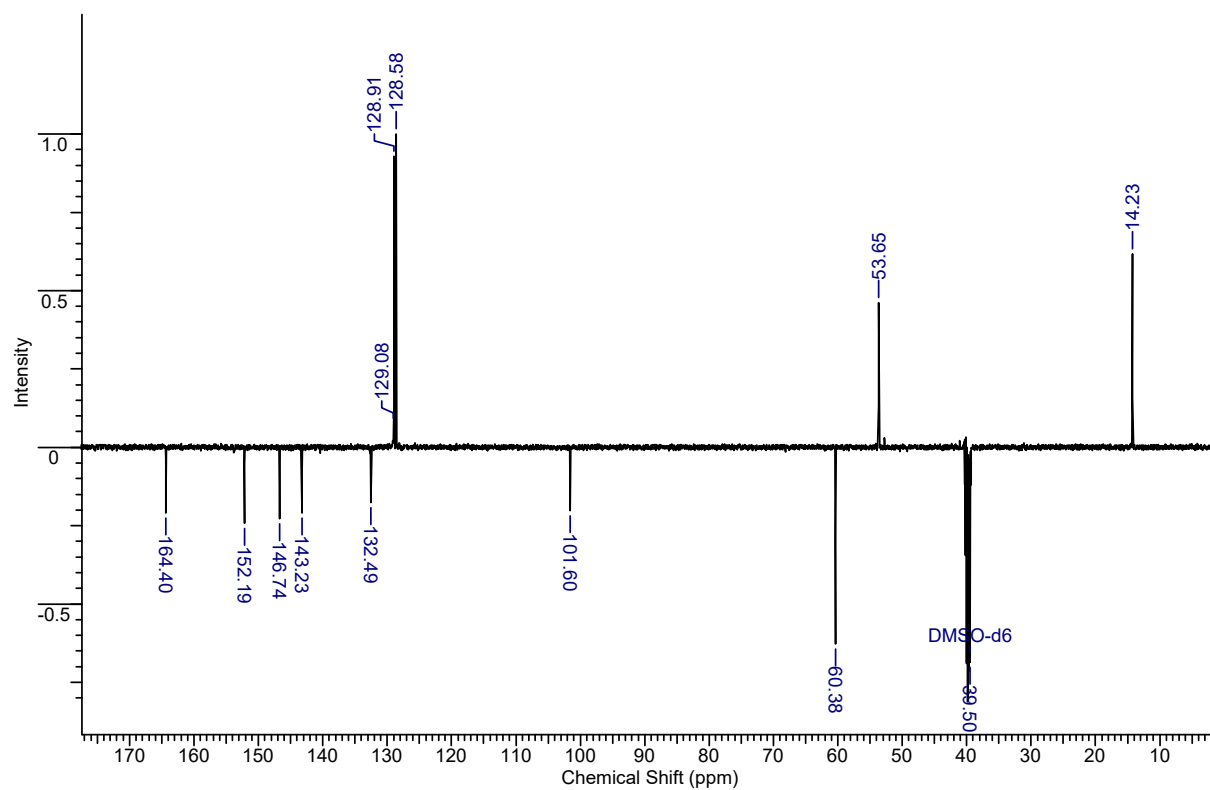
Cromatograma



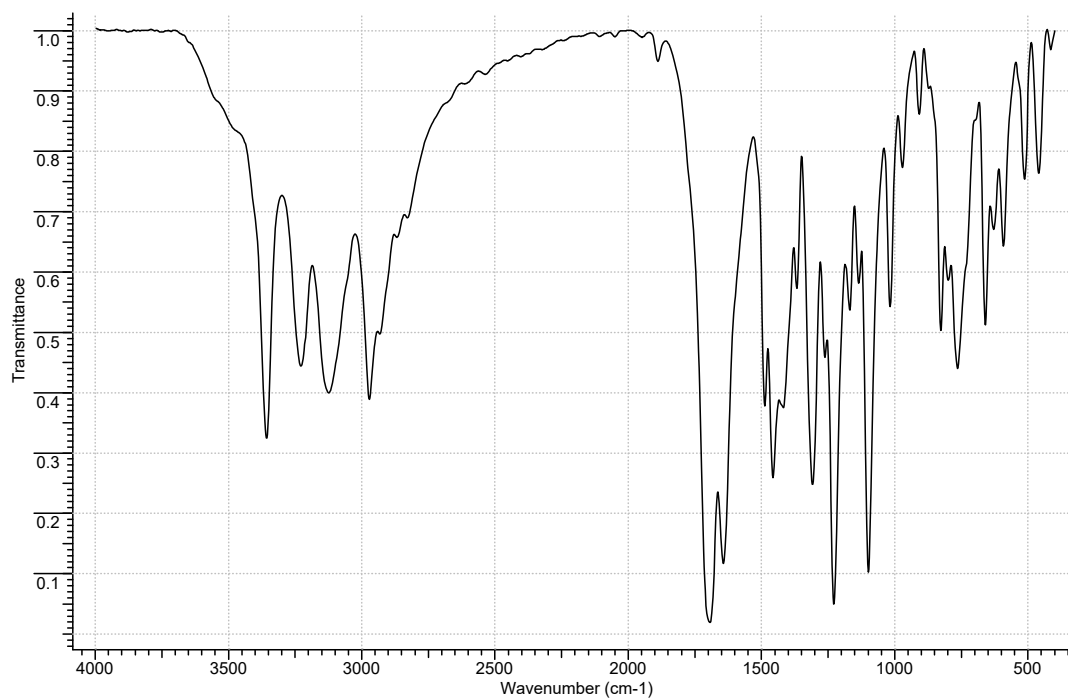
RMN de ^1H



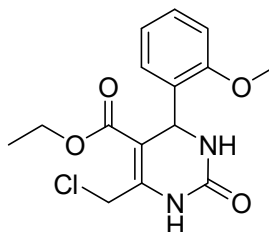
RMN de ^{13}C



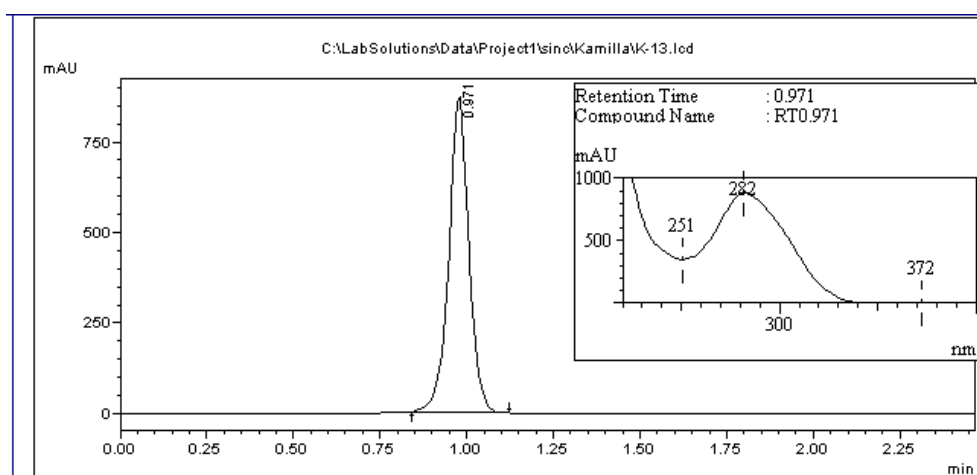
IV



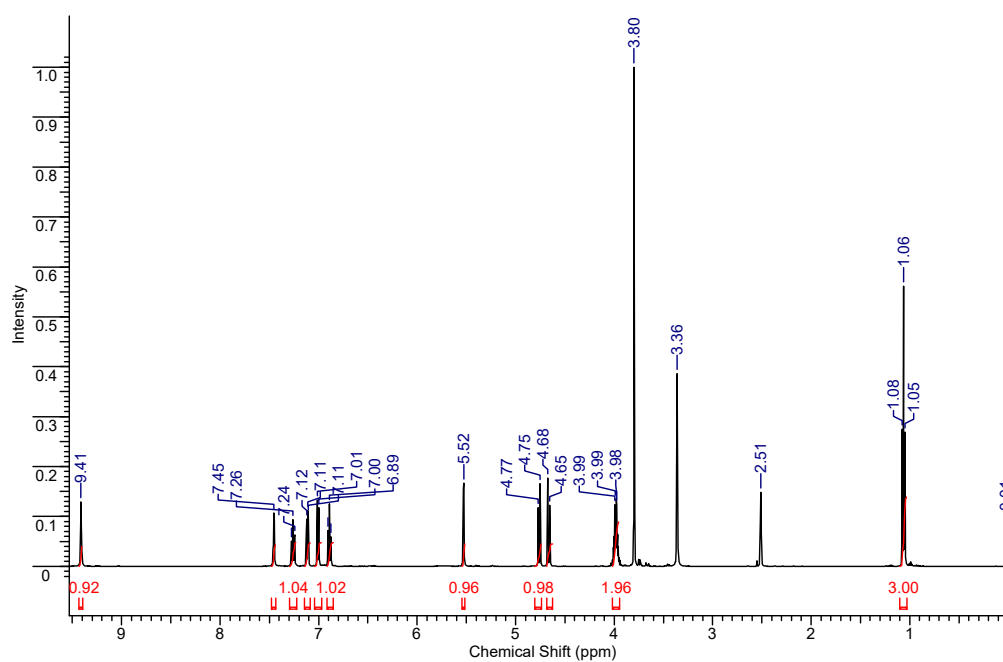
- **6-(clorometil)-4-(2-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetraidropirimidino-5-carboxilato de etila (28e)**



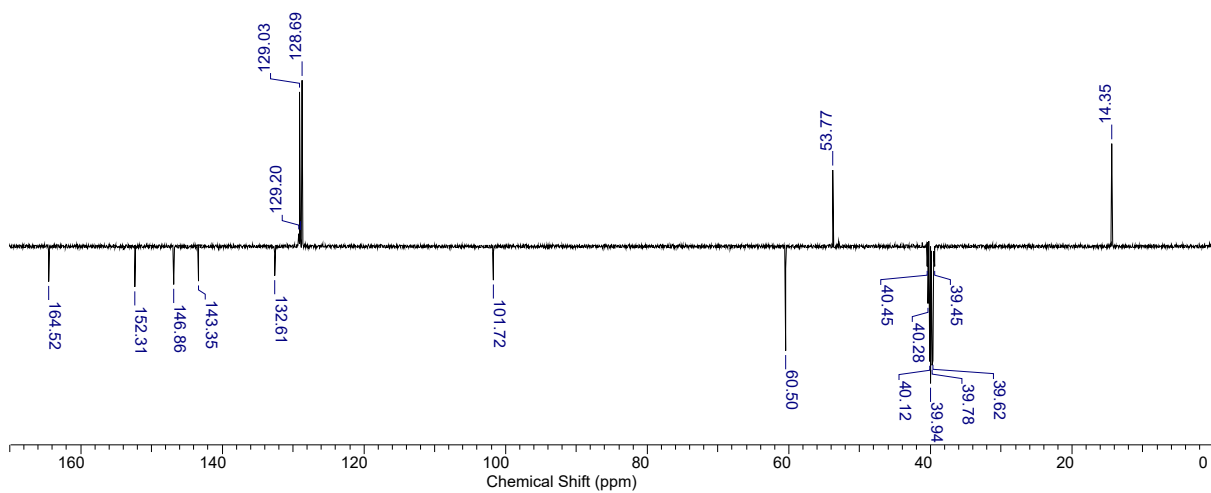
Cromatograma



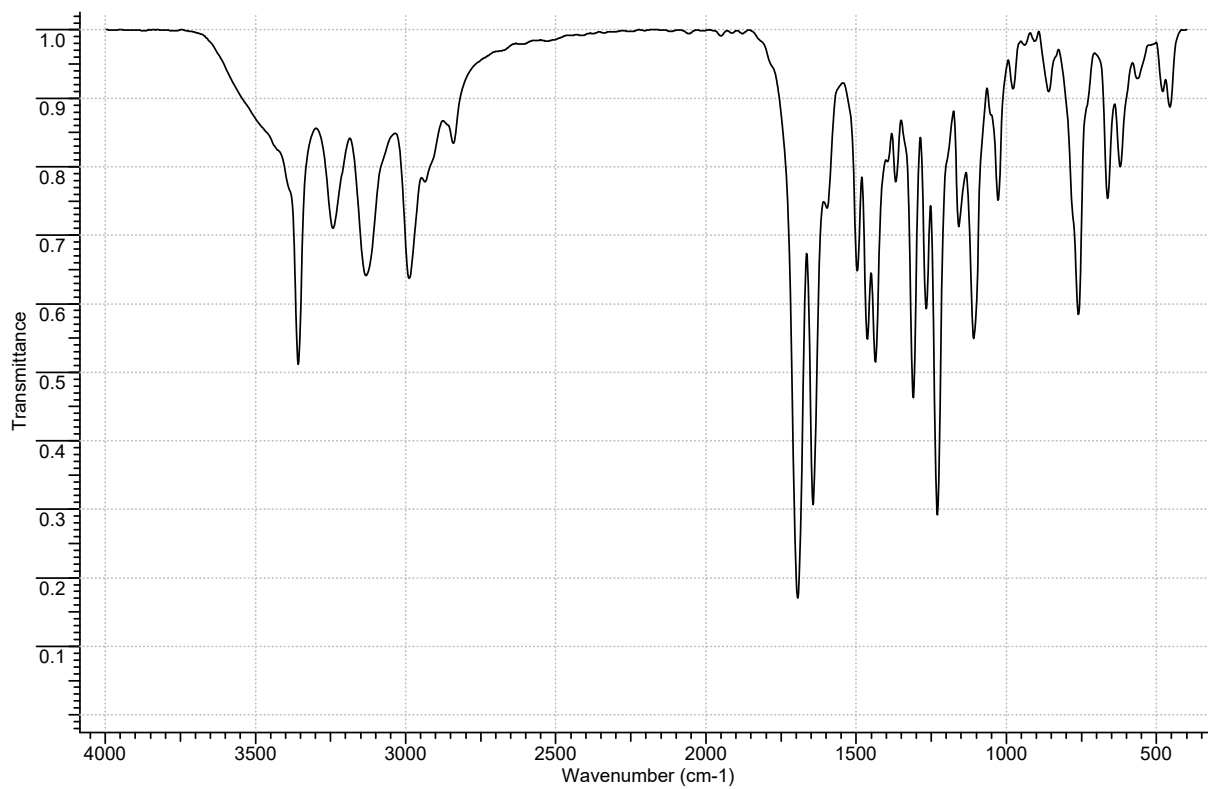
RMN de ^1H



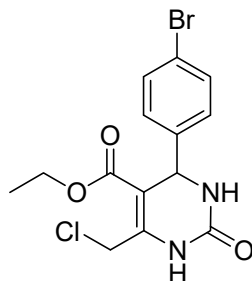
RMN de ^{13}C



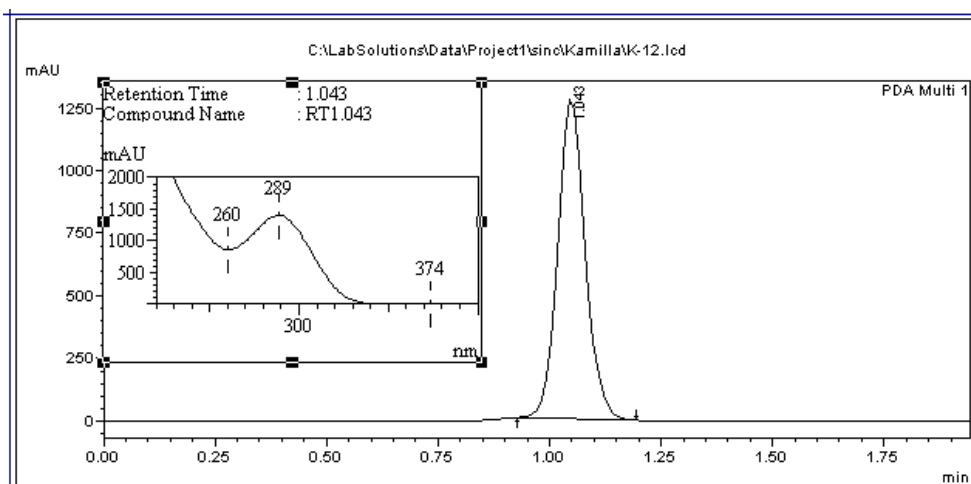
IV



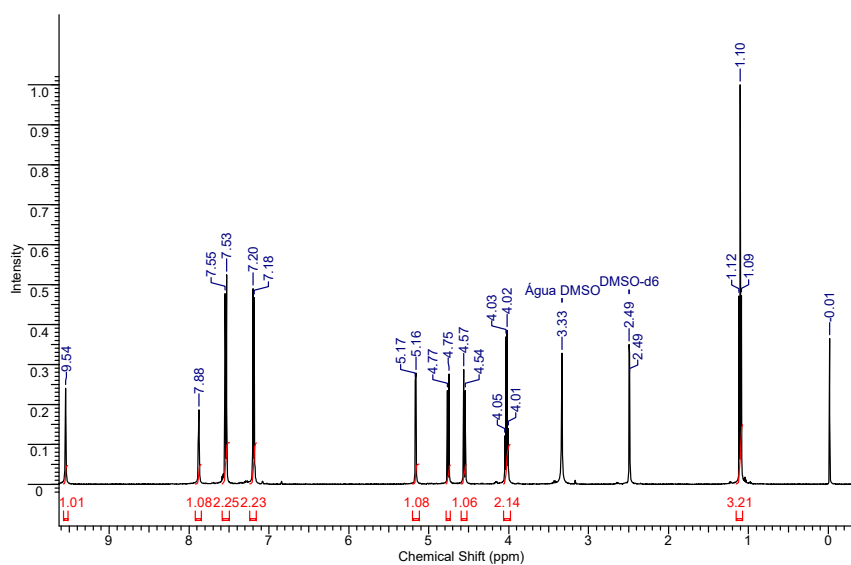
- 4-(4-bromofenil)-6-(clorometil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28f)



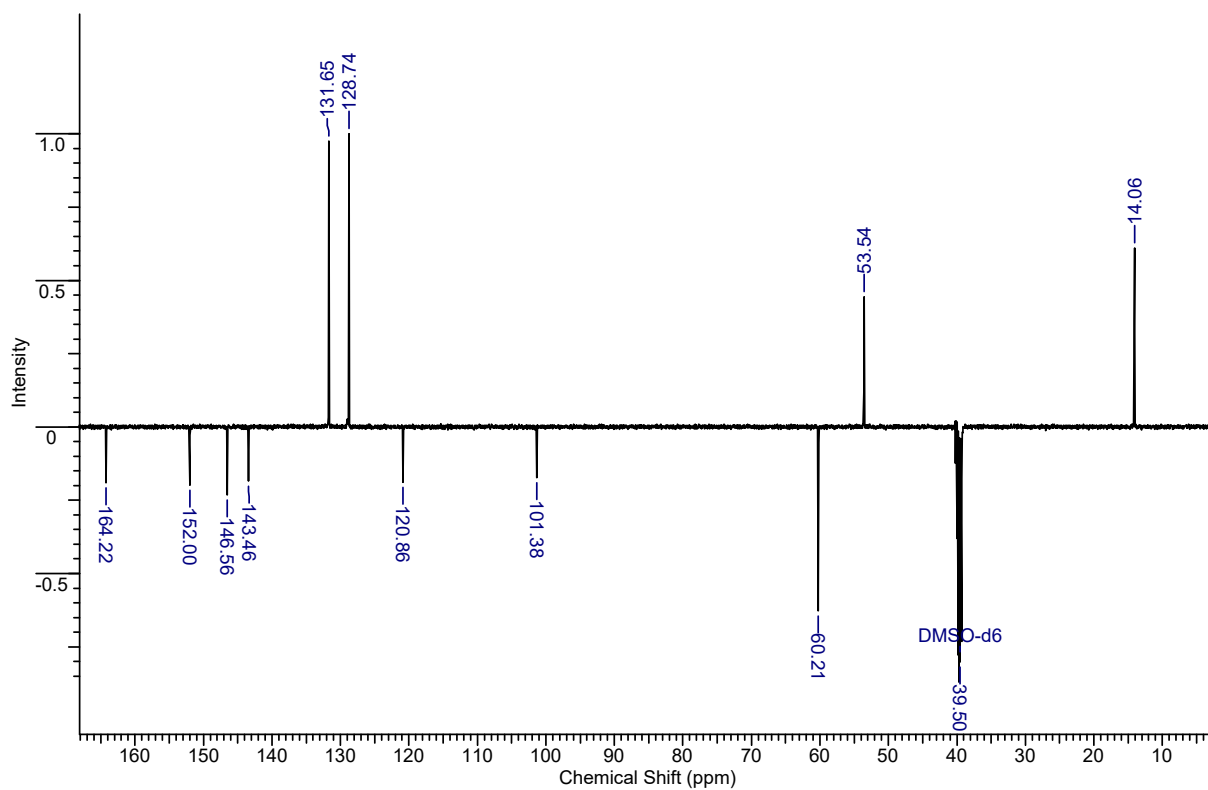
Cromatograma



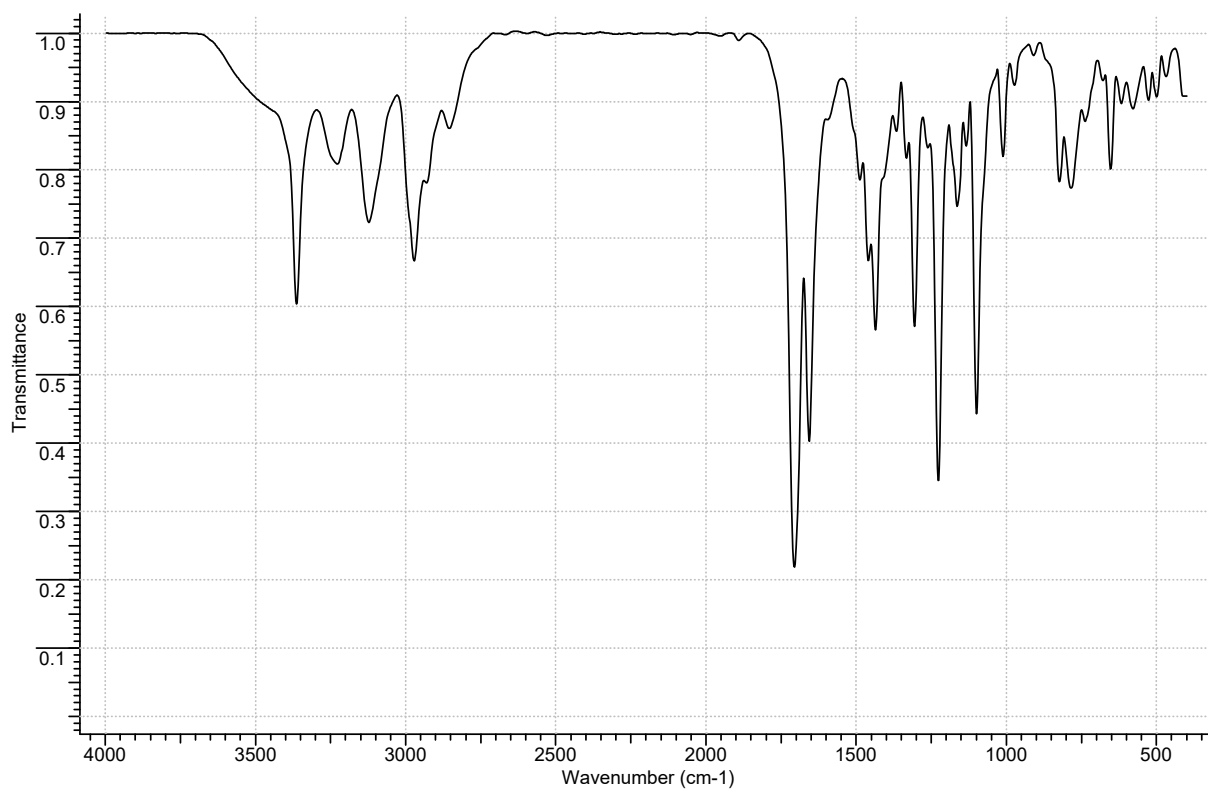
RMN de ^1H



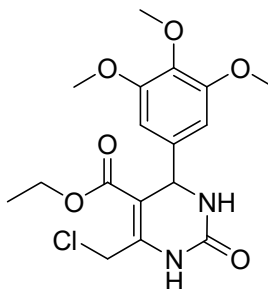
RMN de ^{13}C



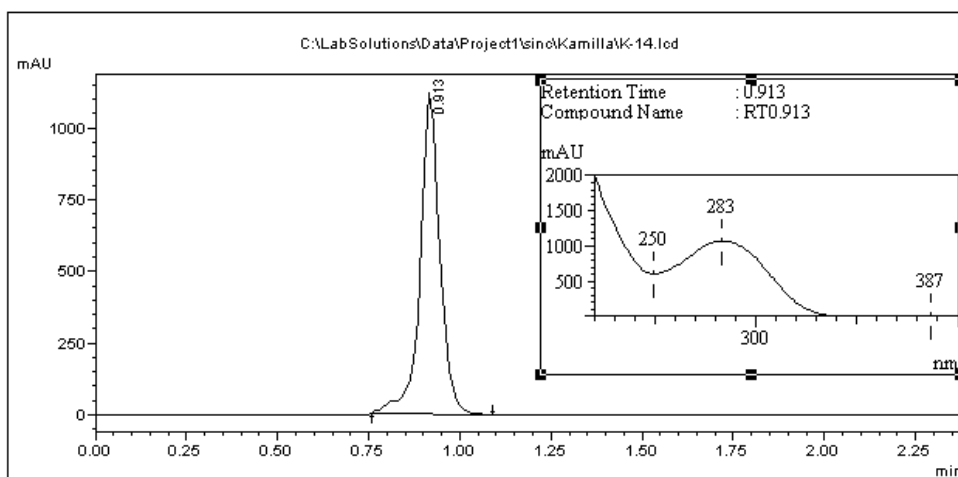
IV



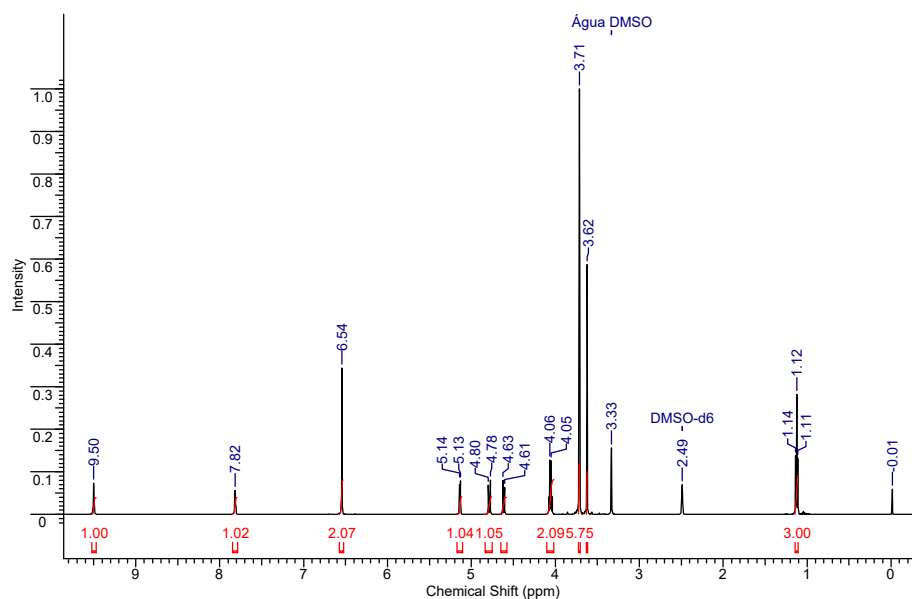
- 6-(clorometil)-4-(2,3,4-trimetoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28g)



