

# Síntese e estudo de compostos heteroaromáticos como potenciais antimaláricos multi-alvo

Mélanie Fernandes Fonte

Mestrado em Química  
Departamento de Química e Bioquímica  
2018

## Orientador

Maria João Sinda Monteiro Pinto de Araújo, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## Coorientador

Cátia Andreia Silva Teixeira, Investigadora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto







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

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_





## Agradecimentos

Desde já começo por dizer que este ano foi um ano de muitos desafios, quer a nível profissional quer a nível pessoal, no qual aprendi muito. É sempre difícil conseguir exprimir em palavras a importância que todos vocês, amigos e família, tiveram neste meu percurso. Ainda que palavras não sejam suficientes deixo aqui um pequeno agradecimento a todas as pessoas que fizeram parte disto.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Prof<sup>a</sup> Doutora Paula Gomes, que me recebeu no seu grupo de investigação e sempre se mostrou disponível para me ajudar. Pelos mesmos motivos quero agradecer à Prof<sup>a</sup> Doutora Maria João Araújo, minha orientadora, por me ajudar e ensinar durante este percurso.

Também não poderia deixar de agradecer à Cátia, minha coorientadora, que me acompanhou em todo este processo e que tanto me ensinou. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão nos dias menos bons, pela dedicação e acima de tudo por nunca me deixar desistir e me mostrar que há sempre uma luz ao fundo do túnel, mesmo quando eu própria não a via. Foi mais do que uma orientadora, foi minha amiga, aliás foi minha companheira de “batalha”. (Espero te ter deixado orgulhosa!)

Agradeço também aos meus grandes companheiros de laboratório - Natália, Ana Teresa, Ana, Luísa e Rita - que me receberam com tanto carinho e me proporcionaram um ambiente de trabalho fantástico, cheio de boa disposição.

Juntamente agradeço ao Ivo, do laboratório 2.24., pelas fantásticas horas de almoço, sempre divertidas e, claro pela ajuda sempre que necessário.

Queria dar um especial agradecimento à Sara, a minha companheira, que me acompanha desde o primeiro ano, aliás desde o primeiro dia de faculdade. A ela agradeço não só por todo o apoio ao longo destes anos como também por ter sempre uma palavra amiga e sincera quando necessário. É uma pessoa muito importante para mim e que irei levar para a vida.

Também não poderia deixar de agradecer à Claudia e à Mafalda que também estiverem sempre presentes nesta etapa.

Gostaria também de agradecer ao Hélder e à Iva por me terem ajudado na fase final deste projeto e, claro pela paciência que tiveram.

À Sílvia, minha amiga de longa data, queria agradecer por ser uma grande amiga, sempre pronta a ajudar. Obrigada por tolerares algumas ausências minhas (principalmente nesta fase final) e, acima de tudo, por me compreenderes e apoiares em tudo.

Por fim, mas não mesmo importante, até porque o melhor fica sempre para o fim, obrigado família:

Ao meu irmão quero agradecer por todos os excelentes conselhos que me deu, pelo apoio em todas as minhas escolhas e por me motivar a ser melhor e me mostrar que nada é impossível.

Aos meus pais, um eterno obrigada pela paciência nos momentos menos bons, pelo apoio incondicional e carinho e por me terem proporcionado tantas oportunidades ao longo destes anos. Sem eles nada faria sentido e é por isso que lhes dedico este trabalho.

A todos, sei que palavras jamais serão suficientes, mas um enorme obrigado do fundo do coração, sem vocês isto não seria possível!

***“Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”***

*Fernando Pessoa*





## Resumo

A Malária é uma doença infecciosa grave causada pelo parasita protozoário do género *Plasmodium*, transmitida pelo mosquito *Anopheles*. Em 2016, segundo estimativas da OMS, ocorreram cerca de 445 000 mortes, nomeadamente pela espécie *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Os fármacos antimaláricos são atualmente a única forma de combater a doença visto que ainda não existe uma vacina comercialmente disponível. Daí a urgente necessidade de desenvolver fármacos novos, económicos e seguros para: (i) bloquear a transmissão do parasita aos vetores, (ii) atingir as formas do parasita alvo e (iii) ultrapassar a resistência em populações vulneráveis. Tendo em conta a estrutura da quinacrina, o seu núcleo de acridina pode ser visto como a fusão entre a cloroquina (CQ) e o núcleo da primaquina (PQ). Neste contexto, e baseado no facto de que uma estratégia rápida e de baixo custo para acelerar o desenvolvimento de fármacos é a reciclagem de farmacóforos clássicos, o objetivo deste trabalho é a síntese de derivados de 4,9-diaminoacridinas e a determinação da sua atividade *in vitro* e citotoxicidade. Assim, é expectável que estas novas moléculas preservem a atividade dos compostos que lhes deram origem, atuando como antimaláricos multi-alvo, isto é, contra a fase sanguínea, como a CQ, e contra a fase hepática e gametócitos, similar à PQ. Para tal, duas rotas sintéticas foram desenvolvidas, a partir do ácido 4-cloro-2-hidroxibenzóico, diferindo apenas na ordem de introdução das cadeias laterais nas posições 4 e 9 do núcleo da acridina, tendo-se obtido resultados mais satisfatórios quando se efetuam primeiro as modificações na posição 9. Foram sintetizados dois análogos e, juntamente com os seus precursores, foram enviados para colaboradores externos para avaliação *in vitro* contra (i) estirpes de *P. falciparum* (sensíveis e resistentes à CQ) na fase sanguínea, (ii) estirpes de *P. berghei* na fase hepática, e (iii) gametócitos de *P. falciparum*. Em suma, os compostos demonstraram possuir atividade antimalárica *in vitro* multi-alvo na gama nanomolar, mas revelaram ser bastante citotóxicos quando testados em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Com base nisso, e no potencial antitumoral do farmacóforo acridina, os compostos também foram avaliados *in vitro* em linhagens celulares de carcinoma gástrico e de carcinoma colorretal, e quanto à sua citotoxicidade em fibroblastos (HFF-1). Como esperado, os compostos apresentaram atividade antitumoral *in vitro* na gama micromolar e revelaram ser também citotóxicos contra HFF-1, corroborando os resultados anteriores em HepG2.

Palavras-chave: acridina, antitumoral, cloroquina, compostos *N*-heterocíclicos, malária, *Plasmodium*, primaquina, quinacrina



## Abstract

Malaria is one of the world's deadliest infectious diseases caused by parasites of the genus *Plasmodium* and transmitted to people through the bite of infected female *Anopheles* mosquitoes. In 2016, according to WHO estimates, there were around 445000 deaths, namely by the species *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Antimalarial drugs are currently the only way to combat the disease since there is yet no commercially available vaccine. Hence there is an urgent need to develop new, economical and safe antimalarial drugs to: (i) interrupt the parasite life cycle by blocking transmission to the vectors, (ii) treat vulnerable populations, prevent infection and target malaria species that transiently remain dormant in the liver, and (iii) overcome increasing resistance against artemisin-based treatments. Taking into account the structure of quinacrine, it can be seen as the fusion between chloroquine (CQ) and the heterocycle of primaquine (PQ). In this context, and based on the fact that a fast and inexpensive strategy to accelerate the development of drugs is the recycling of classical pharmacophores, the objective of this work is the synthesis of novel 4,9-diaminoacridine derivatives and the assessment *in vitro* of their antimalarial activity. Expectantly, the new molecules will preserve the activity of their parent compounds, i.e., against both blood-stage, as in CQ, and liver-stage plus gametocytes, similarly to PQ. For this purpose, two synthetic routes were developed from 4-chloro-2-hydroxybenzoic acid, differing only in the order of the introduction of the side chains at positions 4 and 9 of the acridine core, and more satisfactory results were obtained when modifications were first performed at position 9. Two analogues were synthesized and, together with their precursors, were sent to external collaborators for *in vitro* evaluation against (i) blood-stage CQ-sensitive (3D7) and CQ-resistant (W2) *P. falciparum* strains, (ii) liver-stage *P. berghei* parasites, and (iii) *P. falciparum* gametocytes. The compounds exhibited *in vitro* antimalarial activity against blood- and liver-stage Plasmodium parasites, but they also demonstrated to be quite cytotoxic when tested on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. Based on this, and on the antitumoral potential of the acridine core, these derivatives were also evaluated *in vitro* against gastric carcinoma (MKN-28) and colorectal carcinoma (Caco-2) cell lines, and for their cytotoxicity in human fibroblasts (HFF-1). As expected, the compounds showed antitumoral activity *in vitro* in the micromolar range and were also cytotoxic against HFF-1, corroborating previous results in HepG2.

Key words: acridine, antitumor, chloroquine, *N*-heterocyclic compounds, malaria, *Plasmodium*, primaquine, quinacrine



# Índice Geral

Agradecimentos .....	V
Resumo .....	IX
Abstract .....	XI
Índice Geral .....	XIII
Índice de Figuras .....	XVII
Índice de Esquemas .....	XXI
Índice de Tabelas .....	XXIII
Índice de Abreviaturas e Símbolos.....	XXV
<b>1. Introdução geral .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Malária .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Ciclo de vida do parasita .....	3
1.1.2. Quimioterapia da malária .....	5
1.1.2.1. Primaquina.....	6
1.1.2.2. Cloroquina.....	7
1.1.3. Novas abordagens terapêuticas.....	8
1.1.4. Reciclagem de fármacos.....	10
1.1.5. Derivados da acridina como potenciais antimaláricos .....	11
<b>2. Âmbito do trabalho .....</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo do trabalho .....	23
2.2. Rota sintética .....	25
<b>3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Parte I .....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Síntese de 4-cloro-2-hidroxibenzoato de metilo (1) .....	29
3.1.2. Síntese de 4-cloro-2-(trifluorometanossulfonilo)benzoato de metilo (2)...	31
3.1.3. Síntese de 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzoato de metilo (3). 33	
3.1.4. Síntese de ácido 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzóico (4).....	35
3.1.5. Síntese de 6,9-dicloro-2-metoxi-4-nitroacridina (5).....	37
<b>3.2. Parte II – Rota A.....</b>	<b>42</b>
3.2.1. Síntese de 4-amino-6,9-dicloro-2-metoxiacridina (6) .....	43
3.2.1.1. Hidrogenação catalítica.....	44
3.2.1.2. Hidrogenação por transferência .....	46
3.2.1.3. Redução em fase homogénea .....	48
3.2.2. Síntese de 6,9-dicloro-4-[(4-ftalimidobutil)amino]-2-metoxiacridina (7) .....	52
<b>3.3. Parte II – Rota B.....</b>	<b>59</b>

3.3.1.	Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-nitro-2-metoxiacridina (8) .....	59
3.3.2.	Síntese de 4-amino-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (9) .....	69
3.3.3.	Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-[(n-ftalimidoalquil)amino]-2-metoxiacridina (10) .....	74
3.3.4.	Síntese de 4-(n-aminoalquil)amino-6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (11).....	80
3.4.	Ensaio biológicos .....	89
3.4.1.	Atividade antimalárica na fase sanguínea .....	89
3.4.2.	Atividade antimalárica na fase hepática .....	91
3.4.3.	Atividade antitumoral.....	92
4.	<b>Conclusão e Perspetivas futuras</b> .....	99
5.	<b>Procedimento experimental</b> .....	103
5.1.	Aspetos gerais .....	103
5.2.	Parte I .....	105
5.2.1.	Síntese de 4-cloro-2-hidroxibenzoato de metilo (1) .....	105
5.2.2.	Síntese de 4-cloro-2-(trifluorometanossulfonilo)benzoato de metilo (2). .....	106
5.2.3.	Síntese de 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzoato de metilo (3).....	107
5.2.4.	Síntese de ácido 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzóico (4).....	108
5.2.5.	Síntese de 6,9-dicloro-2-metoxi-4-nitroacridina (5).....	109
5.3.	Parte II – Rota A.....	110
5.3.1.	Síntese de 6,9-dicloro-2-metoxiacridin-4-amino (6) .....	110
5.3.2.	Síntese de 6,9-dicloro-4-[(4-ftalimidobutil)amino]-2-metoxiacridina (7) ....	111
5.4.	Parte II – Rota B.....	112
5.4.1.	Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-nitro-2-metoxiacridina (8).....	112
5.4.2.	Síntese de 4-amino-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (9) .....	114
5.4.3.	Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-[(n-ftalimidoalquil)amino]-2-metoxiacridina (10) .....	116
5.4.4.	Síntese de 4-(n-aminoalquil)amino-6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (11).....	118
6.	<b>Bibliografia</b> .....	123
	<b>Anexos</b> .....	135
	<b>Anexo 1.</b> Caracterização estrutural do composto <b>1</b> (ESI-IT MS e <sup>1</sup> H-RMN):.....	135

<b>Anexo 2.</b> Caracterização estrutural do composto <b>2</b> (ESI-IT MS e <sup>1</sup> H-RMN):.....	136
<b>Anexo 3.</b> Caracterização estrutural do composto <b>3</b> (ESI-IT MS e <sup>1</sup> H-RMN):.....	138
<b>Anexo 4.</b> Caracterização estrutural do composto <b>4</b> (ESI-IT MS e <sup>1</sup> H-RMN):.....	140
<b>Anexo 5.</b> Cromatograma relativo à pureza do composto <b>8</b> :.....	142
<b>Anexo 6.</b> Cromatograma relativo à pureza do composto <b>9</b> :.....	142
<b>Anexo 7.</b> Cromatograma relativo à pureza do composto <b>10a</b> :.....	143
<b>Anexo 8.</b> Caracterização estrutural do composto <b>10b</b> (ESI-IT MS): .....	143
<b>Anexo 9.</b> Caracterização estrutural do composto <b>11b</b> (ESI-IT MS) e cromatograma relativo à sua pureza:.....	144





## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Distribuição da malária no Mundo em 2016, segundo estimativas da OMS. <sup>2</sup> 3	
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> (adaptado de Phillips, M. A. et al., <i>Nature Reviews Disease Primers</i> , 2017) <sup>5</sup> . Local de ação dos fármacos: A – que atuam nas formas pré-eritrocíticas (esquizontocidas tecidulares); B – que atuam nas formas eritrocíticas (esquizontocidas sanguíneos) e C – que atuam nos gametócitos (gametocidas).....	5
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da primaquina.....	6
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da cloroquina.....	7
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do grupo heme e da forma ácido-base predominante no VD da hematina (forma zwitteriônica). <sup>15</sup> .....	8
<b>Figura 6.</b> Estrutura química da <b>A</b> - artemisinina e seus derivados: <b>B</b> – mefloquina, lumefantrina e piperquina.....	9
<b>Figura 7.</b> Estrutura química da tafenoquina.....	10
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da quinacrina.....	12
<b>Figura 9.</b> Análogos da QN ( <b>I</b> e <b>II</b> ) desenvolvidos por Chibale <i>et al.</i> <sup>43</sup> .....	13
<b>Figura 10.</b> Análogos da QN ( <b>III</b> ) desenvolvidos por Sparatore <i>et al.</i> <sup>44</sup> .....	13
<b>Figura 11.</b> Análogos da QN ( <b>IV-IX</b> ) desenvolvidos por Anderson <i>et al.</i> <sup>45</sup> .....	14
<b>Figura 12.</b> Análogos da QN ( <b>X</b> ) desenvolvidos por Guetzoyan <i>et al.</i> <sup>46-47</sup> .....	15
<b>Figura 13.</b> Análogos da QN ( <b>XI</b> ) desenvolvidos por Yu <i>et al.</i> <sup>48</sup> .....	15
<b>Figura 14.</b> Análogos da QN ( <b>XII</b> ) desenvolvidos por Pérez <i>et al.</i> <sup>49</sup> .....	16
<b>Figura 15.</b> Análogos da QN ( <b>XIII</b> ) desenvolvidos por Ana <i>et al.</i> <sup>50-51</sup> .....	17
<b>Figura 16.</b> Derivados híbridos desenvolvidos ( <b>XIV-XXI</b> ) com melhor atividade antimalárica contendo acridina na sua estrutura. <sup>52-57</sup> .....	18
<b>Figura 17.</b> Derivados de 4-aminoacridina ( <b>XXII</b> ) desenvolvido por Jonh P. Scovill <i>et al.</i> <sup>58</sup> .....	19
<b>Figura 18.</b> Estrutura geral dos derivados de 4,9-diaminoacridinas (n = 3 ou 5). .....	23
<b>Figura 19.</b> Estrutura química do ligando BINAP e do pré-catalisador Pd(OAc) <sub>2</sub> . .....	34
<b>Figura 20.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>5</b> . .....	41
<b>Figura 21.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>5</b> . .....	41
<b>Figura 22.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO) do composto <b>5</b> no intervalo 7.75 a 8.50 ppm.....	42
<b>Figura 23.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do análogo do composto <b>6</b> sem Cl na posição 9. ....	46
<b>Figura 24.</b> Estrutura química do trietilsilano. ....	47
<b>Figura 25.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>6</b> . .....	51

<b>Figura 26.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>6</b> .....	51
<b>Figura 27.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO) do composto <b>6</b> no intervalo 6.35 a 8.30 ppm.....	52
<b>Figura 28.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>7</b> .....	53
<b>Figura 29.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>7</b> .....	54
<b>Figura 30.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO) do composto <b>7</b> no intervalo 3.80 a 8.45 ppm.....	55
<b>Figura 31.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>7</b> no intervalo 1.40 a 3.80 ppm.....	55
<b>Figura 32.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) da mistura reacional da síntese do composto <b>7</b> .....	58
<b>Figura 33.</b> Estrutura química de: A – composto <b>5</b> sintetizado no passo anterior (passo <b>v</b> ) e B – composto comercial. ....	61
<b>Figura 34.</b> Estrutura química das bases DMAP, $\text{Et}_3\text{N}$ e DBU e seus $\text{pK}_a$ 's.....	62
<b>Figura 35.</b> Espetros de ESI-IT MS da síntese da QN: A – com $\text{Et}_3\text{N}$ , B – sem base, C – com DMAP e D – com DBU.....	63
<b>Figura 36.</b> Solventes escolhidos como alternativa ao tolueno. ....	64
<b>Figura 37.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>8</b> e, no canto superior direito, o espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação. ....	67
<b>Figura 38.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>8</b> .....	68
<b>Figura 39.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>8</b> no intervalo 3.95 a 8.35 ppm.....	69
<b>Figura 40.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>8</b> no intervalo 0.50 a 2.40 ppm.....	69
<b>Figura 41.</b> Montagem de uma “ <i>flash chromatography</i> ” como forma de purificação. ...	71
<b>Figura 42.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>9</b> e, no canto superior direito, o espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação. ....	72
<b>Figura 43.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>9</b> .....	73
<b>Figura 44.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) do composto <b>9</b> no intervalo 3.85 a 8.30 ppm.....	73
<b>Figura 45.</b> Espetro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO) do composto <b>9</b> no intervalo 0.65 a 2.40 ppm.....	74
<b>Figura 46.</b> <b>A, B</b> – estruturas químicas possíveis do composto di-alkilado. <b>C, D</b> - Espetros de massas (ESI-IT MS em modo positivo) antes da purificação do composto <b>10a</b> utilizando na síntese uma proporção dos reagentes de 1:3. <b>e</b> 1:1,1 (composto <b>9</b> : <b>N</b> -	

( <b>4-bromobutil</b> )ftalimida), respetivamente. (P2 – produto di-alkilado; RP – reagente de partida; Ft – grupo ftalimida). .....	75
<b>Figura 47.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>10a</b> e, no canto superior direito, o espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação.....	77
<b>Figura 48.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>10a</b> . .....	78
<b>Figura 49.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>10a</b> no intervalo 3.50 a 8.50 ppm.....	78
<b>Figura 50.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>10a</b> no intervalo 0.80 a 3.70 ppm.....	79
<b>Figura 51.</b> Estrutura química do análogo <b>10b</b> .....	79
<b>Figura 52.</b> Espetros de massa (ESI-IT MS em modo positivo) da mistura reacional após 30 minutos no MW.....	83
<b>Figura 53.</b> Montagem da pequena coluna de SiO <sub>2</sub> C18.....	84
<b>Figura 54.</b> Espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>11a</b> e, no canto superior direito, o espetro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação.....	85
<b>Figura 55.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> ) do composto <b>11a</b> . .....	86
<b>Figura 56.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> ) do composto <b>11a</b> no intervalo 6.30 a 8.20 ppm.....	87
<b>Figura 57.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> ) do composto <b>11a</b> no intervalo 0.80 a 4.00 ppm.....	87
<b>Figura 58.</b> Cromatograma obtido para o composto <b>11a</b> , com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ = 290 nm. ....	88
<b>Figura 59.</b> Estrutura química do análogo <b>11b</b> .....	88
<b>Figura 60.</b> Estrutura dos compostos ( <b>8-11b</b> ) enviados para ensaios biológicos. ....	89
<b>Figura 61.</b> Gráfico com os resultados preliminares de atividade antimalárica dos compostos <b>10a</b> (MF-203) e <b>11b</b> (MF-222) ( <b>A</b> ), e da referência PQ ( <b>B</b> ) na fase hepática do parasita.....	91
<b>Figura 62.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> ) do composto <b>1</b> . .....	135
<b>Figura 63.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> ) do composto <b>1</b> no intervalo 6.80 a 7.90 ppm.....	135
<b>Figura 64.</b> Espetros de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>2</b> . ....	136
<b>Figura 65.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> ) do composto <b>2</b> . .....	136
<b>Figura 66.</b> Espetro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD-d <sub>4</sub> ) do composto <b>2</b> no intervalo 7.40 a 8.20 ppm.....	137

<b>Figura 67.</b> Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>3</b> .....	138
<b>Figura 68.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>3</b> . ....	138
<b>Figura 69.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>3</b> no intervalo 6.70 a 10.9 ppm.....	139
<b>Figura 70.</b> Espectro de massa (ESI-IT MS em modo negativo) do composto <b>4</b> .....	140
<b>Figura 71.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>4</b> . ....	140
<b>Figura 72.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto <b>4</b> no intervalo 6.70 a 10.9 ppm.....	141
<b>Figura 73.</b> Cromatograma obtido para o composto <b>8</b> , com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ = 290 nm. ....	142
<b>Figura 74.</b> Cromatograma obtido para o composto <b>9</b> , com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ = 290 nm. ....	142
<b>Figura 75.</b> Cromatograma obtido para o composto <b>10a</b> , com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ = 290 nm. ....	143
<b>Figura 76.</b> Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>10b</b> .....	143
<b>Figura 77.</b> Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto <b>11b</b> .....	144
<b>Figura 78.</b> Cromatograma obtido para o composto <b>11b</b> , com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao λ = 290 nm. ....	144

## Índice de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Rotas sintéticas estudadas no presente trabalho. ....	26
<b>Esquema 2.</b> Síntese do composto <b>1</b> .....	29
<b>Esquema 3.</b> Esquema de esterificação em meio ácido e meio básico. ....	30
<b>Esquema 4.</b> Mecanismo de esterificação utilizando $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ como base e $\text{CH}_3\text{I}$ como agente alquilante. ....	31
<b>Esquema 5.</b> Síntese do composto <b>2</b> .....	31
<b>Esquema 6.</b> Estabilização por ressonância do anião triflato.....	32
<b>Esquema 7.</b> Mecanismo da síntese do triflato de arilo via $\text{S}_{\text{N}}2$ utilizando $\text{Et}_3\text{N}$ como base. À parte está descrito o mecanismo de hidrólise do anidrido.....	32
<b>Esquema 8.</b> Síntese do composto <b>3</b> .....	33
<b>Esquema 9.</b> Mecanismo catalítico da reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig utilizando $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ como base. ....	34
<b>Esquema 10.</b> Síntese do composto <b>4</b> .....	35
<b>Esquema 11.</b> Esquema geral da reação de hidrólise ácida e básica.....	36
<b>Esquema 12.</b> Mecanismo geral de hidrólise básica utilizando $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .....	37
<b>Esquema 13.</b> Síntese do composto <b>5</b> .....	37
<b>Esquema 14.</b> Mecanismo geral da formação do cloreto de ácido.....	38
<b>Esquema 15.</b> Mecanismo geral da ciclização de Friedel-Crafts. ....	39
<b>Esquema 16.</b> Mecanismo geral da formação da 9-cloroacridina. ....	40
<b>Esquema 17.</b> Síntese do composto <b>6</b> .....	43
<b>Esquema 18.</b> Esquema geral de redução do compostos nitro-aromáticos proposto por Haber e colaboradores (A rota direta está assinada a preto, enquanto que a rota de condensação está assinalada a cinzento). <sup>77</sup> .....	43
<b>Esquema 19.</b> Mecanismo geral da hidrogenação catalítica do grupo nitroílo utilizando Pd-C como catalisador.....	45
<b>Esquema 20.</b> Síntese do composto <b>6</b> via hidrogenação catalítica.....	46
<b>Esquema 21.</b> Síntese do composto <b>6</b> via hidrogenação catalítica por transferência de hidrogénio.....	48
<b>Esquema 22.</b> Mecanismo de redução de compostos nitro-aromáticos utilizando $\text{SnCl}_2$ em HCl como agente redutor. ....	49
<b>Esquema 23.</b> Reações paralelas à reação de redução. ....	49
<b>Esquema 24.</b> Síntese do composto <b>6</b> via redução com $\text{SnCl}_2/\text{HCl}$ . ....	50
<b>Esquema 25.</b> Síntese do composto <b>7</b> .....	52
<b>Esquema 26.</b> Mecanismo geral da <i>N</i> -alquilação via $\text{S}_{\text{N}}2$ . ....	53
<b>Esquema 27.</b> Esquema geral da poli-alquilação.....	56

<b>Esquema 28.</b> Síntese de <b>7</b> via microondas. ....	57
<b>Esquema 29.</b> Esquema geral da síntese do composto <b>8</b> .....	59
<b>Esquema 30.</b> Mecanismo geral de uma $S_NAr$ (GS = grupo de saída; Nu = Nucleófilo). .....	60
<b>Esquema 31.</b> Síntese da <b>QN</b> .....	61
<b>Esquema 32.</b> Síntese do composto <b>8</b> .....	64
<b>Esquema 33.</b> Síntese do composto <b>8</b> via intermediário fenólico.....	65
<b>Esquema 34.</b> Síntese do composto <b>9</b> .....	70
<b>Esquema 35.</b> Síntese do composto <b>10a</b> .....	74
<b>Esquema 36.</b> Síntese do composto <b>11a</b> .....	80
<b>Esquema 37.</b> Esquema geral da síntese de Gabriel.....	80
<b>Esquema 38.</b> Mecanismo geral da formação da amina livre utilizando $HN_2NH_2$ .....	82
<b>Esquema 39.</b> Síntese do composto <b>11a</b> .....	83
<b>Esquema 40.</b> Esquema da reação redox de conversão do MTT em <i>formazan</i> que ocorre dentro das células viáveis.....	93

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Tentativas de otimização da síntese do composto <b>7</b> .....	56
<b>Tabela 2.</b> Tentativas realizadas no microondas para a síntese do composto <b>7</b> . .....	57
<b>Tabela 3.</b> Tentativas de otimização para a síntese da <b>QN</b> .....	62
<b>Tabela 4.</b> Tentativas de otimização para a síntese do composto <b>8</b> .....	65
<b>Tabela 5.</b> Resultados obtidos para a síntese do composto <b>8</b> (MM = 444,96 g.mol <sup>-1</sup> , óleo vermelho).....	66
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos para a síntese do composto <b>9</b> (MM = 414,98 g.mol <sup>-1</sup> , óleo amarelo). .....	71
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos na síntese do composto <b>10</b> (MM = 616,20 g.mol <sup>-1</sup> , óleo amarelo). .....	76
<b>Tabela 8.</b> Resultados obtidos na síntese do composto <b>11a</b> (MM = 486,10 g.mol <sup>-1</sup> , óleo amarelo). .....	85
<b>Tabela 9.</b> Resultados de IC <sub>50</sub> contra uma estirpe sensível à CQ (3D7) para os compostos <b>8-11b</b> e fármacos de referência. ....	90
<b>Tabela 10.</b> Actividade antiproliferativa <i>in vitro</i> , expressa como IC <sub>50</sub> (média ± erro padrão de duas experiências independentes com quatro repetições para cada concentração, n = 8), dos compostos <b>8-11</b> contra linhagens celulares de MKN-28, Caco-2 e HFF-1. ...	94





## Índice de Abreviaturas e Símbolos

### A

ACN – Acetonitrilo  
 ACT – Terapia combinada à base de artemisinina  
 ADN – ácido desoxirribonucleico  
 AcOEt – Acetato de etilo  
 AcONa – Acetato de sódio

### C

CCF – Cromatografia líquida em camada fina  
 CD<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub> – metanol deuterado  
 CQ – cloroquina

### D

d – duplete  
 dd – duplo duplete  
 DBU – 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9,10 – octahidropirimido[1,2 – a]azepina  
 DCM – Diclorometano  
 DMAP – 4-dimetilaminopiridina  
 DMF – *N,N*-dimetilformamida  
 DMSO – Dimetilsulfóxido  
 DMSO-d<sub>6</sub> – Dimetilsulfóxido  
 Deuterado

### E

ESI-IT MS – Espectroscopia de massa com ionização por electro – spray e deteção por armadilha de iões (Electrospray Ionization Mass Spectrometry ion trap)  
 EtOH – Etanol  
 Et<sub>2</sub>O – Éter dietílico  
 EUA – Estados Unidos da América

### F

FDA – *Food and Drug Administration*  
 Formazan – (*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan  
 FP-Fe(II)- Ferroprotoporfirina IX  
 FP-Fe(III)- Ferriprotoporfirina IX

### G

G6PD – glucose-6-fosfato desidrogenase

### H

Hb – Hemoglobina  
 Hex – Hexano  
 HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

### I

IC<sub>50</sub> – Concentração mínima para 50% de inibição *in vitro*  
 IMM – Instituto de Medicina Molecular

### J

J = constante de acoplamento

### L

LC-MS – Espetroscopia de massa - cromatografia líquida (*Liquid chromatography–mass spectrometry*)

## M

m – multiplete  
 $M_e$  – Massa exata  
 MeOH – Metanol  
 MM – Massa molar  
 MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]  
 MW – Microondas (*Microwave*)  
 m/z – razão massa carga do ião

## N

$\eta$  - rendimento

## O

OMS – Organização Mundial de Saúde

## P

$Pd(OAc)_2$  – Acetato de Paládio (II)  
 Pd-C – Paládio em carbono ativado  
*P. berghei* – *Plasmodium berghei*  
*P. falciparum* – *Plasmodium falciparum*  
 PfCRT – *Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter  
*P. knowlesi* – *Plasmodium knowlesi*  
*P. malariae* – *Plasmodium malariae*  
*P. ovale* – *Plasmodium ovale*  
*P. vivax* – *Plasmodium vivax*  
 PQ – primaquina  
 $p_e$  – Ponto de ebulição  
 p.a. – elevada pureza

## Q

q – Quarteto  
 QN – quinacrina

## R

rac-BINAP – 2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo racémico  
 $R_f$  – fator de retenção (*retention factor*)  
 RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
 RMN- $^1H$  – Ressonância Magnética Nuclear de próton  
 ROS – Espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species*)  
 RP-MPLC – Cromatografia líquida de média eficiência em fase reversa (*Reverse phase medium performance liquid chromatography*)

## S

s – Singleto  
 SI – Índice de seletividade (*selectivity index*)  
 SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida  
 sl - Singleto largo  
 $S_NAr$  – Substituição aromática nucleofílica  
 $S_N1$  – Substituição nucleofílica unimolecular  
 $S_N2$  – Substituição nucleofílica bimolecular

## T

t – Tripleto  
 TES – Trietilsilano  
 TFA – Ácido trifluoroacético  
 $Tf_2O$  – trifluorometanossulfónico  
 THF – Tetra-hidrofurano  
 TMS - trimetilsilano

$t_R$  – Tempo de retenção

## **U**

u.m.a. – unidades de massa  
atómica

## **V**

VD – Vacúolo digestivo  
 $\delta$  – Desvio químico



# CAPÍTULO 1

---

## Introdução

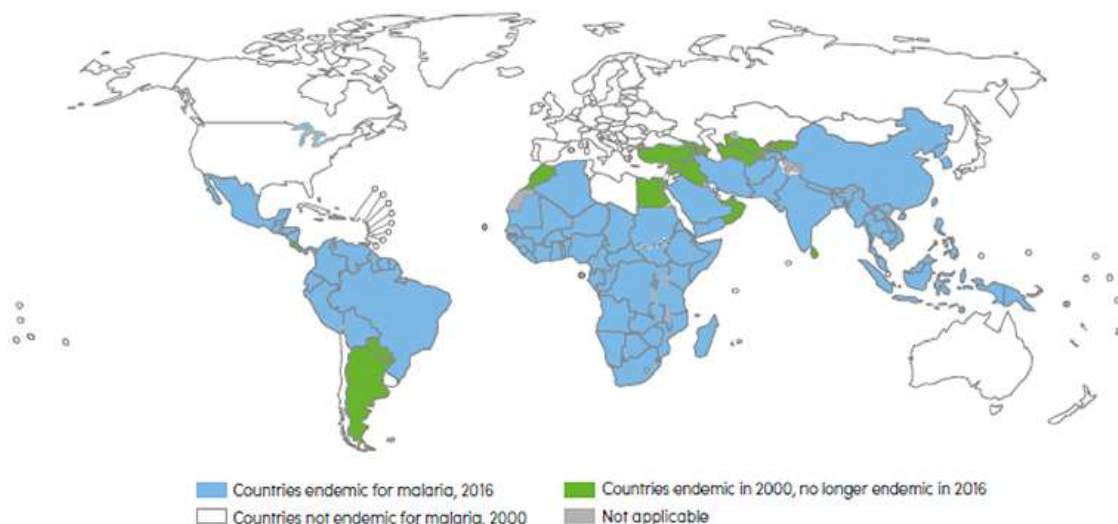


## 1. Introdução geral

### 1.1. Malária

A malária é uma doença parasitária altamente infecciosa e potencialmente fatal, causada pelo parasita protozoário unicelular do género *Plasmodium* (filo *Apicomplexa*). Até ao momento, cinco espécies de *Plasmodium* (*P.*) foram consideradas infecciosas para o Homem, sendo estas *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi* e *P. ovale*. As duas espécies mais prevalentes a nível global são o *P. vivax* e o *P. falciparum*. O *P. vivax* é o que se encontra disseminado numa área mais vasta do globo, mas a forma mais grave da doença é causada pelo *P. falciparum*, que se encontra mais prevalente na África Subsaariana, e é o responsável pela maior taxa de mortalidade causada pela malária. As outras três espécies são encontradas com menor frequência.<sup>1-2</sup> Esta doença é transmitida pelo mosquito *Anopheles* fêmea e é característica de regiões quentes, húmidas e chuvosas, como os países tropicais e subtropicais, visto reunirem as condições ideais para a propagação do mosquito.<sup>2</sup>

Em 2016, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorreram 216 milhões de casos, dos quais resultaram 445 000 mortes, sendo as crianças e as mulheres grávidas os principais afetados. Como se verifica na **Figura 1**, a maioria dos casos ocorreu na Região Africana e foram causados pelo *P. falciparum*, seguida pela Região da América latina, do Sudeste Asiático e do Mediterrâneo Oriental.<sup>2</sup>



**Figura 1.** Distribuição da malária no Mundo em 2016, segundo estimativas da OMS.<sup>2</sup>

#### 1.1.1. Ciclo de vida do parasita

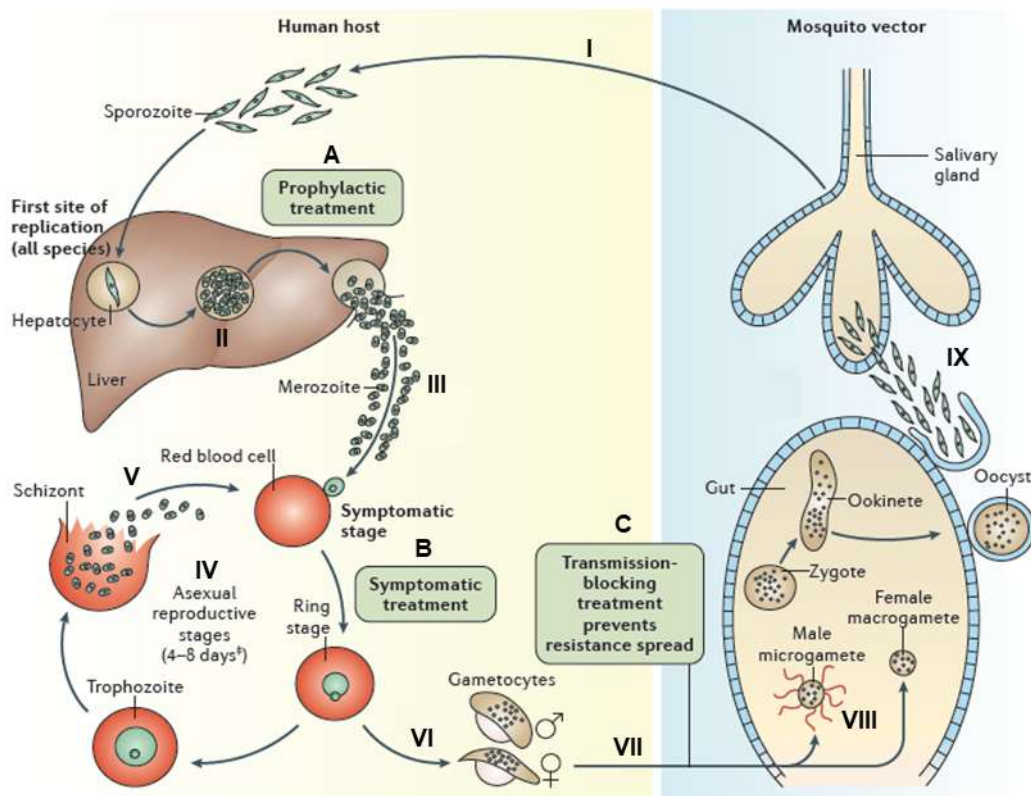
O parasita da malária tem um ciclo de vida bastante complexo constituído por várias fases e em que são necessários dois hospedeiros para o completar: o mosquito, que é o hospedeiro definitivo e simultaneamente o vetor da doença, no qual ocorre a

reprodução sexuada (esporogonia); e o Homem, o hospedeiro intermediário, no qual ocorre a reprodução assexuada (esquizogonia).

O ciclo de vida do parasita no Homem (**Figura 2**) inicia-se quando um mosquito *Anopheles* fêmea infetado pica uma pessoa para se alimentar e simultaneamente injeta na sua circulação sanguínea esporozoítos (**I**). Estes, através da corrente sanguínea, dirigem-se para o seu primeiro alvo, o fígado. Após se alojarem dentro das células hepáticas, os esporozoítos amadurecem dando origem a esquizontes teciduais que, por esquizogonia, originam milhares de merozoítos (**II**). Estes, após a rotura das células hepáticas, são novamente libertados para a corrente sanguínea (**III**) finalizando assim a fase hepática (ou pré-eritrocítica). No caso de infeções pelas espécies *P. ovale* e *P. vivax* alguns dos merozoítos podem progredir para um estado inativo/dormente, os hipnozoítos, e só mais tarde são libertados dando origem a recaídas. Os merozoítos libertados na corrente sanguínea invadem os glóbulos vermelhos e nestes voltam a reproduzir-se assexuadamente dando origem a novos merozoítos (**IV**) que, após a rotura dos glóbulos vermelhos são libertados na corrente sanguínea e invadem outros glóbulos para se continuarem a replicar, conduzindo assim à sua destruição (**V**). É apenas nesta fase da rotura das hemácias e consequente libertação de toxinas no plasma que o doente começa a apresentar os sintomas da doença que podem incluir febre baixa, calafrios, dores musculares, entre outros, ou no caso de infeção por *P. falciparum*, malária cerebral, responsável por cerca de 80% dos casos letais da doença.<sup>3</sup> O intervalo que vai desde a picada inicial do mosquito até o início dos sintomas é designado de Período de Incubação e pode durar de 9 a 40 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium* que causa a infeção.<sup>4</sup>

Paralelamente, algumas das formas sanguíneas do parasita diferenciam-se em formas sexuadas (gametócitos masculinos e femininos) (**VI**) que depois são recaptadas pelo mosquito quando este pica uma pessoa infetada, finalizando assim o ciclo de reprodução no Homem (**VII**).<sup>5-6</sup> Já no interior do mosquito, inicia-se o ciclo de reprodução sexuada em que os gametócitos se reproduzem sexuadamente no trato gastrointestinal do mosquito dando origem a esporozoítos (**VIII**) que, posteriormente, infetam as glândulas salivares do mosquito (**IX**). O mosquito, agora portador da doença, pode transmiti-la a outro hospedeiro humano, atuando como vetor de propagação.<sup>5-6</sup>





**Figura 2.** Ciclo de vida do *Plasmodium* (adaptado de Phillips, M. A. et al., *Nature Reviews Disease Primers*, 2017)<sup>5</sup>. Local de ação dos fármacos: A – que atuam nas formas pré-eritrocíticas (esquizonticidas tecidulares); B – que atuam nas formas eritrocíticas (esquizonticidas sanguíneos) e C – que atuam nos gametócitos (gametocidas).

### 1.1.2. Quimioterapia da malária

A grande complexidade do ciclo de vida do parasita explica as enormes dificuldades que têm vindo a ser identificadas para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura. Adicionalmente, um outro grande problema associado à malária é o rápido desenvolvimento de resistência, pelo parasita, aos fármacos em uso clínico, tornando-os ineficazes. Deste modo, a situação atual é deveras preocupante, principalmente em África onde predomina a infeção causada por *P. falciparum*, uma vez que esta espécie desenvolveu resistência a quase todos os antimaláricos em uso atual, incluindo a cloroquina, que era o fármaco de eleição.<sup>1-2</sup> Adicionalmente, também já têm vindo a ser relatados casos de resistência por *P. vivax* e *P. malariae*.<sup>1</sup>

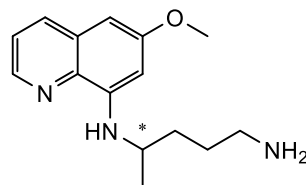
Neste contexto, as principais estratégias de prevenção, envolvem o controlo do vetor através do uso de mosquiteiros tratados com inseticida resistentes, de longa duração e à prova de água e a quimioprevenção (utilização de fármacos) em mulheres grávidas e crianças pequenas.<sup>2, 5</sup> Quando a prevenção não é suficiente e a pessoa acaba por contrair a doença, são utilizados fármacos antimaláricos para tentar reverter a situação. Neste sentido, a quimioterapia ainda desempenha o papel central no controlo e

erradicação da doença, enquanto uma vacina segura e eficaz não estiver globalmente disponível.

Os diferentes fármacos antimaláricos desenvolvidos ao longo do tempo atuam em diferentes fases do ciclo de vida do parasita (**Figura 2**) podendo ser classificados como: (i) esquizonticidas tecidulares (**Figura 2 - A**), que atuam sobre as formas assexuadas do parasita na fase hepática (ou pré-eritrocítica), impedindo o desenvolvimento da infecção e, adicionalmente, podem também atuar sob os hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*, impedindo as recaídas; (ii) esquizonticidas sanguíneos (**Figura 2 - B**), classe à qual pertence a esmagadora maioria dos antimaláricos em uso clínico, que têm como alvo as formas assexuadas do parasita na fase sanguínea (ou eritrocítica); e por último (iii) gametocidas (**Figura 2 - C**), que atuam sobre as formas sexuadas do parasita no sangue, os gametócitos, impedindo a transmissão da infecção ao mosquito.<sup>1, 3, 7</sup> De seguida, serão brevemente referidos a primaquina (esquizonticida tecidular e gametocida) e a cloroquina (esquizonticida sanguíneo), dois fármacos de referência na história da quimioterapia da malária, assim como as novas abordagens terapêuticas.

#### 1.1.2.1. Primaquina

A primaquina (PQ, **Figura 3**) foi sintetizada pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA) e, em 1952, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA). Desde então, ainda detém um lugar único e inquestionável na cura e profilaxia da Malária.<sup>8-10</sup> Este fármaco, pertencente à classe das 8-aminoquinolinas, é dos poucos disponíveis clinicamente com atividade esquizonticida tecidular contra todos os estados hepáticos dos parasitas de todas as espécies de *Plasmodium*, incluindo os hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*. Para além disso, também possui efeito gametocitocida contra todas as espécies de parasita.<sup>7-8</sup>



**Figura 3.** Estrutura química da primaquina.

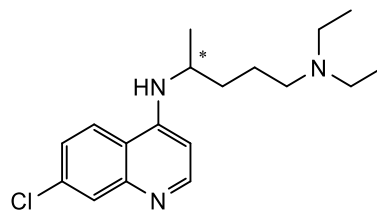
No entanto, a utilidade deste fármaco é bastante limitada principalmente devido aos seus efeitos adversos graves, uma vez que a PQ é tóxica para pacientes com deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), condição que provoca anemia hemolítica, podendo ser muito grave ou mesmo fatal para algumas populações. Adicionalmente, o

uso da PQ está também limitado pelo facto de causar metemoglobinémia, i.e., incapacidade de transportar o oxigénio aos diferentes tecidos.<sup>7, 9-10</sup> A farmacocinética da PQ não é a ideal uma vez que o fármaco é rapidamente absorvido e excretado. Além disso, o seu principal metabolito, a carboxiprimaquina, é inativo, sendo por isso necessárias elevadas e repetidas doses do fármaco.<sup>7, 9-10</sup>

Apesar de ainda não se conhecer o mecanismo de ação responsável pela atividade antimalárica da PQ, acredita-se que esta esteja associada com a sua interferência (i) na respiração celular do parasita, gerando radicais livres de oxigénio (ROS) e consequente indução de stress oxidativo no parasita, e (ii) na função da ubiquinona, um transportador de eletrões na cadeia respiratória.<sup>8, 11</sup>

### 1.1.2.2. Cloroquina

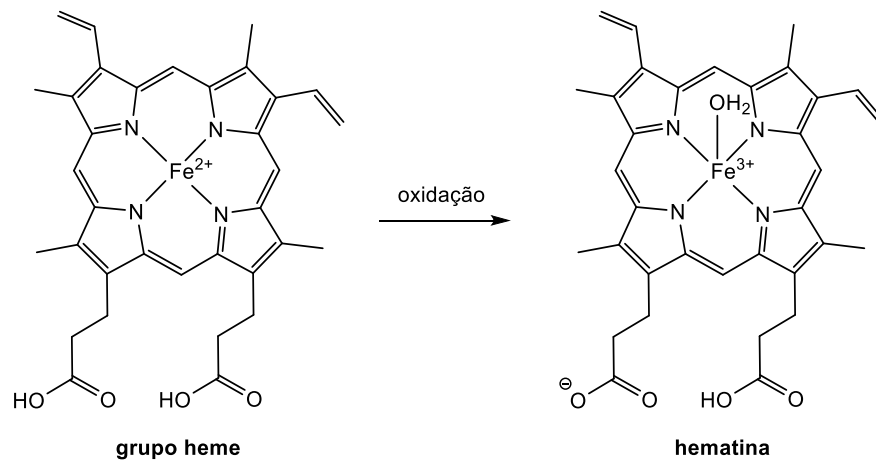
A cloroquina (CQ, **Figura 4**) foi sintetizada pela primeira vez na Alemanha em 1934, mas não foi reconhecida de imediato como um potente fármaco antimalárico. Apenas em 1946, investigadores americanos descobriram que a CQ era muito superior a outros antimaláricos sintéticos utilizados na época devido ao seu baixo custo, elevada eficácia e segurança comprovada mesmo em grávidas e recém-nascidos.<sup>9</sup> Por essa razão, tornou-se a base da quimioterapia antimalárica para tratar infeções por *P. falciparum*.<sup>9</sup>



**Figura 4.** Estrutura química da cloroquina.

A CQ, pertencente à classe das 4-aminoquinolinas, é um esquizonticida sanguíneo, cuja ação esquizonticida se pensa dever à inibição da formação da hemozoína. Esta última é originada pela degradação da hemoglobina (Hb), por parte do parasita, para a obtenção dos aminoácidos necessários para a sua reprodução assexuada. Este processo ocorre num vacúolo digestivo (VD) que contém enzimas e apresenta um pH ácido (5,0-5,4). Assim, a degradação da Hb dá origem à globina, a qual é posteriormente hidrolisada em aminoácidos, e ao grupo heme. Por sua vez, o grupo heme livre (ferroprotoporfirina IX, Fe(II)-FP – **Figura 5**), sofre oxidação dando origem à hematina (ferriprotoporfirina IX, Fe(III)-FP – **Figura 5**) que é tóxica para o parasita. Por essa razão, o parasita efetua um processo de destoxificação por polimerização em que a hematina

é transformada numa forma cristalina insolúvel designada de hemozoína, também conhecida por pigmento da malária.<sup>12-14</sup>



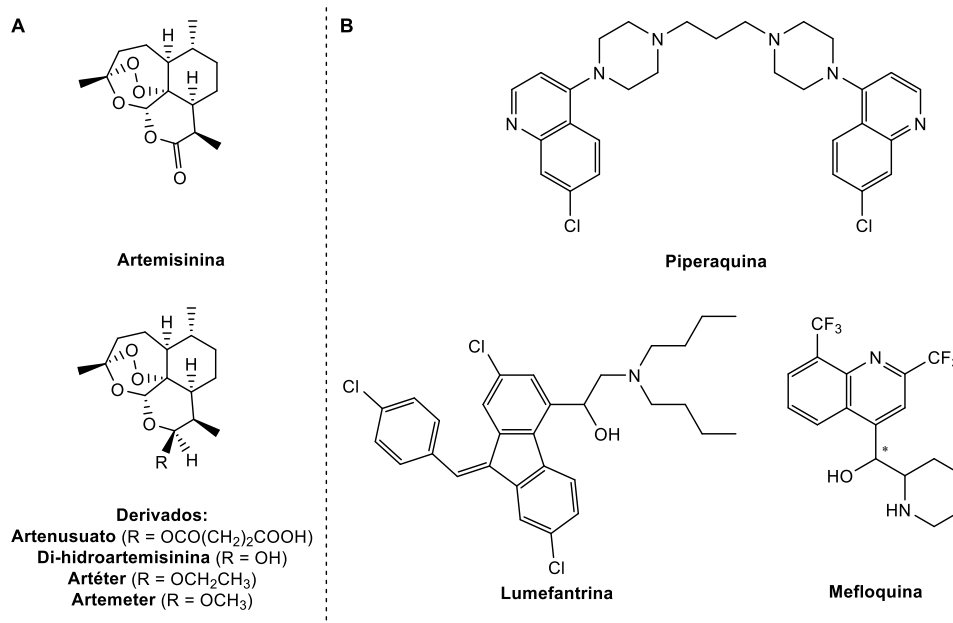
**Figura 5.** Estrutura química do grupo heme e da forma ácido-base predominante no VD da hematina (forma zwitteriônica).<sup>15</sup>

Contudo, devido ao emprego demasiado banalizado da CQ, atualmente este fármaco é praticamente inútil em África, dada a resistência generalizada do parasita *P. falciparum*, quadro que também já tem expressão significativa em muitas regiões onde a malária causada pelo *P. vivax* é endêmica.<sup>16</sup> A CQ, sendo uma base fraca, acumula-se em concentrações muito altas no VD na sua forma di-protonada e, conseqüentemente, não pode deixar o vacúolo por difusão. Assim, este fármaco liga-se ao grupo heme impedindo a sua degradação. Neste sentido, a resistência do *P. falciparum* à CQ está relacionada com o aumento da capacidade do parasita em expelir a CQ do VD a uma taxa que não permite que esta alcance os níveis necessários para a inibição da polimerização do heme. O mecanismo de resistência à CQ está maioritariamente associado a uma mutação no gene *pfcr*, que codifica uma proteína de transporte (*PfCRT*) localizada na membrana do VD, mutação essa que vai induzir o efluxo da CQ diprotonada por transporte ativo.

### 1.1.3. Novas abordagens terapêuticas

Face à propagação da resistência do *P. falciparum* à maioria dos medicamentos antimaláricos disponíveis, a OMS recomenda terapias combinadas à base de artemisinina (ACT), como terapêutica de primeira linha, especialmente em África, onde prevalecem as estirpes do parasita resistentes à CQ.<sup>2, 17</sup> Esta terapia consiste na combinação de artemisinina ou os seus derivados semi-sintéticos (artemeter, artesunato, dihidroartemisinina e artéter – **Figura 6 - A**) de ação rápida e altamente

potente com um fármaco de ação lenta (por exemplo, mefloquina, piperquina ou lumefantrina, **Figura 6 - B**).<sup>18</sup>



**Figura 6.** Estrutura química da **A** - artemisinina e seus derivados: **B** – mefloquina, lumefantrina e piperquina.

O princípio por detrás das ACTs é que o componente de artemisinina tem a capacidade de reduzir rapidamente (mais rapidamente do que todos os outros antimaláricos) o número de parasitas de *Plasmodium* no sangue e, conseqüentemente, levar a uma rápida diminuição dos sintomas clínicos, e os parasitas residuais são expostos ao fármaco parceiro de ação prolongada que, idealmente deve atuar por um mecanismo biológico diferente da artemisinina. Deste modo, a probabilidade de surgir uma mutação que produz resistência simultânea aos dois fármacos é diminuída.<sup>18-19</sup> Contudo, apesar das ACTs proporcionarem bons resultados terapêuticos, já houve indícios no Sudeste Asiático do aparecimento de estirpes resistentes à artemisinina.<sup>19-</sup>

20

É de salientar que, muito recentemente,<sup>21</sup> a FDA aprovou para uso nos EUA um novo antimalárico, a tafenoquina (nome comercial é *Krintafel*) (**Figura 7**), para a cura radical da infeção causada por *P. vivax* em pessoas com 16 anos ou mais.<sup>21</sup> Este fármaco, pertencente à classe das 8-aminoquinolinas, além de ser ativo contra todas as formas hepáticas da malária, incluindo os hipnozoítos, é também eficaz contra os gametócitos de todas as espécies do parasita, apresentando uma atividade quatro a cem vezes superior à da PQ contra a infeção causada por *P. falciparum*.<sup>9, 22</sup> Adicionalmente, apresenta uma semivida longa o que permite que o tratamento seja feito com uma única

dose, contrariamente à PQ, o hipnozoíticida de referência até à data. Contudo, tal como a PQ, não deve ser usado em pessoas com G6PD, nem em crianças ou mulheres grávidas, pois pode causar anemia severa.<sup>5, 20</sup>

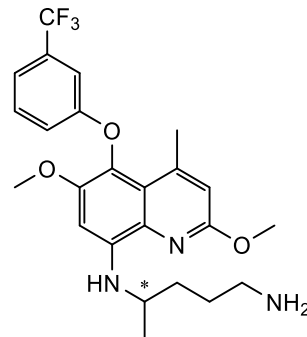


Figura 7. Estrutura química da tafenoquina.

