

**Universidade do Algarve**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Cucurbiturilos como contentores moleculares:  
Estratégias de encapsulação de  
endoperóxidos com atividade antimalárica**

Anna Struk

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas**

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor André  
Duarte Lopes e coorientação da Professora Doutora Maria de  
Lurdes dos Santos Cristiano

2022

**Universidade do Algarve**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Cucurbiturilos como contentores moleculares:  
Estratégias de encapsulação de  
endoperóxidos com atividade antimalária**

Anna Struk

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas**

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor André  
Duarte Lopes e coorientação da Professora Doutora Maria de  
Lurdes dos Santos Cristiano

2022



# **Cucurbiturilos como contentores moleculares: Estratégias de encapsulação de endoperóxidos com atividade antimalária**

## **Declaração de autoria de trabalho:**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos e constam na listagem de referências incluída.

---

Faro, 28 de outubro de 2022

## **Copyright © 2022 Anna Struk**

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## AGRADECIMENTOS

Depois de uma longa caminhada de 5 anos, que se prolongou por mais um ano, posso dizer que finalmente consegui chegar a reta final da mesma. Como sempre me foi ensinando desde o primeiro dia, o “curso não se faz sozinho” e foi algo que pude constatar ao longo destes anos.

Desta forma, queria começar por agradecer à minha família que me permitiu ingressar nesta vida académica e aproveitar a mesma da melhor forma. Sei que envolveu bastante esforço da parte deles e, por isso, estou-lhes eternamente grata.

Aos meus amigos, Ricardo, Carolina, Filipa, Telma, Marcelo e Pereira um grande obrigada por me terem acompanhado nesta caminhada desde os primeiros dias, estiveram ao meu lado nos momentos de conquista e nos de derrota, proporcionando-me alguns dos melhores momentos que vivi durante o meu percurso académico. Sem a vossa cumplicidade, não teria sido a mesma coisa. Um especial agradecimento ao meu melhor amigo, Ricardo, que me acompanhou nesta vida académica, foste o meu companheiro de todas as horas, mostraste-me o verdadeiro significado de amizade e se cheguei até aqui foste um dos grandes motivadores para tal.

Aos meus padrinhos de curso, Olesya, Patrícia e Pedro, um agradecimento por me terem aceitado nesta grande família que é CF e por toda a amizade e carinho demonstrados. Aos meus afilhados, João e Catarina, obrigada pela vossa escolha, sem vocês não teria sido a mesma coisa, tornaram-me uma madrinha orgulhosa. Um obrigado também à minha afilhada emprestadada, Joana, e à *3Points* pela amizade.

A todas as pessoas que se cruzaram, de alguma forma, no meu caminho e que não estejam aqui diretamente mencionadas, obrigada por tornarem estes 5 anos os melhores anos da minha vida. Um enormíssimo FRA a todos vocês.

Um especial agradecimento aos meus orientadores, Professor Doutor André Duarte Lopes e Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano, por toda a paciência, disponibilidade e dedicação demonstradas e que permitiram a concretização deste trabalho. Não poderia ter feito melhor escolha.

Agradeço também à Patrícia Amado que me orientou no trabalho experimental desde o início, transmitindo-me todos os seus conhecimentos e por toda a sua ajuda e disponibilidade demonstradas.

Aos serviços farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia (IPO) do Porto Francisco Gentil e à equipa da Farmácia da Penha um obrigada pela oportunidade de estágio e pela contribuição para a minha formação enquanto futura farmacêutica.

Por fim, agradeço a todos os docentes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas por todos os ensinamentos que serão sem dúvida essenciais para poder exercer a futura profissão com brio e profissionalismo.



## RESUMO

No desenvolvimento de fármacos um dos principais desafios corresponde à criação de formulações estáveis que consigam alcançar o alvo terapêutico *in vivo*. Além da formulação de novos fármacos, o encapsulamento dos já existentes em contentores moleculares representa uma das estratégias utilizadas para otimizar a resposta terapêutica e minimizar os efeitos adversos. Alguns sistemas macrocíclicos têm sido explorados como contentores moleculares, evidenciando capacidade para encapsular agentes terapêuticos através de interações não covalentes. Os cucurbiturilos, de abreviatura CB[n], surgiram recentemente como uma nova classe de contentores moleculares capazes de encapsular uma grande variedade de moléculas, incluindo corantes fluorescentes, fármacos e moléculas biológicas.

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitas do género *Plasmodium*, transmitidos ao ser humano através da picada de mosquitos fêmea do género *Anopheles*, afetando principalmente áreas tropicais e sub-tropicais. São conhecidas 5 espécies de *Plasmodium* que infetam o ser humano, sendo *P. vivax* e *P. falciparum* responsáveis pela quase totalidade dos casos de malária, a nível mundial. Dados da OMS indicam que, em 2020, o número total de casos de malária rondava 241 milhões e o número de mortes por malária foi de ca. 627.000, um aumento de ca. 69.000 mortes em relação ao ano anterior. Este facto é atribuído, essencialmente, ao desenvolvimento de resistências pelo parasita aos fármacos antimaláricos em uso, incluindo às terapêuticas de primeira linha baseadas em artemisinina.

Assim, é urgente o desenvolvimento de terapêuticas com propriedades farmacológicas melhoradas, nomeadamente com eficácia contra estirpes de *P. falciparum* resistentes. Posto isto, a presente dissertação aborda o potencial dos cucurbiturilos para o encapsulamento de endoperóxidos com atividade antimalárica. Na primeira parte apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre a utilização de cucurbiturilos na encapsulação de fármacos. Na segunda parte descreve-se o trabalho experimental realizado, versando a síntese de um endoperóxido com propriedades antimaláricas e a sua encapsulação em CB[7], incluindo resultados preliminares de estudos *in vitro* da atividade antiplasmodial.

**Palavras-chave:** Cucurbiturilos; Contentores moleculares; Encapsulamento; Malária; Endoperóxidos; Trioxolanos.





## ABSTRACT

During the development of drugs, one of the main challenges corresponds to the creation of stable formulations that can reach the therapeutic target *in vivo*. In addition to the formulation of new drugs, the encapsulation of existing ones in molecular containers represents one of the strategies used to optimize therapeutic response and minimize adverse effects. Some macrocyclic systems have been exploited as molecular containers, showing ability to encapsulate therapeutic agents through non-covalent interactions. Cucurbiturils, abbreviated as CB[n], recently emerged as a new class of molecular containers capable of encapsulating a wide variety of guest molecules, including fluorescent dyes, drugs, and biological molecules.

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* parasites and transmitted to humans through the bites of infected female *Anopheles* mosquitoes, mainly affecting tropical and sub-tropical areas. There are 5 species of *Plasmodium* that can infect humans, being *P. vivax* and *P. falciparum* responsible for almost all cases of malaria worldwide. According to WHO, in 2020, there were 241 million cases of malaria and the estimated number of malaria deaths stood at 627.000, an increase of 69.000 deaths compared to the previous year. This fact is essentially attributed to the development of resistance by the *Plasmodium* parasites to the antimalarial drugs in use, including first-line treatment based on artemisinin combination therapies.

Therefore, the development of therapeutics with improved pharmacological properties that are effective against resistant *P. falciparum* strains is crucial. As such, the present dissertation addresses the potential of cucurbiturils for the encapsulation of endoperoxides with antimalarial activity. The first part of this dissertation offers a bibliographic review on the use of cucurbiturils in drug encapsulation, and the second part describes the experimental work undertaken towards approaching the encapsulation of an endoperoxide with antimalarial properties in CB[7]. Preliminary data on *in vitro* antiplasmodial activity is provided.

**Keywords:** Cucurbiturils; Molecular containers, Encapsulation; Malaria; Endoperoxides; Trioxolanes.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
<b>I. INTRODUÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>1</b>
<b>1. CONTENTORES MOLECULARES .....</b>	<b>2</b>
1.1. A Química Supramolecular.....	2
1.2. Aplicabilidade da química hospedeiro-hóspede na administração de fármacos... 4	
1.3. Cucurbiturilos.....	4
1.3.1. Propriedades químicas dos Cucurbiturilos .....	6
1.3.2. Aplicabilidade farmacológica dos cucurbiturilos.....	9
<b>2. MALÁRIA .....</b>	<b>13</b>
2.1. Fisiopatologia da malária .....	14
2.2. Controlo da doença .....	15
2.3. Terapêuticas atuais.....	16
2.3.1. Antimaláricos de base quinolínica .....	17
2.3.2. Antagonistas dos folatos .....	18
2.3.3. Antibióticos.....	18
2.3.4. Artemisinina e os seus análogos .....	19
2.3.5. Endoperóxidos sintéticos .....	20
2.4. Perspetivas futuras no tratamento da malária .....	23
<b>II. OBJETIVO DO TRABALHO .....</b>	<b>25</b>
<b>III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
1. REAGENTES E SOLVENTES .....	29
2. MATERIAIS .....	29
3. MÉTODOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	29
3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	30
3.2. Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) .....	32
3.3. Espectroscopia de refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) .....	32
3.4. Difração de raios X, método de pós (PXRD) .....	34
3.5. Espectroscopia de Raman .....	35

4.	PROCESSO DE SÍNTESE DO TRIOXOLANO NAC89/AS4 .....	36
4.1.	Purificação do composto AS1 .....	37
4.2.	Síntese do composto AS2 .....	37
4.3.	Síntese do composto AS3 .....	38
4.4.	Síntese do composto AS4 .....	39
5.	RECRISTALIZAÇÃO DO CB[7] .....	40
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
1.	CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO AS4 E DO CB[7] .....	43
1.1.	Análise do espectro de correlação $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HSQC) .....	43
1.2.	Análise dos espectros de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (COSY) .....	44
1.3.	Análise do espectro de massa do composto AS4 .....	45
2.	ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DO TRIOXOLANO EM CB[7] .....	46
2.1.	Análise dos espectros de RMN .....	46
2.2.	Análise do espectro de massa obtidos por LC-MS .....	50
2.3.	Análise dos espectros de ATR-FTIR .....	52
2.4.	Análise dos padrões obtidos por PXRD .....	1
2.5.	Análise dos espectros de Raman .....	55
3.	PROPOSTA PARA O MODO DE ENCAPSULAMENTO DO COMPOSTO AS4 EM CB[7] ....	56
4.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DO COMPLEXO AS4-CB[7] .....	56
V.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS .....	58
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
VII.	ANEXOS .....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I-1</b> – Esquema ilustrativo do processo de automontagem (“ <i>self-assembly</i> ”).....	2
<b>Figura I-2</b> – Esquema ilustrativo de como ocorre a formação de complexos hospedeiro-hóspede (“ <i>host-guest</i> ”).....	3
<b>Figura I-3</b> – Modelos estruturais dos cucurbiturilos CB[5] – CB[8].....	5
<b>Figura I-4</b> – Mapa com o potencial eletrostático dos cucurbiturilos CB[5] – CB[8], com as regiões a vermelho representando potenciais eletrostáticos negativos, e as regiões a azul potenciais positivos.....	6
<b>Figura I-5</b> – Representação da estrutura química da cadaverina (1), metil viologénio (2) e adamantilamina (3), hóspedes estabelecidos para CB[6], CB[7] e CB[8], respetivamente. ....	7
<b>Figura I-6</b> – Exemplos de fármacos encapsulados pelos cucurbiturilos.....	10
<b>Figura I-7</b> – Estrutura química do MPTP e do seu metabólito tóxico MPP <sup>+</sup> .....	12
<b>Figura I-8</b> – Representação do modo de ligação do CB[7] à quinina diprotonada (QnH <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ), com os átomos de azoto protonados representados a azul.....	12
<b>Figura I-9</b> – Representação esquemática do ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium</i> , no vetor (mosquito) e no hospedeiro (ser humano). ....	14
<b>Figura I-10</b> – Representação da estrutura química da quinina e de outros fármacos antimaláricos de base quinolínic. ....	17
<b>Figura I-11</b> – Representação da estrutura química de alguns fármacos antagonistas dos folatos usados contra a malária. ....	18
<b>Figura I-12</b> – Representação da estrutura química de alguns antibióticos usados na terapêutica da malária.....	19
<b>Figura I-13</b> – Representação da estrutura química da artemisina, com o farmacóforo representado a vermelho, e de alguns dos seus derivados semissintéticos. ....	20
<b>Figura I-14</b> – Representação das estruturas químicas de alguns endoperóxidos sintéticos, com os respetivos farmacóforos assinalados a vermelho. ....	21
<b>Figura I-15</b> – Representação da estrutura química do artefenomel.....	22
<b>Figura I-16</b> – Representação da estrutura química do composto E209.....	23
<b>Figura I-17</b> – Representação das estruturas químicas de alguns medicamentos, atualmente utilizados com outros fins terapêuticos, que também demonstraram atividade antimalárica. ....	24
<b>Figura II-1</b> – Representação das estruturas químicas dos trioxolanos NAC89, LC50 e LDC67, cuja atividade antimalárica foi avaliada. ....	27

<b>Figura III-1</b> – Representação da alteração do spin nuclear de uma amostra quando esta é colocada sob a influência de um campo magnético externo ( $B_0$ ).....	30
<b>Figura III-2</b> – Diagrama representativo das componentes de um espectrofotômetro de RMN. .	31
<b>Figura III-3</b> – Diagrama do interferômetro de Michelson.....	33
<b>Figura III-4</b> – Diagrama de um difratômetro de raios X. ....	34
<b>Figura III-5</b> – Ilustração do tipo de transições energéticas que ocorrem na “dispersão de Rayleigh” e no espalhamento de Raman. ....	35
<b>Figura III-6</b> – Esquema reacional ilustrativo do processo de síntese do composto AS4.....	36
<b>Figura III-7</b> – Esquema representativo da reação de conversão do composto AS1 no composto AS2.....	37
<b>Figura III-8</b> – Esquema representativo da reação de conversão do composto AS2 no composto AS3.....	38
<b>Figura III-9</b> – Esquema representativo da reação de conversão do composto AS3 no composto AS4.....	39
<b>Figura III-10</b> – Espectro $^1\text{H}$ -RMN do CB[7] em $\text{D}_2\text{O}-d_2$ . ....	41
<b>Figura IV-1</b> – Espectro de massa do composto AS4. ....	46
<b>Figura IV-2</b> – Esquema da clivagem da ligação peróxido do composto AS4, com os respectivos valores de m/z dos compostos resultantes.....	46
<b>Figura IV-3</b> – Espectros $^1\text{H}$ -RMN do a) CB[7], b) composto AS4 e c) mistura destes dois compostos em $\text{D}_2\text{O}-d_2$ . ....	47
<b>Figura IV-4</b> – Ampliação dos espectros de $^1\text{H}$ -RMN do a) composto AS4 e b) mistura deste composto com o CB[7], sendo possível observar os desvios nos sinais devidos a ressonâncias de prótons do composto AS4 após interação com o CB[7].....	48
<b>Figura IV-5</b> – Ampliação dos espectros de $^1\text{H}$ -RMN do a) CB[7] e b) mistura deste com o trioxolano AS4, onde é possível observar os desvios nos sinais devidos a ressonâncias de prótons do CB[7] após este interagir com o AS4. ....	48
<b>Figura IV-6</b> – Espectro de massa do composto AS4 com o CB[7]. ....	51
<b>Figura IV-7</b> – Representação esquemática do complexo de duas cargas formado entre o CB[7], o fragmento com m/z 128 proveniente da clivagem da ligação peróxido do trioxolano AS4 e o cátion de $\text{Na}^+$ . ....	51
<b>Figura IV-8</b> – Representação esquemática do complexo de duas cargas formado entre o CB[7], o íon molecular do trioxolano AS4 e o cátion de $\text{Na}^+$ .....	51
<b>Figura IV-9</b> – Representação a azul das ligações C-H do trioxolano AS4 que dão origem às bandas de estiramento na região entre $2750$ e $3050\text{ cm}^{-1}$ .....	1

<b>Figura IV-10</b> – Representação a azul das ligações C=O do CB[7] que dão origem à banda de estiramento na região entre 1650 e 1800 $\text{cm}^{-1}$ .....	1
<b>Figura IV-11</b> – Proposta para o modo de encapsulamento do composto AS4 em CB[7]. .....	56
<b>Figura VII-1</b> – Espetro $^1\text{H}$ -RMN do composto AS1 em $\text{CDCl}_3$ -d. ....	70
<b>Figura VII-2</b> – Espetro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto AS1 em $\text{CDCl}_3$ -d. ....	70
<b>Figura VII-3</b> – Espetro $^1\text{H}$ -RMN do composto AS2 em $\text{CDCl}_3$ -d. ....	71
<b>Figura VII-4</b> – Espetro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto AS2 em $\text{CDCl}_3$ -d. ....	71
<b>Figura VII-5</b> – Espetro $^1\text{H}$ -RMN do composto AS3 em $\text{CDCl}_3$ -d. ....	72
<b>Figura VII-6</b> – Espetro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto AS3 em $\text{CDCl}_3$ -d. ....	72
<b>Figura VII-7</b> – Espetro $^1\text{H}$ -RMN do composto AS4 em $\text{DMSO-d}_6$ . ....	73
<b>Figura VII-8</b> – Espetro $^{13}\text{C}$ -RMN do composto AS4 em $\text{DMSO-d}_6$ .....	73
<b>Figura VII-9</b> – Espetro HSQC do composto AS4 em $\text{D}_2\text{O-d}_2$ . ....	74
<b>Figura VII-10</b> – Espetro COSY do composto AS4 em $\text{D}_2\text{O-d}_2$ . ....	74
<b>Figura VII-11</b> – Espetro COSY do CB[7] em $\text{D}_2\text{O-d}_2$ . ....	75
<b>Figura VII-12</b> – Espetro $^1\text{H}$ -RMN da mistura do composto AS4 com o CB[7] em $\text{D}_2\text{O-d}_2$ .....	75
<b>Figura VII-13</b> – Espetro COSY da mistura do composto AS4 com o CB[7] em $\text{D}_2\text{O-d}_2$ . ....	76
<b>Figura VII-14</b> – Espetros RMN que demonstram uma degradação do composto AS4 após solubilização deste em água, aparecendo novos picos após 3 dias.....	76



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I-1</b> – Parâmetros estruturais dos cucurbiturilos.....	6
<b>Tabela IV-1</b> – Correlações encontradas entre os espectros RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ (HSQC) do composto AS4 (em $\text{DMSO-d}_6$ ).....	43
<b>Tabela IV-2</b> – Correlações encontradas nos espectros COSY do trioxolano AS4 e do CB[7] (em $\text{D}_2\text{O-d}_2$ ).....	44
<b>Tabela IV-3</b> – Correlações encontradas nos espectros COSY da mistura do trioxolano AS4 com o CB[7] (em $\text{D}_2\text{O-d}_2$ ).....	49
<b>Tabela IV-4</b> – Atividades obtidas contra as linhas celulares 3D7-GFP de <i>P. falciparum</i> sensíveis a cloroquina e a mefloquina. ....	57

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico IV-1</b> – Espectros de ATR-FTIR obtidos entre os números de onda 2000 e 4000 $\text{cm}^{-1}$ , sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7]. ....	52
<b>Gráfico IV-2</b> – Espectros de ATR-FTIR obtido entre os números de onda 350 e 2000 $\text{cm}^{-1}$ , sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7]. ....	53
<b>Gráfico IV-3</b> – Espectros obtidos após análise por PXRD, sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7]. ....	1
<b>Gráfico IV-4</b> – Espectros de Raman obtidos, sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7]. ....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACT</b>	Terapêuticas de Combinação à Base de Artemisinina ( <i>Artemisinin-based Combination Therapy</i> )
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARTs</b>	Artemisininas
<b>ATR</b>	Refletância Total Atenuada ( <i>Attenuated Total Reflectance</i> )
<b>ATR-FTIR</b>	Reflexão Total Atenuada no Infravermelho com Transformada de Fourier, ( <i>Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared</i> )
<b>CB</b>	Cucurbiturilo
<b>CCMar</b>	Centro de Ciências do Mar
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>COSY</b>	Espetros de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ( <i>Correlation Spectroscopy</i> )
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>DHA</b>	Dihidroartemisinina
<b>FTIR</b>	Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, ( <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i> )
<b>HSQC</b>	Espetros de correlação $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ( <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> )
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória Média
<b>IR</b>	Infravermelho
<b>LC-MS</b>	Espetrometria de Massa por Cromatografia em Fase Líquida ( <i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> )
<b>MAO-B</b>	Monoamina Oxidase B
<b>MPP+</b>	1-metil-4-fenilpiridina
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PC</b>	Coefficiente de Empacotamento ( <i>Packing Coefficient</i> )
<b>ppm</b>	partes por milhão
<b>PXRD</b>	Difração de raios X, método de pós ( <i>Powder X-Ray Diffraction</i> )
<b>Qn</b>	Quinina
<b>RF</b>	Radiofrequência
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TLC</b>	Cromatografia analítica em camada fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
<b>TsOH</b>	Ácido p-toluenossulfônico



# I. INTRODUÇÃO TEÓRICA

---

# 1. CONTENTORES MOLECULARES

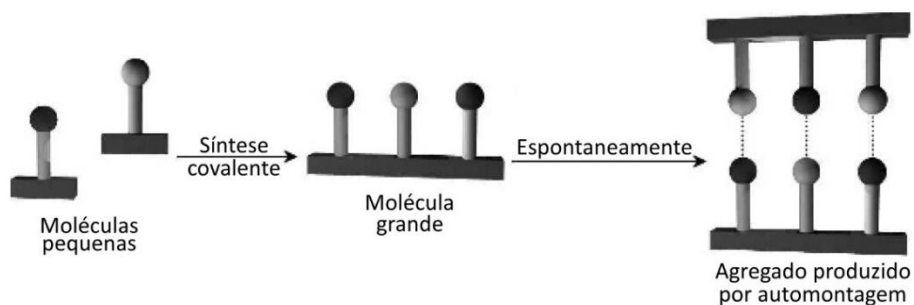
## 1.1. A Química Supramolecular

A designação “Química Supramolecular” foi introduzida em 1969 por Jehn-Marie Lehn, com o objetivo de identificar a vertente da Química que compreende a “química das relações intermoleculares”, também descrita como a “química além da molécula”. (1) Para Lehn, uma supermolécula pode ser definida como uma entidade complexa criada por associação de duas ou mais moléculas unidas por forças intermoleculares. (2)

Pela sua transversalidade e abrangência, a química supramolecular implantou-se como uma área multidisciplinar onde se cruzam outras áreas clássicas da Química, tais como a química orgânica e a química inorgânica, importantes para a síntese dos precursores que irão formar a supermolécula, a química física, relevante para o estudo das propriedades dos sistemas supramoleculares, e a química computacional, para compreender e prever o comportamento supramolecular. (3)

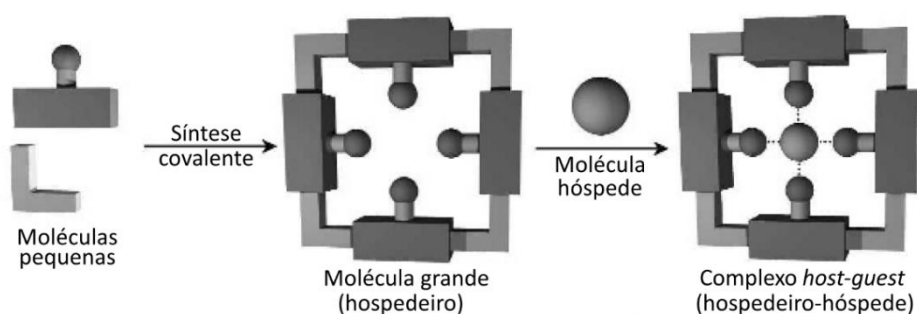
A química supramolecular divide-se em duas categorias, a química hospedeiro-hóspede (“*host-guest*”) e a automontagem (“*self-assembly*”), que divergem essencialmente no tamanho das moléculas envolvidas na ligação e na forma da supermolécula.

No caso da automontagem, ambas as moléculas apresentam tamanhos semelhantes, formando-se um equilíbrio entre as duas espécies que produz um agregado. (Figura I-1) (3) A formação de cristais moleculares, de bicamadas lipídicas, da dupla hélice dos ácidos nucleicos e a associação de um substrato ao seu recetor são alguns exemplos destes agregados. (4)



**Figura I-1** – Esquema ilustrativo do processo de automontagem (“*self-assembly*”).  
Adaptado de (3).

Pelo contrário, no caso da química hospedeiro-hóspede existe uma molécula que é significativamente maior e que irá envolver a outra, sendo assim designada por hospedeiro (“*host*”), enquanto a molécula menor, envolvida pelo hospedeiro, é denominada por hóspede (“*guest*”). (Figura I-2) (3) Neste caso, os hospedeiros possuem uma cavidade interna na qual o hóspede é incorporado, formando um complexo de inclusão. As duas espécies permanecem ligadas por forças intermoleculares, tais como interações de van der Waals, ligações por pontes de hidrogénio e/ou interações iónicas. Para aplicações em sistemas de transporte e entrega de fármacos é importante que as interações permitam a dissociação do complexo, em condições fisiológicas, no local de ação. (5) Contentores moleculares, tais como éteres em coroa, ciclodextrinas, cucurbiturilos, calixarenos e pilararenos, são alguns dos hospedeiros moleculares mais estudados na química supramolecular “*host-guest*”. (6)



**Figura I-2** – Esquema ilustrativo de como ocorre a formação de complexos hospedeiro-hóspede (“*host-guest*”). Adaptado de (3).