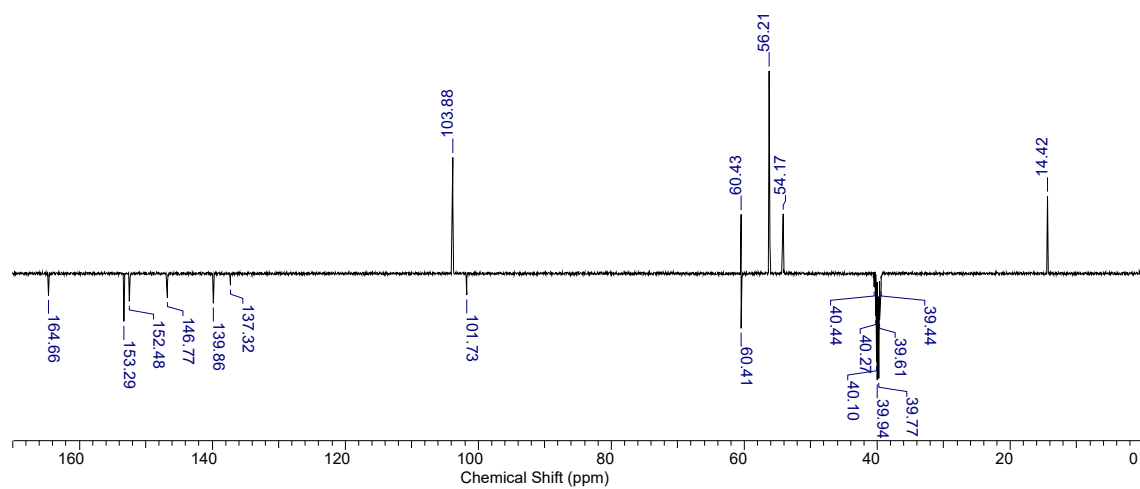
Cromatograma



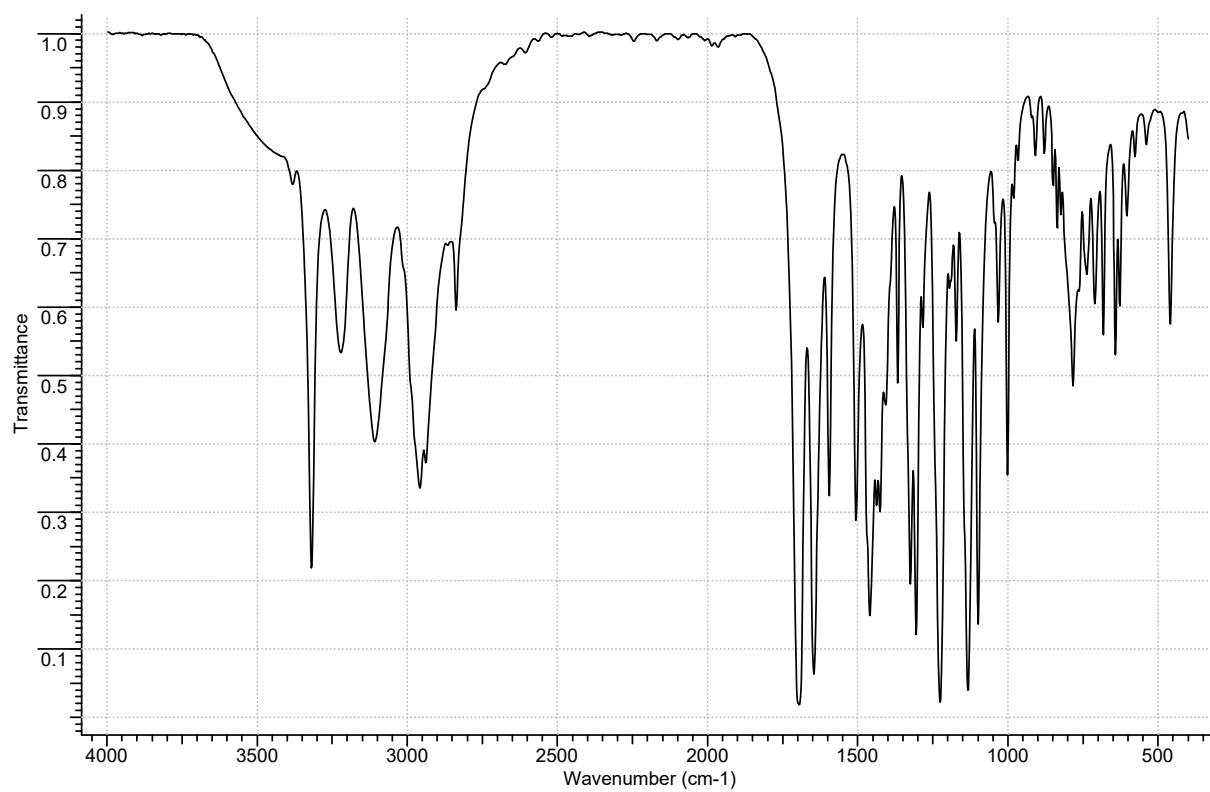
RMN de ¹H



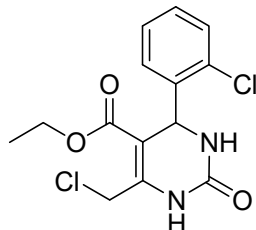
RMN de ^{13}C



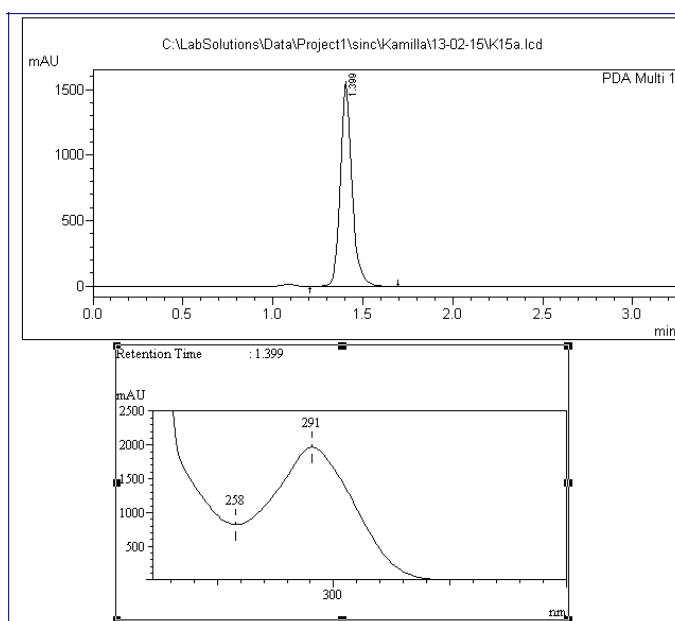
IV



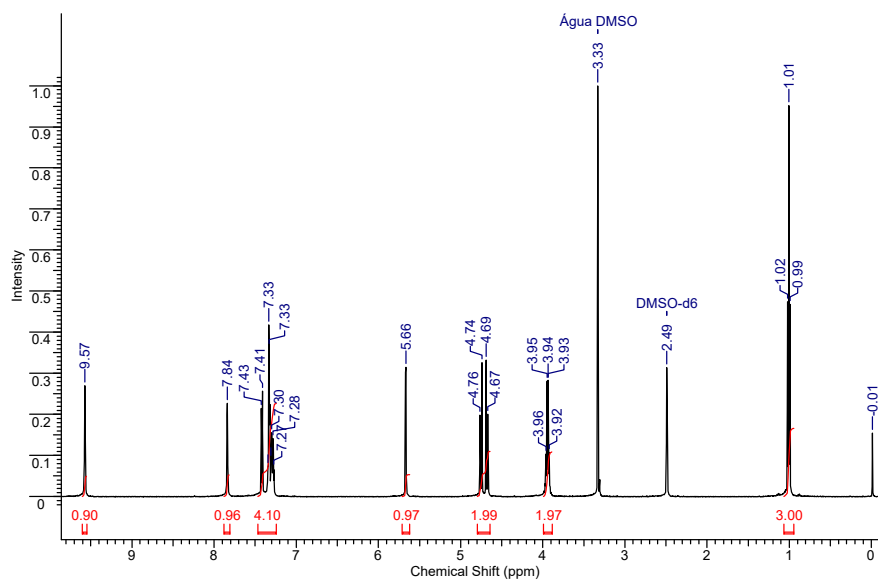
- 6-(clorometil)-4-(2-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28h)



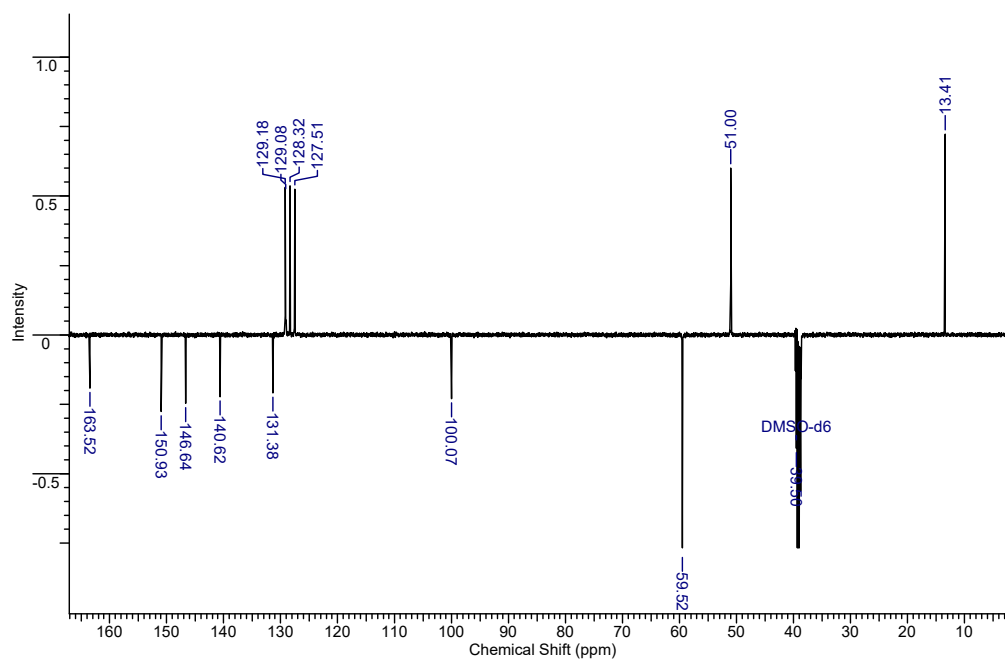
Cromatograma



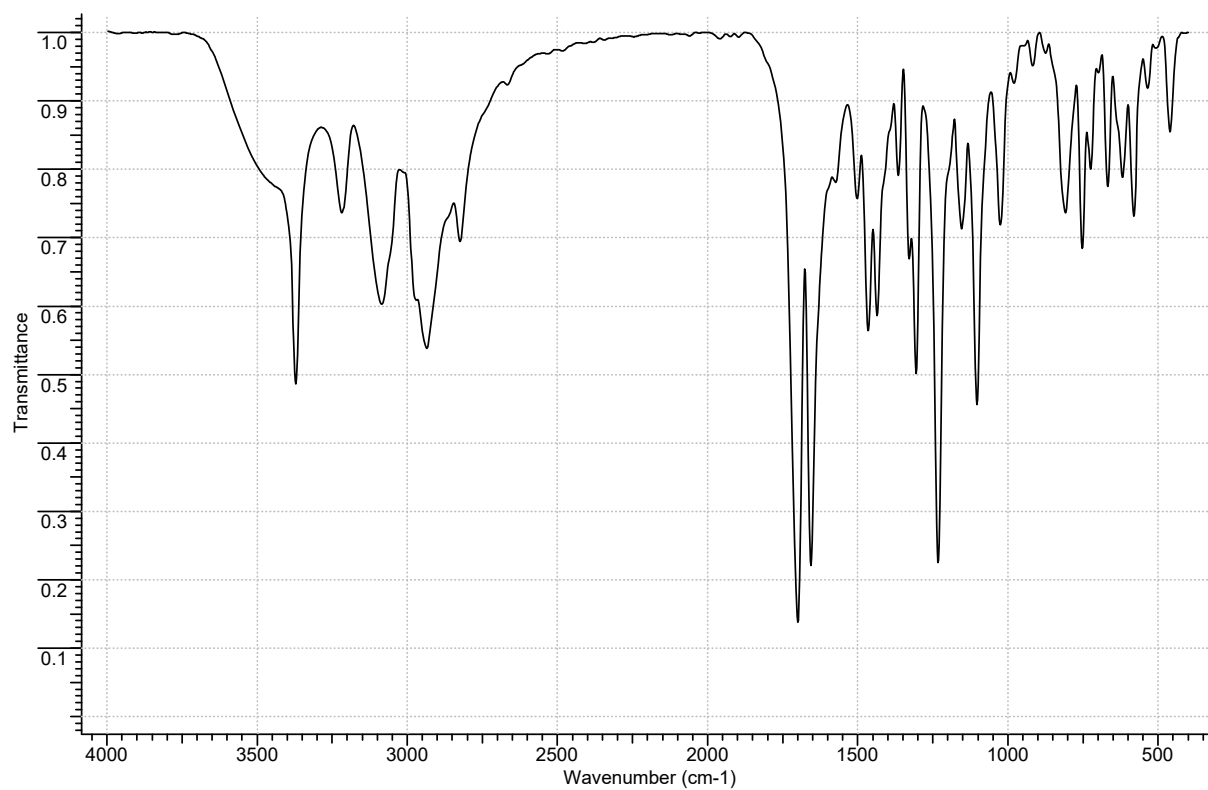
RMN de ¹H



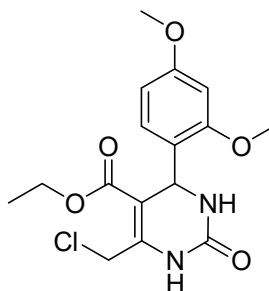
RMN de ^{13}C



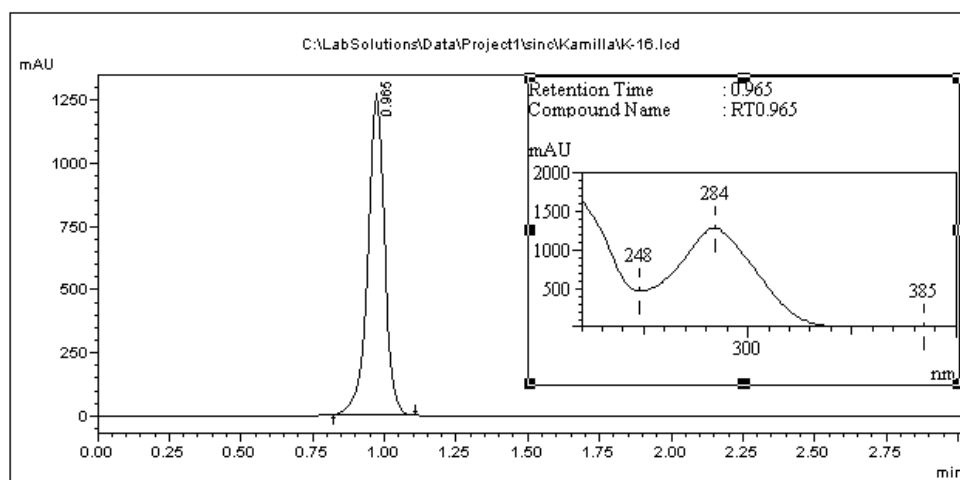
IV



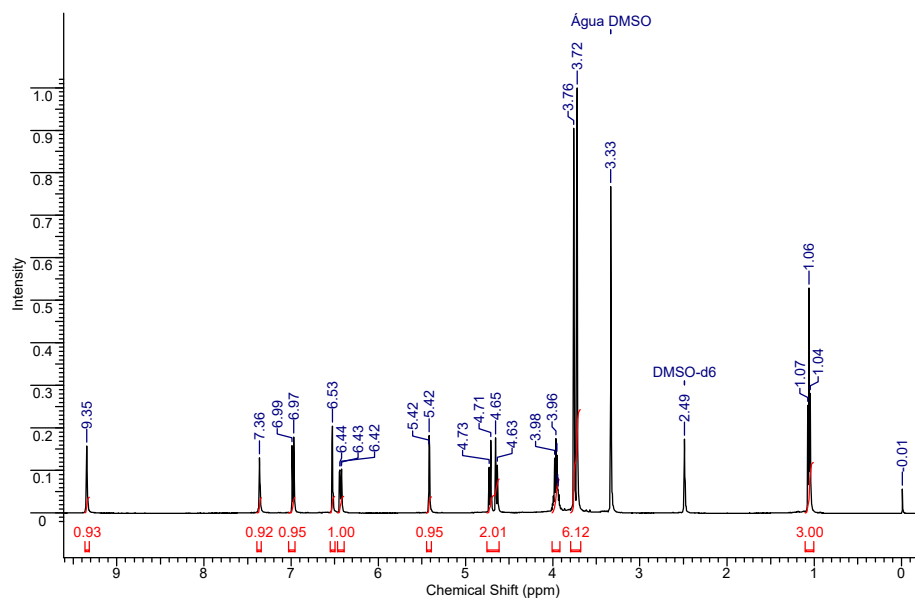
- 6-(clorometil)-4-(2,4-dimetoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5- carboxilato de etila (37i)



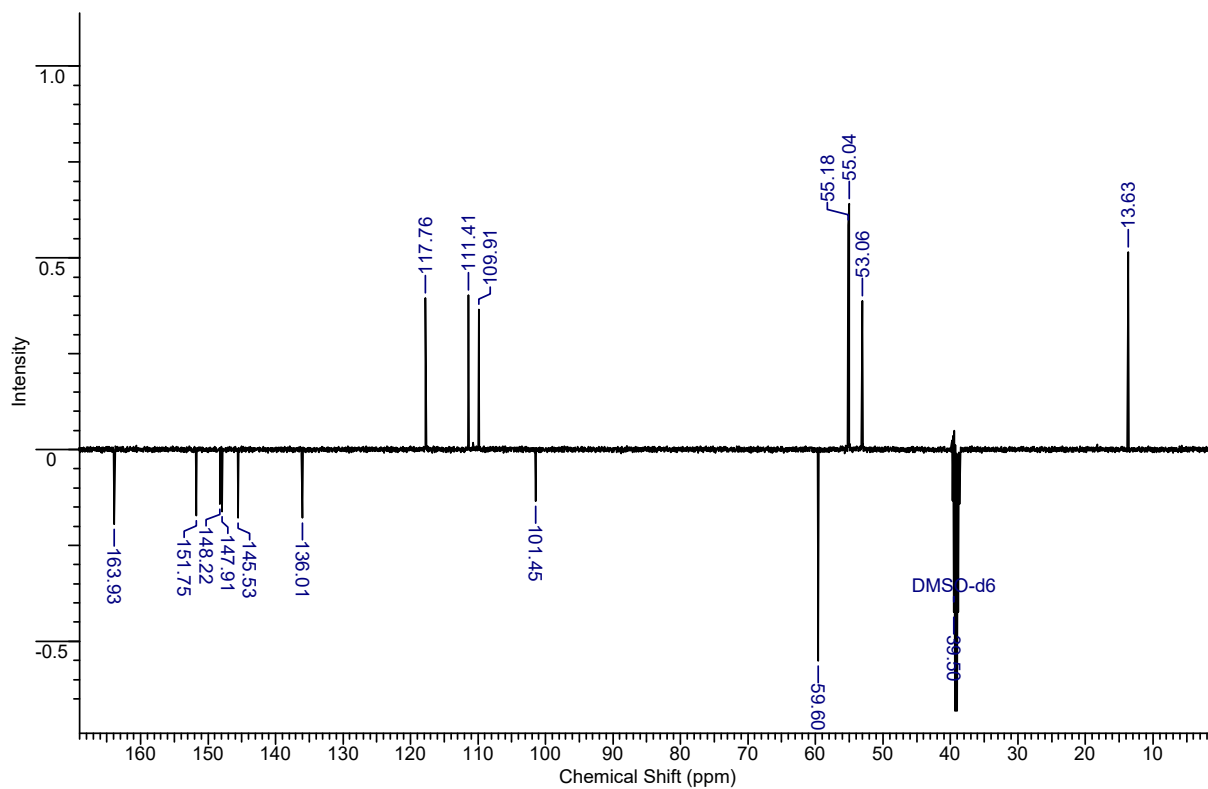
Cromatograma



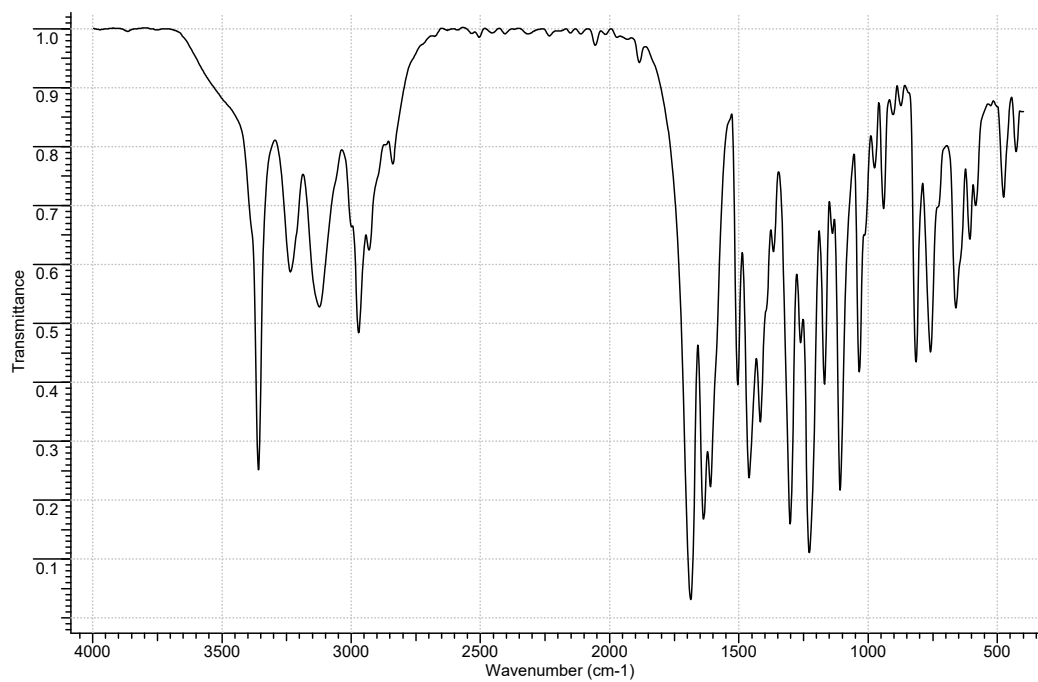
RMN de ^1H



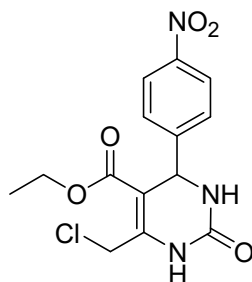
RMN de ^{13}C



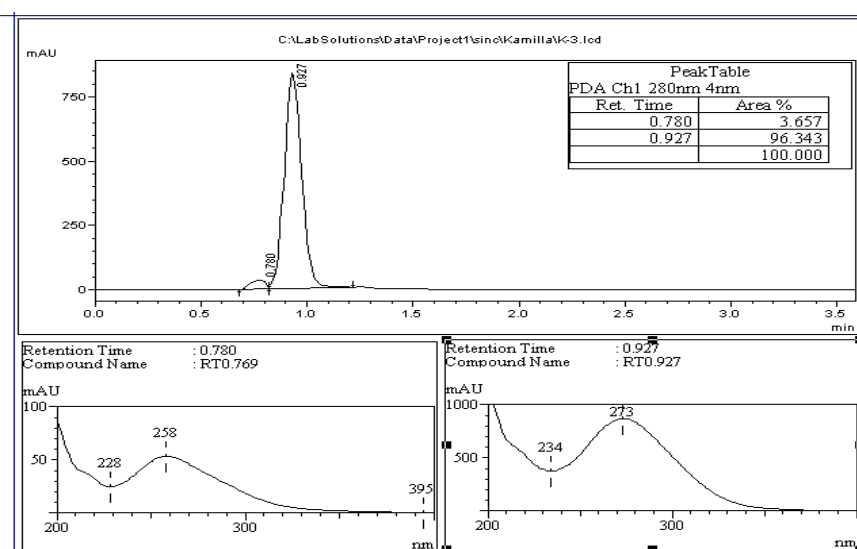
IV



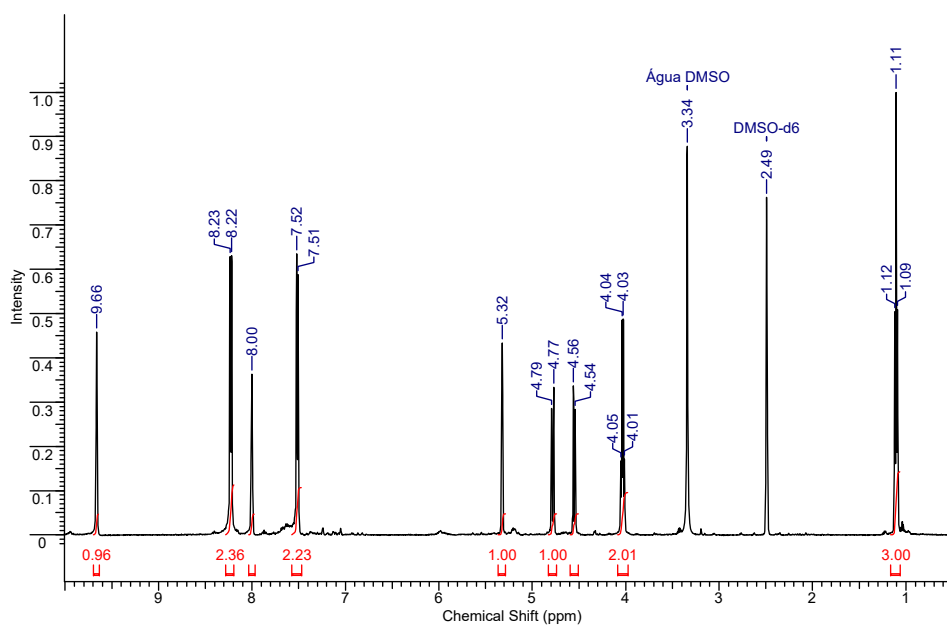
- 6-(clorometil)-4-(nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5-carboxilato de etila (28j)