Adicionalmente, em 2015, uma vacina pré-eritrocitária contra a malária (RTS,S; nome comercial é Mosquirix) recebeu um parecer positivo da *European Medicines Agency* para a implementação em larga escala dum programa piloto (vacinação de 360000 crianças entre 2019 e 2020) no Gana, Quênia e Malauí.<sup>23-26</sup> Apesar desta vacina ser apenas parcialmente eficaz e de curto prazo (não garante imunidade), até à data é a primeira e única a demonstrar um efeito protetor contra a doença entre crianças de tenra idade num ensaio clínico de fase III.<sup>2</sup>

Embora o facto da vacinação com RTS,S limitar parcialmente a infeção clínica da malária seja uma grande conquista, o rápido decréscimo da sua eficácia enfatiza a urgência de desenvolver vacinas com maior e mais durável ação. Neste sentido, uma outra vacina (PbVac), que está a ser desenvolvida pelo Instituto de Medicina Molecular (IMM) desde 2010, iniciou em meados do ano passado os ensaios clínicos de fase I e II na Holanda. Nestes ensaios, os voluntários estão a ser expostos a doses crescentes da vacina e, até ao momento, não se observou efeitos adversos graves. De um modo geral, esta vacina baseia-se na geração de imunidade contra os estágios pré-eritrocitários de *Plasmodium* após imunização com esporozoítos totalmente infeciosos de *P. berghei* (espécie causadora da infeção em roedores, mas não em humanos).<sup>27</sup>

#### 1.1.4. Reciclagem de fármacos

Apesar dos avanços, uma vacina eficaz contra a malária ainda não se encontra disponível comercialmente, e por isso novos antimaláricos precisam de ser urgentemente desenvolvidos para controlar a doença diante de relatos cada vez maiores de resistência aos fármacos existentes. Idealmente, esses novos medicamentos devem

ser produzidos a baixo custo uma vez que a malária está normalmente associada a países em vias de desenvolvimento.<sup>28</sup> Contudo, o desenvolvimento rápido e acessível de medicamentos é uma visão que contrasta fortemente com o estado atual da descoberta de fármacos.<sup>29</sup> Neste contexto, uma solução rápida para encontrar antimaláricos eficientes e acessíveis passa pela reciclagem de fármacos já existentes. Neste sentido, em analogia aos três R's do ambiente ("Reciclar, Reutilizar, Reduzir"), três abordagens principais têm vindo a ser exploradas: i) reutilização de antimaláricos conhecidos, através da sua otimização por modificações químicas (ii) resgate de fármacos existentes atualmente sem aplicação clínica, e iii) redirecionamento, para a malária, de fármacos em uso clínico para outras doenças.<sup>28, 30</sup>

A otimização de fármacos existentes permite diminuir problemas de toxicidade ou biodisponibilidade e problemas associados a resistências que tornaram os fármacos ineficientes. Por outro lado, o resgate e o redirecionamento de fármacos têm o potencial de reduzir os custos em ensaios clínicos de fase inicial, uma vez que esses medicamentos existentes já têm perfis farmacocinéticos e de segurança aprovados para uso humano, assim como reduzir os custos gerais de produção, comparativamente com aqueles necessários para a produção em larga escala de um fármaco, a partir do zero, uma vez que as rotas sintéticas que visam o núcleo básico já são conhecidas e já existem empresas instaladas dedicadas a isso.<sup>28, 30</sup>

Neste contexto, o conceito de fármacos híbridos, que visa a junção covalente num único fármaco através de um espaçador, de dois farmacóforos com diferentes modos de ação, tem atraído um grande interesse por parte da comunidade da Química Medicinal.<sup>31</sup> O desenvolvimento deste tipo de compostos tem como objetivo melhorar a atividade biológica dos fármacos que lhes deram origem e torná-los menos suscetíveis ao desenvolvimento de resistência. Além disso, este tipo de combinações também pode resolver problemas como a baixa solubilidade e estabilidade de compostos. Esta estratégia tem sido utilizada por vários grupos de investigação para desenvolver compostos com potencial para tratar várias doenças, como cancro, SIDA, e tuberculose, tendo, nesta última década, vindo a ganhar força no campo do desenvolvimento de novos antimaláricos.<sup>32-33</sup>

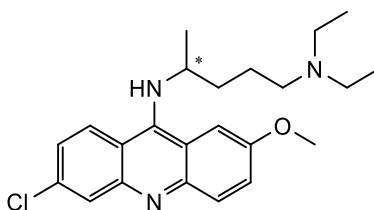
#### 1.1.5. Derivados da acridina como potenciais antimaláricos

A acridina é um farmacóforo bastante relevante nos dias de hoje. De facto, vários dos seus derivados constituem uma classe de compostos com um amplo espectro de atividade biológica e, por essa razão, são de grande interesse. Até ao momento, análogos de acridina desenvolvidos demonstraram possuir atividade antitumoral,<sup>34</sup> anti-

Alzheimer,<sup>35</sup> anti-inflamatória,<sup>36</sup> antiviral,<sup>37</sup> antimalárica,<sup>38</sup> antibacteriana,<sup>39</sup> entre outras.<sup>40-41</sup> No entanto, em muitos casos, a sua aplicação clínica é limitada devido à sua elevada citotoxicidade.<sup>40</sup>

O mecanismo de ação mais consensual de derivados de acridina contra diferentes doenças é a sua interação com o ácido desoxirribonucleico (ADN), possivelmente por intercalação na dupla-hélice e/ou por inibição de topoisomerases. No entanto, no caso da malária, tem vindo a ser defendido que o ADN parasítico não será o principal alvo terapêutico de derivados da acridina, na medida em que vários desses compostos capazes de intercalar com o ADN são desprovidos de atividade antimalárica.<sup>42</sup> Por essa razão, têm sido propostos outros mecanismos de ação antimalárica tais como a inibição do complexo mitocondrial bc1 do parasita e a inibição da formação de hemozoína.<sup>38</sup>

Na história da quimioterapia da malária, destaca-se a quinacrina (QN – **Figura 8**), um derivado de acridina também conhecido por mepacrina, sintetizado em 1932, como o primeiro antimalárico sintético, clinicamente testado com atividade esquizotocida sanguíneo. Este fármaco veio substituir a quinina e foi amplamente utilizado durante a 2ª Guerra Mundial pelos soldados. No entanto, os seus efeitos adversos fizeram com que fosse rapidamente substituído pela CQ, que emergiu como um dos fármacos antimaláricos mais promissores de sempre.<sup>9</sup> Contudo, o aparecimento de resistência generalizada do *P. falciparum* à CQ, e agora mais recentemente às ACTs, atraiu novamente atenção para a síntese de derivados da QN mais eficientes.



**Figura 8.** Estrutura química da quinacrina.

Neste contexto, um dos primeiros trabalhos foi realizado por Chibale *et al.*<sup>43</sup> Os autores desenvolveram uma série de compostos em que o núcleo de acridina da QN foi ligado a uma segunda porção aromática através de sulfonamida (**I**, **Figura 9**) ou grupos ureia (**II**, **Figura 9**), com o objetivo de melhorar as propriedades de solubilidade dos compostos. De uma forma geral, os derivados de ureia tiveram atividades antimaláricas mais elevadas que os derivados de sulfonamida ( $0,0005 < IC_{50} < 0,069 \mu\text{g/mL}$ ) contra uma estirpe sensível (3D7) à CQ, sendo que alguns foram mesmo melhores que a referência CQ ( $IC_{50} = 0,002 \mu\text{g/mL}$ ). O composto **II** apresentou os melhores resultados,



uma vez que foi 4 e 10 vezes mais ativo que a CQ contra as estirpes 3D7 ( $IC_{50} = 0,0005 \mu\text{g/mL}$ ) e K1 ( $IC_{50} = 0,015 \mu\text{g/mL}$ ), respetivamente. Mas, em contrapartida, apresentou citotoxicidade contra a linhagem celular KB.<sup>43</sup>

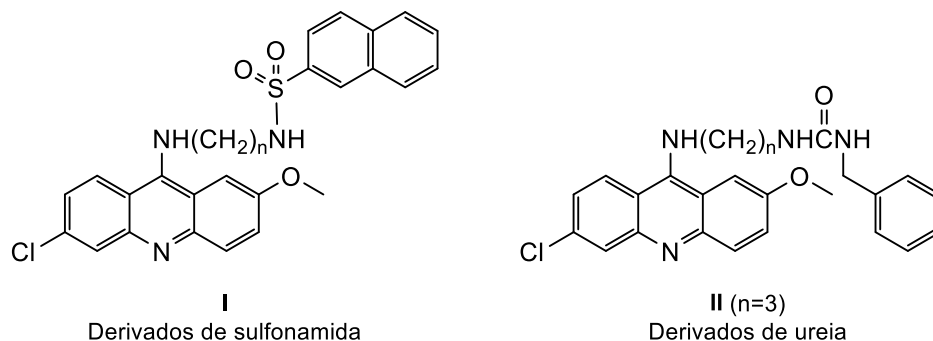


Figura 9. Análogos da QN (I e II) desenvolvidos por Chibale *et al.*<sup>43</sup>

Outras substituições na cadeia lateral da QN foram abordadas. Sparatore *et al.*<sup>44</sup> produziram análogos de QN (III, Figura 10) através da introdução de uma porção quinolizidinilalquilo no grupo amino do núcleo de acridina, com vista a melhorar a biodisponibilidade e farmacocinética do composto. Estes derivados exibiram atividades *in vitro* contra estirpes de *P. falciparum* sensível (D10) e resistente (W2) à CQ com valores compreendidos entre 30,8 a 43,5 nM e de 68,1 a 97,4 nM, respetivamente. Contudo, apresentaram um citotoxicidade equimolar à QN e, conseqüentemente, maior que a referência CQ.<sup>44</sup>

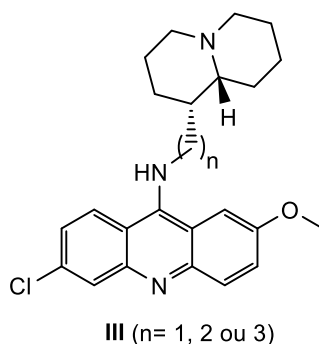


Figura 10. Análogos da QN (III) desenvolvidos por Sparatore *et al.*<sup>44</sup>

Uma abordagem mais conservadora de variações estruturais em torno da QN foi realizada por Marc Anderson *et al.*<sup>45</sup> que descreveram a síntese de análogos das 9-aminoacridinas através de simples alterações na cadeia lateral do fármaco em questão. Seis compostos (Figura 11) demonstraram elevada atividade *in vitro* contra estirpes de *P. falciparum* sensível (3D7) e resistente (W2) à CQ (3D7:  $1,0 < IC_{50} < 4,1 \text{ nM}$ ; W2: 1,0

$< IC_{50} < 7,6$  nM). No geral, todos os compostos tiveram um desempenho melhor do que as referências QN (3D7:  $IC_{50} = 8,1$  nM; W2:  $IC_{50} = 32,1$  nM) e CQ (3D7:  $IC_{50} = 7,0$  nM; W2:  $IC_{50} = 382,2$  nM), principalmente contra a estirpe resistente à CQ. Deste conjunto, destacaram-se dois compostos (**IV** e **VII**) que exibiram atividade subnanomolar contra 3D7, além de uma atividade extremamente melhorada contra a estirpe W2. Os resultados deste trabalho sugeriram alguma flexibilidade nas modificações na cadeia lateral da QN, já que ambos os grupos furilo e alquílico foram bem tolerados, contudo os dois melhores compostos foram aqueles cuja estrutura mais se assemelhou à QN.<sup>45</sup>

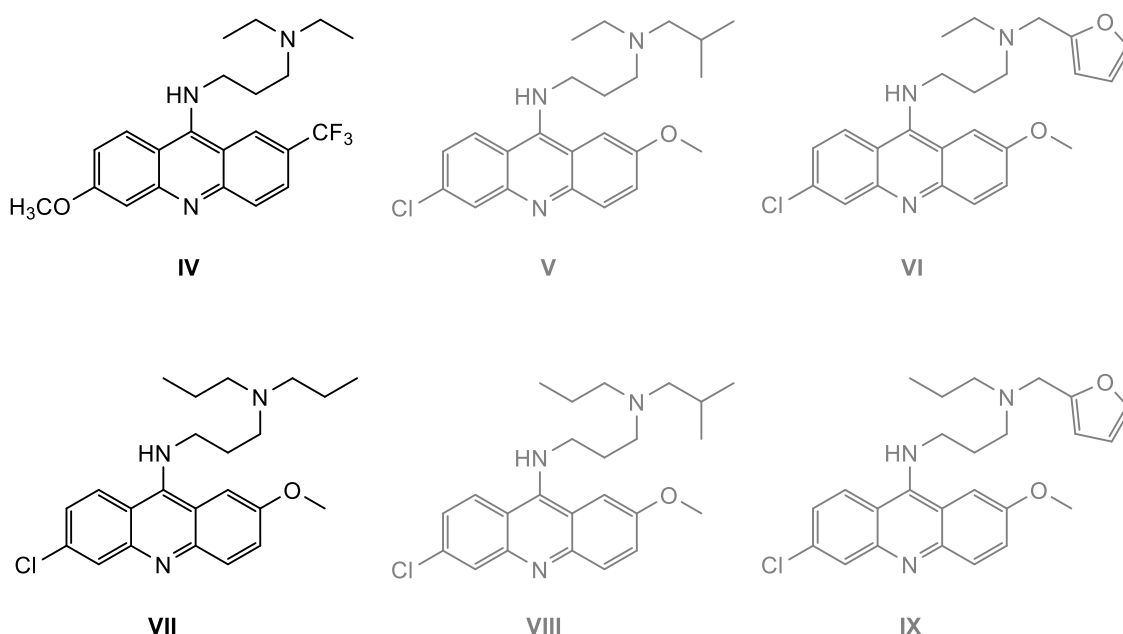


Figura 11. Análogos da QN (IV-IX) desenvolvidos por Anderson *et al.*<sup>45</sup>

No seguimento dos trabalhos desenvolvidos por Anderson, Guetzoyan *et al.*<sup>46-47</sup> reportaram a síntese de análogos da QN introduzindo diferentes cadeias diaminoalquílicas na posição 9 do núcleo heteroaromático, com o objetivo de avaliar a importância do tamanho da cadeia alquílica e do estado de protonação da amina terminal. Adicionalmente, foi também sintetizado um análogo desprovido dos substituintes metoxilo e cloro nas posições 2 e 6, respetivamente, permitindo avaliar o seu impacto na atividade antimalárica.

Comparativamente à CQ, o melhor composto da série (**X** – Figura 12) apresentou melhores atividades *in vitro* (W2:  $IC_{50} = 0,25$   $\mu$ M; FCR3:  $IC_{50} = 0,33$  Mm; Bre1:  $IC_{50} = 0,28$   $\mu$ M) contra três estirpes de *P. falciparum* resistentes ao fármaco. A mesma tendência não se verificou nem para a citotoxicidade, nem contra uma estirpe de *P. falciparum* sensível à CQ (3D7), ( $IC_{50} = 0,042$  e  $0,018$   $\mu$ M para **X** e CQ, respetivamente).<sup>46-47</sup> Ainda assim, este estudo permitiu estabelecer uma relação de

estrutura atividade evidenciando os seguintes requisitos estruturais para que esta família de compostos exiba atividade antimalárica: (i) a presença de dois grupos protonáveis em condições fisiológicas, um no núcleo da acridina e outro na função terminal da cadeia alifática lateral, e (ii) a presença dos substituintes cloro e metoxilo na posição 6 e 2, respectivamente.<sup>46-47</sup>

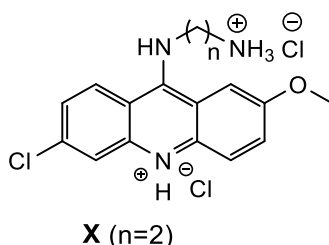


Figura 12. Análogos da QN (X) desenvolvidos por Guetzoyan *et al.*<sup>46-47</sup>

Yu *et al.*,<sup>48</sup> ampliaram o estudo com derivados semelhantes aos anteriores pela introdução de grupos heterocíclicos terminais, como piperazinil, pirrolidinil, imidazolil e morfolinil, na cadeia lateral alifática, uma vez que estes estão associados a biodisponibilidade aumentada, estabilidade metabólica e tolerância em humanos. Além disso, a maioria deles exibe uma carga positiva a pH fisiológico, requisito estrutural para manter uma boa atividade antimalárica. Os melhores compostos foram os derivados de morfolina (**XI**, **Figura 13**) que demonstraram uma boa atividade, relativamente aos compostos de referência CQ e QN, contra estirpes de *P. falciparum* resistente ( $IC_{50} = 30$  nM; SI = 3,7-7,2) e sensível ( $IC_{50} = 9-10$  nM; SI = 12,2-21,5) à CQ, juntamente com citotoxicidade moderada.<sup>48</sup>

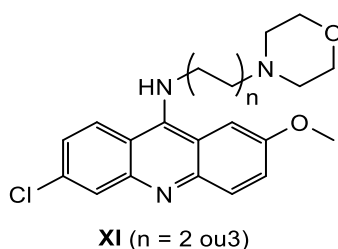
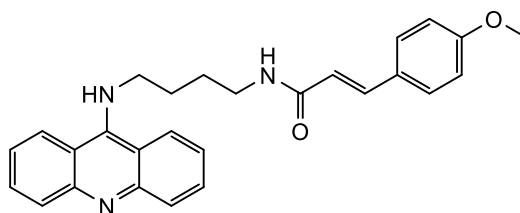


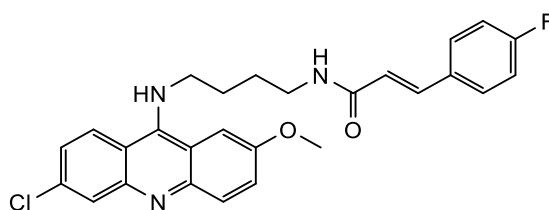
Figura 13. Análogos da QN (XI) desenvolvidos por Yu *et al.*<sup>48</sup>

Pouco tempo depois, Pérez *et al.*,<sup>49</sup> reportaram uma abordagem ligeiramente diferente, remetendo para a síntese de fármacos híbridos, com base em resultados anteriores com derivados da CQ obtidos pelo grupo. Os autores sintetizaram novos derivados de 9-aminoacridina ligando, através de uma cadeia de aminobutilo (farmacóforo com atividade antimalárica), o núcleo heteroaromático da acridina a

diferentes ácidos cinâmicos, os quais, por sua vez, também têm atividade antimalárica intrínseca. Apesar dos compostos mais ativos não apresentarem uma atividade superior à CQ contra formas sanguíneas da estirpe de *P. falciparum* W2 resistente à CQ, apresentavam atividade contra formas hepáticas de *P. berghei*. Tal constituiu um resultado sem precedente, uma vez que a QN está descrita como desprovida de atividade contra formas hepáticas do *Plasmodium*. O composto com melhor índice de seletividade (**XII**, **Figura 14**) apresentou uma atividade na fase sanguínea ( $IC_{50} = 138$  nM) semelhante à da CQ, e uma atividade na fase hepática ( $IC_{50} = 3,2$   $\mu$ M) aproximadamente três vezes superior à da PQ ( $IC_{50} = 8$   $\mu$ M), o então fármaco de referência nessa fase.<sup>49</sup>

**XII****Figura 14.** Análogos da QN (**XII**) desenvolvidos por Pérez *et al.*<sup>49</sup>

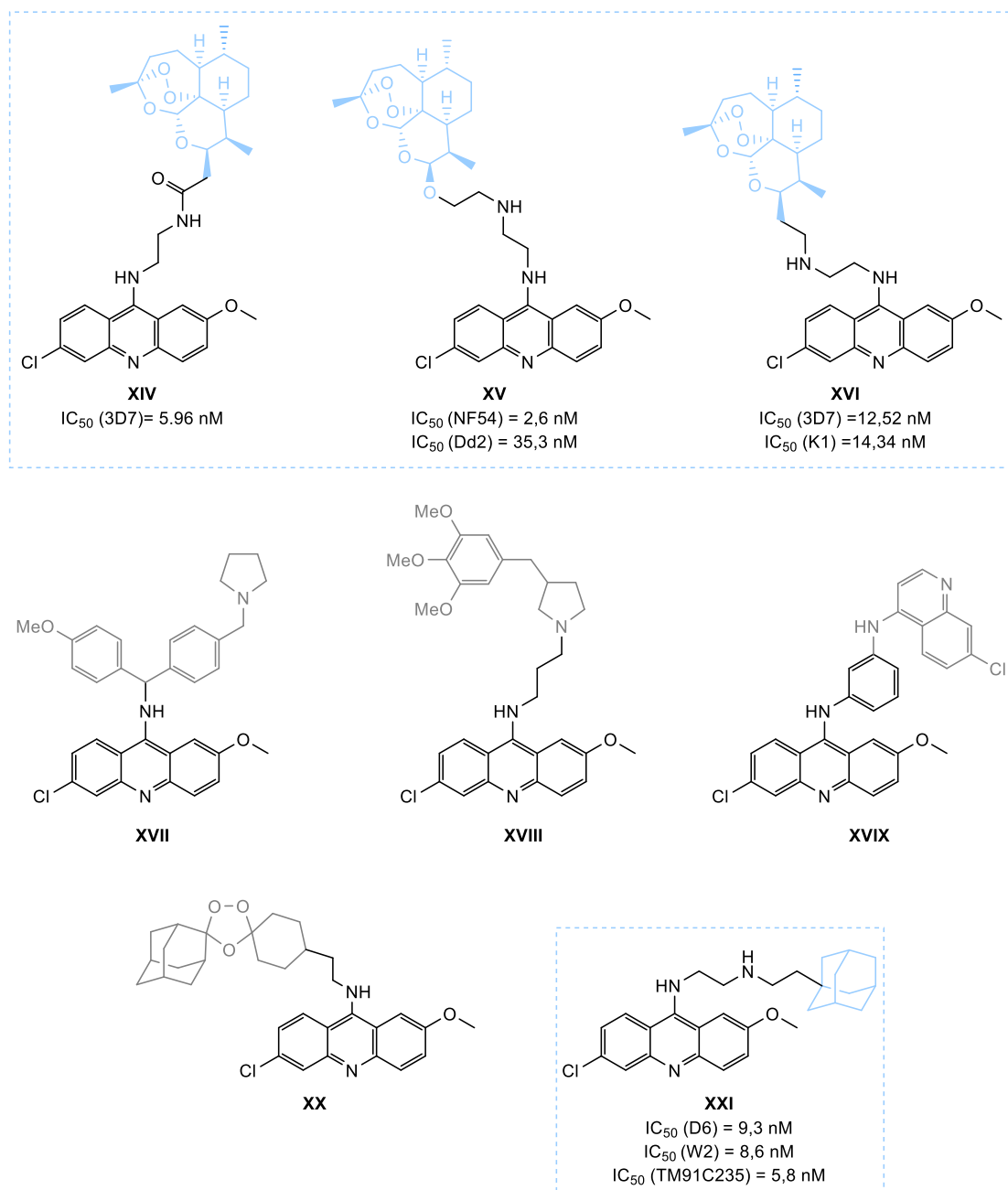
Seguindo esta linha de pensamento, estes híbridos foram novamente sintetizados pelo mesmo grupo de investigação, incluindo na sua estrutura os substituintes cloro e metoxilo na posição 6 e 2, respetivamente, uma vez que estes substituintes comprovaram aumentar a atividade antimalárica. Como expectável, todos os compostos exibiram atividades antimaláricas muito mais potentes que os referidos anteriormente (**XII**, **Figura 14**,  $IC_{50} = 126$ – $225$  nm), contra formas sanguíneas da estirpe de *P. falciparum* W2 resistente à CQ ( $IC_{50} = 3,2$ – $41,2$  nm). Adicionalmente, os compostos também foram avaliados contra outras estirpes, nomeadamente 3D7 e Dd2, e os resultados foram bastante promissores. O melhor composto (**XIII**, **Figura 15**) exibiu (i) atividades comparáveis ou melhores que o composto de referência CQ contra as formas sanguíneas das estirpes de *P. falciparum* 3D7, Dd2 e W2 (3D7:  $IC_{50} = 29,8$  nM; Dd2:  $IC_{50} = 131,0$  nM; W2:  $IC_{50} = 17,8$  nM), ii) atividade mais potente contra o estágio hepático *P. berghei* ( $IC_{50} = 1,5$   $\mu$ M), e iii) baixa citotoxicidade contra células humanas HepG2 (SI = 1257). O facto de apresentar baixa citotoxicidade poderá estar relacionado com a presença de um átomo de flúor na sua estrutura, na medida em que estes são conhecidos por contribuírem para uma maior biodisponibilidade, solubilidade e estabilidade metabólica dos compostos.<sup>50</sup>



XIII

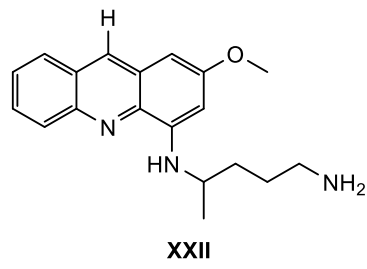
Figura 15. Análogos da QN (XIII) desenvolvidos por Ana *et al.*<sup>50-51</sup>

Em junção aos derivados cinâmicos referidos anteriormente, na **Figura 16** está apresentado um pequeno resumo de outros compostos híbridos já sintetizados para fins antimaláricos contendo o núcleo da acridina. De todos, destacam-se os compostos **XIV**, **XV** e **XVI**, por estes conterem na sua estrutura, além da acridina, a artemisinina ou seus derivados, que são os únicos antimaláricos ativos atualmente para estirpes de *P. falciparum* resistentes à CQ. Os resultados não foram muito promissores no sentido em que apenas o composto **XV** apresentou atividade antimalárica superior aos compostos que lhe deram origem contra a estirpe de *P. falciparum* NF54.<sup>52-54</sup> Adicionalmente, destaca-se também o composto **XXI**, que contém na sua estrutura a acridina e o adamantano, uma vez que este derivado exibiu atividades *in vitro* comparáveis às da artemisinina e (ii) um elevado índice de seletividade (SI = 326-522).<sup>55</sup>



**Figura 16.** Derivados híbridos desenvolvidos (XIV-XXI) com melhor atividade antimalárica contendo acridina na sua estrutura.<sup>52-57</sup>

De realçar também que, paralelamente às substituições na posição 9 do anel da acridina, substituições em outras posições do anel têm sido alvo de investigação. Um estudo realizado por John P. Scovill *et al.*,<sup>58</sup> em que foram sintetizados dois análogos de 4-amino-2-metoxiacridina, revelou resultados bastante interessantes. Um dos compostos (**Figura 17**) avaliados demonstrou atividade *in vivo* na fase hepática contra o *P. cynomolgi* no macaco *rhesus*, o que pode ser um resultado promissor para o desenvolvimento de derivados de acridina contra a fase hepática, em substituição à PQ.<sup>58</sup>



**Figura 17.** Derivados de 4-aminoacridina (XXII) desenvolvido por Jonh P. Scovill *et al.*<sup>58</sup>





## **CAPÍTULO 2**

---

### **Âmbito do trabalho**

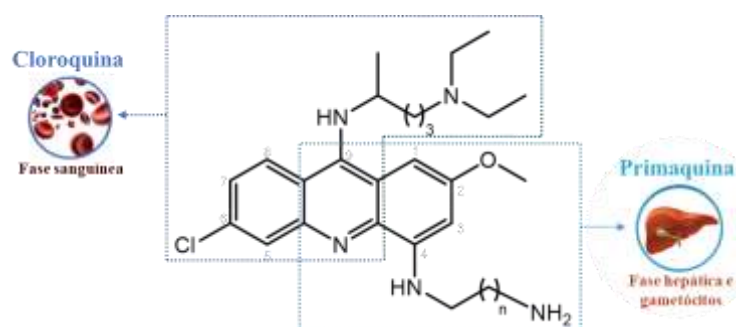


## 2. Âmbito do trabalho

### 2.1. Objetivo do trabalho

O presente trabalho foi realizado no âmbito do Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e orientado pela Professora Doutora Maria João Sinde Monteiro Pinto de Araújo juntamente com a Doutora Cátia Andreia Silva Teixeira, ambas pertencentes ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e ao Laboratório Associado para a Química Verde da Rede de Química e Tecnologia.

De acordo com o referido ao longo do **Capítulo 1**, a cura radical da malária passa pela administração de um fármaco que seja não só ativo nas duas fases do ciclo de vida do parasita, como também que evite a transmissão da doença. Com base nestes factos e em resultados descritos na literatura relativos a análogos da 4-amino-2-metoxiacridina que exibiram atividade na fase hepática do ciclo de vida do parasita quando testados contra o *P. cynomolgi* no macaco *rhesus*, o objetivo principal deste trabalho foi a síntese de derivados de 4,9-diaminoacridinas, e a determinação da sua atividade antimalárica e da sua citotoxicidade *in vitro*. Estruturalmente, estes derivados correspondem à junção da CQ e da PQ, dois antimaláricos clássicos e que atualmente são praticamente ineficientes. Assim, através desta combinação, é expectável que estas novas moléculas preservem a atividade dos compostos que lhes deram origem, atuando como antimaláricos multi-alvo, isto é, contra a fase sanguínea, como a CQ, e contra a fase hepática e gametócitos, similar à PQ (**Figura 18**).



**Figura 18.** Estrutura geral dos derivados de 4,9-diaminoacridinas ( $n = 3$  ou  $5$ ).

Resumidamente, os objetivos específicos deste trabalho de Dissertação consistiram na (i) síntese, (ii) purificação e (iii) caracterização estrutural de uma nova família de derivados de 4,9-diaminoacridinas análogos da QN (**Figura 18**).

Após finalização destes objetivos referidos, os compostos foram enviados para colaboradores externos para a avaliação da sua atividade antimalárica *in vitro* (i) contra formas hepáticas de *P. berghei* (colaboração com o grupo do Dr. Miguel Prudêncio do

IMM da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa); (ii) contra estirpes do *P. falciparum* (sensíveis e resistentes à CQ) na fase sanguínea (colaboração com o grupo do Dr. Xavier Fernández-Busquets do Instituto de Bioengenharia da Catalunha, Barcelona, Espanha); e (iii) contra gametócitos (colaboração com o grupo da Dra. Fátima Nogueira do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa).

## 2.2. Rota sintética

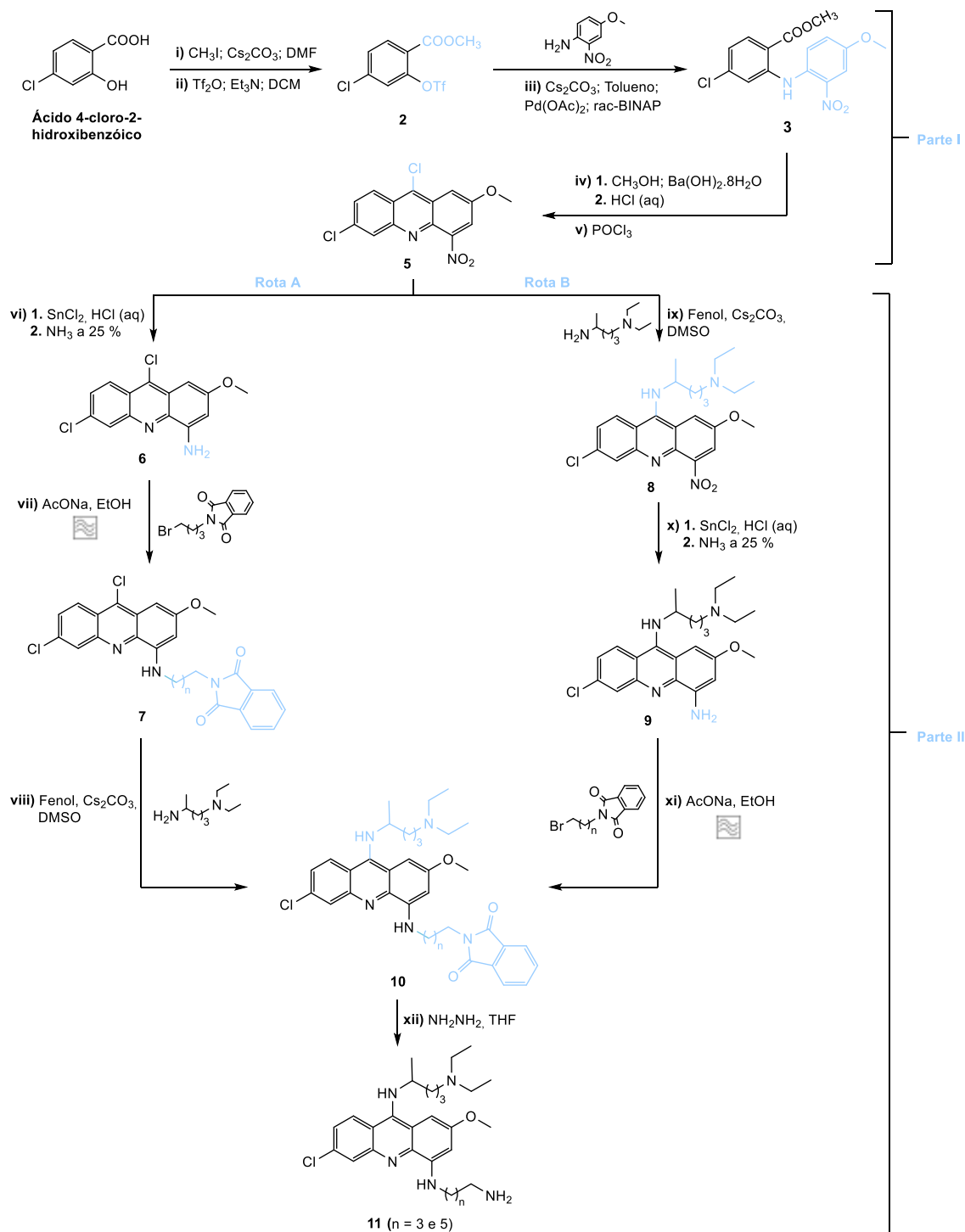
De forma a cumprir os objetivos apresentados na secção anterior (2.1.), delineou-se o plano de trabalhos representado no **Esquema 1**. Para uma melhor compreensão, a rota sintética descrita foi dividida em duas partes principais, **Parte I** e **Parte II**, que correspondem, respetivamente, à síntese do núcleo de acridina substituído e às introduções das cadeias laterais nas posições 4 e 9 desse mesmo núcleo.

A síntese destes derivados inicia-se com a esterificação em meio básico do ácido 4-cloro-2-hidroxibenzóico, disponível comercialmente, utilizando  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  como base (passo **i**). Este passo tem como objetivo proteger o ácido carboxílico para que este não interfira no passo **ii**) que diz respeito à introdução do grupo triflato, por meio de uma substituição nucleofílica bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) com o anidrido trifluorometanossulfónico. De seguida, o composto formado é acoplado com a 4-metoxi-2-nitroanilina, via o procedimento de Buchwald-Hartwig, para dar origem ao composto **3** (passo **iii**) que é seguidamente hidrolisado utilizando hidróxido de bário (passo **iv**). Por fim, o composto formado sofre ciclização de Friedel-Crafts com  $\text{POCl}_3$  (passo **v**), obtendo-se o núcleo de acridina substituído **5**, designado por 6,9-dicloro-2-metoxi-4-nitroacridina.

Relativamente à **Parte II** da rota, esta teve em consideração a ordem de introdução das cadeias laterais na posição 4 e 9, tendo sido para o efeito testadas duas rotas sintéticas (que foram designadas por **Rota A** e **Rota B**).

A primeira rota elaborada, Rota A, começa com a redução do grupo nitroílo na posição 4 do anel ao correspondente grupo amino utilizando  $\text{SnCl}_2$  como agente redutor (passo **vi**). Seguidamente, este grupo amino reage com a cadeia *N*-(4-bromobutil)ftalimida, via  $\text{S}_{\text{N}}2$  (passo **vii**) para dar origem ao composto **7** que posteriormente é submetido a uma reação de uma substituição aromática nucleofílica ( $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ ) na posição 9, usando *N,N*-dietilpentano-1,4-diamina como nucleófilo (passo **viii**). O último passo da Rota A (passo **xii**) diz respeito à formação do composto **11**, por reação do composto **10** com hidrazina, de modo a se obter o grupo amino primário livre na cadeia lateral do produto final **11**.

A segunda rota sintética elaborada, Rota B, inicia-se com a introdução em primeiro lugar, via  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ , do grupo *N,N*- dietilpentano-1,4-diamina na posição 9, usando fenol e  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (passo **ix**). Seguidamente, é realizada a redução do grupo nitroílo ao correspondente grupo amino, utilizando, tal como na Rota A,  $\text{SnCl}_2$  como agente redutor (passo **x**). Por fim, introduz-se a cadeia *N*-aminoalquílica no grupo amino primário por reação do composto **9** com *N*-(*n*-bromoalquil)ftalimida (passo **xi**) seguida de tratamento do composto **10** com  $\text{NH}_2\text{NH}_2$  (passo **xii**), obtendo-se assim o composto final pretendido **11**.



Esquema 1. Rotas sintéticas estudadas no presente trabalho.

# CAPÍTULO 3

---

## Resultados e Discussão





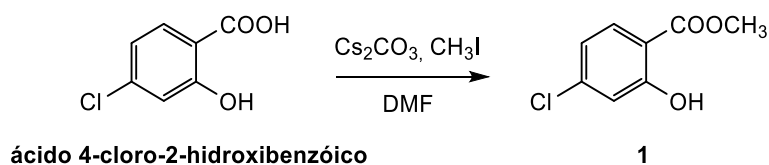
### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Parte I

A **Parte I** da síntese, tal como referido no **Capítulo 2**, diz respeito à síntese do núcleo de acridina substituído nas posições 2, 4, 6 e 9, necessário para a posterior introdução das cadeias laterais aminoalquilamínicas (**Parte II**).

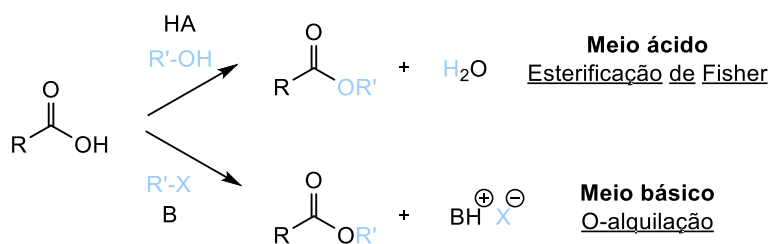
##### 3.1.1. Síntese de **4-cloro-2-hidroxibenzoato de metilo (1)**

O primeiro passo reacional corresponde à esterificação do ácido 4-cloro-2-hidroxibenzoico, disponível comercialmente, e tem como objetivo a proteção do grupo carboxilo presente na sua estrutura, de forma a torná-lo não reativo para passos reacionais futuros. A síntese do éster foi realizada em condições suaves, utilizando  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , de acordo com o método descrito por Marc O. Anderson e colaboradores,<sup>45</sup> tal como apresentado no esquema seguinte:



Esquema 2. Síntese do composto 1.

Esterificação é o nome geral para uma reação química na qual dois reagentes formam um éster como o produto da reação. De entre os vários métodos de síntese existentes na literatura,<sup>59</sup> a forma mais comum de produzir um éster é através da reação entre um ácido carboxílico e um álcool, na presença de um catalisador ácido - esterificação de Fisher (**Esquema 3**).<sup>60</sup> Contudo, geralmente este método apresenta algumas limitações como elevada temperatura e tempos de reação, e ainda rendimentos baixos devido ao facto da reação ser reversível (dando origem ao reagente de partida novamente). Adicionalmente, a síntese de ésteres provenientes de ácidos carboxílicos estericamente impedidos e com grupos funcionais sensíveis a condições drásticas e fortemente ácidas não é possível.<sup>59</sup> Assim, uma alternativa à esterificação de Fisher é a síntese de ésteres em meio básico (**Esquema 3**), utilizando um halogeneto de alquilo e uma base. Neste contexto, a esterificação utilizando sais de metais alcalinos tem comprovado ser um método eficiente de síntese de ésteres. Este tipo de reações é fortemente influenciado pela natureza do catião da base, do solvente e do halogeneto de alquilo.<sup>59</sup>

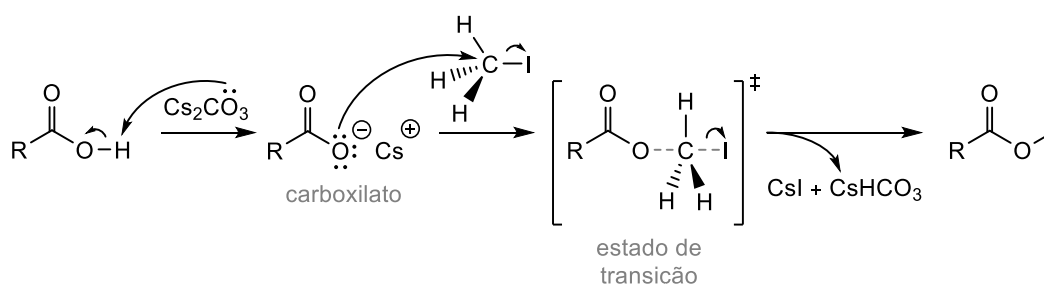


Esquema 3. Esquema de esterificação em meio ácido e meio básico.

Com base no referido, Jay P. Parrish e colaboradores<sup>61</sup> desenvolveram um método em que se torna possível a síntese de um éster em condições suaves utilizando sais de céσιο, nomeadamente carbonato de céσιο (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). O Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> é considerado uma base suave e, por essa razão, não só é altamente compatível com grupos funcionais sensíveis a bases como também tem a capacidade de desprotonação quimiosseletiva.

O céσιο (Cs) adquiriu uma atenção considerável na síntese orgânica devido às suas propriedades únicas (raio iónico elevado e conseqüente baixa densidade de carga, e alta polarizabilidade) que ficaram conhecidas como o “efeito céσιο”.<sup>62</sup> O facto do ião de Cs apresentar um raio iónico elevado conduz a um menor grau de solvatação e emparelhamento iónico. Além disso, se for selecionado um solvente que solvate os cátions mais eficientemente que os aniões, isto é, um solvente polar aprótico com uma grande constante dielétrica  $\epsilon$  (como o *N,N*-dimetilformamida (DMF)), os aniões estarão o mais “livres” possível e, conseqüentemente, altamente reativos. Adicionalmente, os sais de céσιο, em particular os carbonatos, apresentam uma solubilidade superior em solventes apróticos, comparativamente com outros sais de metais alcalinos, conduzindo deste modo também a uma maior acessibilidade.<sup>63</sup> Assim sendo, a utilização destes sais apresenta vantagens significativas, comparativamente à utilização de outros carbonatos de metais alcalinos (Li, Na, K, Rb), nomeadamente em questões de rendimento e condições reacionais.

A esterificação com sais de Cs ocorre mediante duas etapas principais: desprotonação do ácido carboxílico seguido de uma substituição nucleofílica bimolecular (S<sub>N</sub>2) (**Esquema 4**). Inicialmente o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> atua como base removendo um protão do ácido carboxílico, levando deste modo à formação *in situ* do anião carboxilato. Este anião altamente reativo, ataca o carbono pelo lado oposto ao halogéneo ao mesmo tempo que o halogéneo é eliminado, dando assim origem ao produto pretendido e a hidrogenocarbonato de céσιο e iodeto de céσιο. A quebra da ligação carbono-halogéneo ocorre em simultâneo com a formação da ligação carbono-oxigénio através de um estado de transição no qual o átomo de carbono que sofre o ataque nucleofílico está parcialmente pentacoordenado.



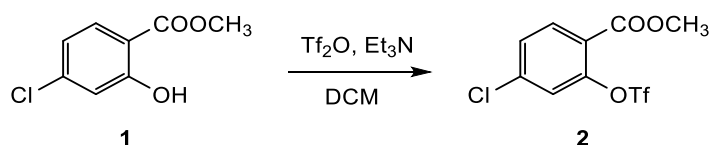
**Esquema 4.** Mecanismo de esterificação utilizando Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base e CH<sub>3</sub>I como agente alquilante.

Assim, no presente trabalho, o ácido 4-cloro-2-hidroxibenzóico **1** foi dissolvido num solvente polar aprótico (DMF), ao qual foi adicionado o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e, alguns minutos depois, o halogeneto de alquilo primário, CH<sub>3</sub>I. O seguimento da reação por cromatografia líquida em camada fina (CCF) mostrou tratar-se de uma reação “limpa”, ou seja, com a formação completa e exclusiva do produto de interesse, o que simplificou a sua purificação, que foi realizada apenas por extração líquido-líquido.

O composto **1** pretendido, obtido sob a forma de óleo incolor, foi caracterizado por <sup>1</sup>H-RMN (**Anexo 1**). Este revelou ser bastante volátil e, por essa razão, o rendimento da reação não pôde ser calculado. No entanto, tendo a reação sido completa, sem a formação de quaisquer produtos secundários, admitiu-se um rendimento de 100 %.

### 3.1.2. Síntese de 4-cloro-2-(trifluorometanossulfoniloxi)benzoato de metilo (**2**)

A síntese do composto **2** diz respeito à ativação do grupo hidroxilo do composto **1** através da introdução do grupo triflato. Este passo reacional tem como objetivo favorecer o acoplamento de Buchwald-Hartwig (passo **iii**) – **Esquema 8**). Esta reação foi realizada mediante o procedimento descrito por Marc O. Anderson e colaboradores,<sup>45</sup> conforme apresentado no esquema seguinte:

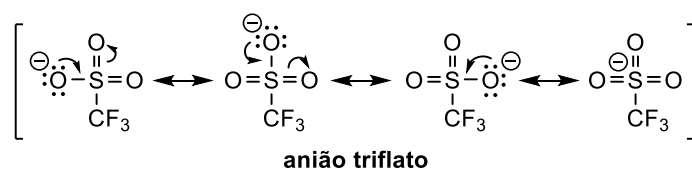


**Esquema 5.** Síntese do composto **2**.

Em química orgânica, o grupo triflato é um dos grupos ativantes mais usados em reações de S<sub>N</sub>2. Isto deve-se ao facto do anião triflato (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ser considerado um dos melhores grupos de saída existentes (inclusive melhor que os halogenetos) dado ser a base conjugada do ácido trifílico (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H), um dos ácidos orgânicos mais fortes

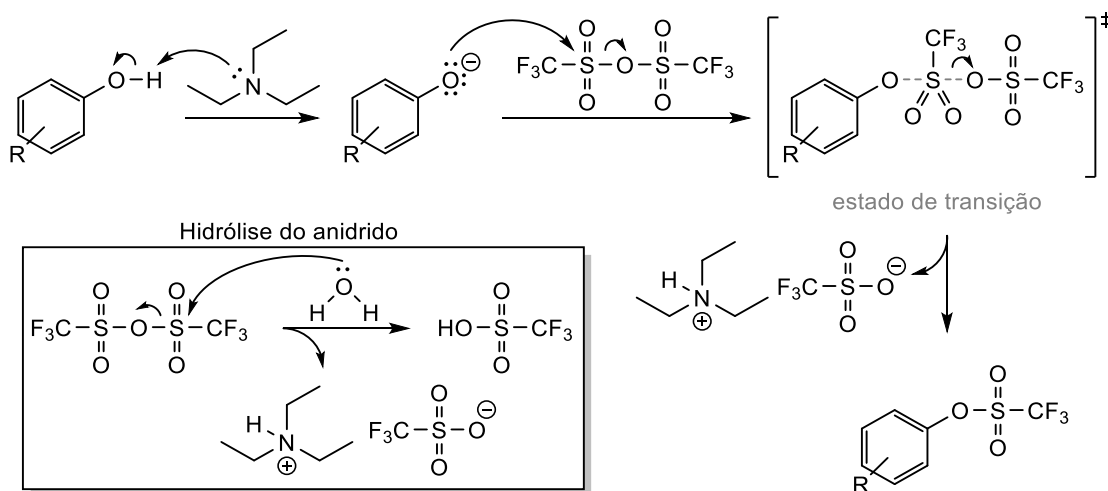
que se conhece, e possuir uma elevada estabilização por ressonância (**Esquema 6**).<sup>64</sup>

66



**Esquema 6.** Estabilização por ressonância do anião triflato.

Pelas razões mencionadas, a conversão de fenóis/álcoois em triflatos favorece posteriores reações de substituições nucleofílicas, tais como o acoplamento de Buchwald-Hartwig. A síntese convencional de triflatos aromáticos envolve o tratamento de fenóis com o anidrido trifluorometanosulfónico (Tf<sub>2</sub>O) na presença de uma base como a trietilamina (Et<sub>3</sub>N), em solventes halogenados como o diclorometano (DCM).<sup>67</sup> Esta reação segue um mecanismo via S<sub>N</sub>2, como apresentado no **Esquema 7**. Inicialmente, a Et<sub>3</sub>N atua como base removendo um protão do fenol. Seguidamente o Tf<sub>2</sub>O sofre ataque nucleofílico por parte do ião fenolato e, em simultâneo, ocorre a saída do anião triflato. Caso as condições reacionais não sejam anidras, uma forte reação secundária ocorre entre o anidrido e a água, dando origem a um ácido extremamente forte (ácido trifílico).



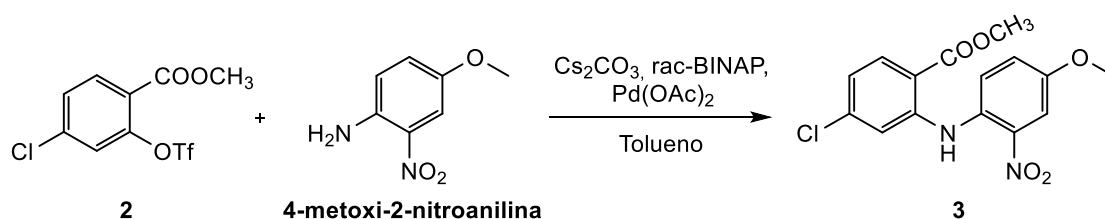
**Esquema 7.** Mecanismo da síntese do triflato de arilo via S<sub>N</sub>2 utilizando Et<sub>3</sub>N como base. À parte está descrito o mecanismo de hidrólise do anidrido.

Assim, e no âmbito deste trabalho, o composto **1** foi dissolvido em DCM (T = - 20 °C e sob atmosfera inerte), ao qual foi adicionado Et<sub>3</sub>N seguida do Tf<sub>2</sub>O. Aquando da adição deste último é importante manter um meio anidro para evitar a reação do anidrido com

a água (ver **Esquema 7**). A reação foi seguida por CCF e, após tratamento por extrações líquido-líquido, a mistura reacional foi purificada por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO<sub>2</sub>. Deste modo, o composto **2** foi obtido sob a forma de um líquido incolor com bons rendimentos (60,5 – 61,5 %) e a sua análise estrutural foi realizada por ESI-IT MS e <sup>1</sup>H-RMN (**Anexo 2**).