Estes contentores moleculares apresentam uma diversidade de aplicações, entre as quais se destaca a sua capacidade de entrega de fármacos no local de ação, e de atuar como catalisadores, em síntese química. (7,8) A cicloadição dipolar azida-acetileno foi a primeira reação descrita que se realizou dentro da cavidade do CB[6], tendo sido reportada uma aceleração em  $5,5 \times 10^4$  vezes, comparada com o processo não catalizado. (9) Estes contentores permitem modificar a reatividade química dos respetivos hóspedes, melhorar a solubilidade de várias substâncias, conferir proteção contra a degradação por microrganismos ou outros fatores ambientais, melhorar a fluorescência de corantes, entre muitas outras aplicações. (10–13)

## **1.2. Aplicabilidade da química hospedeiro-hóspede na administração de fármacos**

No desenvolvimento de novos fármacos, um dos principais desafios corresponde a criação de formulações estáveis das espécies farmacologicamente ativas e que consigam alcançar o alvo terapêutico *in vivo* de forma rápida e quantitativa, com o mínimo de efeitos adversos. (14,15) Vários estudos demonstram que um dos principais obstáculos no desenvolvimento de novos fármacos advém da baixa biodisponibilidade destes. Vários fatores podem afetar a biodisponibilidade, nomeadamente a solubilidade, a estabilidade (*in vivo* e *in vitro*), a capacidade para atravessar as membranas, a toxicidade, a distribuição, o metabolismo, entre outros. (16) O encapsulamento de fármacos em contentores moleculares é uma das estratégias que podem ser utilizadas para otimizar a biodisponibilidade. (14,17)

Uma das famílias de moléculas mais amplamente utilizadas na formulação de agentes terapêuticos são as ciclodextrinas (CDs). Porém, as CDs apresentam algumas limitações em relação ao seu uso em condições clínicas, nomeadamente nefrotoxicidade, especialmente pronunciada quando não são metabolizadas, pelo que o seu uso é limitado às formas de libertação oral e tópica. Além disso, as CDs apresentam uma baixa afinidade de ligação para a maioria dos hóspedes, requerendo concentrações elevadas de CDs para formar uma quantidade suficiente de complexos "host-guest". (15) Além das ciclodextrinas, os calixarenos e os pillararenos também têm sido amplamente estudados no desenvolvimento de complexos hospedeiro-hóspede com inúmeros fármacos. (18,19)

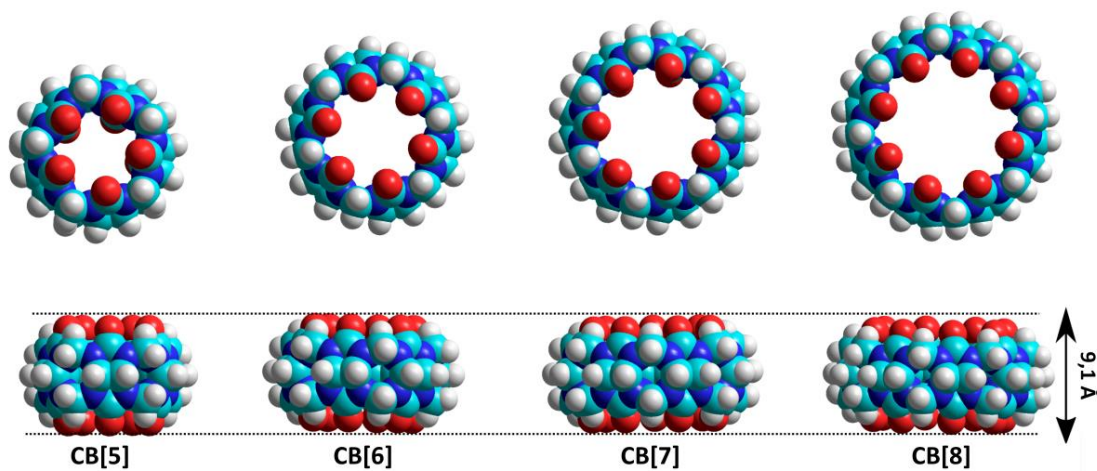
Mais recentemente, os cucurbiturilos surgiram como uma nova geração de contentores com grande potencial para serem aplicados em medicina, como veículos de fármacos. (14,15)

## **1.3. Cucurbiturilos**

Os cucurbiturilos (CBs), de abreviatura CB[n], são macromoléculas cíclicas constituídas por n unidades de glicolurilo ligados por 2n unidades de metileno, formando dois portais hidrofílicos e uma cavidade hidrofóbica interna que permite formar complexos de inclusão. (14,17) Estes contentores moleculares foram desenvolvidos em 1905 por Behrend e colaboradores. A sua síntese baseou-se na

condensação de glicolurilo e formaldeído em HCl concentrado, obtendo-se uma substância cristalina por recristalização do produto com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. (8,20) O grupo de Behrend demonstrou a capacidade dos CBs para formar complexos com uma variedade de espécies químicas, nomeadamente por reação com KMnO<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>, NaAuCl<sub>4</sub>, vermelho congo e azul de metileno. (20,21)

Apesar de o potencial dos CBs ter sido demonstrado por Behrend em 1905, foi em 1981 que a estrutura dos compostos veio a ser caracterizada, por Mock e colaboradores, como sendo constituída por um contentor com 6 unidades de glicolurilo unidas por 12 pontes de metileno, tratando-se, portanto, do CB[6] (Figura I-3). Esta estrutura foi designada por “cucurbiturilo” devido à sua semelhança com uma abóbora, que pertence à família botânica *Cucurbitaceae*. (8,10,20) Posteriormente, os trabalhos de Kim e Day, conduziram à modificação das condições iniciais da reação de Behrend e colaboradores, tornando possível o isolamento e caracterização de novo cucurbiturilos com 5, 7, 8 ou até 10 unidades de glicolurilo, designados pelas abreviaturas CB[5], CB[7], CB[8] e CB[10], respetivamente. (Figura I-3) (10)



**Figura I-3** – Modelos estruturais dos cucurbiturilos CB[5] – CB[8]. Adaptado de (10).

Estes cucurbiturilos apresentam semelhanças entre si, diferindo, principalmente, no número de unidades de glicolurilo e pontes de metileno que os compõem e, conseqüentemente, no tamanho da cavidade hidrofóbica, mas apresentando a mesma altura. A Tabela I-1 apresenta os principais parâmetros estruturais dos cucurbiturilos. De referir que, em comparação com outros hospedeiros, os CBs apresentam uma estrutura muito rígida. (8,22)

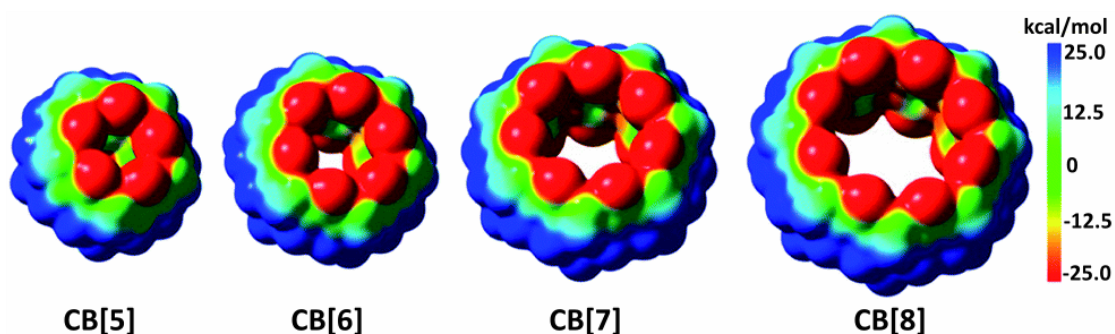


**Tabela I-1** – Parâmetros estruturais dos cucurbiturilos. Adaptado de (8).

	CB[5]	CB[6]	CB[7]	CB[8]	CB[10]
Diâmetro externo (Å)	13,1	14,4	16,0	17,5	20,0
Diâmetro da cavidade interna (Å)	4,4	5,8	7,3	8,8	11,7
Diâmetro do portal (Å)	2,4	3,9	5,4	6,9	10,0
Altura (Å)	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1

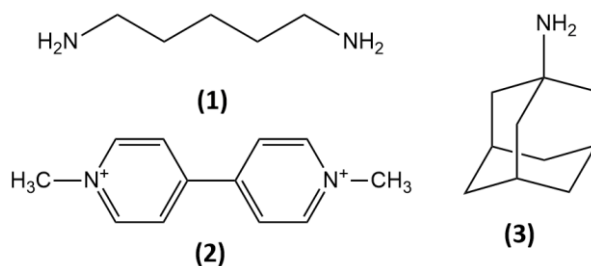
### 1.3.1. Propriedades químicas dos Cucurbiturilos

Uma das principais características destes contentores moleculares é a hidrofobicidade da cavidade interna, devido à ausência de grupos funcionais e pares de elétrons apontando para o interior e à elevada densidade eletrônica nos portais, devido à presença de grupos carbonilo, garantindo a funcionalidade dos CBs como recetores de catiões. (Figura I-4) (8) A natureza apolar da cavidade associada à polaridade dos portais confere aos cucurbiturilos um elevado momento quadrupolar, coerente com o eixo principal de simetria dos CBs, e que permite a formação de interações eletrostáticas com moléculas hóspedes dipolares e quadrupolares. (22)



**Figura I-4** – Mapa com o potencial eletrostático dos cucurbiturilos CB[5] – CB[8], com as regiões a vermelho representando potenciais eletrostáticos negativos, e as regiões a azul potenciais positivos. Adaptado de (23).

Importa referir que, nos CBs, os portais são aproximadamente 2Å mais estreitos que a própria cavidade, o que pode resultar em barreiras para a associação e dissociação de hóspedes, devido à elevada densidade eletrônica, favorecendo, porém, a ligação “*host-guest*”. (20,22) Tendo em conta estas características dos CBs, não é de estranhar que espécies catiónicas com uma região hidrofóbica apresentem constantes de ligação elevadas com estes hospedeiros moleculares. Exemplos destes hóspedes para CB[6], CB[7] e CB[8] incluem cadaverina, metil viologénio e a adamantalina, respetivamente. (Figura I-5) (10)



**Figura I-5** – Representação da estrutura química da cadaverina (1), metil viologénio (2) e adamantilamina (3), hóspedes estabelecidos para CB[6], CB[7] e CB[8], respetivamente.

De forma a compreender a ligação que se estabelece entre os cucurbiturilos e os seus hóspedes, é fundamental a compreensão do microambiente físico da cavidade interna. Quando ocorre a encapsulação de uma molécula no ambiente interno dos CBs, observam-se geralmente alterações nos seus espetros de absorção, fluorescência e RMN, indicativas da ocorrência de alterações no ambiente eletrónico e/ou magnético circundante devido às interações estabelecidas. (8) A natureza destas ligações é semelhante à das interações não covalentes que os fármacos estabelecem nas suas ligações aos recetores biológicos, incluindo interações hidrofóbicas, ligações por pontes de hidrogénio e interações ião-dipolo e dipolo-dipolo. (17)

Dependendo do tamanho da cavidade interna do cucurbiturilo, este pode acomodar tamanhos específicos da molécula hóspede. O CB[5], devido ao seu tamanho mais reduzido, é mais adequado para o encapsulamento de gases, enquanto o CB[6] é capaz de “hospedar” cadeias alquílicas, o CB[7] acomoda compostos aromáticos de baixo peso molecular e o CB[8] consegue fazer complexos de inclusão com mais de uma molécula. (8,10) Ou seja, é requisito a existência de complementaridade entre o tamanho do hóspede e o volume do sítio de ligação. Esta pode ser avaliada através do coeficiente de empacotamento (*packing coefficient*, PC), um indicador da qualidade de ajuste dos complexos de inclusão proposto por Rebek e Mecozzi, aplicado aos CBs por Nau e colaboradores, que traduz a razão entre o tamanho do hóspede e o volume da cavidade do hospedeiro. As melhores afinidades de ligação hospedeiro-hóspede são geralmente associadas a um PC de 55%, enquanto valores superiores ou inferiores são associados a afinidades mais baixas. (8,24) No caso dos cucurbiturilos, Nau e colaboradores chegaram a um valor de coeficiente de empacotamento ótimo de 55±9%. (22) Por exemplo, segundo este valor de PC a

cavidade interna dos cucurbiturilos tem a capacidade de hospedar entre 2 (CB[5]) e 22 (CB[10]) moléculas de água chamadas águas de “alta energia”. A água foi a primeira molécula cujo encapsulamento em cucurbiturilos foi demonstrado. (8,24)

Ao contrário do que acontece normalmente em ambiente aquoso, em que existe uma competição da água por ligações de hidrogénio e a solvatação das espécies carregadas, ocorrendo uma queda da afinidade hospedeiro-hóspede, quando comparada com solventes orgânicos, nos cucurbiturilos tal não acontece. A saída das moléculas de água de “alta energia”, presentes na cavidade interna dos CBs em meio aquoso, proporciona um ganho entrópico e entálpico, fornecendo, assim, a força motriz para a complexação dos hospedeiros nestes contentores moleculares em água, o que permite formar complexos de alta afinidade de ligação. (10)

Uma das potenciais limitações da família CB a ser considerada é a sua relativamente baixa solubilidade em água. Os CB[5] e CB[7] possuem solubilidades mais altas, em comparação com os CB[6] e CB[8]. Esta diferença pode ser racionalizada através das interações CH...O estabelecidas entre as unidades do cucurbiturilo no estado sólido, mais eficientes para os CB[n] de número par ( $n = 6$  e  $8$ ) devido à orientação dos seus anéis. Contudo, a solubilidade pode ser melhorada através da adição de ácidos, que irão protonar os portais do CB, ou de sais (catiões), que estabelecem ligações com os portais carbonilo. (20,22) A solubilidade aquosa dos cucurbiturilos pode também ser aumentada pela formação de complexos “*host-guest*” ou, em alternância, o cucurbiturilo pode aumentar a solubilidade do fármaco, diminuindo a possibilidade de fármacos hidrofóbicos sofrerem agregação em meio aquoso. (17,19)

A presença de elevadas concentrações de sal e ácidos nos principais fluidos do corpo humano (plasma sanguíneo, saliva, fluidos gástricos, intestinais e nasais), permite a solubilização dos cucurbiturilos e dos seus complexos “*host-guest*” nestes líquidos orgânicos até concentrações terapêuticas. De salientar, porém, que os catiões existentes nos fluidos corporais podem ligar-se aos portais dos cucurbiturilos, afetando a libertação dos fármacos ou a força de encapsulamento dos mesmos. Este efeito é mais acentuado no caso de moléculas pequenas, que podem ser totalmente encapsuladas na cavidade hidrofóbica do CB, uma vez que os catiões podem atuar como barreiras à libertação do hóspede. (19)

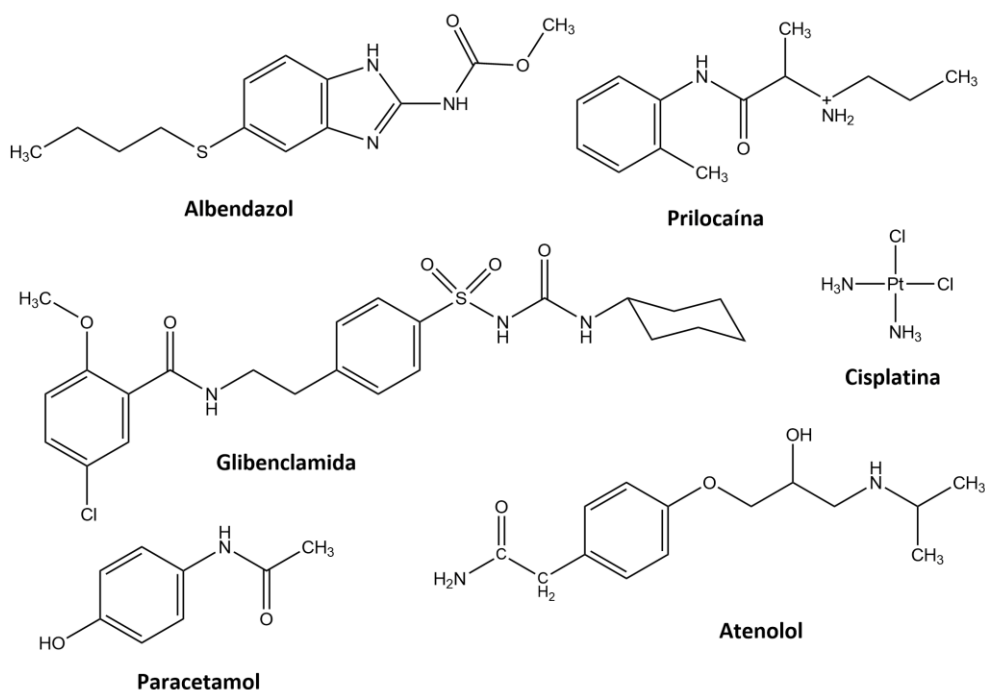
Relativamente à toxicidade dos cucurbiturilos, vários estudos indicam que estes contentores são consideravelmente inertes tanto *in vitro*, como *in vivo*, em dosagens até 250 mg/kg em condições de administração intravenosa lenta. (25–28) Foi também estabelecido que a mistura de CB[7]/CB[8] na proporção de 1:1 apresenta uma dose máxima tolerada superior a 600 mg/kg quando administrada oralmente, sendo superior a 300 mg/kg tanto para CB[7] como para CB[8], se for excluída a possibilidade muito improvável duma interação entre os dois hóspedes. (26)

### **1.3.2. Aplicabilidade farmacológica dos cucurbiturilos**

Devido a todas as suas propriedades químicas anteriormente descritas, não é de admirar que o potencial dos cucurbiturilos para serem utilizados com fins terapêuticos seja alvo de inúmeros estudos, sendo possível encapsular dentro destes contentores uma grande variedade de moléculas, incluindo corantes fluorescentes, fármacos e moléculas biológicas. A encapsulação destas moléculas nos cucurbiturilos afeta as suas propriedades em diferentes graus, podendo, por exemplo, melhorar a intensidade e duração da fluorescência nos corantes fluorescentes e assim facilitar o desenvolvimento de biossensores com maior sensibilidade para um diagnóstico mais preciso da doença. (29) Como exemplo, a encapsulação do corante carboxitetrametilrodamina em CB[7] permite aumentar a duração da fluorescência, possibilitando o seu uso em microscopia de alta resolução. (30)

A encapsulação em cucurbiturilos permite também aumentar a solubilidade e estabilidade dos fármacos e proporcionar uma libertação controlada do medicamento, facilitando o tratamento de doenças como o cancro ou distúrbios cerebrais. (29) Entre os vários cucurbiturilos existentes, aquele que recebeu maior atenção como hóspede de diversas moléculas foi o CB[7], devido à sua maior solubilidade em água e à grande variedade de moléculas com as quais forma complexos hospedeiro-hóspede. Em contrapartida, o CB[8] pode ser útil para a encapsulação simultânea de várias moléculas hóspede. (17)

Vários estudos demonstram que estes contentores formam complexos com uma ampla gama de moléculas farmacologicamente ativas, tais como o albendazol (vermicida), a prilocaína (anestésico local), a glibenclamida (antidiabético), o atenolol (antihipertensor), o paracetamol (analgésico), a cisplatina (antineoplásico), entre outros (Figura I-6). (19)



**Figura I-6** – Exemplos de fármacos encapsulados pelos cucurbiturilos.

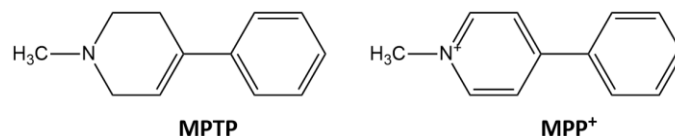
Como a administração oral é sempre a via de administração preferencial, é importante que as substâncias ativas sejam solúveis nos fluidos gastrointestinais de forma a serem absorvidas pelas células epiteliais para poderem exercer a sua ação farmacológica. A encapsulação de fármacos pouco solúveis nos CBs permite aumentar a sua solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade em meio fisiológico. (19,29) Como exemplo, a solubilidade do albendazol aumenta entre 300 e 400 vezes após a encapsulação em CB[6] ou CB[7], a pH 3, e cerca de 2000 vezes a pH 6.6, quando a mistura é preparada a pH 3, com posterior aumento do pH. Outros homólogos dos cucurbiturilos e dos seus derivados acíclicos também promoveram ao aumento da solubilidade desta molécula. (14,31)

Além da baixa solubilidade de alguns fármacos, a variação da estabilidade com o pH, a foto-estabilidade e a suscetibilidade à degradação em reações redox podem trazer vários desafios na produção, armazenamento e uso de certos medicamentos. O encapsulamento destes fármacos nos CBs protege-os do meio externo, melhorando a sua estabilidade. (19) Como exemplo, a encapsulação de pilocarpina em CB[7] aumenta o tempo de armazenamento desta, através da proteção do grupo lactona, inibindo a hidrólise do fármaco. (14,19) Adicionalmente, constatou-se que a

encapsulação de glibenclamida, memantina, atenolol e paracetamol em CB é benéfica, por inibir as alterações na morfologia cristalina destes fármacos durante o armazenamento. (19)

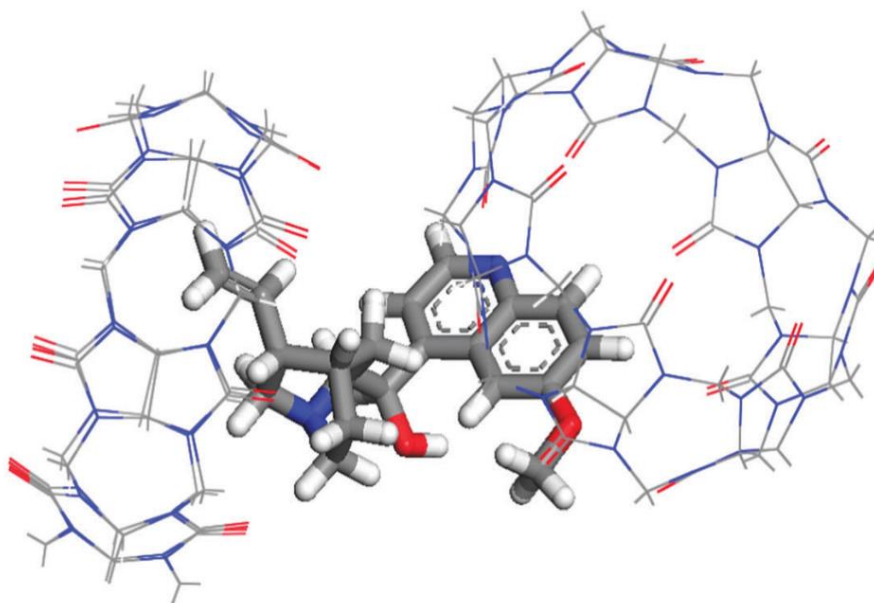
Por outro lado, no caso de fármacos anticancerígenos à base de platina, que contêm agentes lábeis removidos quando estes entram na corrente sanguínea e/ou na célula, tornando o fármaco tóxico, os CBs são utilizados como agentes que fornecem estabilidade química. (19,29) Além disso, os nucleófilos disponíveis, associados, por exemplo, a proteínas e peptídeos contendo grupos tiol (como a glutatona), podem promover reações de substituição, deslocando os grupos lábeis dos fármacos à base de platina, o que pode torná-los inativos. Como tal, o encapsulamento total ou parcial da substância ativa dentro da cavidade de um cucurbiturilo fornece proteção estérea ao fármaco contra ataques nucleofílicos. Estudos demonstraram que a encapsulação inibe até 9 vezes a reação dos fármacos com guanosina e cisteína, sem afetar significativamente a citotoxicidade. Foi também demonstrado que a encapsulação da cisplatina em CB[7] diminui a gravidade dos efeitos adversos e aumenta a biodisponibilidade aquando da administração por via oral, permitindo que a cisplatina exerça o seu efeito farmacológico através da administração por via oral, uma via de administração que antes era tida como interdita, dada a natureza química da substância. (19)

Além de impedirem a metabolização indesejada dos fármacos, os cucurbiturilos também exibem capacidade para capturar e desativar toxinas. Foi demonstrado em 2015, por Bardelang e Wang, que tanto o precursor MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) como a neurotoxina MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridina) (Figura I-7), indutora da doença de Parkinson, podem ser encapsulados em CB[7], reduzindo a neurodegeneração causada pela conversão do MPTP em MPP<sup>+</sup> operada pela monoamina oxidase B (MAO-B). O mecanismo de ação do CB[7] é possivelmente triplo: 1) a encapsulação de MPTP em CB[7] pode impedir ou retardar a passagem do MPTP através da barreira hematoencefálica; 2) caso o complexo cruze esta barreira, o CB[7] consegue protegê-lo da oxidação pela MAO-B; 3) mesmo que ocorra a formação do MPP<sup>+</sup>, o CB[7] pode servir como recetor sintético da neurotoxina, limitando o seu transporte para a mitocôndria, onde a mesma desencadeia a formação de espécies reativas de oxigénio, indutoras da apoptose da célula. (32)



**Figura I-7** – Estrutura química do MPTP e do seu metabólito tóxico MPP<sup>+</sup>.

Foi recentemente reportado um estudo sobre a encapsulação em CB[7] de quinina (Qn) (Figura I-10), um fármaco antimalárico com fraca solubilidade em água. Os estudos revelaram que a quinina forma complexos de inclusão de 1:1, na sua forma neutra (Qn), e de 1:2 (uma molécula de quinina é encapsulada em 2 CB[7]), na sua forma monoprotionada (QnH<sup>+</sup>) e diprotionada (QnH<sub>2</sub><sup>2+</sup>), tal como é representado na Figura I-8, observando-se uma alteração na fluorescência e nos valores de pKa. (33,34) Estes estudos pioneiros constituem um ponto de partida para a realização de novas pesquisas, sendo importante avaliar a biodisponibilidade da quinina aquando da encapsulação em cucurbiturilos.



**Figura I-8** – Representação do modo de ligação do CB[7] à quinina diprotonada (QnH<sub>2</sub><sup>2+</sup>), com os átomos de azoto protonados representados a azul.