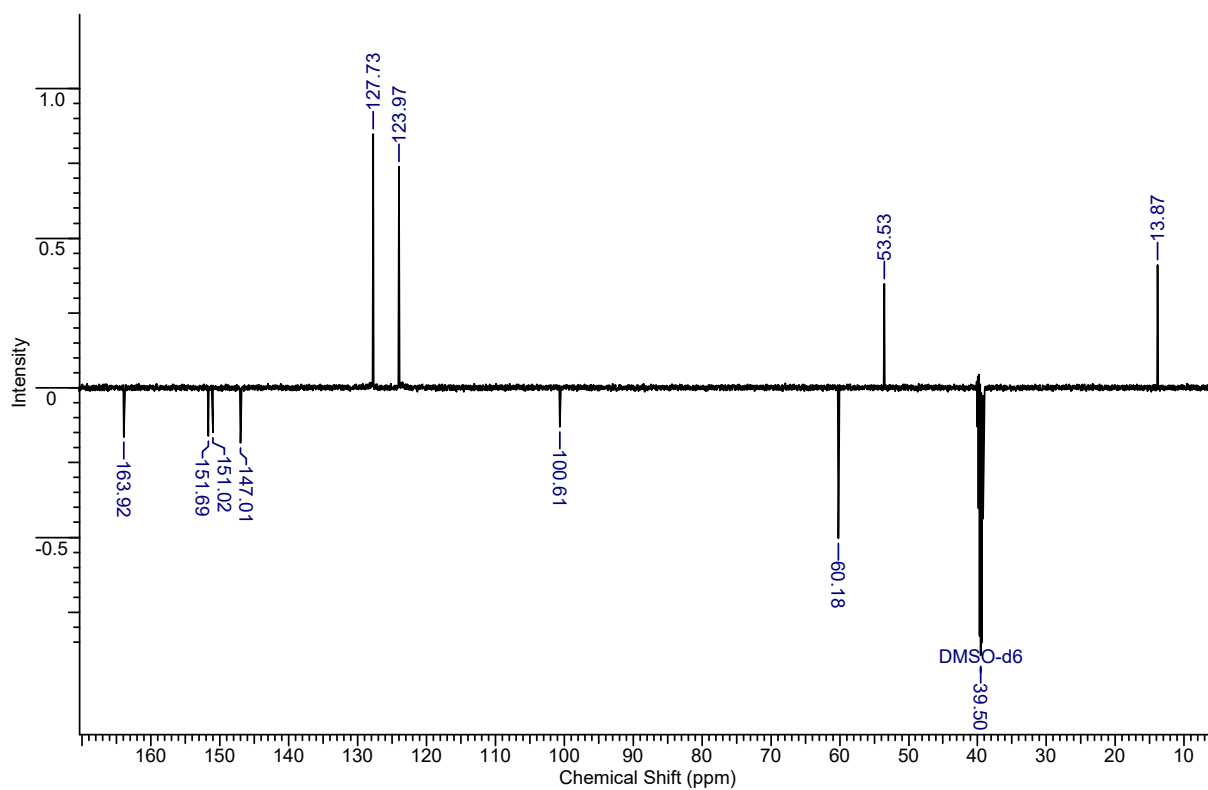
Cromatograma



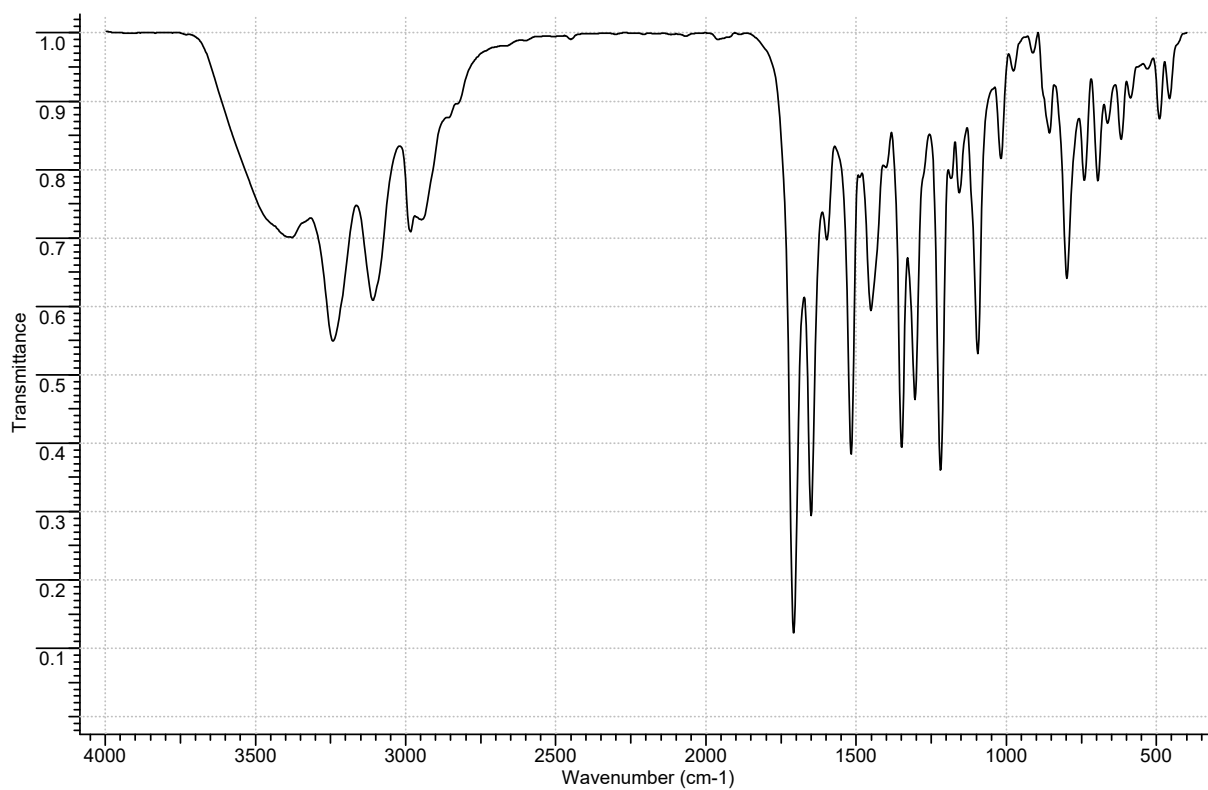
RMN de ¹H



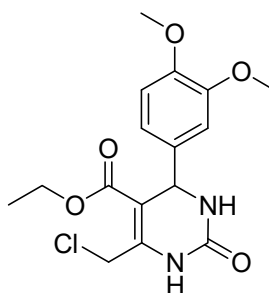
RMN de ^{13}C



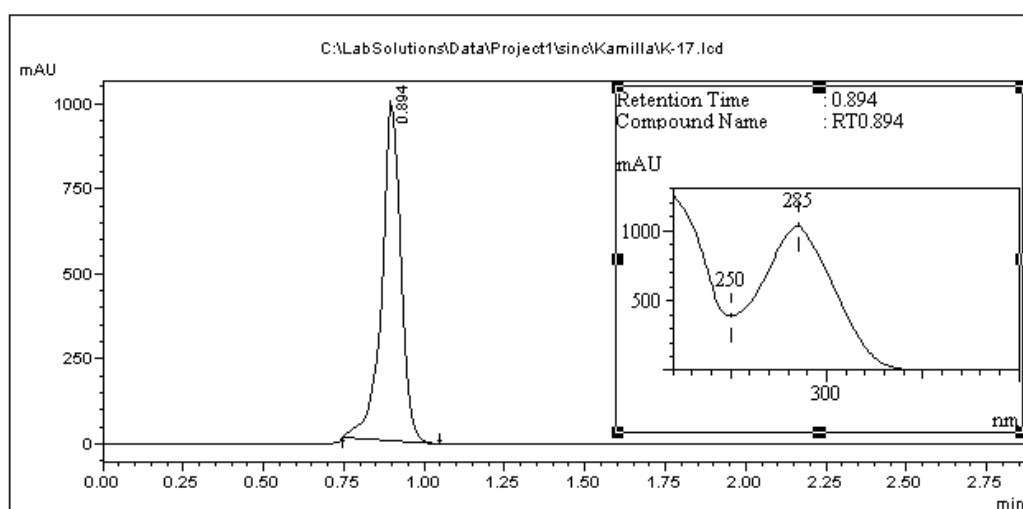
IV



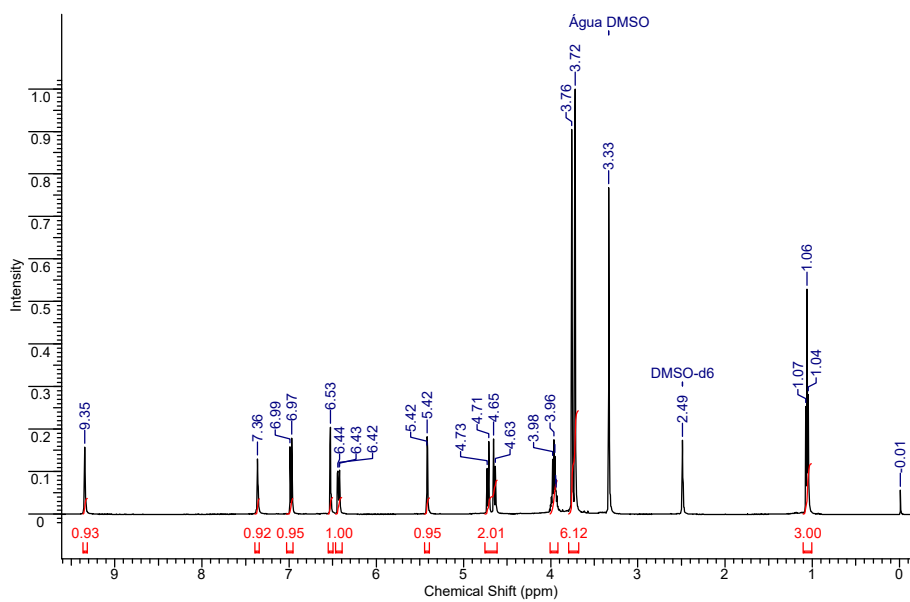
- 6-(clorometil)-4-(3,4-dimetoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5- carboxilato de etila (28k)



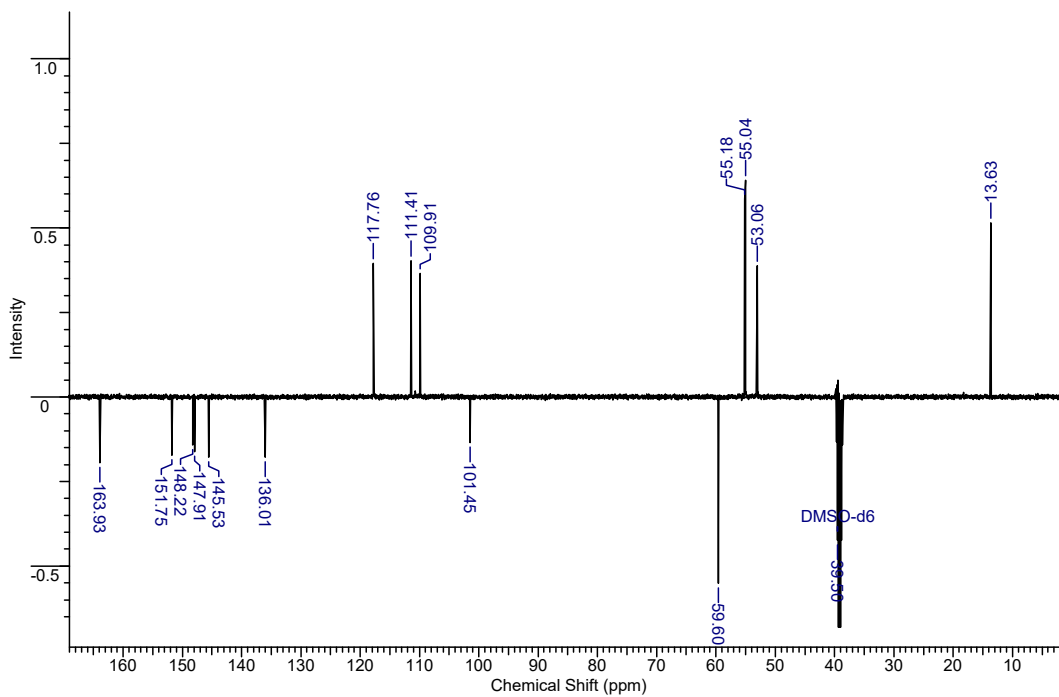
Cromatograma



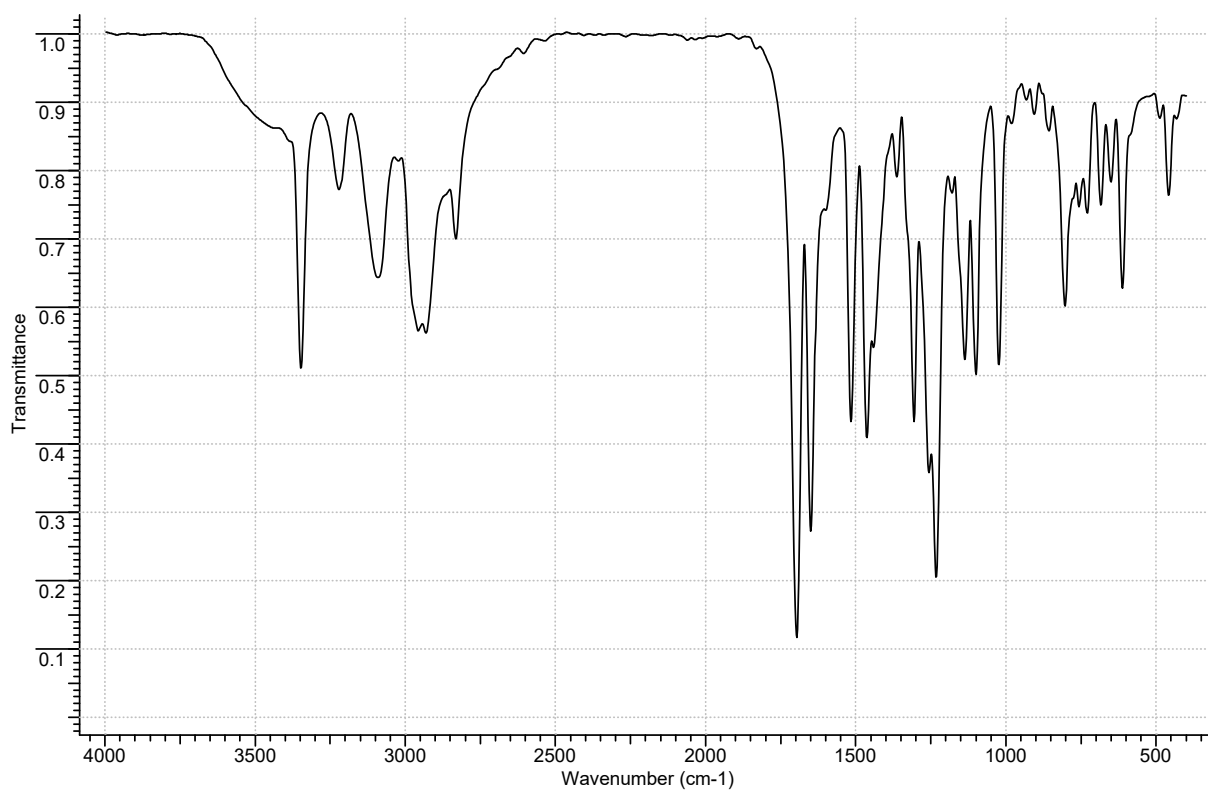
RMN de ^1H



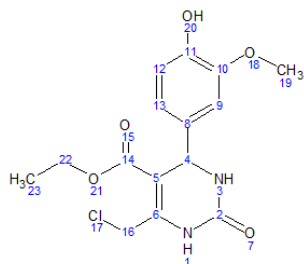
RMN de ^{13}C



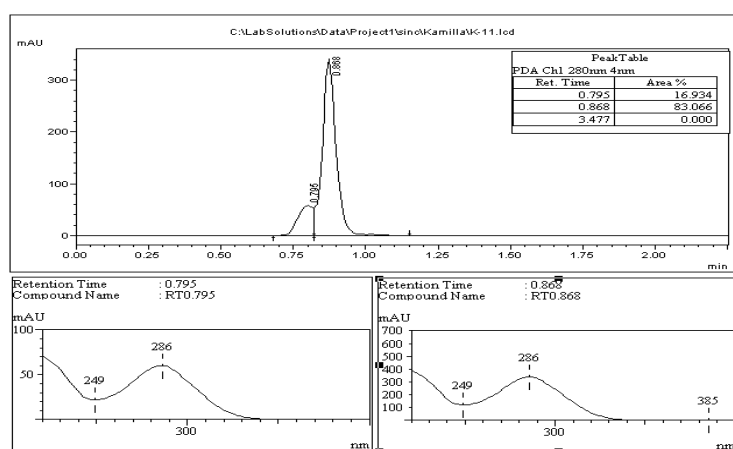
IV



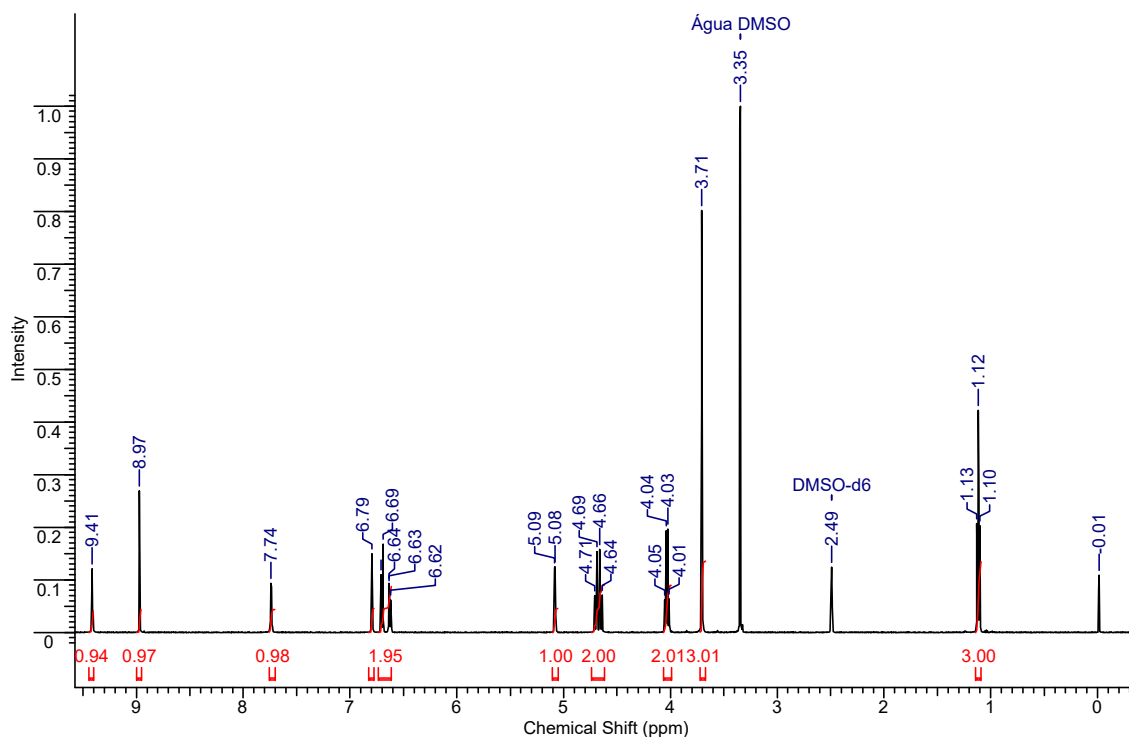
- 6-(clorometil)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4- tetrahidropirimidino-5- carboxilato de etila (28l)



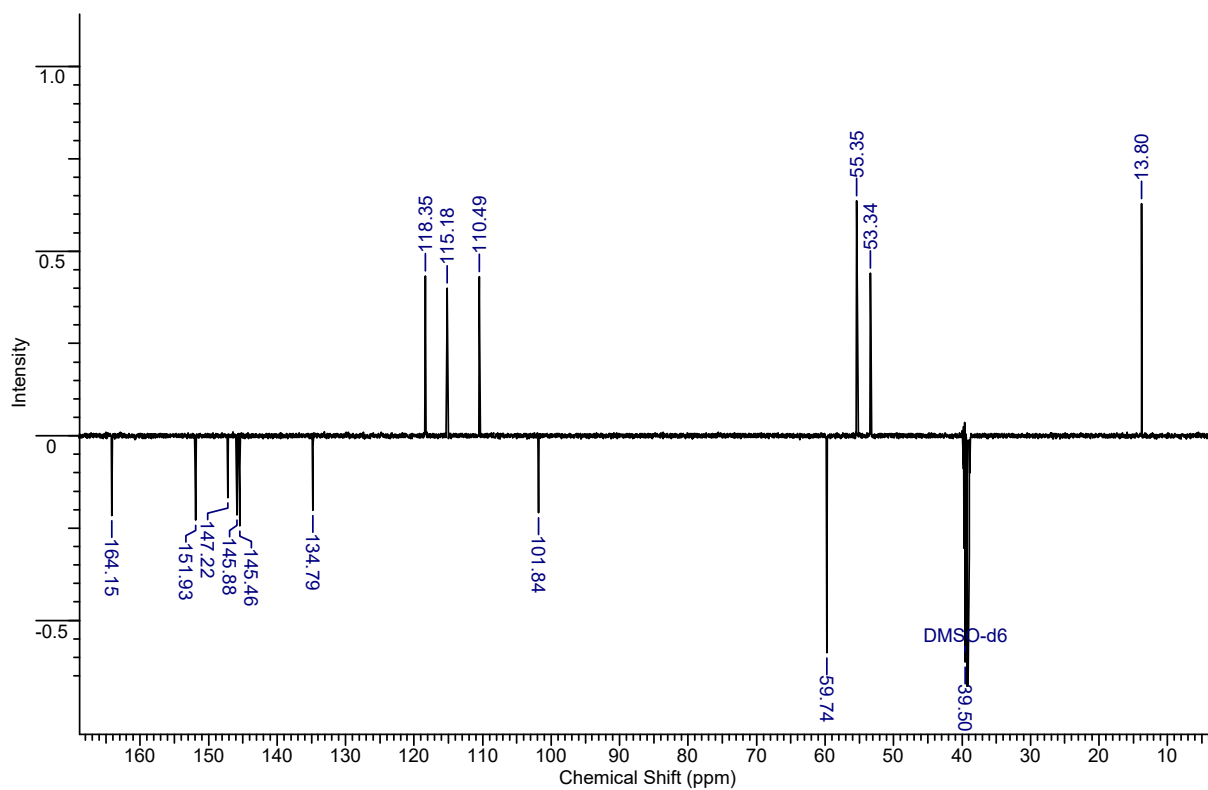
Cromatograma



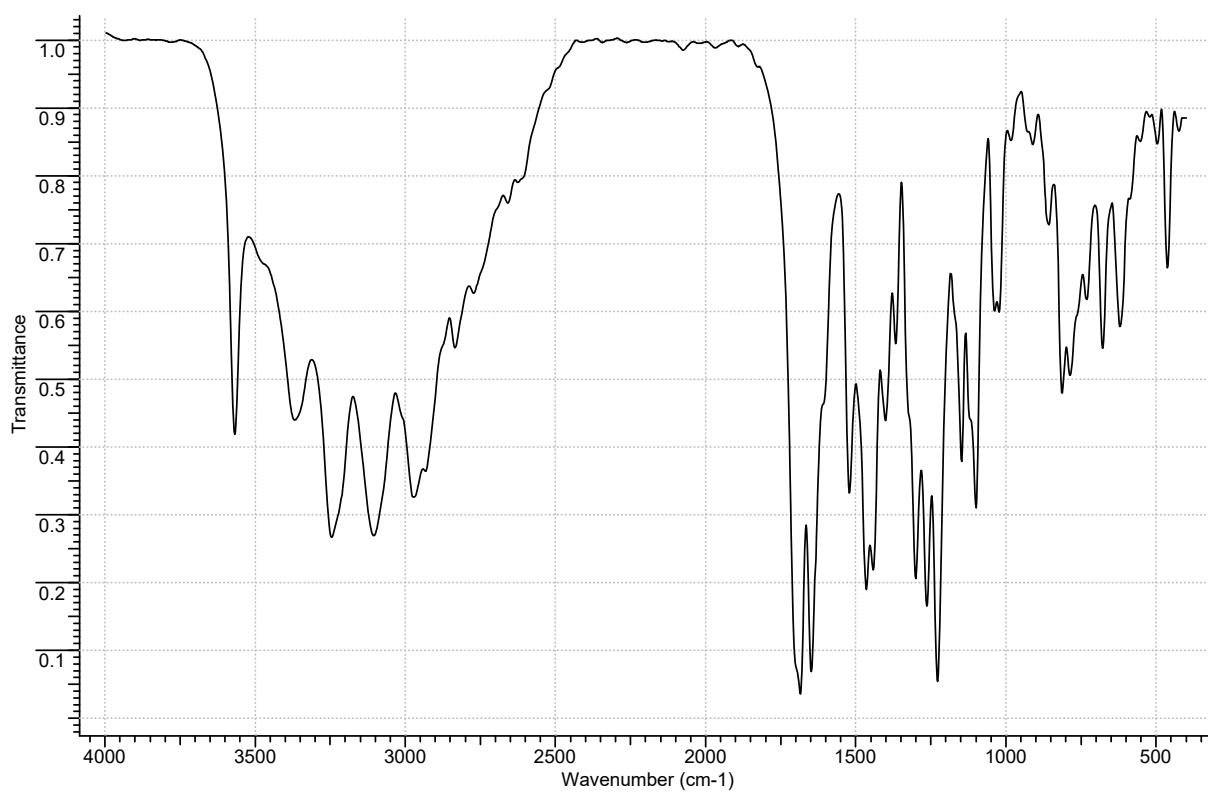
RMN de ¹H



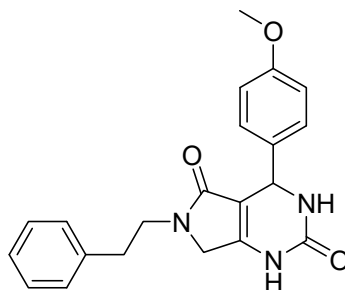
RMN de ^{13}C



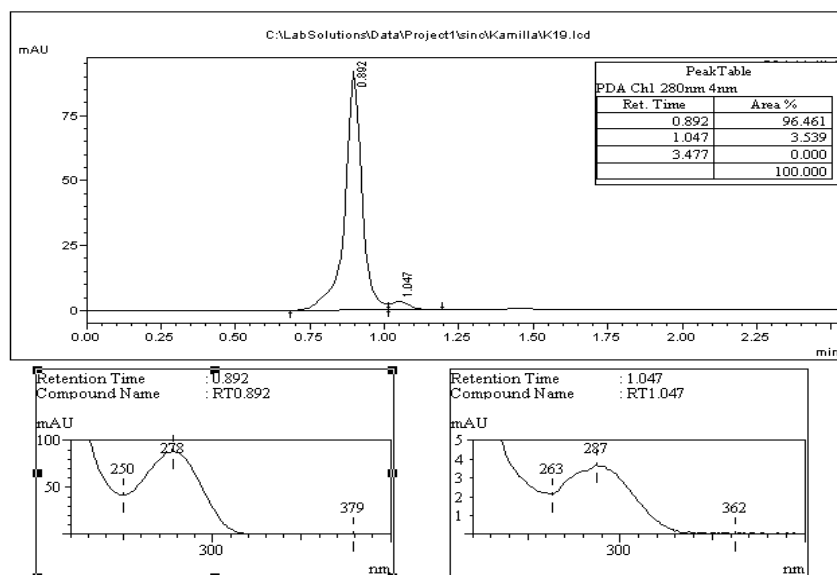
IV



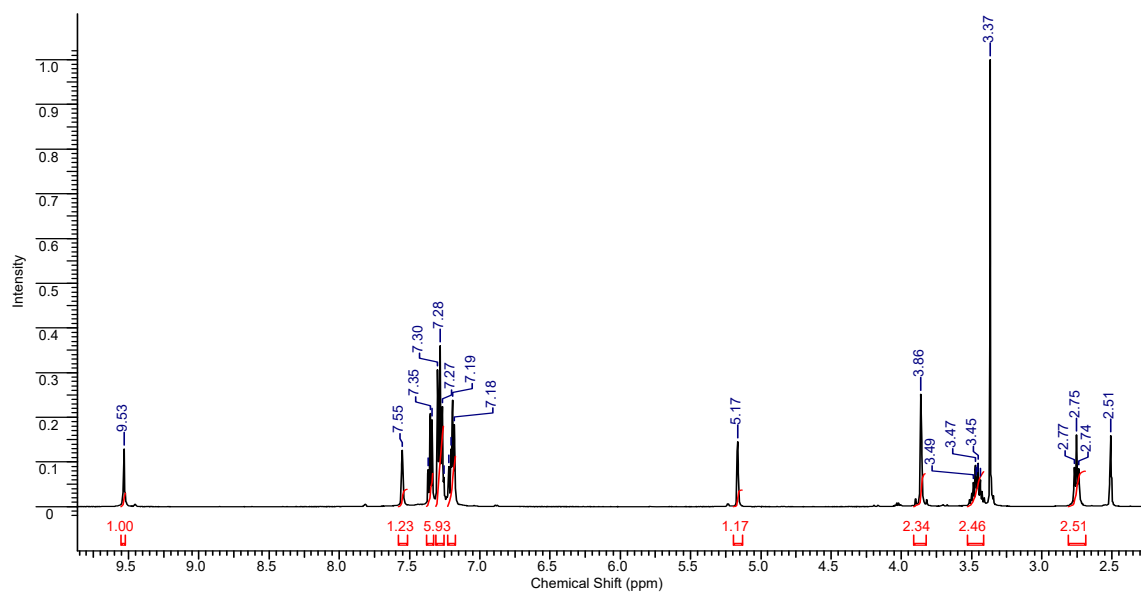
- 4-fenil-6-(2-feniletil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29a)