### 3.1.3. Síntese de 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzoato de metilo (**3**)

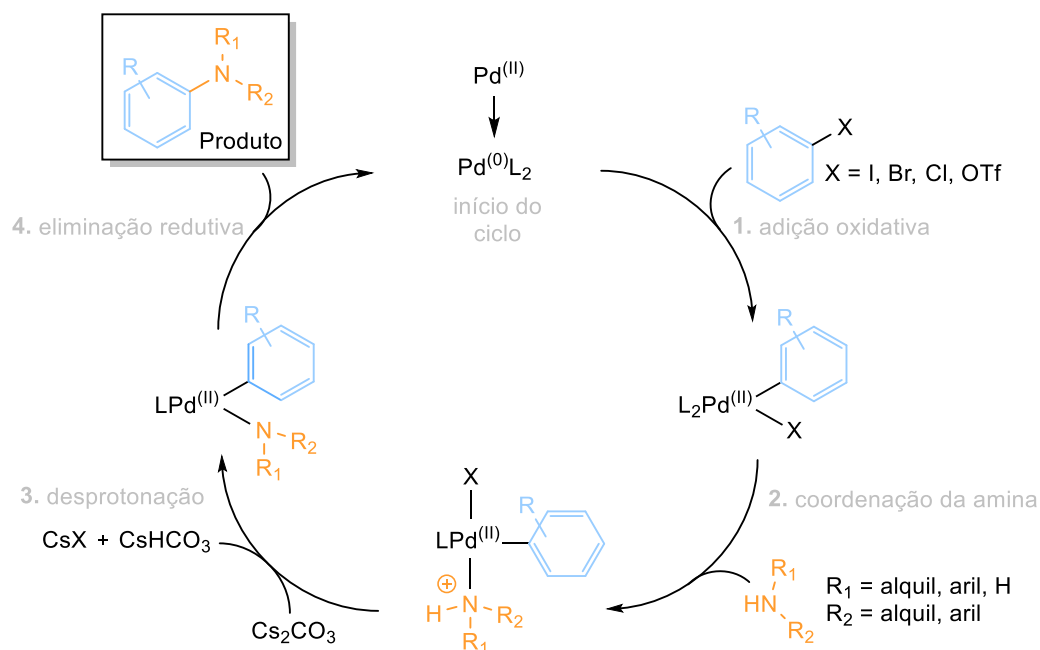
O passo **iii**) da rota sintética diz respeito à síntese do composto **3** através de uma aminação de Buchwald-Hartwig entre o triflato de arilo **2** e a anilina dissubstituída, seguindo a metodologia de Jens Åhman e colaboradores,<sup>68</sup> tal como apresentado no seguinte esquema:



**Esquema 8.** Síntese do composto **3**.

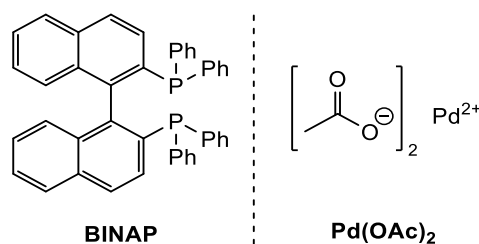
A aminação de Buchwald-Hartwig é uma reação química que consiste no acoplamento cruzado catalisado por paládio entre um halogeneto de arilo ou um triflato de arilo e uma amina primária ou secundária.<sup>69</sup> A descoberta e consequente desenvolvimento desta reação permitiu a síntese mais fácil e com melhores rendimentos de aminas aromáticas substituídas.

O mecanismo catalítico da reação está apresentado no **Esquema 9**. Inicialmente, após a redução de Pd(II) a Pd(0) na presença do ligando, ocorre a formação *in situ* da espécie catalítica, Pd<sup>(0)</sup>L<sub>2</sub> (L = ligando). Posto isto, segue-se a etapa de adição oxidativa, isto é, a inserção do metal na ligação covalente C-X do halogeneto de arilo (ou triflato de arilo) com consequente oxidação do mesmo. Uma vez que a ligação C-X é quebrada, a natureza do halogéneo ou pseudo-halogéneo afeta a velocidade da reação. Posteriormente, ocorre a coordenação da amina ao metal, seguida de desprotonação pela base, que é tão mais rápida quanto mais forte for a base utilizada. Para completar o ciclo catalítico, o complexo formado sofre eliminação redutiva dando origem ao produto desejado em conjunto com a regeneração do catalisador ativo.



**Esquema 9.** Mecanismo catalítico da reação de acoplamento de Buchwald-Hartwig utilizando Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base.

Deste modo, verifica-se que, para o sucesso deste tipo de reações, existem quatro componentes essenciais: catalisador de Pd, ligando, base e solvente. Os catalisadores de Pd são escolhidos mediante o ligando a utilizar sendo que um dos mais versáteis é o acetato de paládio (II) (Pd(OAc)<sub>2</sub>) (**Figura 19**).<sup>70-71</sup> De modo similar, a escolha cuidadosa do ligando também pode facilitar duas etapas do ciclo catalítico: a adição oxidativa e a eliminação reductiva. O uso de ligandos fortes dadores σ, como as difenilfosfinas, aumentam a densidade eletrónica em torno do metal, acelerando a adição oxidativa do catalisador ao substrato, que é o mais comumente acreditado ser o passo determinante da velocidade. No que diz respeito ao passo de eliminação reductiva este é acelerado pelo uso de ligandos volumosos e fortemente impedidos. O *rac*-BINAP (**Figura 19**) é um dos ligandos mais versáteis e usados não só por apresentar estas características referidas como também pelo facto de ser estável ao ar, fácil de manusear e estar disponível comercialmente.<sup>70-71</sup>



**Figura 19.** Estrutura química do ligando BINAP e do pré-catalisador Pd(OAc)<sub>2</sub>.

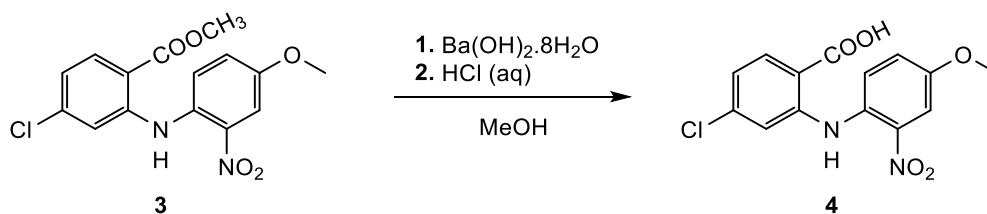
Outro importante fator a ter em conta é a escolha da base, a qual irá depender essencialmente da natureza dos grupos funcionais do reagente amina. De entre as bases mais usuais destaca-se o  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , que além das suas propriedades únicas de reatividade já referidas em 3.1.1., é uma base suave e, por essa razão, não só é bastante tolerada por substratos sensíveis como também evita, quando triflatos de arilo são empregues ao invés de halogenetos, a hidrólise do triflato no correspondente fenol (reação secundária que ocorre quando são utilizadas bases fortes nucleofílicas).<sup>70, 72</sup>

Por último, mas não menos importante, é a escolha do solvente, que por vezes é negligenciada nas reações. Neste caso, o solvente deverá não só permitir uma ampla gama de temperaturas, assim como estabilizar os intermediários no ciclo catalítico, sendo que o tolueno e o 1,4-dioxano são os mais frequentemente usados.<sup>70-71</sup>

Posto isto, no presente trabalho, ao composto **2** dissolvido em tolueno (sob atmosfera inerte) foi adicionado rac-BINAP,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  e 4-metoxi-2-nitroanilina. Aquando da adição deste último a mistura reacional foi aquecida à temperatura de 120 °C, durante 5h. Após se proceder a extrações líquido-líquido seguidas de cromatografia de adsorção em coluna de gel de  $\text{SiO}_2$ , o composto **3** foi obtido sob a forma de um sólido cor de laranja com rendimentos razoáveis (45,5 – 46,2%) e a sua análise estrutural foi realizada por ESI-IT MS e  $^1\text{H}$ -RMN (**Anexo 3**).

#### 3.1.4. Síntese de ácido 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzóico (**4**)

A síntese do composto **4** implica a hidrólise básica do grupo funcional éster do composto **3**, utilizando como base o hidróxido de bário octa-hidratado ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ). Este último é uma base forte amplamente usada para hidrolisar ésteres metílicos, daí a sua escolha para este trabalho.<sup>73</sup> A reação foi realizada mediante a metodologia descrita por Marc O. Anderson e colaboradores,<sup>74</sup> tal como apresentado no esquema seguinte:

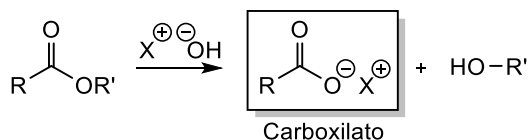


Esquema 10. Síntese do composto **4**.

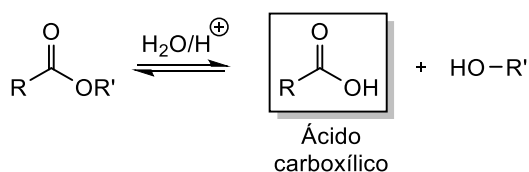
A hidrólise de ésteres pode ser realizada em meio ácido ou meio básico (**Esquema 11**), contudo a hidrólise em meio básico, quando possível, é preferida por esta ser uma

reação mais rápida, ser irreversível, praticamente completa e os produtos resultantes serem de fácil separação, obtendo-se assim melhores rendimentos.<sup>75</sup>

Hidrólise básica



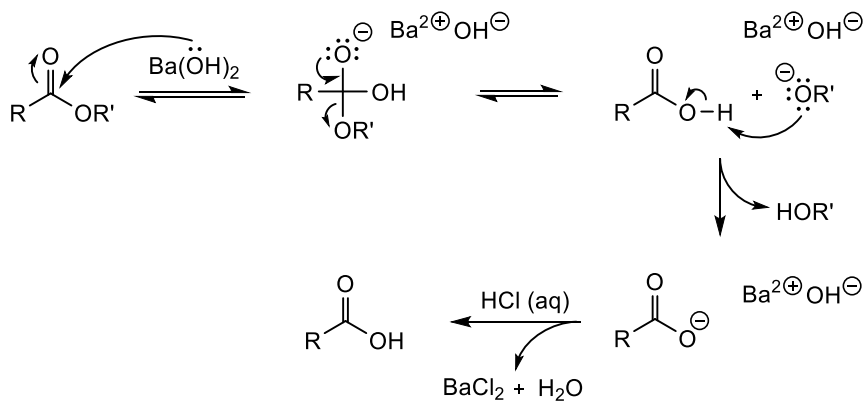
Hidrólise ácida



**Esquema 11.** Esquema geral da reação de hidrólise ácida e básica.

Este tipo de reação segue um mecanismo de adição-eliminação, seguido de desprotonação (**Esquema 12**). A primeira etapa consiste no ataque nucleofílico por parte do hidróxido ao carbono do grupo carbonilo do éster, formando-se um intermediário tetraédrico (adição). De seguida, ocorre a perda de um mau grupo de saída (eliminação). Este passo é reversível sendo possível a expulsão tanto do grupo hidroxilo, obtendo-se o éster inicial, como do respetivo alcóxido dando origem ao ácido carboxílico desejado. Quando ocorre a saída do alcóxido, este como é uma base muito forte, remove rapidamente o protão lábil do ácido carboxílico gerado para dar origem ao respetivo carboxilato. Esta desprotonação torna a reação irreversível uma vez que o carboxilato sendo uma base relativamente fraca não tem tendência a recaptar o protão do álcool (ácido muito fraco). Assim sendo, esta última etapa é considerada bastante importante na medida em que conduz o equilíbrio da reação de hidrólise no sentido da formação do carboxilato desejado, tornando a reação praticamente completa. Deste modo, finda a reação obtém-se o carboxilato que com o tratamento com uma solução aquosa acídica origina o produto de interesse, ácido carboxílico, facilmente separável do outro subproduto, o álcool.





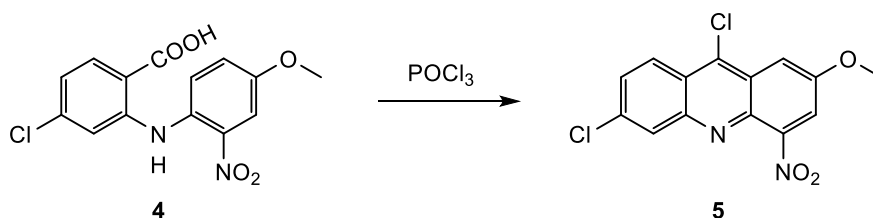
Esquema 12. Mecanismo geral de hidrólise básica utilizando  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .

Assim, no âmbito deste trabalho, ao composto **3** dissolvido em metanol ( $\text{MeOH}$ ), foi adicionado  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . Durante o período estimado da reação (2h,  $T = 80^\circ\text{C}$ ) foi-se observando a formação de um precipitado muito denso correspondente ao carboxilato de bário. Finda a reação e após acidificação com uma solução aquosa de  $\text{HCl}$  a 1M, o ácido carboxílico pretendido foi separado da mistura reacional por extrações líquido-líquido. Por CCF verificou-se, como esperado, a conversão completa do éster em ácido sem a formação de produtos secundários e, por essa razão, não foi necessário purificar.

Deste modo, o composto **4** foi obtido sob a forma de um sólido vermelho com excelentes rendimentos ( $\approx 100\%$ ) e caracterizado por ESI-IT MS e  $^1\text{H}$ -RMN (**Anexo 4**).

### 3.1.5. Síntese de 6,9-dicloro-2-metoxi-4-nitroacridina (**5**)

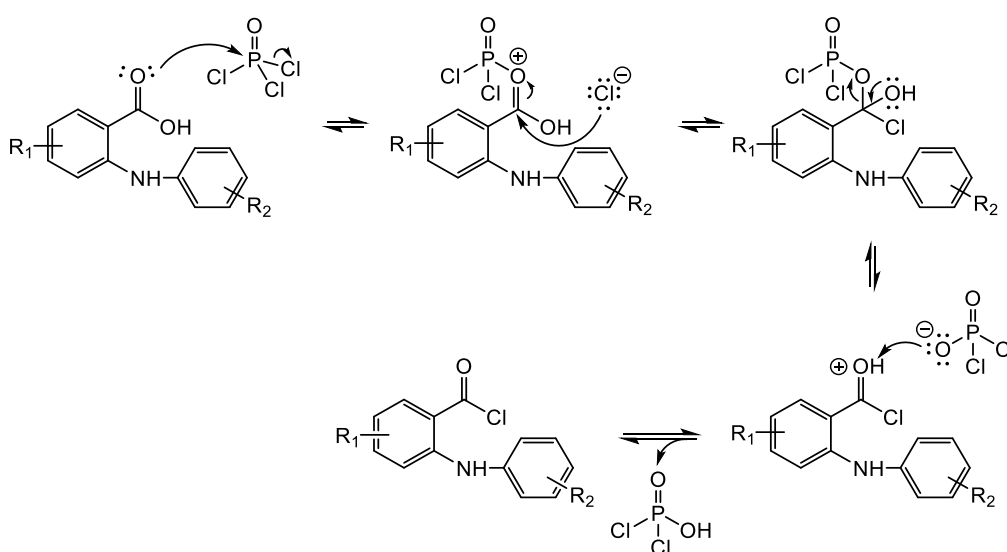
O último passo da **Parte I** da rota sintética elaborada diz respeito à ciclização do composto **4** utilizando cloreto de fosforilo ( $\text{POCl}_3$ ) para dar origem à correspondente acridina **5**. Esta reação foi realizada mediante a metodologia descrita por Marc O. Anderson e colaboradores,<sup>45</sup> de acordo com o seguinte esquema:



Esquema 13. Síntese do composto **5**.

Esta reação envolve três passos principais: (i) formação *in situ* do cloreto de ácido derivado do ácido carboxílico **4**, (ii) ciclização de Friedel-Crafts e (iii) formação da 6,9-dicloro-2-metoxi-4-nitroacridina.

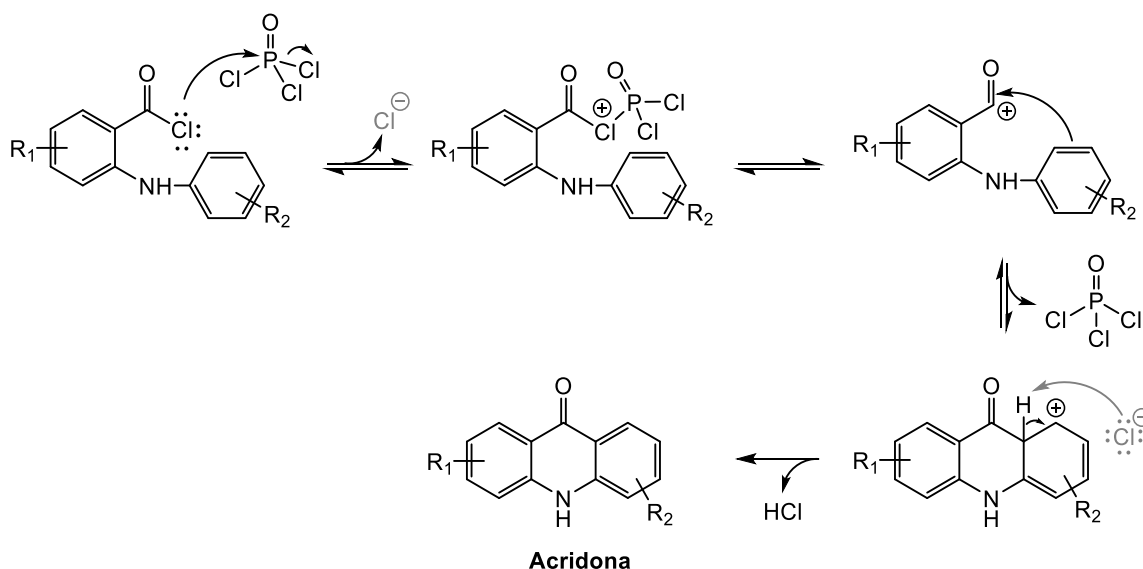
O primeiro passo referido, é a ativação do ácido carboxílico através da sua conversão num cloreto de ácido mais reativo. Assim, tal como descrito no **Esquema 14**, a reação inicia-se com o ataque nucleofílico do oxigénio carbonílico do ácido carboxílico ao fósforo do  $\text{POCl}_3$  com a conseqüente saída de anião cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). De seguida, via um mecanismo de adição-eliminação, o carbono do grupo carboxilo ativado sofre ataque nucleofílico por parte do anião cloreto (adição), dando origem a um intermediário tetraédrico que, por regeneração da ligação dupla  $\text{C}=\text{O}$ , elimina o bom grupo de saída  $[\text{PO}_2\text{Cl}_2]^-$  (eliminação). Este grupo, por sua vez, desprotona o oxigénio do grupo clorocarbonilo, originando deste modo o cloreto de ácido pretendido e ácido diclorofosfínico.



**Esquema 14.** Mecanismo geral da formação do cloreto de ácido.

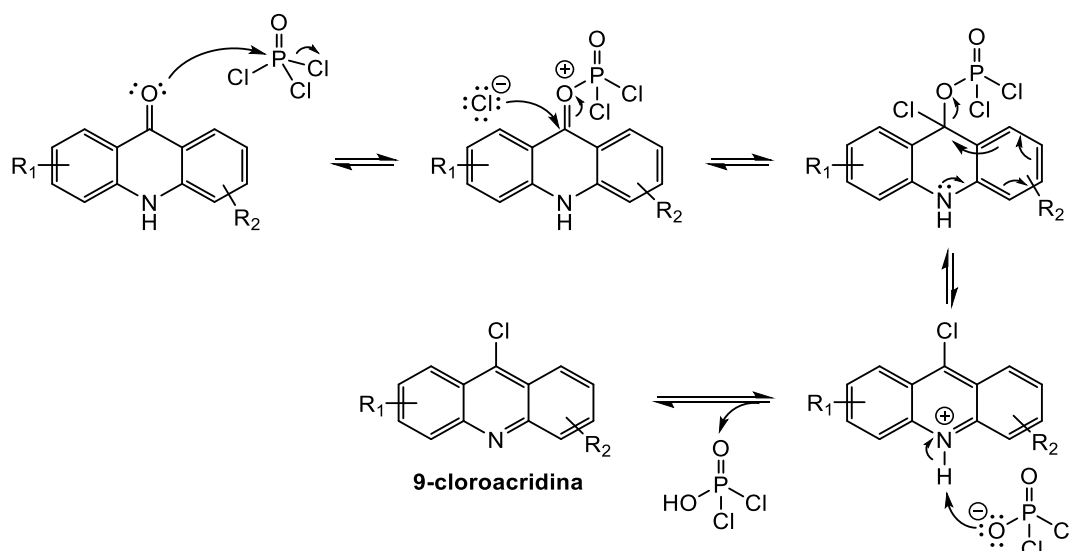
Após a formação *in situ* do cloreto de ácido, ocorre a ciclização de Friedel-Crafts, uma das substituições eletrofílicas aromáticas mais importantes. As reações de substituição eletrofílica aromática consistem na substituição de um átomo ligado a uma sistema aromático (geralmente hidrogénio) por um eletrófilo na presença de um ácido de Lewis que atua como catalisador. Geralmente, são usados o tricloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) ou tricloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ), mas praticamente qualquer ácido de Lewis forte pode ser utilizado. Neste caso, uma vez que está presente no meio reacional em largo excesso o  $\text{POCl}_3$ , a reação pode ocorrer utilizando este reagente, tornando assim o procedimento mais simples. Assim, no **Esquema 15** está descrito o mecanismo pelo qual ocorre esta reação. De uma forma geral, o cloro do grupo clorocarbonilo realiza o ataque nucleofílico ao  $\text{POCl}_3$ , dando origem a um intermediário com um bom grupo de saída. Após a saída desse grupo, forma-se um carbocátion que conseqüentemente

sofre ataque pelo par de elétrons  $\pi$  do anel aromático, formando-se assim o terceiro anel. Após desprotonação pelo  $\text{Cl}^-$ , recupera-se a aromaticidade do anel que efetuou o ataque ao catião acílio originando, deste modo, uma cetona aromática, designada por acridona, e  $\text{HCl}$ .



Esquema 15. Mecanismo geral da ciclização de Friedel-Crafts.

Por fim, devido ao excesso de  $\text{POCl}_3$  presente no meio reacional, a acridona sofre cloração, isto é, substituição de um grupo  $\text{OH}$  por um  $\text{Cl}$ , dando assim origem à 9-cloroacridina, um heterocíclico ativado que serve de intermediário para outras 9-acridinas substituídas. O oxigénio do grupo carbonilo realiza um ataque nucleofílico ao  $\text{POCl}_3$ , originando um intermediário com um bom grupo de saída que, após o ataque do  $\text{Cl}^-$ , é eliminado ao mesmo tempo que se forma o núcleo aromático da acridina (protonada no átomo de azoto). Por fim, após desprotonação do átomo de azoto por parte do anião diclorofosfato, origina-se o produto pretendido, 9-cloroacridina e ácido diclorofosfínico (**Esquema 16**).

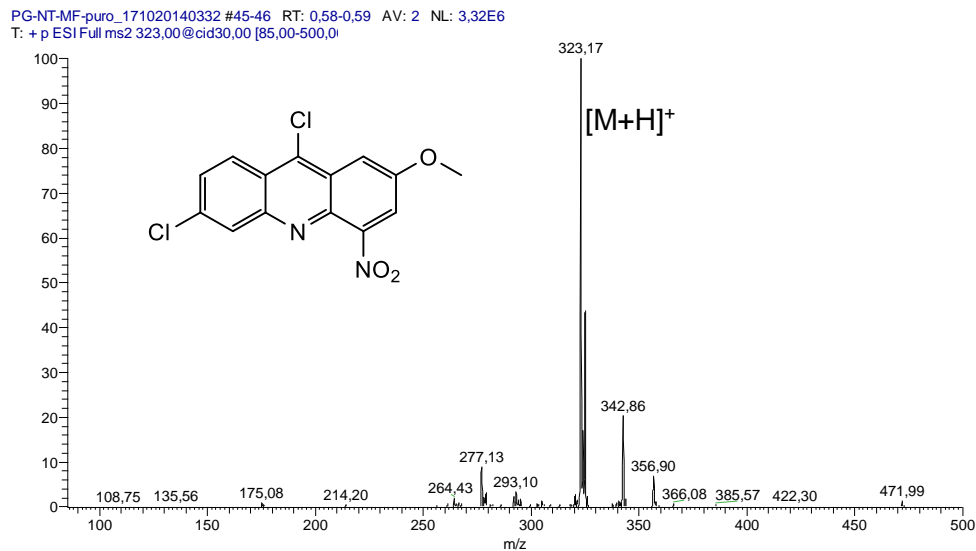


Esquema 16. Mecanismo geral da formação da 9-cloroacridina.

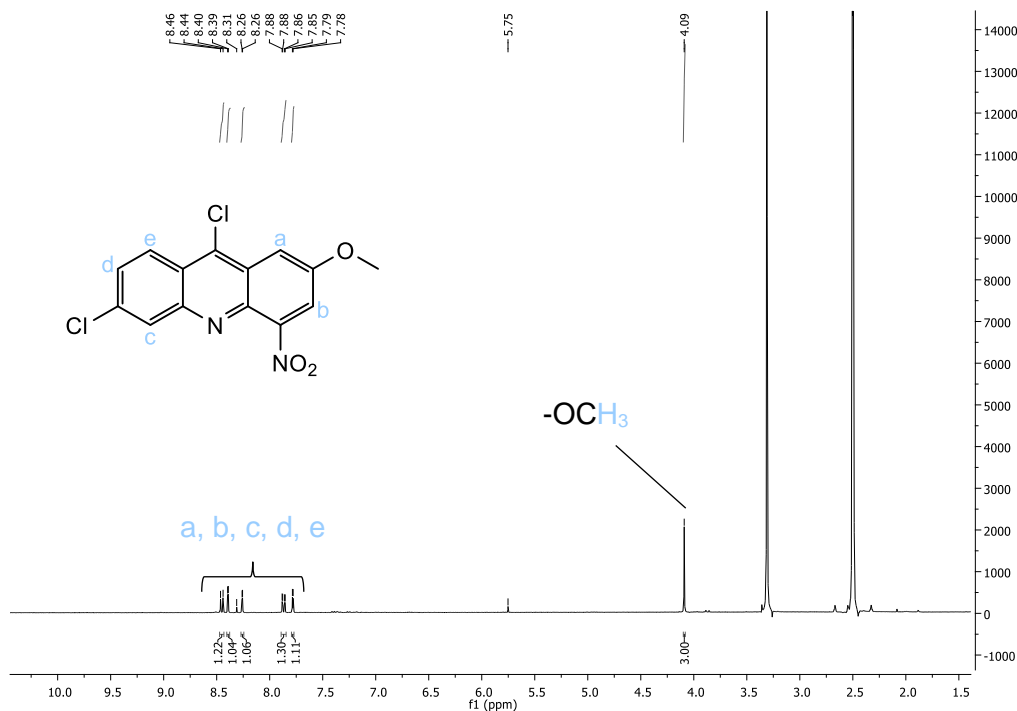
Assim, no presente trabalho, o composto **4** foi colocado a reagir com POCl<sub>3</sub> durante 2 horas e 30 minutos a 120 °C. Finda a reação, à mistura reacional foram adicionados dois cocktails contendo gelo, DCM e NH<sub>3</sub> a 25% que têm como principais objetivos (i) neutralizar o POCl<sub>3</sub> existente no meio reacional, uma vez que este em contacto com a água dá origem a HCl gasoso e ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), e (ii) basificar o meio através adição de NH<sub>3</sub> a 25 %, uma vez que durante as reações e aquando da adição de água se forma HCl, ácido diclorofosfínico e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. No final, após tratamento por extracções líquido-líquido, o resíduo obtido foi incorporado na SiO<sub>2</sub>, por não ser suficientemente solúvel no eluente escolhido para a purificação, e posteriormente purificado em coluna de gel de SiO<sub>2</sub>.

Desta forma, o composto **5** obtido sob a forma de sólido amarelo foi sintetizado com bons rendimentos (78,6 – 79,4%) e a sua análise estrutural foi realizada por ESI-IT MS e <sup>1</sup>H-RMN, conforme apresentado de seguida.

No espetro de ESI-IT MS em modo positivo apresentado na **Figura 20**, é visível apenas o pico-base a m/z = 323,17 correspondente ao ião quasi-molecular ([M+H]<sup>+</sup>) do produto esperado, cuja massa exata (M<sub>e</sub>) é 321,99 unidades de massa atómica (u.m.a.).



Através do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentado na **Figura 21** (com ampliação da zona aromática na **Figura 22**) é possível confirmar a presença (i) dos prótons característicos do núcleo da acridina (Ha, Hb, Hc, Hd e He) e (ii) dos prótons correspondentes ao grupo metoxilo. As atribuições das multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.



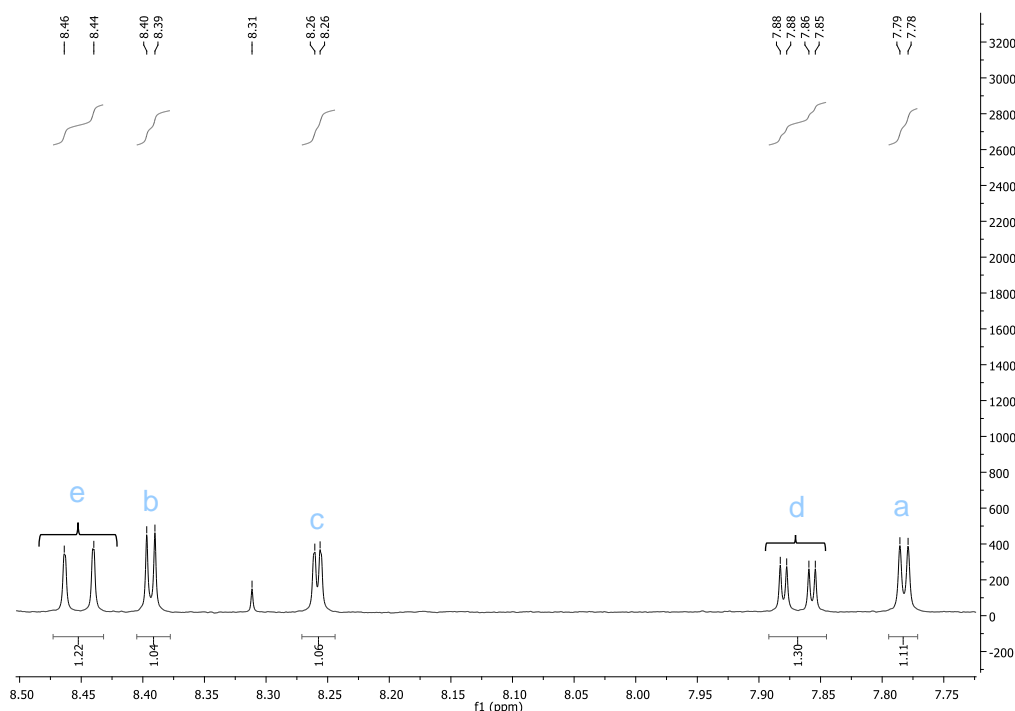


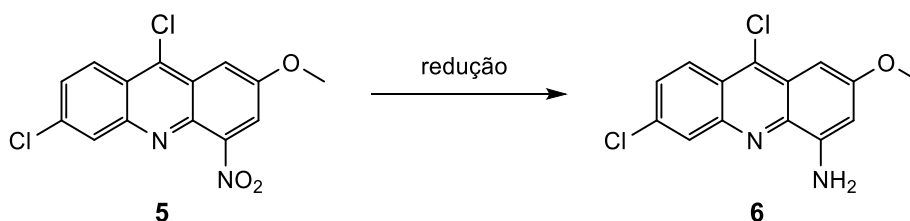
Figura 22. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) do composto **5** no intervalo 7.75 a 8.50 ppm.

### 3.2. Parte II – Rota A

Sintetizado o núcleo da acridina substituída, a **Parte II** da rota sintética diz respeito à introdução das cadeias laterais aminoalquilamínicas nas posições 4 e 9 para dar origem aos derivados **11** desejados. A **Parte II** foi dividida em duas rotas: **Rota A** e **Rota B**, sendo que estas diferem na ordem de introdução das cadeias referidas anteriormente. Resultados anteriores obtidos pelo grupo de investigação para análogos de 9-aminoacridinas demonstraram que a introdução de cadeias laterais na posição 9 do anel da acridina ocorre com baixos rendimentos (13-32%).<sup>50</sup> Em contrapartida, outros resultados descritos na literatura evidenciam que a introdução de cadeias laterais na posição 4 em compostos semelhantes ocorre com melhores rendimentos (67-81%).<sup>76</sup> Assim, com base nestes resultados, a primeira rota sintética proposta foi a Rota A que consiste na introdução, em primeiro lugar, da cadeia aminoalquilamínica na posição 4. De seguida, serão descritas pormenorizadamente a maior parte das tentativas de síntese realizadas para cada composto.

### 3.2.1. Síntese de 4-amino-6,9-dicloro-2-metoxiacridina (6)

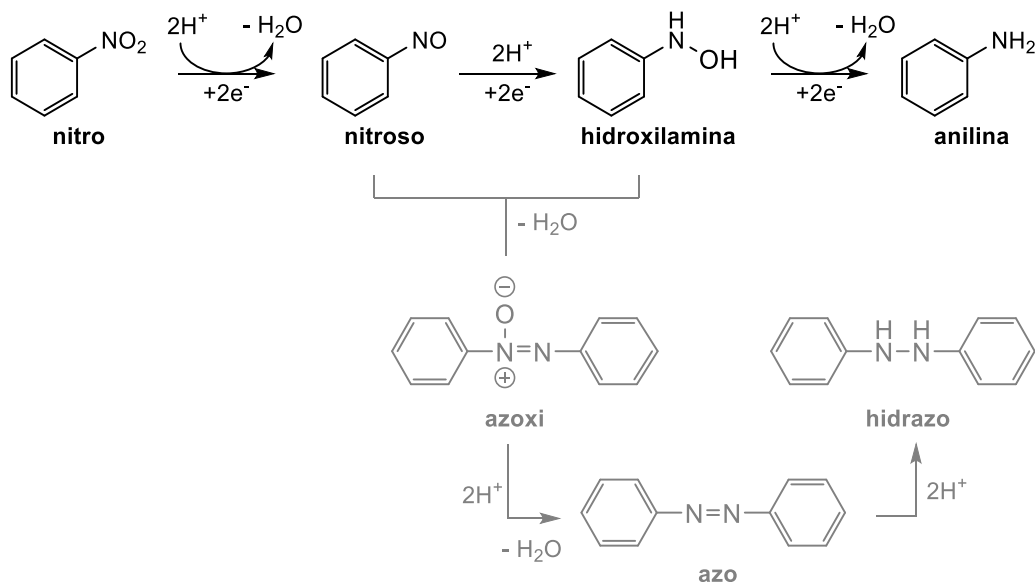
A síntese do composto **6** corresponde à redução do grupo nitroílo ao grupo amino correspondente, tal como exemplificado no esquema seguinte:



Esquema 17. Síntese do composto **6**.

Os compostos aromáticos contendo grupos nitroílo como substituintes podem ser reduzidos a aminas primárias sob uma variedade de condições experimentais. O mecanismo de redução mais aceite foi proposto por Haber e colaboradores,<sup>77</sup> e refere que a redução deste grupo funcional passa por vários intermediários sequenciais até à obtenção da amina aromática:

#### Rota direta



#### Rota de condensação

Esquema 18. Esquema geral de redução de compostos nitro-aromáticos proposto por Haber e colaboradores (A rota direta está assinalada a preto, enquanto que a rota de condensação está assinalada a cinzento).<sup>77</sup>

Estudos cinéticos<sup>77</sup> comprovaram que, normalmente, apenas os produtos nitroso, hidroxilamina e anilina são detetados em solução (**Esquema 18** - rota direta). O perfil de reação indica uma rápida redução do grupo nitroílo ao intermediário nitroso que por

sua vez é reduzido a hidroxilamina. A redução da hidroxilamina em anilina é o passo determinante da velocidade. A condensação para produtos azo e azóxi (**Esquema 18** – rota de condensação) não ocorre normalmente, exceto quando uma base forte está presente, via desidratação entre nitroso e hidroxilamina.<sup>78</sup> No que diz respeito à escolha do agente redutor, esta tem como base o reagente de partida (composto nitro), nomeadamente os seus substituintes e a sua solubilidade no meio reacional. De entre vários métodos de redução existentes<sup>78-81</sup> foram testados neste trabalho (i) a hidrogenação catalítica mediada por Pd-C, (ii) a hidrogenação catalítica por transferência de hidrogénio e (iii) a redução em fase homogénea. De seguida, cada um dos métodos abordados será descrito mais detalhadamente.

### 3.2.1.1. Hidrogenação catalítica

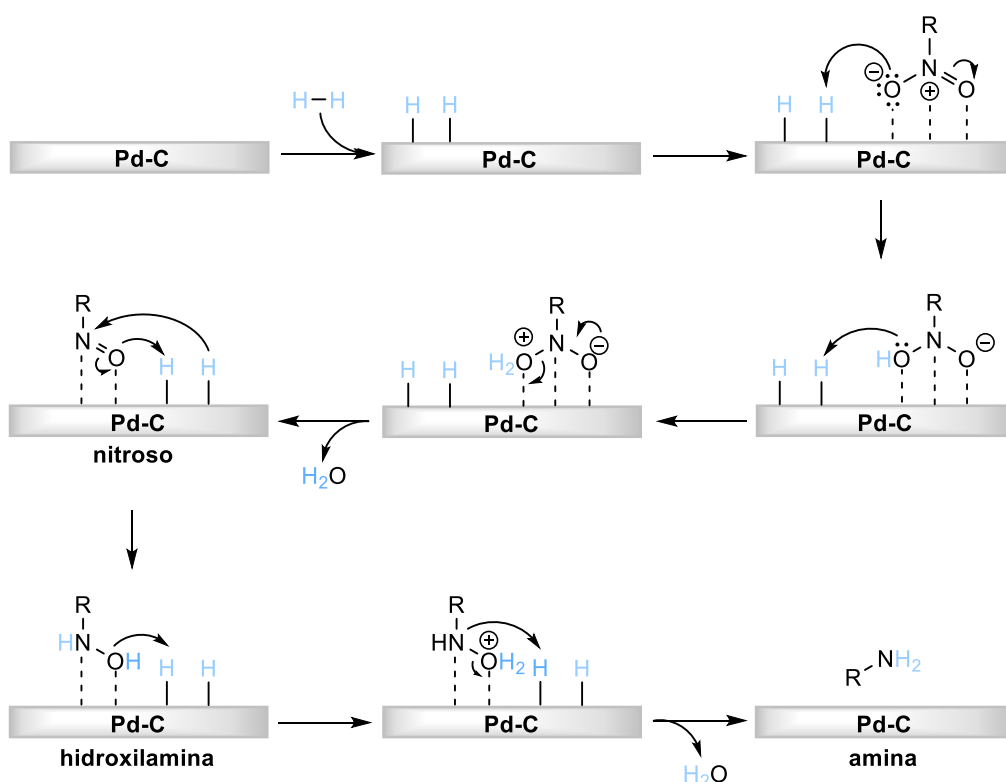
A hidrogenação é uma reação de redução que resulta na adição de hidrogénio molecular ( $H_2$ ) a uma molécula insaturada.<sup>82-83</sup> Contudo, salvo raras exceções, o  $H_2$  não é reativo com compostos orgânicos uma vez que a barreira energética para a sua dissociação é muito elevada. Para ultrapassar esta situação, recorre-se ao uso de catalisadores metálicos por estes serem capazes de baixar a energia de dissociação molecular do  $H_2$  fazendo com que a reação ocorra. Assim, a hidrogenação catalítica é uma hidrogenação na qual é usado hidrogénio gasoso a alta pressão na presença de um catalisador metálico.<sup>82-83</sup> Este processo é, em muitos casos, o primeiro método de escolha para a redução de compostos nitro-aromáticos nas correspondentes aminas aromáticas.<sup>79</sup>

O catalisador tem como principal função a ativação do  $H_2$  para gerar hidrogénio ligado aos átomos metálicos, presentes na superfície do catalisador e adicionalmente, tem a capacidade de acelerar as reações e de influenciar a seletividade das mesmas. Os catalisadores utilizados podem ser homogéneos e heterogéneos, sendo estes últimos os mais comuns no que respeita a reações de hidrogenação. Os primeiros são solúveis no solvente usado, enquanto que os segundos são partículas sólidas que estão suspensas no solvente em que está dissolvido o composto insaturado. Os catalisadores heterogéneos são preferidos em detrimento dos homogéneos por estes serem de mais baixo custo e facilmente eliminados do meio reacional através de filtração, obtendo-se os compostos pretendidos sem contaminações por parte destes metais.<sup>82</sup>

Por norma, os catalisadores heterogéneos utilizados consistem em partículas de metal finamente dispersas num suporte sólido, como carbono, alumina ou sílica. De entre uma vasta gama de metais frequentemente utilizados na hidrogenação catalítica heterogénea (platina, ródio, níquel, cobalto, ruténio),<sup>84</sup> o paládio (Pd) é geralmente o catalisador de eleição.<sup>85</sup>

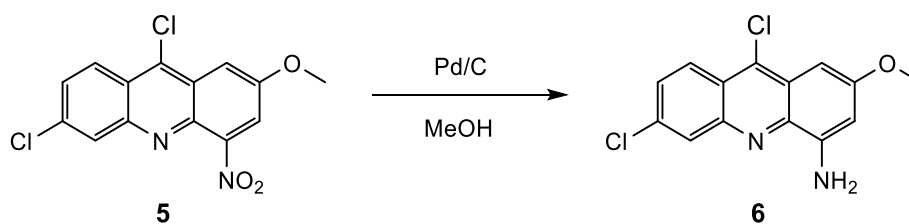


O mecanismo pelo qual ocorre a redução utilizando Pd-C (paládio em carbono ativado) como catalisador está apresentado no **Esquema 19**. Primeiramente ocorre a clivagem do hidrogénio molecular presente e a ligação dos átomos de hidrogénio resultantes aos átomos metálicos presentes na superfície do catalisador. De seguida, ocorre a adsorção da molécula insaturada (neste caso o composto nitro-aromático) à superfície do catalisador. Posto isto, ocorre a primeira transferência de hidrogénio que, seguida de protonação e conseqüente processo de desidratação, dá origem ao primeiro intermediário, o nitroso. De seguida, nova transferência de hidrogénio ocorre originando o segundo intermediário, a hidroxilamina que, por sua vez é protonada e conseqüentemente desidratada, obtendo-se assim a amina aromática livre. Por fim, ocorre a dessorção desta última da superfície do catalisador.



**Esquema 19.** Mecanismo geral da hidrogenação catalítica do grupo nitroilo utilizando Pd-C como catalisador.

Posto isto, no âmbito deste trabalho, a hidrogenação catalítica com Pd-C foi o 1º método testado para a redução do grupo nitroilo da posição 4 do composto **5** no correspondente grupo amino primário. A reação decorreu nas condições apresentadas no esquema seguinte:



Esquema 20. Síntese do composto 6 via hidrogenação catalítica.

Ao composto **5** parcialmente dissolvido em MeOH foi adicionado Pd-C e a mistura reacional foi colocada no hidrogenador a uma pressão de  $\approx 50$  psi durante 5h. Findo este tempo, e após a remoção do Pd-C por filtração em celite e do tratamento por extrações líquido-líquido, verificou-se por CCF que a reação tinha dado origem a uma mistura de vários produtos. Posteriormente, observou-se por ESI-IT MS (**Figura 23**) que não se obteve o composto pretendido e que um dos produtos da reação correspondia a um análogo do composto **6** sem o cloro na posição 9 ( $m/z = 259,39$ ). Ainda assim, efetuou-se uma tentativa de isolamento deste análogo por cromatografia em coluna de gel de sílica, mas tal não foi possível devido à diversidade de produtos formados.

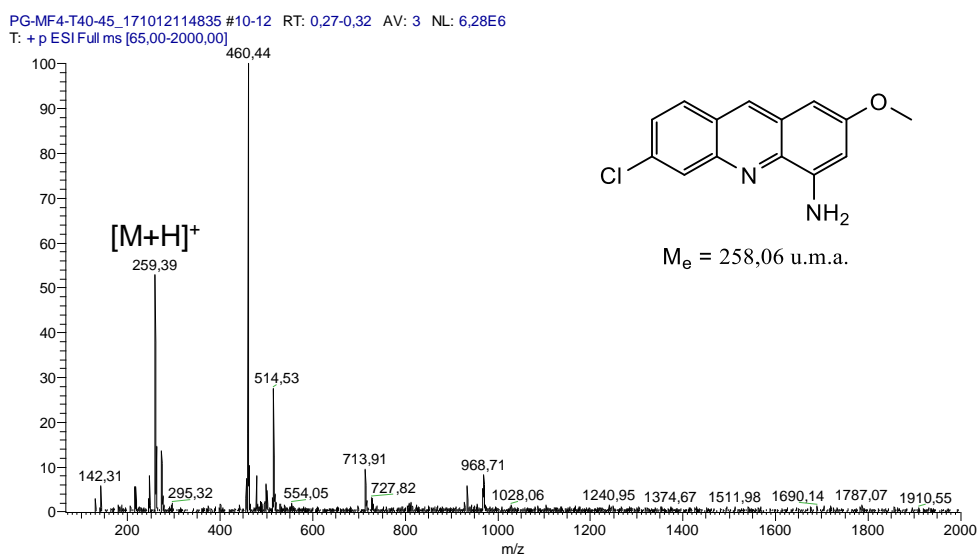


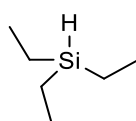
Figura 23. Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do análogo do composto 6 sem Cl na posição 9.

### 3.2.1.2. Hidrogenação por transferência

Perante os resultados apresentados anteriormente, foi necessário a escolha de um outro método de redução capaz de reduzir o grupo nitroílo na presença de outros grupos redutíveis, como os halogéneos. Assim, optou-se por usar uma fonte alternativa de hidrogénio em detrimento do hidrogénio gasoso sob pressão. Estes métodos são designados de *hidrogenações por transferência* e apresentam vantagens como a maior

seletividade na redução, dependendo do dador de hidrogénio utilizado e, em alguns casos, uma maior velocidade de reação.<sup>86</sup> O mecanismo pelo qual ocorre a reação é igual ao mecanismo da hidrogenação catalítica com Pd-C referido anteriormente (**Esquema 19** em **3.2.1.1.**), simplesmente a fonte de hidrogénio é diferente.

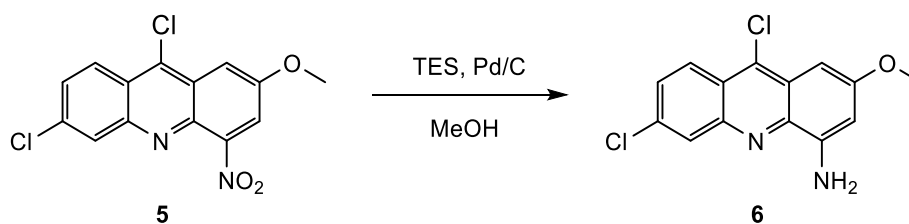
Em termos de eletronegatividade, o hidrogénio ocupa uma posição central na tabela periódica, apresentando um valor de 2,1 de acordo com a definição de eletronegatividade de Pauling.<sup>87</sup> Por essa razão, em reações envolvendo a sua transferência, este pode aparecer em forma de protão ( $H^+$ ), átomo (H) ou hidreto ( $H^-$ ), dependendo dos agentes redutores utilizados. De entre os vários agentes redutores disponíveis,<sup>79</sup> os organosilanos, compostos constituídos por um ou mais átomos de hidrogénio ligados a um átomo de silício, têm vindo a ganhar popularidade devido à sua disponibilidade económica, às suas propriedades físicas adequadas e aos produtos secundários de baixa toxicidade e fácil eliminação que são gerados durante o processo de redução.<sup>88</sup> Devido à proximidade das eletronegatividades do silício e do hidrogénio a ligação Si-H é pouco polarizada. Assim, aquando da quebra da mesma o hidrogénio, sai sob a forma de  $H^-$ , uma vez que é mais eletronegativo (Si=1,8 vs H=2,1 na escala de Pauling<sup>4</sup>). Desta forma, este atua como um agente redutor mais suave comparativamente com os hidretos à base de alumínio, boro e outros metais. Como são agentes redutores suaves, na maioria dos casos as reduções são realizadas na presença de um catalisador ácido, como o ácido trifluoroacético, limitando a aplicação do método a substratos sensíveis a ácidos.<sup>88-89</sup> Com o objetivo de contornar esta situação, Pijus K. Mandal e colaboradores reportaram um método com trietilsilano (TES – **Figura 24**) em condições neutras, utilizando Pd-C como catalisador e MeOH como solvente prótico.<sup>90</sup>



**Trietilsilano**

**Figura 24.** Estrutura química do trietilsilano.

Assim, neste trabalho, a reação de hidrogenação catalítica por transferência de hidrogénio da acridina **5** para obtenção da correspondente acridina reduzida **6**, pode ser descrita pelo seguinte esquema:



**Esquema 21.** Síntese do composto **6** via hidrogenação catalítica por transferência de hidrogénio.

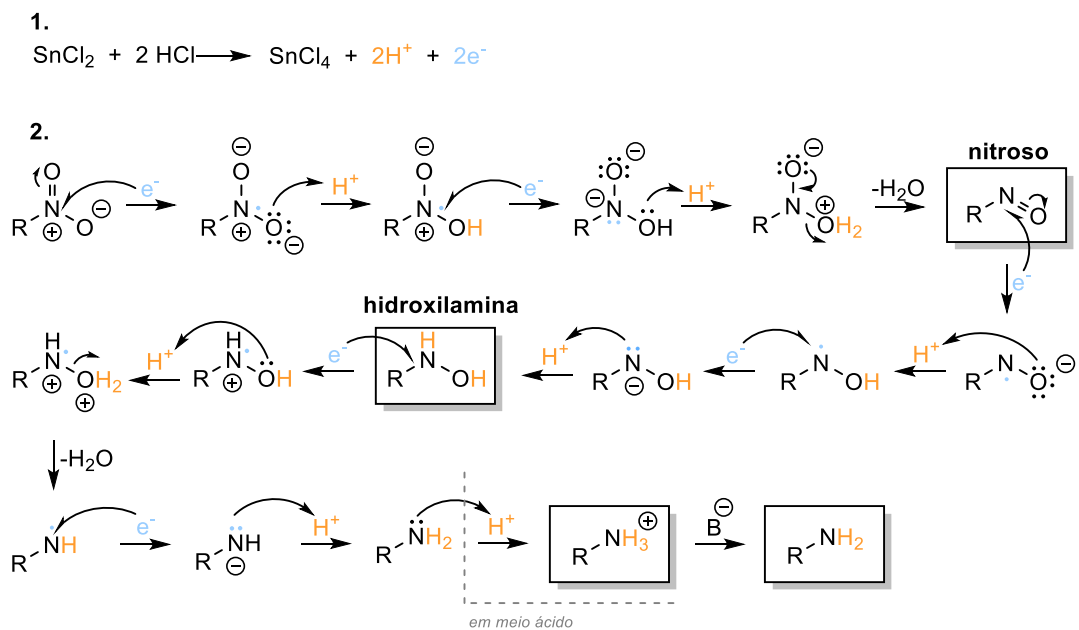
Ao composto **5** parcialmente dissolvido em MeOH sob atmosfera inerte, foi adicionado Pd-C e TES. Finda a reação, e após a remoção do Pd-C por filtração em celite e tratamento por extrações líquido-líquido, confirmou-se por ESI-IT MS a formação do composto **6**, mas em contrapartida, por CCF, verificou-se novamente a formação de bastantes produtos secundários que, após purificação por cromatografia em coluna de gel de SiO<sub>2</sub>, não foram por completo separados do produto final. Este problema, em junção com a falta de solubilidade do composto de partida em MeOH, foram as principais razões que levaram a que este método de redução não fosse levado avante para o composto em questão.

### 3.2.1.3. Redução em fase homogénea

Perante os resultados anteriores, conclui-se que a alternativa seguinte de redução não pode passar por hidrogenações catalíticas por estas não serem muito seletivas e induzirem à formação de muitos produtos secundários. Assim sendo, de entre várias hipóteses,<sup>79-80</sup> as reduções utilizando metais, ou os seus sais, foram o método alternativo escolhido. Neste contexto, os metais num estado de oxidação baixo (ex: Al, Fe, Zn, In, Sn e Sm) atuam como doadores de eletrões para formar uma espécie radical protonada, e o solvente fornece os protões necessários.<sup>79</sup> No caso particular deste trabalho, a combinação escolhida foi o SnCl<sub>2</sub>/HCl por ser uma combinação frequentemente utilizada para a redução de compostos aromáticos contendo halogéneos.<sup>91</sup>

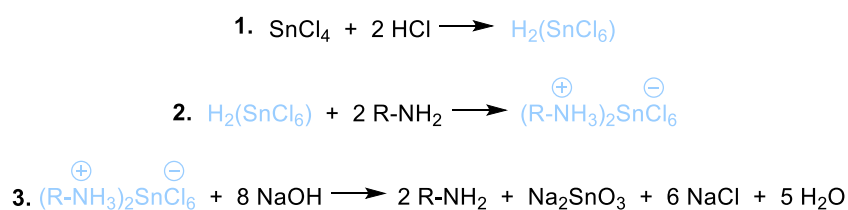
Tal como nas outras reduções, o mecanismo pelo qual ocorre a reação é bastante complexo envolvendo sempre a formação dos intermediários nitroso e hidroxilamina. Neste caso, ocorre a transferência de eletrões seguida de uma transferência de protões, em que o SnCl<sub>2</sub> atua como agente redutor (e consequente fonte de e<sup>-</sup>) e o HCl como fonte de protões (H<sup>+</sup>).<sup>80</sup> Tal como esquematizado no **Esquema 22**, a primeira etapa diz respeito a uma reação de oxidação-redução em que o Sn(II) é oxidado a Sn(IV) na presença de HCl, formando deste modo SnCl<sub>4</sub>, iões H<sup>+</sup> e e<sup>-</sup> (**Esquema 22 – 1.**). Na segunda etapa (**Esquema 22 – 2.**) os e<sup>-</sup> provenientes dessa oxidação bem como os iões

$H^+$  são utilizados para reduzir o composto nitro-aromático à amina aromática correspondente. A reação envolve sempre a transferência sequencial de  $1e^-$  seguida da adição de  $1H^+$  que, após repetição leva à desidratação e conseqüente formação do primeiro intermediário (nitroso). Seguidamente o ciclo repete-se duas vezes, dando origem primeiro à hidroxilamina e depois à amina aromática pretendida. Por norma, como as reações são realizadas em meio ácido, após se obter a amina esta sofre protonação sendo depois necessário a basificação do meio para a obter novamente sob a forma de amina livre.