## 2. MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitas do género *Plasmodium*, transmitidos ao ser humano através da picada de mosquitos fêmea do género *Anopheles*, afetando principalmente áreas tropicais e sub-tropicais. Existem 5 espécies de parasitas que podem infetar o ser humano: *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium ovale*; *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. (35) De entre estas, o *P. vivax* e *P. falciparum* são responsáveis pela quase totalidade dos casos de malária no mundo, sendo que o *P. falciparum* conduz a morbilidade mais grave e à grande maioria dos casos de mortalidade, sendo o mais prevalente no continente africano, enquanto o *P. vivax* é mais prevalente em países fora da África Subariana, nomeadamente na América Latina e Ásia. (36,37)

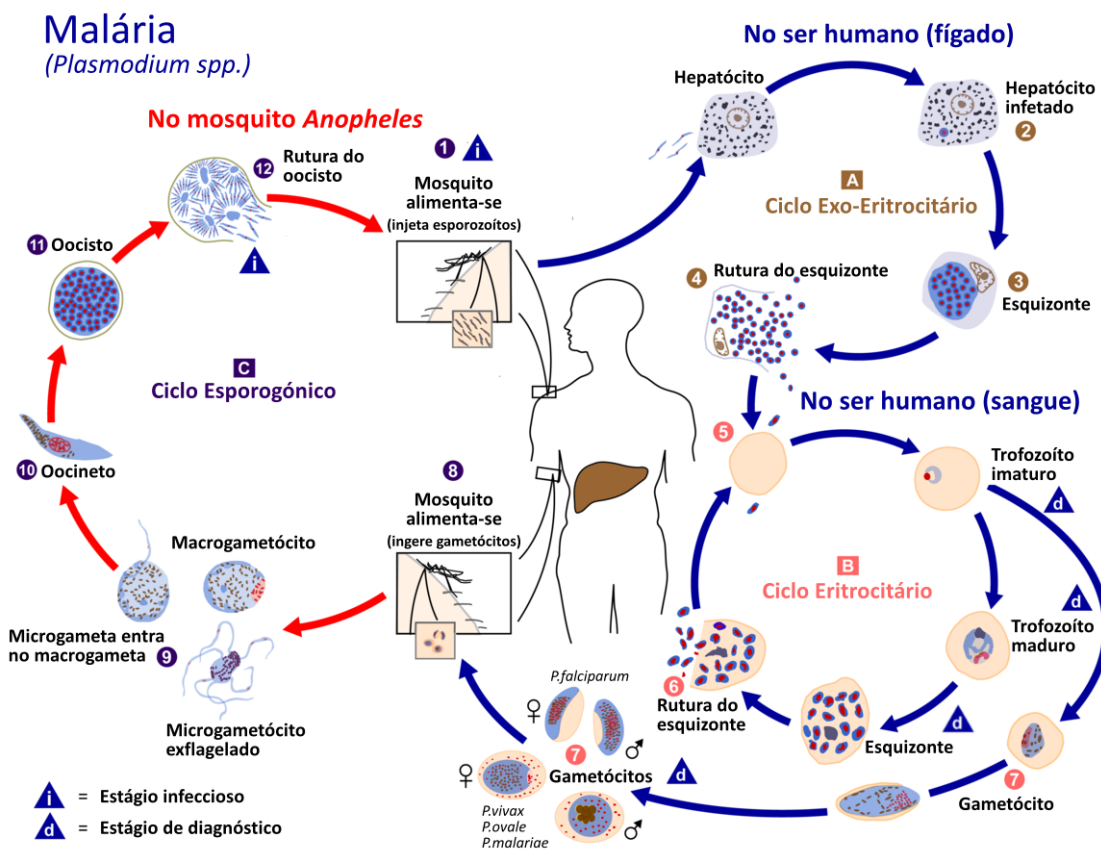
Os primeiros sintomas de malária surgem geralmente entre 10 a 15 dias após a picada e incluem febre, arrepios, suores, dores de cabeça, dores no corpo, náuseas, vómitos e mal-estar geral. Por estes sintomas se assemelharem a uma constipação ou gripe comum, o diagnóstico de malária pode ser complicado, principalmente em países onde os casos de malária não são frequentes. Nestes casos, o tratamento tardio da malária provocada por *P. falciparum* pode progredir para doença grave e morte, num período de ca. 24 horas. Em contrapartida, nos países onde a malária é endémica os residentes acabam por associar estes sintomas com malária, recorrendo ao tratamento específico sem procurar confirmação diagnóstica por parte de um profissional de saúde. (36,38)

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que em 2020 o número total de casos de malária rondava 241 milhões, enquanto o número de mortes nesse mesmo ano foi de ca. 627.000, representando um aumento de ca. 69.000 mortes em relação ao ano anterior (2019). É de referir que uma fatia deste aumento foi atribuída a perturbações nos serviços nacionais de saúde durante a pandemia de COVID-19. (36,39) Alguns grupos populacionais, tais como bebés, crianças menores de 5 anos, mulheres grávidas, indivíduos portadores de SIDA e outros imunocomprometidos, que se deslocam para áreas em que a malária é endémica, comportam maior risco de contrair o parasita e desenvolver doença grave. (36)



## 2.1. Fisiopatologia da malária

A fisiopatologia da malária implica a infecção cíclica de humanos e mosquitos fêmea do género *Anopheles*, tal como ilustrado na Figura I-9. O ciclo de vida deste parasita pode ser dividido em 3 ciclos distintos, um deles ocorrendo no hospedeiro invertebrado (mosquito), o ciclo esporogónico (C), e os restantes 2 no hospedeiro humano: o ciclo eritrocitário (B), que se desenvolve no interior dos eritrócitos; e o ciclo exo-eritrocitário (A), que ocorre no fígado. (40)



**Figura I-9** – Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Plasmodium*, no vetor (mosquito) e no hospedeiro (ser humano). Adaptado de (40).

A infecção do hospedeiro humano ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles* infectada transmite os esporozoítos durante uma refeição sanguínea (1). Ao entrarem na corrente sanguínea, estes esporozoítos alcançam o fígado do hospedeiro e infetam os hepatócitos (2), onde sofrem multiplicação assexuada (esquizogonia exo-eritrocitária) e se diferenciam em esquizontes (3). Esta fase é assintomática. A rotura destes esquizontes liberta entre 10.000 e 30.000 merozoítos (5) na corrente sanguínea, que invadem os eritrócitos (6), iniciando-se o ciclo eritrocitário, sintomático. É importante notar que o *P. vivax* e o *P. ovale* possuem um estágio

dormente, denominado de hipnozoíto, que pode permanecer no fígado por semanas ou até anos sem ser detetado, antes do desenvolvimento de sintomas causados por recaídas da malária. (40,41)

Dentro dos eritrócitos, os merozoítos sofrem esquizogonia eritrocitária, formando os trofozoítos em estágio de anel, que amadurecem em esquizontes. Estes esquizontes rompem-se **(6)**, libertando mais merozoítos na corrente sanguínea que infetam novos glóbulos vermelhos, mantendo-se assim o ciclo eritrocitário. É neste ciclo que ocorre a lise dos eritrócitos, com libertação de moléculas bioativas do parasita na circulação, surgindo a patogénese e sintomatologia características da doença. Concomitantemente com este ciclo eritrocitário, uma pequena porção dos trofozoítos imaturos diferencia-se por reprodução sexuada em estágios eritrocitários sexuais (gametócitos) masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos) **(7)**. (40,41)

Quando o mosquito realiza uma refeição de sangue de um hospedeiro infetado, ingere os gametócitos presentes na corrente sanguínea **(8)**. No intestino médio do mosquito, os macrogametócitos maduros diferenciam-se em macrogametas e os microgametócitos exflagelam, formando oito microgametas móveis haploides. Estes microgametas movem-se rapidamente e penetram nos macrogametas, formando um zigoto **(9)**. Em algumas horas os zigotos tornam-se móveis e alongados, formando os oocinetos **(10)**. Estes invadem as células epiteliais do intestino médio do mosquito, onde se transformam em oocistos **(11)** que se multiplicam por reprodução assexuada, desencadeando a rotura destes e a libertação dos esporozoítos na hemocele **(12)**. Os esporozoítos móveis invadem o epitélio da glândula salivar, permitindo que numa próxima picada de um hospedeiro saudável, o mosquito injete a saliva anticoagulante com os esporozoítos, iniciando assim um novo ciclo. (40,41)

## **2.2. Controlo da doença**

O controlo da malária assenta em diversas medidas que visam a prevenção da infeção em áreas com alta transmissão da doença, baseando-se sobretudo no controlo eficaz de vetores e no uso de quimioterapias preventivas. O controlo dos vetores transmissores da malária baseia-se no uso de redes mosquiteiras impregnadas com inseticida e na pulverização residual interna, mediante a aplicação de um inseticida em potenciais superfícies de repouso de mosquitos do género *Anopheles*. (42)

Por seu lado, as quimioterapias preventivas envolvem o uso de fármacos antimaláricos com o objetivo de, após a infeção do hospedeiro humano, prevenir a evolução da doença. As quimioterapias preventivas são muitas vezes empregues em doses subterapêuticas, em pessoas não imunes que viajam para áreas endémicas da malária. (42)

Outra medida que também pode ser aplicada em áreas endémicas corresponde à gestão da fonte larval, através da manipulação de corpos de água, evitando o desenvolvimento das larvas dos mosquitos e, conseqüentemente, de mosquitos adultos. Repelentes tópicos, roupas tratadas com inseticidas e repelentes espaciais também fazem parte das medidas que permitem controlar o desenvolvimento de malária. Pode-se ainda recorrer a algumas modificações na habitação que impeçam a entrada de mosquitos, diminuindo a exposição ao vetor. (42)

Recentemente foi aprovada pela OMS a primeira vacina contra a malária, a vacina RTS,S/AS01, de nome comercial Mosquirix. Esta vacina é atualmente administrada a crianças entre as 6 semanas e os 17 meses, em áreas endémicas de malária causada por *P. falciparum*, para conferir alguma proteção contra a infeção causada por esta espécie do parasita. (43)

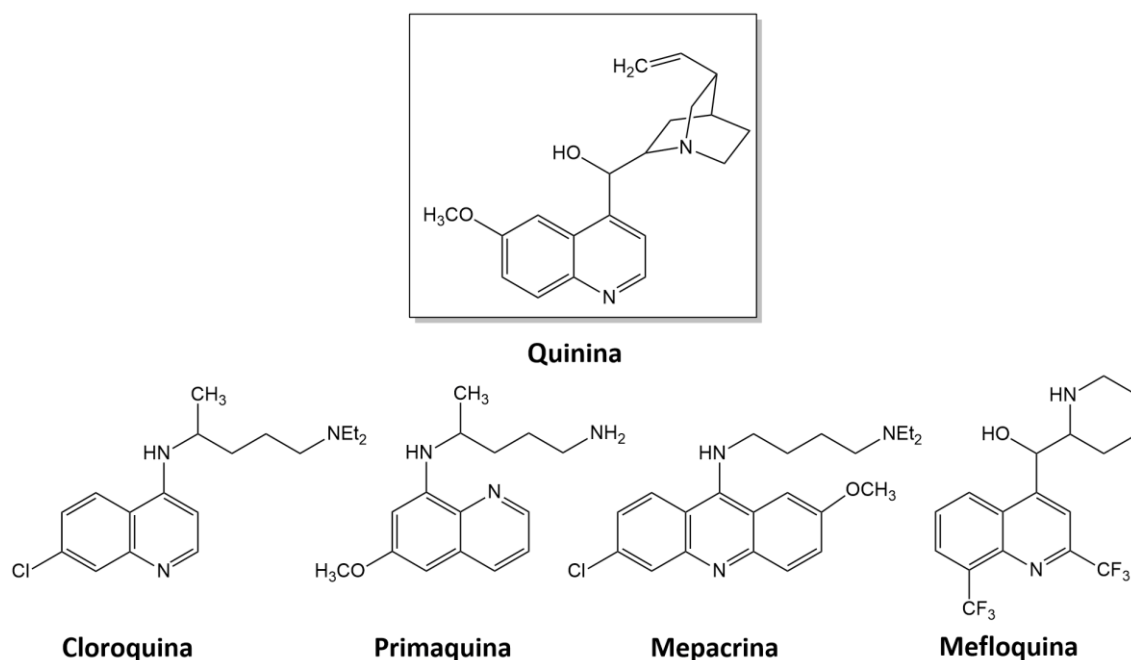
### **2.3. Terapêuticas atuais**

As terapêuticas atuais para a malária agregam um arsenal terapêutico com diversos grupos de fármacos cujo objetivo principal é garantir a eliminação rápida e eficaz do parasita da corrente sanguínea, uma vez que é na fase eritrocitária que surge a sintomatologia da doença. (44,45) O tratamento da fase de infeção aguda é necessário para infeções causadas por todas as espécies de parasita da malária. No caso de infeções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* é também necessária uma profilaxia terminal, com um fármaco ativo contra hipnozoítos, com o intuito de evitar uma recidiva da infeção. (44)

O tratamento da malária é considerado eficaz quando reduz a transmissão da infeção e previne o surgimento de resistência aos fármacos antimaláricos. A OMS mantém uma lista de medicamentos usados como tratamento de primeira linha em países onde a malária é considerada endémica. (45) Estes medicamentos serão apresentados em seguida.

### 2.3.1. Antimaláricos de base quinolínica

Os antimaláricos de base quinolínica são frequentemente usados na profilaxia e tratamento da malária. (46) A primeira molécula desta classe de fármacos foi a quinina (Figura I-10), um alcaloide natural isolado da casca das árvores do género *Chinchona*. (47) A partir desta foi possível desenvolver novas estruturas de quinolinas sintéticas, estruturalmente mais simples, tais como a cloroquina, a primaquina, a mepacrina e a mefloquina (Figura I-10). (48) Estes fármacos atuam como agentes esquizonticidas sanguíneos, concentrando-se nos vacúolos alimentares do parasita, onde inibem a conversão do heme livre, tóxico para o parasita, em hemozoína, envenenando assim o parasita. (49,50) A primaquina, porém, atua nos estágios hepáticos do parasita, sendo ativa contra os hipnozoítos de *P. vivax* e *P. ovale*. É assim usada em conjunto com outros fármacos, de forma a evitar o evitar ressurgimento da doença em caso de infeções por estas espécies de parasitas. (49)



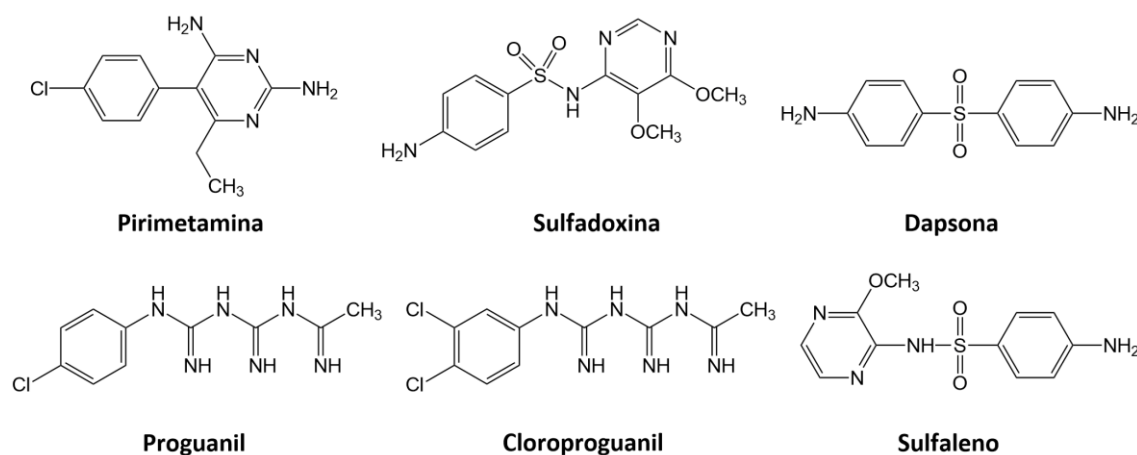
**Figura I-10** – Representação da estrutura química da quinina e de outros fármacos antimaláricos de base quinolínica.

Esta classe de fármacos tem sido a base de tratamento da malária por várias décadas, nomeadamente devido às suas vantagens, incluindo disponibilidade, toxicidade controlada para o hospedeiro, facilidade de utilização, custo controlado e uma síntese eficaz de alguns dos fármacos. (51) Porém, o desenvolvimento de

resistências, principalmente por estirpes de *P. falciparum*, estimulou a procura de novos antimaláricos. (48) Não obstante, a cloroquina continua a ser usada em primeira linha para o tratamento da malária não complicada, essencialmente quando não é causada por *P. falciparum*. (49)

### 2.3.2. Antagonistas dos folatos

Os antagonistas dos folatos são geralmente usados em regimes de combinação para o tratamento e prevenção da malária, atuando sinergicamente na inibição de enzimas envolvidas na síntese de folatos, essenciais para a síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasita. (44,49) Esta classe inclui dois grupos de antifolatos: os que inibem a enzima dihidrofolato redutase, pertencentes à família das diaminopiridinas e biguanidinas, tais como a pirimetamina, o proguanil e o cloroproguanil; os que inibem a dihidropteroato sintetase, dos quais são exemplo algumas sulfonamidas e sulfonas, como a sulfadoxina, o sulfaleno e a dapsona. (Figura I-11). (52) Os antagonistas dos folatos exibem atividade contra as formas eritrocitárias do parasita, sendo que o proguanil também possui atividade contra as formas hepáticas. (49)

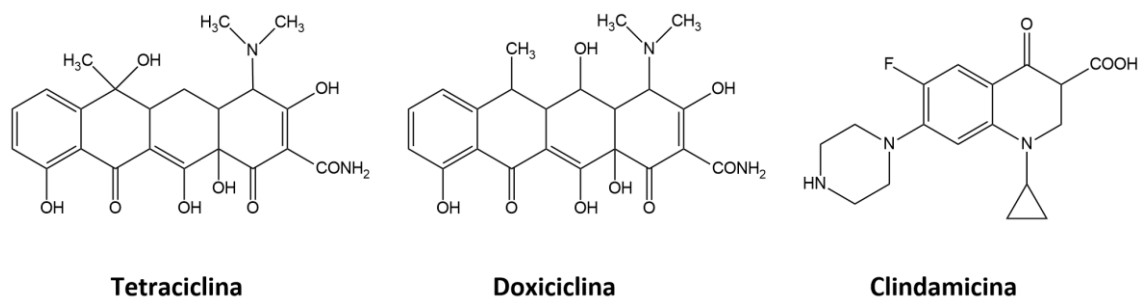


**Figura I-11** – Representação da estrutura química de alguns fármacos antagonistas dos folatos usados contra a malária.

### 2.3.3. Antibióticos

Alguns antibióticos, como a tetraciclina, a doxiciclina e a clindamicina (Figura I-12), possuem atividade antimalárica ao inibirem a síntese de proteínas no apicoplasto, um organelo semelhante a alguns ancestrais procarióticos. (44) Os antibióticos não são

usados em monoterapia, uma vez que possuem uma ação antimalárica relativamente lenta. (49) São por isso combinados com outros antimaláricos de ação rápida, como, por exemplo, a quinina. (44)



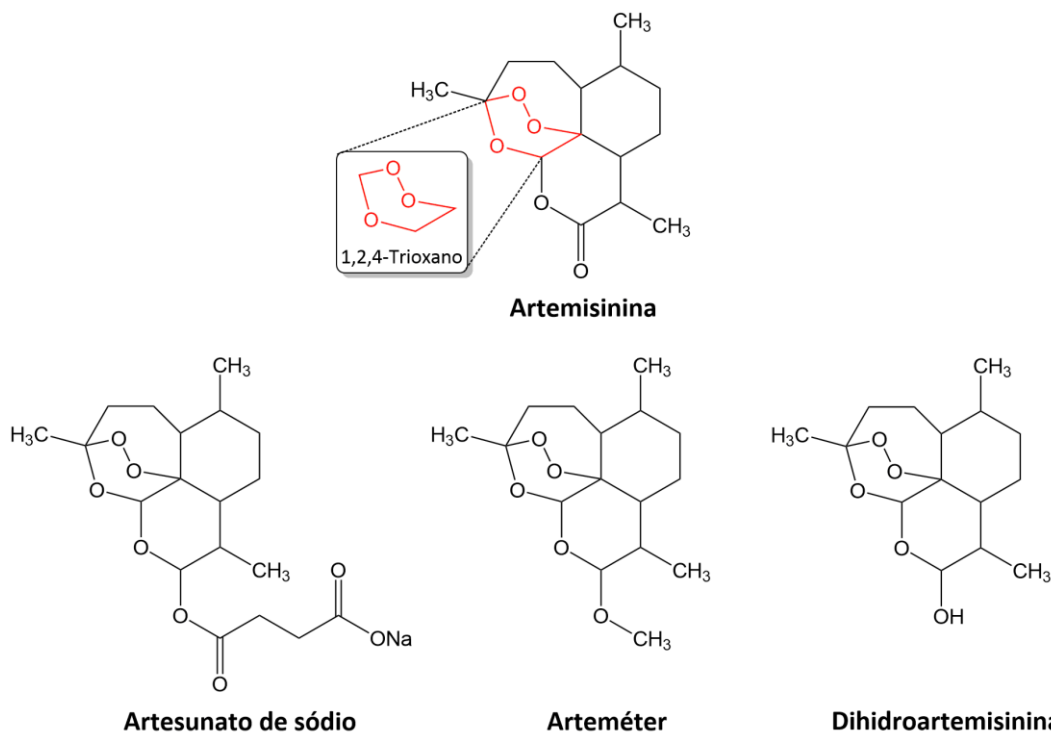
**Figura I-12** – Representação da estrutura química de alguns antibióticos usados na terapêutica da malária.

#### 2.3.4. Artemisinina e os seus análogos

A artemisinina (Figura I-13), um produto natural extraído da planta *Artemisia annua*, é uma lactona sesquiterpénica que atua de modo rápido e eficaz como esquizotocida sanguíneo no tratamento da fase aguda da malária, incluindo malária resistente à cloroquina. (50) Visando aumentar a solubilidade e aprimorar a eficácia antimalárica, foram preparados derivados semissintéticos deste fármaco, sendo os mais importantes o artesunato, o arteméter e a dihidroartemisinina (Figura I-13). (49) Estes medicamentos possuem uma ligação peróxido, incorporada numa estrutura de trioxano (Figura I-13), essencial para a sua atividade antimalárica. A ligação peróxido é o farmacóforo presente em todos os endoperóxidos relacionados com a artemisinina, geralmente referenciados por artemisininas (ARTs). (53) Estudos sobre os mecanismos de bioativação e ação desta classe de fármacos revelaram que a atividade antimalárica das ARTs advém da clivagem da ligação peróxido catalisada pelo catião ferro do grupo heme, presente no vacúolo do parasita. O processo químico resulta na formação de radicais livres centrados em carbono que alquilam macromoléculas de *Plasmodium spp* e heme livre. (54)

O artesunato, administrado por via intravenosa, é usado como terapêutica de primeira linha para o tratamento da malária grave. A administração por via retal é adequada para estabilizar pacientes gravemente doentes em áreas remotas de países endêmicos, antes do transporte para as unidades de saúde. Em virtude da curta semi-

vida desta classe de fármacos, a terapêutica intravenosa com artesunato deve ser combinada com a administração oral de um antiplasmodial de ação mais longa. Estes regimes terapêuticos, designados por ACT (*Artemisinin-based Combination Therapy*), são apoiados pela OMS, e a sua aplicação resultou na diminuição acentuada do número de mortes por malária, testemunhada nas últimas 2 décadas. (44)

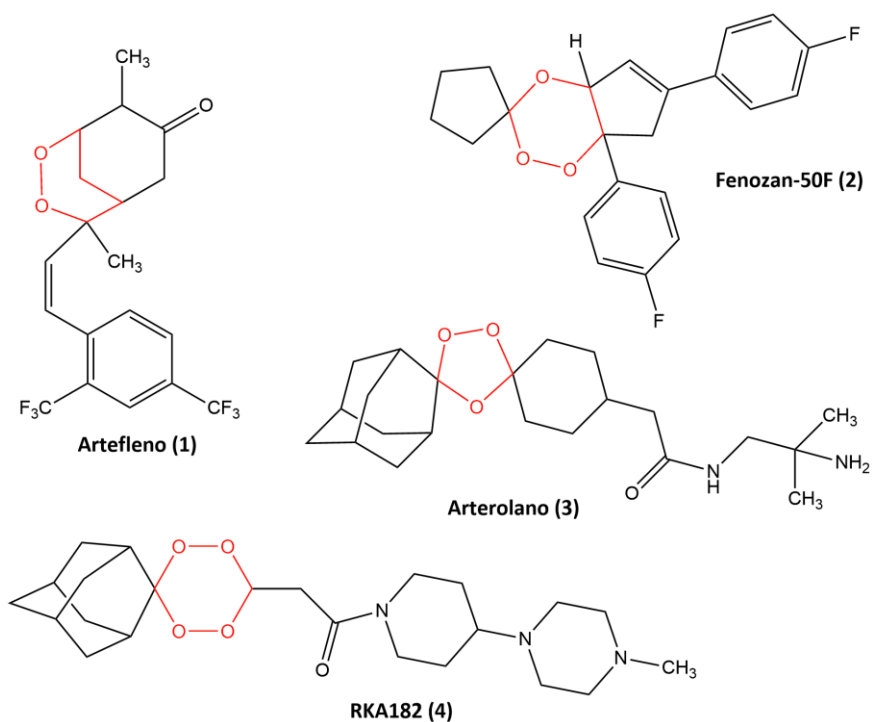


**Figura I-13** – Representação da estrutura química da artemisinina, com o farmacóforo representado a vermelho, e de alguns dos seus derivados semissintéticos.

### 2.3.5. Endoperóxidos sintéticos

Desde a sua descoberta, a artemisinina e os seus derivados foram amplamente utilizados no tratamento da malária. Porém, em 2008 foi pela primeira vez reportado o surgimento de espécies de parasitas resistentes a esta classe de fármacos na província da Pailin, no oeste de Camboja (55), espalhando-se posteriormente as estirpes de *P. falciparum* resistentes ao longo de toda a sub-região do Grande Mekong, que atingiram o Vietname, Laos, Tailândia e Myanmar. (56) Daí em diante foram detetadas e descritas evidências de falência terapêutica dos derivados de artemisinina na China, na fronteira com Myanmar (57), na Índia oriental (58) e, mais recentemente, em África. (59) Além disso, o facto de a artemisinina ser extraída de uma planta, a sua obtenção por extração e a produção dos seus derivados semissintéticos envolvem um processo longo e bastante caro. (60) Estas circunstâncias impulsionaram o

desenvolvimento de novos antimaláricos do tipo endoperóxido, mas de origem sintética, que se revelaram igualmente eficazes contra os parasitas da malária, especialmente contra estirpes resistentes aos análogos da artemisinina, sendo também mais seguros e baratos. (61,62) Desde então foram descritas várias classes de endoperóxidos sintéticos, com diferentes farmacóforos, nomeadamente 1,2-dioxanos **(1)**, 1,2,4-trioxanos **(2)**, 1,2,4-trioxolanos **(3)** e 1,2,4,5-tetraoxanos **(4)**. A figura I-14 apresenta moléculas desta classe com atividade antimalárica demonstrada e que compara muito favoravelmente com a dos fármacos derivados de artemisinina. De entre estas classes de endoperóxidos sintéticos, os 1,2,4-trioxolanos e os 1,2,4,5-tetraoxanos têm sido amplamente estudados, encontrando-se algumas moléculas destas classes em fases avançadas de desenvolvimento como antimaláricos. (62)

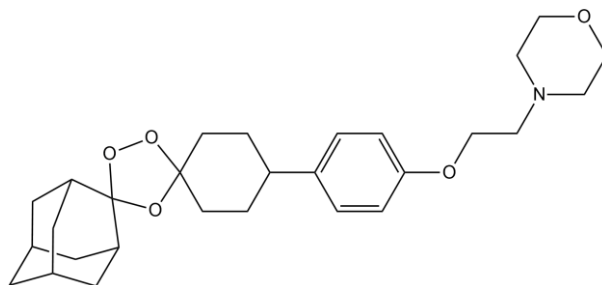


**Figura I-14** – Representação das estruturas químicas de alguns endoperóxidos sintéticos, com os respetivos farmacóforos assinalados a vermelho.