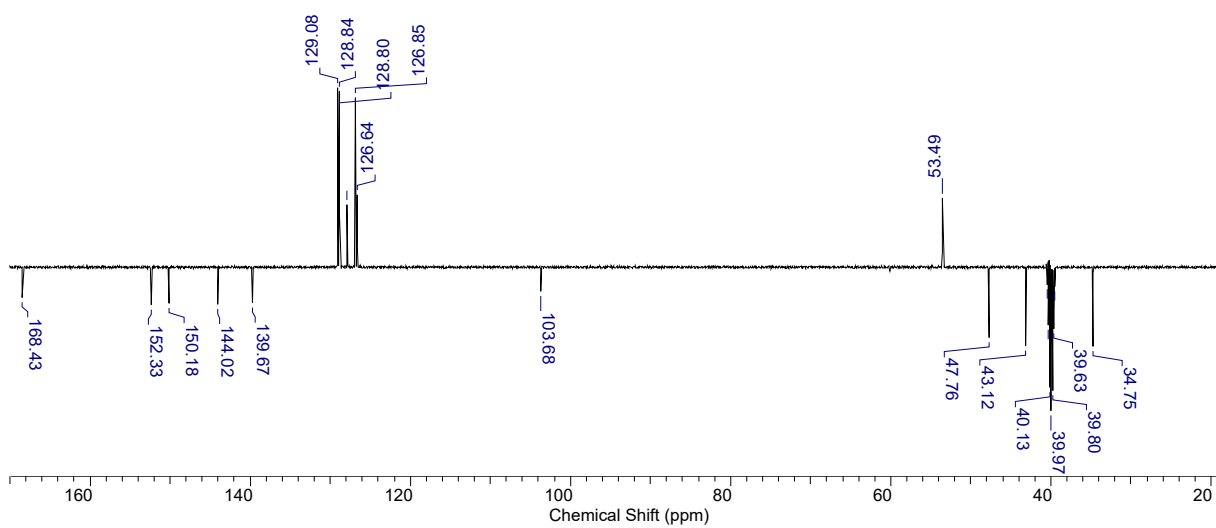
Cromatograma



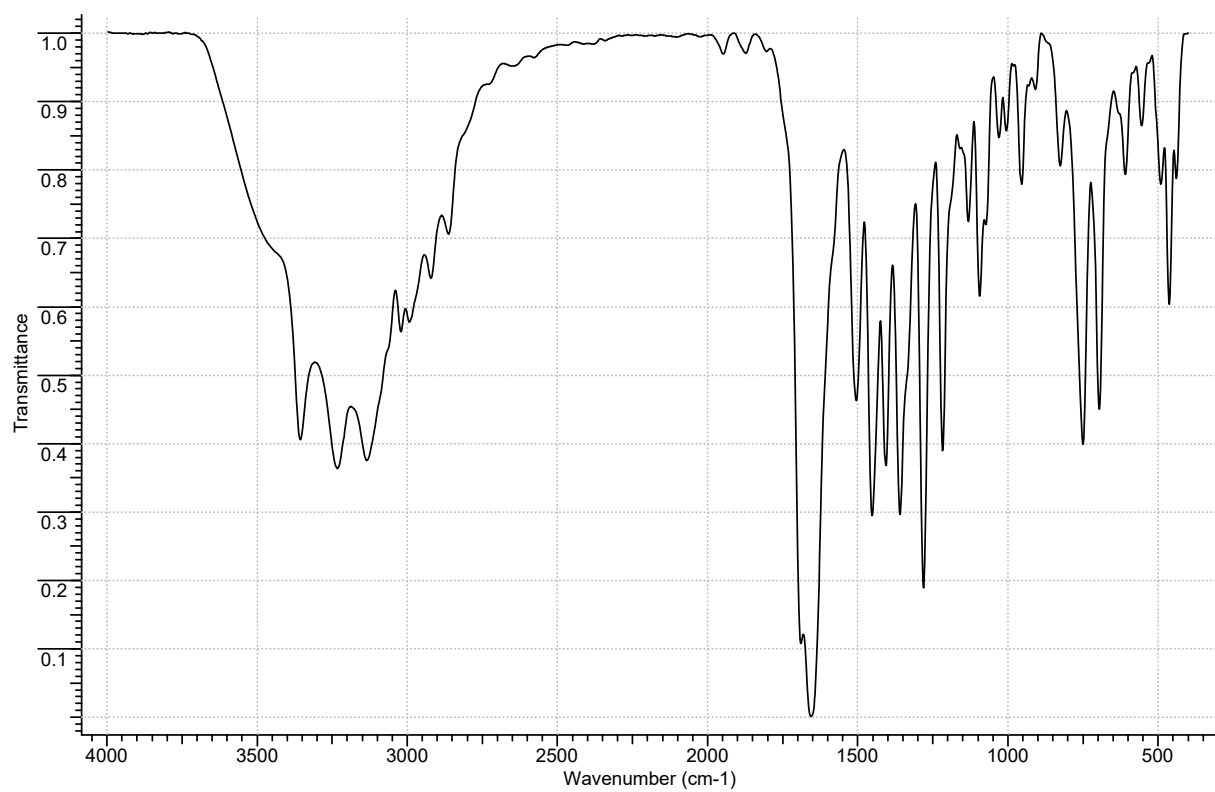
RMN de ^1H



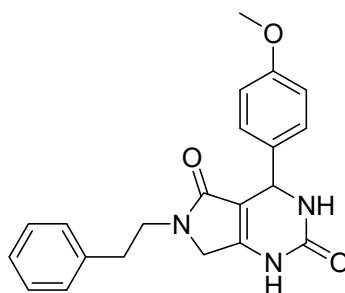
RMN de ^{13}C



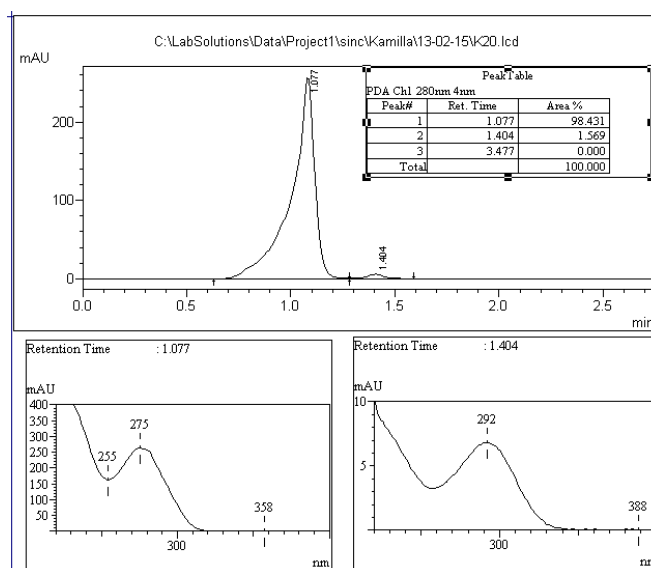
IV



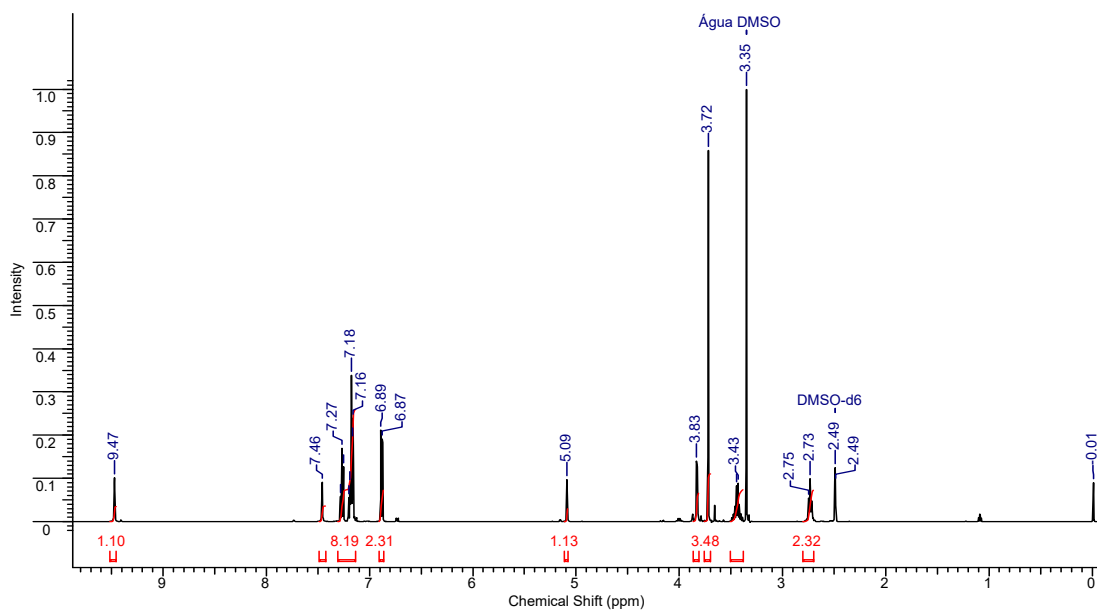
- 4-(4-metoxifenil)-6-(2-feniletil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29b)



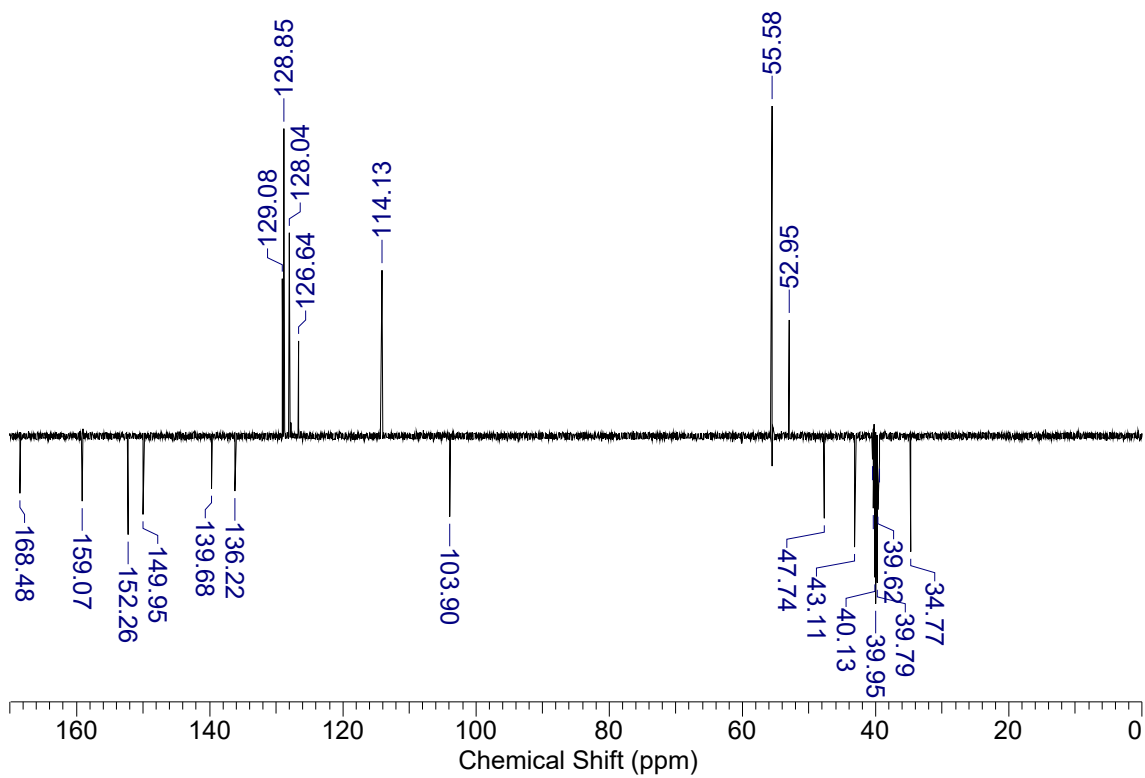
Cromatograma



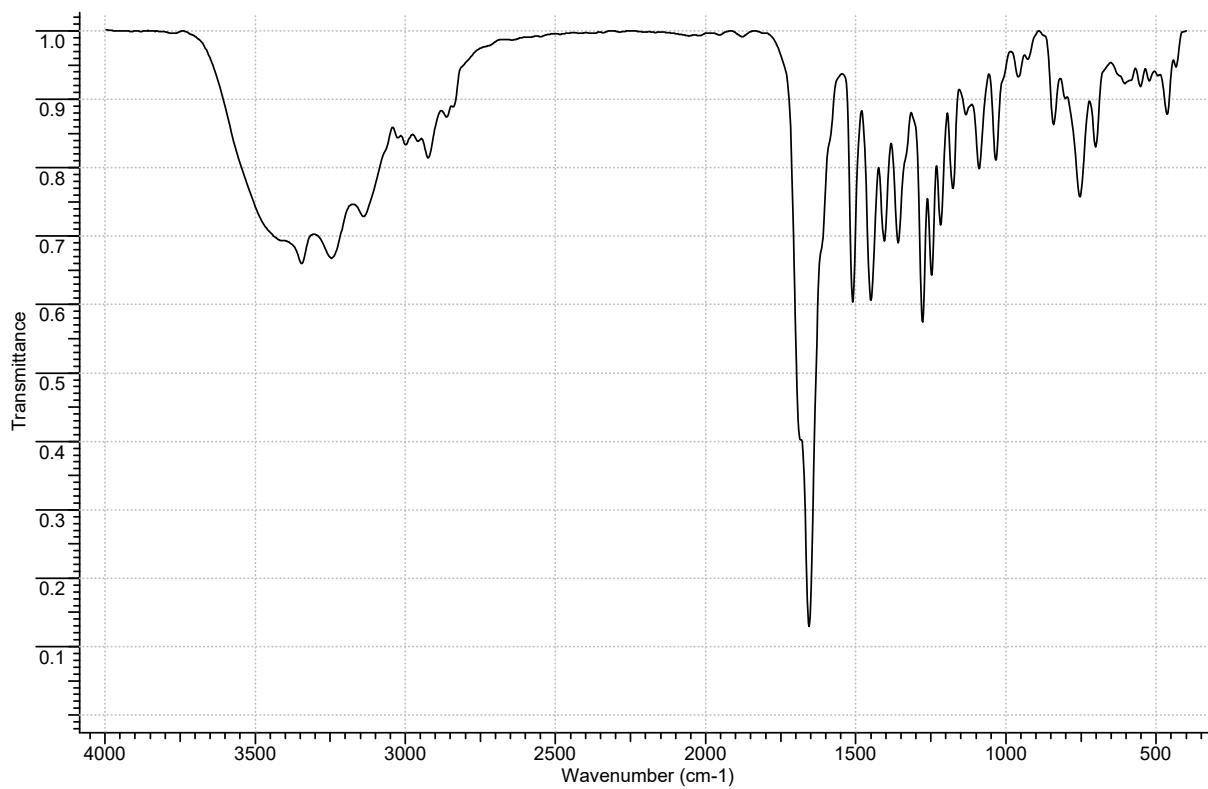
RMN de ¹H



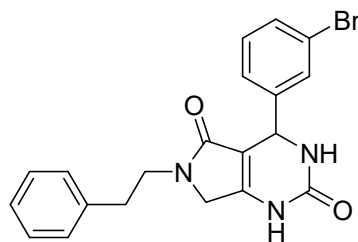
RMN de ^{13}C



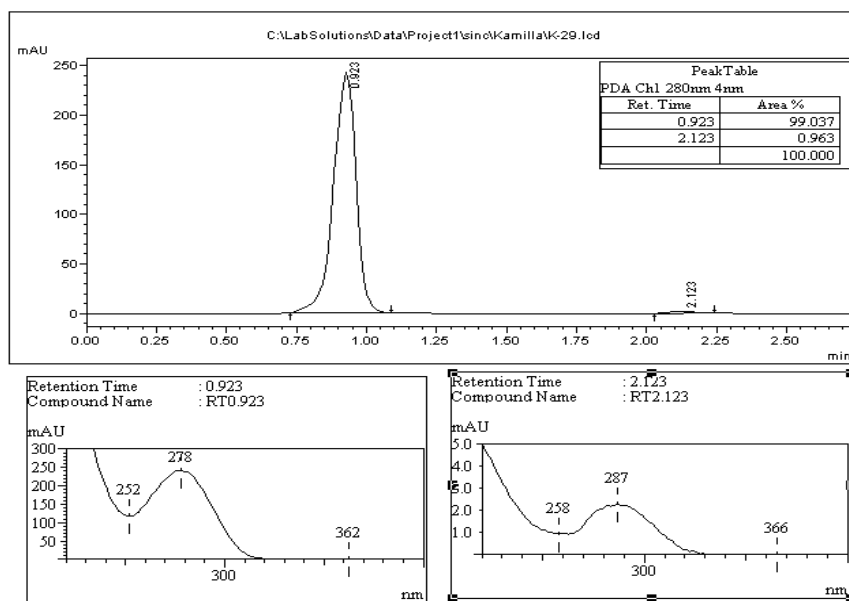
IV



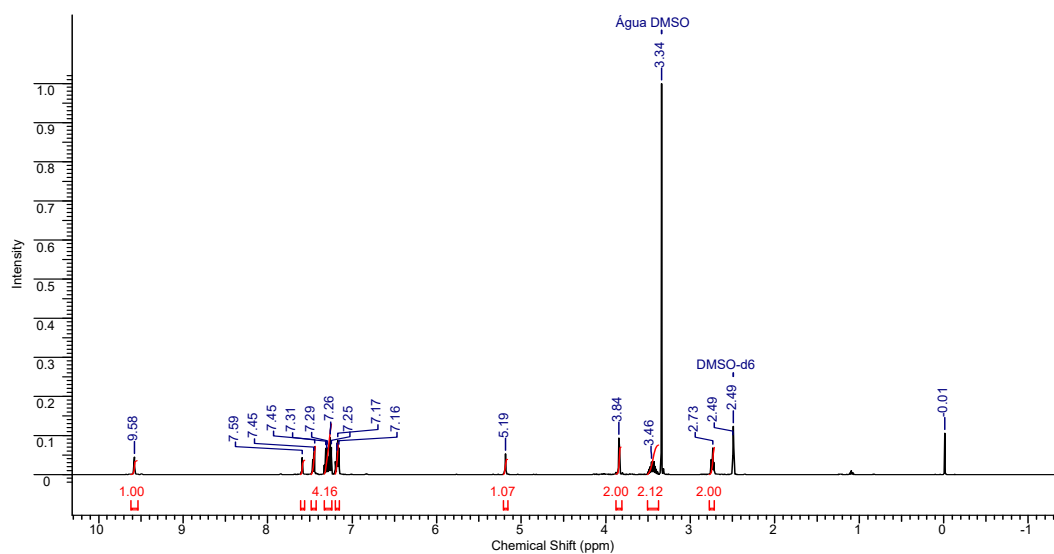
- 4-(3-bromofenil)-6-(2-feniletil)-3,4,6,7-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29C)



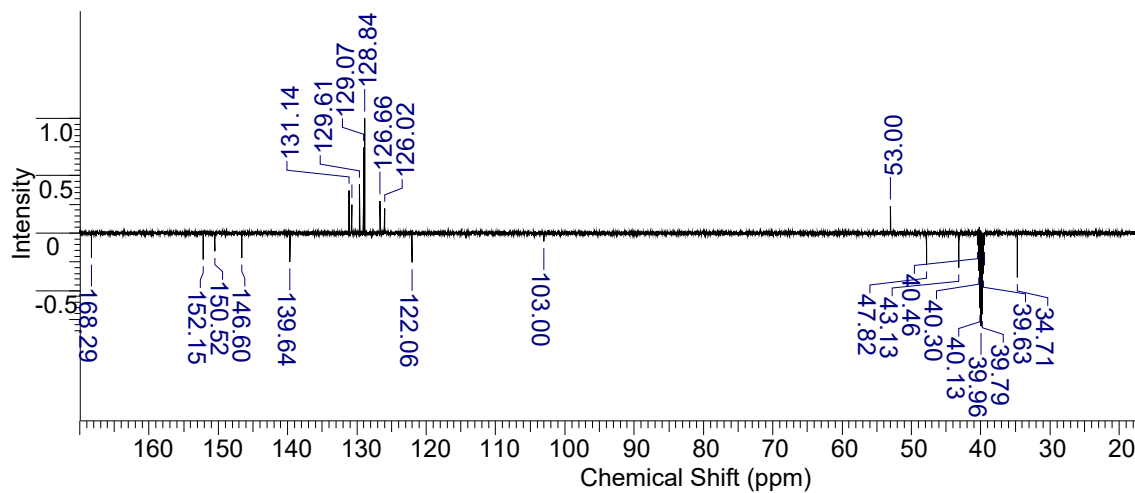
Cromatograma



RMN de ^1H



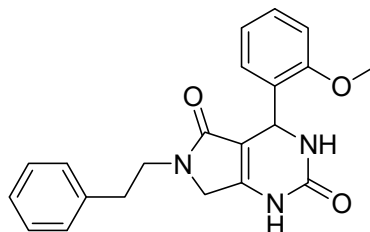
RMN de ^{13}C



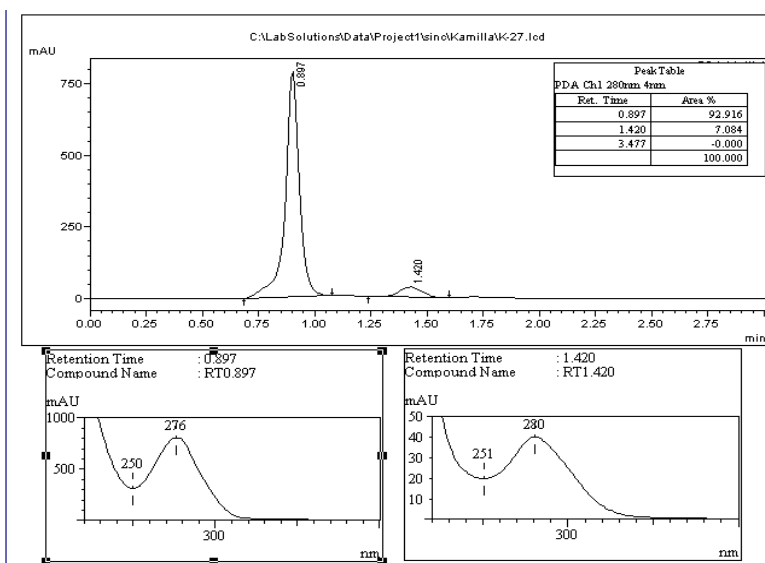
IV



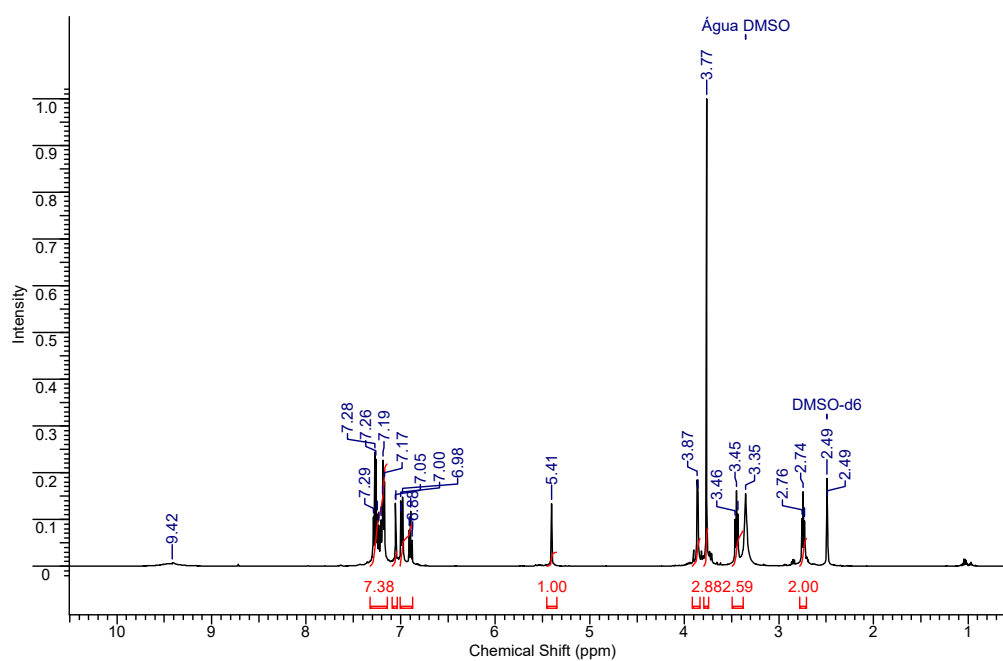
- 6-(2-feniletil)-4-(2-metoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrol[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29e)



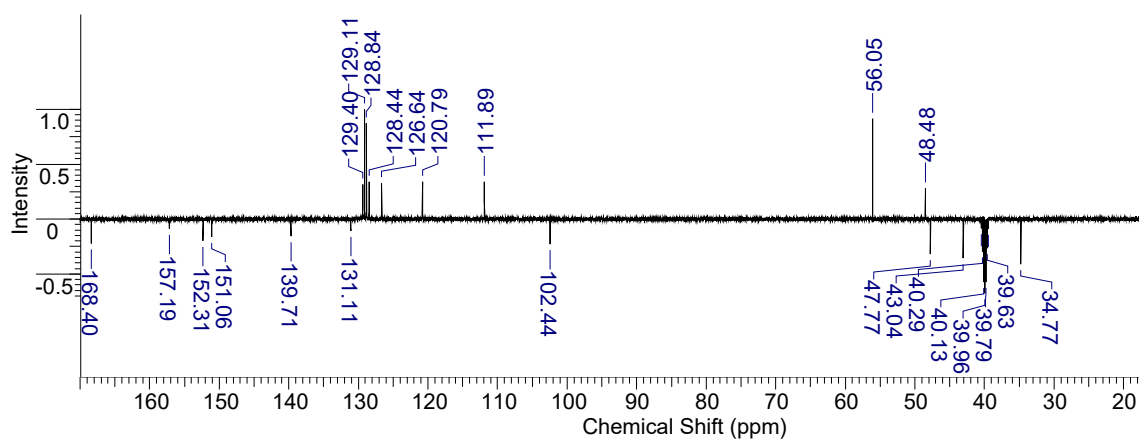
Cromatograma



RMN de ^1H



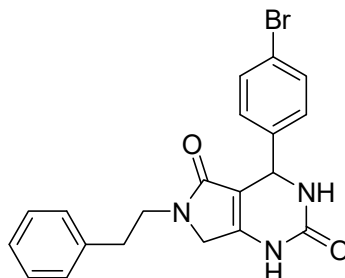
RMN de ^{13}C



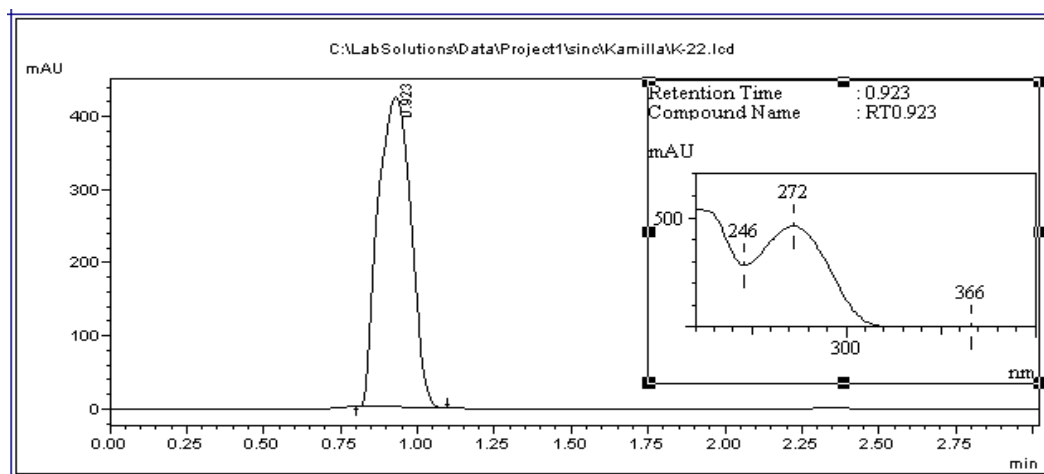
IV



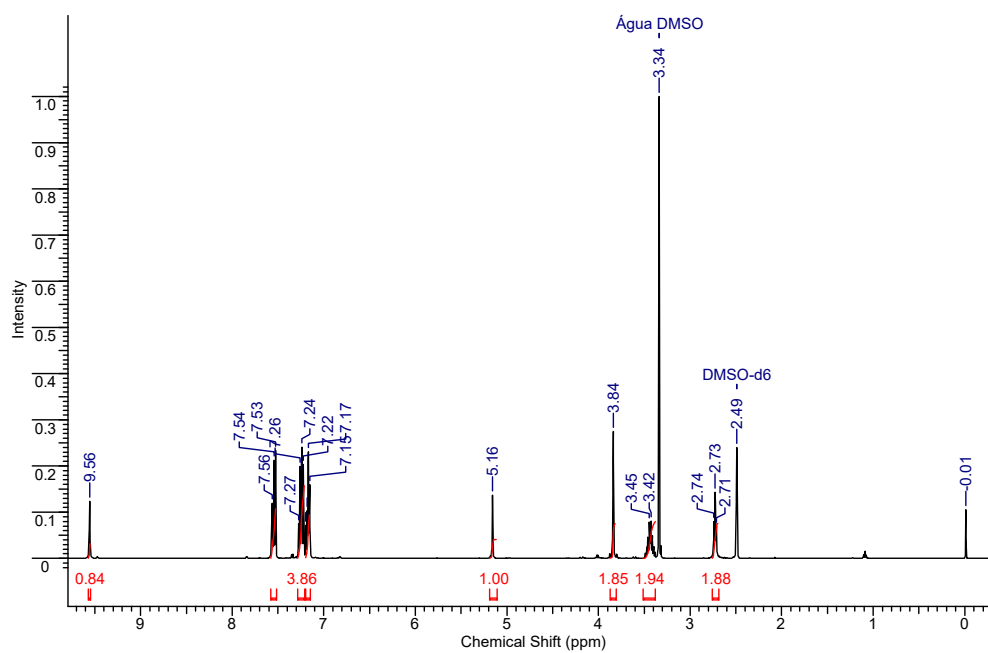
5.2.3 4-(4-bromofenil)-6-(2-feniletil)-3,4,6,7-tetrahidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29f)