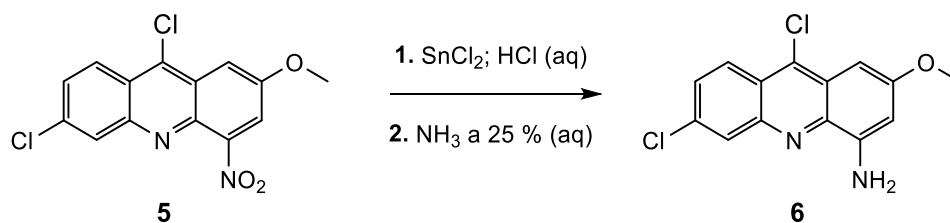
**Esquema 22.** Mecanismo de redução de compostos nitro-aromáticos utilizando  $SnCl_2$  em  $HCl$  como agente redutor.

Paralelamente à reação de redução descrita, o  $SnCl_4$  obtido aquando da oxidação do  $Sn(II)$  a  $Sn(IV)$  reage com o  $HCl$  presente em excesso no meio reacional dando origem ao ácido cloroestânico (**Esquema 23 - 1.**) que, no final da redução, forma um complexo com a amina aromática obtida (**Esquema 23 - 2.**). Este complexo é posteriormente decomposto por hidrólise básica com a adição de uma base, por exemplo  $NaOH$ , dando origem à amina livre pretendida (**Esquema 23 - 3.**).



**Esquema 23.** Reações paralelas à reação de redução.

Assim, no âmbito deste trabalho, a reação de redução realizada mediante a metodologia descrita por John P. Scovill e colaboradores,<sup>58</sup> está representada no seguinte esquema:



Esquema 24. Síntese do composto **6** via redução com SnCl<sub>2</sub>/HCl.

Ao composto **5** adicionou-se, em banho de gelo, HCl concentrado seguido de SnCl<sub>2</sub> deixando-se a mistura reacional a reagir durante 30 min (T = 40 °C). Posteriormente, e após a adição de água desionizada, basificou-se a mistura reacional com uma solução concentrada de NH<sub>3</sub> a 25 % para decompor o complexo formado entre a amina aromática e o ácido cloroestânico. Aquando da basificação verificou-se uma alteração de cor da mistura reacional de vermelha para laranja e a consequente formação de um precipitado com essa cor correspondendo ao composto **6**, o qual após tratamento por extrações líquido-líquido foi posteriormente purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO<sub>2</sub>. É de realçar que o composto demonstrou degradar-se com alguma facilidade pelo que, após o passo de purificação, era de imediato utilizado na reação seguinte.

Deste modo, o derivado da acridina **6** (sólido cor-de-laranja) foi obtido com rendimentos superiores (69,4 – 76,8 %) comparativamente aos descritos na literatura para compostos análogos.<sup>58</sup> A análise estrutural do composto **6** foi realizada por ESI-IT MS e <sup>1</sup>H-RMN. No espectro de ESI-IT MS em modo positivo apresentado na **Figura 25**, é visível o pico-base a m/z = 293,33 correspondente ao ião quasi-molecular ([M+H]<sup>+</sup>) do produto esperado, cuja M<sub>e</sub> é 292,02 u.m.a..

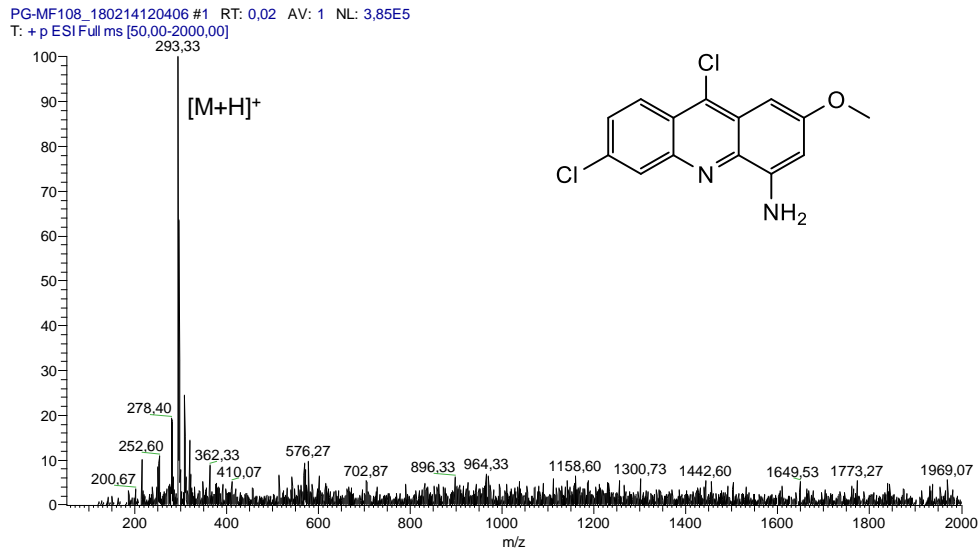


Figura 25. Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto 6.

Através do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentado na **Figura 26** (com ampliação da zona aromática na **Figura 27**) é possível confirmar a presença (i) dos prótons característicos do núcleo da acridina (Ha, Hb, Hc, Hd e He), (ii) dos prótons da amina aromática, comprovando assim a eficiência da redução e, por último (iii) dos prótons correspondentes ao grupo metoxilo. As atribuições das multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.

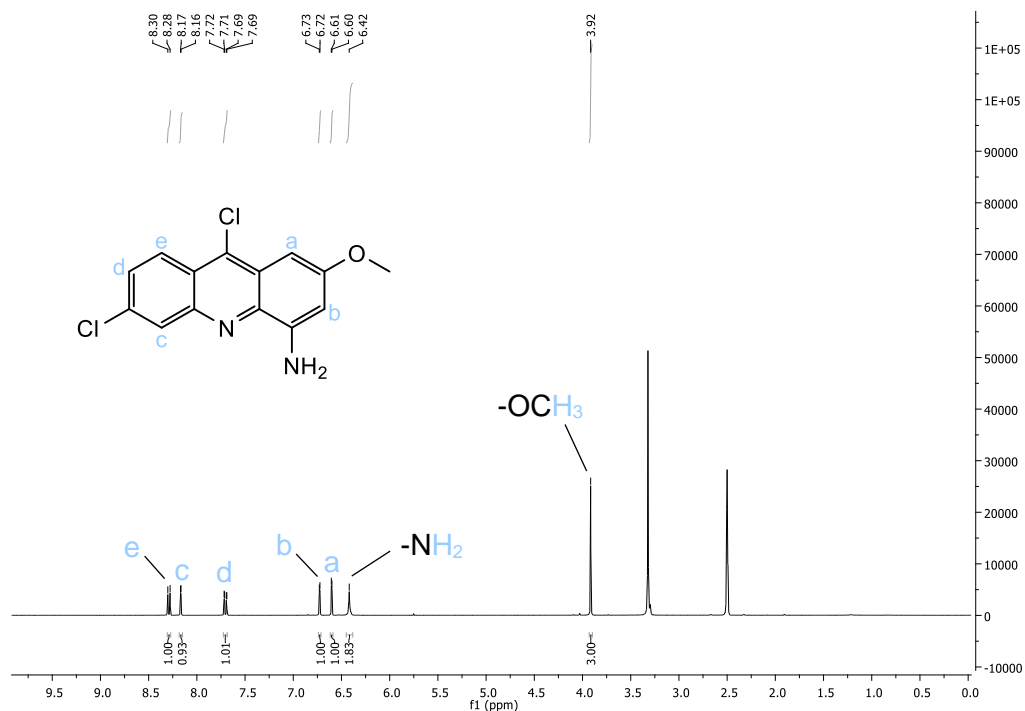


Figura 26. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 6.

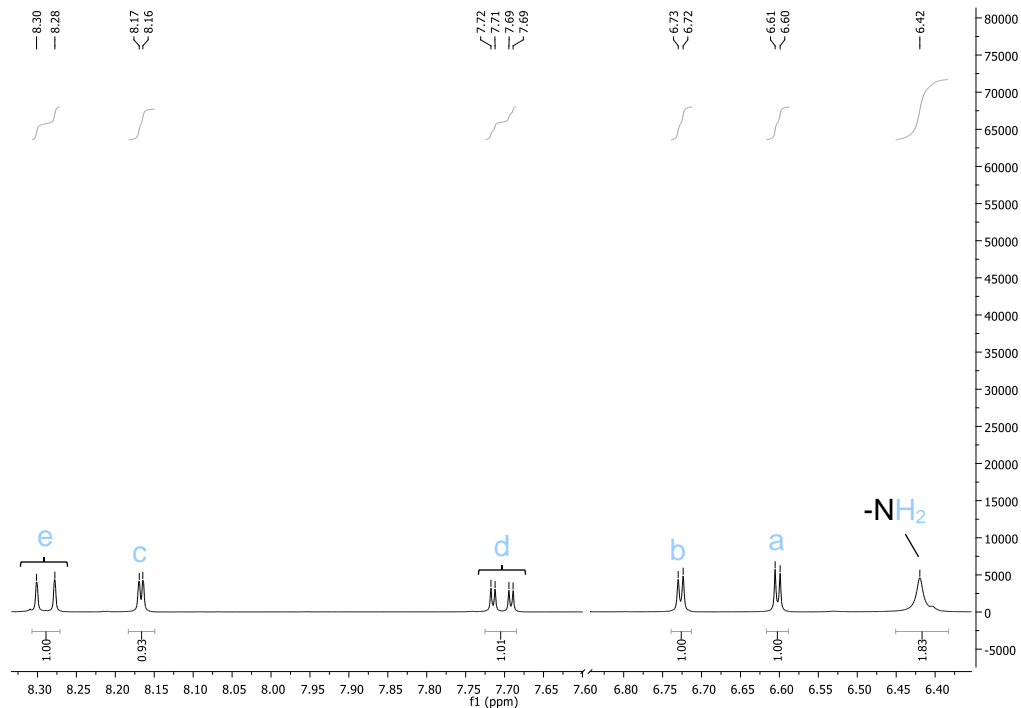
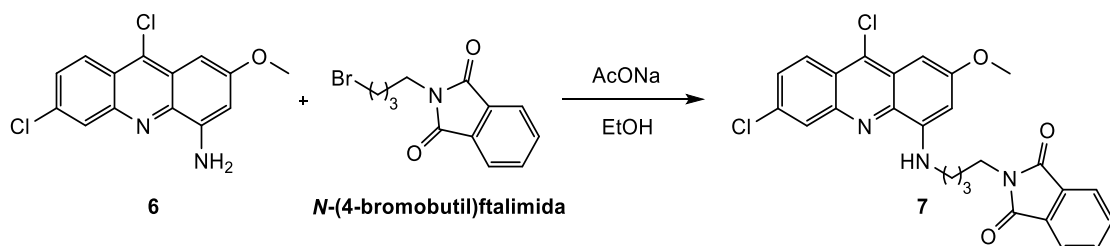


Figura 27. Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO) do composto **6** no intervalo 6.35 a 8.30 ppm.

### 3.2.2. Síntese de 6,9-dicloro-4-[(4-ftalimidobutil)amino]-2-metoxiacridina (**7**)

O passo seguinte na rota sintética A, passo **vii**), diz respeito à *N*-alquilação da amina aromática com um halogeneto de alquilo por ser o processo mais comum de síntese de aminas com um maior grau de substituição. Inicialmente, usaram-se condições reacionais (amina, agente alquilante, ACN ou  $\text{Et}_3\text{N}$  como solvente, e  $T = 80\text{ }^\circ\text{C}$ ) já descritas na literatura para composto semelhante.<sup>58</sup> Uma vez que não se observou a formação do composto **7**, posteriormente testou-se (com sucesso) a metodologia descrita por John P. Scovill e colaboradores para compostos análogos,<sup>58</sup> conforme descrito no seguinte esquema:

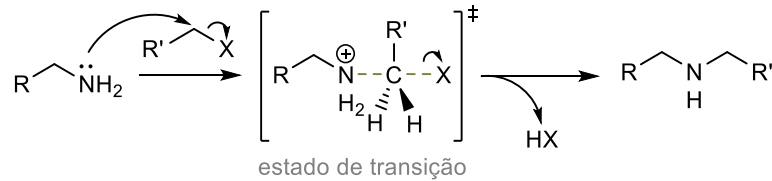


Esquema 25. Síntese do composto **7**.

As reações de *N*-alquilação ocorrem através de um mecanismo  $\text{S}_{\text{N}}2$ , como apresentado no **Esquema 26**. Inicialmente ocorre o ataque nucleofílico ao carbono pelo lado oposto ao halogéneo ao mesmo tempo que ocorre a quebra da ligação carbono-



halogéneo, através de um estado de transição em que o carbono está pentacoordenado. Caso o halogeneto de alquilo apresente quiralidade no carbono que sofre substituição, ocorre a inversão obrigatória da configuração desse carbono.



Esquema 26. Mecanismo geral da *N*-alkilação via  $S_N2$ .

Deste modo, no presente trabalho, o composto **6** dissolvido em EtOH foi colocado a reagir com ***N*-(4-bromobutil)ftalimida**, na presença de acetato de sódio (AcONa), a 80 °C. A reação seguida por CCF foi parada apenas passados 5 dias. Após evaporação do EtOH, dissolução do composto em DCM e posterior tratamento por extrações líquido-líquido, o composto foi purificado recorrendo à cromatografia de adsorção em coluna de gel de  $SiO_2$ . O composto **7** foi assim obtido sob a forma de um sólido cor-de-laranja com um rendimento baixo (9,32 %), e a sua estrutura caracterizada por ESI-IT MS e  $^1H$ -RMN.

No espectro de ESI-IT MS em modo positivo (**Figura 28**), é visível o pico-base a  $m/z = 494,47$  correspondente ao ião quasi-molecular ( $[M+H]^+$ ) do produto esperado, cuja  $M_e$  é 493,10 u.m.a..

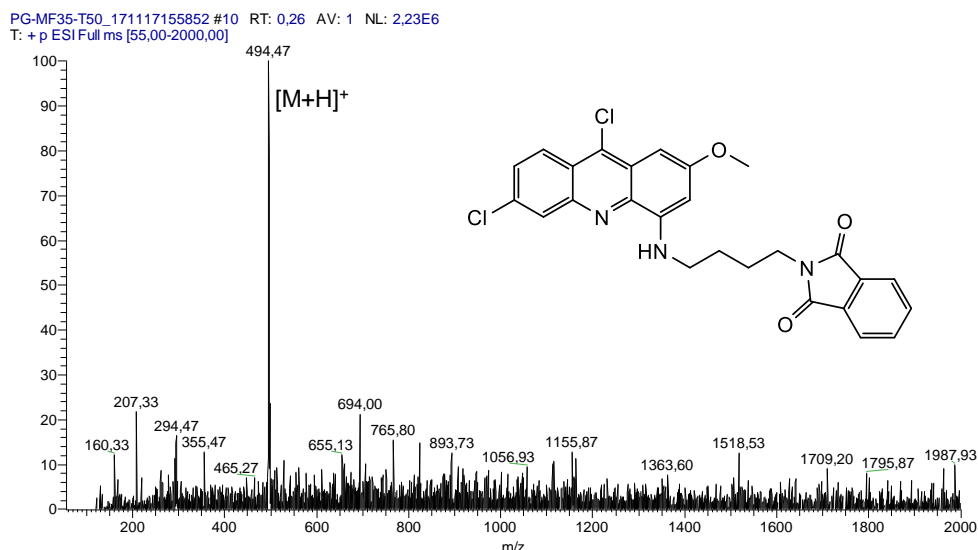


Figura 28. Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **7**.

Através do espectro de  $^1H$ -RMN apresentado na **Figura 29** (com ampliação da zona aromática e alifática na **Figura 30** e **Figura 31**, respetivamente) é possível confirmar a

presença (i) dos prótons característicos do núcleo da acridina (Ha, Hb, Hc, Hd e He), (ii) dos prótons do anel aromático da ftalimida (Hj, Hk,, Hl e Hm) bem como (iii) dos prótons da cadeia alifática (Hf, Hg, Hh e Hi), confirmando assim a introdução da cadeia pretendida. Adicionalmente, observa-se também a presença (iv) do próton da amina aromática na posição 4 do núcleo da acridina e (v) dos prótons do grupo metoxilo.

As atribuições das multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.

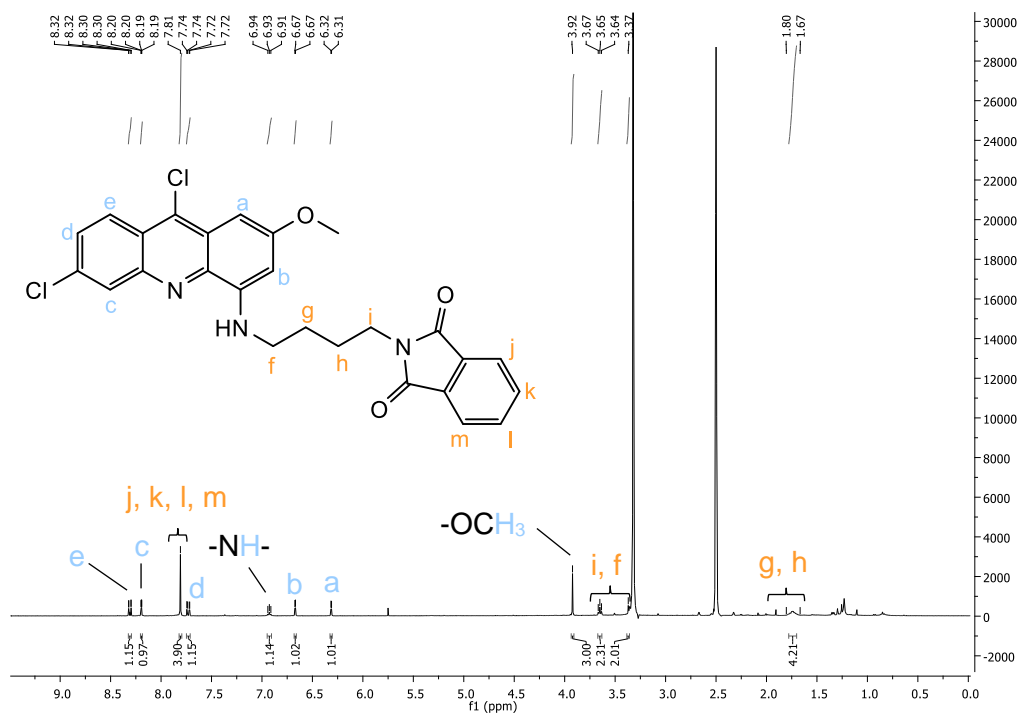


Figura 29. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto 7.

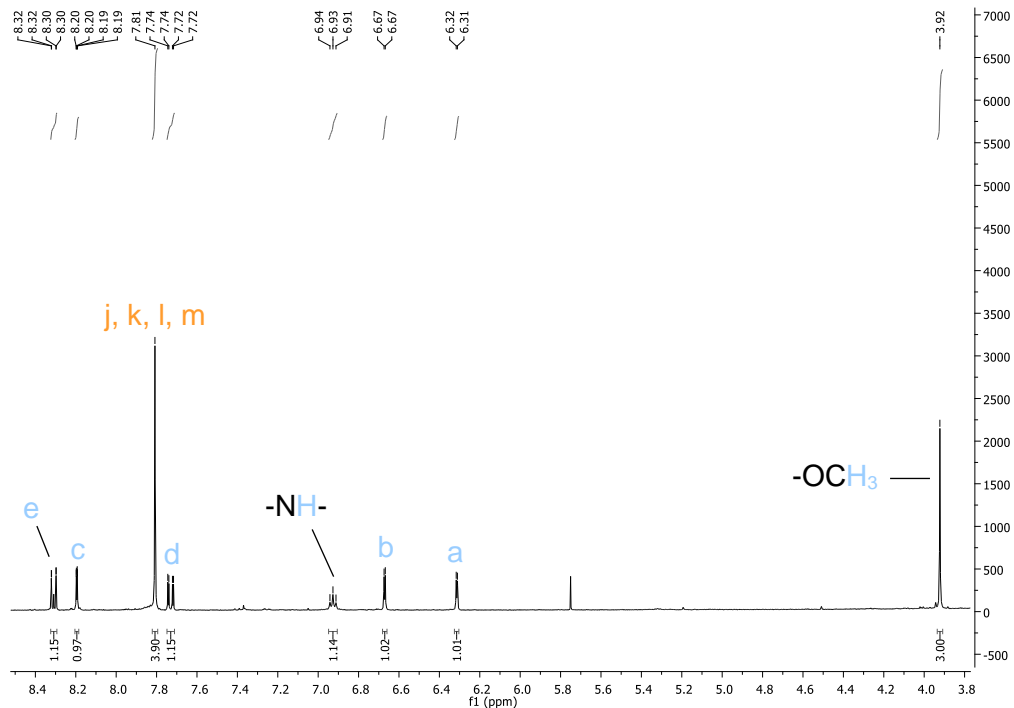


Figura 30. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) do composto 7 no intervalo 3.80 a 8.45 ppm.

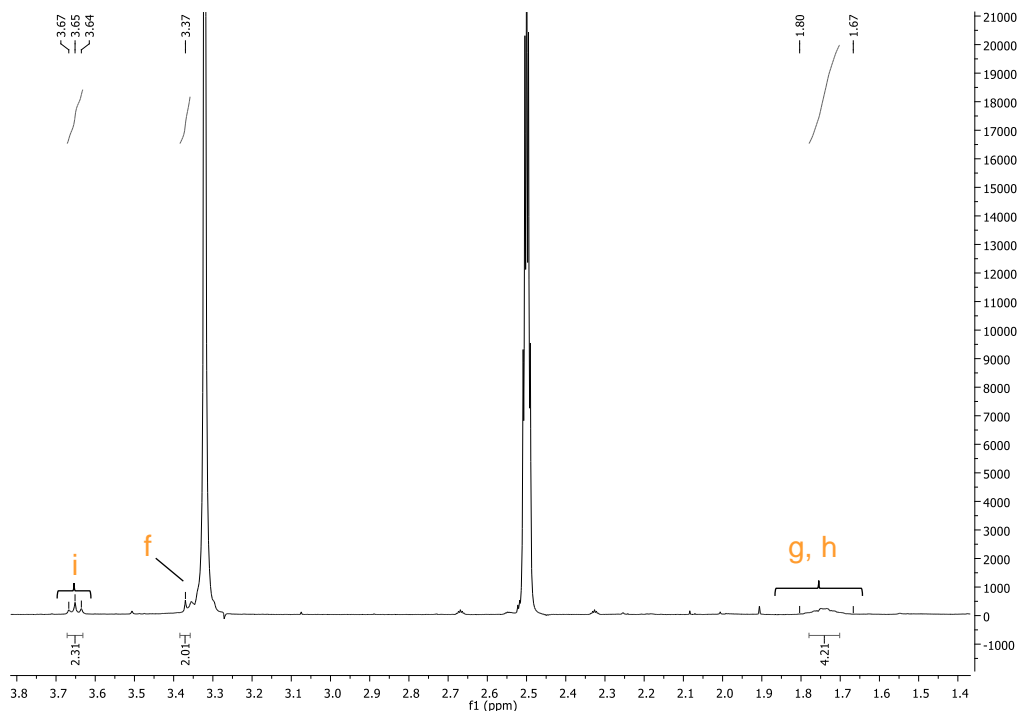
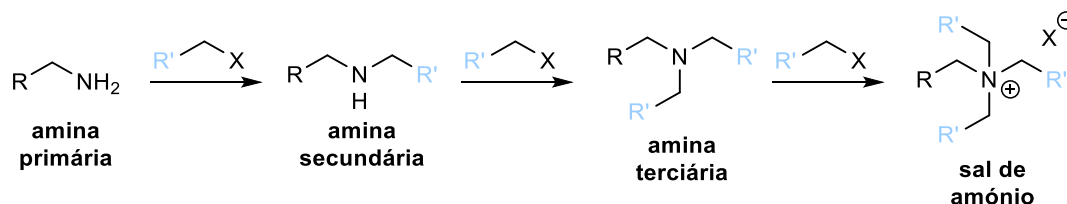


Figura 31. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do composto 7 no intervalo 1.40 a 3.80 ppm.

A *N*-alquilação com um halogeneto de alquila resulta, geralmente, em poli-alquilação, devido ao produto da reação (amina secundária) ser frequentemente mais nucleofílico do que o reagente de partida (amina primária) e, por isso, reagir preferencialmente com o agente alquilante. Assim, o rendimento obtido relativo à amina secundária é, por

norma, baixo e, além disso, os produtos resultantes (amina secundária, terciária e sal de amónio) são difíceis de separar por cromatografia em coluna de gel de  $\text{SiO}_2$  (**Esquema 27**).



**Esquema 27.** Esquema geral da poli-alkilação.

A amina secundária pode ser obtida predominantemente por tratamento do haleto de alquila com um grande excesso da amina primária, mas no contexto deste trabalho, essa opção não seria viável no sentido em que grandes quantidades de amina teriam de ser sintetizadas.<sup>92</sup> A poli-alkilação depende também das características da amina primária inicial, nomeadamente a sua reatividade e estrutura química. Isto é, uma amina pouco reativa e volumosa prosseguirá exclusivamente para a amina secundária. Contudo, mesmo no caso em que a mono-alkilação ocorre exclusivamente, o rendimento é dependente de outros fatores como por exemplo a solubilidade da amina. Assim, com o objetivo de aumentar o rendimento da reação, foram modificadas algumas variáveis possíveis, como o solvente e o tempo de reação, tal como sumariado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Tentativas de otimização da síntese do composto 7.

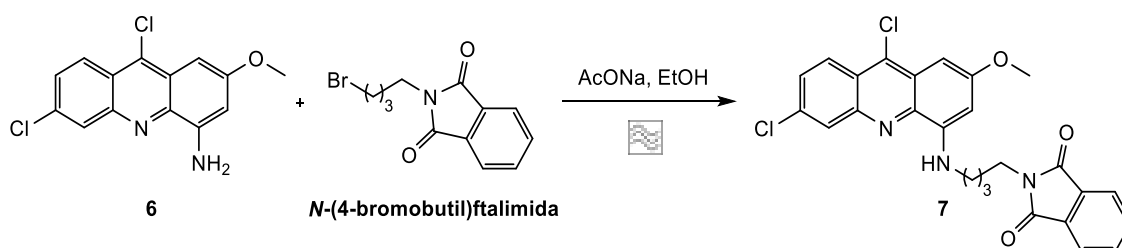
Método Tentativas	Solvente	T/°C	t/d	$\eta$ / %
1	EtOH	80	5	9,32
2	ACN	80	5	-
3	<b>EtOH</b>	<b>80</b>	<b>7</b>	<b>10,1</b>

A fraca solubilidade do reagente de partida **6** em EtOH e o facto de este ser um solvente polar prótico que, por norma, não favorece as reações via  $\text{S}_{\text{N}}2$  devido à solvatação do nucleófilo, foram as duas principais razões que levaram à sua alteração. O solvente escolhido para substituir foi ACN por ser um solvente polar aprótico com  $p_{\text{e}}$  maior que 80 °C (temperatura a que foi realizada a reação) e pela razoável solubilidade do composto no mesmo. Tendo em mente estas considerações, seria de esperar um aumento significativo do rendimento, mas ao contrário do teoricamente esperado, não se observou a formação do produto de interesse (**Tabela 1** – tentativa **2**). Este resultado

é indicativo de que a presença de um solvente polar prótico no meio reacional poderá ser um fator essencial.

A segunda alteração realizada foi o aumento do tempo de reação de 5 dias para 7 dias. Ainda assim, não se verificou um aumento significativo do rendimento da reação pelo que foram pesquisadas novas alternativas.

A alternativa encontrada passa pela utilização do microondas (MW) cuja utilização em síntese orgânica tem vindo a emergir ao longo destes últimos anos. A radiação de MW é uma radiação eletromagnética resultando no aquecimento eficiente de materiais por efeitos de aquecimento dielétrico. Assim, os solventes com uma elevada constante dielétrica, como os álcoois, são preferencialmente utilizados no MW visto que induzem uma forte absorção de MW e, conseqüentemente, um rápido aquecimento. Adicionalmente, o aquecimento em vasos fechados permite a utilização de temperaturas muito acima do ponto de ebulição do solvente usado.<sup>93-94</sup> Assim, a síntese do composto **7** foi repetida via MW, conforme descrito no esquema:



O procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente, mas a reação ocorreu em vaso fechado num reator próprio para o microondas. Com as condições iniciais testadas (2 horas, 100 °C), não se observou a formação do produto desejado, pelo que se procedeu a tentativas de otimização (**Tabela 2**) variando temperatura e tempo de reação.

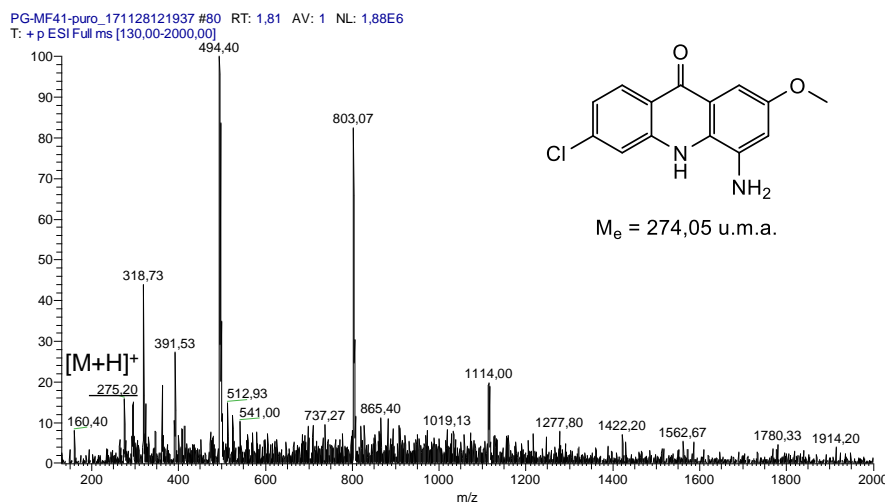
**Tabela 2.** Tentativas realizadas no microondas para a síntese do composto **7**.

Método	Solvente	T / °C	t / h	$\eta$ / %
Tentativas				
4	EtOH	100	2	-
5	EtOH	120	4	<b>7,43*</b>
6	EtOH	120	3	<b>8,25*</b>
<b>7</b>	<b>EtOH</b>	<b>120</b>	<b>2,5</b>	<b>10,1</b>

\*grande parte do composto degradou.

Perante os resultados, concluiu-se que as condições mais favoráveis de tempo e temperatura seriam 2,5h e 120 °C, respetivamente. Um tempo reacional de 4h ou 3h revelou ser demasiado levando à degradação do composto e conseqüente descida do rendimento (**Tabela 2** – tentativa **5** e **6**). Assim, de um modo geral verificou-se que, apesar de não se obter um aumento significativo do rendimento, foi possível diminuir drasticamente o tempo de reação de 7 dias para 2,5 horas.

Resumindo, todas as tentativas de otimização da síntese, mostraram-se ineficientes na medida em que não ocorreu, em nenhum caso, um aumento significativo do rendimento. Este baixo rendimento pode estar associado a diversos fatores, dos quais se destacam o facto de o nucleófilo ser uma amina aromática, que por si só é menos reativa que uma amina alifática devido à estabilização por ressonância, e estar ligada a uma acridina que é um grupo bastante volumoso. Adicionalmente, como se comprova pelo espectro de massa da mistura reacional da reação em questão (**Figura 32**), a presença de um átomo de cloro na posição 9 do anel, sendo esta posição mais reativa por ter em posição *para* um átomo de azoto, dá origem à formação de vários produtos secundários, muitos deles não identificados (com  $m/z = 318,73$ ;  $391,53$ ;  $512,93$ ;  $803,07$ ), e 4-amino-6-cloro-2-metoxiacridona ( $m/z = 275,20$ ), fruto da reação da acridina **6** com a água presente no meio reacional.



**Figura 32.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) da mistura reacional da síntese do composto **7**.

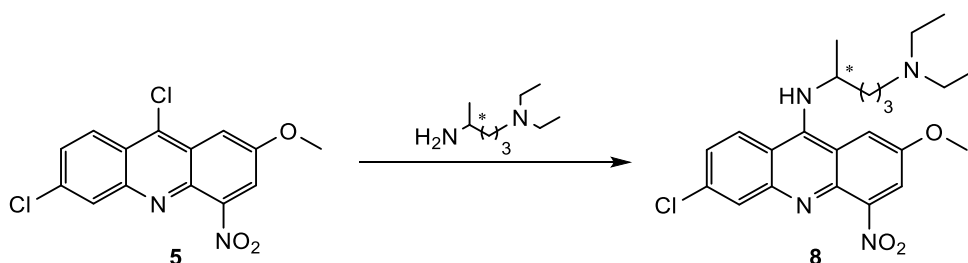
Devido ao baixo rendimento desta última reação, esta rota sintética foi interrompida explorando-se assim a rota B como alternativa, a qual será apresentada na secção seguinte.

### 3.3. Parte II – Rota B

Como alternativa à rota sintética A, foi proposta a rota B que, como já referido anteriormente, difere essencialmente na ordem de introdução das cadeias aminoalquilamínicas na posição 9 e 4 do anel da acridina. Neste caso, é primeiramente introduzida a cadeia lateral na posição 9, com o objetivo de retirar por completo a instabilidade da molécula causada pela presença do cloro nessa posição que se pensa ser uma das principais causas da formação de compostos secundários.

#### 3.3.1. Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-nitro-2-metoxiacridina (**8**)

A síntese de acridinas 9-substituídas pode ser realizada de duas formas: (i) através de uma reação direta entre o nucleófilo e a acridina ativada ou (ii) através de uma reação de Chichibabin entre a acridina não-substituída em C9 com um forte nucleófilo. No entanto, neste último caso, o uso de bases muito fortes como nucleófilos faz a reação de Chichibabin muito agressiva para alguns grupos funcionais.<sup>95</sup> Desta forma, o método de síntese (i) é o mais comumente utilizado e, por essa razão foi o testado neste trabalho. Assim sendo, a síntese da 9-aminoacridina **8** foi realizada via  $S_NAr$ , utilizando como precursor a 9-cloroacridina **5**, sintetizada anteriormente (3.1.5.), tal como apresentado no esquema seguinte:

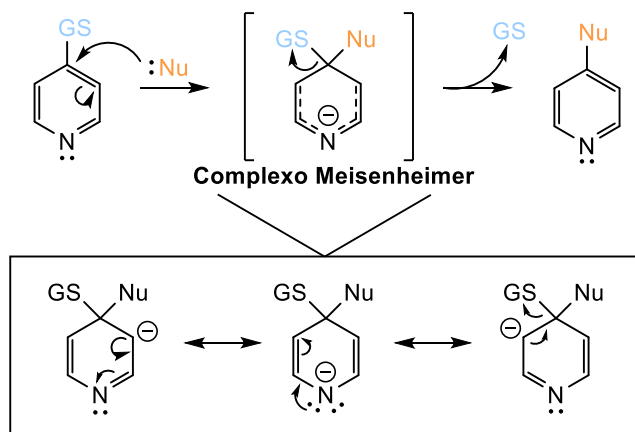


Esquema 29. Esquema geral da síntese do composto **8**.

No caso dos halogenetos de arilo, estes não podem sofrer as reações clássicas de substituição nucleofílica unimolecular,  $S_N1$ , e bimolecular,  $S_N2$ . Desta forma, uma reação de substituição em anéis aromáticos tem que prosseguir por um tipo de mecanismo totalmente diferente, designado por substituição aromática nucleofílica ( $S_NAr$ ). Contudo, para a reação ocorrer com sucesso, esta requer a presença de um forte grupo aceitador de eletrões ou de um heteroátomo eletronegativo no anel aromático em posição *para* ou *orto* relativamente ao grupo de saída.

Como apresentado no **Esquema 30**, as  $S_NAr$  ocorrem através de um mecanismo de adição-eliminação constituído por dois passos sequenciais. No primeiro passo, a adição,

ocorre o ataque do nucleófilo no carbono que contém o halogénio como substituinte, dando origem a um intermediário aniónico, designado por complexo Meisenheimer, estabilizado por ressonância devido, neste caso, à eletronegatividade do azoto. O sistema aromático é destruído aquando a formação deste complexo, e o carbono onde ocorreu o ataque nucleofílico muda a sua geometria planar (ligações  $sp^2$ ) para tetraédrica (ligações  $sp^3$ ). No segundo passo o halogeneto (grupo de saída) é eliminado para assim regenerar o sistema aromático estável.



Esquema 30. Mecanismo geral de uma  $S_NAr$  (GS = grupo de saída; Nu = Nucleófilo).

No presente trabalho, e com o objetivo de evitar o desperdício do composto de partida **8**, a otimização das condições de reação foi realizada utilizando o composto **6,9-dicloro-2-metoxiacridina (Figura 33 - B)**, disponível comercialmente, que apenas difere do composto de interesse (**Figura 33 - A**) pela ausência do grupo nitroílo na posição 4 do núcleo da acridina. Tal escolha teve por base um estudo cinético realizado por Zbigniew Zawada e colaboradores<sup>96</sup> sobre a influência dos substituintes no núcleo da acridina na reação de  $S_NAr$ . Uma vez que os autores verificaram que, à exceção da substituição na posição 1 do anel (por questões principalmente de impedimento estereoquímico), a presença do grupo nitroílo, sendo um grupo aceitador de eletrões, aumenta a reatividade da acridina devido ao efeito mesomérico negativo, as condições otimizadas para o composto comercial devem, teoricamente, resultar de igual forma (ou melhor) para a acridina de interesse **5**.



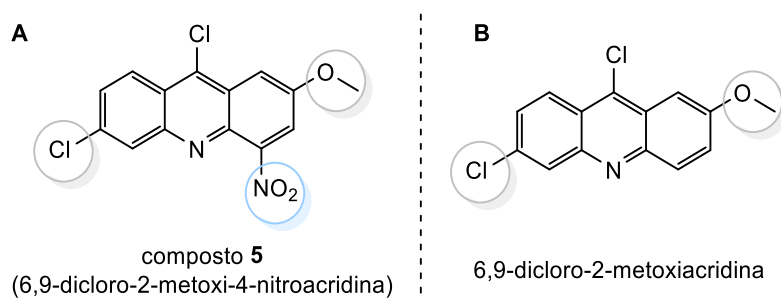
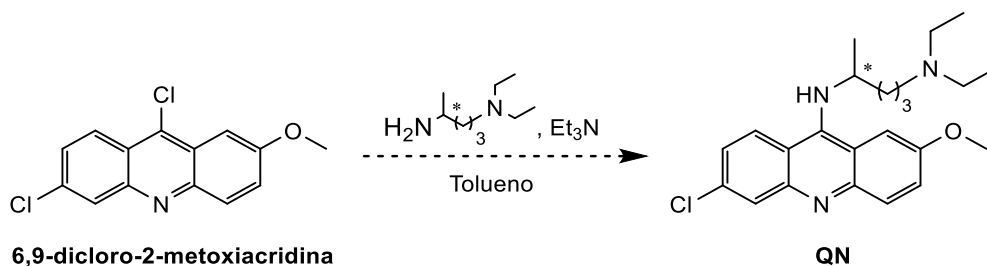


Figura 33. Estrutura química de: A – composto 5 sintetizado no passo anterior (passo v) e B – composto comercial.

Assim sendo, as primeiras condições testadas foram uma adaptação do método descrito por V. Raja Solomon e colaboradores,<sup>97</sup> tal como apresentado no seguinte esquema:



Esquema 31. Síntese da QN.

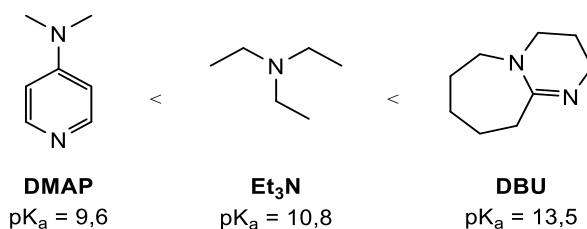
O composto 6,9-dicloro-2-metoxiacridina dissolvido em tolueno foi colocado a reagir com  $Et_3N$  e  $N,N$ -dietilpentano-1,4-diamina, durante 24 horas a 100 °C. No final desse período, após o tolueno ser evaporado, procedeu-se à realização de extrações líquido-líquido como tratamento. Findo o tratamento, por ESI-IT MS, observou-se a formação do composto de interesse, no entanto, após purificação por cromatografia em coluna de gel de  $SiO_2$ , o rendimento obtido não foi muito elevado ( $\approx 45,3\%$ ).

Tendo em conta este resultado, a otimização do processo foi realizada alterando algumas variáveis tais como a base, o solvente e a temperatura. Todas estas alterações realizadas estão sumariadas na **Tabela 3** e serão adiante discutidas pormenorizadamente.

Tabela 3. Tentativas de otimização para a síntese da QN.

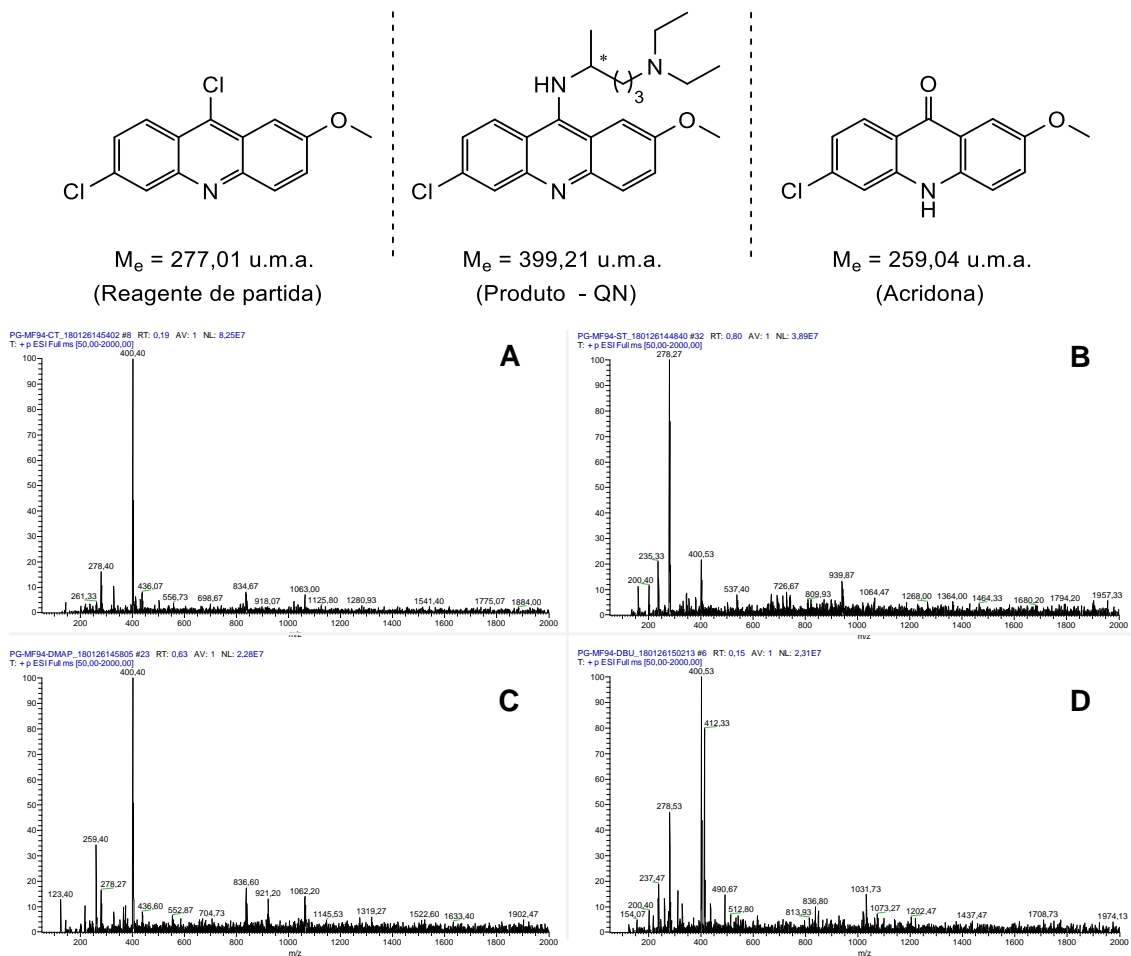
Método / Tentativas	Base	Solvente	T / °C	t / h	$\eta$ / %
1	Et <sub>3</sub> N	Tolueno	100	24	45,3
2	-	Tolueno	100	24	10,4
3	DMAP	Tolueno	100	24	26,7
4	DBU	Tolueno	100	24	33,9
5	Et <sub>3</sub> N	Dioxano	120	24	50,1

A primeira alteração efetuada foi relativamente à base utilizada, como forma de verificar se a sua basicidade seria um fator influente no rendimento. Assim sendo, as bases escolhidas foram a 4-dimetilaminopiridina (DMAP), que tem um  $pK_a$  menor que Et<sub>3</sub>N e por isso é uma base mais fraca, e a 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 1 – octahidropirimido[1,2 – a]azepina (DBU), que pelo contrário é uma base mais forte que a Et<sub>3</sub>N (**Figura 34**).

Figura 34. Estrutura química das bases DMAP, Et<sub>3</sub>N e DBU e seus  $pK_a$ 's.

Por ESI-IT MS (**Figura 35**) foram retiradas várias conclusões relativamente a este assunto. Em primeiro lugar, constatou-se que a presença de uma base é essencial uma vez que, comparando o espetro da reação na presença de Et<sub>3</sub>N (**Figura 35 – A**) com o espetro na sua ausência (**Figura 35 – B**) observou-se, neste último, um decréscimo significativo da intensidade do pico relativo ao ião quasi-molecular do produto QN ( $[M+H]^+ = 400$  u.m.a.). Alterando a base para uma mais fraca (**Figura 35 – C**), observou-se uma maior formação de acridona ( $[M+H]^+ = 259$  u.m.a.), um produto secundário já referido anteriormente noutras reações, proveniente da hidrólise do composto de partida, que ocorre com bastante facilidade quando a água está presente no meio e são empregues temperaturas elevadas. Sendo a DMAP uma base mais fraca supõe-se que esta não seja suficientemente forte para favorecer a reação de substituição aromática de interesse e, por essa razão, a reação de hidrólise ocorre prioritariamente. Em contrapartida, a utilização de uma base mais forte como a DBU (**Figura 35 – D**) induz a formação de produtos secundários não identificados ( $[M+H]^+ = 412$  u.m.a.). Assim sendo, concluiu-se que a melhor escolha é, sem dúvida, a utilização de Et<sub>3</sub>N como base.

É de realçar que, em espectroscopia de massa a intensidade dos picos não está diretamente relacionada com a quantidade do composto presente, mas sim com a facilidade de ionização dos grupos funcionais do composto. Contudo, neste caso em concreto, uma vez que o composto de partida comercial não tem tão bons grupos ionizáveis como o produto formado que contém várias aminas (uma delas terciária), fez-se essa comparação que, posteriormente foi confirmada através do cálculo do rendimento apresentado na **Tabela 3**.



**Figura 35.** Espectros de ESI-IT MS da síntese da QN: A – com  $\text{Et}_3\text{N}$ , B – sem base, C – com DMAP e D – com DBU.

Uma vez que o tolueno (solvente inicialmente usado) não dissolve por completo o composto de partida, o que também pode afetar o rendimento da reação, a segunda alteração realizada foi o tipo de solvente usado. A escolha de um solvente alternativo teve dois principais aspetos em consideração: o seu ponto de ebulição ( $p_e$ ) e, acima de tudo a solubilidade do composto no mesmo. De entre um grupo de solventes escolhidos com elevados  $p_e$  – DMF, ACN e dioxano (**Figura 36**) – o dioxano foi, comparativamente com o tolueno, o que melhor dissolveu o composto (apesar dessa dissolução também não ser completa). De seguida, aumentou-se também a temperatura da reação de 100

°C para 120 °C de forma a favorecer ainda mais a colisão entre as moléculas e, conseqüentemente, a reação entre elas. Desta forma, verificou-se um aumento do rendimento de 45,3 para 50,1 %.

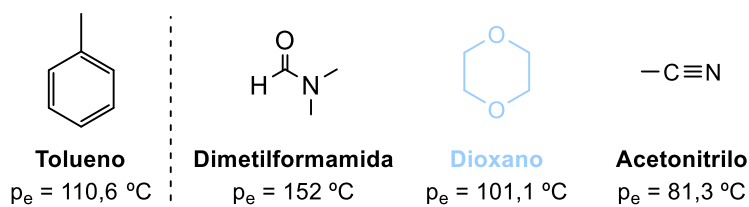
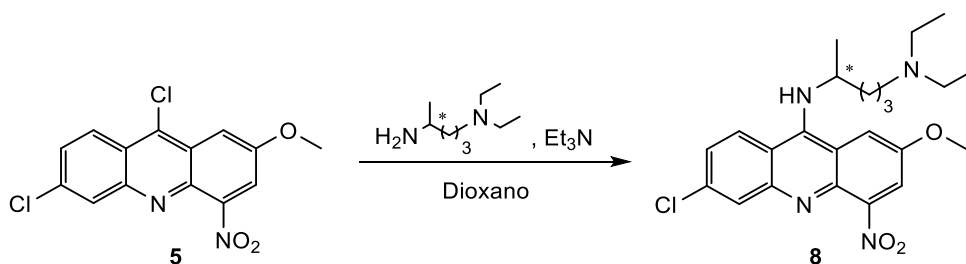


Figura 36. Solventes escolhidos como alternativa ao tolueno.

Após todas as tentativas de otimização efetuadas, as melhores condições obtidas para a síntese da QN foram as da tentativa **5** (Tabela 3) e, por isso, foram essas as condições reproduzidas para o composto de interesse, tal como descrito no seguinte esquema:



Esquema 32. Síntese do composto **8**.

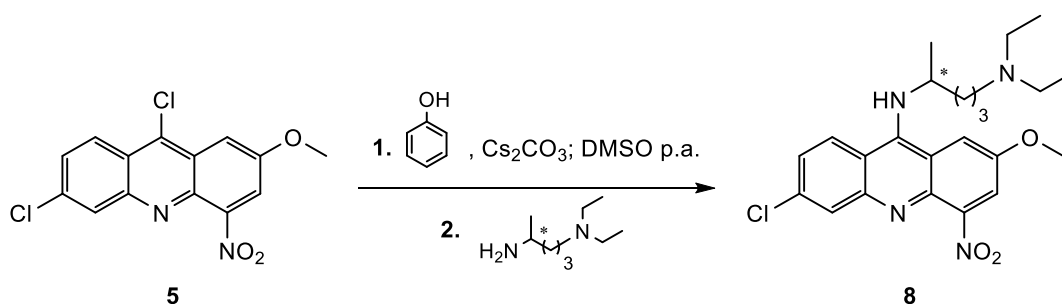
Ao contrário do teoricamente esperado, isto é, do favorecimento da reação quando presente o grupo nitroílo, observou-se a formação de muitos produtos secundários que dificultaram a obtenção do composto numa pureza aceitável e possível de quantificar, daí, o rendimento apresentado na Tabela 4 ser uma estimativa do maior rendimento possível, caso toda a mistura reacional obtida após a tentativa de purificação fosse o composto **8**. Tal resultado pressupõe que realmente a presença do grupo nitroílo na posição 4 ativa o anel, mas em contrapartida, torna-o muito reativo, levando também à produção de muitos produtos secundários.<sup>98</sup>

Ainda assim, mais algumas alterações foram realizadas a nível do tempo (Tabela 4), mas o “rendimento” não variou linearmente não sendo possível retirar qualquer tipo de conclusão.

Tabela 4. Tentativas de otimização para a síntese do composto 8.

Método Tentativas	Base	Solvente	T/°C	t/h	$\eta$ / %
6	Et <sub>3</sub> N	Dioxano	120	24	< 44,2
7	Et <sub>3</sub> N	Dioxano	120	48	< 11,1
8	Et <sub>3</sub> N	Dioxano	120	72	< 20,4

Perante estes resultados, o método foi descartado e procuraram-se novas alternativas de síntese. A melhor alternativa encontrada para a síntese do composto 8 foi uma adaptação de um artigo publicado por Marc O. Anderson e colaboradores,<sup>45</sup> de acordo com o seguinte esquema:



Esquema 33. Síntese do composto 8 via intermediário fenólico.

Este método difere do anterior na medida em que, neste caso, é em primeiro lugar formado um intermediário fenólico *in situ* que é mais reativo que o composto inicial uma vez que o ião fenolato é um melhor grupo de saída que o cloro devido à sua estabilização por ressonância. Além disso, novos cuidados experimentais foram tidos em conta: a reação foi realizada em atmosfera inerte e na presença de filtros moleculares previamente ativados por calor para evitar a presença de água no meio reacional que havia induzido a formação do produto secundário acridona.