O trioxolano OZ277, posteriormente denominado de arterolano (Figura I-14), é um composto antimalárico sintético desenvolvido por Vennerstrom e colaboradores que avançou para testes clínicos. (63,64) A atividade antimalárica deste composto advém do anel 1,2,4-trioxolano e a eficácia é semelhante à combinação de arteméter com lumefantrina, comercializada com a designação de COARTEM e usada no

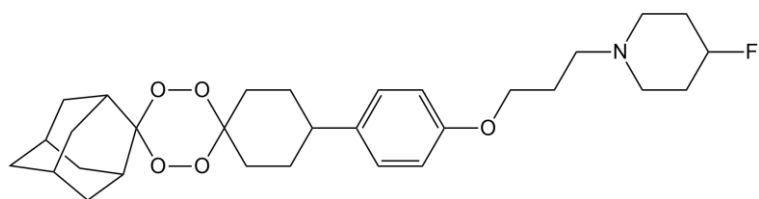


tratamento da malária. O OZ277, ou arterolano, revelou atividade contra todos os estágios eritrocitários de *P. falciparum*. (61,64) Porém, em ensaios clínicos de fase II, em monoterapia, mostrou baixa atividade, devido à diminuição da exposição sanguínea (tempo de semi-vida no plasma). (64) Para mitigar esta limitação foi desenvolvida uma combinação de arterolano com piperaquina, o que permitiu atingir níveis sanguíneos mais elevados, em grande parte devido ao facto de a piperaquina atuar como inibidor do CYP3A4, retardando o metabolismo do arterolano. (62) Esta combinação, com a dose fixa de 150 mg de maleato de arterolano e 750 mg de piperaquina e com a designação comercial de Synriam, foi aprovada para o tratamento da malária na Índia e em alguns países africanos. (65,66) Foi posteriormente desenvolvido o artefenomel (OZ439) (Figura I-15), um trioxolano com tempo de semi-vida superior ao do arterolano que se encontra atualmente em estudos de fase III. (65)



**Figura I-15** – Representação da estrutura química do artefenomel.

Enquanto o grupo de Vennerstrom se focou no desenvolvimento de endoperóxidos baseados no farmacóforo 1,2,4-trioxolano, o grupo de O'Neill dedicou-se à produção de endoperóxidos sintéticos contendo o farmacóforo 1,2,4,5-tetraoxano. (62) Foi desenvolvida uma biblioteca com mais de 150 tetraoxanos, da qual foi selecionado o RKA182 (Figura I-14), um composto contendo uma cadeia lateral polar e metabolicamente estável, conferindo-lhe boa solubilidade em água e biodisponibilidade, bem como um tempo de semi-vida relativamente longo. (65,67) Porém, o seu desenvolvimento pré-clínico foi interrompido devido ao facto de o seu perfil farmacocinético não permitir o uso terapêutico em dose única. (62,65) Mais recentemente, O'Neill e colaboradores, desenvolveram o E209 (Figura I-16), um novo candidato antimalárico contendo o 1,2,4,5-tetraoxano como farmacóforo que apresenta propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas compatíveis com o seu uso terapêutico em dose única. (68)

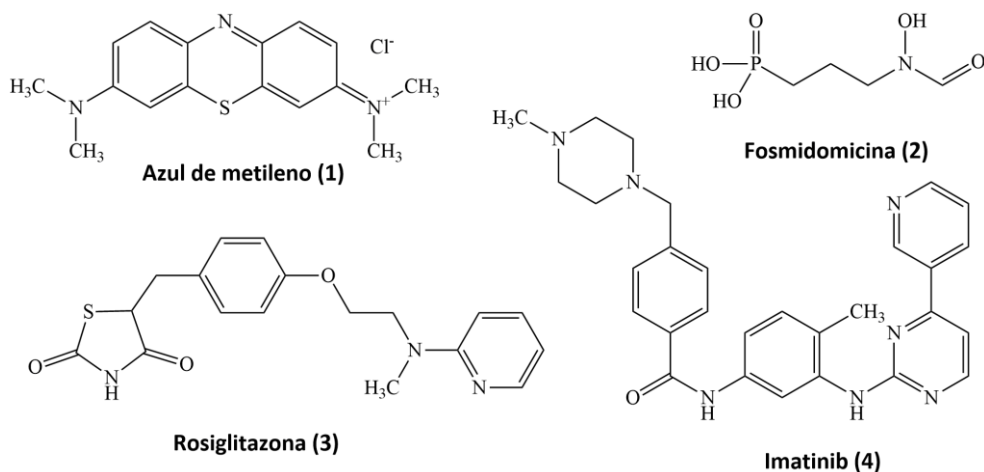


**Figura I-16** – Representação da estrutura química do composto E209.

#### **2.4. Perspetivas futuras no tratamento da malária**

Desde a sua génese e lançamento, em 1999, a Fundação *Medicines for Malaria Venture* tem estado na vanguarda da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos. Com este objetivo, foram estabelecidos alguns requisitos para avaliação do potencial para desenvolvimento de compostos, selecionados com o objetivo de serem usados como novos antimaláricos. Os requisitos foram explicitados através de um conjunto de questões, nomeadamente: (I) o composto apresenta um mecanismo de ação diferente, não demonstrando resistência cruzada com os medicamentos existentes?; (II) o composto tem potencial para uso terapêutico em dose única?; (III) o composto é ativo contra todos os estágios eritrocitários, que causam os sintomas da doença e também apresenta atividade gametocida, eliminando os gametócitos responsáveis pela transmissão?; (IV) o composto apresenta ação quimioprotetora, prevenindo a infeção?; (V) o composto elimina os hipnozoítos de *P. vivax* presentes no fígado, prevenindo a reinfeção?. (69)

A descoberta de novos medicamentos com atividade antimalárica pode seguir os métodos tradicionais, através da descoberta de novos compostos. (69) Nesse sentido, os compostos com farmacóforos 1,2,4-trioxolanos e 1,2,4,5-tetraoxanos são considerados promissores para a formulação de um novo fármaco que preencha os requisitos mencionados anteriormente. (65) Além deste método, mais tradicional, existem outras abordagens que podem permitir a descoberta de novas soluções para o tratamento da malária, nomeadamente a exploração de novas combinações de fármacos antimaláricos atualmente em uso. Em alternativa, pode ser estudado o uso de medicamentos que, atualmente, sejam utilizados com outros fins terapêuticos, sendo este método vantajoso, uma vez que os compostos provavelmente já demonstraram boas propriedades biológicas e perfil toxicológico adequado para a sua utilização. Alguns exemplos de fármacos que estão a ser estudados com vista à sua aplicação no tratamento de malária são apresentados na Figura I-17. (69)



**Figura I-17** – Representação das estruturas químicas de alguns medicamentos, atualmente utilizados com outros fins terapêuticos, que também demonstraram atividade antimalárica.

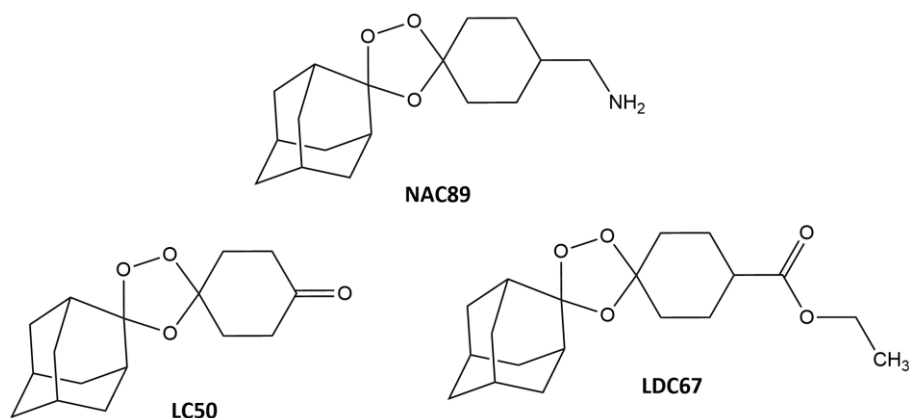
O azul de metileno **(1)** é um corante solúvel em água, atualmente utilizado para o tratamento de meta-hemoglobinemia adquirida e hereditária. Este composto foi efetivamente o primeiro antimalárico sintético, utilizado amplamente em finais do século XIX e inícios do século XX. (70) Os últimos ensaios clínicos com o azul de metileno são de fase II e remontam a 2017, altura em que foi testado em combinação tripla com artesunato e amodiaquina. Os resultados demonstraram alguns benefícios do uso deste fármaco ao invés da primaquina, nomeadamente uma menor prevalência de gametócitos de *P. falciparum*. (69–71) A fosmidomicina **(2)** é um antibiótico cuja atividade antimalárica tem sido avaliada em diversos estudos, em monoterapia ou em combinação com clindamicina ou artesunato. No último ensaio clínico, datado de 2014, foi usada em combinação com a piperquina, demonstrando esta combinação uma elevada eficácia, com rápida eliminação da massa parasitária. (72,73) A rosiglitazona **(3)** é um fármaco da classe dos antidiabéticos, recentemente avaliada como antimalárico, em monoterapia, num estudo que decorreu entre 2016 e 2021 e cujos resultados ainda não foram publicados. (69,74) Por fim, o imatinib **(4)**, um inibidor de cinases tirosínicas utilizado no tratamento de alguns tipos de leucemia, completou em 2019 um ensaio clínico de fase II numa combinação tripla com dihidroartemisinina e piperquina. (69,75) Esta combinação apresentou várias vantagens, entre as quais um declínio significativamente acelerado na densidade parasitária, com a maioria dos doentes apresentando uma parasitemia nula após 3 dias de tratamento. (76)

## II. OBJETIVO DO TRABALHO

---

Com o recente aumento no número de casos de malária (39) e com o surgimento de parasitas multirresistentes aos fármacos atualmente empregues no tratamento da doença (47,55–58), é cada vez mais premente o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas que garantam atividade antimalárica melhorada. Uma abordagem alternativa para o desenvolvimento destas novas formulações pode envolver a inclusão dos fármacos antimaláricos com recipientes moleculares, como, por exemplo, em cucurbiturilos. (34) Uma análise da literatura revela que apenas foi demonstrada a encapsulação da quinina na cavidade do CB[7] (33,34), não existindo nenhum estudo de encapsulação de outros fármacos com atividade antimalárica na cavidade destes contentores moleculares. Esta pode ser uma área de estudo promissora no contexto da quimioterapia antimalárica, explorando ou ampliando as formas de administração de endoperóxidos sintéticos.

A presente dissertação aborda o potencial dos cucurbiturilos para o encapsulamento de endoperóxidos com atividade antimalárica. Nesse sentido, foi sintetizado um endoperóxido com farmacóforo 1,2,4-trioxolano, denominado na literatura como NAC89 (Figura II-1). (77) Este composto foi inicialmente sintetizado por Vennerstrom e colaboradores, em 2004, em conjunto com o arterolano, demonstrando excelente atividade antimalárica e boa biodisponibilidade oral em ratos. (63) Posteriormente, em 2016, foi avaliado contra as formas do estágio eritrocitário em *P. falciparum* resistente à cloroquina e mefloquina, em conjunto com os compostos LC50 e LDC67 (Figura II-1), tendo-se observado, no estudo *in vitro*, excelente atividade antimalárica dos três compostos (na escala nanomolar), muito semelhante à demonstrada pela artemisina e dihidroartemisinina. Em testes de citotoxicidade contra as células hepáticas HepG2-A16 de mamíferos, os compostos apresentaram citotoxicidades muito baixas. Porém, aquando da testagem da atividade antimalárica *in vivo*, em murganhos, o NAC89 evidenciou uma reação cutânea no sítio de administração que não foi visível com nenhum dos outros compostos estudados. (77).



**Figura II-1** – Representação das estruturas químicas dos trioxolanos NAC89, LC50 e LDC67, cuja atividade antimalárica foi avaliada.

Após a síntese do trioxolano NAC89, no presente trabalho denominado de AS4, foi avaliada a sua encapsulação no contentor molecular CB[7], com o intuito de melhorar a respetiva farmacocinética. Para comprovar a encapsulação recorreu-se à avaliação dos espetros obtidos em análises por ressonância magnética nuclear (RMN) e por cromatografia em fase líquida acoplada a espetrometria de massa (*liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS). Foram realizados estudos adicionais, recorrendo à análise de espetros de refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (*attenuated total reflectance - fourier transform infrared*, ATR-FTIR), a análise por difração de raios X, método de pós, (*powder x-ray diffraction*, PXRD) e por espetroscopia de Raman. Estudos *in vitro* foram realizados em linhas celulares 3D7-GFP de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina e mefloquina, obtendo-se os valores da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>).

### III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

---

## 1. REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes e solventes empregues neste trabalho possuíam um grau de pureza elevado, adequado para aplicações de síntese, tendo sido utilizados sem qualquer purificação adicional. De modo geral, os reagentes e solventes foram utilizados tal como comercialmente fornecidos. Não obstante, um dos solventes usados, tetrahidrofurano (THF), foi submetido a secagem com pequenas limalhas de sódio, com benzofenona como indicador, seguindo os procedimentos descritos na literatura. (78)

O CB[7], utilizado na encapsulação do trioxolano sintetizado, foi facultado pelo professor André Lopes, tendo este sido obtido por síntese química, através da reação de condensação de glicolurilo com formaldeído, em meio ácido. (79)

## 2. MATERIAIS

Para a realização da cromatografia em camada fina (*thin layer chromatography*, TLC) recorreu-se a placas de TLC de sílica gel sobre alumínio, contendo o indicador fluorescente F254, com um tamanho de 20×20 cm, que foram cortadas em tamanhos menores, adequados para a execução da cromatografia.

Por seu lado, a cromatografia em coluna foi realizada usando sílica gel 60, com partículas de tamanho compreendido entre 0,04 e 0,063 mm.

## 3. MÉTODOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

A caracterização do CB[7] e do composto AS4, bem como dos compostos intermédios AS1, AS2 e AS3, foi efetuada com recurso a espectroscopia de RMN de protão e de carbono-13 e por espectroscopia de massa para o composto final AS4. O estudo do encapsulamento do trioxolano em CB[7] foi realizado com recurso a diversos métodos, nomeadamente espectroscopia de RMN, LC-MS, espectroscopia de ATR-FTIR, PXRD e espectroscopia de Raman.

Os espetros de RMN e LC-MS foram registados recorrendo aos serviços analíticos do Centro de Ciências do Mar (CCMar). As análises por espectroscopia de ATR-FTIR, PXRD e espectroscopia de Raman foram realizadas recorrendo aos serviços analíticos do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro. Nestes casos, para a encapsulação do composto AS4 em CB[7] recorreu-se à síntese mecanoquímica, na



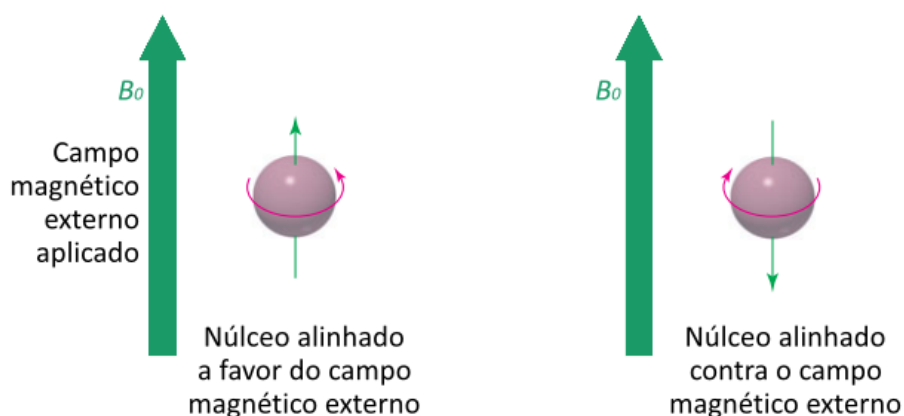
qual uma mistura de pós das substâncias foi moída manualmente num almofariz de granito, durante 90 minutos. Foram recolhidas frações desta mistura após 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos de moagem, para uma análise adicional por ATR-FTIR.

Adicionalmente, foram realizados estudos *in vitro* no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, em linhas celulares 3D7-GFP de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina e à mefloquina. Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados através do *software GraphPad Prism 5*, usando a cloroquina e a dihidroartemisinina como fármacos antimaláricos de controlo.

### 3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

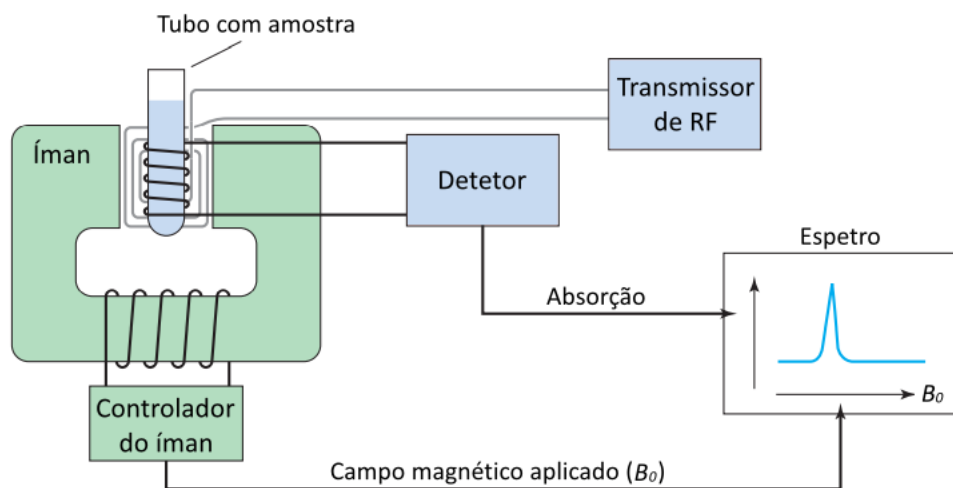
A espectroscopia de RMN é uma das ferramentas mais robustas disponíveis para a determinação da estrutura molecular de compostos orgânicos. A técnica é usada para o estudo de uma ampla variedade de núcleos, incluindo <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F e <sup>31</sup>P, sendo os espectros de RMN de protão (<sup>1</sup>H) e de carbono-13 (<sup>13</sup>C) os mais comumente empregues em química orgânica, pelo facto de os elementos H e C serem os mais abundantes na maioria dos compostos orgânicos. (80)

Esta técnica baseia-se no facto de um núcleo com um número atómico ou de massa ímpares apresentar um *spin* nuclear que é alterado quando a amostra é submetida a um campo magnético externo. O núcleo, ao ser irradiado com fótons de radiofrequência, gira, alinhando-se contra ou a favor do campo magnético externo (Figura III-1), sendo a diferença de energia entre estes dois estados detetada pelo espectrofotómetro de RMN, permitindo registar um gráfico de absorção em função do campo magnético aplicado. (80)



**Figura III-1** – Representação da alteração do spin nuclear de uma amostra quando esta é colocada sob a influência de um campo magnético externo ( $B_0$ ). Adaptado de (80).

De uma forma geral, o espectrofotômetro de RMN compreende quatro partes principais (Figura III-2): um magneto estável, com um controlador sensível que produz o campo magnético; um transmissor de radiofrequência (RF), que emite uma frequência precisa; um detetor, que mede a quantidade de RF absorvida pela amostra; e um conversor de sinal analógico para digital, que produz o espectro de absorção (no eixo do Y) em função do campo magnético aplicado (no eixo do X). (80)



**Figura III-2** – Diagrama representativo das componentes de um espectrofotômetro de RMN. Adaptado de (80).

No espectro obtido, os valores mais altos de campo magnético localizam-se à direita (campo superior) e os valores mais baixos à esquerda (campo inferior). Desta forma, as absorções de prótons mais blindados irão aparecer no campo superior do espectro enquanto as de prótons mais desprotegidos aparecem no campo inferior. Além disso, prótons que são quimicamente equivalentes irão exibir o mesmo desvio químico, sendo a área dos sinais diretamente proporcional ao número de hidrogênios que contribuem para o sinal. (80)

No trabalho realizado no âmbito desta dissertação, os espectros de RMN de próton ( $^1\text{H}$ -RMN) e de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) foram registados utilizando um sistema JEOL de 500 MHz equipado com uma sonda Royal HFX, em solução, usando solventes deuterados, tal como descrito em cada procedimento experimental. Os deslocamentos químicos destes espectros são descritos em partes por milhão (ppm) a partir do padrão interno utilizado, o tetrametilsilano no caso de solventes orgânicos ou a partir do sinal residual do próton ( $^1\text{H}$ ) para a água deuterada.

### **3.2. Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)**

A espectrometria de massa é uma técnica capaz de fornecer o peso molecular, através da massa do ião molecular, e outras informações relevantes, tais como o padrão de fragmentação, que, combinadas, fornecem dados que ajudam a elucidar a estrutura molecular do composto em análise. Nesta técnica, o composto é ionizado em vácuo, sendo os iões separados e obtida a razão massa/carga para cada um deles. O registo tem em conta a abundância de iões de cada massa, obtendo-se o espectro de massa, onde as massas são representadas no eixo do X e o número relativo de iões para cada massa no eixo do Y. (80)

De forma a ser possível a análise por espectrometria de massa de uma mistura complexa é acoplada uma técnica de separação ao espectrómetro de massa. Uma destas técnicas corresponde à cromatografia líquida, capaz de separar compostos de uma amostra baseando-se na interação destes com as fases móvel e estacionária. Após a separação cromatográfica, os compostos são eluídos na coluna, dessolvatados na fase gasosa e ionizados, sendo depois introduzidos no espectrómetro de massa. A cromatografia líquida é uma técnica de separação geralmente utilizada para a separação de moléculas de maior peso molecular e não voláteis. (81,82)

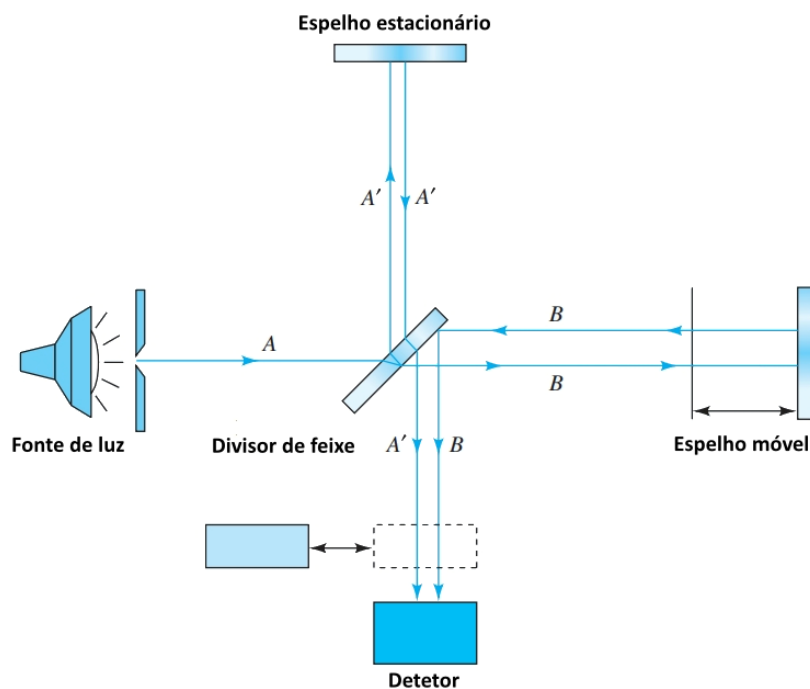
No trabalho realizado no âmbito desta dissertação, as análises por LC-MS foram conduzidas num sistema de espectrometria de massa híbrido (*Orbitrap Elite*) com elevado poder de resolução (até 240,000 FWHM e MS<sub>n</sub>, n até 10), acoplado a um *Thermo Scientific Ultimate 3000 UHPLC*.

### **3.3. Espectroscopia de refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)**

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica utilizada para a obtenção de um espectro de infravermelho, de absorção ou emissão, de uma substância no estado sólido, líquido ou gasoso. O termo advém do facto de ser necessário recorrer-se à transformada de Fourier, um processo matemático que permite converter os dados obtidos num espectro. (83)

Os espectrómetros de infravermelho com transformada de Fourier recorrem a um interferómetro de Michelson para o registo dos espectros. Este incorpora, tal como representado na Figura III-3, uma fonte de luz contínua, um espelho estacionário na

parte superior, um espelho móvel à direita, um divisor de feixe e um detetor. O principal componente deste aparelho é o divisor de feixe, permitindo que uma fração da luz que incide sobre ele passe através do mesmo e outra fração seja refletida. Assim, o feixe incidente divide-se em dois feixes que se movem pelo espaço ao longo de diferentes caminhos e recombina-se no detetor para formar um padrão de interferência. (84) Além disso, o movimento do espelho móvel origina diferentes comprimentos de onda que passam pela amostra, sendo medidos e convertidos, através do processo de transformada de Fourier, num espectro. (83)



**Figura III-3** – Diagrama do interferômetro de Michelson. Adaptado de (84).

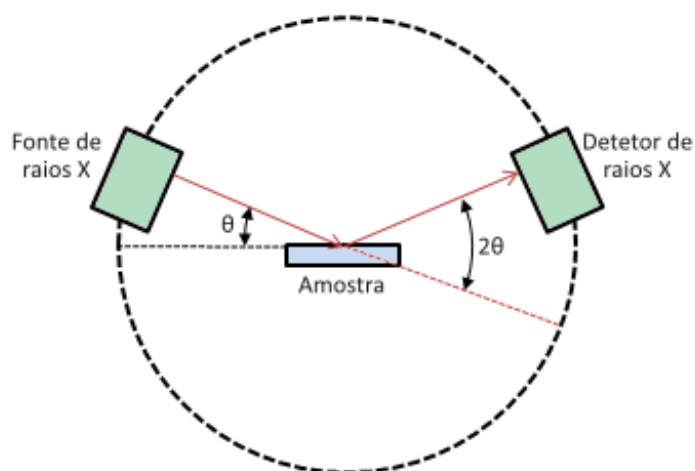
A metodologia de amostragem mais amplamente utilizada para a espectroscopia FTIR corresponde a refletância total atenuada (*attenuated total reflectance*, ATR). Na amostragem ATR, a luz infravermelha (IR) percorre um cristal com alto índice de refração, sendo refletida uma ou mais vezes na *interface* entre o cristal e a amostra até chegar ao detetor FTIR. Durante esta reflexão, uma parte da luz IR é absorvida pela amostra, resultando numa atenuação seletiva da radiação nos comprimentos de onda absorvidos pela amostra. (83,85)

No trabalho realizado no âmbito desta dissertação, a medição dos espectros de ATR-FTIR foi efetuada utilizando um acessório Specac Golden Gate Mk II ATR com uma placa superior de diamante e lentes de focagem KRS-5 (resolução 4  $\text{cm}^{-1}$ , 256 *scans*).