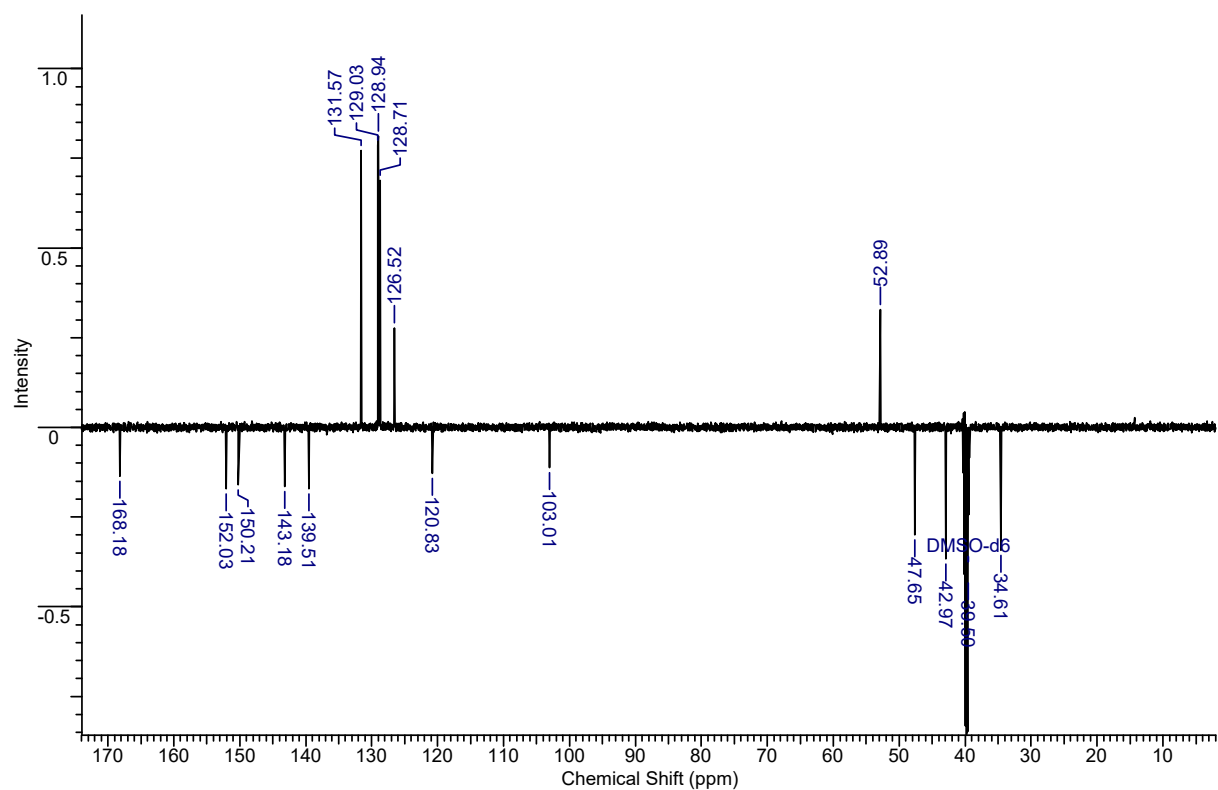
Cromatograma



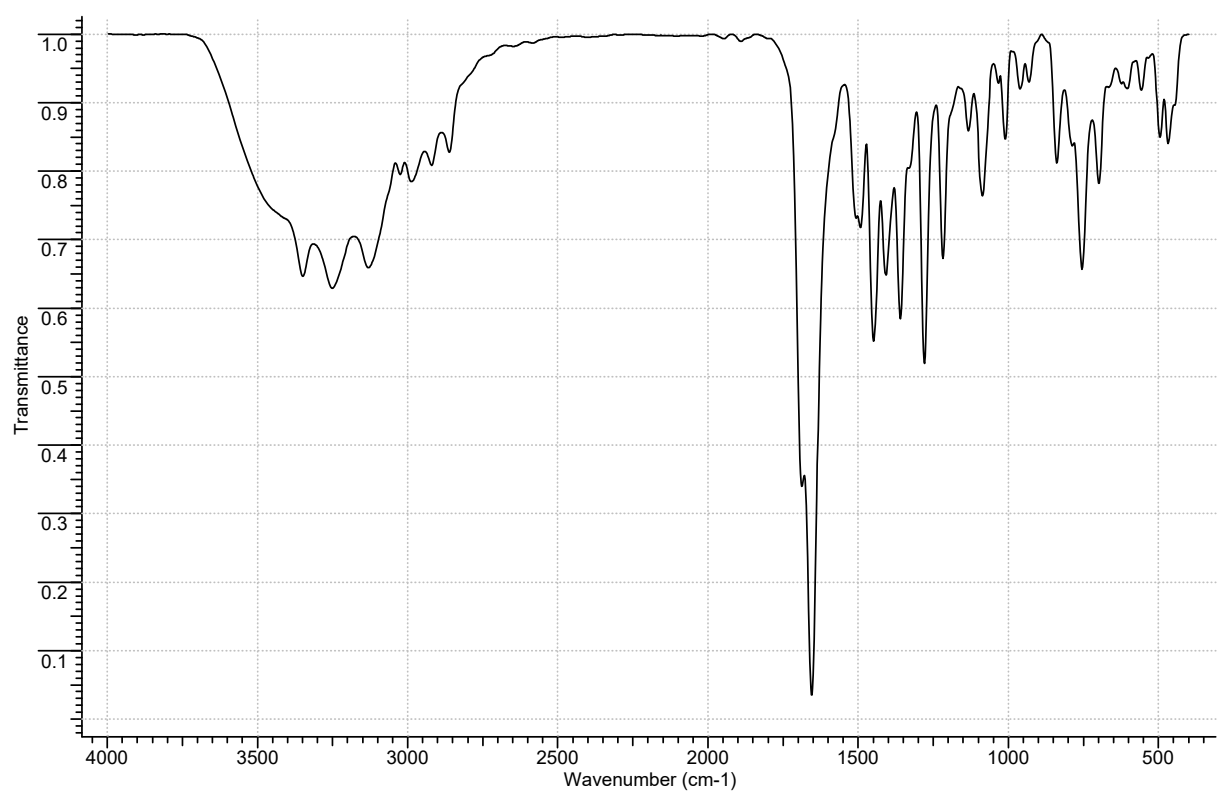
RMN de ^1H



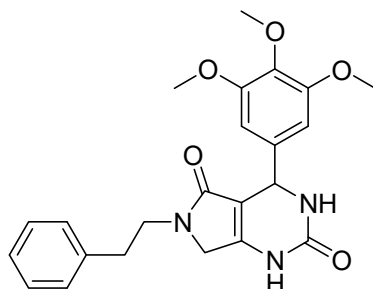
RMN de ^{13}C



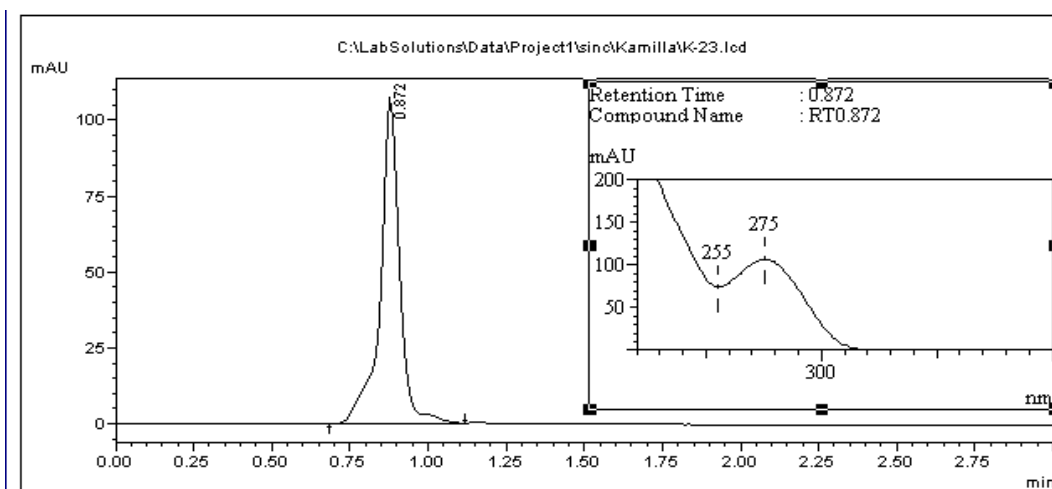
IV



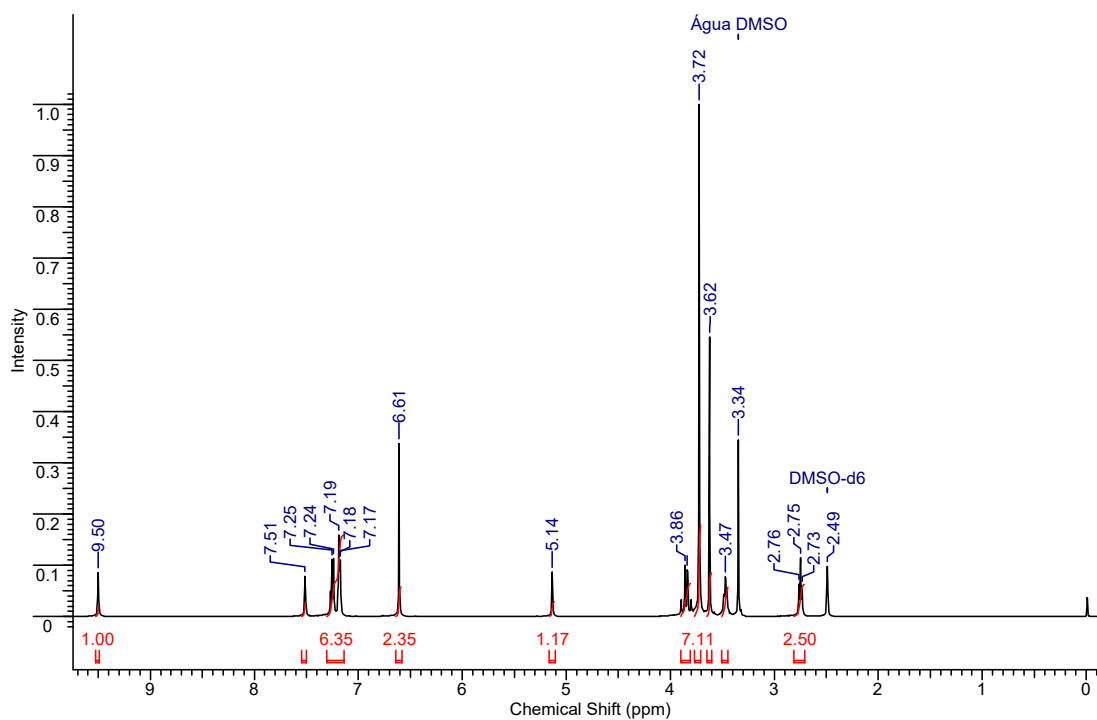
- 6-(2-feniletíl)-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29g)



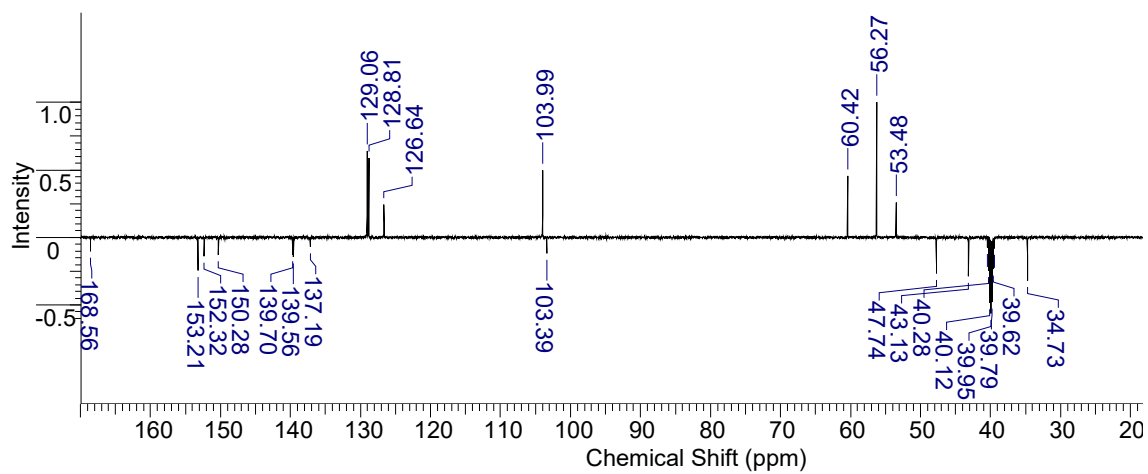
Cromatograma



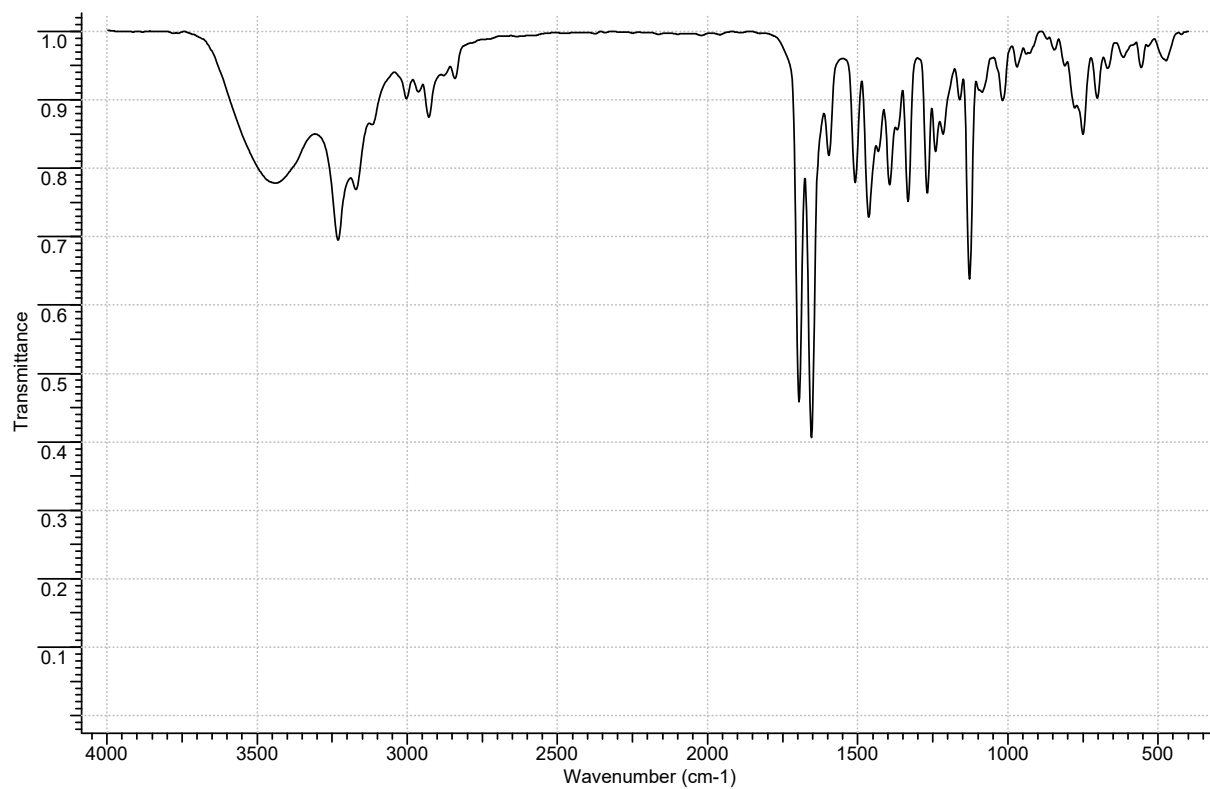
RMN de ^1H



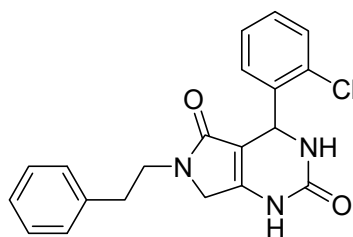
RMN de ^{13}C



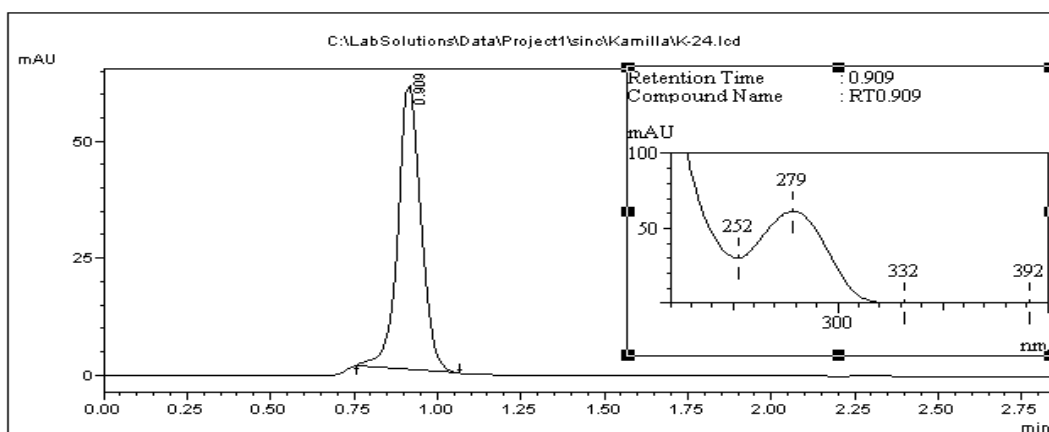
IV



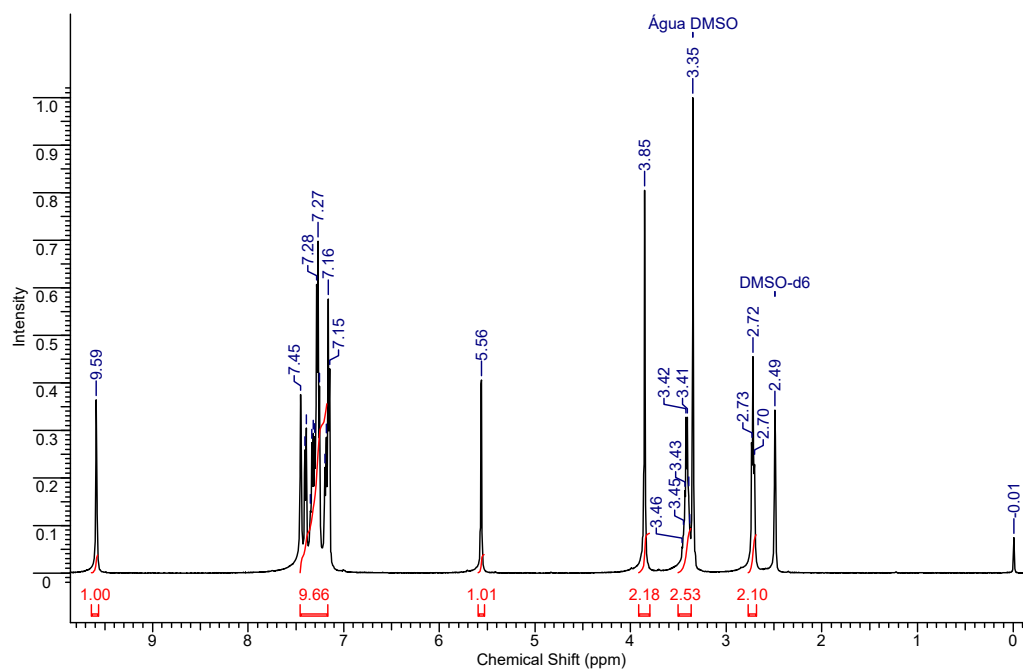
- 4-(2-clorofenil)-6-(2-feniletil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29h)



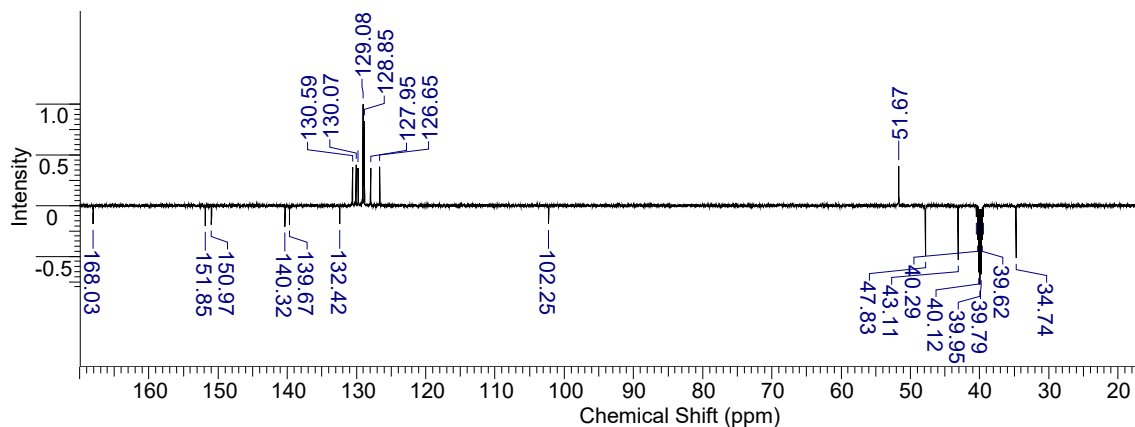
Cromatograma



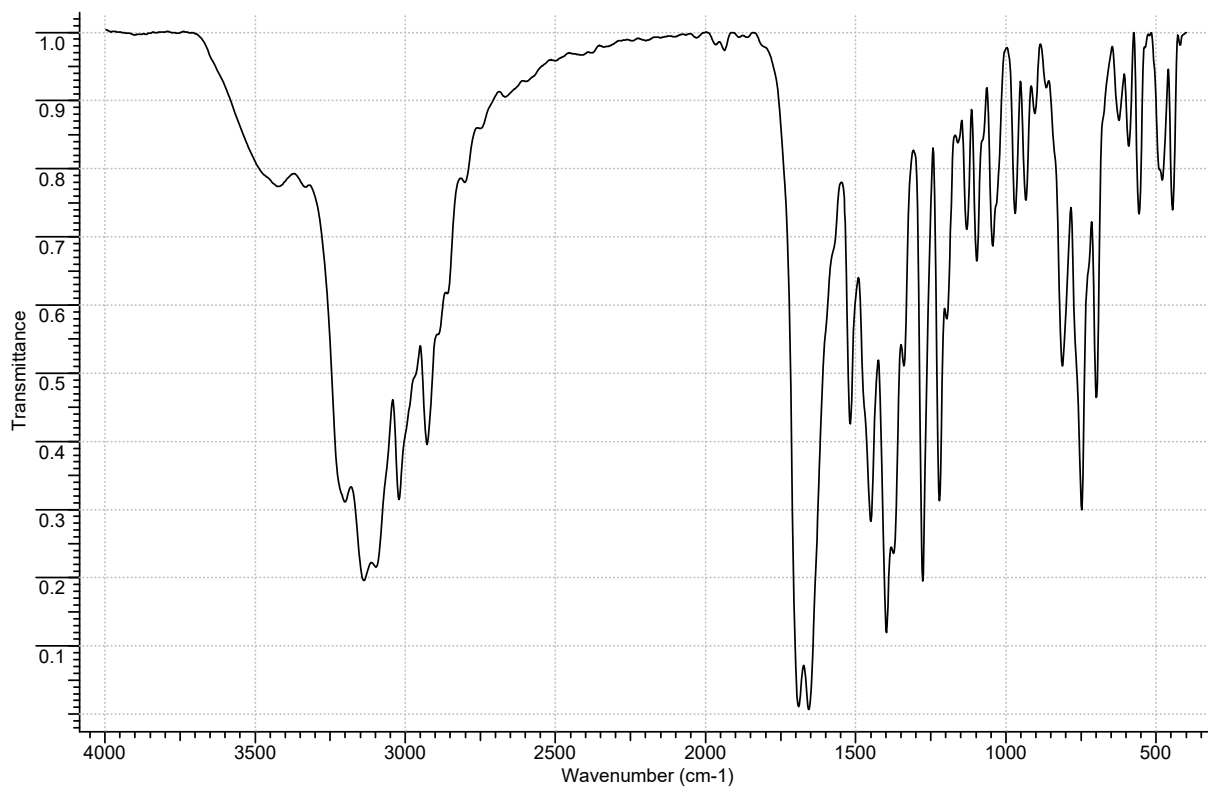
RMN de ¹H



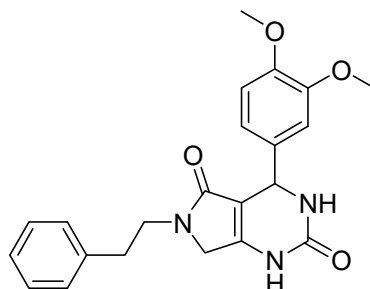
RMN de ^{13}C



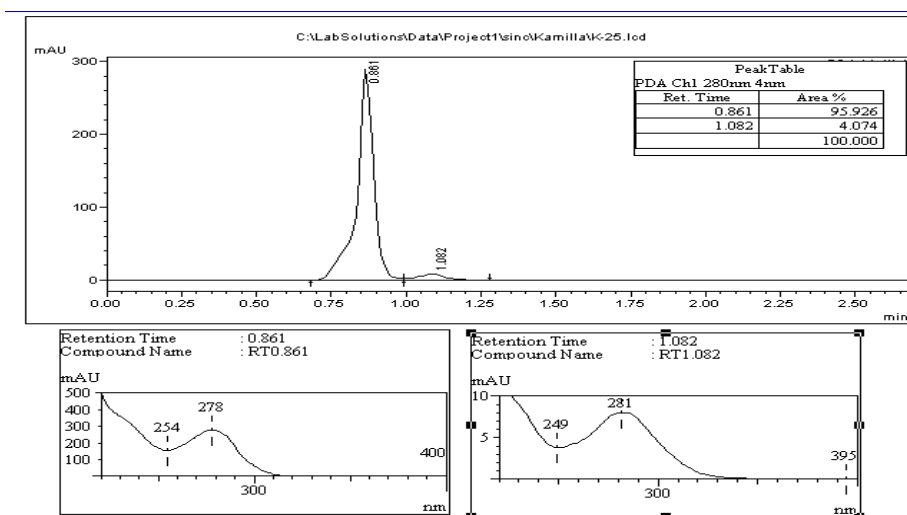
IV



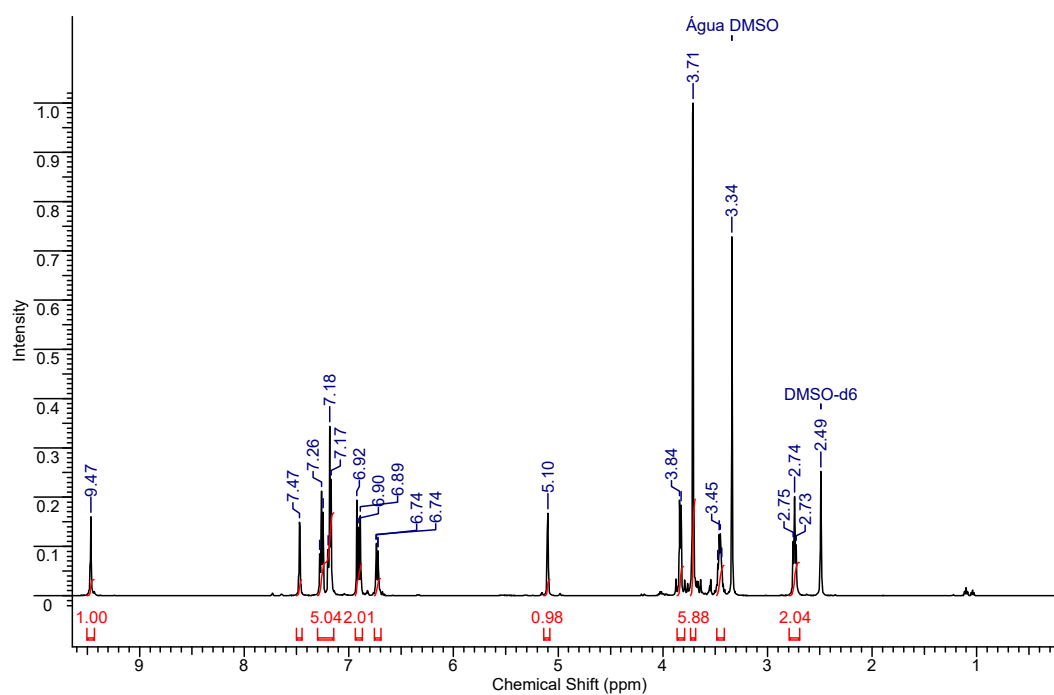
- 6-(2-feniletil)-4-(3,4-dimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (29k)