Assim, ao composto 5 dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) adicionou-se fenol e Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> seguido de *N,N*-dietilpentano-1,4-diamina. Finda a reação, e após remoção dos filtros moleculares por filtração e tratamento por extrações líquido-líquido, confirmou-se que a reação não formou tantos produtos secundários, comparativamente com o primeiro método descrito e, por isso, a purificação do composto por cromatografia em coluna de gel de SiO<sub>2</sub> ocorreu eficientemente. Contudo, observou-se alguma retenção do composto na coluna que pode estar associado a interações deste com a sílica uma vez que esta apresenta carácter ácido, induzindo assim a protonação do composto. Adicionalmente, depois da purificação observou-se também uma diminuição do fator de

retenção ( $R_f$ ) do composto que indica que realmente essa protonação deverá ter ocorrido.

Conforme se ilustra na **Tabela 5**, o produto desejado (óleo vermelho) foi obtido com rendimentos razoáveis de aproximadamente 50 %. Estes resultados estão de acordo com resultados reportados na literatura utilizando acridinas e cadeias aminoalquilamínicas semelhantes.<sup>45</sup> Contudo ainda há aspetos a melhorar, nomeadamente na purificação, uma vez que o facto de o composto ter ficado retido na coluna cromatográfica induz à perda inevitável do mesmo diminuindo assim o rendimento obtido. A purificação utilizando RP-MPLC é uma forma de evitar este problema, mas uma solução mais prática e económica e que já foi reportada para compostos semelhantes,<sup>54</sup> passa pela purificação utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  juntamente com o eluente utilizado (neste caso, DCM/MeOH) numa proporção estudada que não elua demasiado rapidamente o composto e que não se torne demasiado básica para dissolver a sílica.<sup>99</sup> Estes sistemas de eluentes aumentam o pH de modo a que o composto permaneça como base livre eluindo mais facilmente na coluna. Adicionalmente, a utilização de uma base também "desativa" a sílica porque o amoníaco interage com os grupos silanol na sílica e evita que estes interajam com o composto de interesse.

**Tabela 5.** Resultados obtidos para a síntese do composto **8** (MM = 444,96 g.mol<sup>-1</sup>, óleo vermelho).

Repetições	$m_{\text{obtida}} / \text{g}$	$\eta / \%$	Repetições	$m_{\text{obtida}} / \text{g}$	$\eta / \%$	Pureza / %
1	0,0717	50,6	11	0,0712	50,0	91,1-91,3
2	0,0700	50,1	12	0,0696	50,5	
3	0,2678	*96,0	13	0,0718	51,1	
4	0,0911	**33,2	14	0,0687	49,9	
5	0,0936	**32,9	15	0,0610	42,6	
6	0,0802	58,0	16	0,0595	42,8	
7	0,0698	49,6	17	0,0586	43,1	
8	0,0713	50,7	18	0,0590	42,6	
9	0,0692	50,2	19	0,0844	54,4	
10	0,0697	49,2	-	-	-	

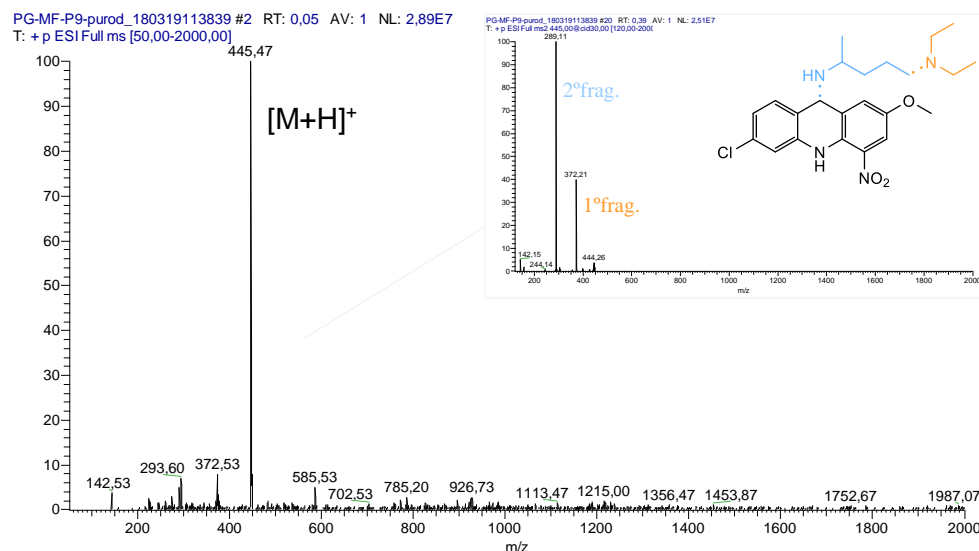
\* Continha DMSO, o  $\eta$  não é verdadeiro. \*\* Remoção do DMSO por liofilização.

É de salientar que o elevado número de repetições apresentado na **Tabela 5** está relacionado com a utilização de DMSO como solvente, o que impede o aumento de escala da síntese uma vez que a sua remoção completa não é possível através de extracções líquido-líquido nem através de evaporação a pressão reduzida. O facto de no final o composto de interesse ainda conter DMSO induz à adição de mais duas etapas de tratamento: liofilização para retirar por completo o solvente e consequente extração

para o obter novamente o composto em forma de amina livre. Estas soluções encontradas e testadas (**Tabela 5** – repetição **4** e **5**) diminuem drasticamente o rendimento visto que inevitavelmente existem sempre perdas quanto maior for o número de passos a realizar para a obtenção do composto final. Dito isto, o ideal é realizar a síntese partindo de, no máximo,  $\approx 100$  mg. Ainda assim, num futuro próximo, a escolha de outro solvente similar mais fácil de eliminar, será um importante fator a testar.

A análise estrutural do composto obtido foi realizada por ESI-IT MS e  $^1\text{H}$ -RMN e a avaliação da sua pureza foi realizada por HPLC (**Anexo 5**).

No espectro de ESI-IT MS em modo positivo apresentado na **Figura 37**, é visível apenas o pico-base a  $m/z = 445,47$  correspondente ao ião quasi-molecular ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) do produto esperado, cuja  $M_e$  é 444,19 u.m.a.. O subsequente estudo de fragmentação do ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  evidenciou a perda da amina terciária di-substituída da cadeia aminoalquilamínica introduzida ( $m/z = 372,21$ ), e a perda total da mesma cadeia com consequente rearranjo estrutural ( $m/z = 289,11$ ).



**Figura 37.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **8** e, no canto superior direito, o espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação.

Pela análise do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentado na **Figura 38** (com ampliação da zona aromática e alifática na **Figura 39** e **Figura 40**, respetivamente), confirma-se a teoria proposta anteriormente relativa à protonação do composto durante a purificação, devido à presença de um pico a 4,09 ppm correspondente ao próton da amina terciária protonada (amónio) da cadeia aminoalquilamínica. Adicionalmente, confirma-se a presença (i) dos prótons característicos do núcleo da acridina (Ha, Hb, Hc, Hd e He),

(iii) dos prótons correspondentes ao grupo metoxilo e (iv) dos prótons da cadeia aminoalquilamínica (Hf, Hg, Hh, Hi, Hj, Hk, Hm, Hl e Hn), confirmando assim a correta introdução da mesma.

As atribuições das multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.

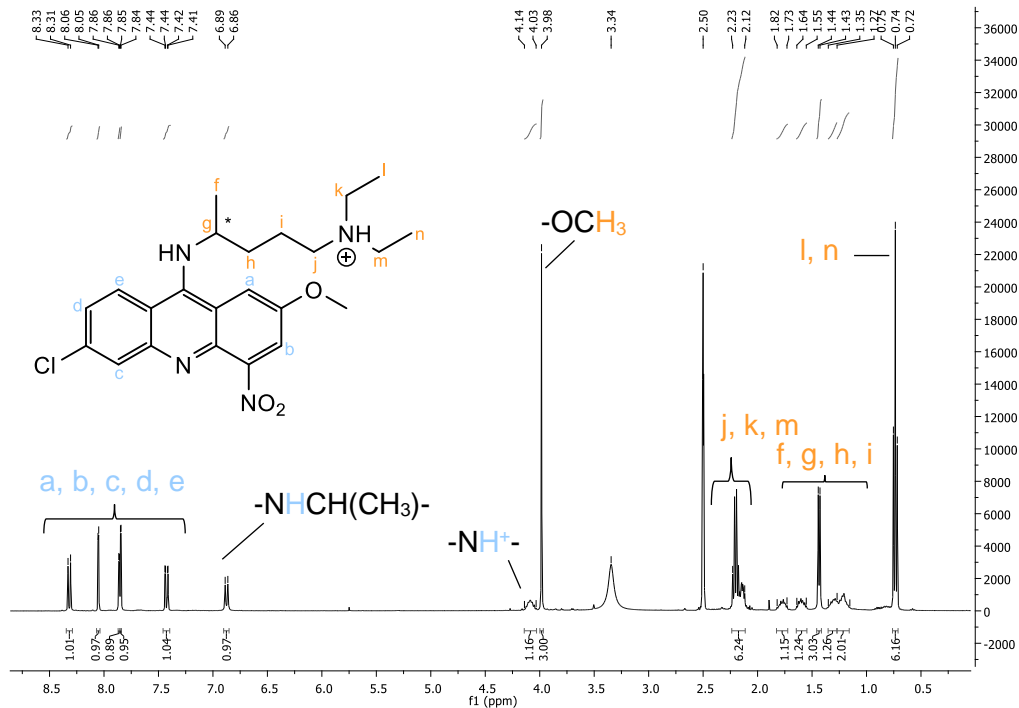


Figura 38. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto **8**.



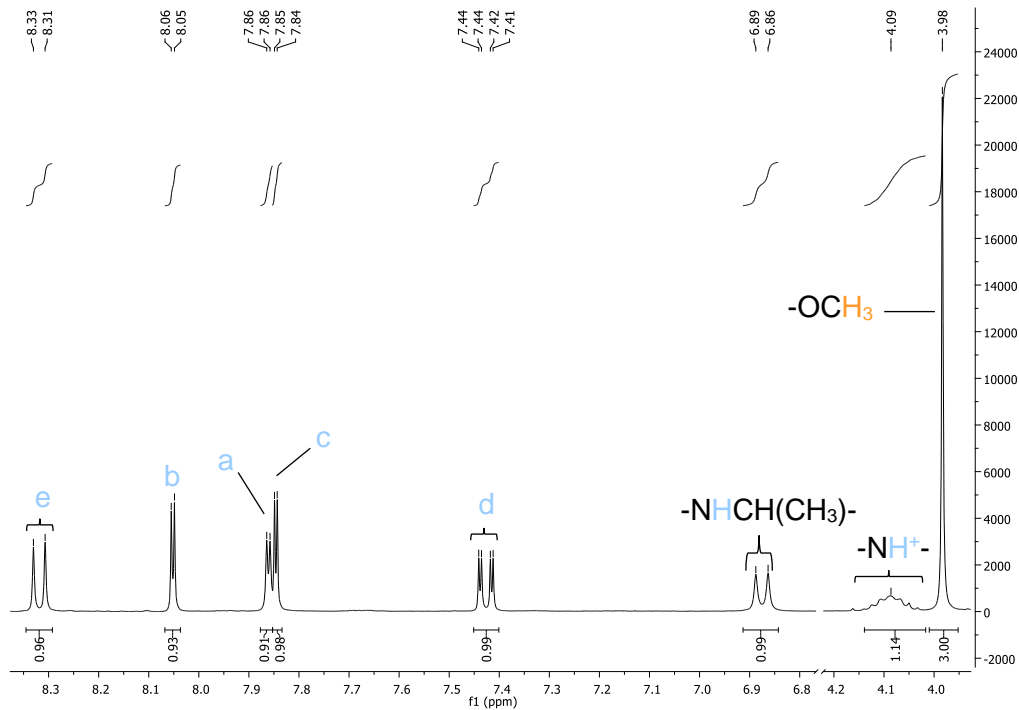


Figura 39. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto **8** no intervalo 3.95 a 8.35 ppm.

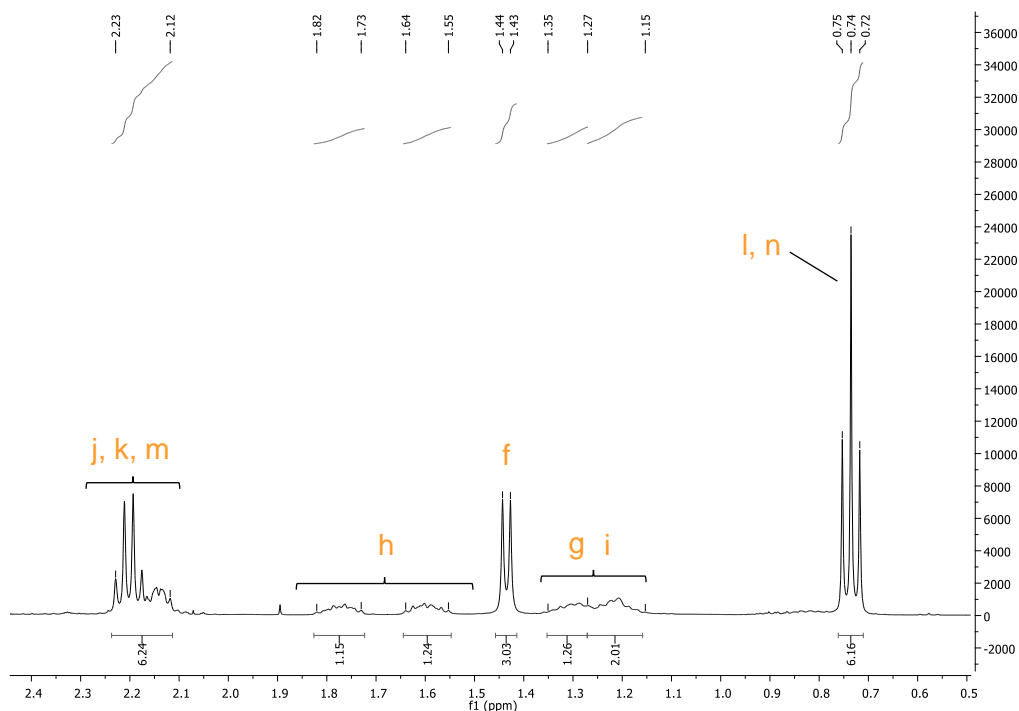
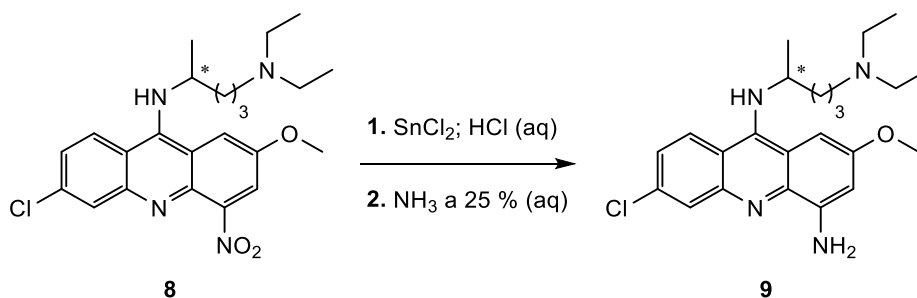


Figura 40. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto **8** no intervalo 0.50 a 2.40 ppm.

### 3.3.2. Síntese de 4-amino-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (**9**)

O passo sintético seguinte corresponde à redução do grupo nitroílo da posição 4 do núcleo da acridina. Tendo em conta os resultados obtidos na Rota A (em **3.2.1.**), o

método de redução escolhido foi o descrito por John P. Scovill,<sup>58</sup> utilizando  $\text{SnCl}_2$  em  $\text{HCl}$ , conforme descrito no seguinte esquema:



Esquema 34. Síntese do composto 9.

Tanto o procedimento como o tratamento foram iguais aos descritos na Rota A (em **3.2.1.3.**).

Por CCF, verificou-se que a reação foi completa sem a formação de muitos produtos secundários. Apesar de serem poucas as impurezas resultantes da reação, prosseguiu-se para a purificação do composto. No entanto, este composto, devido à presença de várias aminas na sua estrutura química, apresenta um  $R_f$  extremamente baixo, que dificulta a sua purificação por cromatografia em coluna de gel de  $\text{SiO}_2$ . Desta forma as alternativas encontradas para ultrapassar este obstáculo foram (i) a realização de uma “flash chromatography” ou (ii) a precipitação das impurezas em  $\text{Et}_2\text{O}$ .

Em primeiro lugar, testou-se a purificação por “flash chromatography” realizada numa seringa de plástico com gel de  $\text{SiO}_2$ , sob pressão reduzida, como apresentado na montagem da **Figura 41**, por ser a forma mais eficaz de purificação. Apesar de ser igualmente utilizado gel de  $\text{SiO}_2$ , o facto de o seu volume ser significativamente mais pequeno torna mais rápida a passagem do composto pelo gel de  $\text{SiO}_2$ . Contudo, mesmo com a utilização de  $\text{MeOH}$  como eluente, grande parte do composto ficou retido na  $\text{SiO}_2$ , muito provavelmente devido à acidez da mesma que promove a protonação das aminas. Além disso, outra limitação do método esteve relacionada com a separação das impurezas com um  $R_f$  semelhante ao do composto, que se tornou complicada devido à pequena quantidade de  $\text{SiO}_2$  utilizada.



Figura 41. Montagem de uma "flash chromatography" como forma de purificação.

Perante estes resultados, prosseguiu-se para a segunda opção de purificação. Neste caso, a mistura reacional foi tratada com  $\text{Et}_2\text{O}$ , verificando-se que a maior parte das impurezas precipitaram, tendo sido, posteriormente removidas por filtração a pressão reduzida. Este método de purificação além de ser mais prático revelou-se mais eficiente na medida em que, comparativamente com o método anterior, evitou perdas de composto e, conseqüentemente, um aumento do rendimento (**Tabela 6** – repetição 1).

Desta forma, o composto **9** obtido sob a forma de óleo amarelo, foi sintetizado com resultados muito satisfatórios uma vez que se obtiveram bons rendimentos (75,9 – 85,2 %), da mesma ordem de grandeza dos obtidos na Rota A, e elevados graus de pureza (**Tabela 6**).

Tabela 6. Resultados obtidos para a síntese do composto **9** ( $M_M = 414,98 \text{ g.mol}^{-1}$ , óleo amarelo).

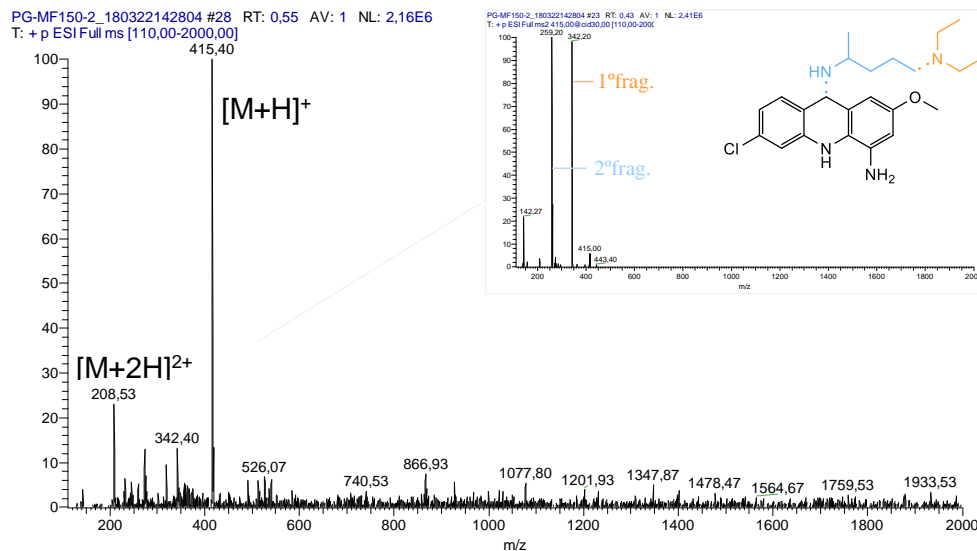
Repetições	$m_{\text{obtida}} / \text{g}$	$\eta / \%$	Repetições	$m_{\text{obtida}} / \text{g}$	$\eta / \%$	Pureza / %
1	0,0832	75,9*	6	0,1002	80,9	96,8-97,1
2	0,0440	83,7	7	0,0334	81,5	
3	0,1020	83,6	8	0,0996	84,2	
4	0,1370	82,1	9	0,2073	85,2	
5	0,0995	79,3	10	0,0769	83,9	

\* Obtenção do composto utilizando "flash chromatography" como método de purificação.

A análise estrutural do composto obtido foi realizada por ESI-IT MS e  $^1\text{H-RMN}$  e a avaliação da sua pureza foi realizada por HPLC (**Anexo 6**).

No espectro de ESI-IT MS em modo positivo apresentado na **Figura 42**, é visível o pico-base a  $m/z = 415,40$  correspondente ao ião quasi-molecular ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) do produto esperado, cuja  $M_e$  é 414,98 u.m.a.. Observa-se também a presença de um pico minoritário a  $m/z = 208,53$  correspondente ao ião molecular  $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$  que é possível devido às duas amins fáceis de ionizar presentes na estrutura da molécula-alvo. O subsequente estudo de fragmentação do ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  evidenciou os fragmentos

característicos destas 9-aminoacridinas: a perda da amina terciária di-substituída da cadeia aminoalquilamínica introduzida ( $m/z = 342,20$ ), e a perda total da mesma cadeia com conseqüente rearranjo estrutural ( $m/z = 259,20$ ).



**Figura 42.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **9** e, no canto superior direito, o espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação.

Pela análise do espectro de  $^1\text{H-RMN}$  apresentado na **Figura 43** (com ampliação da zona aromática e alifática na **Figura 44** e **Figura 45**, respetivamente), confirma-se novamente a protonação do composto, devido à presença de um pico a 4,00 ppm correspondente ao próton da amina terciária protonada (amónio) da cadeia aminoalquilamínica. Adicionalmente, na zona aromática confirma-se a presença (i) dos prótons característicos do núcleo da acridina (Ha, Hb, Hc, Hd e He), (ii) do próton pertencente à amina ligada ao anel da acridina na posição 9 e, por último (iii) dos dois prótons correspondentes à amina aromática da posição 4, confirmando assim a correta redução do grupo nitroílo ao grupo amino. No que diz respeito à zona alifática do espectro, confirma-se a presença dos picos correspondentes aos prótons da cadeia lateral da posição 9 (Hf, Hg, Hh, Hi, Hj, Hk, Hm, Hl, Hn) e (ii) dos prótons correspondentes ao grupo metoxilo. As atribuições das multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de  $^1\text{H-RMN}$  encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.

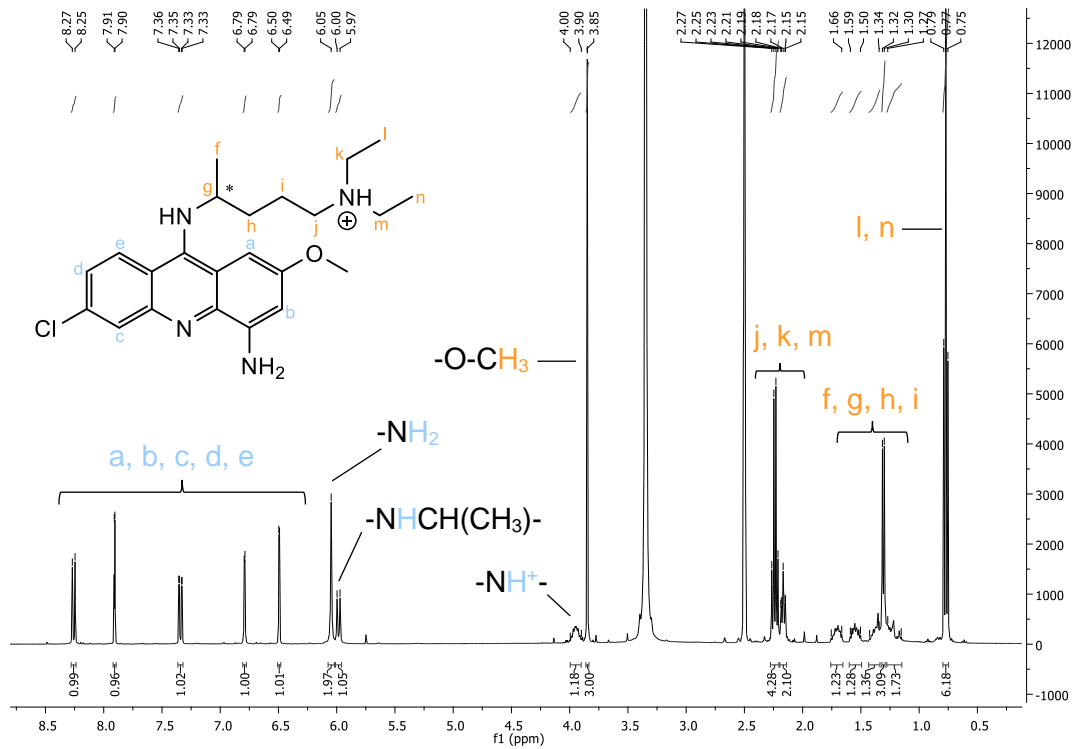


Figura 43. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do composto 9.

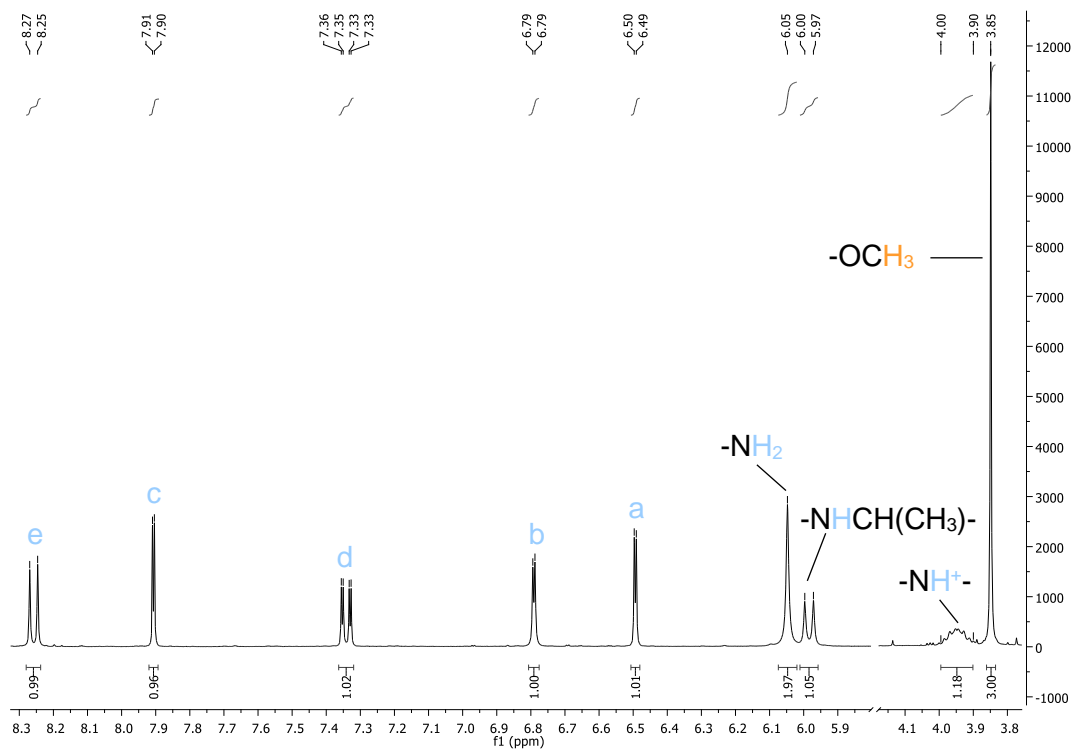


Figura 44. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do composto 9 no intervalo 3.85 a 8.30 ppm.

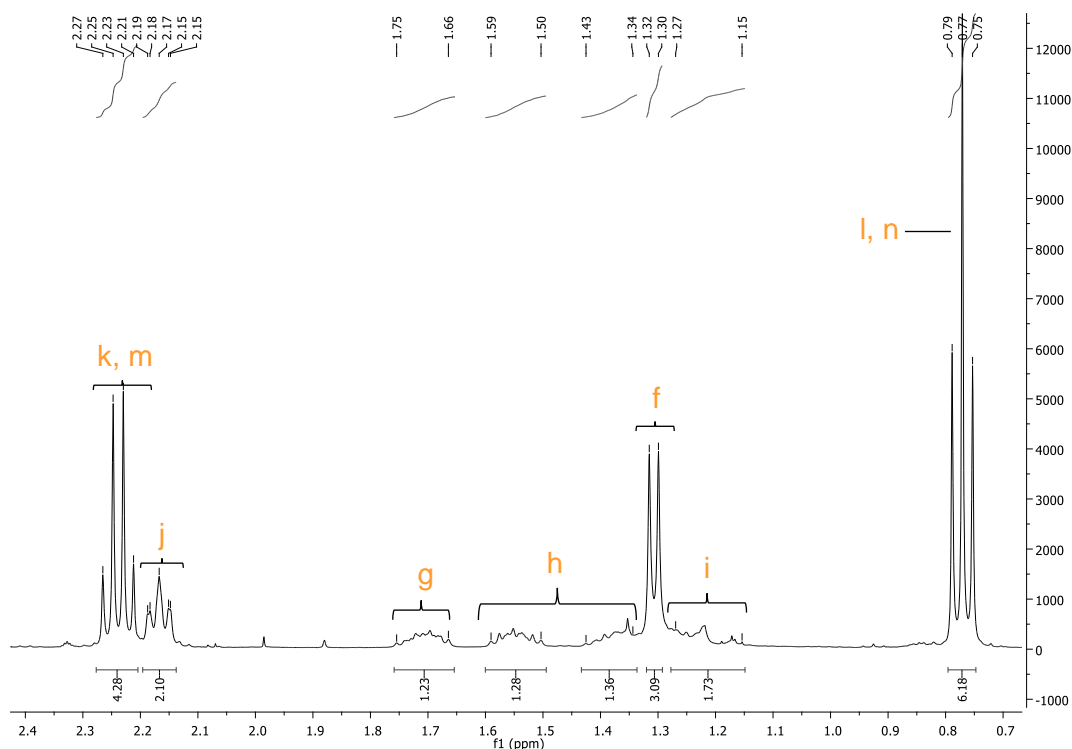
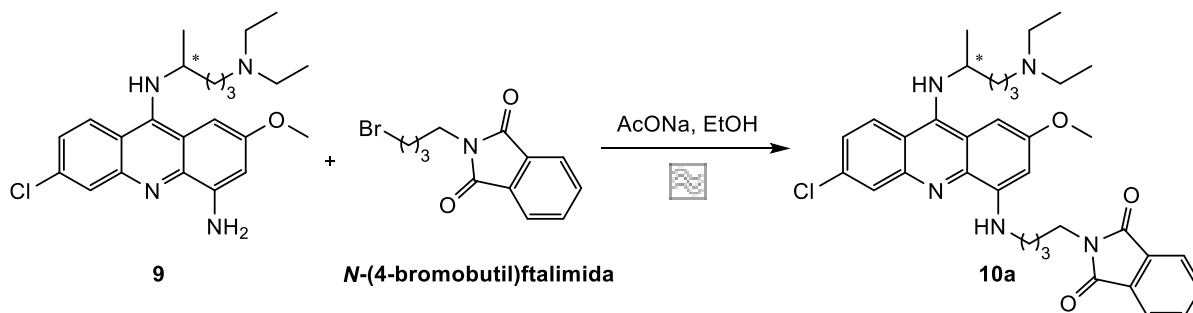


Figura 45. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, DMSO) do composto **9** no intervalo 0.65 a 2.40 ppm.

### 3.3.3. Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-[(n-ftalimidoalquil)amino]-2-metoxiacridina (**10**)

As condições utilizadas para a *N*-alquilação do grupo amino primário (na posição 4 do núcleo da acridina) com *N*-(*n*-bromoalquil)ftalimida tiveram por base a otimização realizada na Rota A (em 3.2.2.). Apesar de nesse caso o rendimento ter sido bastante baixo ( $\approx 10\%$ ), esperava-se que este aumentasse significativamente devido à presença da cadeia aminoalquilamínica na posição 9 do núcleo da acridina ao invés do cloro. Assim sendo, o esquema geral que descreve a síntese do composto **10a** (6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-[(4-ftalimidobutil)amino]-2-metoxiacridina) é o seguinte:

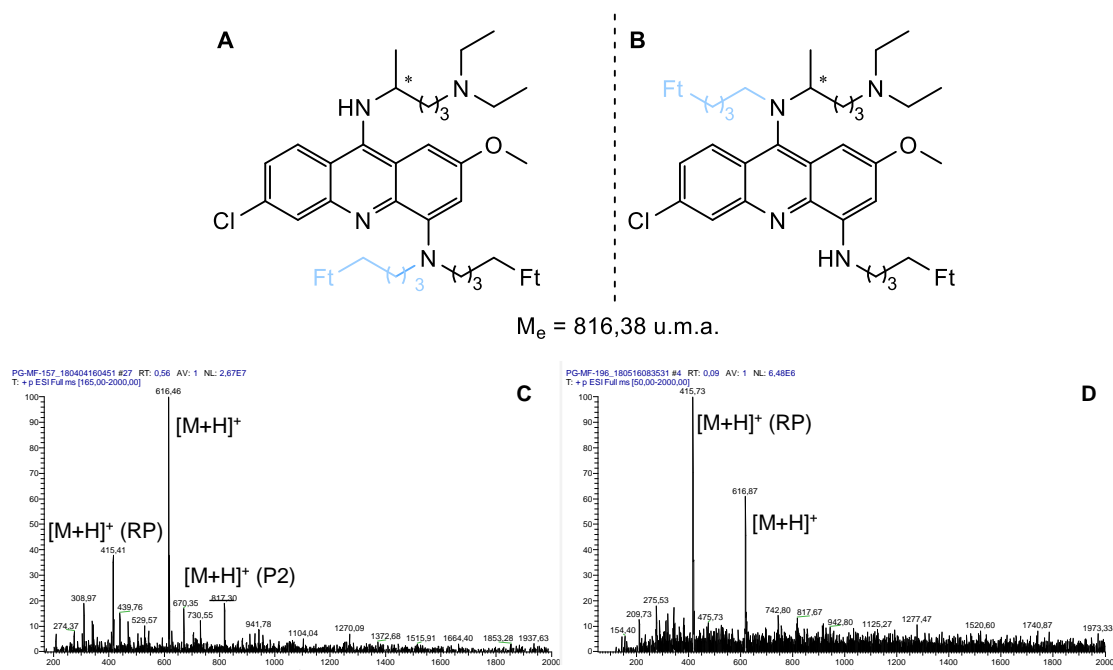


Esquema 35. Síntese do composto **10a**.

O procedimento e o tratamento da reação foram iguais ao descrito na rota A (em 3.2.2.).

A análise por ESI-IT MS antes da purificação indicou não só que a reação não foi completa como também a formação, além produto de interesse **10a** (mono-alquilado), do produto di-alquilado (**Figura 46 - C**). Apesar de, por espectroscopia de massa, não ser possível identificar qual a estrutura do composto di-alquilado formado (**Figura 46 - A** ou **B**), supõe-se que o produto apresente a estrutura química **B**, isto é, que a alquilação tenha também ocorrido na amina da posição 9 por na *N*-alquilação na Rota A (3.2.2.) não se ter observado a formação do composto di-alquilado.

Podendo este ser um fator influenciável no rendimento, para obviar a situação, a proporção dos reagentes foi alterada de 1:3 para 1:1,1 (**9: N-(4-bromobutil)ftalimida**) e, como previsto, verificou-se a ausência do pico relativo ao composto di-alquilado (**Figura 46 - D**).



**Figura 46. A, B** – estruturas químicas possíveis do composto di-alquilado. **C, D** - Espetros de massas (ESI-IT MS em modo positivo) antes da purificação do composto **10a** utilizando na síntese uma proporção dos reagentes de 1:3. e 1:1,1 (composto **9: N-(4-bromobutil)ftalimida**), respetivamente. (P2 – produto di-alquilado; RP – reagente de partida; Ft – grupo ftalimida).

Resolvida esta questão, ambas as misturas reacionais foram purificadas por cromatografia em coluna de gel de SiO<sub>2</sub>. Contrariamente ao esperado, o valor do rendimento desceu drasticamente de 26,1% para 9,10%, quando alterada a proporção dos reagentes para 1:1,1. Posto isto, apesar da formação do produto di-alquilado, o método adotado foi o da proporção dos reagentes original (1:3). Tendo em conta os

resultados obtidos que estão sumariados na **Tabela 7**, observa-se (com exceção da repetição 1) que os rendimentos foram superiores aos obtidos na rota sintética A ( $\eta \approx 10\%$ ). Deste modo, confirma-se mais uma vez a hipótese colocada anteriormente relativamente à influência do átomo de cloro na posição 9. Contudo, este passo ainda está em processo de otimização e novas metodologias irão ser testadas, nomeadamente a utilização de um agente alquilante com triflato como grupo de saída ao invés do brometo,<sup>45</sup> visto os bons resultados obtidos com a sua utilização no passo **ii**) da síntese (**3.1.2.**). Uma outra opção poderá ser a utilização de bases inorgânicas como o  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  que favorecem a mono-alkilação.<sup>100</sup>

**Tabela 7.** Resultados obtidos na síntese do composto **10a** (MM = 616,20 g.mol<sup>-1</sup>, óleo amarelo).

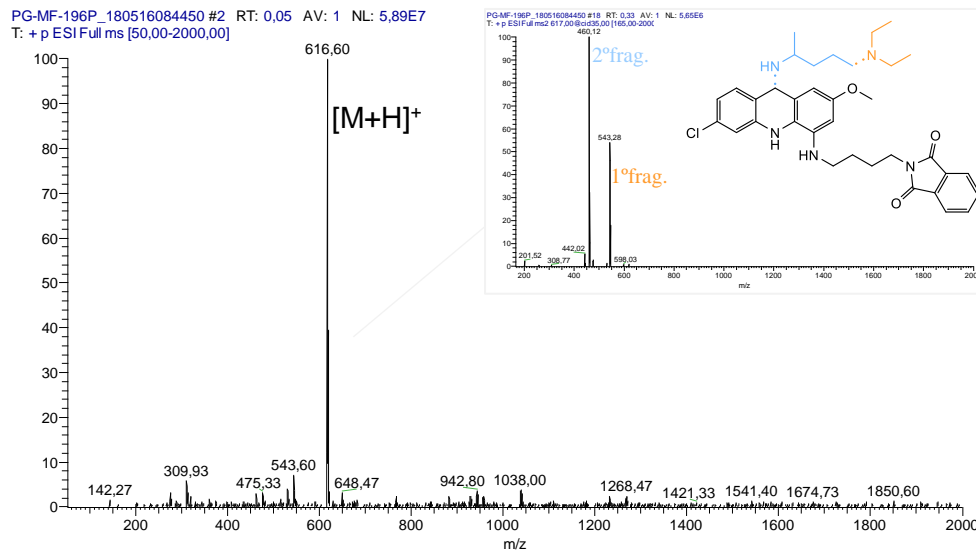
Repetições	$m_{\text{obtida}} / \text{g}$	$\eta / \%$	Pureza / %
<b>1</b>	0,0078	<b>9,10*</b>	86,8 - 87,2
<b>2</b>	0,0138	26,1	
<b>3</b>	0,0244	26,5	
<b>4</b>	0,0437	29,6	
<b>5</b>	0,0821	26,7	

\* Rendimento obtido quando utilizada a proporção dos reagentes de 1:1,1.

A análise estrutural do composto obtido sob a forma de óleo amarelo e a análise da sua pureza foi realizada por ESI-MS e <sup>1</sup>H-RMN e por HPLC (**Anexo 7**), respetivamente.

No espetro de ESI-IT MS em modo positivo apresentado na **Figura 47**, é visível um pico-base a  $m/z = 616,60$  correspondente ao ião quasi-molecular ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) do produto esperado, cuja  $M_e$  é 615,30 u.m.a.. O subsequente estudo de fragmentação do ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$  evidenciou a perda da amina terciária da cadeia aminoalquilamínica introduzida ( $m/z = 543,28$ ), e a perda total da mesma cadeia com consequente rearranjo estrutural ( $m/z = 460,12$ ).





**Figura 47.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **10a** e, no canto superior direito, o espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação.

Pela análise do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentado na **Figura 48** (com ampliação da zona aromática e alifática na **Figura 49** e **Figura 50**, respetivamente), confirma-se novamente a protonação do composto, devido à presença de um pico a 3,95 ppm correspondente ao protão da amina terciária protonada (amónio) da cadeia lateral da posição 9. Adicionalmente, confirma-se a presença (i) dos protões característicos do anel da acridina (Ha, Hb, Hc, Hd e He), (ii) dos protões pertencentes às aminas ligadas ao núcleo da acridina na posição 9 e na posição 4, (iii) dos protões dos anel do grupo ftalimida bem como (iv) dos protões da cadeia lateral da posição 4 (Ho, Hp, Hq, Hr), confirmando assim a introdução da cadeia pretendida. Adicionalmente, confirma-se também a presença dos picos correspondentes aos protões (ii) do grupo metoxilo e (ii) da cadeia lateral da posição 9 (Hf, Hg, Hh, Hi, Hj, Hk, Hm, Hl e Hn).

As atribuições das multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.

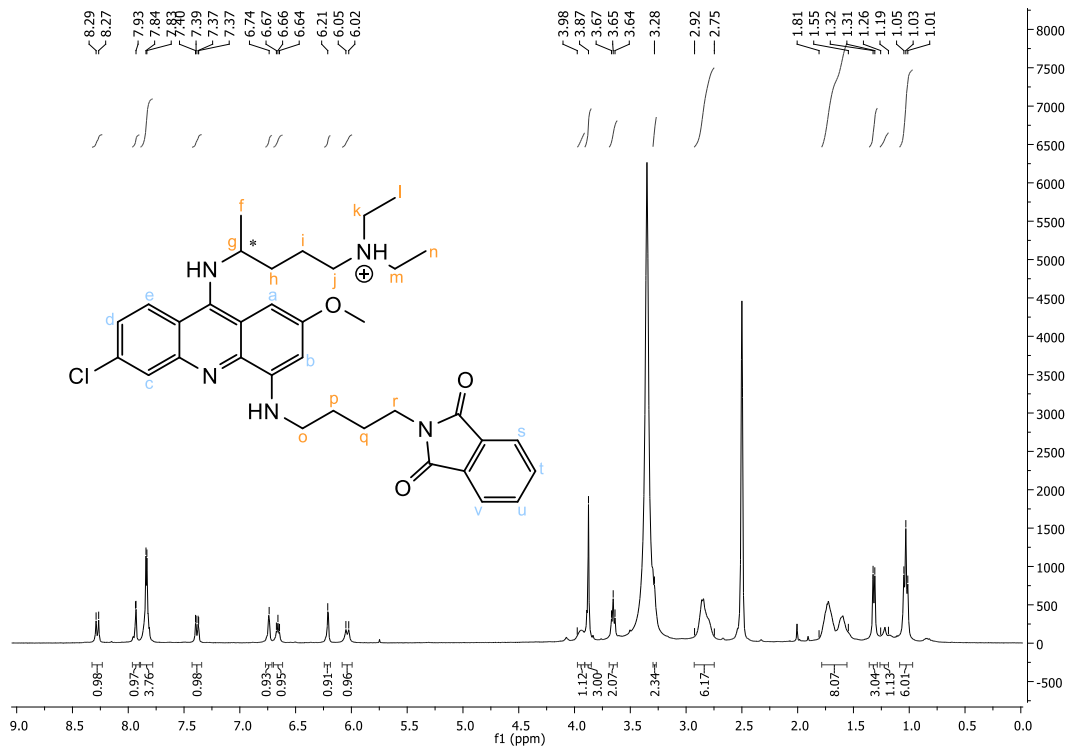


Figura 48. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto 10a.

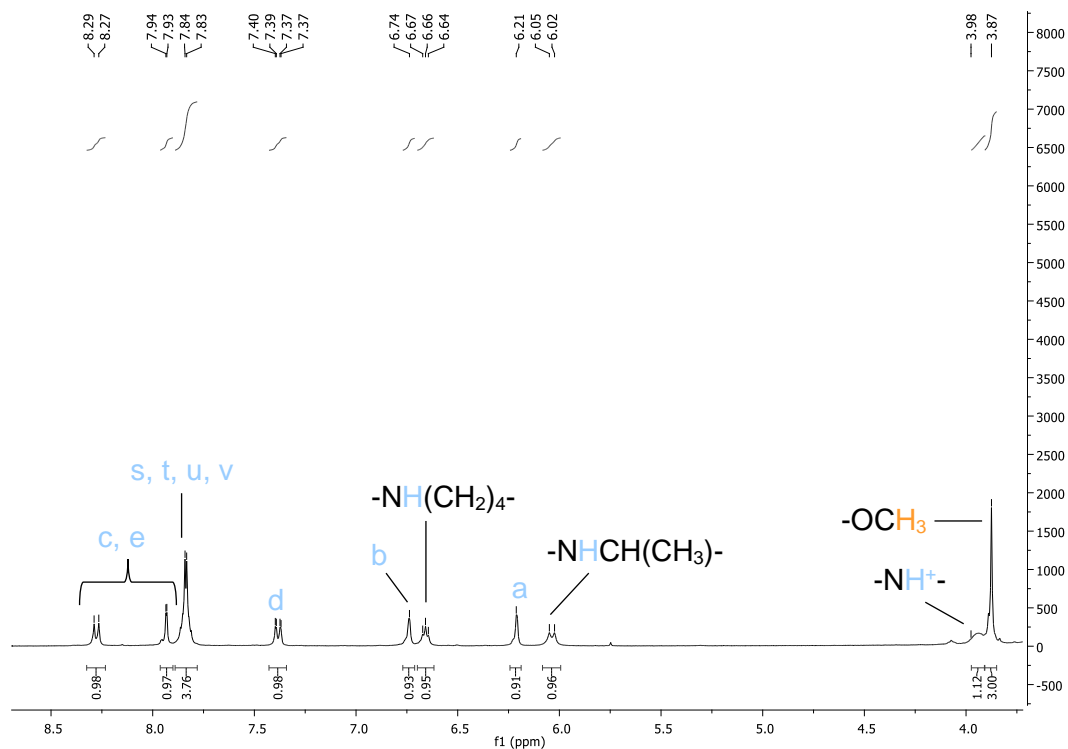


Figura 49. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto 10a no intervalo 3.50 a 8.50 ppm.

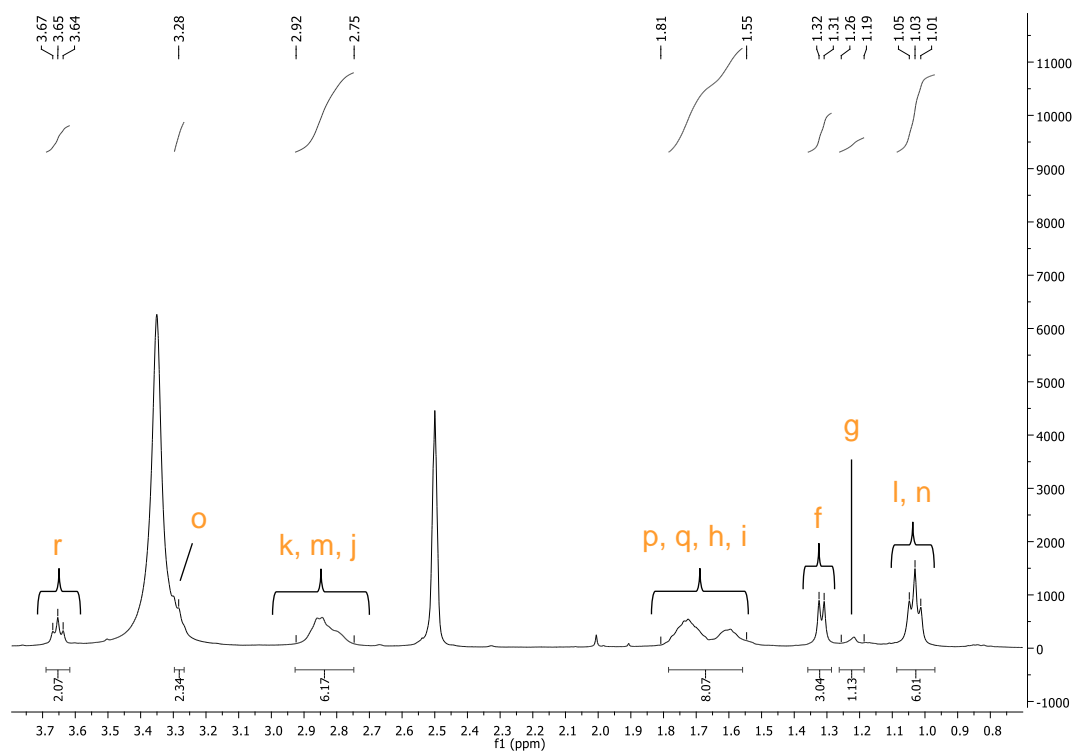


Figura 50. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto **10a** no intervalo 0.80 a 3.70 ppm.

Todos os resultados apresentados nesta secção dizem respeito à síntese da acridina substituída em C4 com uma cadeia aminoalquilamínica de quatro carbonos (**10a**). Adicionalmente, com as condições de reação otimizadas, um outro análogo com uma cadeia lateral de seis carbonos também foi sintetizado (**10b**, Figura 51). O espectro de ESI-IT MS do composto em questão encontra-se no **Anexo 8**.

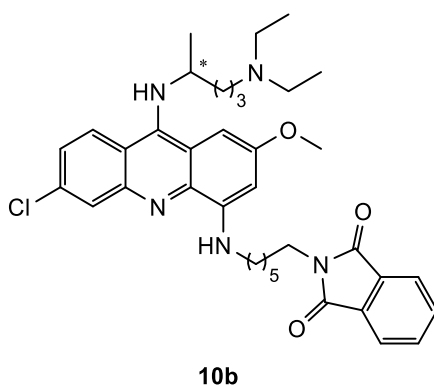
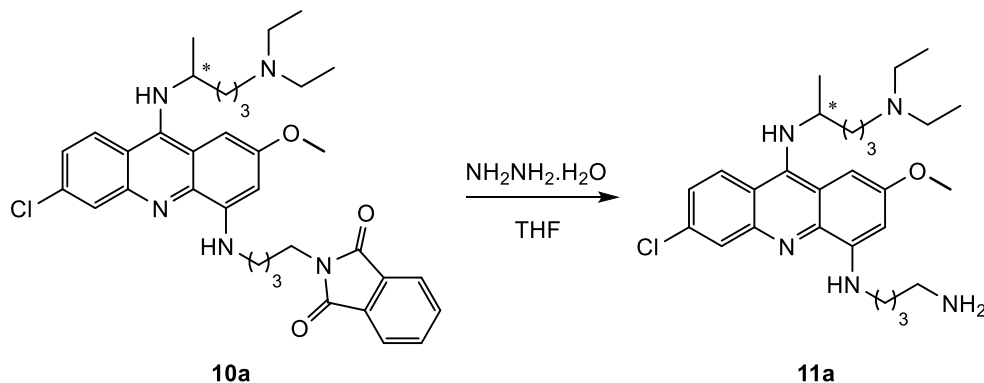


Figura 51. Estrutura química do análogo **10b**.

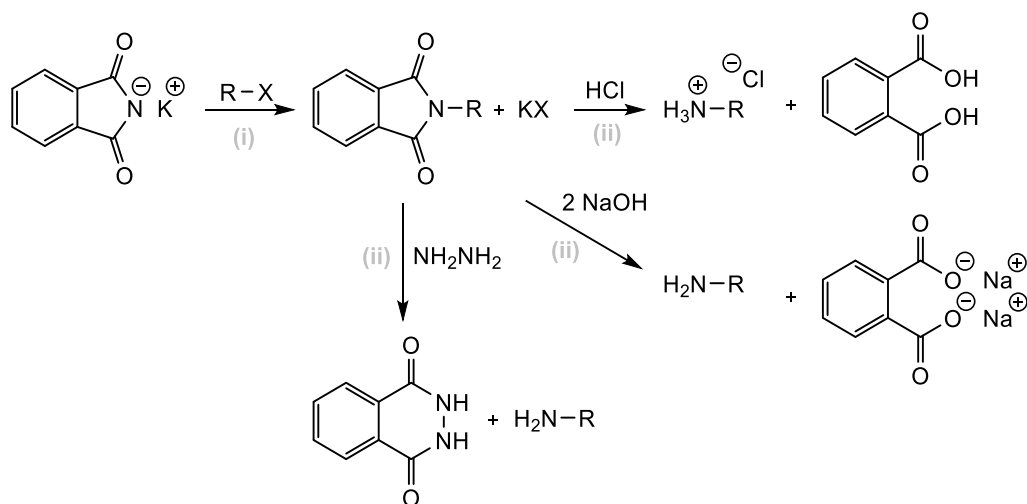
### 3.3.4. Síntese de 4-(n-aminoalquil)amino-6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (11)

O último passo reacional desta rota sintética diz respeito à formação do composto **11a**, por reação de **10a** com hidrazina, de modo a se obter o grupo amino primário livre na cadeia alquílica do produto final. Este passo corresponde ao segundo passo da síntese de Gabriel e foi primeiramente realizado mediante uma adaptação de R. Nguyen e colaboradores,<sup>101</sup> conforme descrito no esquema seguinte:



Esquema 36. Síntese do composto 11a.