### 3.4. Difração de raios X, método de pós (PXRD)

A PXRD é uma técnica comumente utilizada para o estudo das características da estrutura cristalina e determinação da mineralogia de sedimentos de granulação mais fina. (86) A análise de uma amostra por PXRD fornece diversas informações importantes complementares a vários métodos microscópicos e espectroscópicos, tais como a identificação de fase, da pureza da amostra, do tamanho do cristalito e, em alguns casos, da morfologia. (87)

O difratômetro de raios X incorpora uma fonte de radiação monocromática, um porta amostra, um detetor de raios X e um sistema que permite variar o ângulo  $\theta$  (Figura III-4). Os raios X incidem na amostra num ângulo  $\theta$ , enquanto o detetor lê a intensidade dos raios X num ângulo de  $2\theta$ , sendo o ângulo de incidência aumentado ao longo do tempo. Quando os raios X incidem na amostra, são difratados num padrão característico da estrutura do pó, formando um gráfico de difração que registra a intensidade da radiação em função do ângulo do detetor,  $2\theta$ . (88)



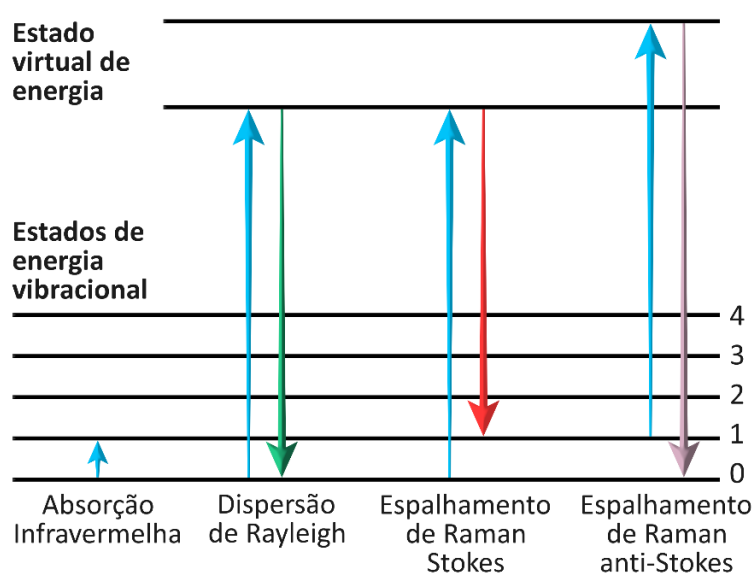
**Figura III-4** – Diagrama de um difratômetro de raios X. Adaptado de (88).

No trabalho realizado no âmbito desta dissertação, os dados de PXRD foram recolhidos à temperatura ambiente, usando o difratômetro Empyrean da PANalytical equipado com um detetor PIXcel1D ajustado a 240 mm da amostra. Foi usada a radiação X de Cu-K $\alpha$ 1,2 ( $\lambda_1 = 1,540598 \text{ \AA}$ ;  $\lambda_2 = 1,544426 \text{ \AA}$ ), filtrada com uma folha de níquel, juntamente com um suporte de amostra de transmissão padrão. As condições de funcionamento do tubo de raios X foram de 45 kV e 40 mA. Os dados da intensidade foram recolhidos em modo contínuo a aproximadamente 3,0–70° na faixa angular de  $2\theta$ . As amostras foram *scaneadas*/digitalizadas em etapas de 0,02° com um tempo de contagem de 50s por etapa.

### 3.5. Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica comumente empregue em química para o estudo das estruturas vibracionais de moléculas, em conjunto com a espectroscopia de infravermelhos, sendo baseada na polarizabilidade molecular induzida, após a interação da molécula com a luz do *laser*. (83)

Esta técnica utiliza um feixe de luz monocromática que ao interagir com a molécula é espalhada por ela, formando-se um feixe de luz com a mesma energia ou com energia diferente do feixe incidente. Durante esse processo de espalhamento, a molécula é temporariamente elevada a um nível de energia mais elevado, designado por “estado virtual de energia”. Após a luz ser espalhada a molécula poderá retornar ao nível de energia original, o que confere à luz espalhada e à luz incidente o mesmo comprimento de onda, sendo este processo conhecido como “dispersão de Rayleigh” (Figura III-5). Em outros casos, a molécula poderá sofrer uma mudança nos níveis vibracionais e rotacionais durante o processo de espalhamento. Esta mudança confere energias diferentes à luz espalhada e à luz incidente, sendo esta diferença compatível com a energia envolvida na transição vibracional e correspondendo a comprimentos de onda ligeiramente diferentes. Este fenómeno é designado de espalhamento de Raman. (83)



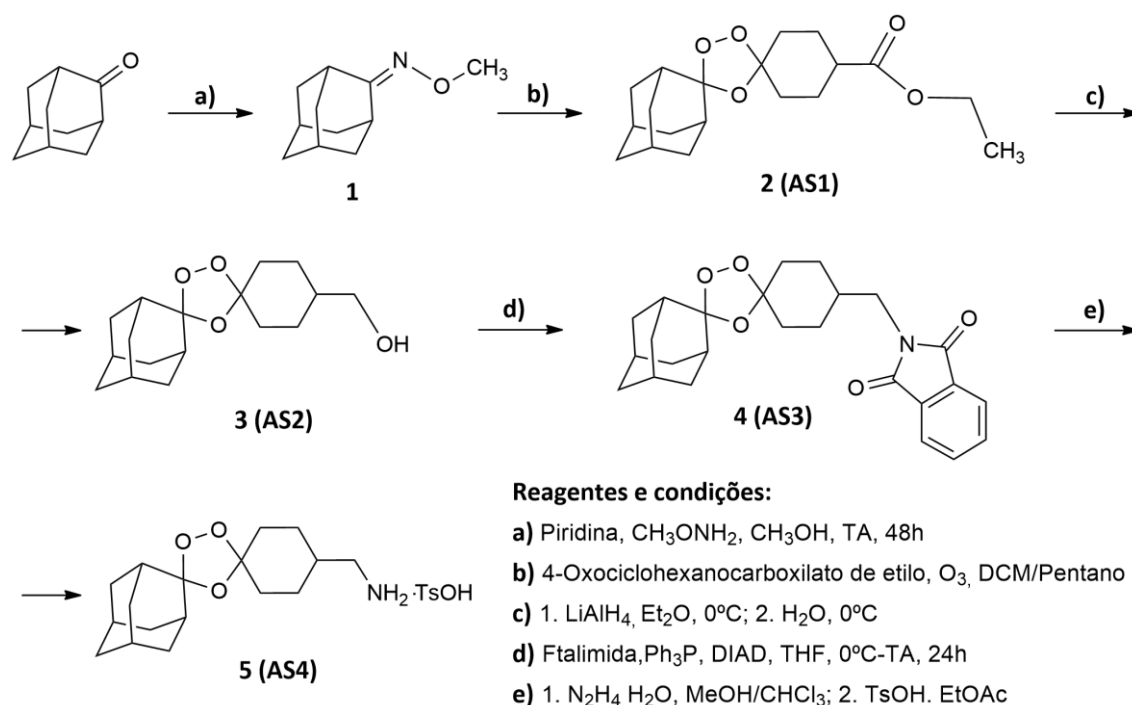
**Figura III-5** – Ilustração do tipo de transições energéticas que ocorrem na “dispersão de Rayleigh” e no espalhamento de Raman. Adaptado de (83).

Por outras palavras, o efeito de Raman é resultado de fótons sendo “capturados” momentaneamente pelas moléculas da amostra e posteriormente cedidos, causando um pequeno incremento ou decréscimo de energia, através de mudanças nas energias vibracionais e rotacionais moleculares. Este tipo de espalhamento, denominado de inelástico, pode ser subdividido em dois tipos: espalhamento Stokes e anti-Stokes. A principal diferença entre eles é que no espalhamento Stokes as moléculas recebem a energia no seu estado fundamental e no espalhamento anti-Stokes a molécula encontra-se num estado excitado de energia. (Figura III-5). (83)

No trabalho realizado no âmbito desta dissertação, os espectros de Raman foram registados utilizando um espectrómetro Bruker MultiRAM equipado com um *laser* Nd-YAG com um comprimento de onda de excitação de 1064 nm.

#### 4. PROCESSO DE SÍNTESE DO TRIOXOLANO NAC89/AS4

A preparação do composto AS4 seguiu o esquema reacional apresentado na Figura III-6 e detalhado em seguida.



**Figura III-6** – Esquema reacional ilustrativo do processo de síntese do composto AS4.

Na presente dissertação, continuou-se a síntese iniciada por uma estudante de doutoramento do laboratório OrgMedChem/CCMar, partindo do composto **2 (AS1)** fornecido.

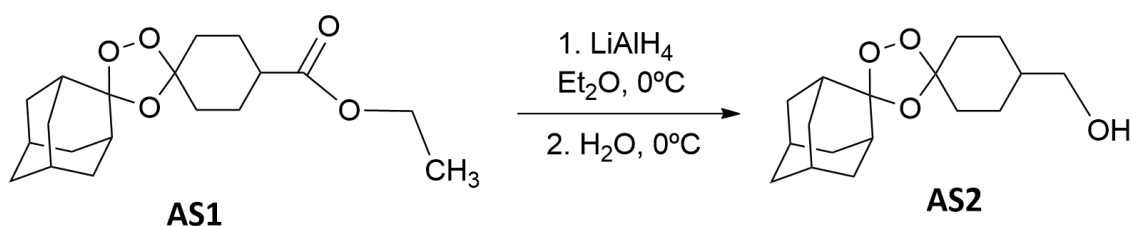
#### 4.1. Purificação do composto AS1

O composto **2 (AS1)** encontrava-se contaminado com adamantanona, pelo que foi necessário proceder a uma separação dos compostos através de uma cromatografia em coluna. O eluente utilizado foi uma mistura de acetona e hexano na proporção de 2/8, sendo o mesmo eluente usado nas análises por TLC para confirmar a separação dos compostos.

Após a realização da cromatografia, foi possível obter-se aproximadamente 14 g de composto AS1 isolado, tendo a sua estrutura sido comprovada pelos espectros de RMN, apresentados nas Figuras VII-1 e VII-2 dos anexos. Estes dados espectrais estão de acordo com os reportados na literatura. (77)  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ )  $\delta$  4.13 (dq,  $J = 9.4, 7.1$  Hz, 2H), 2.40 – 2.26 (m, 1H), 2.00 – 1.66 (m, 22H), 1.25 (dt,  $J = 8.3, 7.1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN (126 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ )  $\delta$  175.05, 111.60, 108.04, 60.49, 41.52, 36.85, 36.44, 34.94, 34.89, 34.85, 34.83, 34.06, 33.66, 33.44, 33.29, 33.23, 31.59, 27.18, 26.93, 26.53, 26.31, 26.13. De notar que surgem sinais duplicados no espectro de RMN de carbono-13, devido à presença de desordem no anel de trioxolano, que origina 2 conformémeros relativamente estáveis e populados. (89,90)

#### 4.2. Síntese do composto AS2

A figura III-7 esquematiza o processo de redução da função éster presente no composto **AS1** à função álcool presente no composto **AS2**.



**Figura III-7** – Esquema representativo da reação de conversão do composto AS1 no composto AS2.

Para a obtenção do composto AS2, dissolveu-se 4 g do composto AS1 (11,89 mmol) em 60 mL de éter dietílico seco, adicionando-se esta solução a uma suspensão de 0,85 g de tetrahydroaluminato de lítio (35,67 mmol) em 10 mL de éter dietílico seco, a  $0^\circ\text{C}$ . Esta mistura reacional foi mantida sob agitação a esta temperatura por aproximadamente 30 minutos, confirmando o final da reação através de uma análise por TLC, usando como eluente uma mistura de acetona e hexano na proporção de 2/8.



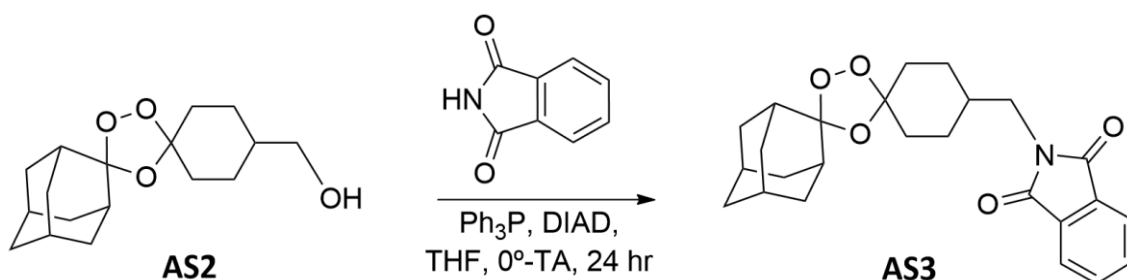
À mistura obtida foi adicionada água gelada, gota a gota, até não se visualizar a liberação de bolhas (resultantes da formação de H<sub>2</sub> por destruição do excesso de agente redutor). De seguida, adicionou-se HCl 2M até a mistura ficar com um pH ácido, para liberação do álcool.

Depois deste procedimento, é possível verificar a formação de 2 fases, a fase aquosa e a fase orgânica, na qual se encontra o produto pretendido. Esta fase foi separada através de 3 extrações sucessivas com éter dietílico. Por fim, a mistura foi filtrada e a solução concentrada por evaporação a pressão reduzida, originando 3,14 g do produto na forma de um líquido viscoso.

O procedimento anteriormente descrito foi adaptado do processo de síntese reportado por *Kwiatkowski et al.* (91), com ligeiras modificações. O composto desejado foi obtido com um rendimento de 89%, estando os dados espectrais, apresentados nas Figuras VII-3 e VII-4 dos anexos, de acordo com os reportados na literatura. (77) <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ 3.49 (dd, J = 26.1, 6.5 Hz, 2H), 2.12 – 1.65 (m, 21H), 1.58 – 1.15 (m, 5H); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ 111.28, 108.86, 67.61, 38.79, 36.73, 36.45, 36.31, 34.85, 34.74, 34.73, 34.68, 33.74, 33.54, 33.15, 30.96, 26.83, 26.80, 26.56, 26.41, 26.39. De notar que surgem sinais duplicados no espectro de RMN de carbono-13, devidos à desordem no anel de trioxolano, que origina 2 conformémeros relativamente estáveis e populados. (89,90)

#### 4.3. Síntese do composto AS3

A figura III-8 esquematiza o processo de conversão do composto **AS2** no composto **AS3**.



**Figura III-8** – Esquema representativo da reação de conversão do composto AS2 no composto AS3.

Iniciou-se o processo pela dissolução de 3,04 g do composto AS2 (10,31 mmol) em ca. 100 mL de THF seco, sendo a mistura colocada num banho de gelo. Quando a solução já se encontrava a 0°C, adicionaram-se 3,49 g de trifetilfosfina (13,30 mmol) e

1,96 g de ftalamida (13,30 mmol). Após a dissolução completa de todos os compostos adicionados, acrescentou-se lentamente 2,64 g de DIAD (13,40 mmol), tendo a reação sido protegida da luz e agitada à temperatura ambiente por aproximadamente 22 horas. O procedimento foi conduzido em condições anidras. A reação foi controlada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetona e hexano, na proporção de 3/7. Após a conclusão da reação, adicionou-se água gelada à mistura reacional e extraiu-se o composto AS3 com diclorometano (3x 30 mL). Aos extratos orgânicos combinados adicionou-se sulfato de magnésio anidro. Após filtração, a fase orgânica foi evaporada até à secura sob pressão reduzida. Por fim, o produto foi purificado por cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura de acetona e hexano, na proporção de 4/6, obtendo-se 3,12 g do produto desejado na forma de um sólido branco.

O procedimento anteriormente descrito foi adaptado do processo de síntese relatado por Sen *et al.* (92), com ligeiras modificações. O composto desejado foi obtido com um rendimento de 71%. Os dados espectrais de caracterização do produto são apresentados nas Figuras VII-5 e VII-6 dos anexos e estão de acordo com os reportados na literatura. (77)  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ )  $\delta$  7.84 (dt,  $J = 5.4, 3.3$  Hz, 2H), 7.71 (dt,  $J = 5.6, 3.1$  Hz, 2H), 3.58 (dd,  $J = 20.9, 7.2$  Hz, 2H), 2.09 – 1.96 (m, 1H), 1.94 – 1.64 (m, 18H), 1.57 – 1.22 (m, 4H);  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN (126 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ )  $\delta$  168.68, 134.10, 134.06, 132.08, 123.37, 111.45, 108.61, 43.17, 36.87, 36.42, 35.71, 34.97, 34.86, 34.82, 33.68, 33.48, 27.90, 27.70, 26.96, 26.93, 26.54. De notar que surgem sinais duplicados no espectro de RMN de carbono-13, devidos à desordem no anel de trioxolano, que origina 2 conformémeros relativamente estáveis e populados. (89,90)

#### 4.4. Síntese do composto AS4

A figura III-9 esquematiza o processo de conversão do composto AS3 no composto AS4.

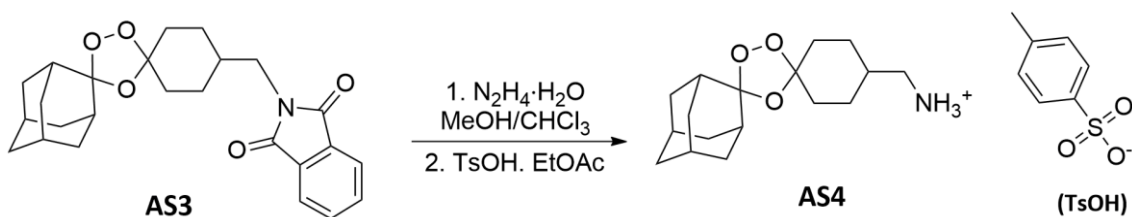


Figura III-9 – Esquema representativo da reação de conversão do composto AS3 no composto AS4.

Dissolveram-se 3 g do composto AS3 (7,08 mmol) em 100 mL de uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção de 7/3, à qual se adicionou ca. 4,1 mL de monohidrato de hidrazina. Esta mistura reacional permaneceu em agitação, num banho a 60°C, durante aproximadamente 12 horas, após as quais foi arrefecida até à temperatura ambiente, com posterior filtração e evaporação do filtrado sob pressão reduzida. Obteve-se um óleo amarelo, que foi dissolvido em 18 mL de acetato de etilo e ao qual foi adicionado ca. 1,83 g de TsOH (10,63 mmol; em excesso). O precipitado resultante foi filtrado e evaporado à secura, sob pressão reduzida, obtendo-se 2,65 g do produto desejado na forma de um pó branco.

O procedimento anteriormente descrito foi adaptado do processo de síntese reportado por Lobo *et al.* (77), com ligeiras modificações. O rendimento da reação de síntese do composto desejado foi de 80%, estando os dados espectrais de caracterização do produto obtido, apresentados nas Figuras VII-7 e VII-8 dos anexos, de acordo com os reportados na literatura. (77)  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.67 (s, 3H), 7.45 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 2.64 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.88 – 1.56 (m, 21H), 1.07 (dd, J = 13.4, 9.8 Hz, 2H);  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  RMN (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  145.99, 138.33, 128.66, 126.02, 111.16, 108.67, 43.99, 36.59, 36.25, 34.77, 34.22, 33.37, 27.46, 26.73, 26.32, 21.32.

## 5. RECRISTALIZAÇÃO DO CB[7]

CB[7] (7,3 g), previamente preparado por síntese química no laboratório do professor André Lopes, foi dissolvido em água. Esta mistura permaneceu em agitação, com algumas gotas de HCl, até à dissolução total do cucurbiturilo. Posteriormente, foi adicionada acetona, numa proporção 1/1 em relação à água, até à precipitação do CB[7], o qual foi subsequentemente filtrado, originando 5,09 g do produto na forma de um pó branco.

O espectro de RMN obtido, representado na figura III-10, encontra-se de acordo com o reportado na literatura. (21,34,93) Neste espectro é possível visualizar três conjuntos de sinais, sendo o singuleto a 5,50 ppm correspondente aos prótons localizados na posição equatorial ( $\text{H}^c$ ). Já nas pontes de metileno, o próton exocíclico ( $\text{H}^b$ ) integra um duplete a 4,20 ppm e o próton endocíclico ( $\text{H}^a$ ) corresponde ao duplete a 5,76 ppm.

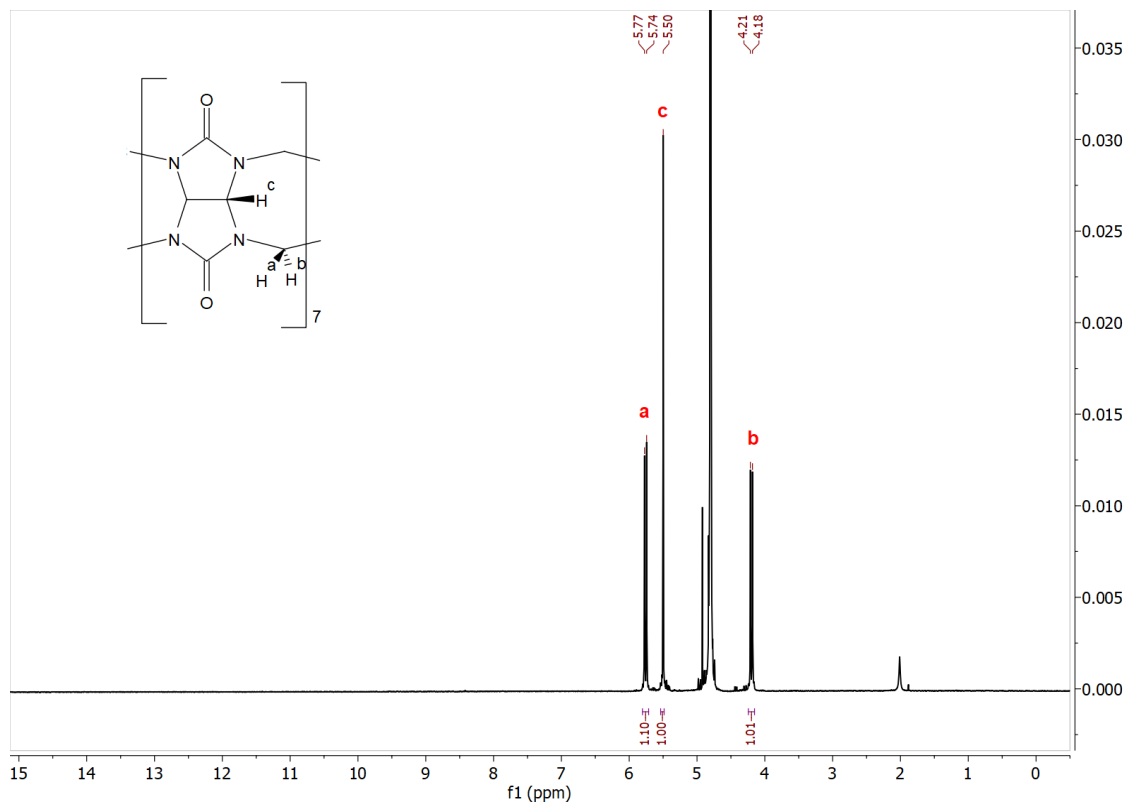


Figura III-10 – Espectro  $^1\text{H}$ -RMN do CB[7] em  $\text{D}_2\text{O-d}_2$ .

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

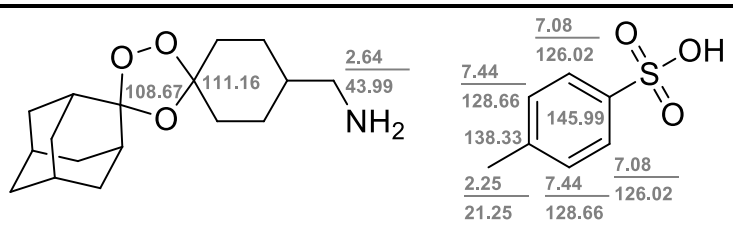
---

# 1. CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO AS4 E DO CB[7]

## 1.1. Análise do espectro de correlação $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HSQC)

Com recurso ao espectro de correlação  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (*heteronuclear single quantum correlation*, HSQC) do composto AS4 (Figura VII-9 dos anexos) elaborou-se a Tabela IV-1 com as correlações existentes entre os prótons do composto AS4 e os átomos de carbono aos quais estes se encontram diretamente ligados. (94)

**Tabela IV-1** – Correlações encontradas entre os espectros RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (HSQC) do composto AS4 (em DMSO- $d_6$ ).



$^1\text{H}$ , $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ , $\delta$ (ppm) + HSQC
1.07	27.55
1.61	33.18, 36.51
1.64	34.69
1.67	27.55
1.69	27.38, 34.69
1.71	26.38
1.72	34.69
1.75	26.72
1.78	33.36
1.83	34.69
1.87	36.59
2.25	21.25
2.64	43.99
-	108.67
-	111.16
7.08	128.66
7.45	126.02
7.67	-
-	138.33
-	145.99

Na figura presente nesta tabela é mostrada a atribuição dos sinais observados na tabela (indicando os desvios químicos correspondentes). Não obstante, com exceção dos sinais de  $^{13}\text{C}$  dos carbonos quaternários, não foi possível atribuir-se os sinais para os grupos adamantilo e ciclohexilo, pelo facto de estes sinais aparecem como um multiplete no espetro, não sendo possível a sua atribuição precisa.