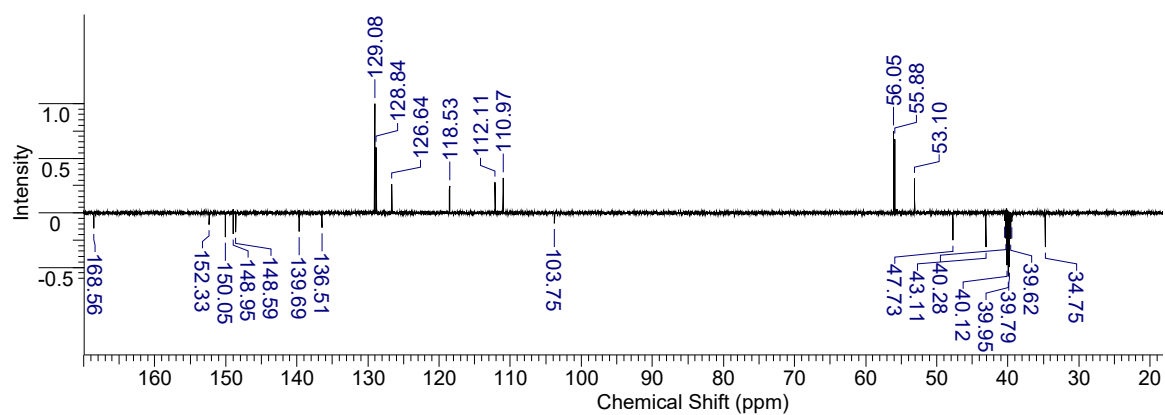
Cromatograma



RMN de ¹H



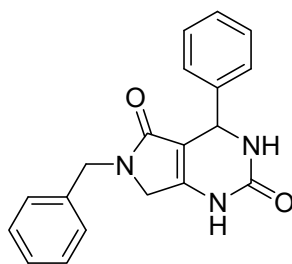
RMN de ^{13}C



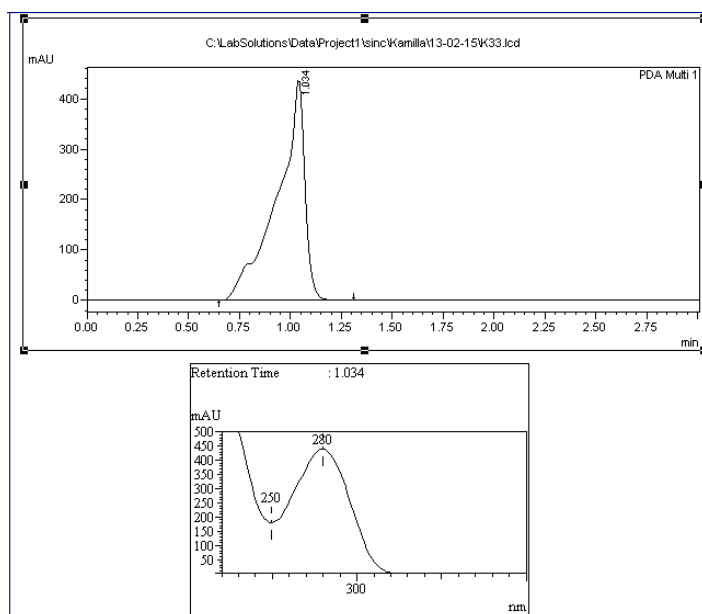
IV



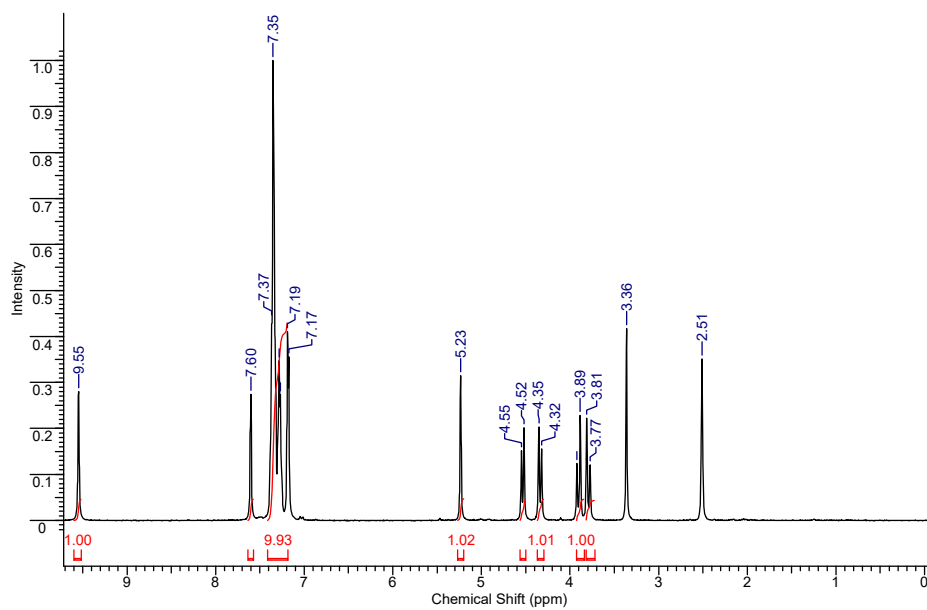
- 6-(benzil)-4-fenil-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30a)



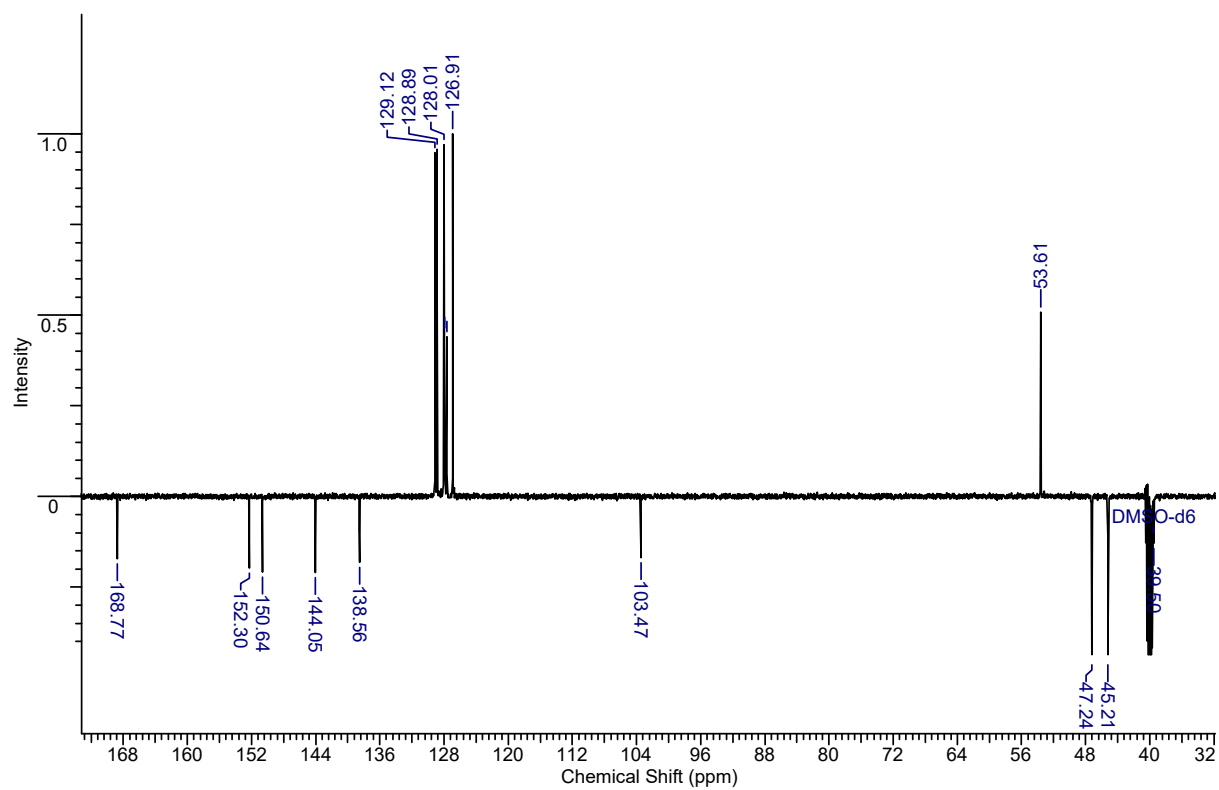
Cromatograma



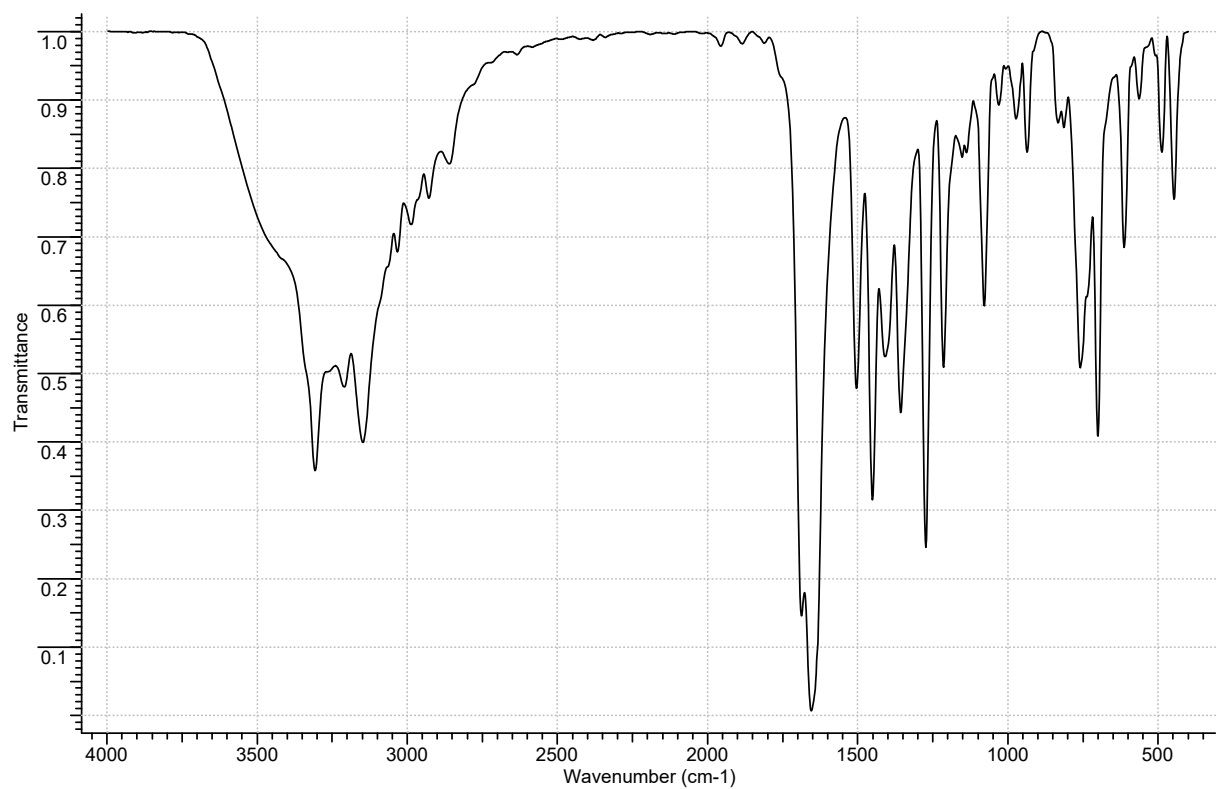
RMN de ^1H



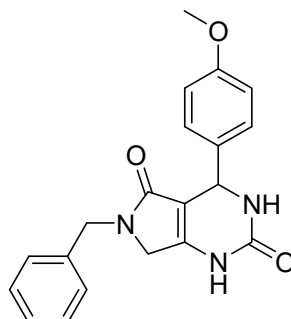
RMN de ^{13}C



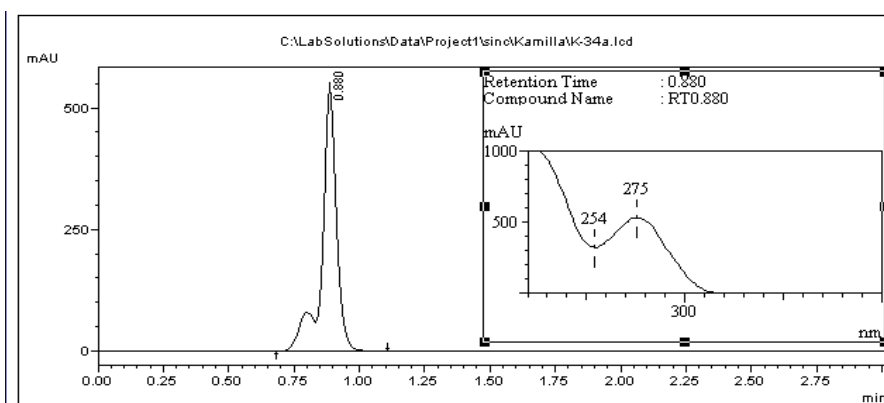
IV



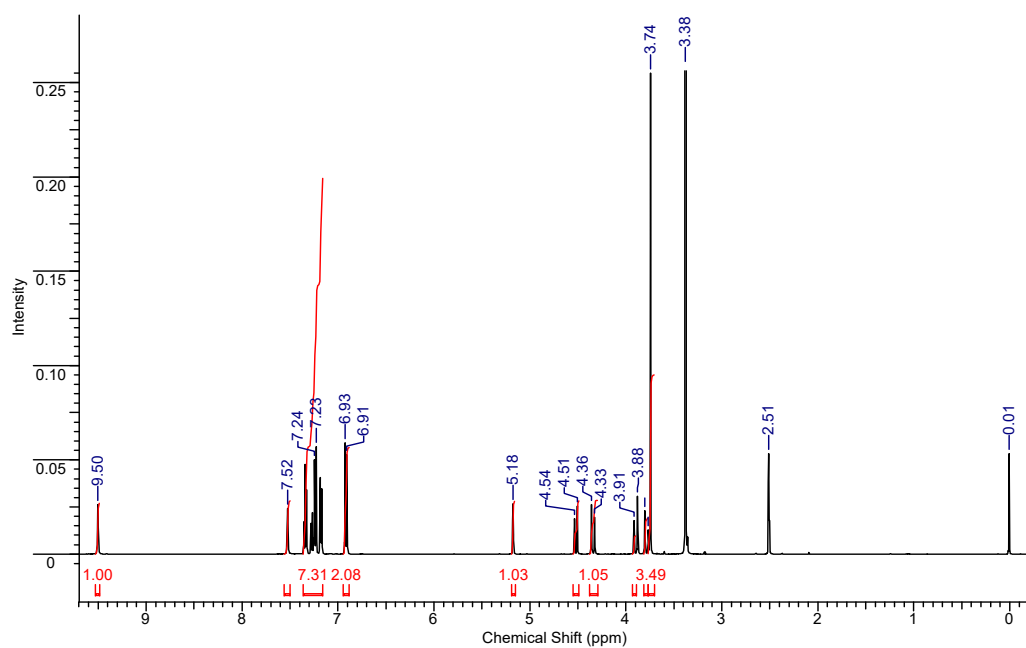
- 6-(benzil)-4-(4-metoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30b)



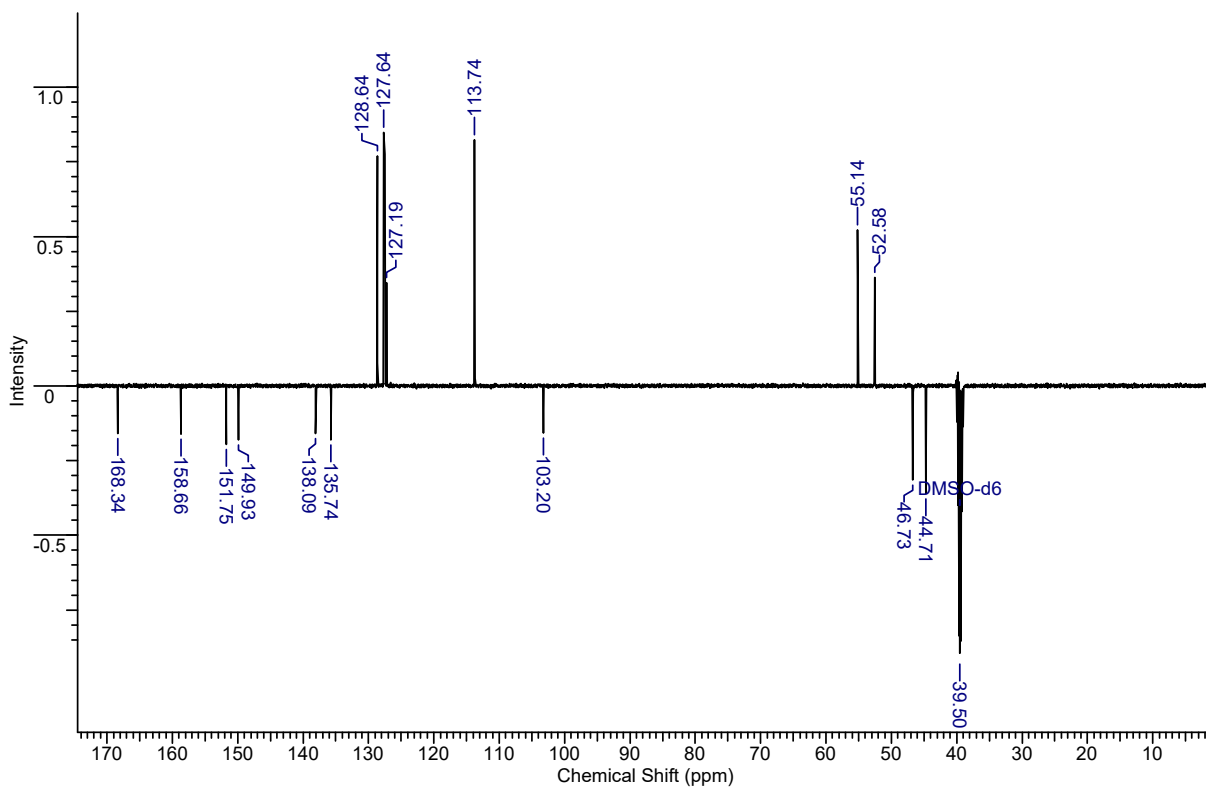
Cromatograma



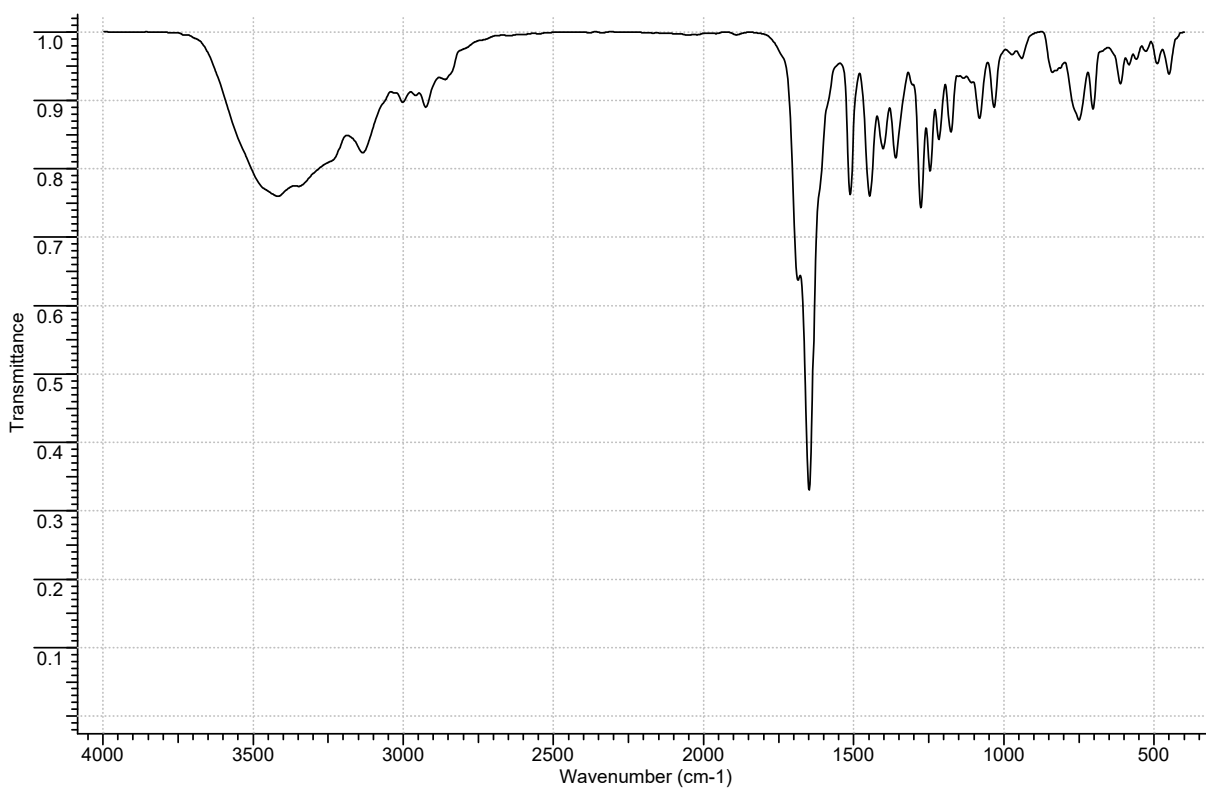
RMN de ¹H



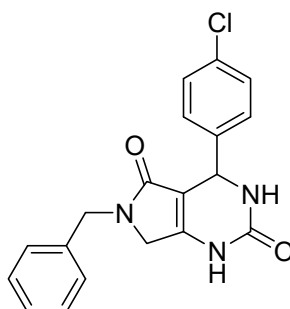
RMN de ¹³C



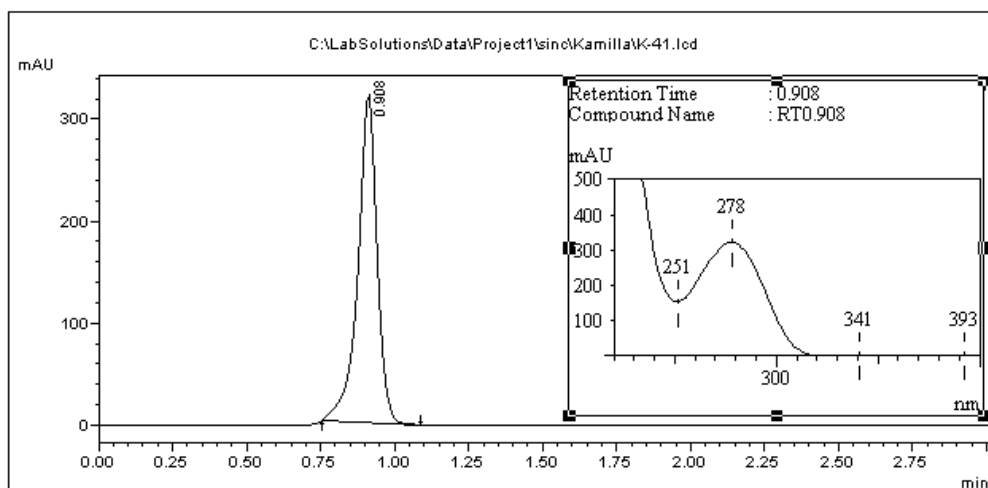
IV



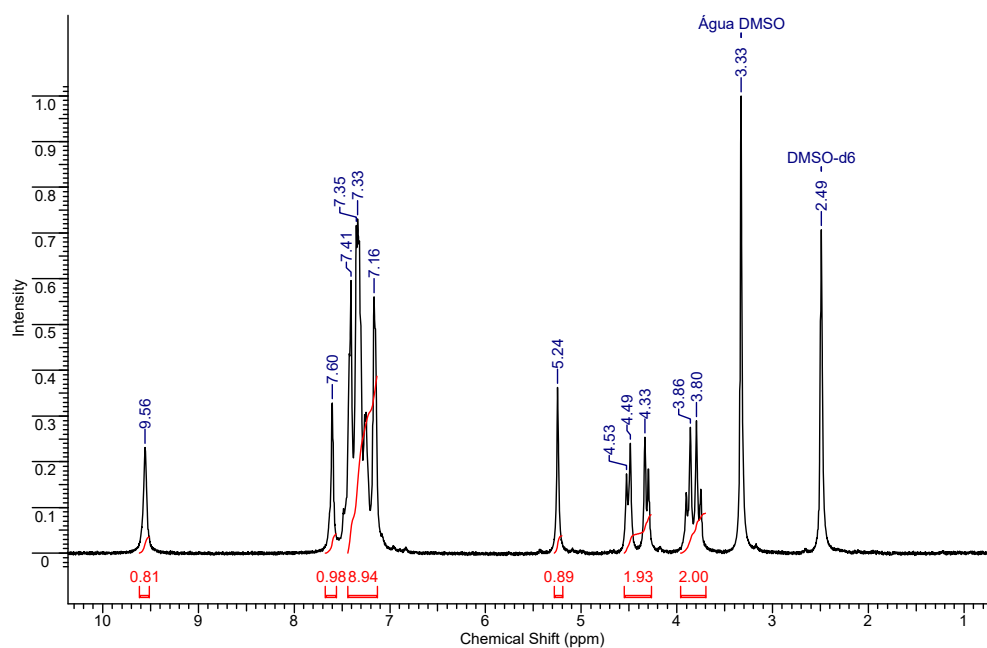
- 6-(benzil)-4-(4-clorofenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30d)