A síntese de Gabriel, comumente utilizada para a síntese de aminas primárias, envolve duas principais etapas: (i) a síntese de ftalimidas *N*-substituídas e (ii) a síntese de aminas primárias (**Esquema 37**).<sup>102</sup>



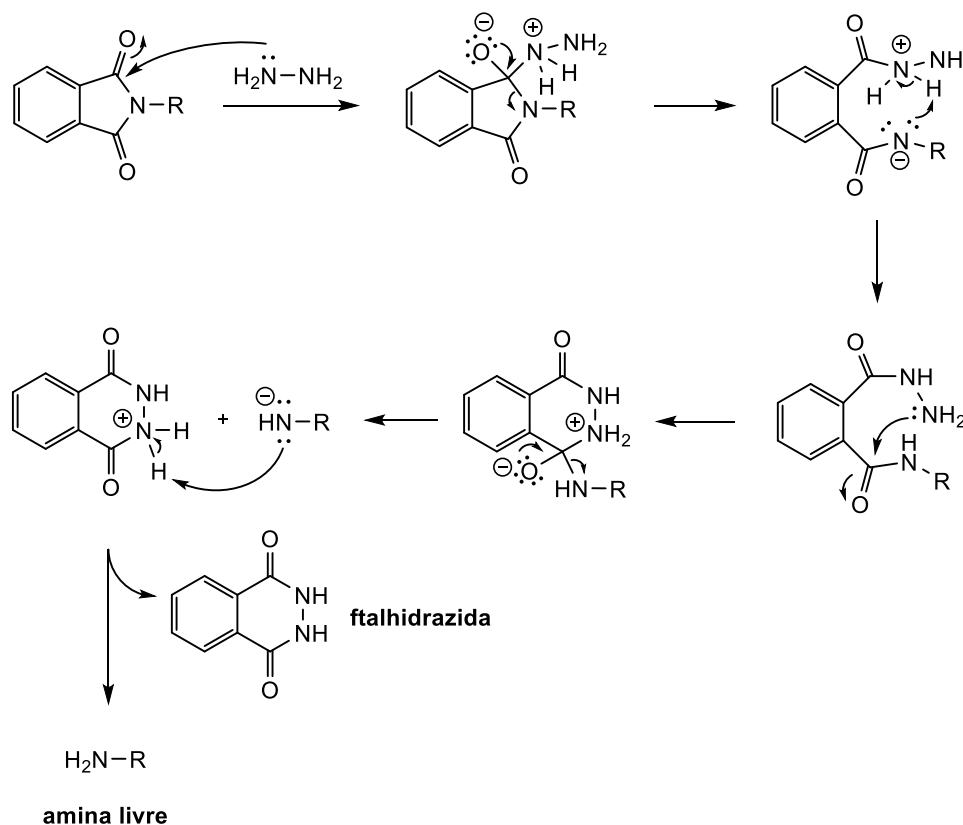
Esquema 37. Esquema geral da síntese de Gabriel.

O primeiro passo da síntese consiste na reação entre a ftalimida de potássio com o halogeneto de alquila, utilizando acetona como solvente, conforme descrito na literatura (**Esquema 37** – passo (i)).<sup>103</sup> Este passo foi inicialmente concretizado em laboratório,

mas apesar da síntese ser relativamente simples e eficaz, com o objetivo de economizar tempo, as *N*-alquilftalimidias foram adquiridas comercialmente. Por essa razão, esta parte não será discutida neste relatório.

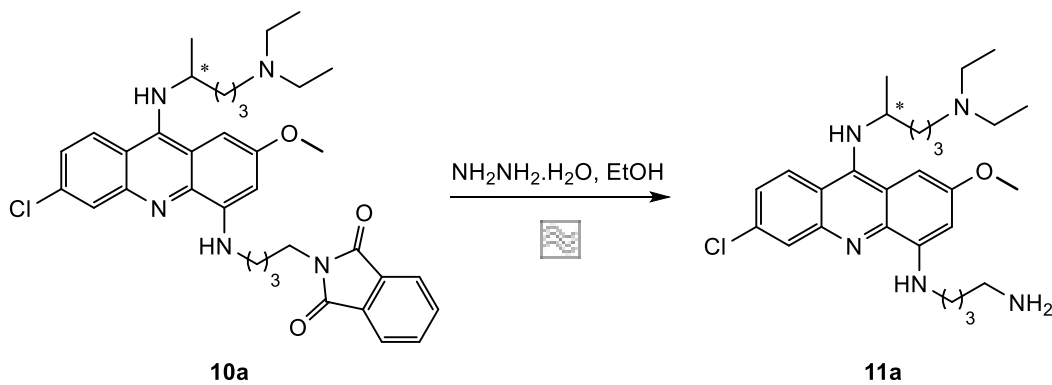
A formação da amina primária pode ser realizada por hidrólise catalisada por ácido ou base ou, em alternativa, por hidrazinólise (**Esquema 37** – passo **(ii)**). Esta última opção é uma variante da síntese de Gabriel e é designada por procedimento de Ing-Manske, onde é utilizada hidrazina ( $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ).<sup>104-105</sup>

Na hidrólise ácida é geralmente utilizado HCl, embora também possam ser utilizados outros ácidos fortes como HBr ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Por norma, a mistura reacional é aquecida sendo que em alguns casos é mesmo necessário o uso de elevadas temperaturas (até 200 °C). Embora a hidrólise básica possa ser realizada com NaOH, o procedimento utilizando  $\text{NH}_2\text{NH}_2$  é atualmente o método de eleição, uma vez que a clivagem é realizada sob condições mais suaves, permitindo a preservação de muitos grupos funcionais, incluindo aqueles sensíveis à hidrólise. Adicionalmente, o produto secundário formado, o sal de hidrazina, é facilmente separado da amina.<sup>102</sup> Existem também outros métodos alternativos que envolvem o uso de metilamina,<sup>106</sup>  $\text{NaBH}_4$ /2-propanol seguido de ácido acético,<sup>107</sup> etc.. Este tipo de reações segue um mecanismo de adição-eliminação, característico dos ácidos carboxílicos e seus derivados, como apresentado no **Esquema 38**. A reação inicia-se com o ataque nucleofílico da hidrazina ao carbono de um dos grupos carbonilo da ftalimida e conseqüente formação de um intermediário tetraédrico (adição) que depois por regeneração da dupla  $\text{C}=\text{O}$  quebra a ligação C-N (eliminação). De seguida, após desprotonação, ocorre novamente ataque nucleofílico intramolecular da amina primária presente sob outro grupo carbonilo dando origem a um intermediário tetraédrico que posteriormente elimina o amideto substituído. Este último, por sua vez, como é uma base muito forte, capta prontamente um próton da ftalhidrazida protonada, originando o produto pretendido, a amina livre, e a ftalhidrazida como produto secundário.



**Esquema 38.** Mecanismo geral da formação da amina livre utilizando  $\text{HN}_2\text{NH}_2$ .

Assim sendo, no presente trabalho, tal como descrito na literatura,<sup>101</sup> o composto **10a**, dissolvido em THF, foi colocado a reagir com  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , à temperatura ambiente, durante 4h. A reação foi seguida por CCF e, durante esse período, não se observou nenhuma alteração. Por essa razão, colocou-se a mistura reacional em refluxo a 60 °C e, passado 24 horas, quer por CCF, quer por ESI-IT MS, comprovou-se a formação do composto de interesse. Assim, conclui-se que o aquecimento é um fator importante para a reação ocorrer com sucesso. Contudo, tendo em conta os bons resultados obtidos em **3.2.2.** relativamente à utilização do MW, esta reação foi também testada em MW nas mesmas condições (THF e  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ) apenas aumentando a temperatura para 100 °C que, tal como referido, revelou ser um fator importante. No entanto, a reação não ocorreu devido ao THF não ser um bom solvente para utilizar no MW,<sup>93</sup> tendo sido posteriormente substituído por EtOH (conforme descrito no **Esquema 39**). O EtOH foi eleito por ser, não só um excelente solvente para utilizar em MW, mas, principalmente, por ser muito usado neste tipo de reações com hidrazina.<sup>76, 102</sup>



Esquema 39. Síntese do composto 11a.

Por ESI-IT MS verificou-se que, após 30 minutos no MW, o produto formado começou a ser hidrolisado, dando origem ao composto sem a cadeia aminoalquilamínica da posição 9 do núcleo, com  $m/z = 330,60$  (**Figura 52**).

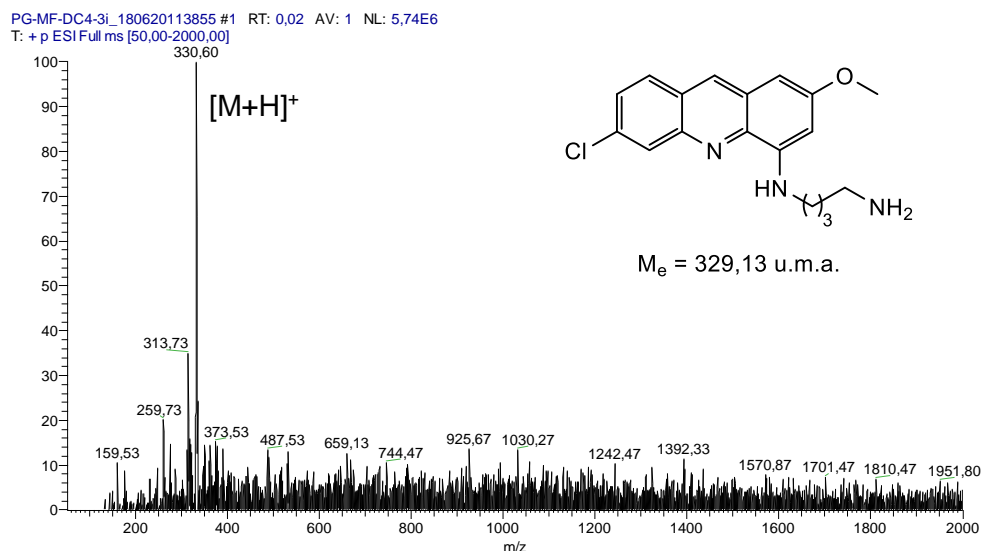


Figura 52. Espectros de massa (ESI-IT MS em modo positivo) da mistura reacional após 30 minutos no MW.

Após o tratamento da mistura reacional, que consistiu, em ambos os casos (método convencional e método via MW) em extrações líquido-líquido, prosseguiu-se para a purificação, que não pôde ser realizada pelo método convencional, isto é, por cromatografia de adsorção em gel de  $\text{SiO}_2$ , devido ao composto ser muito polar, consequência dos grupos amino presentes na sua estrutura. Como alternativa, foi realizada uma purificação em coluna de fase reversa ( $\text{SiO}_2$  modificada com C18), com uma eluição de 15% ACN em  $\text{H}_2\text{O}$  (0,05% TFA). A sílica C18 contém igualmente, como a  $\text{SiO}_2$  comum, os grupos Si-O, mas estes estão ligados covalentemente a cadeias apolares de 18 carbonos. Desta forma, a fase estacionária torna-se apolar e, por essa

razão, os compostos polares, como é o caso, não ficam retidos na coluna e são os primeiros a serem eluídos.

A análise do composto impuro por LC-MS e por HPLC permitiu a escolha do eluente a utilizar na purificação e, após essa escolha, a coluna foi preparada da mesma forma que uma coluna convencional, tal como apresentado na **Figura 53**. Depois de isoladas e combinadas as frações contendo o composto puro, procedeu-se a uma extração líquido-líquido utilizando uma solução aquosa básica com o objetivo de obter novamente o composto sob a forma de amina livre (uma vez que o eluente utilizado continha H<sub>2</sub>O com 0,05% de TFA).



**Figura 53.** Montagem da pequena coluna de SiO<sub>2</sub> C18.

Assim sendo, na **Tabela 8** estão sumariados os resultados obtidos para as duas tentativas de síntese efetuadas. Conclui-se que a síntese da 4,9-diaminoalquilaminoacridina **11a** apresentada sob a forma de um óleo amarelo, que era o principal objetivo deste trabalho de dissertação, foi realizada com sucesso, com um rendimento de 18,5% ou 9,92%, dependendo do método de síntese utilizado ter sido o método convencional ou via MW, respetivamente. Apesar disso, o rendimento obtido foi bastante baixo comparativamente com os rendimentos descritos na literatura para compostos semelhantes<sup>76</sup> e, por essa razão este passo reacional ainda está em processo de otimização. Tendo em conta os resultados obtidos, conclui-se que a síntese do composto não deve ser realizada via MW devido aos produtos secundários formados, incluindo um análogo do composto **11a** sem a cadeia lateral na posição 9 do núcleo. A solução passará, em primeiro lugar, por repetir o método descrito com THF e NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> a 60 °C, uma vez que durante a síntese existiu um percalço induzindo à perda de composto, e por essa razão espera-se um aumento significativo do rendimento na próxima repetição. Caso os resultados não sejam promissores, outras alternativas de



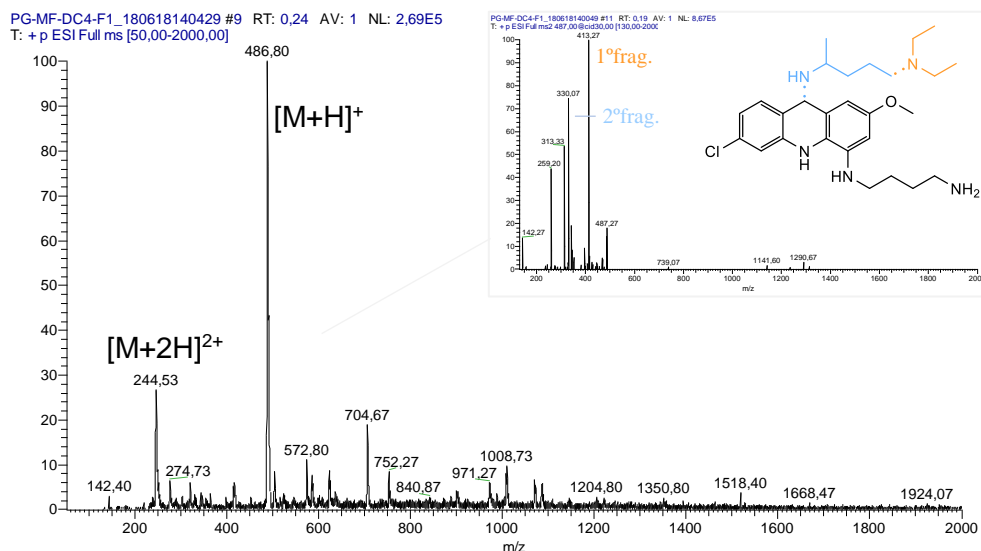
síntese utilizando, por exemplo, metilamina<sup>106</sup> ou NaBH<sub>4</sub>/2-propanol seguido de ácido acético,<sup>107</sup> serão abordadas.

**Tabela 8.** Resultados obtidos na síntese do composto **11a** (MM = 486,10 g.mol<sup>-1</sup>, óleo amarelo).

Método	<i>m</i> <sub>obtida</sub> / g	$\eta$ / %	Pureza / %
Convencional	0,0078	18,5	94,6 - 96,9
Microondas	0,0138	9,90	

Para finalizar, a análise estrutural do composto obtido (**11a**) e a análise da sua pureza foi realizada por ESI-MS e <sup>1</sup>H-RMN e por HPLC, respetivamente, conforme apresentado a seguir.

No espectro de ESI-IT MS em modo positivo apresentado na **Figura 54**, é visível um pico-base a *m/z* = 486,80 correspondente ao ião quasi-molecular ([M+H]<sup>+</sup>) do produto esperado, cuja M<sub>e</sub> é 485,29 u.m.a.. Adicionalmente, observa-se um pico minoritário a *m/z* = 244,53 correspondente ao ião [M+2H]<sup>2+</sup>. O subsequente estudo de fragmentação do ião [M+H]<sup>+</sup> evidenciou a perda da amina terciária da cadeia aminoalquilamínica da posição 9 do núcleo da acridina (*m/z* = 413,27) e a perda total dessa mesma cadeia com consequente rearranjo estrutural (*m/z* = 330,07).

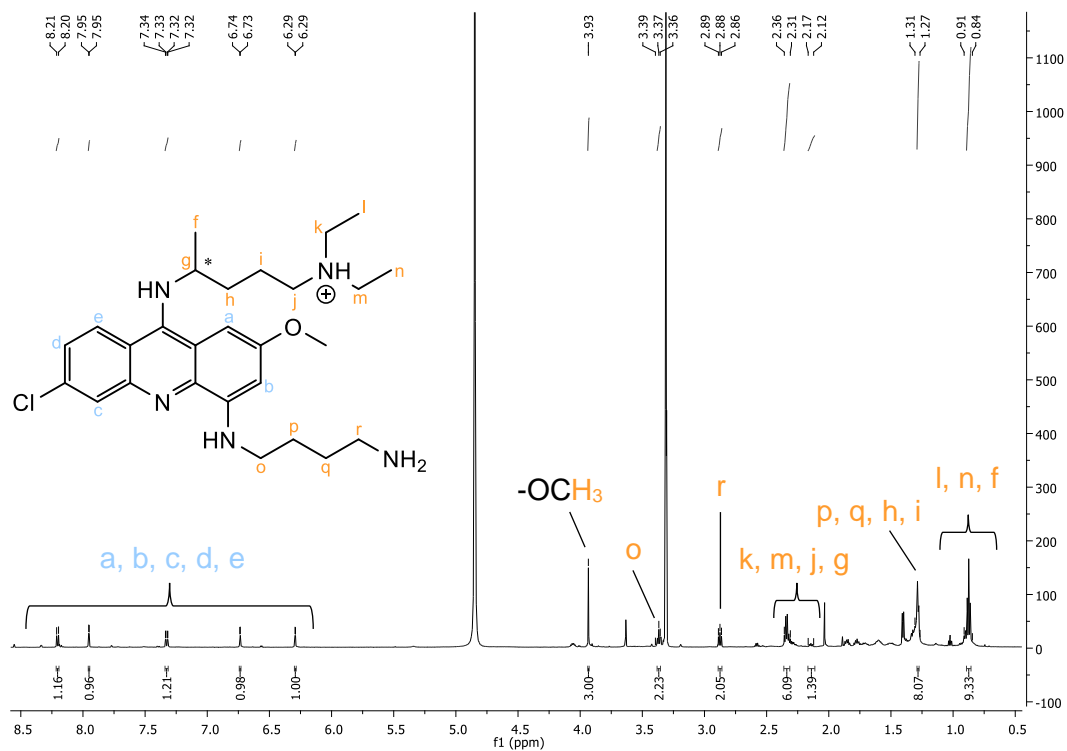


**Figura 54.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **11a** e, no canto superior direito, o espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) correspondente à sua fragmentação.

Pela análise do espectro de <sup>1</sup>H-RMN apresentado na **Figura 55**, confirma-se a síntese do composto de interesse apesar do espectro estar com interferência de solventes e possíveis impurezas do material utilizado. Na zona aromática do espectro (**Figura 56**)

confirma-se a presença dos prótons característicos do anel da acridina (Ha, Hb, Hc, Hd e He) e a ausência dos prótons característicos do anel da ftalimida confirmando assim a remoção deste grupo. Uma vez que o espectro foi realizado em metanol deuterado não se observam os picos relativos às aminas existentes. No que diz respeito à zona alifática do espectro (**Figura 57**), confirma-se a presença dos picos correspondentes aos prótons (ii) do grupo metoxilo, (ii) da cadeia lateral da posição 9 (Hf, Hg, Hh, Hi, Hj, Hk, Hm, Hl e Hn) e (ii) da cadeia lateral da posição 4 (Ho, Hp, Hq, Hr).

As atribuições das multiplicidades e constantes de acoplamento associadas a cada sinal identificado no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN encontram-se descritas com detalhe na Parte Experimental.



**Figura 55.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ ) do composto 11a.

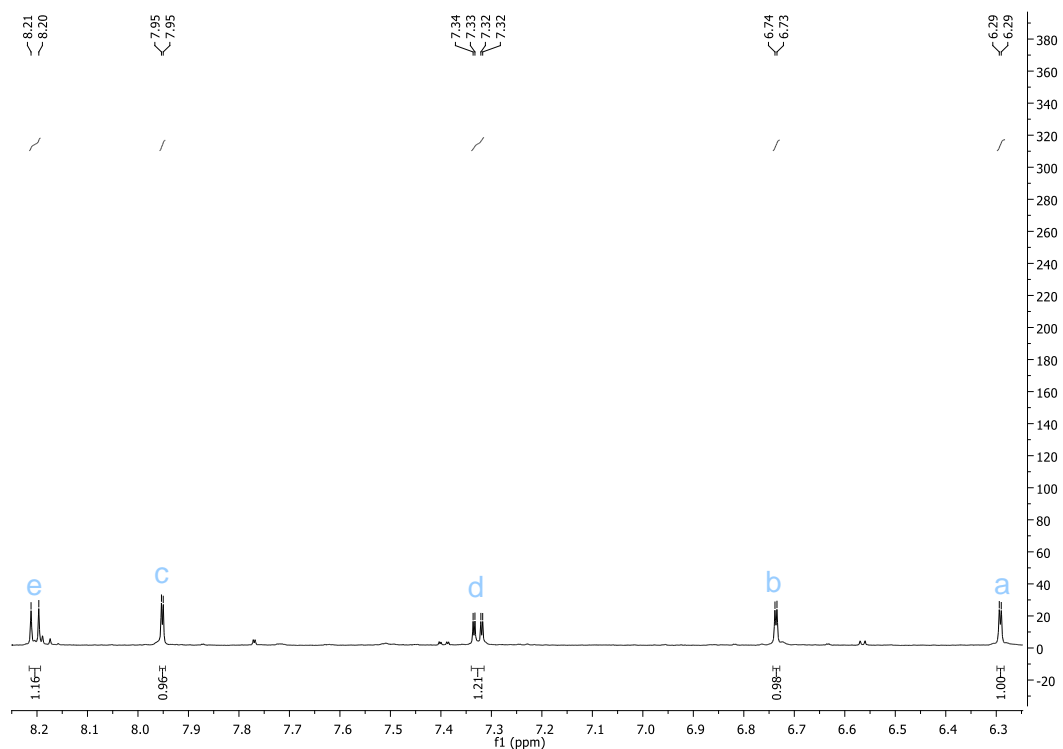


Figura 56. Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ ) do composto **11a** no intervalo 6.30 a 8.20 ppm.

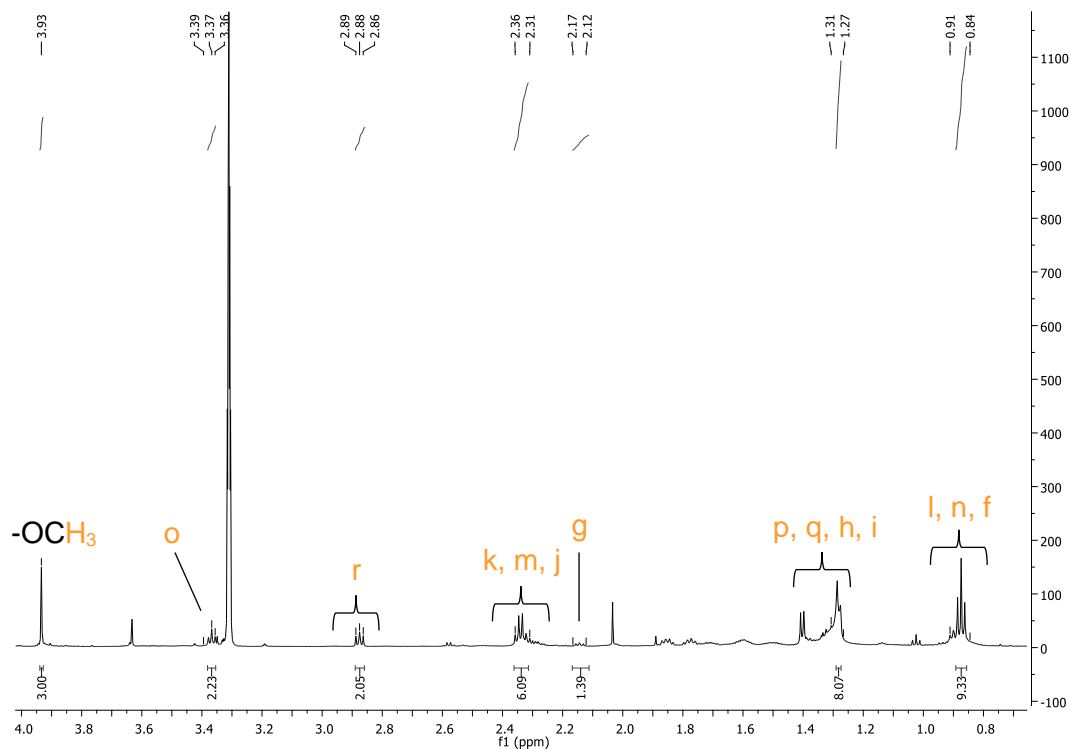
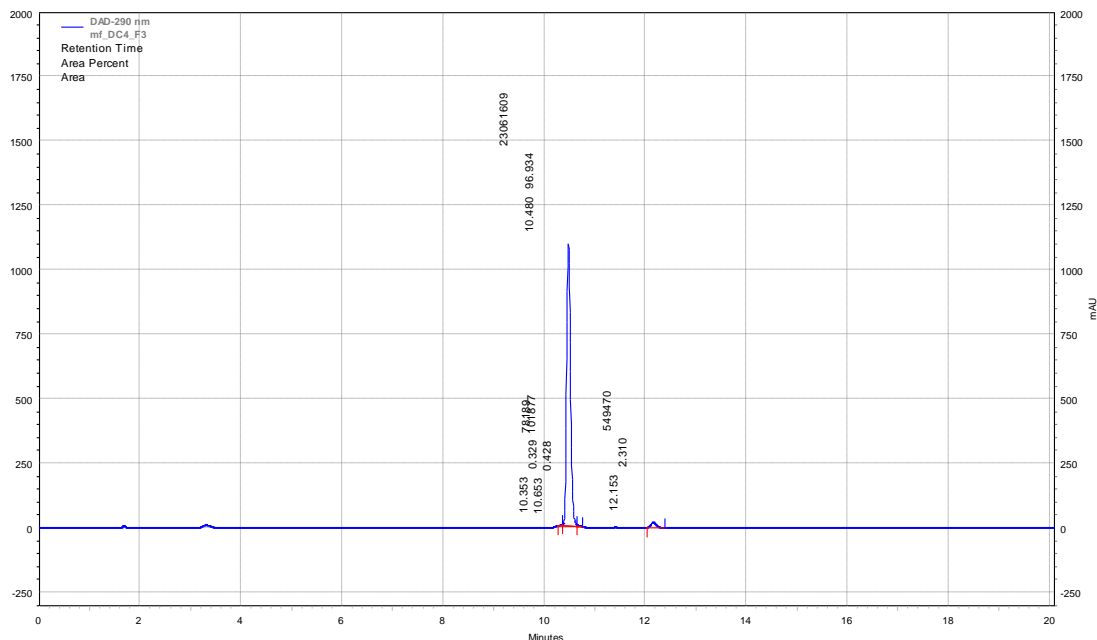


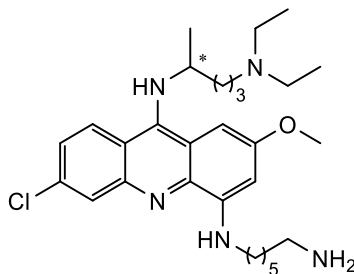
Figura 57. Espetro de  $^1\text{H}$ -RMN (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ ) do composto **11a** no intervalo 0.80 a 4.00 ppm.

Na **Figura 58** está apresentado o cromatograma obtido para o composto em questão (**11a**), confirmando-se, deste modo, a eficiência da purificação alternativa utilizada (sílica modificada com C18) visto que se obteve o composto de interesse com uma pureza elevada de 96,9%.



**Figura 58.** Cromatograma obtido para o composto **11a**, com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5  $\mu$ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao  $\lambda = 290$  nm.

Adicionalmente, após otimização das condições experimentais, o análogo **11b** (**Figura 59**), que contém a cadeia de 6 carbonos na posição 4 do núcleo da acridina em vez da cadeia de 4 carbonos, também já foi sintetizado, encontrando-se os dados referentes à sua caracterização por ESI-IT MS bem como a avaliação da sua pureza por HPLC no **Anexo 9**.



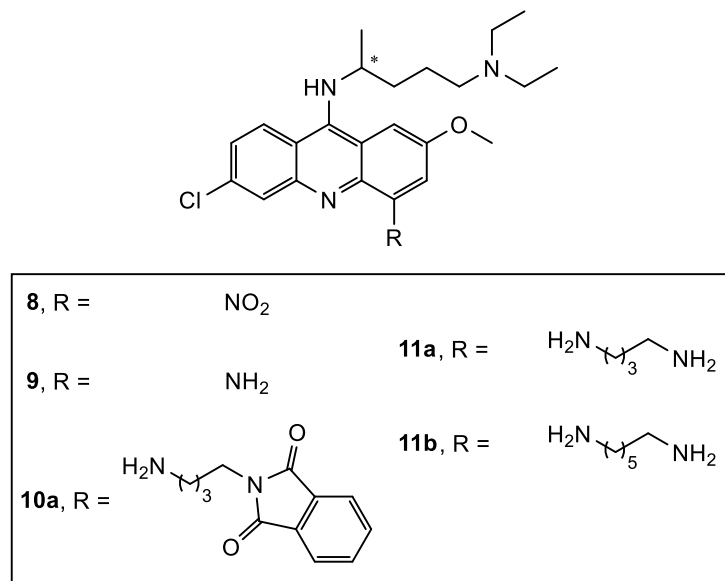
**11b**

**Figura 59.** Estrutura química do análogo **11b**.

### 3.4. Ensaio biológicos

#### 3.4.1. Atividade antimalárica na fase sanguínea

No âmbito deste trabalho, além da síntese dos derivados 4,9-diaminoacridinas, um dos objetivos principais era a avaliação *in vitro* da atividade antimalárica dos compostos finais (**11a** e **11b**, **Figura 60**), bem como dos intermediários de síntese (**8-10a**, **Figura 60**).

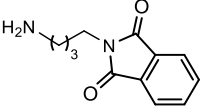
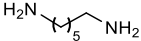


**Figura 60.** Estrutura dos compostos (**8-11b**) enviados para ensaios biológicos.

Assim sendo, os compostos foram avaliados *in vitro* contra estirpes do *P. falciparum* (sensíveis e resistentes à CQ) na fase sanguínea, em colaboração com o grupo do Dr. Xavier Fernández-Busquets do Instituto de Bioengenharia da Catalunha, Barcelona, Espanha.

A parasitemia das culturas de células foi verificada por citometria de fluxo, após a coloração dos parasitas com SYTO 11 (coloração de ácido nucleico verde fluorescente) e 42 horas de incubação (5% CO<sub>2</sub> a 37°C), conforme descrito na referência 108. E, de seguida, a análise estatística dos resultados foi realizada usando o programa *GraphPad Prism*, versão 5.0 para Windows (*one-way* ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os resultados obtidos até ao momento contra uma estirpe sensível à CQ (3D7) encontram-se apresentados na seguinte tabela.

**Tabela 9.** Resultados de IC<sub>50</sub> contra uma estirpe sensível à CQ (3D7) para os compostos **8-11b** e fármacos de referência.

Composto	R	IC <sub>50</sub> / nM
		<i>Pf</i> 3D7
<b>8</b>	NO <sub>2</sub>	282,9
<b>9</b>	NH <sub>2</sub>	447,2
<b>10a</b>		516,7
<b>11b</b>		265,4
<b>QN</b> <sup>[a]</sup>	-	100
<b>CQ</b> <sup>[b]</sup>	-	21,0

[a] Valores retirados da referência 109; [b] Valores retirados da referência 50.

Conforme descrito na **Tabela 9**, observa-se que todos os compostos apresentaram atividade antimalárica *in vitro* na gama sub-micromolar ( $265,4 \text{ nM} < \text{IC}_{50} < 516,7 \text{ nM}$ ), o que, por si só, já é um resultado bastante animador. De todos, o composto **11b** foi o mais potente, apesar de, tal como os outros, não ser mais ativo que os fármacos de referência QN ( $\text{IC}_{50} = 100 \text{ nM}$ ) e PQ ( $\text{IC}_{50} = 21,0 \text{ nM}$ ). Assim, conclui-se que a introdução da cadeia aminoalquilamínica na posição 4 do núcleo da acridina não induz a perda de atividade na fase sanguínea.

Embora o composto final tenha sido o mais ativo, todos os seus precursores também apresentaram atividade, tendo o composto **8** (que contém o grupo nitroílo na posição 4 do núcleo da acridina) exibido uma atividade bastante próxima do **11b**. Em contrapartida, observou-se a perda de atividade quando o composto apresenta uma amina primária nessa mesma posição (composto **9**), assim como quando essa amina primária se encontra protegida pelo grupo ftalimida (**10a**).

Contudo, estes compostos encontram-se ainda em fase de avaliação contra uma estirpe resistente à CQ (W2) e espera-se que estes apresentem atividade antimalárica *in vitro* na fase sanguínea melhor que a CQ.

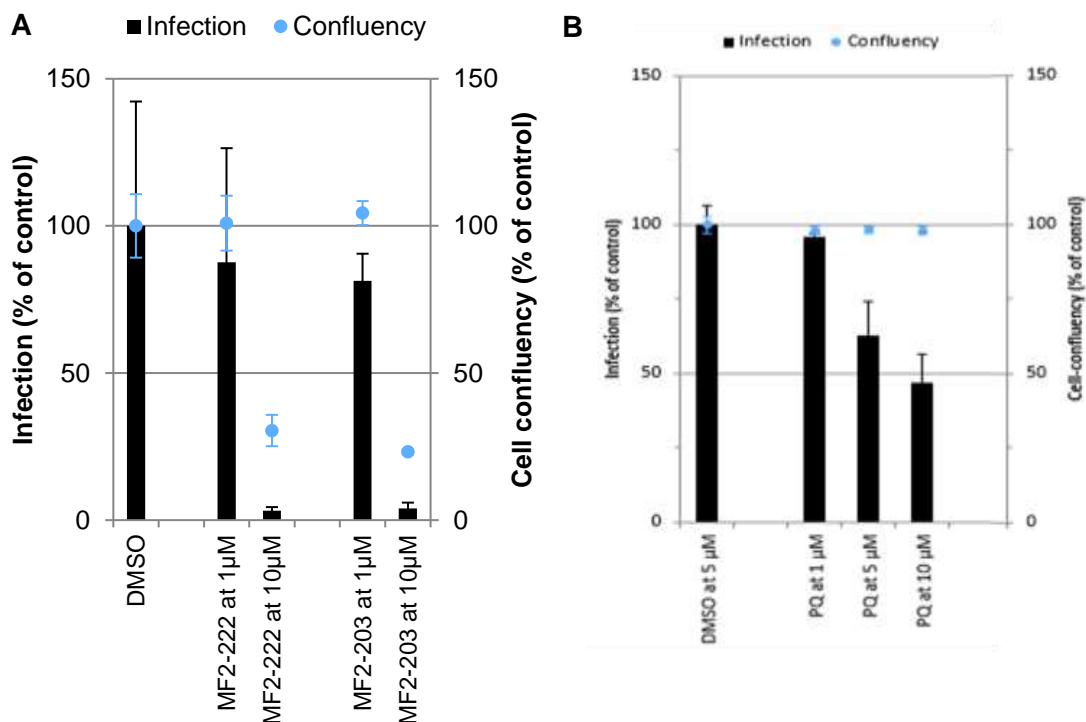
Adicionalmente, os compostos estão atualmente em avaliação contra os gametócitos do parasita, no grupo da Dra. Fátima Nogueira do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa.

### 3.4.2. Atividade antimalárica na fase hepática

Paralelamente, também foi realizada a avaliação dos compostos *in vitro* contra formas hepáticas de *P. berghei*, em colaboração com o grupo de investigação do Dr. Miguel Prudêncio do IMM da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

A percentagem de inibição da infeção causada pelo parasita foi quantificada utilizando o ensaio Luciferase (ensaio de luminescência), cuja metodologia utilizada pelo grupo de investigação se encontra explicada detalhadamente na referência 50. De uma forma geral, após a realização da lise celular dos hepatócitos, a enzima luciferase, que é expressa no *P. berghei*, reage com substratos adicionados (lucoferina) ao lisado das células, resultando na emissão de uma quantidade de luz que é proporcional à taxa de parasitemia no lisado. Neste caso, o corante AlamarBlue é utilizado para avaliar a confluência das células antes da lise celular.

Até ao momento apenas dois compostos (**10a** e **11b**) foram avaliados contra formas hepáticas do parasita *P. falciparum*, conforme apresentado na figura seguinte.



**Figura 61.** Gráfico com os resultados preliminares de atividade antimalárica dos compostos **10a** (MF-203) e **11b** (MF-222) (A), e da referência PQ (B) na fase hepática do parasita.

Resultados preliminares, apresentados na **Figura 61**, demonstraram que os compostos **10a** e **11b** à concentração de 1 µM não exibem praticamente atividade antimalárica, uma vez que a infeção causada pelo parasita no hospedeiro é apenas diminuída em aproximadamente 19% e 12%, respetivamente. Em contrapartida, à

concentração de 10  $\mu\text{M}$  ambos os compostos demonstram capacidade de reduzir em aproximadamente 96-97% a infecção causada pelo parasita. Capacidade essa que é ligeiramente melhor que o composto de referência nesta fase, **PQ** (inibição em 84% para a mesma concentração, **Figura 61**). Estes resultados acabam por ser bastante interessantes na medida em que a QN é desprovida de atividade antimalárica na fase hepática da doença. Deste modo, conclui-se que a introdução da cadeia em questão na posição 4 confere aos compostos atividade nessa fase da doença.

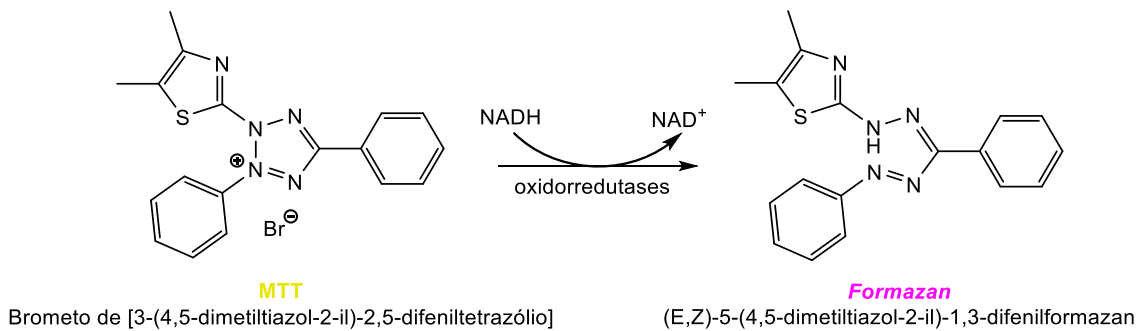
Apesar dos resultados preliminares de atividade antimalárica serem animadores, quando avaliados em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) apresentaram elevada citotoxicidade, maior que a referência (**Figura 61**, PQ:  $\text{IC}_{50} = 3,35 \mu\text{M}$ ). Porém, é de notar que a citotoxicidade foi avaliada em células HepG2 que são células antitumorais do fígado, o que indica que estes compostos possam ser potenciais antitumorais. Tal facto não foi uma surpresa uma vez que estes compostos apresentam um núcleo de acridina, farmacóforo conhecido por intercalar com o ADN e, conseqüentemente, conferir aos compostos propriedades antitumorais.

#### 3.4.3. Atividade antitumoral

Com base nos resultados de citotoxicidade obtidos em células HepG2 (secção 3.4.2.) e em resultados reportados na literatura que evidenciam o potencial antitumoral do farmacóforo acridina,<sup>110</sup> estes compostos (**9-11a**) foram também avaliados *in vitro* em linhagens celulares de carcinoma gástrico (MKN-28) e colorretal (Caco-2), e quanto à sua citotoxicidade em fibroblastos do prepúcio humano (HFF-1).

A avaliação da viabilidade metabólica foi realizada utilizando o ensaio MTT. O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico baseado na avaliação da atividade metabólica celular que determina a viabilidade celular. O MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), de coloração amarela, entra nas células e é metabolizado ao nível mitocondrial, onde é reduzido por oxidoredutases dependentes de NADPH, gerando um produto insolúvel, o *formazan* ((*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan), de cor púrpura. Os cristais de *formazan* são depois solubilizados com um solvente orgânico (geralmente DMSO), e a absorvância é medida a aproximadamente 570 nm utilizando um leitor de placas (**Esquema 40**).



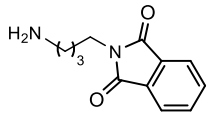
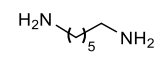


**Esquema 40.** Esquema da reação redox de conversão do MTT em *formazan* que ocorre dentro das células viáveis.

Assim sendo, como a redução do MTT só pode ocorrer em células metabolicamente ativas, o nível de atividade é uma medida da viabilidade celular. A formação de cor (púrpura) e a intensidade da mesma é diretamente proporcional à viabilidade celular e, portanto, uma diminuição da absorvância sugere efeito citotóxico do composto testado pela diminuição das células metabolicamente ativas, incapazes de reduzir o MTT.

Este ensaio foi realizado em colaboração com o grupo de investigação do Dr. Nuno Mateus pertencente ao QUINOA-LAQV (<https://www.foodphenolab.com/>), de acordo com o método desenvolvido pelo mesmo grupo, cuja metodologia utilizada se encontra já bem estabelecida.<sup>51</sup> De uma forma geral, para a realização deste ensaio, após a incubação das células com os compostos durante 48 horas, retirou-se o meio dos poços da placa de 96 poços e estes foram lavados com tampão fosfato salino (PBS). Posteriormente, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de solução MTT a cada poço (0,45 mg/ml) e incubou-se a placa numa atmosfera controlada (5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ ) durante 1 a 2 horas. Os cristais que se formaram foram dissolvidos em DMSO e procedeu-se à leitura da densidade ótica a 570 nm, após incubação por 10 minutos. A análise estatística dos resultados foi realizada usando o programa *GraphPad Prism*, versão 5.0 para Windows (*one-way ANOVA*), seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os resultados obtidos no ensaio de MTT estão sumariados na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Actividade antiproliferativa *in vitro*, expressa como IC<sub>50</sub> (média ± erro padrão de duas experiências independentes com quatro repetições para cada concentração, n = 8), dos compostos **8-11a** contra linhagens celulares de MKN-28, Caco-2 e HFF-1.

Composto	R	IC <sub>50</sub> / μM			SI <sup>[b]</sup>
		HFF-1	Caco-2	MKN-28	
<b>8</b>	NO <sub>2</sub>	14,05 ± 0,26	4,43 ± 0,51	2,93 ± 0,15	3,17
<b>9</b>	NH <sub>2</sub>	16,02 ± 0,49	5,49 ± 0,26	6,19 ± 0,04	2,59
<b>10a</b>		18,46 ± 0,20	7,28 ± 0,46	6,59 ± 0,01	2,54
<b>11a</b>		13,64 ± 0,65	10,01 ± 0,52	4,70 ± 0,61	1,36
<b>QN<sup>[a]</sup></b>	-	10,59 ± 0,73	2,37 ± 0,02	2,46 ± 0,11	4,30

[a] Valores retirados da referência 51. [b] Índice de seletividade (SI): razão entre citotoxicidade em HFF-1 / citotoxicidade em linhagens tumorais, usando o valor de IC<sub>50</sub> determinado para o composto menos potente.

As quatro acridinas sintetizadas apresentaram atividade antiproliferativa moderada contra as duas linhagens tumorais, com atividade ligeiramente melhor para MKN-28 (IC<sub>50</sub> = 2,93 - 6,59 μM) do que para Caco-2 (IC<sub>50</sub> = 4,43 - 10,01 μM). De todos os compostos, o composto **8** foi o que que exibiu melhor atividade antitumoral (IC<sub>50</sub> = 2,93 μM e 4,43 μM para MKN-28 e Caco-2, respetivamente; **Tabela 10**). Estes resultados já eram, de certo modo, expectáveis visto que resultados de estrutura-atividade reportados na literatura sobre análogos de acridina indicam que o grupo nitroílo na sua estrutura concede uma boa atividade antitumoral e que esta depende da sua posição no anel da acridina.<sup>111</sup> No entanto, a atividade deste composto não se apresentou superior ao fármaco de referência **QN** (MKN-28: IC<sub>50</sub> = 2,46 μM; Caco-2: IC<sub>50</sub> = 2,37 μM).<sup>51</sup>

Posto isto, de modo a avaliar a seletividade dos compostos para as células antitumorais em relação às células normais, a sua citotoxicidade foi avaliada em células HFF-1. O índice de seletividade (SI) apresentado também na **Tabela 10** resulta do quociente entre os valores de citotoxicidade obtido nas células HFF-1 sob os valores obtidos em células antitumorais do composto menos potente. Perante os resultados, conclui-se que os compostos são bastante citotóxicos em células normais e, apesar de exibirem uma menor citotoxicidade que a referência **QN** (IC<sub>50</sub> = 10,59 μM),<sup>51</sup> têm índices de seletividade bastante baixos (SI < 5).<sup>112</sup>

Contudo, com base em resultados obtidos pelo grupo de investigação (ainda não publicados) para análogos não contendo a cadeia lateral na posição 9, conclui-se que a

citotoxicidade advém da presença dessa cadeia, uma vez que esses outros compostos apresentam um valor de  $IC_{50}$  contra HFF-1 muito superior. Por essa razão, de modo a preservar a atividade antitumoral e antimalárica *in vitro* (e, se possível melhorá-la) e diminuir a citotoxicidade, modificações estruturais ao nível da cadeia na posição 9 poderão alcançar resultados mais promissores.

Em suma, os compostos demonstraram possuir atividade antimalárica *in vitro* multi-alvo (exibiram atividade antimalárica em duas fases distintas do ciclo de vida do parasita), preservando assim a atividade dos compostos que lhe deram origem, que era o principal objetivo aquando do desenho racional para síntese destes derivados. Adicionalmente, ainda demonstraram atividade antitumoral *in vitro* em diferentes linhagens celulares. Assim sendo, apesar de serem necessárias alterações estruturais dos compostos para melhorar as propriedades biológicas, os resultados obtidos foram acima de tudo bastantes animadores.



## **CAPÍTULO 4**

---

### **Conclusão e Perspetivas futuras**



## 4. Conclusão e Perspetivas futuras

Em retrospectiva, é possível assumir que todos os objetivos do trabalho propostos no âmbito desta Dissertação, centrados na síntese, purificação, caracterização e avaliação *in vitro* de derivados de 4,9-diaminoacridinas, foram atingidos com sucesso.

Resumidamente, como primeira escolha foi desenvolvida uma rota sintética, denominada ao longo do trabalho por Rota A, que consistiu na introdução em primeiro lugar da cadeia lateral na posição 4 do núcleo da acridina substituído. Esta rota foi interrompida no passo reacional de introdução dessa mesma cadeia, por questões de baixo rendimento ( $\approx 10\%$ ). Rendimentos estes que poderão estar associados com a instabilidade causada pelo cloro na posição 9 do núcleo da acridina levando à formação de bastantes produtos secundários. Como alternativa, foi desenvolvida a Rota B que difere da rota A na introdução em primeiro lugar da cadeia lateral na posição 9 do núcleo da acridina. Assim, esta rota permitiu a obtenção dos compostos-alvo **11a** e **11b** com sucesso, tendo estes sido isolados com elevados graus de pureza ( $\approx 96\%$ ) e caracterizados através de técnicas correntes de análise orgânica estrutural (ESI-IT MS e RMN). Os rendimentos das reações foram, de uma forma geral, razoáveis a bons ( $\eta \approx 54,4-100\%$ ), à exceção dos obtidos nos dois últimos passos reacionais (passos **xi**) e **xii**) correspondentes, respetivamente, à *N*-alquilação na posição 4 do núcleo da acridina ( $\eta \approx 30\%$ ) e formação da correspondente amina livre ( $\eta \approx 19\%$ ). Com o objetivo de que a síntese destes derivados seja, de um modo geral, mais rápida, simples e eficiente para, caso seja de interesse, a efetuar em larga escala (aplicável a nível industrial), a evolução deste projeto passará eventualmente por desenvolver uma rota sintética alternativa, na qual poderão ser testados os procedimentos seguintes:

- Síntese do núcleo da acridina (passo **v**) utilizando a mesma metodologia, mas sob condições de MW, conforme descrito na referência 113 (1,5 minutos; 100 °C). Este procedimento é mais fácil e leva a uma redução substancial do tempo de reação.
- Com base nos excelentes resultados obtidos no passo **ii**), realizar a *N*-alquilação na posição 4 do núcleo da acridina (passo **xi**) utilizando como grupo de saída da cadeia alquilante um grupo triflato em vez de um halogeneto.
- Repetir o último passo da síntese (passo **xii**) otimizando questões de tempo e temperatura que se comprovaram ser essenciais.

Relativamente aos ensaios antimaláricos *in vitro* da fase sanguínea para os compostos **8-11b**, o composto **11b**, em conjunto com o composto **8**, foram os que apresentaram melhores atividades, na gama nanomolar, contra uma estirpe sensível à

CQ (3D7) embora os resultados não tenham sido melhores que para os compostos de referência, QN e CQ. No entanto, é previsível que os derivados **8** e **11b** exibam melhores atividades que a CQ quando avaliados contra a estirpe resistente à mesma (W2), cujos ensaios estão neste momento a decorrer. Por outro lado, nos ensaios *in vitro* contra formas hepáticas de *P. berghei*, os compostos **10** e **11b** demonstraram possuir atividade antiparasitária semelhante à atividade da PQ, mas revelaram também serem muito citotóxicos quando testados contra células HepG2. É de referir que a avaliação da atividade antimalárica dos compostos sintetizados contra gametócitos de *P. falciparum* ainda está a decorrer. Ainda assim, é possível concluir que estes compostos apresentaram para já atividade antimalárica dual, isto é, em duas fases distintas do ciclo de vida do parasita, que era um dos principais objetivos pretendidos aquando do desenho racional destes derivados.

Relativamente à avaliação da atividade antitumoral *in vitro* dos derivados, realizada no seguimento da citotoxicidade observada para os compostos, o derivado **8** apresentou a maior atividade antitumoral *in vitro* para ambas as linhagens testadas (MKN-28 e Caco-2), no entanto, demonstrando também uma elevada citotoxicidade em células HFF-1. Com base em resultados (ainda não publicados) do grupo de investigação, correspondendo à atividade para compostos análogos que apenas apresentam a cadeia na posição 4 ( $52,3 < IC_{50} < 114 \mu M$  contra HFF-1), sabe-se que a citotoxicidade dos compostos **8-11a** se deve à presença da cadeia lateral na posição 9 do núcleo da acridina substituído. Pelas razões referidas, de modo a preservar/melhorar a atividade antitumoral e antimalárica e diminuir a citotoxicidade, o passo seguinte deverá consistir num estudo de estrutura-atividade modificando a natureza e/ou comprimento da cadeia na posição 9. Neste contexto, a introdução na posição 9 de uma cadeia (*N*-[*N*-(*p*-fluoro)cinamoíl]aminobutil)amino poderá ser uma boa escolha, uma vez que estudos *in vitro* antimaláricos e antitumorais de análogos da QN apresentando essa cadeia na posição 9, revelaram ter baixa citotoxicidade ( $IC_{50} = 68,46 \mu M$  contra HFF-1).<sup>51</sup> Adicionalmente à baixa citotoxicidade, esta cadeia fornece, por si só, atividade antimalárica na fase hepática,<sup>50</sup> fator que também é de interesse melhorar nos derivados estudados na presente dissertação.



# **CAPÍTULO 5**

---

## **Procedimiento Experimental**



## 5. Procedimento experimental

### 5.1. Aspetos gerais

Todos os procedimentos descritos neste capítulo dizem respeito única e exclusivamente ao procedimento otimizado ou em que se obtiveram os melhores resultados.

Os reagentes comerciais e solventes utilizados no âmbito deste trabalho foram adquiridos na Sigma-Aldrich [fenol, Pd(OAc)<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-dietilpentano-1,4-diamina e *N*-(*n*-Bromoalquil)ftalimida], na FluoroChem (Tf<sub>2</sub>O, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e rac-BINAP), na Fluka (CH<sub>3</sub>I e SnCl<sub>2</sub>), na VWR International (Et<sub>3</sub>N, HCl concentrado, *HPLC gradient grade*, ou *LC-MS grade*, conforme a aplicação, e solventes da marca Merck, de qualidade *p.a.*, como *DMSO*), na Merck (POCl<sub>3</sub>), na LabChem e na Fischer Chemical (restantes solventes) ou na CortecNet (solventes deuterados).

Ao longo do trabalho utilizou-se a técnica de CCF para avaliar a evolução da reação ou mesmo a homogeneidade cromatográfica do produto final. Para tal, utilizaram-se placas de alumínio recobertas com gel de sílica 60 F<sub>254</sub> da Merck (VWR International), sendo os cromatogramas revelados por irradiação com luz ultra-violeta (254 nm e 365 nm) utilizando uma lâmpada Viber Lourmat (CN-6).

Após uma primeira etapa de extração líquido-líquido sobre a mistura reacional, a purificação dos compostos finais **2-3**, **5-8** e **10** foi realizada através de cromatografia líquida de adsorção em coluna de gel de sílica 60 Å (partículas de 35-70 µm), da SDS.

Após uma primeira etapa de extração líquido-líquido sobre a mistura reacional, a purificação dos compostos finais **11** e **11b** foi realizada através de cromatografia líquida de adsorção em coluna de gel de sílica do tipo octadecil-silano Vydac® 218TP, da Grace Vydac. As colunas foram preparadas usando-se suspensões do gel de sílica no eluente a utilizar. Os diferentes eluentes utilizados, quer na purificação, quer em CCF, apresentam-se devidamente identificados em cada caso.