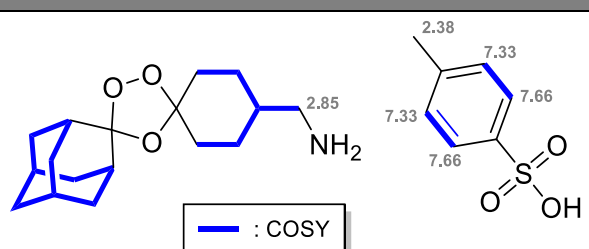
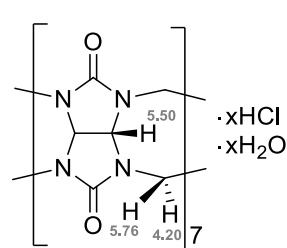
## 1.2. Análise dos espetros de correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (COSY)

Com recurso aos espetros de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (*correlation spectroscopy*, COSY) do trioxolano AS4 e do CB[7] (Figuras VII-10 e VII-11 dos anexos, respetivamente) elaborou-se a Tabela IV-2, onde é possível observar-se as correlações existentes entre os prótons ou grupos de prótons adjacentes. (94)

No caso do trioxolano AS4, os sinais 2.38, 7.33 e 7.66 ppm são pertencentes ao ácido p-toluenossulfónico (TsOH), utilizado para precipitar o trioxolano sob a forma de sal. Estes encontram-se atribuídos na figura presente na tabela. Os restantes sinais são pertencentes ao trioxolano AS4, sendo o sinal a 2.85 ppm correspondente ao  $\text{CH}_2$  que se encontra ligado ao  $\text{NH}_2$  e os sinais entre 1.19 e 2.01 ppm correspondentes aos prótons dos grupos adamantilo e ciclohexilo.

Já para os sinais presentes no CB[7], é de notar uma correlação existente entre os prótons exocíclico e endocíclico do cucurbiturilo. Por sua vez, o próton localizado na posição equatorial do CB[7] não apresenta qualquer correlação.

**Tabela IV-2** – Correlações encontradas nos espetros COSY do trioxolano AS4 e do CB[7] (em  $\text{D}_2\text{O-d}_2$ ).

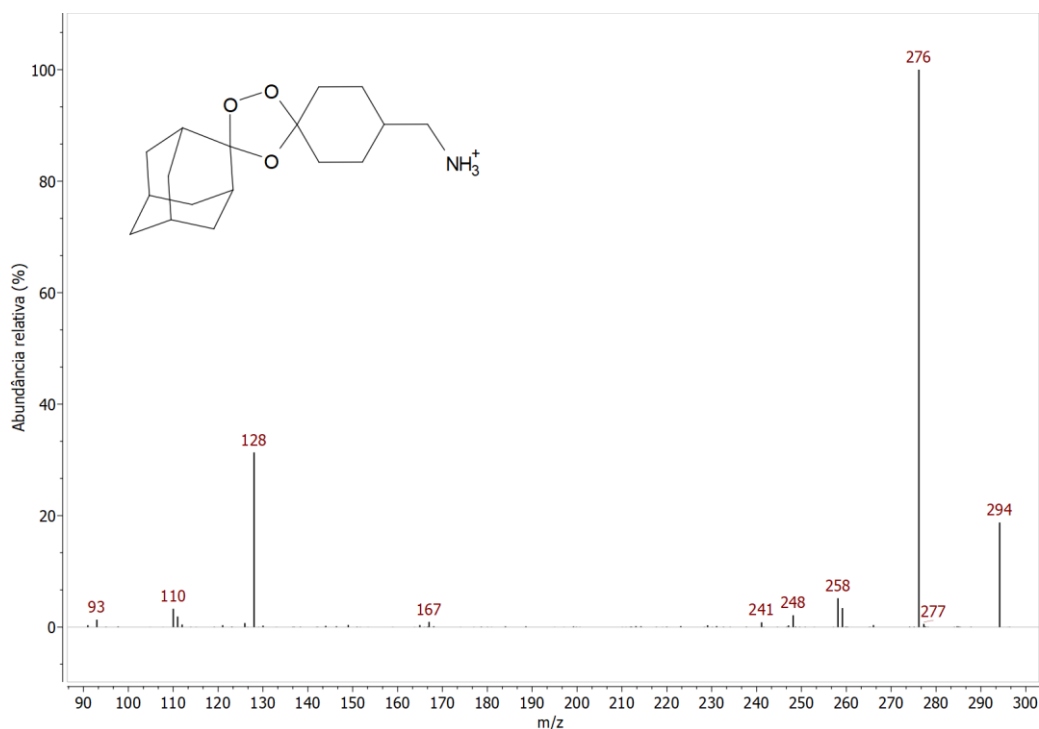
AS4		CB[7]	
			
$^1\text{H}$ , $\delta$ (ppm)	COSY, $^1\text{H}$ , $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ , $\delta$ (ppm)	COSY, $^1\text{H}$ , $\delta$ (ppm)
1.19	1.82	4.20	5.76
1.20	1.73, 1.80, 1.99	5.50	-

1.24	1.82	5.76	4.20
1.26	1.80		
1.69	1.74, 1.80, 1.83		
1.72	1.82		
1.73	1.20, 2.01		
1.74	1.69, 1.87, 1.99, 2.85		
1.78	1.82, 1.99, 2.01		
1.80	1.20, 1.26, 1.69, 1.99, 2.01		
1.82	1.19, 1.24, 1.72, 1.78		
1.83	1.69		
1.87	1.74		
1.99	1.20, 1.74, 1.80		
2.01	1.73, 1.78, 1.80		
2.38	-		
2.85	1.74		
7.33	7.66		
7.66	7.33		

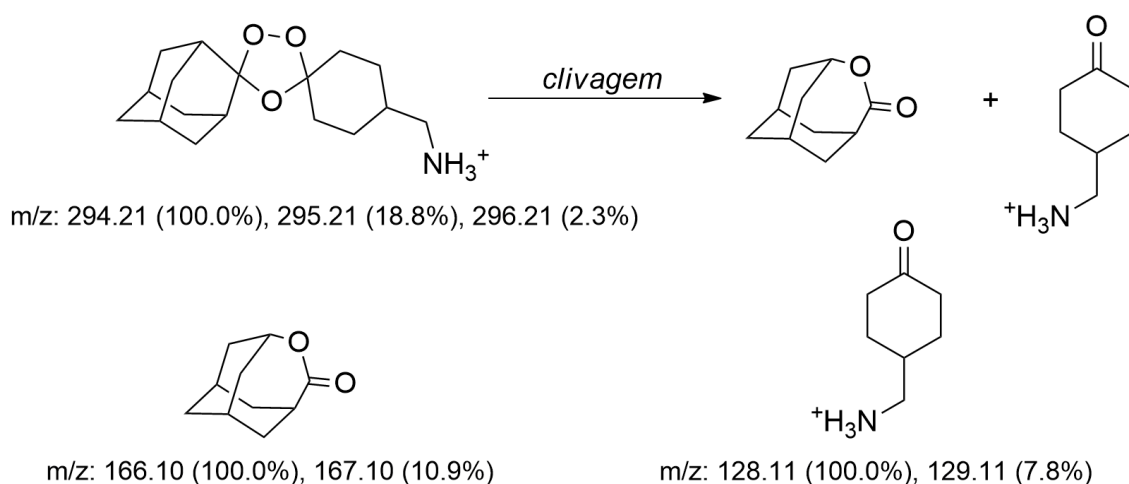
### 1.3. Análise do espectro de massa do composto AS4

O espectro de massa do trioxolano AS4 (Figura IV-1) revela um sinal com razão massa/carga 294, compatível com o íon molecular  $[AS4]^+$ . Neste espectro, é possível verificar uma maior abundância relativa do fragmento com uma razão massa/carga de 276, compatível com a perda de uma molécula de água pelo trioxolano. Adicionalmente, observa-se um sinal a 128, compatível com um dos fragmentos provenientes da clivagem da ligação peróxido do trioxolano (Figura IV-2), que pode resultar do facto da ligação peróxido do anel 1,2,4-trioxolano ser relativamente lábil. Esta clivagem origina dois fragmentos, um com  $m/z$  de 128/129 e outro com  $m/z$  de 166/167, aparecendo ambos os sinais no espectro de massa do composto AS4. A fragmentação observada está de acordo com o padrão de fotofragmentação em matriz criogénica de um trioxolano análogo, descrito na literatura. (95)





**Figura IV-1** – Espectro de massa do composto AS4.



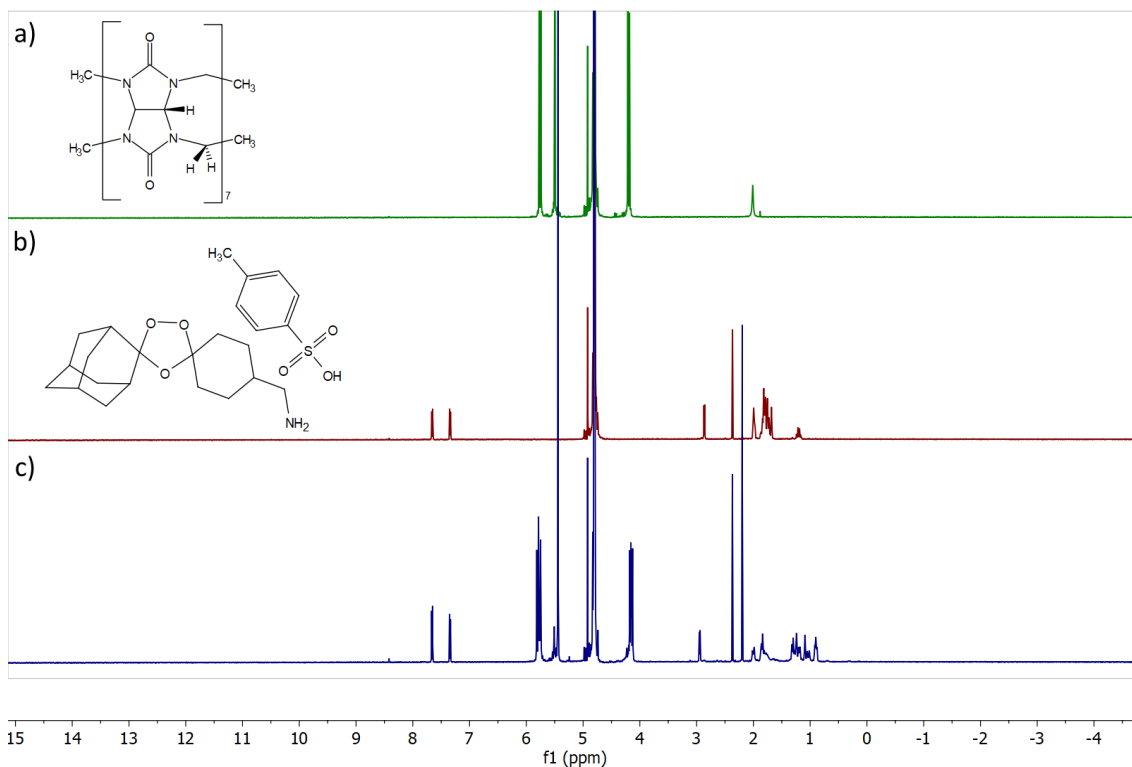
**Figura IV-2** – Esquema da clivagem da ligação peróxido do composto AS4, com os respectivos valores de m/z dos compostos resultantes.

## 2. ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DO TRIOXOLANO EM CB[7]

### 2.1. Análise dos espectros de RMN

Uma mistura do composto AS4 com CB[7] em água deuterada foi caracterizada por RMN, obtendo-se o espectro de  $^1\text{H}$ -RMN apresentado na Figura VII-12 dos anexos. Comparando o espectro obtido com os espectros dos compostos isolados (Figura IV-3) é

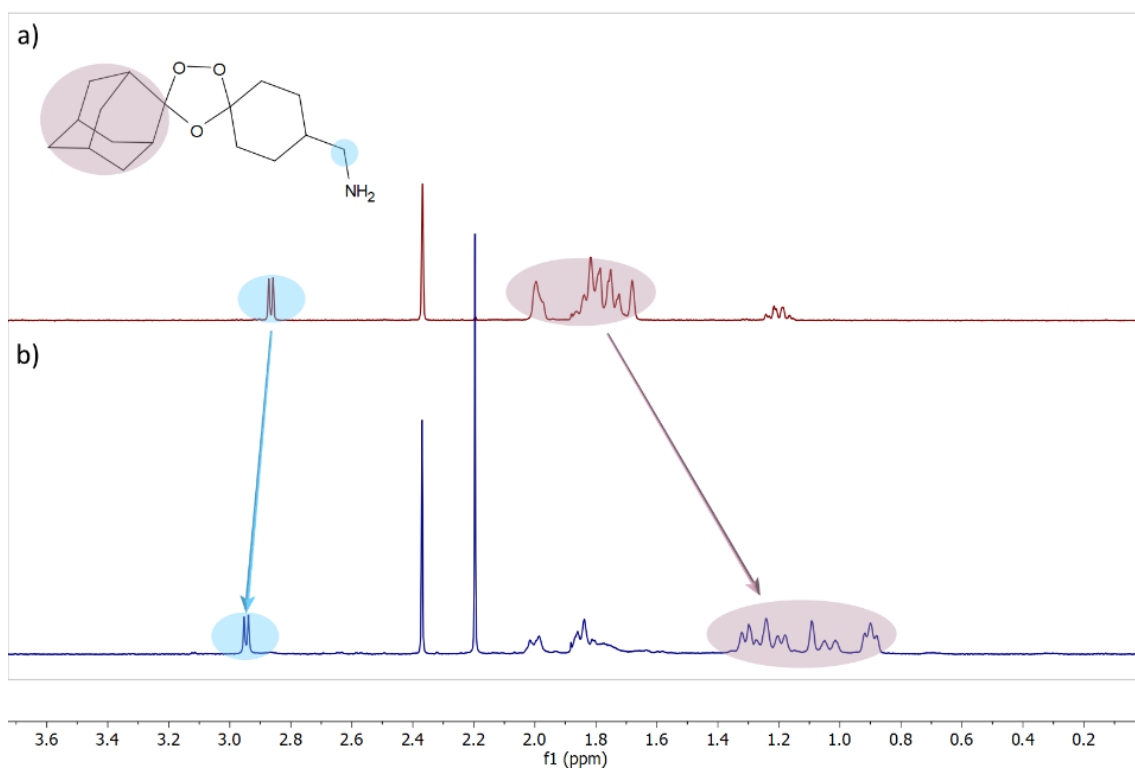
possível verificar a existência de alterações nos desvios químicos, tanto do composto AS4 como do cucurbiturilo, sendo esta observação indicativa da existência de interação química entre estes dois compostos.



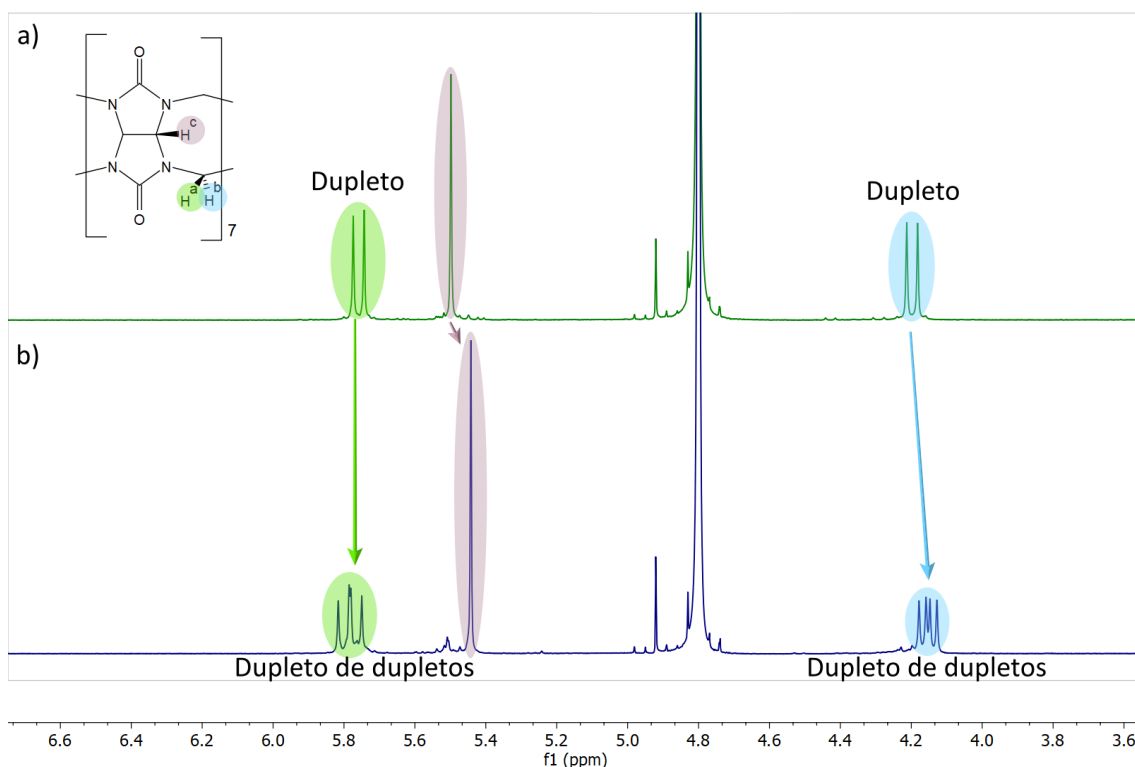
**Figura IV-3** – Espetros <sup>1</sup>H-RMN do a) CB[7], b) composto AS4 e c) mistura destes dois compostos em D<sub>2</sub>O-d<sub>2</sub>.

Com o intuito de visualizar melhor estas alterações, procedeu-se a uma ampliação deste espectro para a região onde ocorrem (entre 0.2 a 3.6 ppm e entre 3.6 a 6.6 ppm), estando estas ampliações apresentada nas Figuras IV-4 e IV-5.

Analisando a Figura IV-4 verifica-se um deslocamento para valores de campo magnético mais altos dos sinais correspondentes aos prótons do grupo adamantilo. Este desvio para um campo magnético mais alto é indicativo de encapsulamento deste grupo no interior da cavidade do CB[7], pelo facto de esta proporcionar uma blindagem magnética aos prótons do hóspede incluído. (96) Em contraste, o sinal correspondente ao CH<sub>2</sub> ligado ao grupo amina sofreu um ligeiro desvio químico para valores de campo magnético mais baixos, indicativo da sua localização fora da cavidade hidrofóbica e perto dos portais carbonílicos do cucurbiturilo. (31)



**Figura IV-4** – Ampliação dos espectros de <sup>1</sup>H-RMN do a) composto AS4 e b) mistura deste composto com o CB[7], sendo possível observar os desvios nos sinais devidos a ressonâncias de prótons do composto AS4 após interação com o CB[7].

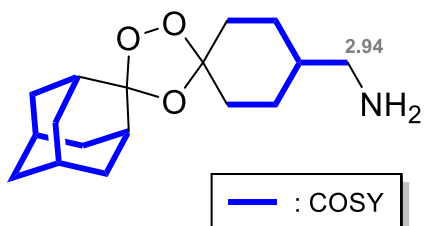
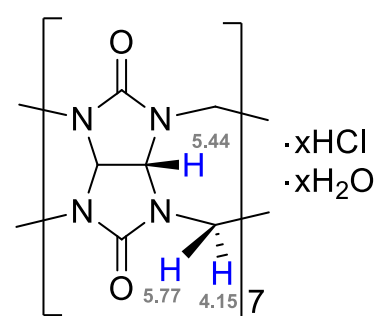


**Figura IV-5** – Ampliação dos espectros de <sup>1</sup>H-RMN do a) CB[7] e b) mistura deste com o trioxolano AS4, onde é possível observar os desvios nos sinais devidos a ressonâncias de prótons do CB[7] após este interagir com o AS4.

Por seu lado, nos espectros da Figura IV-5 verifica-se um ligeiro desvio químico para valores de campo magnético mais altos dos sinais correspondentes ao protão localizado na posição equatorial ( $H^c$ ) e ao protão exocíclico ( $H^b$ ) do CB[7]. Existe também um desdobramento dos sinais relativos aos protões exocíclico ( $H^b$ ) e endocíclico ( $H^a$ ), anteriormente dupletos, sendo que este desdobramento corresponderá a um duplete de dupletos. Todas estas alterações sugerem que existe algum tipo de interação, tanto endocíclica como exocíclica entre o trioxolano e o cucurbiturilo, um indício da existência de interação com o exterior do CB[7]. (97)

Adicionalmente, com recurso ao espectro COSY da mistura do trioxolano AS4 com o CB[7], apresentado na Figura VII-13 dos anexos, elaborou-se a Tabela IV-3, na qual é possível observar as correlações existentes entre os protões ou grupos de protões adjacentes. Na imagem presente nesta tabela fez-se a atribuição dos sinais aos respetivos protões, sendo a região entre 0.87 e 1.31 ppm correspondente aos protões do grupo adamantilo, que sofreram um desvio para a direita, enquanto os sinais entre 1.80 e 2.01 ppm correspondem aos protões do grupo ciclohexilo. Fazendo uma comparação destes valores com os valores obtidos na Tabela IV-2 para os compostos isolados, é possível verificar as mesmas alterações nos espectros destes dois compostos, já anteriormente explicadas.

**Tabela IV-3** – Correlações encontradas nos espectros COSY da mistura do trioxolano AS4 com o CB[7] (em  $D_2O-d_2$ ).

$^1H, \delta$ (ppm)	COSY, $^1H, \delta$ (ppm)
0.87	0.92, 1.18
0.92	0.87, 1.02, 1.31
1.02	0.92, 1.28, 1.30, 1.31

1.18	0.87
1.23	1.83, 1.86
1.27	1.83
1.28	1.02, 2.01
1.30	1.02
1.31	0.92, 1.02, 1.80, 1.86
1.80	1.31, 1.99, 2.01, 2.94
1.83	1.23, 1.27
1.86	1.23, 1.31, 1.99, 2.01
1.99	1.80, 1.86
2.01	1.28, 1.80, 1.86
2.94	1.80
4.15	5.77
5.44	-
5.77	4.15
7.33	7.66
7.66	7.33

## 2.2. Análise do espectro de massa obtidos por LC-MS

O espectro de massa do complexo AS4-CB[7] encontra-se representado na Figura IV-6. Neste é possível verificar uma maior abundância relativa da espécie com uma razão massa/carga ( $m/z$ ) de 656.8, compatível com a formação de um complexo de duas cargas entre o CB[7], o fragmento com  $m/z$  128 proveniente da clivagem da ligação peróxido do trioxolano AS4, e um catião de  $\text{Na}^+$  (Figura IV-7) Esta reação de clivagem poderá ser resultado do processo de ionização empregue em espectrometria de massa. Por sua vez, o sinal com um  $m/z$  739.9 é compatível com a formação de um complexo de duas cargas entre o CB[7], o ião molecular do trioxolano AS4 e um catião de  $\text{Na}^+$  (Figura IV-8) No espectro é ainda possível visualizar o sinal com um  $m/z$  294.5, correspondente ao ião molecular  $[\text{AS4}]^+$ .

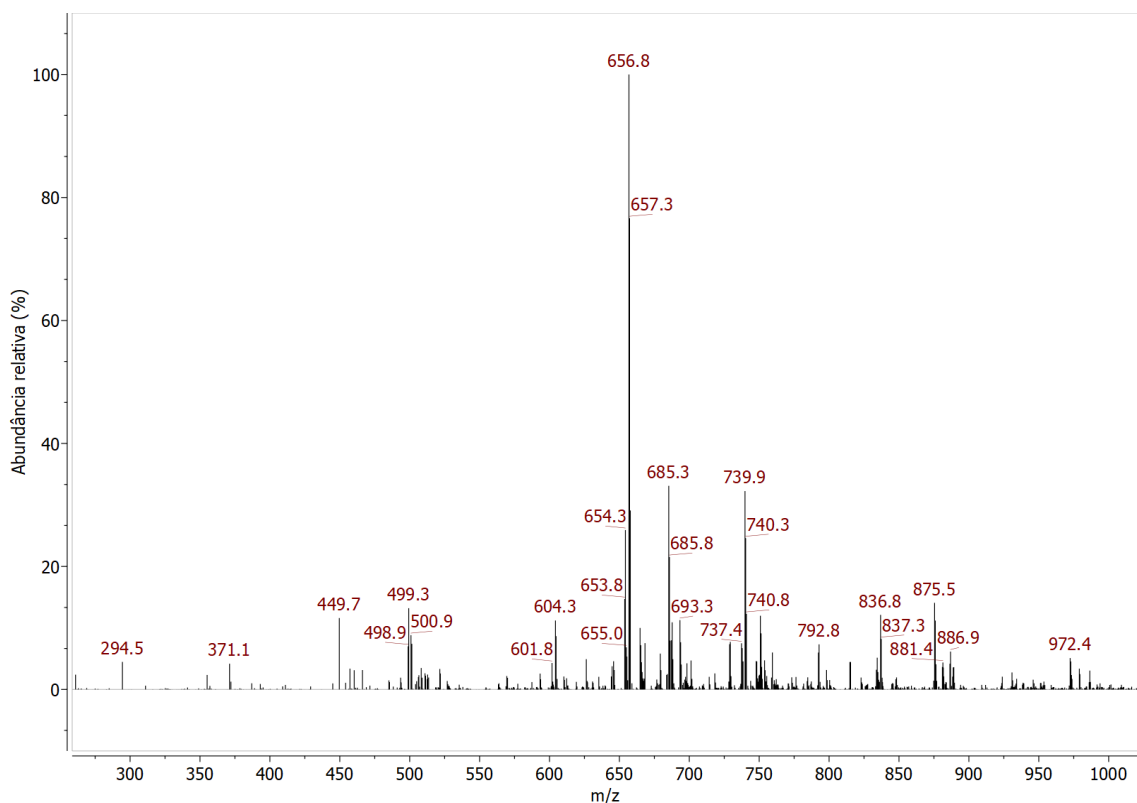


Figura IV-6 – Espectro de massa do composto AS4 com o CB[7].