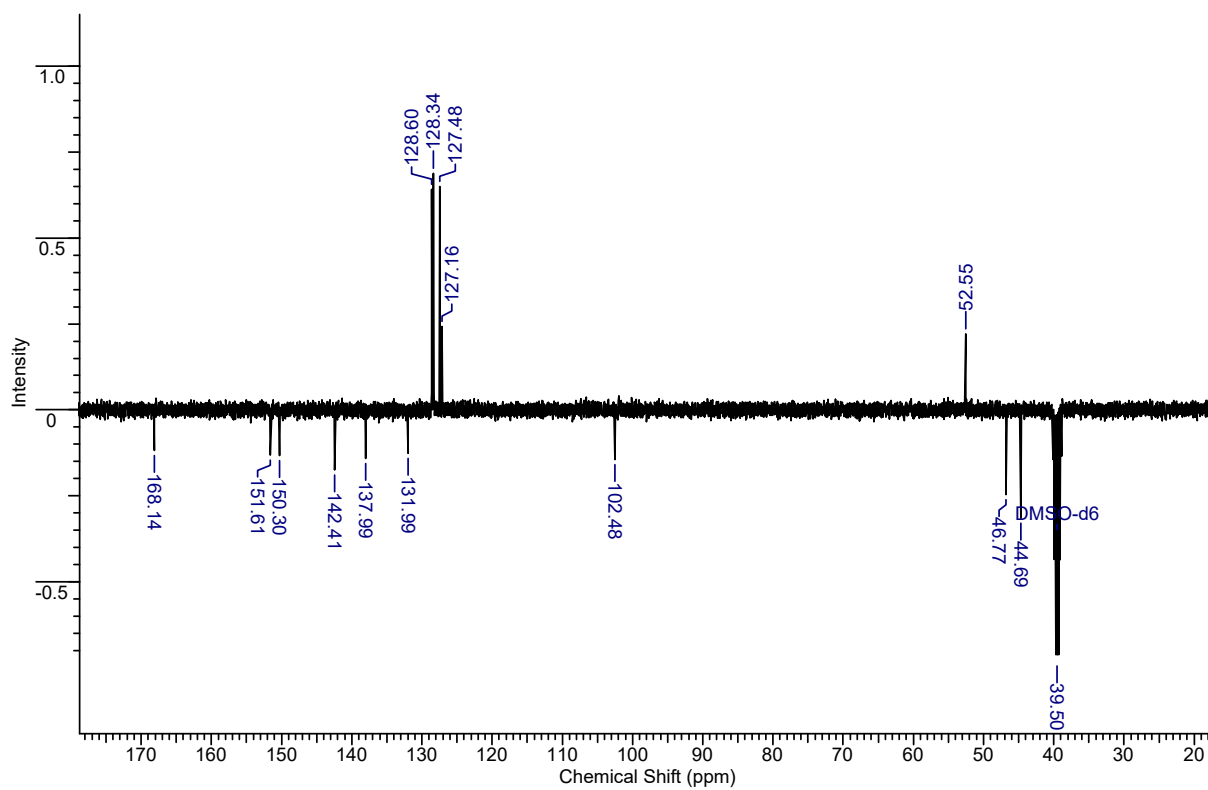
Cromatograma



RMN de ¹H



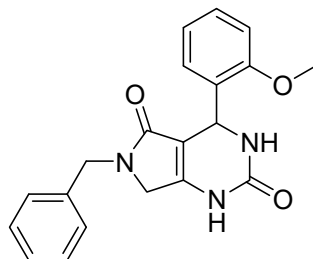
RMN de ^{13}C



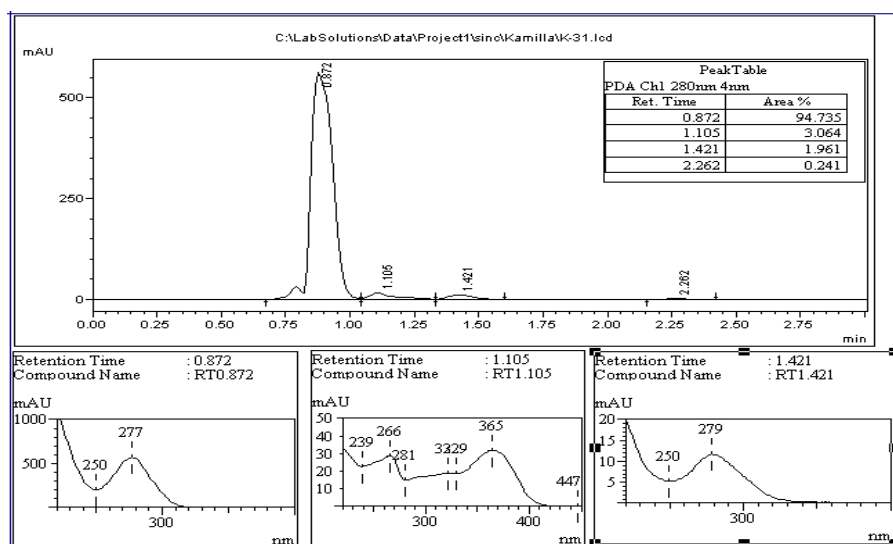
IV



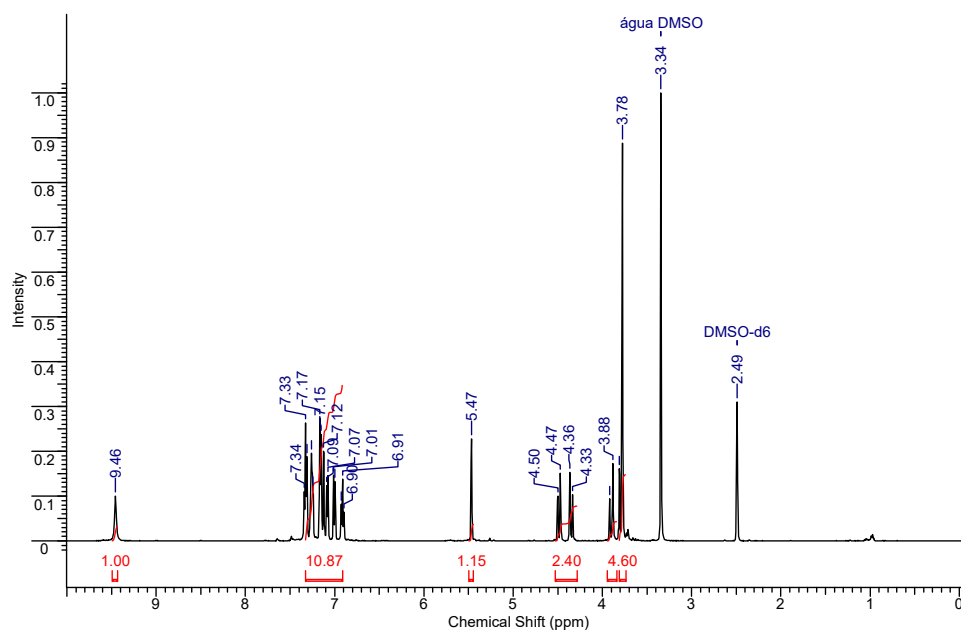
- 6-(benzil)-4-(2-imetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30e)



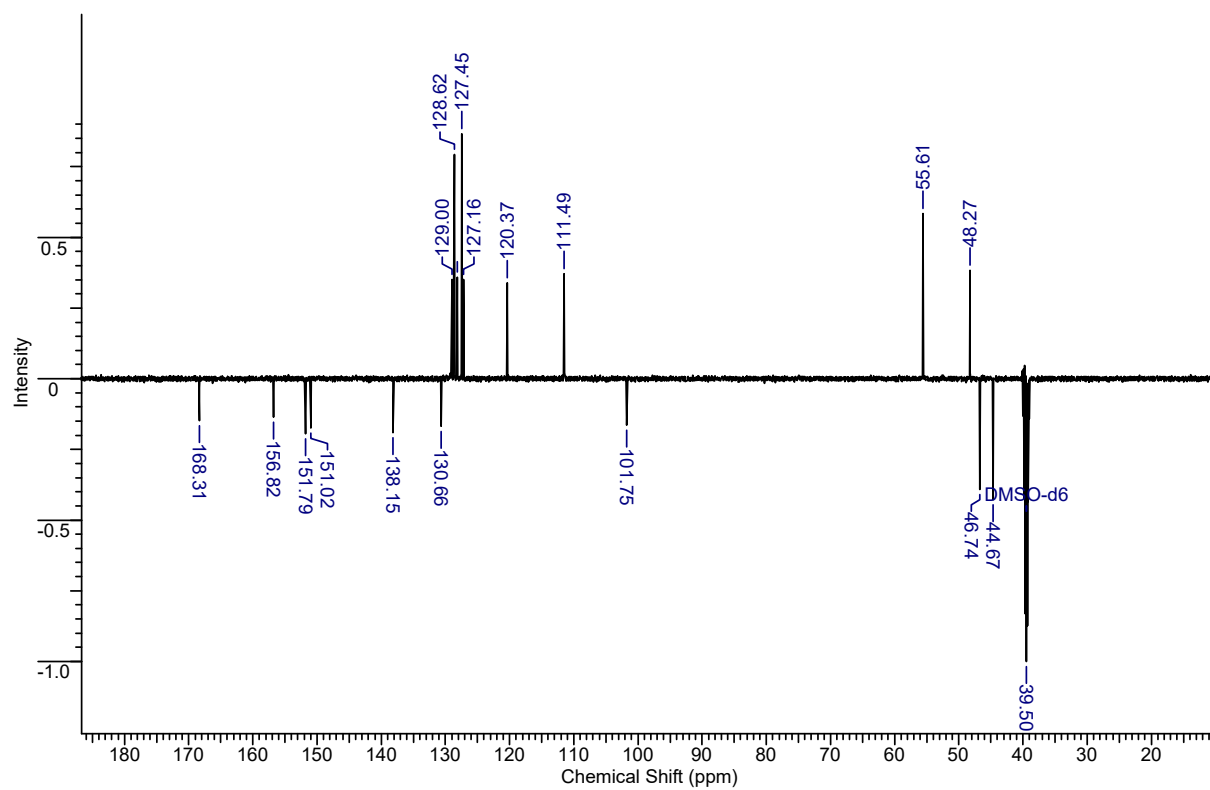
Cromatograma



RMN ¹H



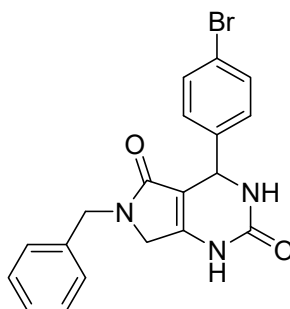
RMN ¹³C



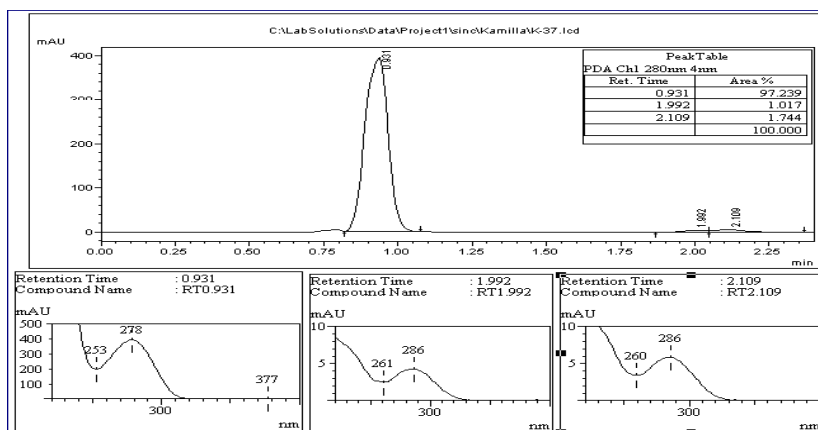
IV



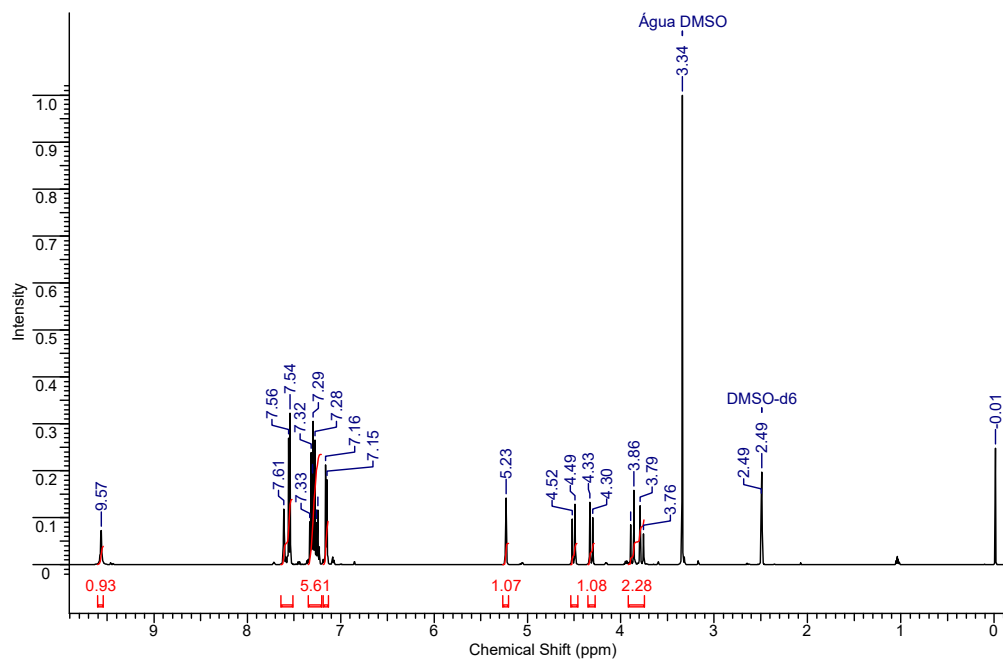
- 6-(benzil)-4-(4-bromofenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30f)



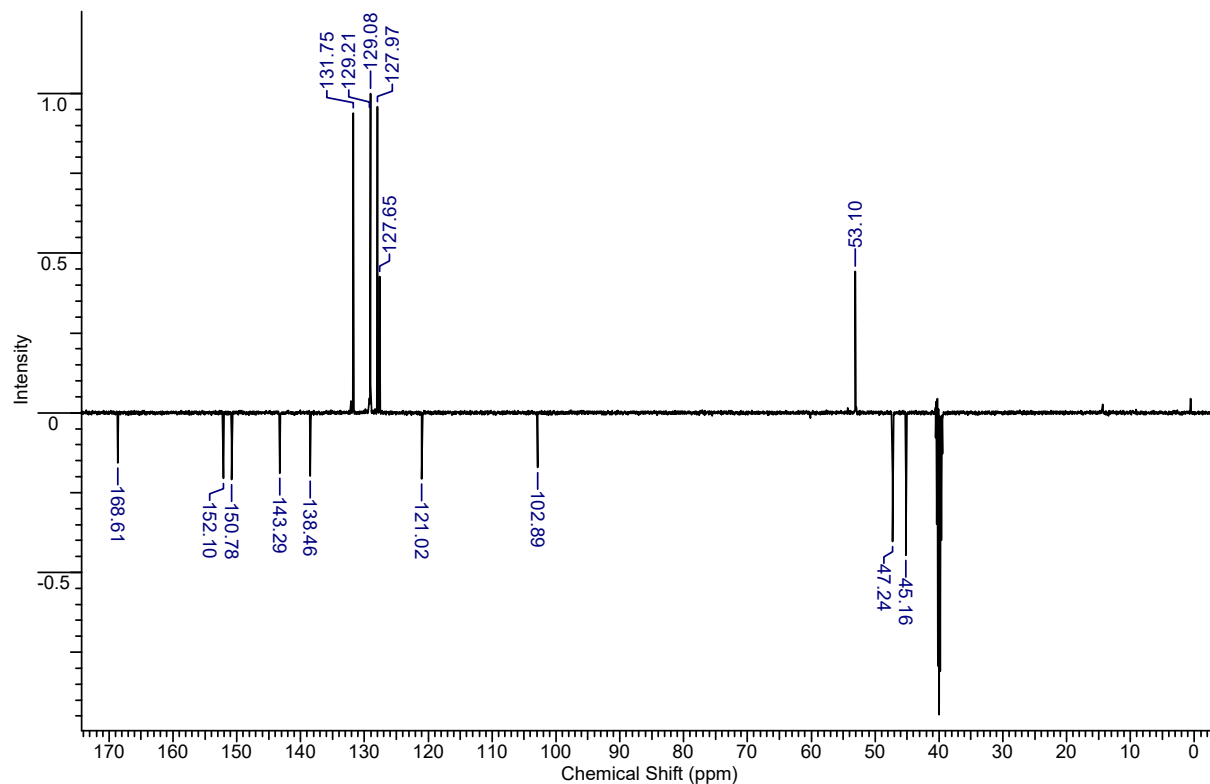
Cromatograma



RMN de ¹H



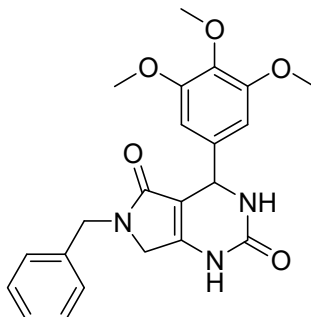
RMN ¹³C



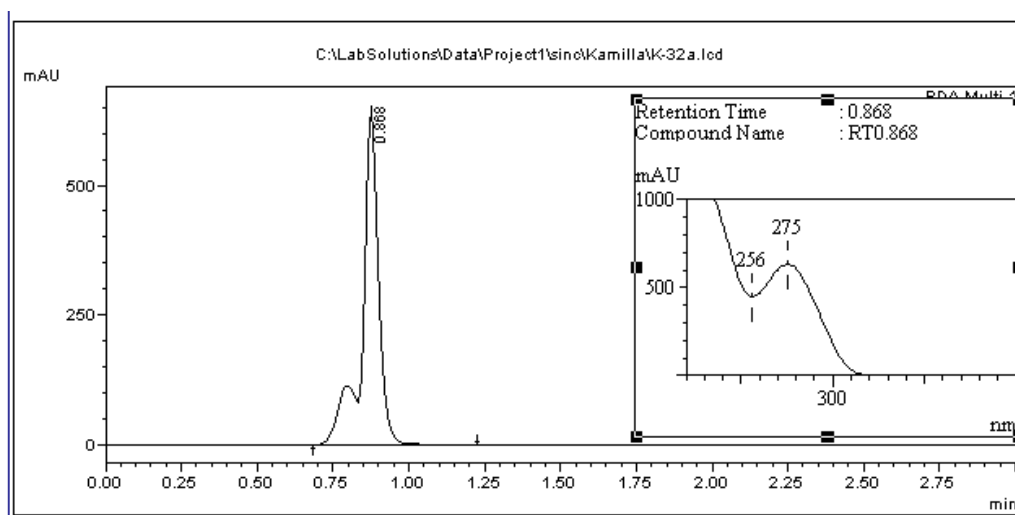
IV



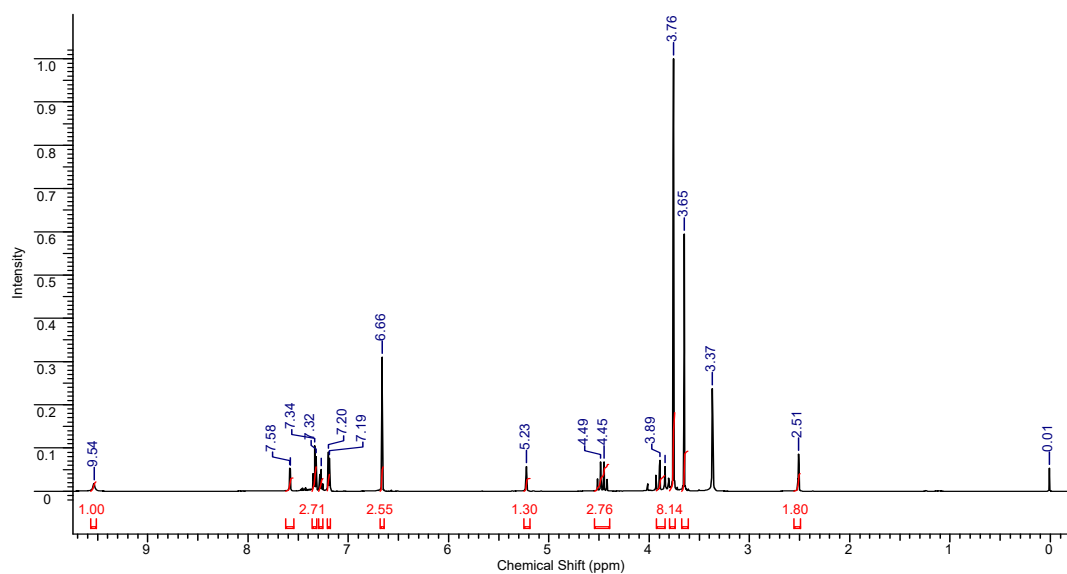
- 6-(benzil)-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30g)



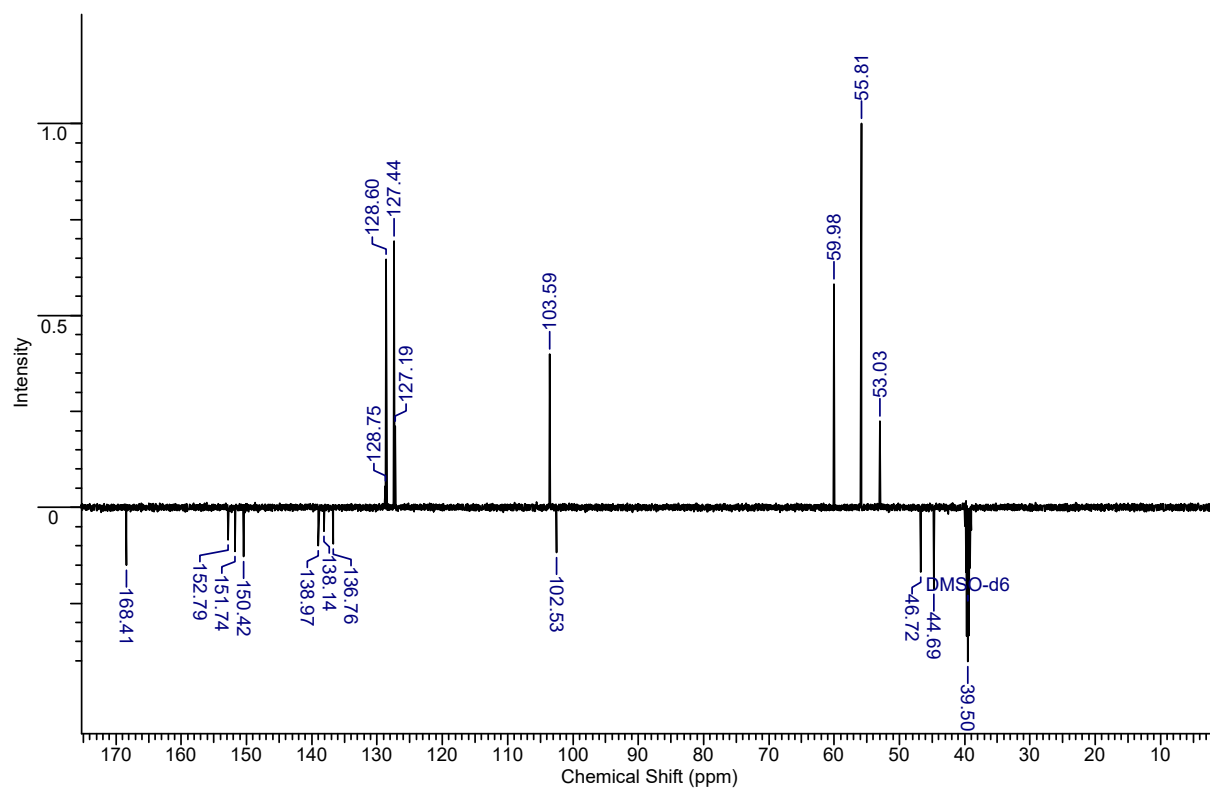
Cromatograma



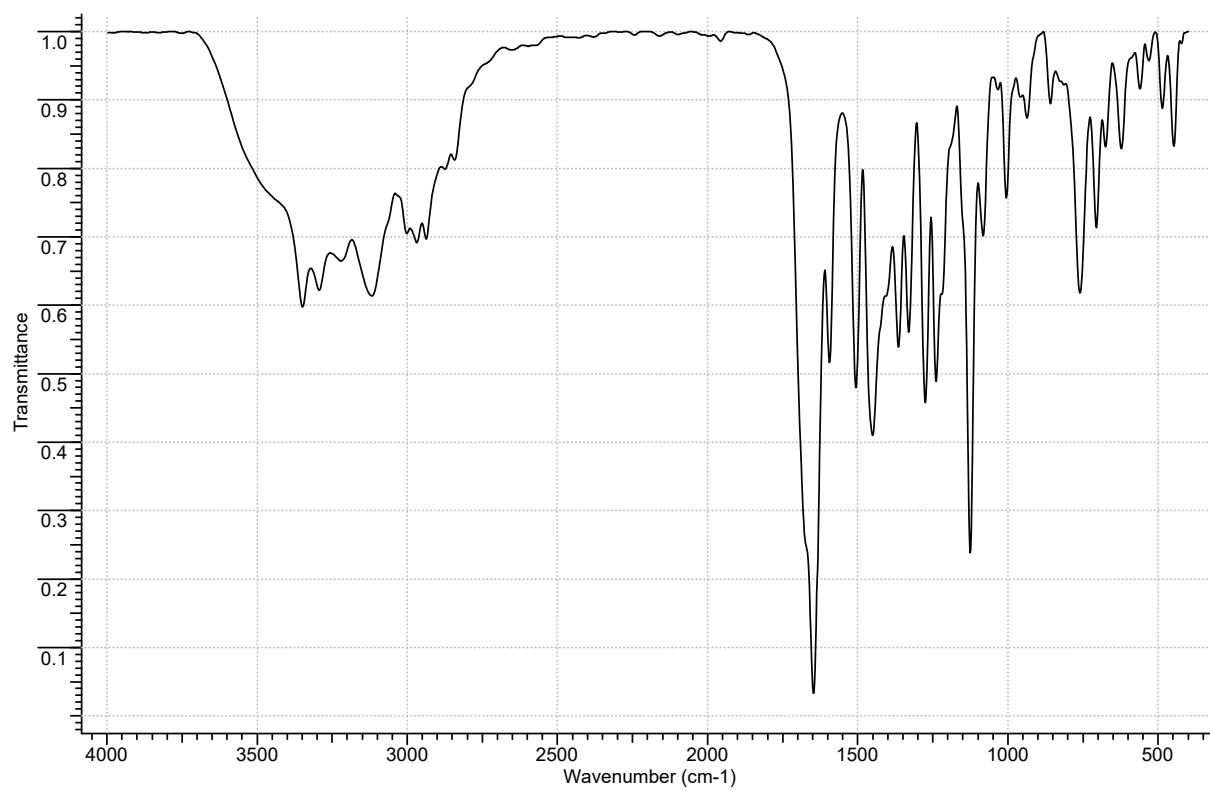
RMN de ^1H



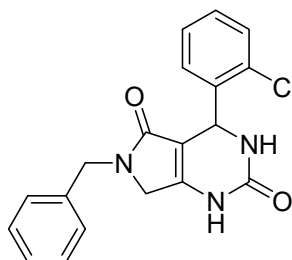
RMN de ^{13}C



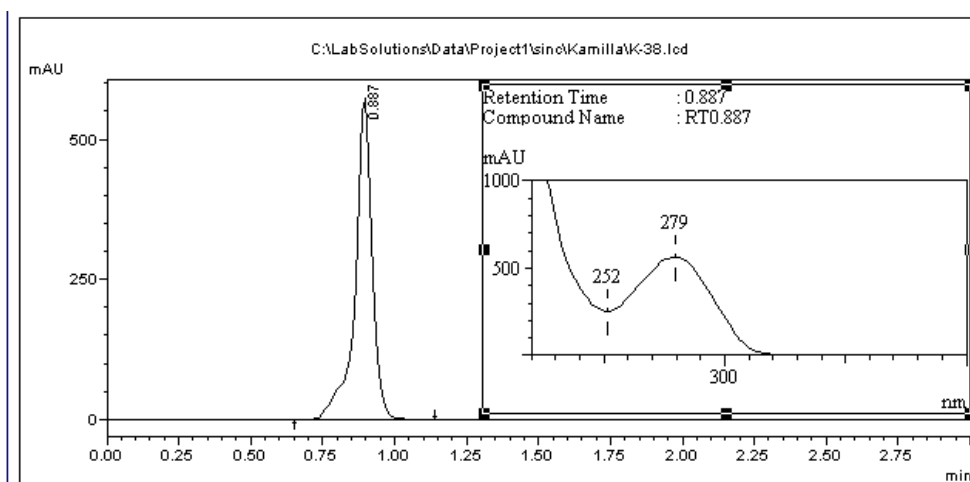
IV



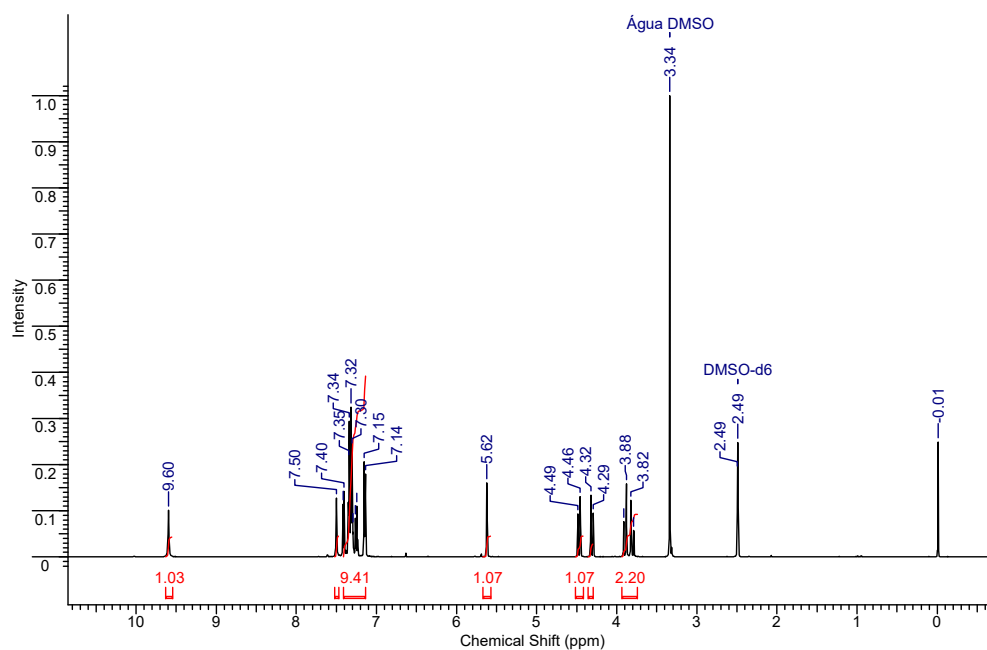
- 6-(benzil)-4-(2-clorofenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30h)