Os solventes foram eliminados sob pressão reduzida num evaporador rotativo modelo *BUCHI* no Departamento de Química e Bioquímica da FCUP.

A síntese dos compostos **7** e **10** foram realizadas no Microondas modelo *Discovery SP*.

Os filtros moleculares utilizados, com diâmetro 4Å, foram ativados através da sua colocação numa mufla modelo *Furnace 62700*, durante 24h a 200 °C e, de seguida, arrefecidos em atmosfera inerte.

Todos os intervalos de rendimentos apresentados referem-se aos compostos finais obtidos após purificação.

Para o arrefecimento de reações a -20 °C, aplicaram-se banhos de gelo e sal numa proporção de 3 para 1, respetivamente.

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

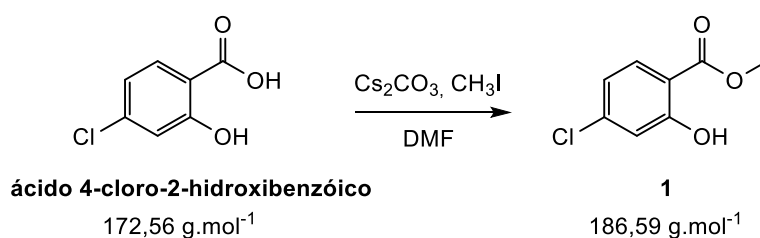
Os espetros de RMN foram adquiridos de soluções de composto puro em diferentes solventes deuterados, contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno, num espetrómetro Bruker Avance III de 400 MHz ou 600 MHz (<sup>1</sup>H-RMN), conforme o caso, existente no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

A pureza dos compostos foi avaliada por HPLC, num equipamento Merck-Hitachi LaChrom Elite dotado de bomba quaternária, injetor automático termostaticado por efeito Peltier e detetor de díodos. Usou-se uma coluna de fase reversa (octadecilsilano) Purospher star RP-C18 de 125 × 4.0 mm e 5 µm (diâmetro de partícula). Foi realizada uma eluição com gradiente de 1 a 100% de ACN em água milipore contendo 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA). A eluição decorreu a um fluxo de 1 mL/min e a deteção foi realizada a 290 nm. As amostras foram preparadas em acetonitrilo.

Os dados referentes aos espetros de Ressonância Magnética Nuclear de protão encontram-se apresentados do seguinte modo: <sup>1</sup>H-RMN (intensidade do campo magnético, em MHz, e solvente deuterado utilizado): δ<sub>H</sub> (desvio-químico em ppm), multiplicidade do sinal (**s**: singleto, **sl**: singuleto largo, **d**: duplete, **t**: tripleto, **q**: quarteto, **dd**: duplo duplete, **m**: multiplete), constante de acoplamento (*J*, em Hertz), nº de protões correspondentes ao sinal e localização do protão na molécula.

## 5.2. Parte I

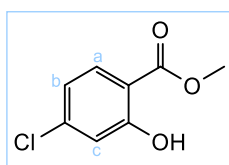
### 5.2.1. Síntese de 4-cloro-2-hidroxibenzoato de metilo (1)



Num balão de fundo redondo colocou-se o ácido 4-cloro-2-hidroxibenzóico e dissolveu-se em DMF. Seguidamente, adicionou-se Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,5 eq) que não dissolveu na totalidade e, alguns minutos depois, adicionou-se, lentamente, o CH<sub>3</sub>I (5 eq). A mistura reacional ficou a reagir à temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos. Após esse período, adicionou-se água desionizada e deixou-se sob agitação mais alguns minutos.

O produto final foi extraído utilizando uma mistura de Et<sub>2</sub>O e acetato de etilo (AcOEt) (2:1) (3x 50mL). A fase orgânica resultante foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x 50 mL) e de NaCl (1x 50mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, após filtração por gravidade, levada à secura usando um evaporador rotativo, a pressão reduzida.

O líquido incolor obtido apresentou a pureza necessária, confirmada por CCF e RMN, para a continuação da síntese, não tendo sido necessário nenhum método de purificação. Os dados espectrais e analíticos obtidos para o composto apresentam-se em seguida.

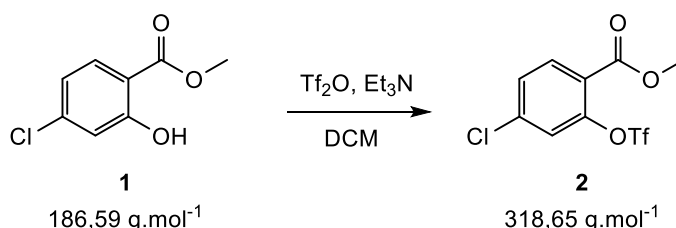


Líquido incolor volátil ( $\eta$  = 100%)

**R<sub>f</sub>**: 0,76 em Hex/AcOEt 10:1 (v/v)

**<sup>1</sup>H-RMN**:  $\delta_{\text{H}}$  ppm (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>): 3,94 (s; 3H; -COOCH<sub>3</sub>); 6,89 (dd; J = 8,6 Hz; J = 2,1 Hz; 1H; H<sub>b</sub>); 6,96 (d; J = 2,0 Hz; 1H; H<sub>c</sub>); 7,78

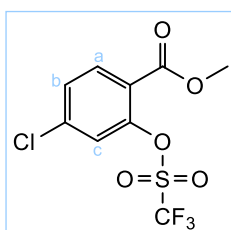
(d; J = 8,4 Hz; 1H; H<sub>a</sub>).

**5.2.2. Síntese de 4-cloro-2-(trifluorometanossulfonilo)benzoato de metilo (2)**

Num balão de fundo redondo, o reagente **1** foi dissolvido em DCM sob atmosfera inerte e colocado num banho de gelo e sal a  $-20^\circ\text{C}$ . Posto isto, adicionou-se ao meio reacional  $\text{Et}_3\text{N}$  (2 eq) e deixou-se a saturar em atmosfera inerte durante mais alguns minutos. De seguida, colocou-se um funil de adição, purgou-se novamente com árgon, e adicionou-se consecutivamente DCM,  $\text{Tf}_2\text{O}$  (1,5 eq) e DCM. Por fim, esta solução foi adicionada gota a gota ao balão que continha o composto **1**.

No final da adição, a mistura reacional ficou em agitação magnética a  $-20^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 30 minutos. No final desse período e, após a mistura reacional atingir a temperatura ambiente, realizaram-se extrações líquido-líquido com  $\text{Et}_2\text{O}$  e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com uma solução aquosa de  $\text{HCl}$  1M (3x 50mL) e uma solução aquosa saturada de  $\text{NaCl}$  (1x 50mL) e, posteriormente, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada por gravidade e evaporada até à secura usando um evaporador rotativo, a pressão reduzida.

O composto foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de  $\text{SiO}_2$ , usando como eluente Hex/ $\text{AcOEt}$  (10:1). No final, obteve-se um líquido incolor que foi subsequentemente caracterizado por  $^1\text{H}$ -RMN e ESI-IT MS, comprovando ser o composto de interesse. Os dados espetrais e analíticos obtidos para o composto apresentam-se em seguida.

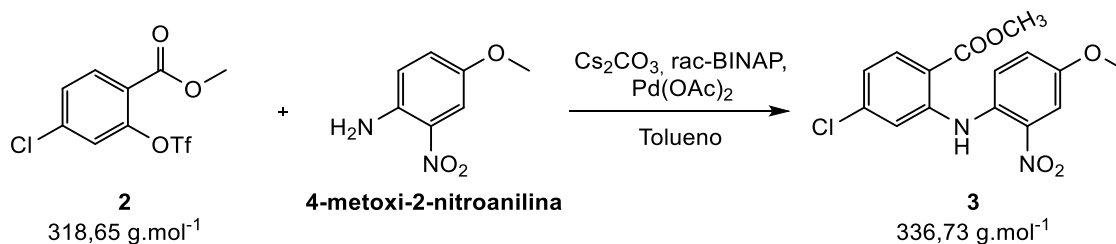


Líquido incolor ( $\eta = 60,5\text{-}61,5\%$ )

$R_f$ : 0,59 em Hex/ $\text{AcOEt}$  10:1 (v/v)

$^1\text{H}$ -RMN:  $\delta_{\text{H}}$  ppm (400 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ ): 3,94 (s; 3H;  $-\text{COOCH}_3$ ); 7,52 (d;  $J = 2,0 \text{ Hz}$ ; 1H; Hc); 7,62 (dd;  $J = 8,5 \text{ Hz}$ ;  $J = 2,0 \text{ Hz}$ ; 1H; Hb); 8,08 (d;  $J = 8,5 \text{ Hz}$ ; 1H; Ha).

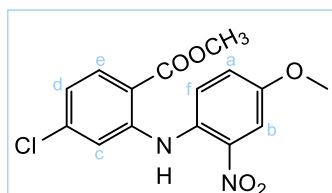
$\text{C}_9\text{H}_6\text{ClF}_3\text{O}_5\text{S}$ : 317,96 u.m.a.;  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 340,95$ .

**5.2.3. Síntese de 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzoato de metilo (3)**

Num balão de fundo redondo dissolveu-se o composto **2** em tolueno e deixou-se saturar em atmosfera de argón. Seguidamente, adicionou-se Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,4eq), rac-BINAP (0,08eq) e Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,05eq) e deixou-se em agitação magnética sob atmosfera de argón durante alguns minutos até os reagentes, à exceção do Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, solubilizarem completamente.

Posto isto, adicionou-se **4-metoxi-2-nitroanilina** (1,2eq) e deixou-se a reagir em refluxo durante 5h a 120 °C. Passado esse período e, após a mistura reacional atingir a temperatura ambiente, adicionou-se DCM, observando-se a formação de um precipitado roxo que foi posteriormente eliminado por filtração por gravidade. De seguida, foram realizadas extrações líquido-líquido com uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x 50mL) e de NaCl (1x 50mL), e a fase orgânica resultante foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, após filtração por gravidade, levada à secura usando um evaporador rotativo, a pressão reduzida.

O composto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de SiO<sub>2</sub> utilizando DCM/Hex (3:1) como eluente. No final, obteve-se um sólido cor-de-laranja que foi subsequentemente caracterizado por <sup>1</sup>H-RMN e ESI-IT MS, comprovando ser o composto de interesse. Apresentam-se em seguida os dados espectrais e analíticos obtidos para o composto **3**.



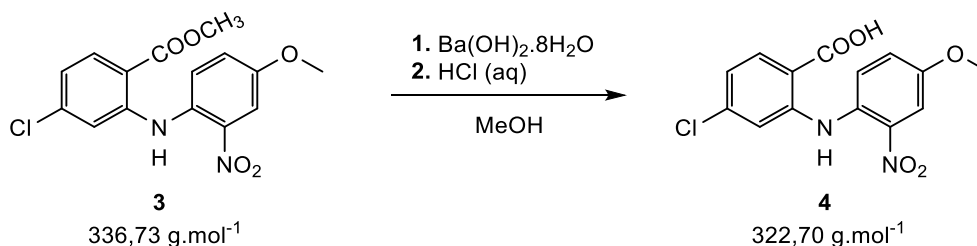
Sólido cor-de-laranja ( $\eta$  = 45,5 – 46,2%)

**R<sub>f</sub>**: 0,46 em DCM/Hex 3:1 (v/v)

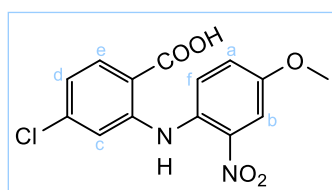
**<sup>1</sup>H-RMN**:  $\delta_{\text{H}}$  ppm (400 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): 3,85 (s; 3H, -OCH<sub>3</sub>);  
3,88 (s; 3H; -COOCH<sub>3</sub>); 6,98 (dd; J = 8,6 Hz; J = 2,0 Hz; 1H;

Ha); 7,20 (d; J = 2,0 Hz; 1H; Hb); 7,36 (dd; J = 9,1 Hz; J = 3,0 Hz; 1H; Hd); 7,61 (d; J = 3,0 Hz; 1H; Hc); 7,64 (d; J = 9,1 Hz; 1H; He); 7,92 (d; J = 8,6 Hz; 1H; Hf); 10,48 (sl; 1H; -NH-).

**C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**: 336,05 u.m.a.; m/z [M+H]<sup>+</sup> = 337,07.

**5.2.4. Síntese de ácido 4-cloro-2-[(4-metoxi-2-nitrofenil)amino]benzóico (4)**

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o composto **3** em MeOH e, de seguida, adicionou-se Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (1,5eq). A mistura reacional ficou a reagir sob refluxo durante 2 horas, tendo-se observado a formação de um precipitado muito denso cor-de-vinho. Passado esse período, transferiu-se a mistura reacional para um gobelé em banho de gelo e neutralizou-se a mesma com uma solução aquosa de HCl 1M verificando-se a alteração da cor do precipitado cor-de-vinho para cor-de-laranja. Para garantir a homogeneidade da mistura, esta foi colocada em agitação magnética durante alguns minutos. O produto final foi extraído com AcOEt (3x 50mL) e a fase orgânica resultante foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaCl (1x 50mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, após filtração por gravidade, levada à secura usando um evaporador rotativo, a pressão reduzida obtendo-se, desta forma, um sólido vermelho identificado como o composto pretendido **4**. Os dados espetrais e analíticos obtidos para o composto em questão apresentam-se em seguida.



Sólido vermelho ( $\eta$  = 100%)

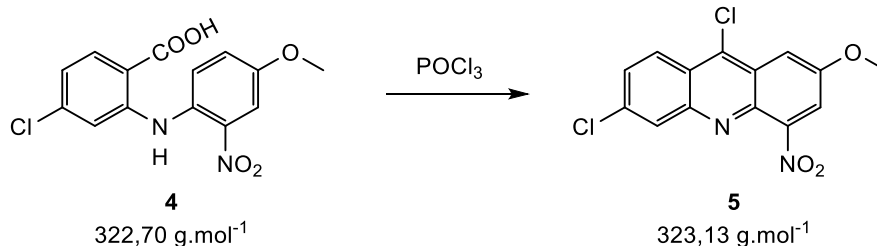
**R<sub>f</sub>**: 0,02 em DCM/Hex 2:1 (v/v)

**<sup>1</sup>H-RMN**:  $\delta_{\text{H}}$  ppm (400 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): 3,85 (s; 3H, -OCH<sub>3</sub>); 6,94 (dd; J = 8,5 Hz; J = 2,0 Hz; 1H; Ha); 7,16 (d; J = 2,0 Hz; 1H; Hb); 7,35 (dd; J = 9,1 Hz; J = 3,1 Hz; 1H; Hd); 7,60 (d; J = 3,0 Hz; 1H; Hc); 7,66 (d; J = 9,1 Hz; 1H; He); 7,92 (d; J = 8,5 Hz; 1H; Hf); 10,72 (s; 1H; -NH-);

**C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**: 322,04 u.m.a.; m/z [M-H]<sup>-</sup> = 321,00.



### 5.2.5. Síntese de 6,9-dicloro-2-metoxi-4-nitroacridina (5)

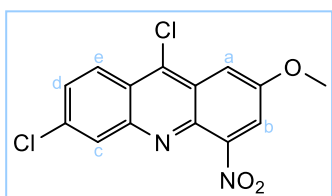


Colocou-se o composto **4** num balão de fundo redondo e, de seguida, adicionou-se  $\text{POCl}_3$  (33,7 eq). A mistura reacional ficou em refluxo a 120 °C com agitação magnética durante 2 horas e 30 minutos.

Após o período referido, a mistura reacional foi vertida para um matraz contendo um cocktail previamente preparado com 39 g de gelo, 12 mL de DCM e 15 mL de  $\text{NH}_3$  a 25 % e, o balão da reação foi lavado com outro cocktail com a mesma composição. No final, adicionou-se 50 mL de DCM e deixou-se a mistura em agitação durante aproximadamente 15 minutos.

Seguidamente, procedeu-se à extração líquido-líquido com DCM (3x 50mL). A fase orgânica resultante foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaCl, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e, após filtração por gravidade, levada à secura usando um evaporador rotativo, a pressão reduzida.

O sólido laranja obtido foi incorporado na  $\text{SiO}_2$  e posteriormente purificado em coluna de gel de  $\text{SiO}_2$  utilizando DCM/Hex (2:1) como eluente. No final, obteve-se um sólido cor-de-laranja que foi subseqüentemente caracterizado por  $^1\text{H}$ -RMN e ESI-IT MS, comprovando ser o composto de interesse. Os dados espectrais e analíticos obtidos para o composto **5** apresentam-se em seguida.



Sólido cor-de-laranja ( $\eta = 78,6 - 79,4\%$ )

$R_f$ : 0,58 em DCM/Hex 2:1 (v/v)

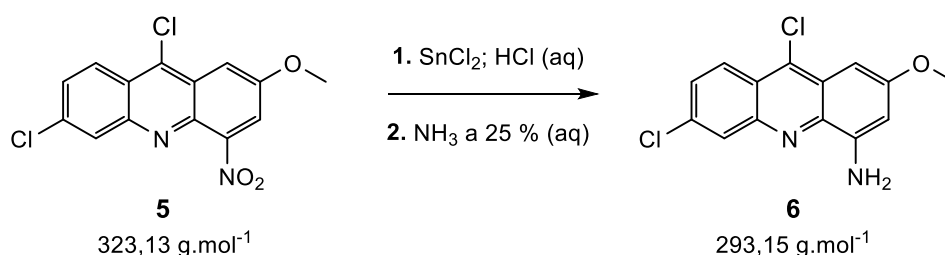
$^1\text{H}$ -RMN:  $\delta_H$  ppm (400 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ): 4,09 (s; 3H;  $-\text{OCH}_3$ );  
7,78 (d;  $J = 2,6$  Hz; 1H; Ha); 7,87 (dd;  $J = 2,1$  Hz;  $J = 9,3$

Hz; 1H; Hd); 8,26 (d;  $J = 1,7$  Hz; 1H; Hc); 8,39 (d;  $J = 2,6$  Hz; 1H; Hb); 8,45 (d;  $J = 9,3$  Hz; 1H; He).

$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ : 321,99 u.m.a.;  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 323,17$ .

### 5.3. Parte II – Rota A

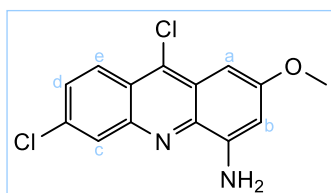
#### 5.3.1. Síntese de 6,9-dicloro-2-metoxiacridin-4-amino (6)



Num balão de fundo redondo mergulhado em gelo, dissolveu-se **5** em HCl concentrado (mínimo possível) e adicionou-se gota a gota uma solução de 3 eq de SnCl<sub>2</sub> em 2mL de HCl. De seguida, aqueceu-se a mistura reacional em banho maria até os 40 °C. Quando atingida essa temperatura, deixou-se a reagir durante 30 minutos. Finalizada a reação, diluiu-se o conteúdo do balão com água desionizada e transferiu-se o mesmo para um gobelé. Posto isto, a mistura reacional foi basificada com uma solução aquosa de NH<sub>3</sub> a 25%, tendo-se verificado a alteração da cor da mistura de vermelho para laranja e a consequente formação de um precipitado dessa cor.

Como tratamento, realizaram-se extrações líquido-líquido com DCM (3x 50mL) e posteriormente lavou-se a fase orgânica resultante com uma solução saturada de NaCl (1x 50mL), secou-se com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, e após filtração por gravidade, esta foi levada à secura no evaporador rotativo a pressão reduzida.

O composto foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO<sub>2</sub> utilizando DCM como eluente. No final, obteve-se um sólido cor-de-laranja que foi subsequentemente caracterizado por <sup>1</sup>H-RMN e ESI-IT MS, como sendo o composto de interesse. Os dados espectrais e analíticos obtidos para o composto **6** apresentam-se em seguida.



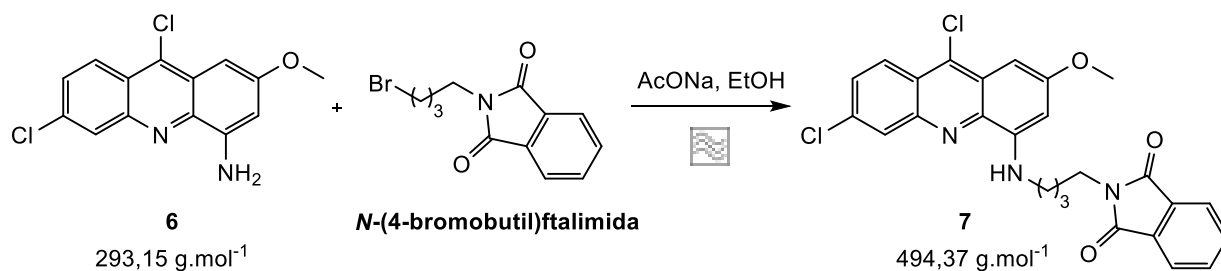
Sólido cor-de-laranja ( $\eta$  = 69,3 – 76,8%)

R<sub>f</sub>: 0,73 em DCM

<sup>1</sup>H-RMN:  $\delta_H$  ppm (400 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): 3,92 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub>); 6,42 (sl; 2H; -NH<sub>2</sub>); 6,60 (d, J= 2,4 Hz; 1H; Ha); 6,73 (d, J=

2,4 Hz; 1H, Hb); 7,71 (dd, J= 2,0 Hz, J= 9,4 Hz; 1H; Hd); 8,17 (d, J= 1,6 Hz; 1H, Hc); 8,29 (d, J= 9,2 Hz; 1H; He);

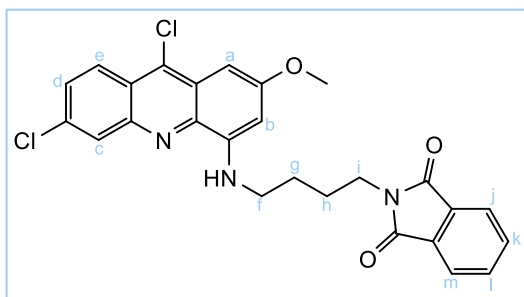
**C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O**: 292,02 u.m.a.; m/z [M+H]<sup>+</sup> = 293,33.

**5.3.2. Síntese de 6,9-dicloro-4-[(4-ftalimidobutil)amino]-2-metoxiacridina (7)**

Num reator de 30 mL dissolveu-se o composto **6** no mínimo possível de EtOH (5 mL) e, de seguida, adicionou-se **N-(4-bromobutil)ftalimida** (3 eq) e AcONa (3 eq). Colocou-se o reator no aparelho de ultrassons durante aproximadamente 30 segundos para garantir a homogeneidade da solução e, seguidamente, colocou-se a mistura reacional no microondas durante 2,5h, a 120 °C, com pressão e potência de 100 psi e 100 W, respetivamente. No final desse período, a mistura reacional estava com um tom acastanhado, ligeiramente mais escuro que inicialmente.

De seguida, evaporou-se o EtOH a pressão reduzida, dissolveu-se a mistura em DCM e procedeu-se a extrações líquido-líquido. A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x 50mL) e NaCl (1x 50mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, após filtração por gravidade, levada à secura através usando um evaporador rotativo, a pressão reduzida.

O composto foi purificado em coluna de gel de SiO<sub>2</sub> utilizando DCM/Hex (3:1) como eluente. No final, obteve-se um óleo amarelo torrado que foi subsequentemente caracterizado por <sup>1</sup>H-RMN e ESI-IT MS. Os dados espectrais e analíticos obtidos para o composto **7** apresentam-se em seguida.



Óleo amarelo torrado ( $\eta = 9,32 - 10,1 \%$ )

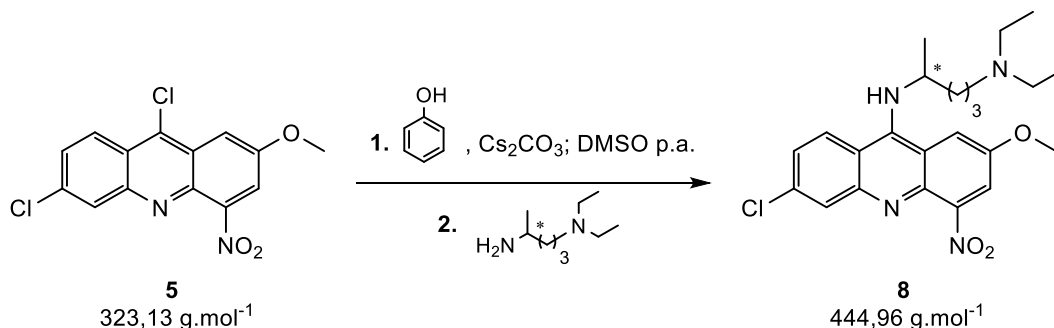
**R<sub>f</sub>**: 0,48 em DCM/Hex 3:1 (v/v)

**<sup>1</sup>H-RMN**:  $\delta_{\text{H}}$  ppm (400 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): 1,74 (m; 4H; Hg, Hh); 3,37 (m; 2H; Hf); 3,65 (t; J = 6,4 Hz; 2H; Hi); 3,92 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub>); 6,31 (d, J= 2,4 Hz; 1H; Ha); 6,67 (d, J= 2,4 Hz; 1H, Hb); 6,93 (t; J = 6,0 Hz; -NH-); 7,73 (dd, J= 2,1 Hz, J= 9,2 Hz; 1H; Hd); 7,80 (s; 4H; Hj, Hk, Hl; Hm); 8,19 (d, J= 2,1 Hz; 1H, Hc); 8,31 (d, J= 9,2 Hz; 1H; He);

**C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>**: 493,10 u.m.a.; m/z [M+H]<sup>+</sup> = 494,47.

## 5.4. Parte II – Rota B

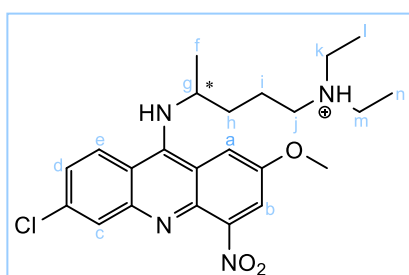
### 5.4.1. Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-nitro-2-metoxiacridina (8)



Sob atmosfera inerte, num balão de fundo redondo contendo filtros moleculares previamente ativados por ação do calor, dissolveu-se o composto **5** em DMSO p.a. Posto isto, adicionou-se o fenol (15 eq) e o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 eq). A mistura reacional foi deixada em refluxo, durante 2 horas com agitação magnética a 100 °C. Passado esse período, adicionou-se ao meio reacional **N',N'-dietilpentano-1,4-diamina** (4 eq) e deixou-se em agitação nas mesmas condições referidas anteriormente durante 4 horas.

No final, após a reação atingir a temperatura ambiente, os filtros moleculares foram removidos por filtração a vácuo e, de seguida, procedeu-se à extração líquido-líquido utilizando, por esta ordem, uma solução aquosa de NaOH 2M (1x 50mL), solução aquosa de CH<sub>3</sub>COOH (3x 50mL) a 10% e solução aquosa de NH<sub>3</sub> a 25% (3x 50mL). A fase orgânica obtida foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada por gravidade e consequentemente levada à secura através de evaporação por pressão reduzida.

O composto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de gel de SiO<sub>2</sub> utilizando DCM/MeOH (4:1) como eluente. No final, obteve-se um óleo vermelho que foi subsequentemente caracterizado por <sup>1</sup>H-RMN, ESI-IT MS e HPLC, como sendo o composto de interesse. Os dados espetrais e analíticos obtidos para o composto **8** apresentam-se em seguida.



Óleo vermelho ( $\eta = 42,6 - 54,4\%$ )

**R<sub>f</sub>**: 0,45 em DCM/MeOH 4:1 (v/v); 0,16 em DCM/MeOH 4:1 (v/v) quando a amina terciária está protonada

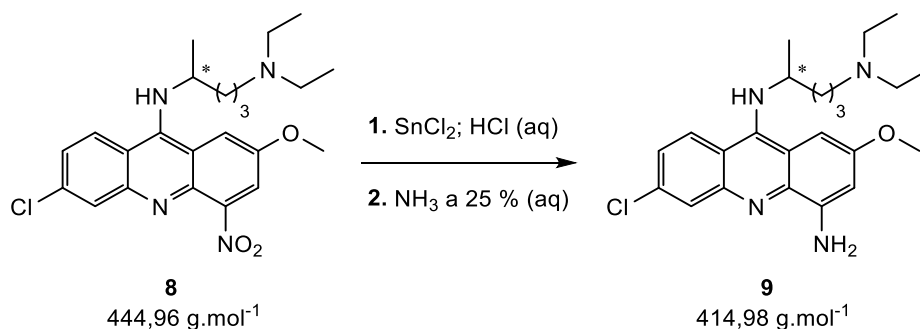
**<sup>1</sup>H-RMN**:  $\delta_H$  ppm (400 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): 0,74 (t, J = 7,1 Hz; 6H; Hl, Hn); 1,22 (m; 2H; Hi); 1,31 (m; 1H; Hg); 1,44 (d, J = 6,4 Hz; 3H; Hf); 1,61 (m; 1H; Hh); 1,76 (m, 1H,

Hh); 2,15 (m, 6H; Hj, Hk, Hm); 3,98 (s, 3H, Hp); 4,09 (m; 1H; -NH<sup>+</sup>-); 6,87 (d; J = 9,76 Hz; 1H; -NHCH(CH<sub>3</sub>)-); 7,43 (dd, J= 9,3 Hz; J= 2,2 Hz; 1H; Hd); 7,85 (d, J = 2,2 Hz; 1H; Hc); 7,86 (d, J = 2,6 Hz; 1H; Ha); 8,05 (d, J = 2,6 Hz; 1H; Hb); 8,32 (d, J = 9,32 Hz; 1H; He)

**HPLC-DAD:**  $t_R = 11,913$  min (% área = 91,34 %)

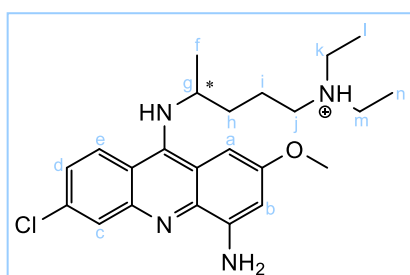
**C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>CIN<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>:** 444,19 u.m.a.;  $m/z [M+H]^+ = 445,47$ ;  $m/z [M+2H]^{+2} = 223,38$ .

**5.4.2. Síntese de 4-amino-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (9)**



Num balão de fundo redondo mergulhado em gelo, dissolveu-se **8** em 5mL de HCl concentrado e adicionou-se SnCl<sub>2</sub> (3 eq). De seguida, aqueceu-se a mistura reacional em banho maria até os 40 °C. Quando atingida essa temperatura, deixou-se a reagir durante 30 minutos. Finalizada a reação, adicionou-se água desionizada para diluir o conteúdo do balão e transferiu-se o mesmo para um gobelé. Posto isto, a mistura reacional foi basificada com uma solução aquosa de NH<sub>3</sub> a 25%, tendo-se verificado uma alteração da cor da mistura de laranja para amarelo e a consequente formação de um precipitado dessa cor.

Como tratamento, realizaram-se extrações líquido-líquido com DCM (3x 50mL) e posteriormente lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NaCl (1x 50mL), secou-se a mesma com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, e após filtração por gravidade, levou-se à secura no evaporador rotativo a pressão reduzida. O composto obtido foi dissolvido em Et<sub>2</sub>O, tendo as impurezas precipitado e sido removidas por filtração a vácuo. No final, obteve-se um óleo amarelo que foi subsequentemente caracterizado por <sup>1</sup>H-RMN, ESI-IT MS e HPLC, como sendo o composto de interesse. Os dados espectrais e analíticos obtidos para o composto **9** apresentam-se em seguida.



Óleo amarelo ( $\eta$  = 75,1 – 85,2 %)

R<sub>f</sub>: 0,13 em DCM/MeOH 4:1 (v/v)

**<sup>1</sup>H-RMN:**  $\delta_H$  ppm (400 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>): 0,77 (t; J = 7,1 Hz; 6H; Hl, Hn); 1,23 (m; 2H; Hi); 1,31 (d; J = 6,4 Hz; 3H; Hf); 1,38 (m; 1H; Hh); 1,55 (m; 1H; Hh); 1,71 (m; 1H; Hg); 2,17 (t; J = 7,9 Hz; 2H; Hj); 2,24 (q; J = 7,1 Hz;

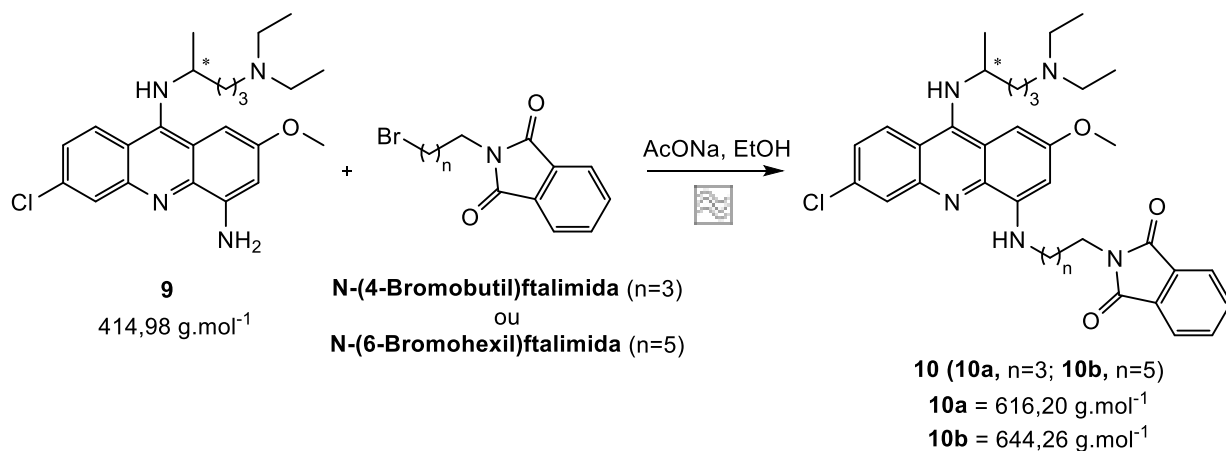
4H; Hk, Hm); 3,85 (s; 3H; -OCH<sub>3</sub>); 3,95 (m; 1H; -NH<sup>+</sup>-); 5,98 (d; J = 10,2 Hz; 1H; -NHCH(CH<sub>3</sub>)-); 6,05 (s; 2H; -NH<sub>2</sub>); 6,49 (d; J = 2,4 Hz; 1H; Ha); 6,79 (d; J = 2,5 Hz; 1H;

Hb); 7,34 (dd; J = 9,2 Hz; J = 2,2 Hz; 1H; Hd); 7,91 (d; J = 2,2 Hz; 1H; Hc); 8,26 (d; J = 9,3 Hz; 1H; He).

**HPLC-DAD:**  $t_R = 11,487$  min (% área = 97,069 %)

**C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>CIN<sub>4</sub>O<sup>+</sup>:** 414,22 u.m.a.; m/z [M+H<sup>+</sup>] = 415,40; m/z [M+2H]<sup>+2</sup> = 208,47.

### 5.4.3. Síntese de 6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-4-[(n-ftalimidoalquil)amino]-2-metoxiacridina (10)



Num reator de 30 mL dissolveu-se o composto **9** no mínimo possível de EtOH e, de seguida, adicionou-se **N-(n-bromoalquil)ftalimida** (3 eq) e AcONa (3 eq). Colocou-se o reator no aparelho de ultrassons durante aproximadamente 30 segundos para garantir a homogeneidade da solução e, seguidamente, colocou-se a mistura reacional no microondas durante 2,5h, a 120 °C, com pressão e potência de 100 psi e 100 W, respetivamente. No final desse período, a mistura reacional apresentava um tom acastanhado, ligeiramente mais escuro que inicialmente.

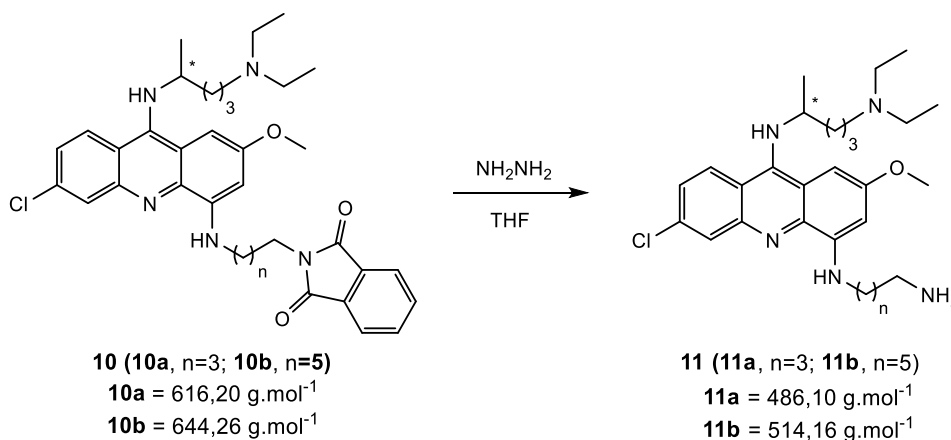
De seguida, evaporou-se o EtOH a pressão reduzida, dissolveu-se a mistura resultante em DCM e procedeu-se a extrações líquido-líquido com uma solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> saturado. A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, após filtração por gravidade, levada à secura no evaporador rotativo a pressão reduzida.

Os compostos foram purificados em coluna de gel de SiO<sub>2</sub> utilizando DCM/MeOH (8:1) como eluente. No final, estes foram caracterizados por <sup>1</sup>H-RMN, ESI-IT MS e HPLC. Os dados espetrais e analíticos obtidos para cada composto apresentam-se em seguida.





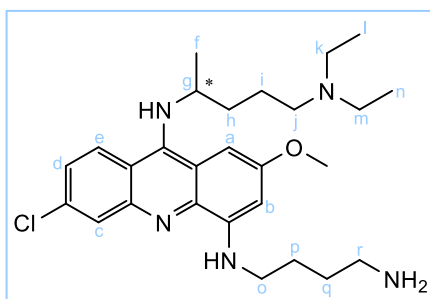
#### 5.4.4. Síntese de 4-(n-aminoalquil)amino-6-cloro-9-([4-(dietilamino)-1-metilbutil]amino)-2-metoxiacridina (11)



Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o composto **10** em THF, adicionou-se NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (40eq) e colocou-se em agitação magnética a 60 °C durante 24h. No final desse período, foram realizadas extrações líquido-líquido com DCM. A fase orgânica resultante foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x 50mL) e de NaCl (1x 50mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e, após filtração por gravidade, levada à secura no evaporador rotativo a pressão reduzida.

Por fim, os compostos foram purificados em coluna de gel de SiO<sub>2</sub>-C18 utilizando uma eluição de 20% (**11a**) ou 15% (**11b**) ACN em H<sub>2</sub>O (0,05% TFA). No final, estes foram caracterizados por <sup>1</sup>H-RMN, ESI-IT MS e HPLC. Os dados espectrais e analíticos obtidos para cada composto apresentam-se em seguida.

##### Composto 11a:



Óleo amarelo ( $\eta$  = 18,5 %)

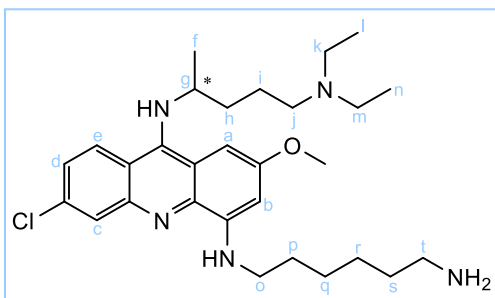
**R<sub>f</sub>**: 0,02 em MeOH

**<sup>1</sup>H-RMN:**  $\delta_{\text{H}}$  ppm (600 MHz; CD<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>): 0,88 (m; 9H; Hl, Hn, Hf); 1,28 (m; 8H; Hp, Hq, Hh, Hi); 2,14 (m; 1H, Hg); 2,34 (m; 6H; Hk, Hm, Hj); 2,88 (m; 2H; Hr); 3,37 (m; 2H; Ho); 6,29 (d; J = 2,3 Hz; 1H; Hb); 6,74 (d; J = 2,4 Hz; 1H; Ha); 7,33 (dd; J = 9,2 Hz; J = 2,2 Hz; 1H; Hd); 7,95 (d; J = 2,1 Hz; 1H; Hc); 8,20 (d; J = 9,2 Hz; 1H; He).

**HPLC-DAD:** t<sub>R</sub>= 10,480 min (% área = 96,934 %)

**C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>CIN<sub>5</sub>O:** 485,29 u.m.a.; m/z [M+H]<sup>+</sup> = 486,80; m/z [M+2H]<sup>2+</sup> = 244,53.

**Composto 11b:**



Óleo amarelo ( $\eta$  = 19,0%)

R<sub>f</sub>: 0,03 em MeOH

HPLC-DAD: t<sub>R</sub>= 11,140 min (% área = 95,480 %)

**C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>5</sub>O**: 513,22 u.m.a.; m/z [M+H]<sup>+</sup> = 514,93; m/z [M+2H]<sup>2+</sup> = 258,53.



# CAPÍTULO 6

---

## Bibliografía



## 6. Bibliografia

1. Antony, H. A.; Parija, S. C., Antimalarial drug resistance: An overview. *Tropical parasitology* **2016**, 6 (1), 30-41.
2. Organization, W. H. *World Malaria Report*, **2017**. (acedido a 05/09/2018).
3. Schlitzer, M., Malaria Chemotherapeutics Part I: History of Antimalarial Drug Development, Currently Used Therapeutics, and Drugs in Clinical Development. *ChemMedChem*, **2007**, 2 (7), 944-986.
4. Brasil, P.; de Pina Costa, A.; Pedro, R. S.; da Silveira Bressan, C.; da Silva, S.; Tauil, P. L.; Daniel-Ribeiro, C. T., Unexpectedly long incubation period of Plasmodium vivax malaria, in the absence of chemoprophylaxis, in patients diagnosed outside the transmission area in Brazil. *Malaria Journal*, **2011**, 10, 122-122.
5. Phillips, M. A.; Burrows, J. N.; Manyando, C.; van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C.; Wells, T. N. C., Malaria. *Nature Reviews Disease Primers*, **2017**, 3, 17050.
6. Biamonte, M. A.; Wanner, J.; Le Roch, K. G., Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23 (10), 2829-2843.
7. Vangapandu, S.; Jain, M.; Kaur, K.; Patil, P.; Patel, S. R.; Jain, R., Recent advances in antimalarial drug development. *Medicinal Research Reviews*, **2007**, 27 (1), 65-107.
8. Fernando, D.; Rodrigo, C.; Rajapakse, S., Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues. *Malaria Journal*, **2011**, 10 (1), 351.
9. Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P., Quimioterapia da malária. *Revista da Sociedade Portuguesa de Química*, **2005**, 99, 61-73.
10. Gomes, P., A química terapêutica no combate a um "gigante adormecido": a malária vivax. *Revista da Sociedade Portuguesa de Química*, **2011**, 121, 39-46.
11. Hill, D. R.; Baird, J. K.; Parise, M. E.; Lewis, L. S.; Ryan, E. T.; Magill, A. J., Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg*, **2006**, 75 (3), 402-15.
12. Gemma, S.; Travagli, V.; Savini, L.; Novellino, E.; Campiani, G.; Butini, S., Malaria chemotherapy: recent advances in drug development. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, **2010**, 5 (3), 195-225.
13. Kumar, S.; Guha, M.; Choubey, V.; Maity, P.; Bandyopadhyay, U., Antimalarial drugs inhibiting hemozoin ( $\beta$ -hematin) formation: A mechanistic update. *Life Sciences*, **2007**, 80 (9), 813-828.
14. Coronado, L. M.; Nadovich, C. T.; Spadafora, C., Malarial hemozoin: from target to tool. *Biochimica et biophysica acta*, **2014**, 1840 (6), 2032-41.

15. Egan, T. J., Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. *TARGETS*, **2003**, 2 (3), 115-124.
16. Schlitzer, M., Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Archiv der Pharmazie*, **2008**, 341 (3), 149-63.
17. Chaturvedi, D.; Goswami, A.; Pratim Saikia, P.; Barua, N. C.; Rao, P. G., Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chemical Society Reviews*, **2010**, 39 (2), 435-454.
18. Ouji, M.; Augereau, J.-M.; Paloque, L.; Benoit-Vical, F., Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies: A sword of Damocles in the path toward malaria elimination. *Parasite*, **2018**, 25, 24.
19. Fairhurst, R. M.; Dondorp, A. M., Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum Malaria. *Microbiol Spectr.*, **2016**, 4 (3).
20. Ashley, E. A.; Phyo, A. P., Drugs in Development for Malaria. *Drugs* **2018**, 78 (9), 861-879.
21. Food and Drug Administration. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varAppNo=210795> (accedido a 05/09/2018).
22. Dow, G.; Smith, B., The blood schizonticidal activity of tafenoquine makes an essential contribution to its prophylactic efficacy in nonimmune subjects at the intended dose (200 mg). *Malaria Journal*, **2017**, 16 (1), 209.
23. Collins, K. A.; Snaith, R.; Cottingham, M. G.; Gilbert, S. C.; Hill, A. V. S., Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Scientific Reports*, **2017**, 7, 46621.
24. Sherrard-Smith, E.; Sala, K. A.; Betancourt, M.; Upton, L. M.; Angrisano, F.; Morin, M. J.; Ghani, A. C.; Churcher, T. S.; Blagborough, A. M., Synergy in anti-malarial pre-erythrocytic and transmission-blocking antibodies is achieved by reducing parasite density. *eLife*, **2018**, 7, e35213.
25. Coelho, C. H.; Doritchamou, J. Y. A.; Zaidi, I.; Duffy, P. E., Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *npj Vaccines*, **2017**, 2 (1), 34.
26. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet*, **2015**, 386 (9988), 31-45.
27. Mendes, A. M.; Machado, M.; Gonçalves-Rosa, N.; Reuling, I. J.; Foquet, L.; Marques, C.; Salman, A. M.; Yang, A. S. P.; Moser, K. A.; Dwivedi, A.; Hermsen, C. C.; Jiménez-Díaz, B.; Viera, S.; Santos, J. M.; Albuquerque, I.; Bhatia, S. N.; Bial, J.; Angulo-Barturen, I.; Silva, J. C.; Leroux-Roels, G.; Janse, C. J.; Khan, S. M.; Mota, M. M.;



- Sauerwein, R. W.; Prudêncio, M., A Plasmodium berghei sporozoite-based vaccination platform against human malaria. *npj Vaccines*, **2018**, 3 (1), 33.
28. Teixeira, C.; Vale, N.; Pérez, B.; Gomes, A.; Gomes, J. R. B.; Gomes, P., "Recycling" Classical Drugs for Malaria. *Chemical Reviews*, **2014**, 114 (22), 11164-11220.
29. Chong, C. R.; Sullivan Jr, D. J., New uses for old drugs. *Nature*, **2007**, 448, 645.
30. Jean-Pierre, J.; Jérémy, S.; Alexandra, D.; Sonnet, P., Recent advances in antimalarial drugs: structures, mechanisms of action and clinical trials. In *Antimicrobial Research: Novel bioknowledge and educational programs* Méndez-Vilas, A., Ed. Formatex Research Center: Badajoz (Spain), **2017**.
31. Meunier, B., Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality? *Accounts of Chemical Research*, **2008**, 41 (1), 69-77.
32. Agarwal, D.; Gupta, R. D.; Awasthi, S. K., Are Antimalarial Hybrid Molecules a Close Reality or a Distant Dream? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2017**, 61 (5).
33. Oliveira, R.; Miranda, D.; Magalhães, J.; Capela, R.; Perry, M. J.; O'Neill, P. M.; Moreira, R.; Lopes, F., From hybrid compounds to targeted drug delivery in antimalarial therapy. *Bioorg Med Chem*, **2015**, 23 (16), 5120-5130.
34. Belmont, P.; Bosson, J.; Godet, T.; Tiano, M., Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2007**, 7 (2), 139-169.
35. Munawar, R.; Mushtaq, N.; Arif, S.; Ahmed, A.; Akhtar, S.; Ansari, S.; Meer, S.; Saify, Z. S.; Arif, M., Synthesis of 9-Aminoacridine Derivatives as Anti-Alzheimer Agents. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, **2016**, 31 (3), 263-9.
36. Chen, Y.-L.; Lu, C.-M.; Chen, I. L.; Tsao, L.-T.; Wang, J.-P., Synthesis and Antiinflammatory Evaluation of 9-Anilinoacridine and 9-Phenoxyacridine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45 (21), 4689-4694.
37. Tonelli, M.; Vettoretti, G.; Tasso, B.; Novelli, F.; Boido, V.; Sparatore, F.; Busonera, B.; Ouhtit, A.; Farci, P.; Blois, S.; Giliberti, G.; La Colla, P., Acridine derivatives as anti-BVDV agents. *Antiviral research*, **2011**, 91 (2), 133-41.
38. Valdés, A. F.-C., Acridine and Acridinones: Old and New Structures with Antimalarial Activity. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, **2011**, 5, 11-20.
39. Wainwright, M., Acridine-a neglected antibacterial chromophore. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **2001**, 47 (1), 1-13.
40. Gensicka-Kowalewska, M.; Cholewiński, G.; Dzierzbicka, K., Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues. *RSC Advances*, **2017**, 7 (26), 15776-15804.

41. Schmidt, A.; Liu, M., Chapter Four - Recent Advances in the Chemistry of Acridines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Scriven, E. F. V.; Ramsden, C. A., Eds. Academic Press: **2015**, 115, 287-353.
42. Martinez, R.; Chacon-Garcia, L., The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Current medicinal chemistry*, **2005**, 12 (2), 127-51.
43. Chibale, K.; Haupt, H.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Saravanamuthu, A.; Fairlamb, A. H.; Croft, S. L., Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**, 11 (19), 2655-7.
44. Sparatore, A.; Basilico, N.; Parapini, S.; Romeo, S.; Novelli, F.; Sparatore, F.; Taramelli, D., 4-Aminoquinoline quinolizidinyl- and quinolizidinylalkyl-derivatives with antimalarial activity. *Bioorg Med Chem*, **2005**, 13 (18), 5338-45.
45. Anderson, M. O.; Sherrill, J.; Madrid, P. B.; Liou, A. P.; Weisman, J. L.; DeRisi, J. L.; Guy, R. K., Parallel synthesis of 9-aminoacridines and their evaluation against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem*, **2006**, 14 (2), 334-43.
46. Guetzoyan, L.; Ramiandrasoa, F.; Dorizon, H.; Desprez, C.; Bridoux, A.; Rogier, C.; Pradines, B.; Perree-Fauvet, M., In vitro efficiency of new acridyl derivatives against *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem*, **2007**, 15 (9), 3278-89.
47. Guetzoyan, L.; Yu, X. M.; Ramiandrasoa, F.; Pethe, S.; Rogier, C.; Pradines, B.; Cresteil, T.; Perree-Fauvet, M.; Mahy, J. P., Antimalarial acridines: synthesis, in vitro activity against *P. falciparum* and interaction with hemozoin. *Bioorg Med Chem*, **2009**, 17 (23), 8032-9.
48. Yu, X. M.; Ramiandrasoa, F.; Guetzoyan, L.; Pradines, B.; Quintino, E.; Gadelle, D.; Forterre, P.; Cresteil, T.; Mahy, J. P.; Pethe, S., Synthesis and biological evaluation of acridine derivatives as antimalarial agents. *ChemMedChem*, **2012**, 7 (4), 587-605.
49. Pérez, B.; Teixeira, C.; Gomes, A. S.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Prudêncio, M.; Gomes, P., In vitro efficiency of 9-(N-cinnamoylbutyl)aminoacridines against blood- and liver-stage malaria parasites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23 (3), 610-613.
50. Gomes, A.; Perez, B.; Albuquerque, I.; Machado, M.; Prudencio, M.; Nogueira, F.; Teixeira, C.; Gomes, P., N-cinnamylation of antimalarial classics: quinacrine analogues with decreased toxicity and dual-stage activity. *ChemMedChem*, **2014**, 9 (2), 305-10.
51. Gomes, A.; Fernandes, I.; Teixeira, C.; Mateus, N.; Sottomayor, M. J.; Gomes, P., A Quinacrine Analogue Selective Against Gastric Cancer Cells: Insight from Biochemical and Biophysical Studies. *ChemMedChem*, **2016**, 11 (24), 2703-2712.