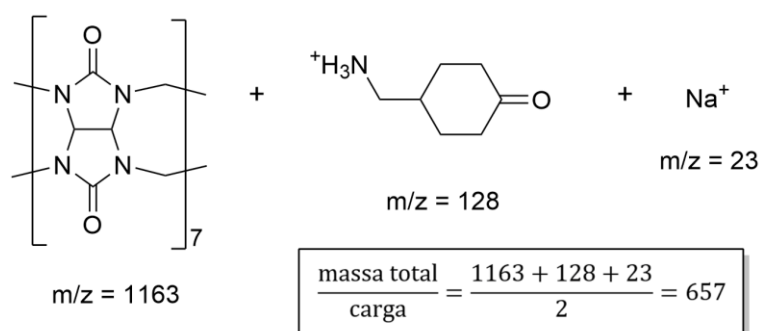


Figura IV-7 – Representação esquemática do complexo de duas cargas formado entre o CB[7], o fragmento com m/z 128 proveniente da clivagem da ligação peróxido do trioxolano AS4 e o catião de Na<sup>+</sup>.

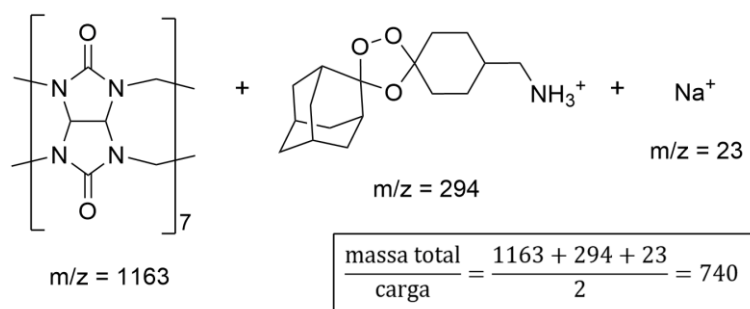
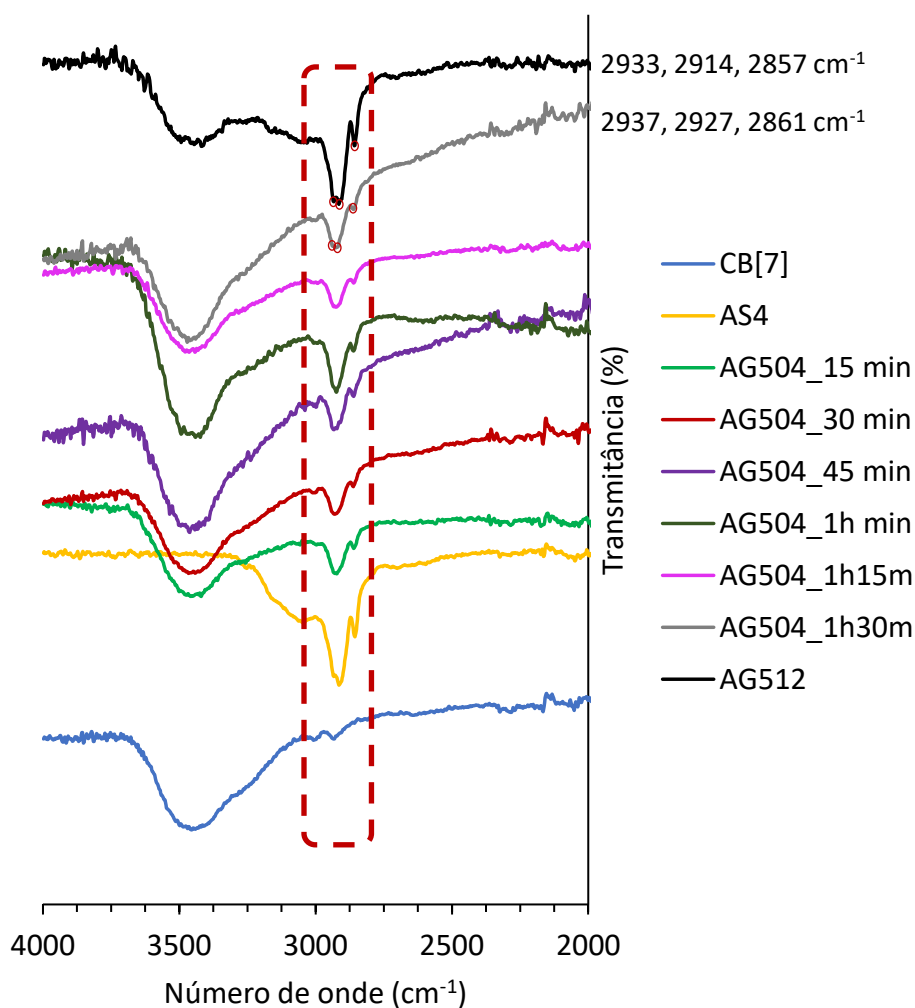


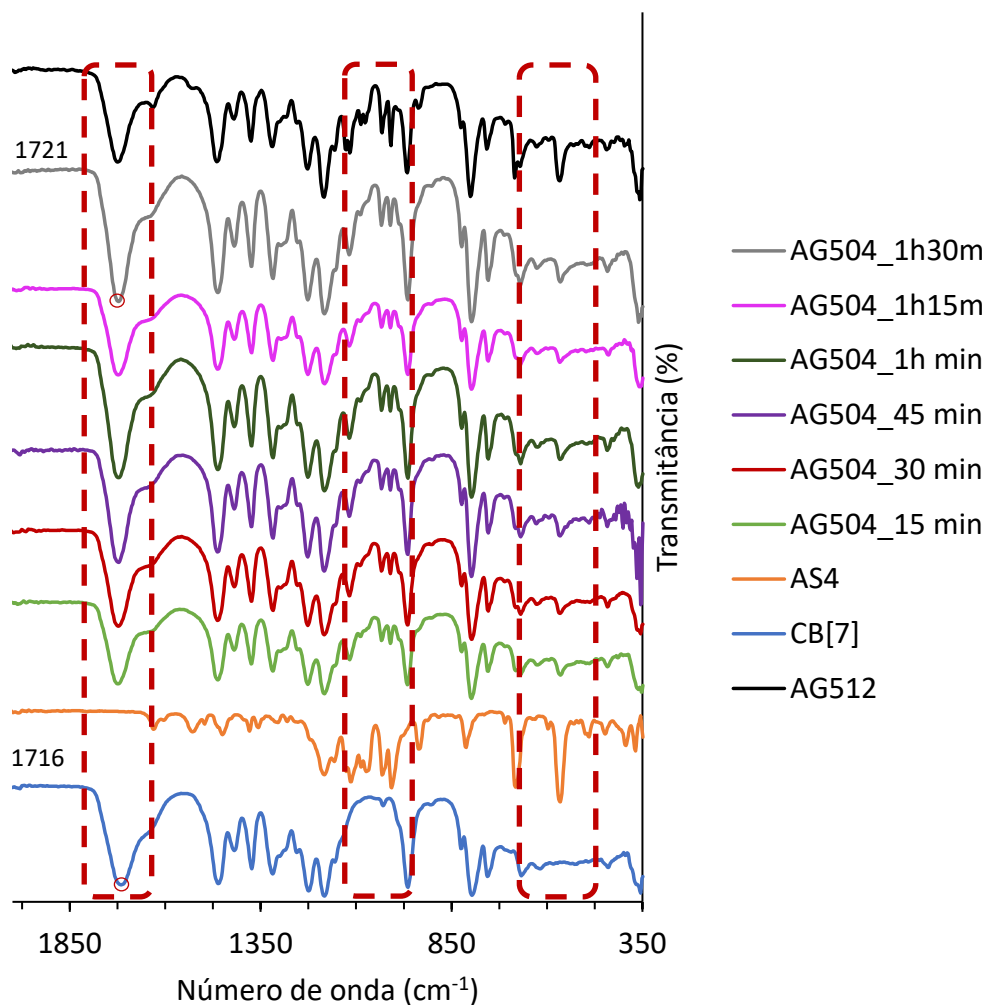
Figura IV-8 – Representação esquemática do complexo de duas cargas formado entre o CB[7], o íon molecular do trioxolano AS4 e o catião de Na<sup>+</sup>.

### 2.3. Análise dos espectros de ATR-FTIR

Nos Gráficos IV-1 e IV-2 apresentam-se os espectros obtidos por espectroscopia de ATR-FTIR, estando os espectros relativos ao CB[7] de acordo com os reportados na literatura. (21,98) Nestes espectros foram usadas as abreviaturas AG504, para designar os espectros do composto formado após a síntese mecanoquímica, e AG512, para designar os espectros da mistura física entre AS4 e CB[7], não sendo perceptível, no caso da mistura física qualquer interação entre os compostos. Observam-se, contudo, alterações no espectro à medida que ocorre a síntese mecanoquímica, sugerindo existir uma interação entre os dois compostos. Evidências destas alterações surgem nas regiões espectrais assinaladas nos gráficos (entre os números de onda 2750 e 3050  $\text{cm}^{-1}$ , 1650 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , 980 e 1150  $\text{cm}^{-1}$  e entre 530 e 720  $\text{cm}^{-1}$ ).



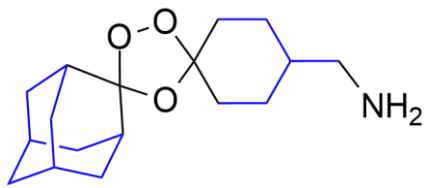
**Gráfico IV-1** – Espectros de ATR-FTIR obtidos entre os números de onda 2000 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7].



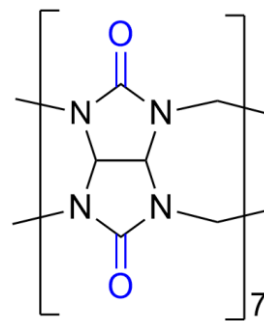
**Gráfico IV-2** – Espectros de ATR-FTIR obtido entre os números de onda 350 e 2000  $\text{cm}^{-1}$ , sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7].

Nestes espectros verifica-se que a mistura física (amostra AG512) apresenta sinais a 2933, 2914 e 2857  $\text{cm}^{-1}$ , pertencentes às bandas de estiramento  $\nu$  (C-H) do trioxolano AS4 (Figura IV-9), enquanto na amostra AG504, analisada após 90 minutos de moagem (amostra AG504\_1h30m), as bandas apresentam desvios relativamente a estes valores, surgindo a 2937, 2927 e a 2861  $\text{cm}^{-1}$ . Adicionalmente, na amostra AG504\_1h30m a banda de estiramento  $\nu$  (C=O) do CB[7] (1721  $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura IV-10) também apresenta um desvio de 5  $\text{cm}^{-1}$  relativamente ao espectro do CB[7] isolado (que aparece a 1716  $\text{cm}^{-1}$ ). Estes dados permitem deduzir que exista interação entre o composto AS4 e o cucurbiturilo.





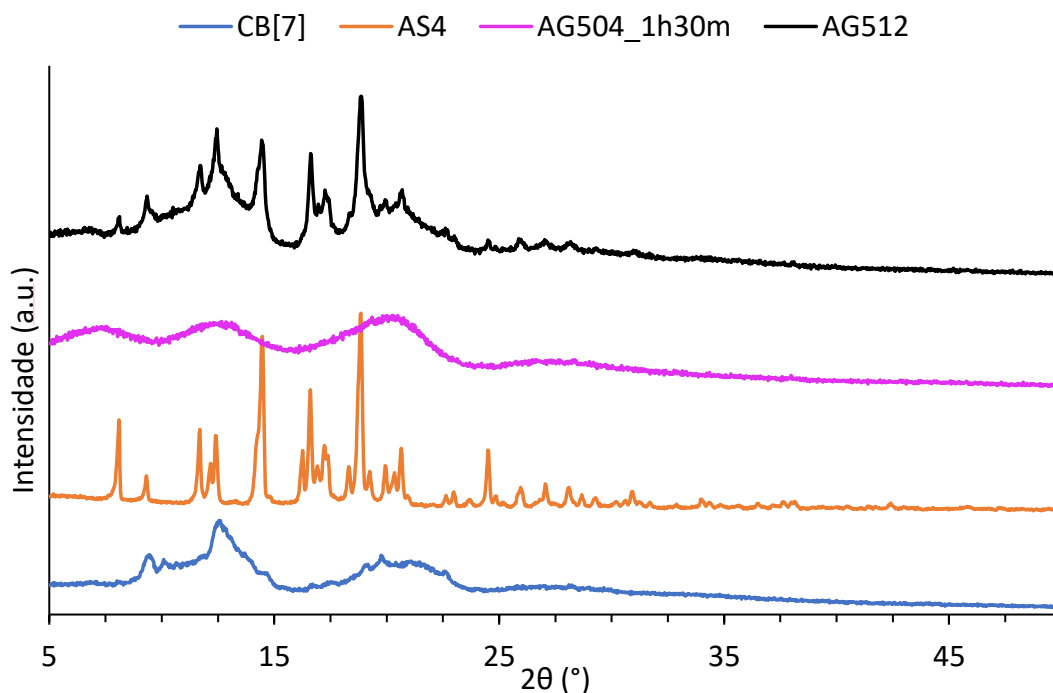
**Figura IV-9** – Representação a azul das ligações C-H do trioxolano AS4 que dão origem às bandas de estiramento na região entre 2750 e 3050 cm<sup>-1</sup>



**Figura IV-10** – Representação a azul das ligações C=O do CB[7] que dão origem à banda de estiramento na região entre 1650 e 1800 cm<sup>-1</sup>

## 2.4. Análise dos padrões obtidos por PXRD

A análise por PXRD permitiu obter os padrões apresentados no Gráfico IV-3, estando os padrões obtidos para o CB[7] de acordo com os reportados na literatura. (21,79)



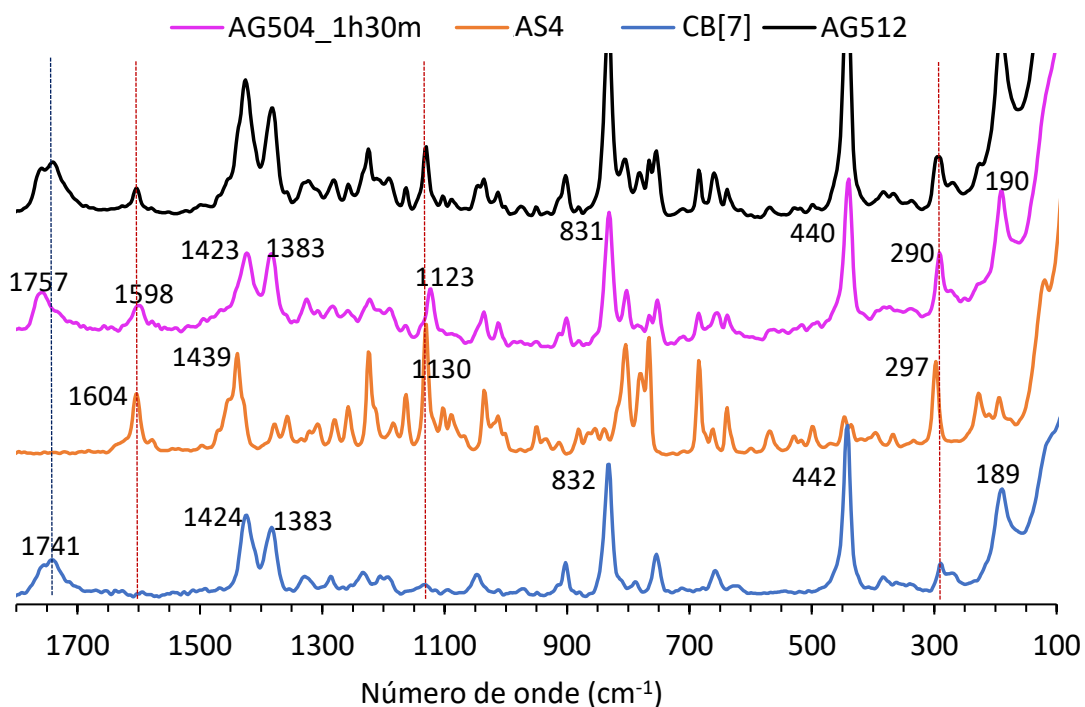
**Gráfico IV-3** – Espectros obtidos após análise por PXRD, sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7].

Neste gráfico é de notar a existência de uma grande diferença entre os padrões obtidos para a mistura física (amostra AG512) e os obtidos para a amostra após a síntese mecanoquímica (amostra AG504\_1h30m). O padrão PXRD da amostra

AG504\_1h30m exibe um pequeno número de reflexões na faixa estudada, não sendo possível retirar informação estrutural do complexo entre o CB[7] e o AS4. Este tipo de reflexão difusa deve-se, provavelmente, a uma perda de cristalinidade dos pós após o processo de síntese mecanoquímica. Não obstante, a ausência de reflexões do composto AS4 não incluído e do CB[7] puro indicam a existência de algum tipo de interação entre o composto orgânico e o CB[7].

## 2.5. Análise dos espectros de Raman

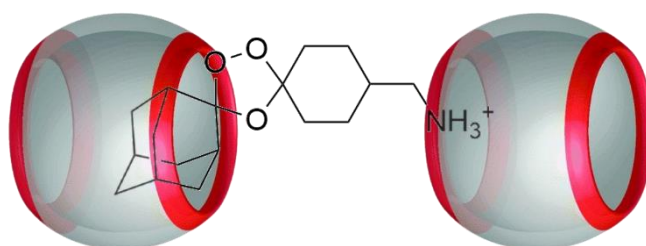
Foram obtidos os espectros de Raman presentes no Gráfico IV-4, estando o espectro do CB[7] de acordo com o reportado na literatura. (21,99) No gráfico apresentado abaixo é possível verificar que as bandas atribuídas ao hóspede da amostra AG504\_1h30m apresentam pequenos deslocamentos de ca.  $7\text{ cm}^{-1}$  em relação ao espectro do composto AS4 puro (destacados no gráfico com um tracejado vermelho). Adicionalmente, a banda do carbonilo do hospedeiro aparece a  $1757\text{ cm}^{-1}$  (destacada no gráfico com um tracejado azul) na amostra AG504\_1h30m, o que reflete um deslocamento de  $16\text{ cm}^{-1}$  em relação a mesma banda do CB[7] puro ( $1741\text{ cm}^{-1}$ ). Estes deslocamentos indicam a existência de algum tipo de interação entre o trioxolano e o cucurbiturilo.



**Gráfico IV-4** – Espectros de Raman obtidos, sendo AG504: composto formado após a síntese mecanoquímica e AG512: mistura física entre AS4 e CB[7].

### 3. PROPOSTA PARA O MODO DE ENCAPSULAMENTO DO COMPOSTO AS4 EM CB[7]

Com base nas informações obtidas através das técnicas espectroscópicas elaborou-se uma proposta do modo de ligação do composto AS4 com o CB[7], apresentada na Figura IV-11. A análise dos resultados por reação mecanoquímica permitiu constatar a existência de interação entre o composto orgânico com o CB[7], não sendo, no entanto, conclusiva quanto ao tipo de interação existente. Porém, a análise dos resultados em solução, quer por LC-MS que por  $^1\text{H-RMN}$ , demonstram de forma mais clara a possível existência de um complexo de inclusão em que o grupo adamantilo se encontra encapsulado dentro da cavidade hidrofóbica do CB[7] e o grupo amina interage com os portais carbonílicos de outra molécula de cucurbiturilo. Como a cavidade hidrofóbica deste CB[7] se encontra livre, permite que exista a encapsulação de outra molécula de trioxolano na sua cavidade, podendo dar origem a uma estrutura em cadeia que intercala trioxolano encapsulado e contentor, formando um complexo de AS4:CB[7] na proporção de 1:1.



**Figura IV-11** – Proposta para o modo de encapsulamento do composto AS4 em CB[7].

Não obstante, as dúvidas existentes quanto ao tipo de complexo formado poderiam ser elucidadas se tivesse sido possível obter-se cristais com o intuito de se conseguir a estrutura raio X do complexo. Porém, devido à instabilidade do trioxolano AS4 em água (Figura VII-14 dos anexos), isto não foi possível.

### 4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DO COMPLEXO AS4-CB[7]

Com o objetivo de obter informação preliminar sobre o potencial antimalárico do complexo AS4-CB[7] (amostra AG521) foi solicitada uma avaliação *in vitro* da atividade antiplasmodial desta amostra, comparando-a com os valores obtidos para o

trioxolano AS4 e para o contentor CB[7], testados nas mesmas condições. A análise baseou-se na suscetibilidade demonstrada pela linhagem 3D7-GFP de *Plasmodium falciparum* aos compostos testados. A linhagem 3D7-GFP é sensível aos fármacos cloroquina e mefloquina, pelo que no estudo realizado foi testada a cloroquina (CQ) como antimalárico de controlo e, adicionalmente, a dihidroartemisinina (DHA), um fármaco antimalárico da classe dos endoperóxidos cuja atividade poderá ser tomada como termo de comparação na avaliação da atividade do trioxolano AS4. Na Tabela IV-4 encontram-se os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para as moléculas AS4 e CB[7] puro, bem como para a amostra AG521, obtida por síntese mecanoquímica, e para a dihidroartemisinina (DHA) e cloroquina (CQ).

**Tabela IV-4** – Atividades obtidas contra as linhas celulares 3D7-GFP de *P. falciparum* sensíveis a cloroquina e a mefloquina.

Composto	IC <sub>50</sub> (nM)
CB[7]	440,7 ± 17,3
AS[4]	2,5 ± 1,2
AG521	18,2 ± 1,2
DHA	4,1 ± 0,1
CQ	21,3 ± 0,5

A análise dos valores de IC<sub>50</sub> apresentados na tabela IV-4, revela que a interação do trioxolano AS4 com o CB[7] apenas afetou ligeiramente a atividade antimalárica demonstrada pelo trioxolano. Por outro lado, os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para a amostra AG512 são semelhantes aos obtidos para a CQ e apenas sensivelmente mais baixos que os exibidos pelo derivado de artemisinina DHA, um fármaco da classe dos endoperóxidos, tal como o composto AS4. Todos os compostos testados (DHA, CQ, AS4 e a amostra AG51) exibiram valores de IC<sub>50</sub> na escala nanomolar baixa. De salientar que a atividade antimalárica exibida pelo composto AS4 nestes estudos, medida através do valor de IC<sub>50</sub>, está de acordo com resultados obtidos por outros investigadores, em estudos anteriores realizados com o mesmo composto. (63,77)

Os estudos experimentais aqui reportados foram realizados no Grupo de Malária do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, no âmbito de uma colaboração do grupo OrgMedChem/CCMar com esta instituição.

## V. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

---

No mundo atual, é cada vez mais urgente a procura de soluções mais viáveis para o combate das mais variadas doenças. Além da formulação de novos fármacos, o encapsulamento dos já existentes em contenedores moleculares, com o intuito de melhorar a biodisponibilidade e servir de veículo de entrega no local de ação, tem vindo a ser alvo de vários estudos científicos. (14) Nesse sentido, os cucurbiturilos, devido às propriedades químicas e estruturais promissoras que possuem, apresentam um grande potencial para aplicação em medicina como veículo de transporte e entrega de fármacos, permitindo aumentar a solubilidade e a estabilidade de diversos fármacos. (29)

Dado que as terapêuticas atualmente existentes para a malária têm vindo a perder eficácia, devido sobretudo ao surgimento de parasitas multirresistentes, é cada vez mais urgente o desenvolvimento de formulações farmacêuticas melhoradas com atividade antimalárica contra linhas de parasitas multirresistentes. (34) Nesta dissertação optou-se por uma abordagem que envolve a encapsulação de um endoperóxido sintético com atividade antimalárica comprovada (77), em CB[7], com o intuito de melhorar propriedades farmacológicas, incluindo o perfil de toxicidade.

Desta forma, a síntese do endoperóxido com farmacóforo 1,2,4-trioxolano (composto AS4) foi o ponto de partida para o presente trabalho de investigação. Após a síntese do trioxolano procedeu-se à encapsulação mecanoquímica deste no contendor molecular CB[7] e posterior caracterização do material resultante com recurso a diversas técnicas, entre as quais LC-MS e espetroscopias de RMN, ATR-FTIR, PXRD e Raman.

A síntese do composto AS4 foi realizada seguindo procedimentos descritos na literatura, com ligeiras modificações. Os estudos de caracterização do material AG512, obtido por síntese mecanoquímica a partir do endoperóxido sintético AS4 e do CB[7], foram conduzidos recorrendo a espetroscopias de RMN, LC-MS, ATR-FTIR, PXRD e Raman. Os resultados indicam que existiu a formação de um complexo entre o endoperóxido sintético e o CB[7]. Com base nos dados espectralis obtidos, propôs-se a composição de um complexo na proporção de 1:1, em que a cavidade hidrofóbica do cucurbiturilo acomoda o grupo adamantilo do trioxolano, interagindo, em simultâneo, com o grupo amina de outra molécula de trioxolano.

Os estudos *in vitro* conduzidos em linhas celulares 3D7-GFP de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina e mefloquina comprovaram não existir perda significativa de atividade do trioxolano após a interação deste com o CB[7]. Desta forma, como perspectivas futuras, a condução de estudos *in vitro* em linhas celulares humanas de forma a determinar a citotoxicidade do complexo deve ser considerada. Estudos posteriores *in vivo* em murganhos também podem ser ponderados, dependendo dos resultados obtidos para os estudos anteriores, com o intuito de avaliar se a encapsulação do trioxolano AS4 em CB[7] diminuiu a toxicidade cutânea anteriormente revelada pelo composto puro.

Adicionalmente e tendo em conta a baixa estabilidade demonstrada pelo trioxolano em água, que impediu a formação de cristais para o composto de inclusão, era de considerar experimentar a encapsulação em CB[7] de um composto com farmacóforo 1,2,4,5-tetraoxano, tido como quimicamente mais estável. Foi comprovado que compostos com esta estrutura possuem uma maior estabilidade da ligação peróxido, o que poderia resultar em melhores resultados de encapsulação.