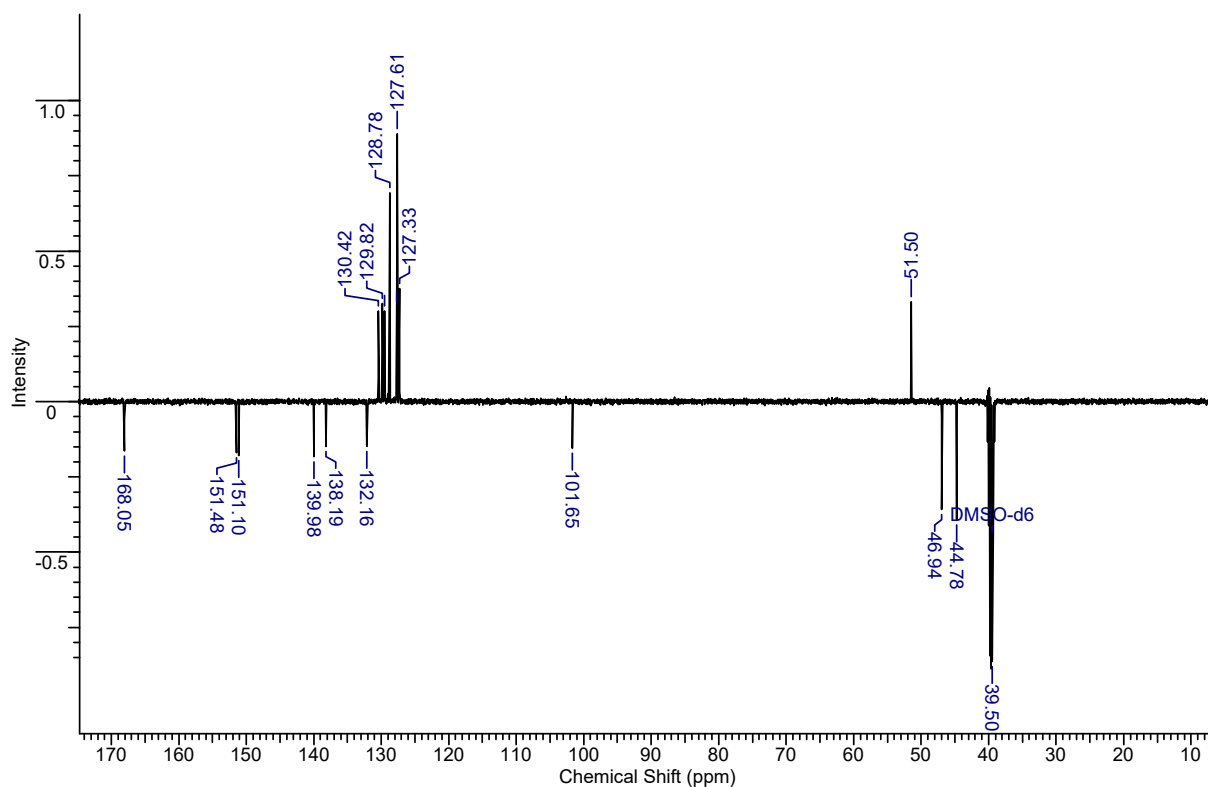
Cromatograma



RMN de ¹H



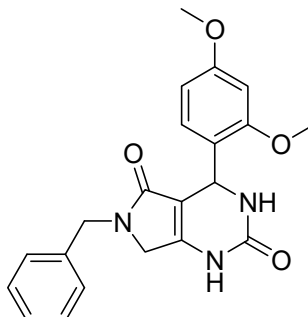
RMN de ^{13}C



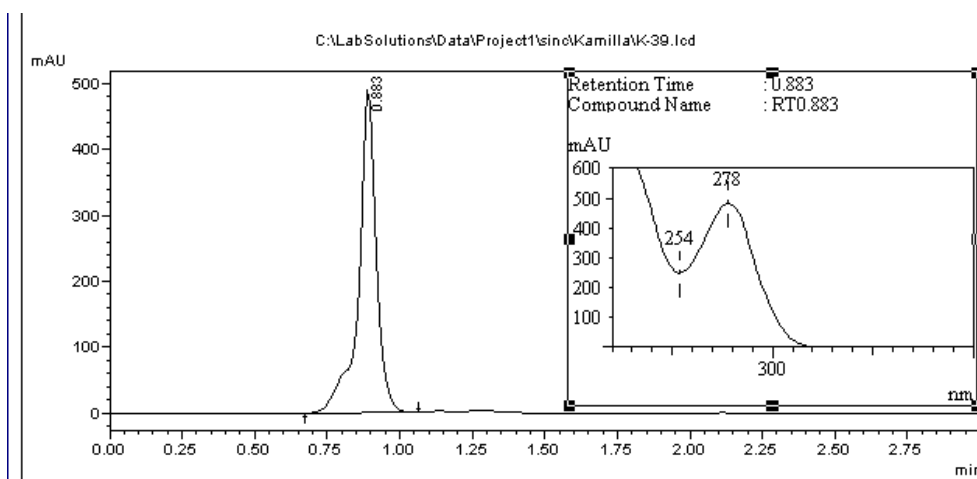
IV



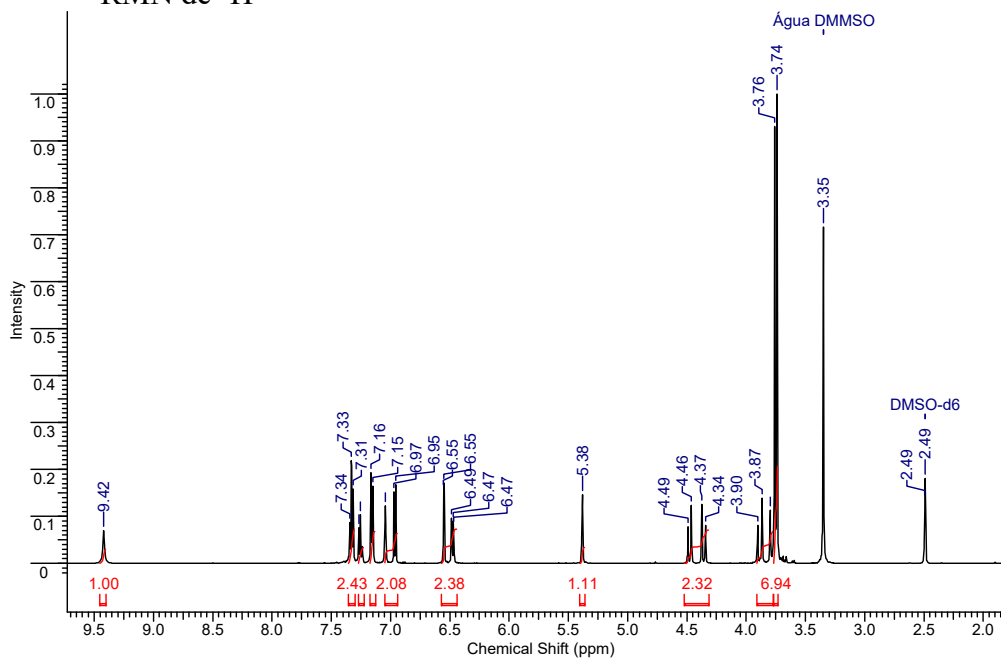
- 6-(benzil)-4-(2,4-dimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30i)



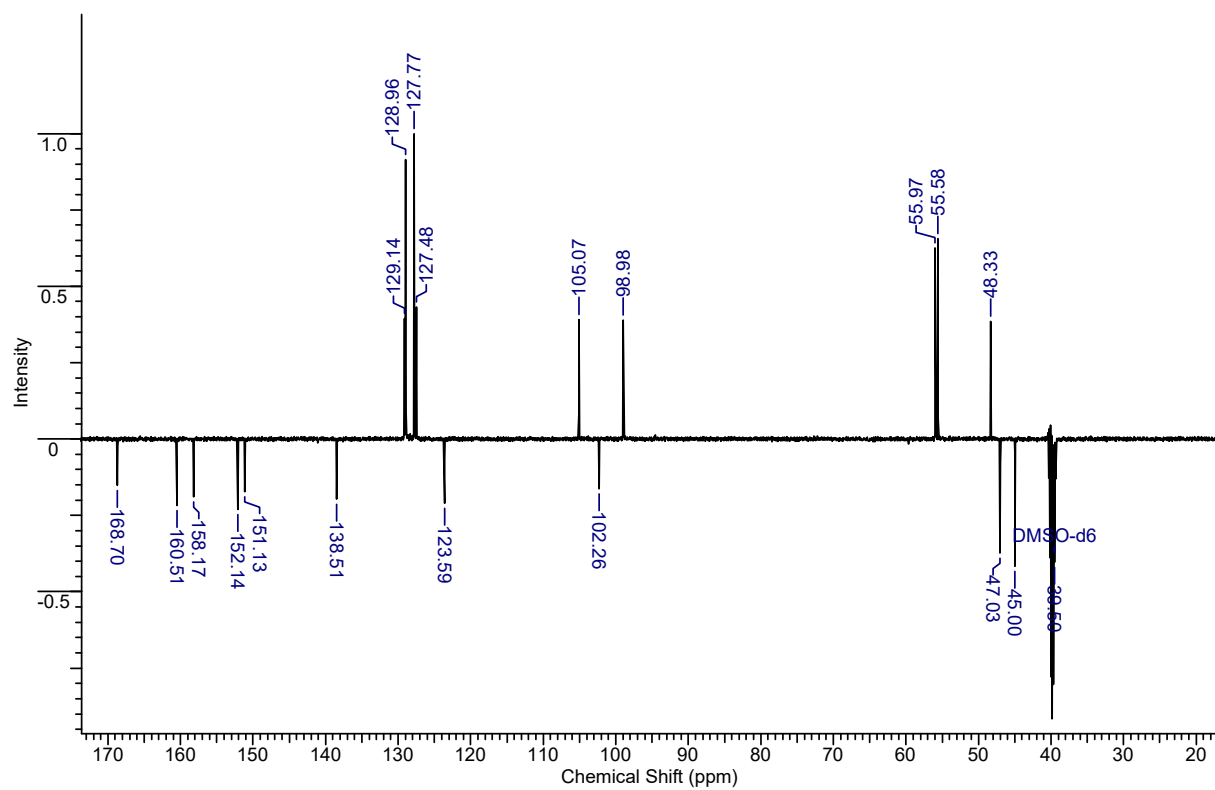
Cromatograma



RMN de ^1H



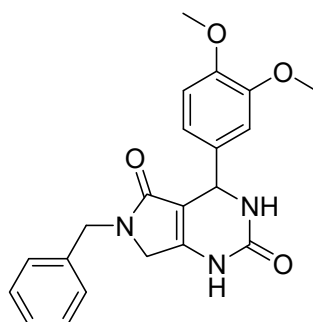
RMN de ^{13}C



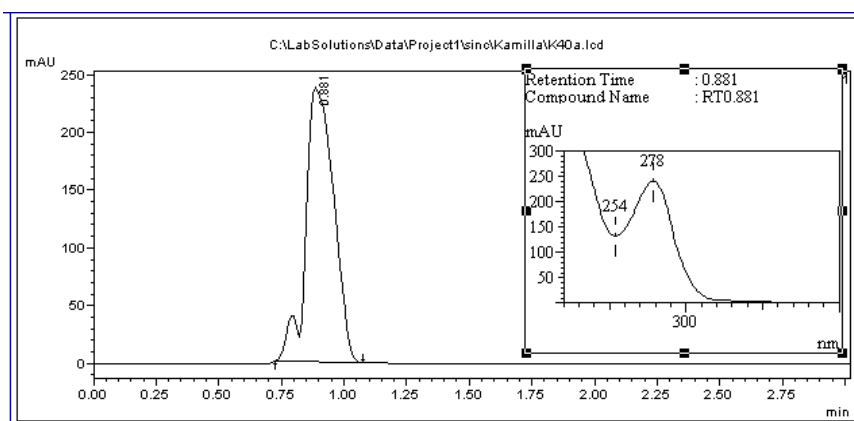
IV



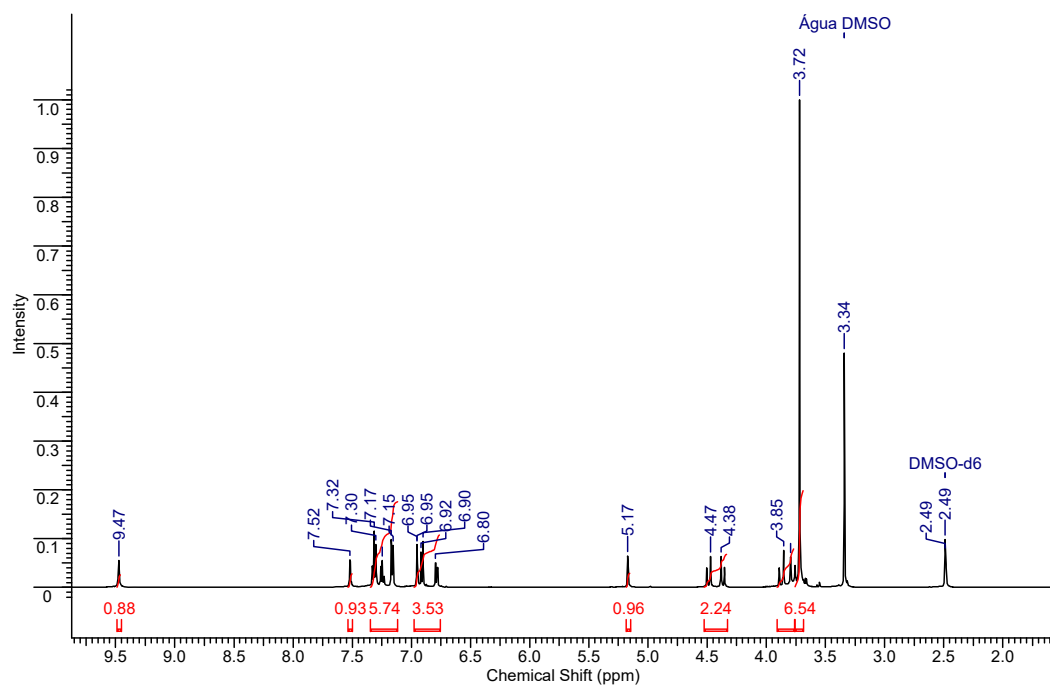
- 6-(benzil)-4-(3,4-dimetoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrólo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30k)



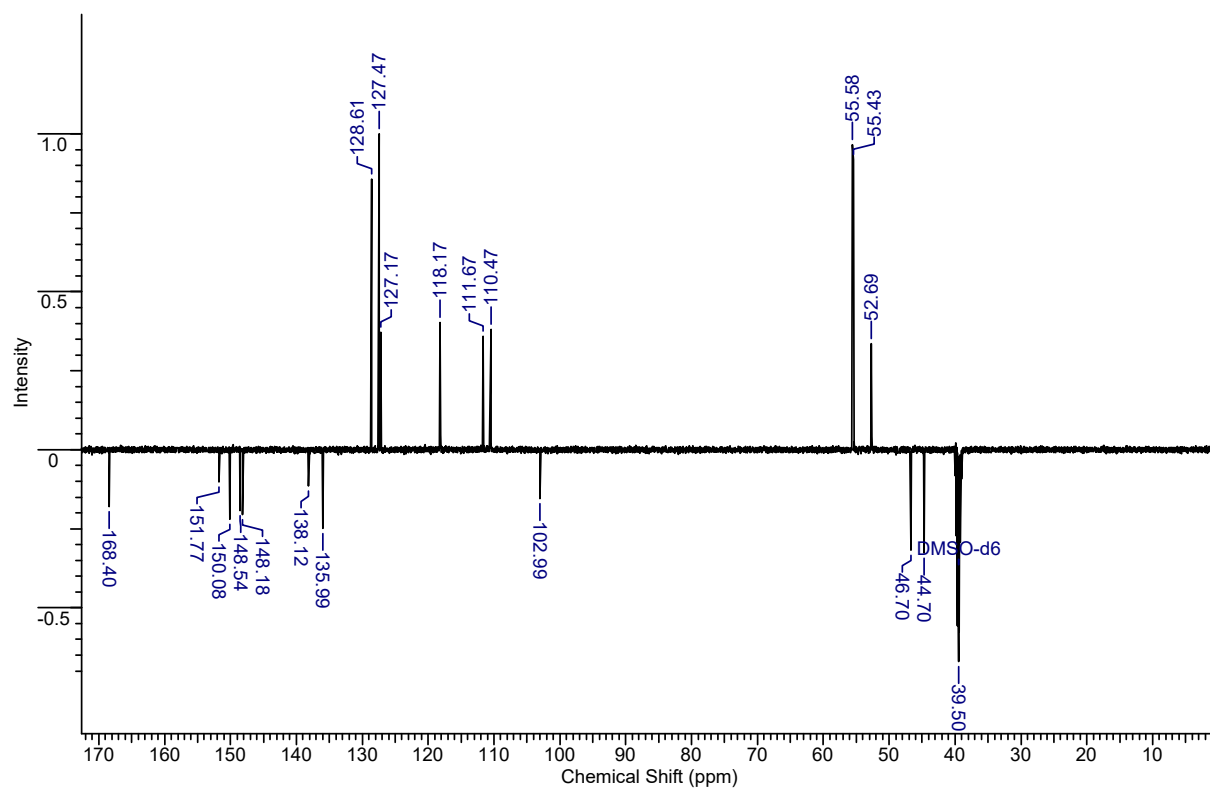
Cromatograma



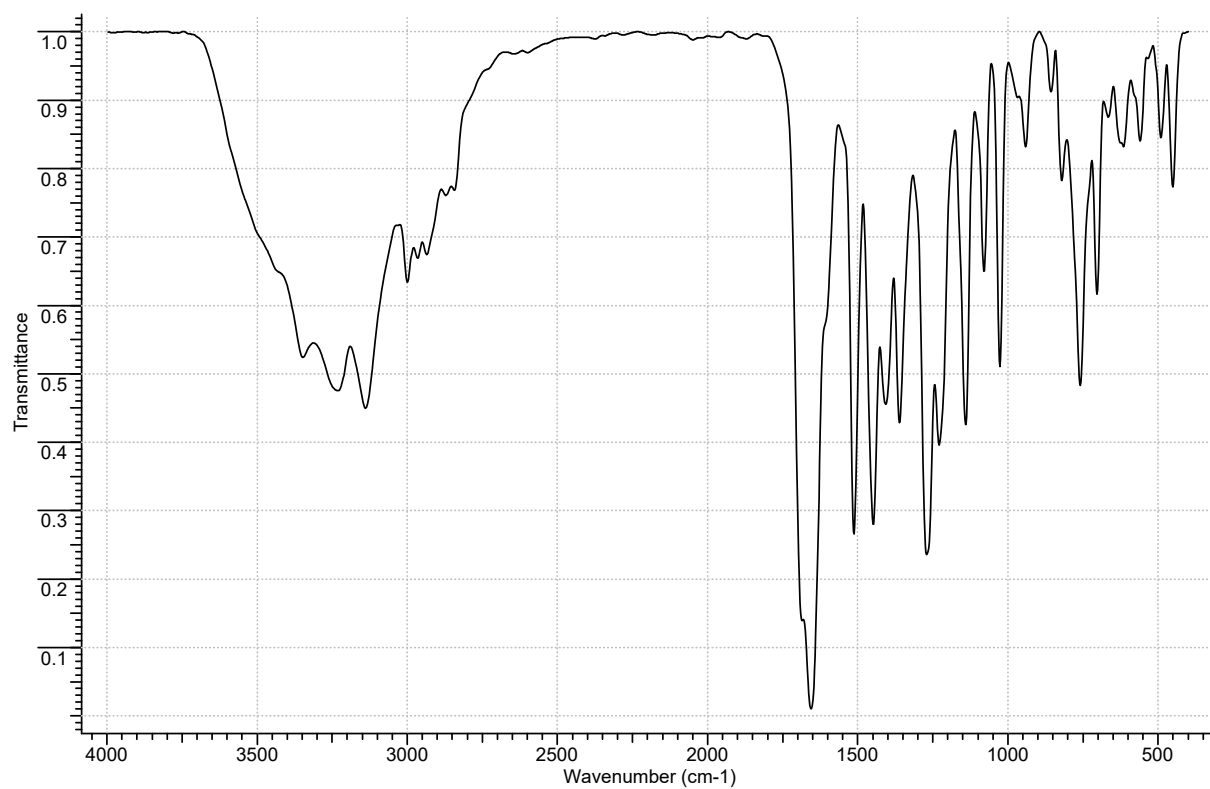
RMN de ¹H



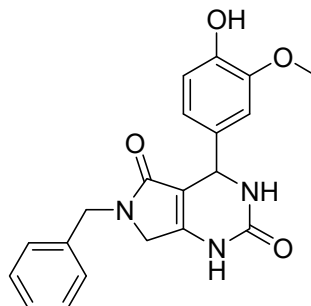
RMN de ^{13}C



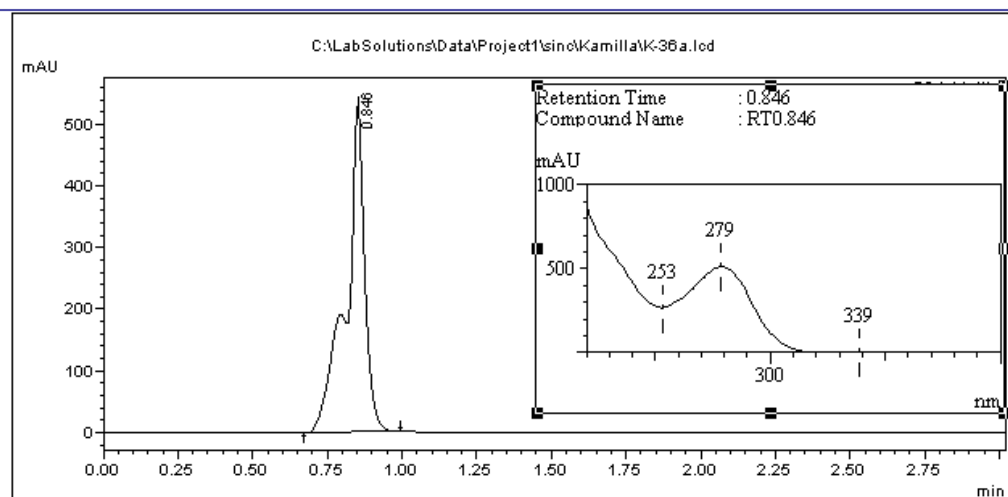
IV



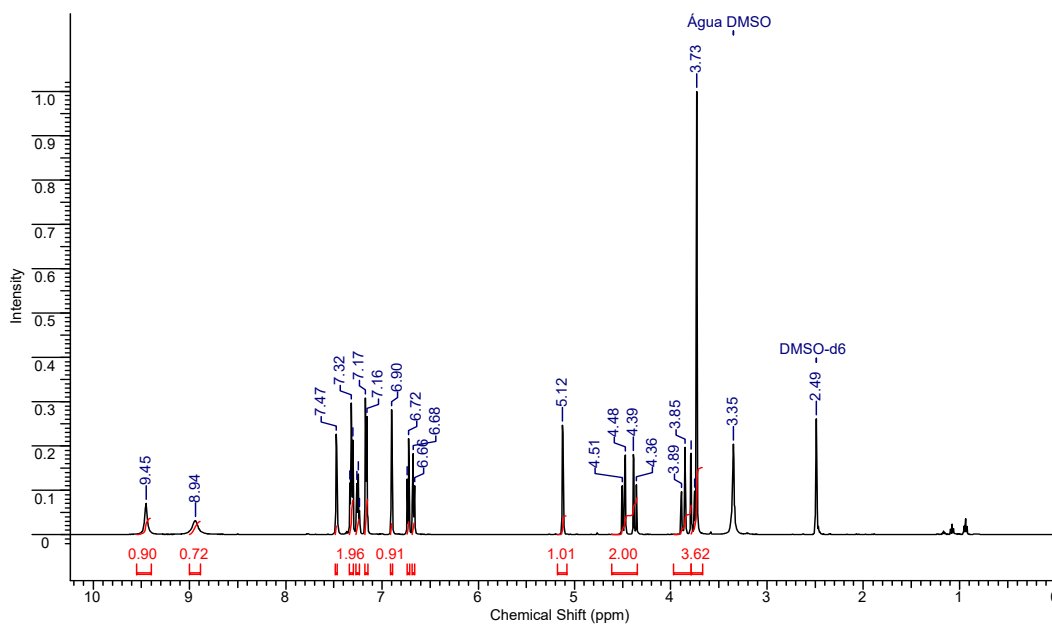
- 6-(benzil)-4-(4-metoxifenil)-3,4,6,7-tetraidro-1H-pirrolo[3,4-d]pirimidino-2,5-diona (30l)



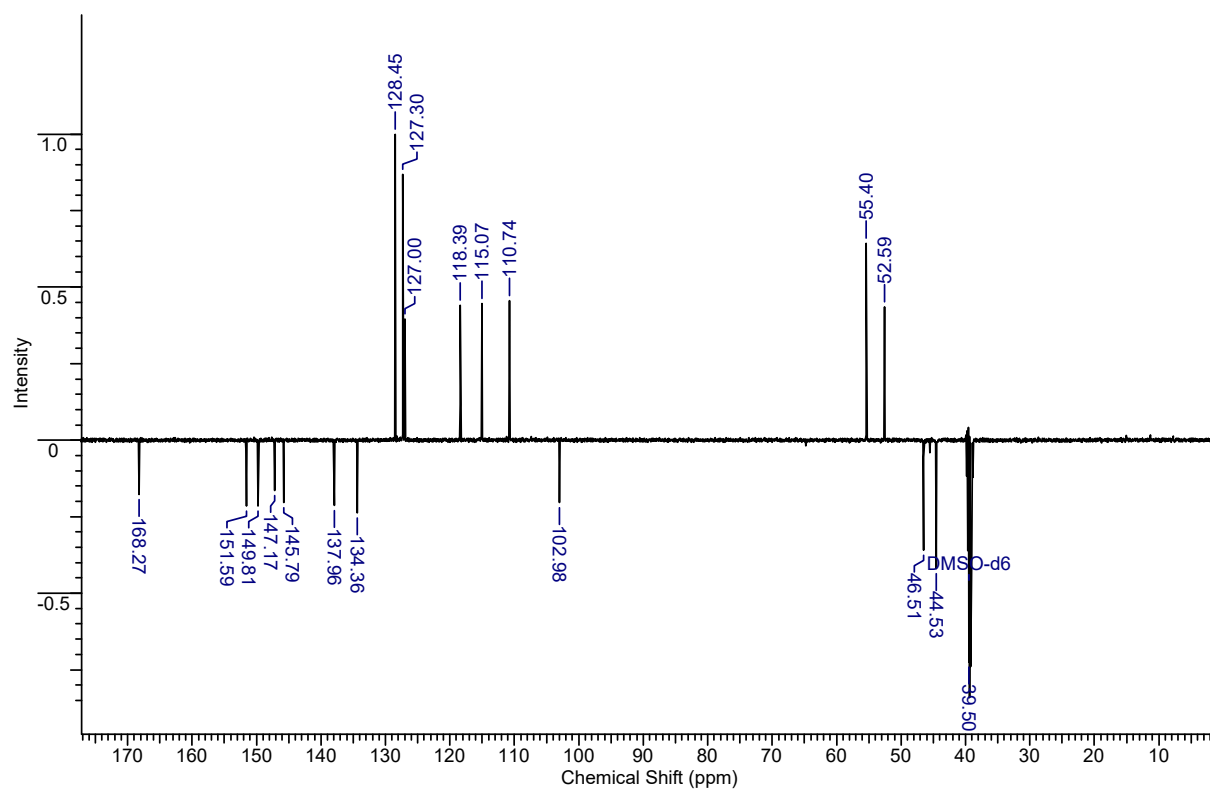
Cromatograma



RMN de ¹H



RMN de ^{13}C



IV