52. Jones, M.; Mercer, A. E.; Stocks, P. A.; La Pensée, L. J. I.; Cosstick, R.; Park, B. K.; Kennedy, M. E.; Piantanida, I.; Ward, S. A.; Davies, J.; Bray, P. G.; Rawe, S. L.; Baird, J.; Charidza, T.; Janneh, O.; O'Neill, P. M., Antitumour and antimalarial activity of artemisinin-acridine hybrids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **2009**, *19* (7), 2033-2037.
53. Araujo, N. C.; Barton, V.; Jones, M.; Stocks, P. A.; Ward, S. A.; Davies, J.; Bray, P. G.; Shone, A. E.; Cristiano, M. L.; O'Neill, P. M., Semi-synthetic and synthetic 1,2,4-trioxaquines and 1,2,4-trioxolaquines: synthesis, preliminary SAR and comparison with acridine endoperoxide conjugates. *Bioorg Med Chem Lett*, **2009**, *19* (7), 2038-43.
54. Joubert, J. P.; Smit, F. J.; du Plessis, L.; Smith, P. J.; N'Da, D. D., Synthesis and in vitro biological evaluation of aminoacridines and artemisinin-acridine hybrids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2014**, *56*, 16-27.
55. Tot, M.; Opsenica, D.; Mitric, M.; C. Burnett, J.; Gomba, L.; Bavari, S.; Solaja, B., New 9-aminoacridine derivatives as inhibitors of Botulinum neurotoxins and *P. falciparum* malaria. *J. Serb. Chem. Soc.*, **2013**, *78* (12) 1847-1864.
56. Gemma, S.; Campiani, G.; Butini, S.; Joshi, B. P.; Kukreja, G.; Coccone, S. S.; Bernetti, M.; Persico, M.; Nacci, V.; Fiorini, I.; Novellino, E.; Taramelli, D.; Basilico, N.; Parapini, S.; Yardley, V.; Croft, S.; Keller-Maerki, S.; Rottmann, M.; Brun, R.; Coletta, M.; Marini, S.; Guiso, G.; Caccia, S.; Fattorusso, C., Combining 4-Aminoquinoline- and Clotrimazole-Based Pharmacophores toward Innovative and Potent Hybrid Antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, *52* (2), 502-513.
57. Kumar, A.; Srivastava, K.; Raja Kumar, S.; Puri, S. K.; Chauhan, P. M. S., Synthesis of new 4-aminoquinolines and quinoline-acridine hybrids as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, *20* (23), 7059-7063.
58. Scovill, J. P.; Klayman, D. L.; Woods, T. S.; Sweeney, T. R., Primaquine analogues: derivatives of 4-amino-2-methoxyacridine. *J Med Chem*, **1979**, *22* (10), 1164-7.
59. Pfeffer, P. E.; Silbert, L. S., Esterification by alkylation of carboxylate salts. Influence of steric factors and other parameters on reaction rates. *The Journal of Organic Chemistry*, **1976**, *41* (8), 1373-1379.
60. Otera, J.; Nishikido, J., *Esterification: Methods, Reactions, and Applications*. 2<sup>nd</sup> Ed.; Wiley, **2009**.
61. Parrish, J. P.; Dueno, E. E.; Kim, S.-I.; Jung, K. W., Improved Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Promoted O-Alkylation of Acids. *Synthetic Communications*, **2000**, *30* (15), 2687-2700.
62. Rabie, R.; Hammouda, M.; Elattar, K., Cesium carbonate as a mediated inorganic base in some organic transformations. *Res Chem Intermed*, **2016**; *43* (4), 1979-2015.

63. Dijkstra, G.; Kruizinga, W. H.; Kellogg, R. M., An assessment of the causes of the "cesium effect". *The Journal of Organic Chemistry*, **1987**, 52 (19), 4230-4234.
64. Dhakal, B.; Bohé, L.; Crich, D., Trifluoromethanesulfonate Anion as Nucleophile in Organic Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry*, **2017**, 82 (18), 9263-9269.
65. Gill, D.; Hester, A. J.; Lloyd-Jones, G. C., On the preparation of ortho-trifluoromethyl phenyl triflate. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2004**, 2 (17), 2547-2548.
66. Charette, A. Æ. B., *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Reagents for Heteroarene Synthesis*. Wiley, **2017**.
67. Norberg, A. M.; Sanchez, L.; Maleczka, R. E., Aryl-aryl cross-couplings that avoid the preparation of haloaromatics. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **2008**, 11 (6), 853-869.
68. Åhman, J.; Buchwald, S. L., An Improved Method for the Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Triflates. *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38 (36), 6363-6366.
69. Wang, Z., *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. Wiley: 2009.
70. Schlummer, B.; Scholz, U., Palladium-Catalyzed C-N and C-O Coupling—A Practical Guide from an Industrial Vantage Point. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2004**, 346 (13-15), 1599-1626.
71. Surry, D. S.; Buchwald, S. L., Dialkylbiaryl phosphines in Pd-catalyzed amination: a user's guide. *Chemical Science*, **2011**, 2 (1), 27-50.
72. Sunesson, Y.; Limé, E.; Nilsson Lill, S. O.; Meadows, R. E.; Norrby, P.-O., Role of the Base in Buchwald–Hartwig Amination. *The Journal of Organic Chemistry*, **2014**, 79 (24), 11961-11969.
73. Kocienski, P. J., *Protecting Groups*, 3rd Ed., Thieme, **2014**.
74. Anderson, M. O.; Moser, J.; Sherrill, J.; Guy, R. K., A Convenient Procedure for Parallel Ester Hydrolysis. *Synlett*, **2004**, 2004 (13), 2391-2393.
75. Mill, T.; Mabey, W., *The Handbook of Environmental Chemistry, Hydrolysis of Organic Chemicals. Reactions and Processes*, **1988**, 71-111.
76. Vangapandu, S.; Sachdeva, S.; Jain, M.; Singh, S.; Singh, P. P.; Kaul, C. L.; Jain, R., 8-quinolinamines and their pro prodrug conjugates as potent blood-schizontocidal antimalarial agents. *Bioorg Med Chem*, **2003**, 11 (21), 4557-68.
77. Serna, P.; Corma, A., Transforming Nano Metal Nonselective Particulates into Chemoselective Catalysts for Hydrogenation of Substituted Nitrobenzenes. *ACS Catalysis*, **2015**, 5 (12), 7114-7121.
78. Song, J.; Huang, Z.-F.; Pan, L.; Li, K.; Zhang, X.; Wang, L.; Zou, J.-J., Review on selective hydrogenation of nitroarene by catalytic, photocatalytic and electrocatalytic reactions. *Applied Catalysis B: Environmental*, **2018**, 227, 386-408.

79. Orlandi, M.; Brenna, D.; Harms, R.; Jost, S.; Benaglia, M., Recent Developments in the Reduction of Aromatic and Aliphatic Nitro Compounds to Amines. *Organic Process Research & Development*, **2018**, *22* (4), 430-445.
80. Johnstone, R. A. W.; Wilby, A. H.; Entwistle, I. D., Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation and its relation to other methods for reduction of organic compounds. *Chemical Reviews*, **1985**, *85* (2), 129-170.
81. Kabalka, G.; Varma, R., Chapter - *Reduction of Nitro and Nitroso Compounds*. *Comprehensive Organic Synthesis*, Barry M. Trost and Ian Fleming, Pergamon Press: **1991**, *8*, 363-379.
82. Walter, W., *Organic Chemistry: A Comprehensive Degree Text and Source Book*. Albion Publishing: Chichester (UK), 1997.
83. Wang, D.; Astruc, D., The Golden Age of Transfer Hydrogenation. *Chemical Reviews*, **2015**, *115* (13), 6621-6686.
84. Nerozzi, F., Heterogeneous Catalytic Hydrogenation. *Platinum Metal Reviews* **2012**, *56*, 236-241.
85. ÊErvenÝ, L., PALLADIUM CATALYSTS IN HYDROGENATION REACTIONS. *Chemical Engineering Communications*, **1989**, *83* (1), 31-63.
86. Tuteja, J.; Nishimura, S.; Ebitani, K., Base-free chemoselective transfer hydrogenation of nitroarenes to anilines with formic acid as hydrogen source by a reusable heterogeneous Pd/ZrP catalyst. *RSC Advances*, **2014**, *4* (72), 38241-38249.
87. Burrows, J. A., Pauling, Linus. The nature of the chemical bond and the structure of molecules aid crystals. *Science Education*, **1941**, *25* (2), 120-120.
88. Pesti, J.; Larson, G. L., Tetramethyldisiloxane: A Practical Organosilane Reducing Agent. *Organic Process Research & Development* **2016**, *20* (7), 1164-1181.
89. Larson, G., Silicon-Based Reducing Agents, Supplement to the Gelest Catalog, "Silicon, Germanium & Tin Compounds, Metal Alkoxides and Metal Diketonates", **2008**, 127-158.
90. Mandal, P. K.; McMurray, J. S., Pd-C-Induced Catalytic Transfer Hydrogenation with Triethylsilane. *The Journal of Organic Chemistry*, **2007**, *72* (17), 6599-6601.
91. Smith, P. A. S., Reagents for organic synthesis. *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry*, **1969**, *7* (2), 795-796.
92. Salvatore, R. N.; Yoon, C. H.; Jung, K. W., Synthesis of secondary amines. *Tetrahedron*, **2001**, *57* (37), 7785-7811.
93. Kappe, C. O., Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie*, **2004**, *43* (46), 6250-84.
94. C. Oliver Kappe, Doris Dallinger, Shaun S. Murphree, Chapter two - Microwave Theory. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists*, **2009**, 11-44.

95. Ježek, J.; Hlaváček, J.; Šebestík, J., *Biomedical Applications of Acridines: Derivatives, Syntheses, Properties and Biological Activities with a Focus on Neurodegenerative Diseases*. Springer International Publishing: **2017**.
96. Zawada, Z.; Šebestík, J.; Šafařík, M.; Bouř, P., Dependence of the Reactivity of Acridine on Its Substituents: A Computational and Kinetic Study. *European Journal of Organic Chemistry*, **2011**, 2011 (34), 6989-6997.
97. Solomon, V. R.; Almnayan, D.; Lee, H., Design, synthesis and characterization of novel quinacrine analogs that preferentially kill cancer over non-cancer cells through the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax and Bad. *European journal of medicinal chemistry*, **2017**, 137, 156-166.
98. Johns, S. C.; Crouch, L. L. E.; Grieve, S.; Maloney, H. L.; Peczkowski, G. R.; Jones, A. E.; Sharp, D.; Smith, R. B., A rapid, chromatography-free route to substituted acridine–isoalloxazine conjugates under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*, **2014**, 55 (22), 3308-3311.
99. Alexander, G. B.; Heston, W. M.; Iler, R. K., The Solubility of Amorphous Silica in Water. *The Journal of Physical Chemistry*, **1954**, 58 (6), 453-455.
100. Castillo, J.-C.; Orrego-Hernández, J.; Portilla, J., Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Promoted Direct N-Alkylation: Highly Chemoselective Synthesis of N-Alkylated Benzylamines and Anilines. *European Journal of Organic Chemistry*, **2016**, 2016 (22), 3824-3835.
101. Nguyen, R.; Jouault, N.; Zanirati, S.; Rawiso, M.; Allouche, L.; Fuks, G.; Buhler, E.; Giuseppone, N., Core–shell inversion by pH modulation in dynamic covalent micelles. *Soft Matter*, **2014**, 10 (22), 3926-3937.
102. Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W., The Gabriel Synthesis of Primary Amines. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1968**, 7 (12), 919-930.
103. Elderfield, R. C.; Mertel, H. E.; Mitch, R. T.; Wempen, I. M.; Werble, E., Synthesis of Primaquine and Certain of its Analogs<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77 (18), 4816-4819.
104. Ing, H. R.; Manske, R. H. F., CCCXII.—A modification of the Gabriel synthesis of amines. *Journal of the Chemical Society*, **1926**, 129 (0), 2348-2351.
105. M Sinead Curley, O.; E McCormick, J.; Stanley Mcelhinney, R.; Brian, T.; McMurry, H., Intermediates in the Ing-Manske reaction, *ARKIVOC*, **2003**, 2003 (7), 180-189.
106. Wolfe, S.; Hasan, S. K., Five-membered rings. II. Inter and intramolecular reactions of simple amines with N-substituted phthalimides. Methylamine as a reagent for removal of a phthaloyl group from nitrogen. *Canadian Journal of Chemistry* **1970**, 48 (22), 3572-3579.

107. Osby, J. O.; Martin, M. G.; Ganem, B., An exceptionally mild deprotection of phthalimides. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25 (20), 2093-2096.
108. Moles, E.; Galiano, S.; Gomes, A.; Quiliano, M.; Teixeira, C.; Aldana, I.; Gomes, P.; Fernandez-Busquets, X., ImmunoPEGliposomes for the targeted delivery of novel lipophilic drugs to red blood cells in a falciparum malaria murine model. *Biomaterials* **2017**, 145, 178-191.
109. Yuan, J.; Johnson, R. L.; Huang, R.; Wichterman, J.; Jiang, H.; Hayton, K.; Fidock, D. A.; Wellems, T. E.; Inglesse, J.; Austin, C. P.; Su, X.-z., Genetic mapping of targets mediating differential chemical phenotypes in *Plasmodium falciparum*. *Nat Chem Biol* **2009**, 5 (10), 765-771.
110. Prasher, P.; Sharma, M., Medicinal chemistry of acridine and its analogues. *MedChemComm*, **2018**.
111. Gniazdowski, M.; Szmigiero, L., Nitracrine and its congeners—An overview. *General Pharmacology: The Vascular System* **1995**, 26 (3), 473-481.
112. de Souza Pietra, R. C. C.; Rodrigues, L. F.; Teixeira, E.; Fried, L.; Lefkove, B.; Rabello, A.; Arbiser, J.; Ferreira, L. A. M.; Fernandes, A. P., Triphenylmethane Derivatives Have High In Vitro and In Vivo Activity against the Main Causative Agents of Cutaneous Leishmaniasis. *PLOS ONE* **2013**, 8 (1), e51864.
113. Taherpour, A. A.; Kvaskoff, D.; Bernhardt, P. V.; Wentrup, C., 9-Azidoacridine and 9-acridinyl nitrene. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2010**, 23 (4), 382-389.



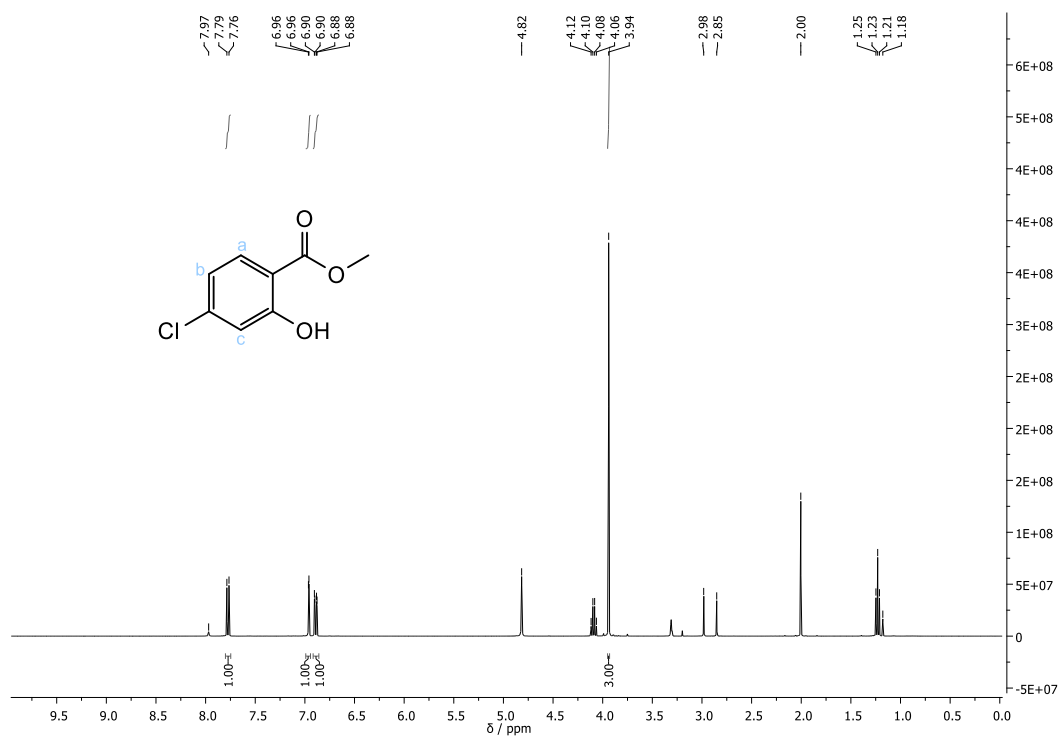
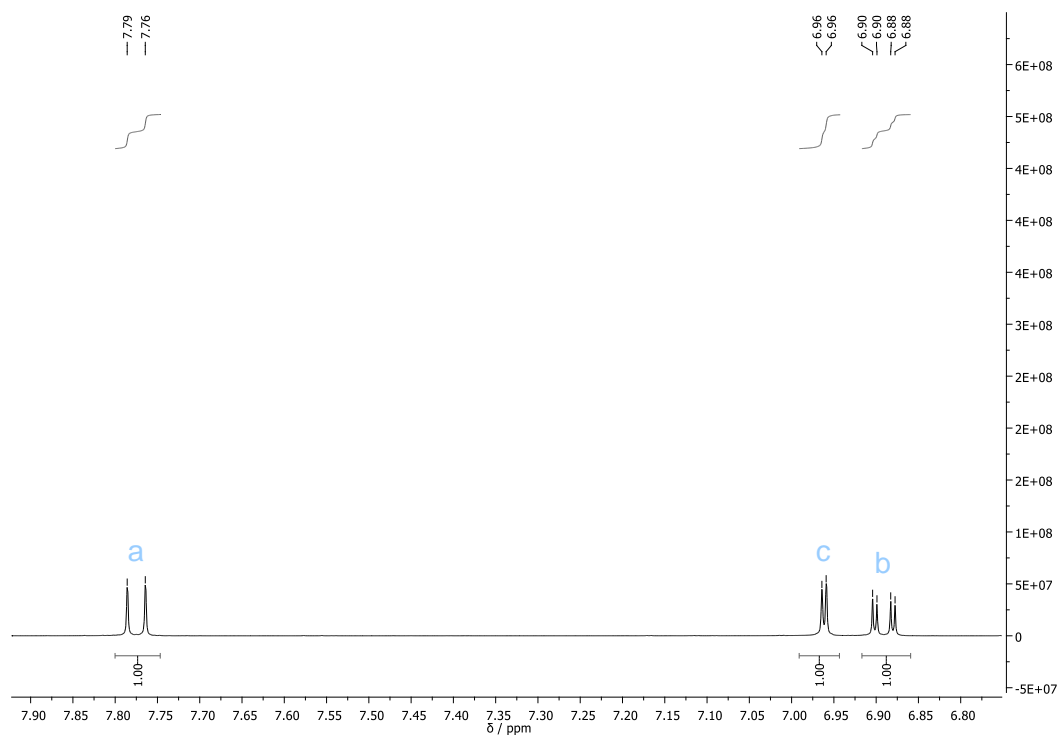


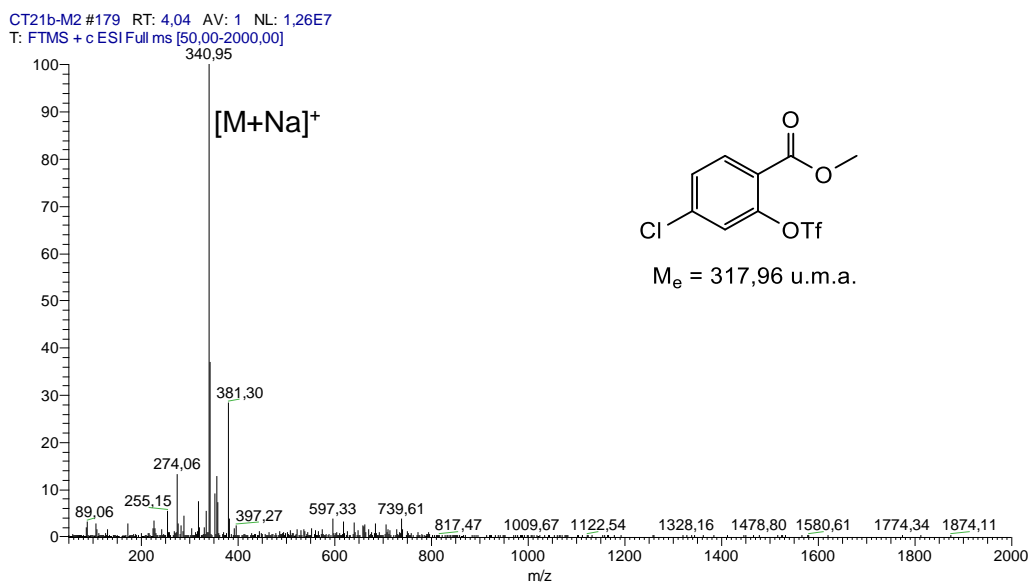
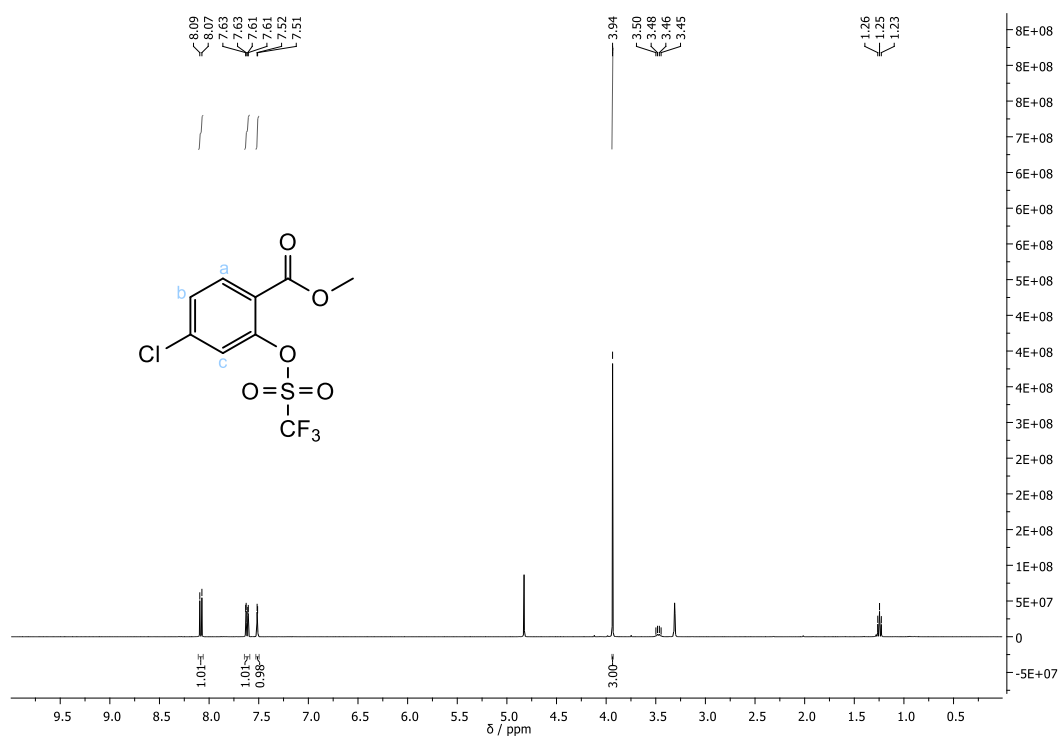
## Anexos

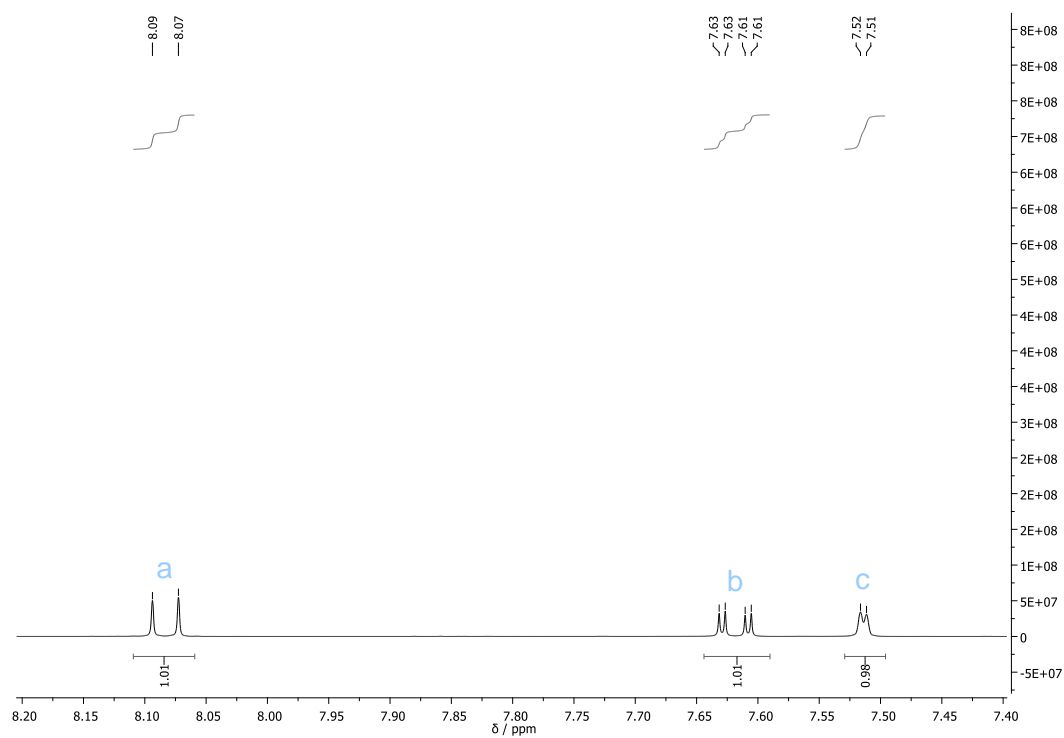
---



## Anexos

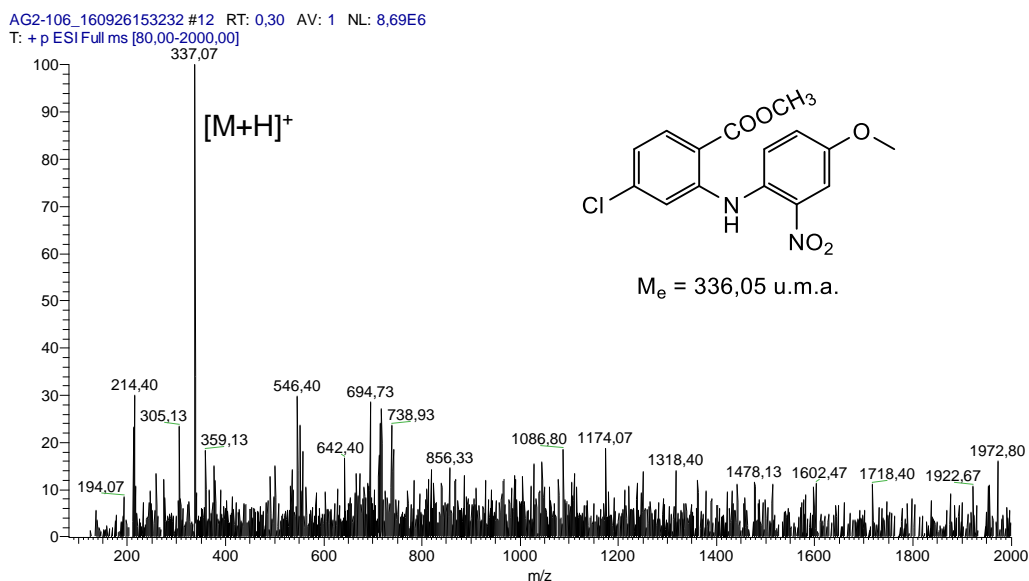
Anexo 1. Caracterização estrutural do composto 1 (ESI-IT MS e  $^1\text{H}$ -RMN):Figura 62. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) do composto 1.Figura 63. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ ) do composto 1 no intervalo 6.80 a 7.90 ppm.

**Anexo 2.** Caracterização estrutural do composto **2** (ESI-IT MS e <sup>1</sup>H-RMN):**Figura 64.** Espetros de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **2**.**Figura 65.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>) do composto **2**.

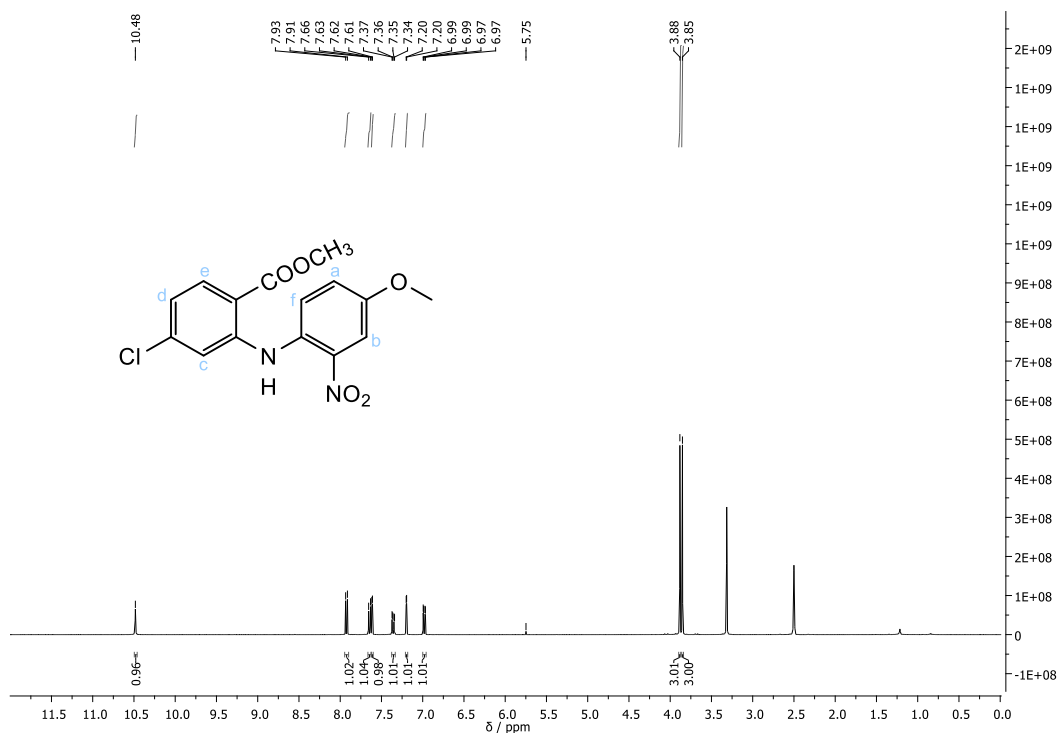


**Figura 66.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ ) do composto **2** no intervalo 7.40 a 8.20 ppm.

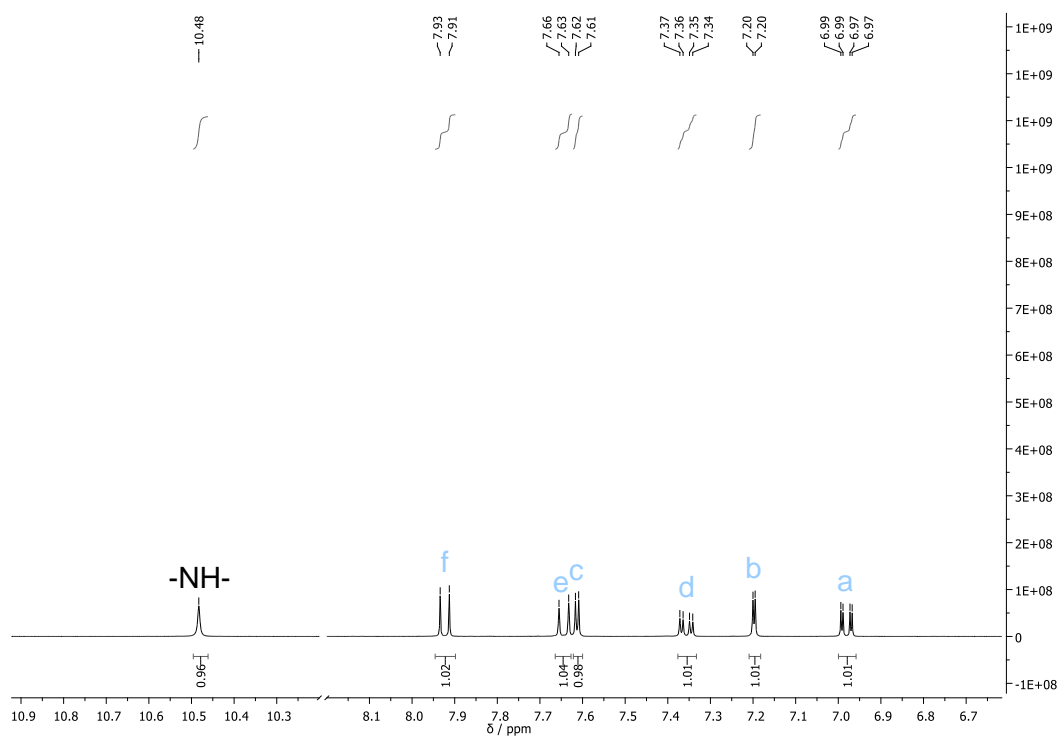
**Anexo 3. Caracterização estrutural do composto 3 (ESI-IT MS e <sup>1</sup>H-RMN):**



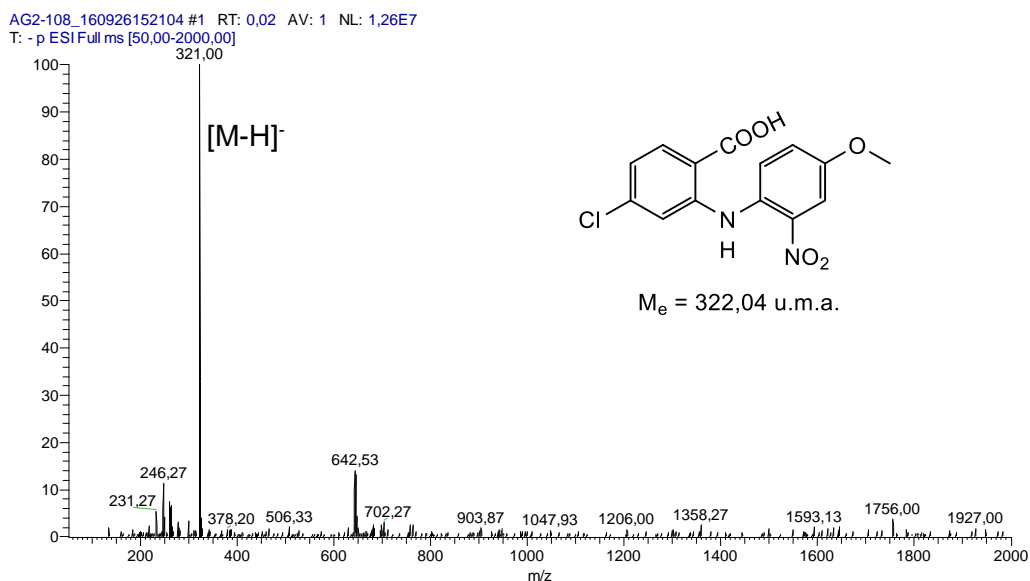
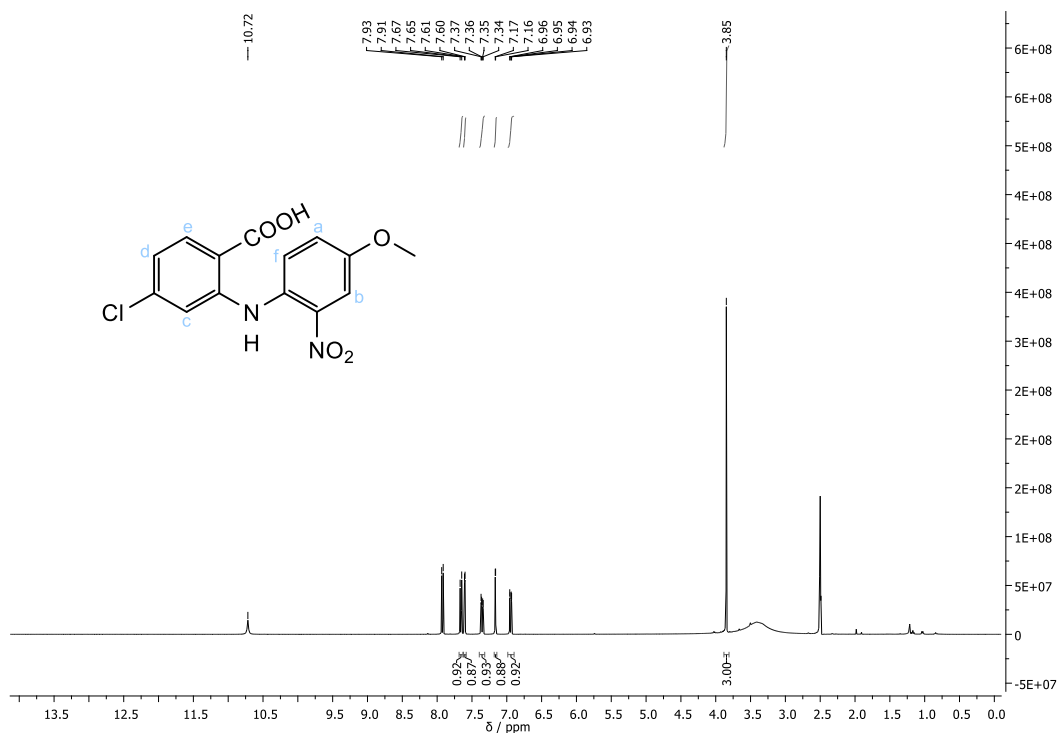
**Figura 67.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto 3.



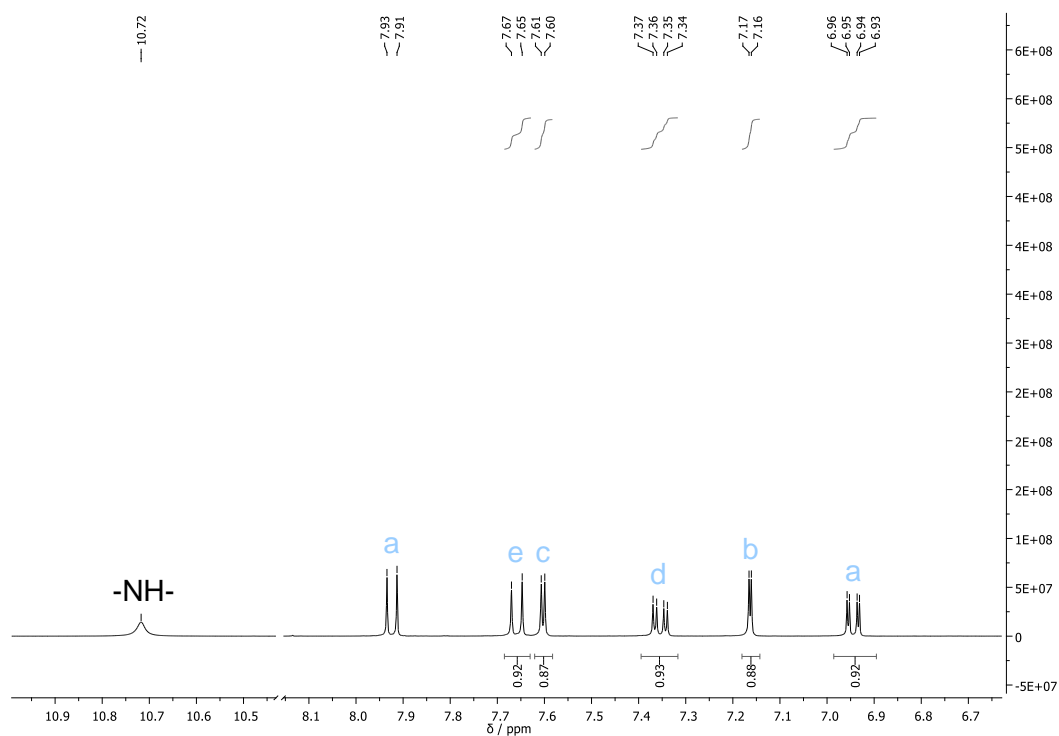
**Figura 68.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do composto 3.



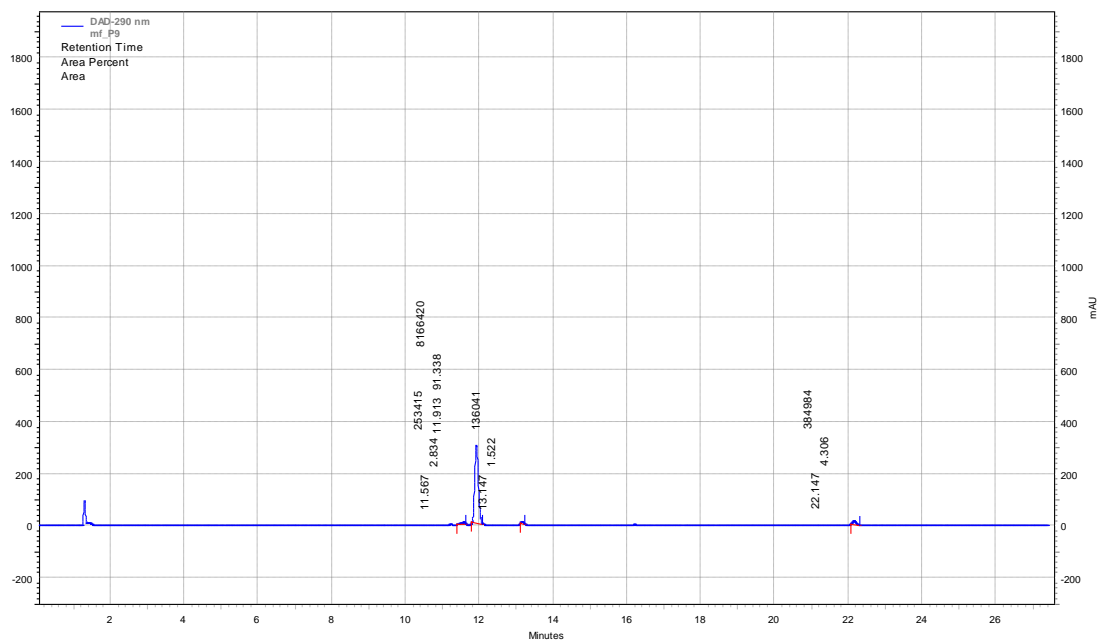
**Figura 69.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto **3** no intervalo 6.70 a 10.9 ppm.

**Anexo 4. Caracterização estrutural do composto 4 (ESI-IT MS e  $^1\text{H}$ -RMN):****Figura 70.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo negativo) do composto 4.**Figura 71.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto 4.

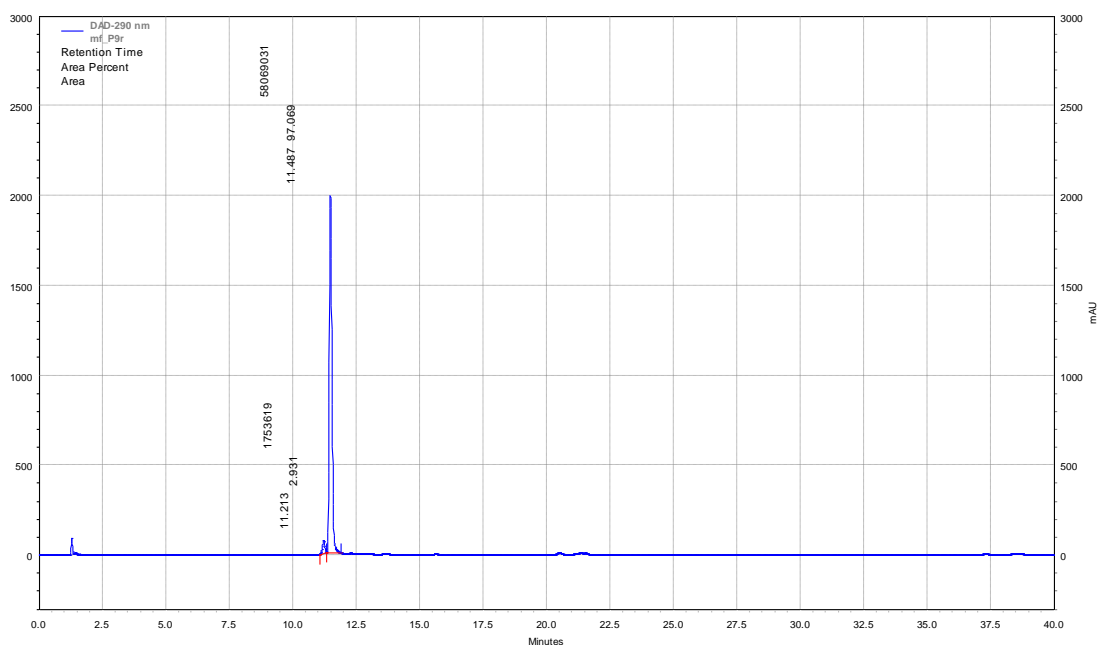




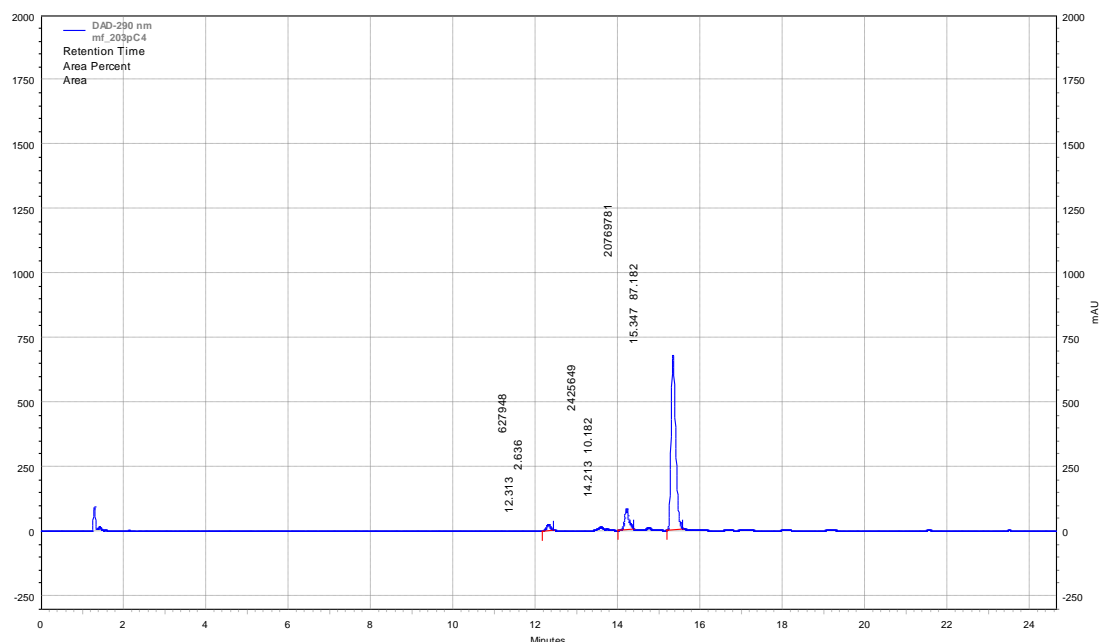
**Figura 72.** Espetro de  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) do composto **4** no intervalo 6.70 a 10.9 ppm.

**Anexo 5. Cromatograma relativo à pureza do composto 8:**

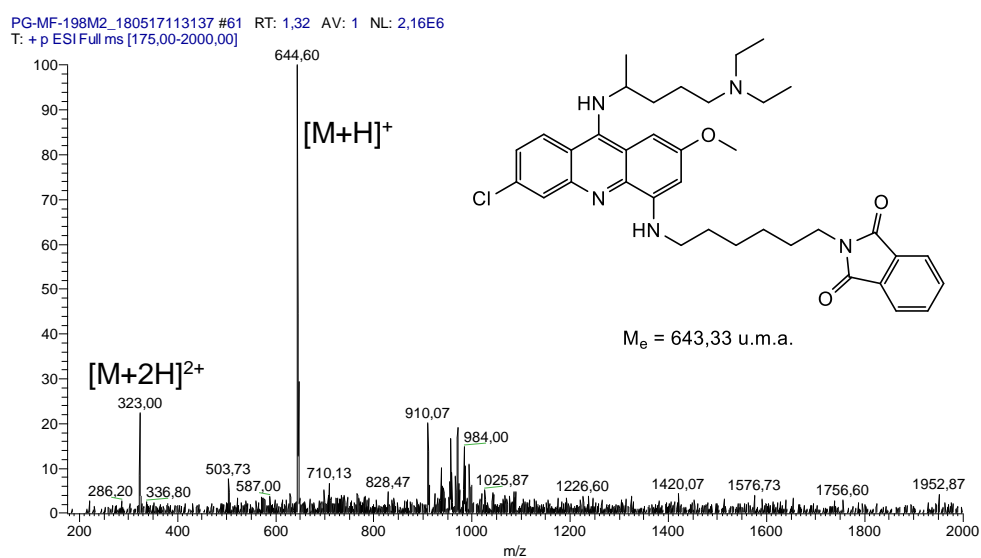
**Figura 73.** Cromatograma obtido para o composto 8, com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com detecção ao  $\lambda = 290$  nm.

**Anexo 6. Cromatograma relativo à pureza do composto 9:**

**Figura 74.** Cromatograma obtido para o composto 9, com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5 µm), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com detecção ao  $\lambda = 290$  nm.

**Anexo 7. Cromatograma relativo à pureza do composto 10a:**

**Figura 75.** Cromatograma obtido para o composto **10a**, com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5  $\mu$ m), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com deteção ao  $\lambda = 290$  nm.

**Anexo 8. Caracterização estrutural do composto 10b (ESI-IT MS):**

**Figura 76.** Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **10b**.

### Anexo 9. Caracterização estrutural do composto **11b** (ESI-IT MS) e cromatograma relativo à sua pureza:

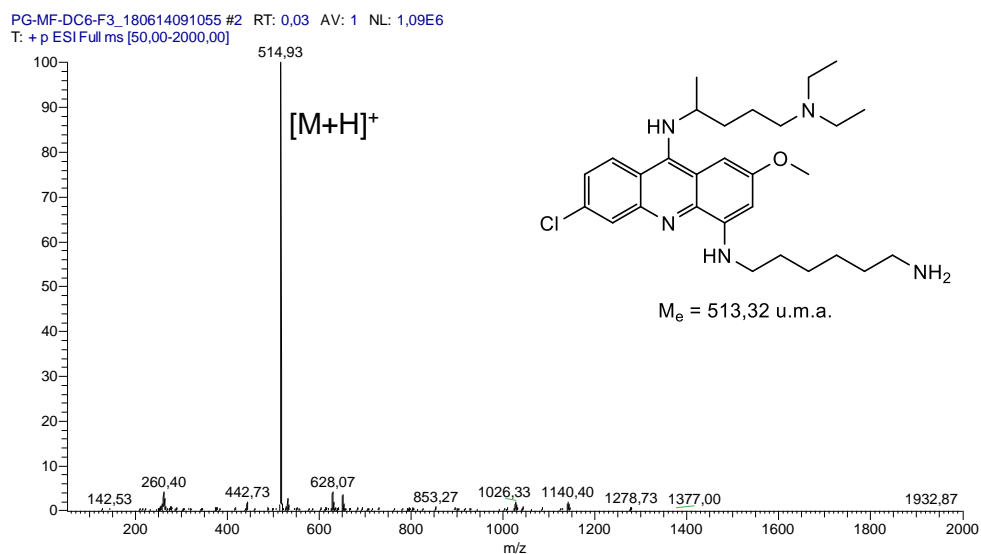


Figura 77. Espectro de massa (ESI-IT MS em modo positivo) do composto **11b**.

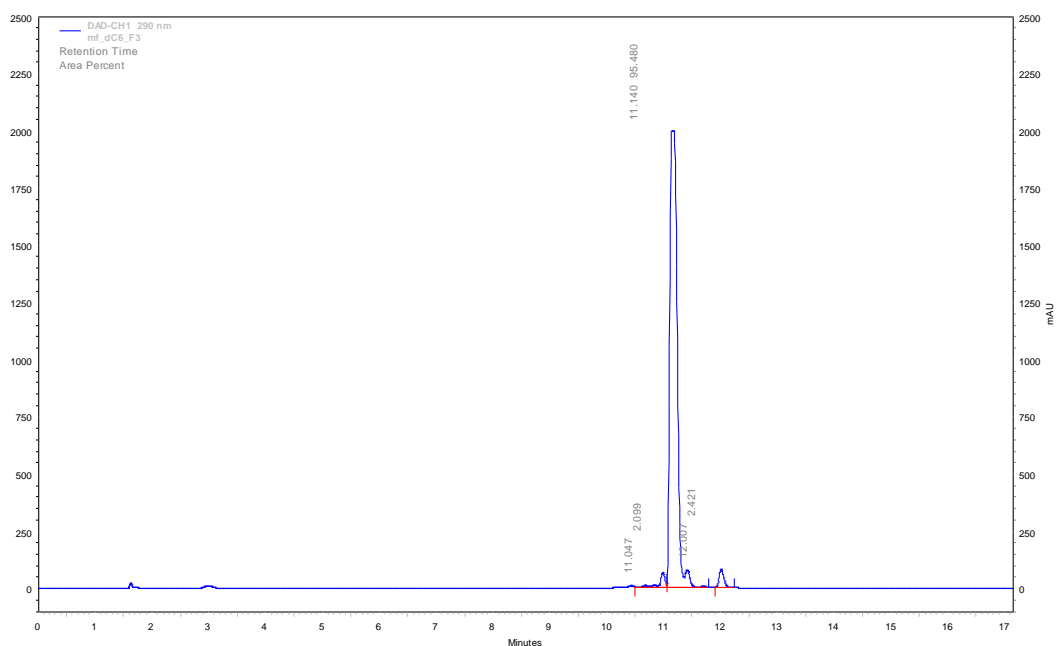


Figura 78. Cromatograma obtido para o composto **11b**, com uma eluição em gradiente de 1-100% ACN em água (0,05% TFA) numa coluna RP-18E (5  $\mu\text{m}$ ), ao longo de 30 minutos e a um fluxo de 1 ml/min, com detecção ao  $\lambda = 290 \text{ nm}$ .