(100)

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



1. Steed JW, Atwood JL. *Supramolecular chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. 2009. 1–9 p.
2. Ariga K, Kunitake T. *Supramolecular chemistry – Fundamentals and applications*. Springer. 2006. 1–5 p.
3. Steed J, Turner D, Wallace K. *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. 2007. 1–3 p.
4. Whitesides GM, Boncheva M. Beyond molecules: Self-assembly of mesoscopic and macroscopic components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):4769–74.
5. Wenz G. An overview of host-guest chemistry and its application to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Drug Investig*. 2000;19(2):21–5.
6. Geng WC, Sessler JL, Guo DS. Supramolecular prodrugs based on host-guest interactions. *Chem Soc Rev*. 2020;49:2303–15.
7. Shang J, Liu Y, Pan T. Macrocycles in bioinspired catalysis: From molecules to materials. *Front Chem*. 2021;9:1–8.
8. Assaf KI, Nau WM. Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chem Soc Rev*. 2014;44(2):394–418.
9. Mock WL, Irra TA, Wepsiec JP, Manimaran TL. Cycloaddition induced by cucurbituril. A case of Pauling principle catalysis. *J Org Chem*. 1983;48(20):3619–20.
10. Barrow SJ, Kasera S, Rowland MJ, Del Barrio J, Scherman OA. Cucurbituril-based molecular recognition. *Chem Rev*. 2015;115(22):12320–406.
11. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem*. 2004;39:1033–46.
12. Nimse SB, Kim T. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem Soc Rev*. 2013;42:366–86.
13. Chen JF, Ding JD, Wei TB. Pillararenes: Fascinating planar chiral macrocyclic arenes. *R Soc Chem*. 2021;57:9029–39.
14. Das D, Assaf KI, Nau WM. Applications of cucurbiturils in medicinal chemistry and chemical biology. *Front Chem*. 2019;7(619):1–23.
15. Saleh N, Ghosh I, Nau WM. Cucurbiturils in drug delivery and for biomedical applications. *Em: Supramolecular Systems in Biomedical Fields*. 2013. p. 164–6.
16. Hettiarachchi G, Nguyen D, Wu J, Lucas D, Ma D, Isaacs L, et al. Toxicology and drug delivery by cucurbit[n]uril type molecular containers. *PLoS One*. 2010;5(5):1–10.
17. Macartney DH. Encapsulation of drug molecules by cucurbiturils: Effects on their chemical properties in aqueous solution. *Isr J Chem*. 2011;51(5–6):600–15.
18. Bai H, Wang J, Li Z, Tang G. Macrocyclic compounds for drug and gene delivery in immune-modulating therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20.

19. Walker S, Oun R, McInnes FJ, Wheate NJ. The potential of cucurbit[n]urils in drug delivery. *Isr J Chem.* 2011;51(5–6):616–24.
20. Lagona J, Mukhopadhyay P, Chakrabarti S, Isaacs L. The cucurbit[n]uril family. *Angew Chemie - Int Ed.* 2005;44(31):4844–70.
21. Costa AL, Gomes AC, Lopes AD, Da Silva JP, Pillinger M, Gonçalves IS, et al. Evaluation of the supramolecular interaction of congo red with cucurbiturils using mass spectrometry and spectroscopic methods. *New J Chem.* 2020;2587–96.
22. Kim K (Editor), Hur MY, Hwang I, Murray J, Nau W, Masson E, et al. *Monographs in supramolecular chemistry: Cucurbiturils and related macrocycles.* Em: The Royal Society of Chemistry. 2020. p. 21–2, 31–3.
23. Jin Y, Huang T, Zhao W, Yang X, Meng Y, Ma P. A study on the self-assembly mode and supramolecular framework of complexes of cucurbit[6]urils and 1-(4-methoxyphenyl) piperazine. *RSC Adv.* 2020;10:37369–73.
24. Masson E, Ling X, Joseph R, Kyeremeh-Mensah L, Lu X. Cucurbituril chemistry: A tale of supramolecular success. *RSC Adv.* 2012;2:1213–47.
25. Oun R, Floriano RS, Isaacs L, Rowan EG, Wheate NJ. The ex vivo neurotoxic, myotoxic and cardiotoxic activity of cucurbituril-based macrocyclic drug delivery vehicles. *R Soc Chem.* 2014;3:447–55.
26. Uzunova VD, Cullinane C, Brix K, Nau WM, Day AI. Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: An exploratory *in vitro* and *in vivo* study. *Org Biomol Chem.* 2010;8(9):2037–42.
27. Chen H, Chan JYW, Yang X, Wyman IW, Bardelang D, MacArtney DH, et al. Developmental and organ-specific toxicity of cucurbit[7]uril: *In vivo* study on zebrafish models. *R Soc Chem.* 2015;5:30067–74.
28. Aktanova A, Abramova T, Pashkina E, Boeva O, Grishina L, Kovalenko E, et al. Assessment of the biocompatibility of cucurbiturils in blood cells. *Nanomaterials.* 2021;11(1356):1–10.
29. Cheng G, Luo J, Liu Y, Chen X, Wu Z, Chen T. Cucurbituril-oriented nanoplateforms in biomedical applications. *ACS Appl Bio Mater.* 2020;3:8211–40.
30. Zhang M, Gao J, Chen J, Cai M, Jiang J, Tian Z, et al. Enhanced dSTORM imaging using fluorophores interacting with cucurbituril. *Sci China Chem.* 2016;59(7):848–52.
31. Zhao Y, Buck DP, Morris DL, Pourgholami MH, Day AI, Collins JG. Solubilisation and cytotoxicity of albendazole encapsulated in cucurbit[n]uril. *Org Biomol Chem.* 2008;6:4509–15.
32. Li S, Chen H, Yang X, Bardelang D, Wyman IW, Wan J, et al. Supramolecular inhibition of neurodegeneration by a dyntactic receptor. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6:1174–8.
33. Boraste DR, Chakraborty G, Ray AK, Shankarling GS, Pal H. pH-responsive interaction of fluorogenic antimalarial drug quinine with macrocyclic host cucurbit[7]uril: Modulations in photophysical and acid-base properties. *ChemistrySelect.* 2017;2(18):5128–42.

34. Mallick S, Pal K, Chandra F, Koner AL. Investigation of the effect of cucurbit[7]uril complexation on the photophysical and acid–base properties of the antimalarial drug quinine. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(44):30520–9.
35. Fletcher TE, Beeching NJ. Malaria. *J R Army Med Corps*. 2013;159:158–66.
36. World Health Organisation (WHO). Malaria [Internet]. 2022 [citado em Setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
37. CDC. Malaria - About Malaria - Where Malaria Occurs [Internet]. 2020 [citado em Agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>
38. CDC. Malaria - About malaria - Disease [Internet]. 2022 [citado em Março de 2021]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>
39. World Health Organisation (WHO). World malaria report. 2021.
40. CDC. Malaria - About malaria - Biology [Internet]. 2020 [citado em Julho de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
41. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria immunology, 2nd edition. Em: *Chemical Immunology*. 2002. p. 1–4.
42. World Health Organisation (WHO). WHO guidelines for malaria. 2022.
43. EMA. Mosquirix: Summary of product characteristics. p. 1–27.
44. UpToDate. Antimalarial drugs: An overview [Internet]. 2022 [citado em Julho de 2022]. Disponível em: [https://www.uptodate.com/contents/antimalarial-drugs-an-overview?search=malaria treatment&source=search\\_result&selectedTitle=9~150&usage\\_type=default&display\\_rank=9#H21](https://www.uptodate.com/contents/antimalarial-drugs-an-overview?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=9~150&usage_type=default&display_rank=9#H21)
45. World Health Organisation (WHO). Treating malaria [Internet]. [citado em Julho de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/activities/treating-malaria>
46. Zhou W, Wang H, Yang Y, Chen ZS, Zou C, Zhang J. Chloroquine against malaria, cancers and viral diseases. *Drug Discov Today*. 2020;25(11):2012–22.
47. Kumar S, Bawa S, Gupta H. Biological activities of quinoline derivatives. *Mini-Reviews Med Chem*. 2009;9:1648–54.
48. Kumar V, Mahajan A, Chibale K. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. *Bioorganic Med Chem*. 2009;17(6):2236–75.
49. Katzung B. Basic & clinical pharmacology, 14th edition. *Side Effects of Drugs Annual*. 2018. 1–1250 p.
50. Rang HP, Ritter J, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D. Rang & Dale's pharmacology, 9th edition. Elsevier. 2020. 699–705 p.
51. Muregi FW, Ishih A. Next-generation antimalarial drugs: Hybrid molecules as a new strategy in drug design. *Drug Dev Res*. 2010;71:20–32.

52. Rudrapal M. A brief review on malaria and current antimalarial drugs. *Curr Pharma Res.* 2011;1(3):286–92.
53. Koehne E, Adegnika AA, Held J, Kreidenweiss A. Pharmacotherapy for artemisinin-resistant malaria. *Expert Opin Pharmacother.* 2021;22(18):2483–93.
54. Brunton L, Hilal-dandan R, Knollman B. *The pharmacological basis of therapeutics*, 13th edition. McGraw-Hill Education. 2018. 969–985 p.
55. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Hanpithakpong W, Ph D, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2009;361(5):455–67.
56. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2014;371(5):411–23.
57. Wang Z, Wang Y, Cabrera M, Zhang Y, Gupta B, Wu Y, et al. Artemisinin resistance at the China-Myanmar border and association with mutations in the K13 propeller gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(11):6952–9.
58. Das S. Evidence of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in eastern India. *N Engl J Med.* 2018;379(20):1963–4.
59. Balikagala B, Fukuda N, Ikeda M, Katuro OT, Tachibana S-I, Yamauchi M, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in africa. *N Engl J Med.* 2021;385(13):1163–71.
60. Lobo L, Cabral LIL, Sena MI, Guerreiro B, Rodrigues AS, De Andrade-Neto VF, et al. New endoperoxides highly active *in vivo* and *in vitro* against artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2018;17(145):1–11.
61. Wells TNC, Van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC. Malaria medicines: A glass half full? *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14:424–42.
62. Woodley CM, Amado PSM, Cristiano MLS, O’Neill PM. Artemisinin inspired synthetic endoperoxide drug candidates: Design, synthesis, and mechanism of action studies. *Med Res Rev.* 2021;41:3062–95.
63. Vennerstrom JL, Arbe-Barnes S, Brun R, Charman SA, Chiu FCK, Chollet J, et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature.* 2004;430:900–4.
64. Patil C, Baig M, Doifode S, Katare S. Fixed dose combination of arterolane and piperazine: A newer prospect in antimalarial therapy. *Ann Med Health Sci Res.* 2014;4(4):466–71.
65. Graham P. *Antimalarial agents: Design and mechanism of action.* Elsevier. 2020. 121–125 p.
66. Mossallam SF, Amer EI, El-Faham MH. Efficacy of Synriam™, a new antimalarial combination of OZ277 and piperazine, against different developmental stages of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 2015;143:36–46.

67. O'Neill PM, Amewu RK, Nixon GL, ElGarah FB, Mungthin M, Chadwick J, et al. Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins. *Angew Chemie - Int Ed.* 2010;49:5693–7.
68. O'Neill PM, Amewu RK, Charman SA, Sabbani S, Gnädig NF, Straimer J, et al. A tetraoxane-based antimalarial drug candidate that overcomes PfK13-C580Y dependent artemisinin resistance. *Nat Commun.* 2017;8:1–10.
69. Tse EG, Korsik M, Todd MH. The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malar J.* 2019;18(93):1–21.
70. Lu G, Nagbanshi M, Goldau N, Jorge MM, Meissner P, Jahn A, et al. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: A systematic review. *BMC Med.* 2018;16(59):1–16.
71. NIH Clinical Trials. Methylene blue against falciparum malaria in burkina faso (BlueACTn) [Internet]. 2020 [citado em Agosto de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02851108?term=Methylene+blue&cond=Malaria&draw=2&rank=1>
72. Mombo-Ngoma G, Remppis J, Sievers M, Zoleko Manego R, Endamne L, Kabwende L, et al. Efficacy and safety of fosmidomycin-piperaquine as nonartemisinin-based combination therapy for uncomplicated falciparum malaria: A single-arm, age de-escalation proof-of-concept study in Gabon. *Clin Infect Dis.* 2018;66(12):1823–30.
73. NIH Clinical Trials. Evaluation of fosmidomycin and piperaquine in the treatment of acute falciparum malaria (FOSPIP) [Internet]. 2015 [citado em Agosto de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02198807?term=Fosmidomycin&cond=Malaria&draw=2&rank=5>
74. NIH Clinical Trials. Rosiglitazone adjunctive therapy for severe malaria in children (ROSI) [Internet]. 2021 [citado em Agosto de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02694874?term=Rosiglitazone&cond=Malaria&draw=2&rank=1>
75. NIH Clinical Trials. Triple antimalarial combination to accelerate the parasite clearance and to prevent the selection of resistant parasites (Artesynib) [Internet]. 2018 [citado em Agosto de 2022]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03697668?term=Imatinib&cond=Malaria&draw=2&rank=2>
76. Chien HD, Pantaleo A, Kesely KR, Noomuna P, Putt KS, Tuan TA, et al. Imatinib augments standard malaria combination therapy without added toxicity. *J Exp Med.* 2021;218(10):1–8.
77. Lobo L, de Sousa B, Cabral L, Cristiano MLS, Nogueira F. Highly active ozonides selected against drug resistant malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(7):450–3.
78. Leonard J, Lygo B, Procter G. *Advanced practical organic chemistry*, 3th edition. CRC Press. 2013. 74–79 p.

79. Gomes AC, Magalhães CIR, Oliveira TSM, Lopes AD, Gonçalves IS, Pillinger M. Solid-state study of the structure and host-guest chemistry of cucurbituril-ferrocene inclusion complexes. *R Soc Chem*. 2016;45(42):17042–52.
80. Wade LG. *Organic chemistry*, 8th edition. Pearson. 2013. 541–543; 563–568 p.
81. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and applications*, 3th edition. John Wiley & Sons, Ltd. 2007. 217–222 p.
82. Thermo Fisher Scientific. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) information* [Internet]. [citado em Setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms-information.html>
83. Kafle BP. *Chemical analysis and material characterization by spectrophotometry*. Elsevier. 2020. 220–224 p.
84. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th edition. Brooks/Cole, Cengage Learning. 2014. 713–719 p.
85. Agilent Technologies. *ATR Technical Overview*. 2022. p. 1–7.
86. Poppe LJ, Paskevich VF, Hathaway JC, S. BD. *A laboratory manual for x-ray powder diffraction*. USGS. 2001.
87. Holder CF, Schaak RE. Tutorial on powder x-ray diffraction for characterizing nanoscale materials. *ACS Nano*. 2019;13(7):7359–65.
88. Grebenkemper J. *Powder x-ray diffraction* [Internet]. Chemistry LibreTexts. 2022 [citado em Setembro de 2022]. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Diffraction\\_Scattering\\_Techniques/Powder\\_X-ray\\_Diffraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Diffraction_Scattering_Techniques/Powder_X-ray_Diffraction)
89. Tang Y, Dong Y, Karle JM, DiTusa CA, Vennerstrom JL. Synthesis of tetrasubstituted ozonides by the griesbaum coozonolysis reaction: Diastereoselectivity and functional group transformations by post-ozonolysis reactions. *J Org Chem*. 2004;69:6470–3.
90. Amado PSM, Jesus AJL, Paixão JA, Fausto R, Cristiano MLS. Unravelling the structure of peroxides with antiparasitic activity: The relative impact of a trioxolane or a tetraoxane pharmacophore on the overall molecular structure. *Chempluschem*. 2022;87:1–16.
91. Kwiatkowski MR, Alexanian EJ. Nickel-catalyzed mizoroki–heck-type reactions of unactivated alkyl bromides. *Angew Chemie - Int Ed*. 2018;57:16857–60.
92. Sen SE, Roach SL. A convenient two-step procedure for the synthesis of substituted allylic amines from allylic alcohols. *Synth*. 1995;7:756–8.
93. Kim J, Jung IS, Kim SY, Lee E, Kang JK, Sakamoto S, et al. New cucurbituril homologues: Syntheses, isolation, characterization, and X-ray crystal structures of cucurbit[n]uril (n = 5, 7, and 8). *J Am Chem Soc*. 2000;122(3):540–1.
94. Field LD, Li HL, Magill AM. *Organic structures from 2D NMR spectra*. John Wiley & Sons, Ltd. 2015.

95. Brás EM, Cabral LIL, Amado PSM, Abe M, Cristiano MLS, Fausto R. Photoinduced reactivity in a dispiro-1,2,4-trioxolane: Adamantane ring expansion and first direct observation of the long-lived triplet diradical intermediates. *J Phys Chem A*. 2020;124(21):4202–10.
96. Sadjadi S. *Organic Nanoreactors*. Elsevier. 2016. 56–57 p.
97. Paudics A, Hessz D, Bojtár M, Gyarmati B, Szilágyi A, Kállay M, et al. Binding modes of a phenylpyridinium styryl fluorescent dye with cucurbiturils. *Molecules*. 2020; 25(5111):1–15.
98. Bruno SM, Gomes AC, Oliveira TSM, Antunes MM, Lopes AD, Valente AA, et al. Catalytic alcoholysis of epoxides using metal-free cucurbituril-based solids. *Org Biomol Chem*. 2016;14:3873–7.
99. Mahajan S, Lee TC, Biedermann F, Hugall JT, Baumberg JJ, Scherman OA. Raman and SERS spectroscopy of cucurbit[n]urils. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12:10429–33.
100. Gomes GDP, Vil V, Terent'Ev A, Alabugin I V. Stereoelectronic source of the anomalous stability of bis-peroxides. *R Soc Chem*. 2015;6:6783–91.

## VII. ANEXOS

---



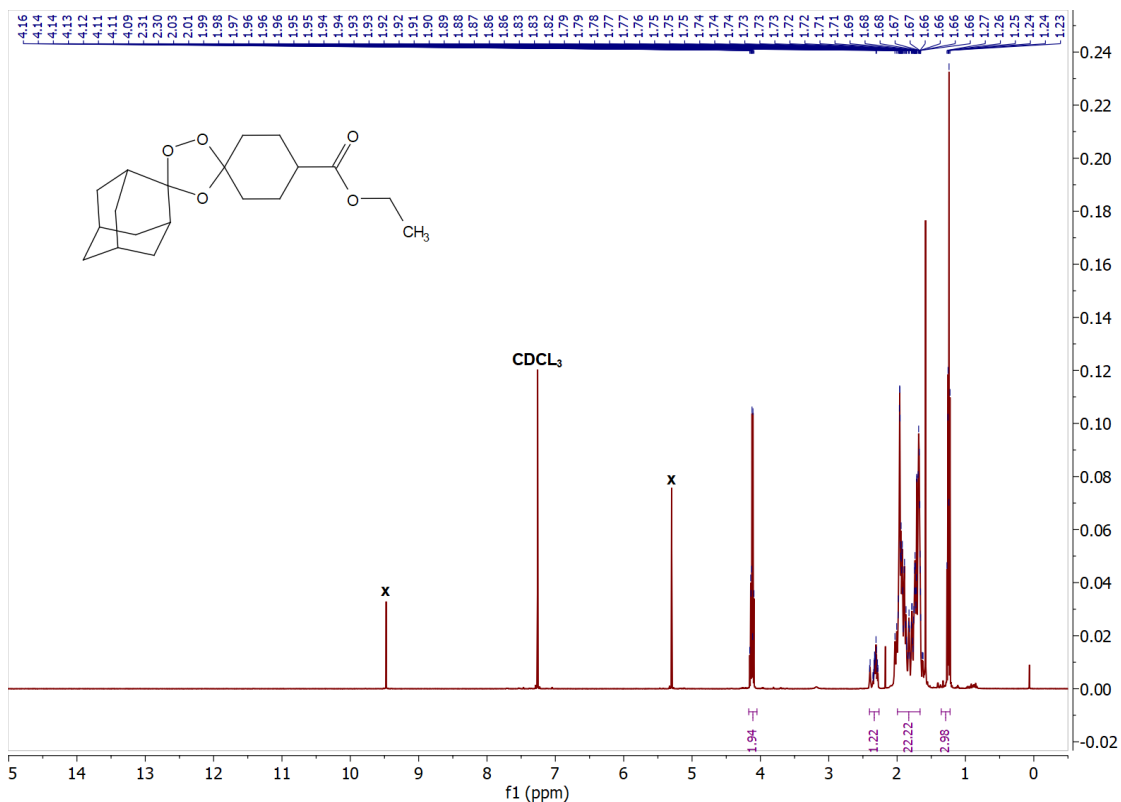


Figura VII-1 – Espetro <sup>1</sup>H-RMN do composto AS1 em CDCl<sub>3</sub>-d.

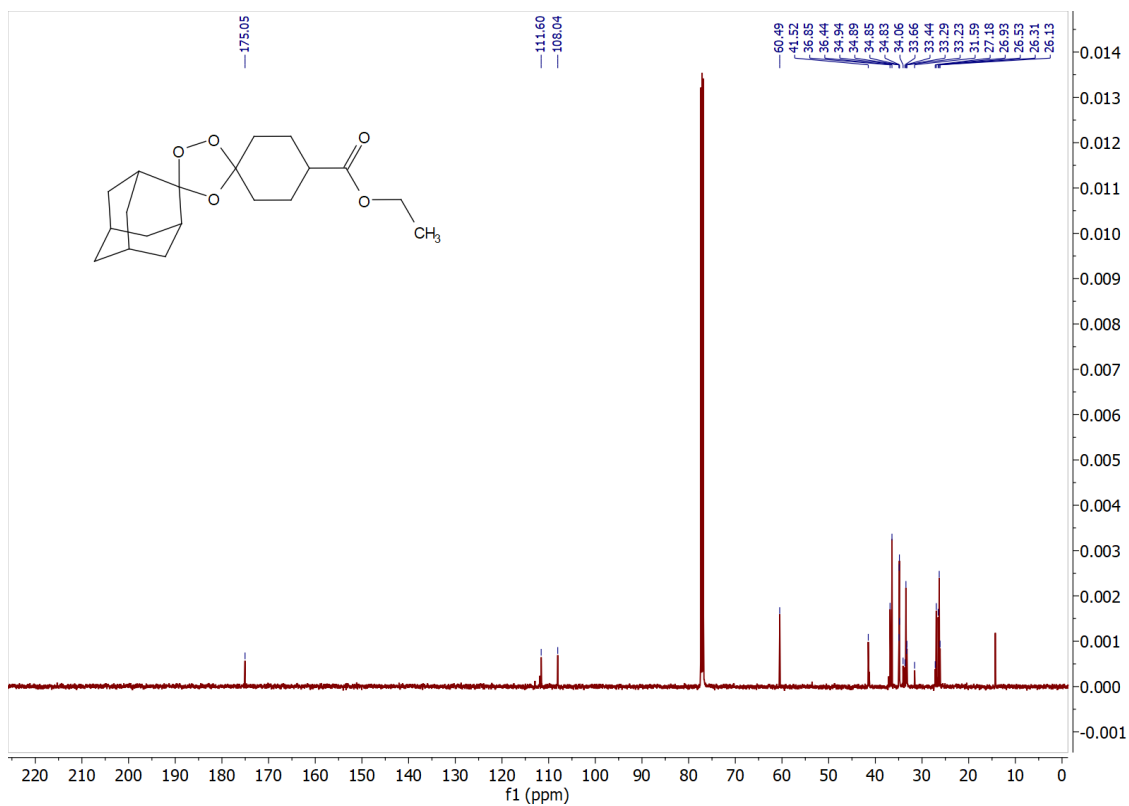


Figura VII-2 – Espetro <sup>13</sup>C-RMN do composto AS1 em CDCl<sub>3</sub>-d.

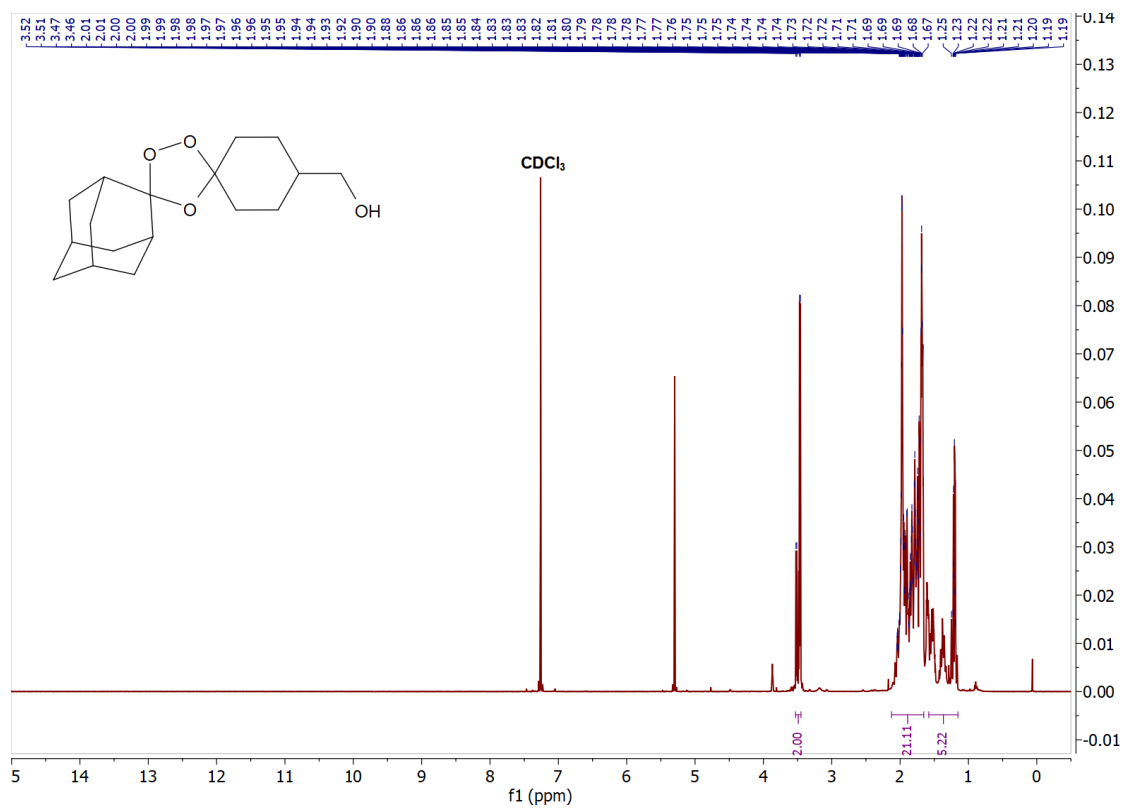


Figura VII-3 – Espetro <sup>1</sup>H-RMN do composto AS2 em CDCl<sub>3</sub>-d.

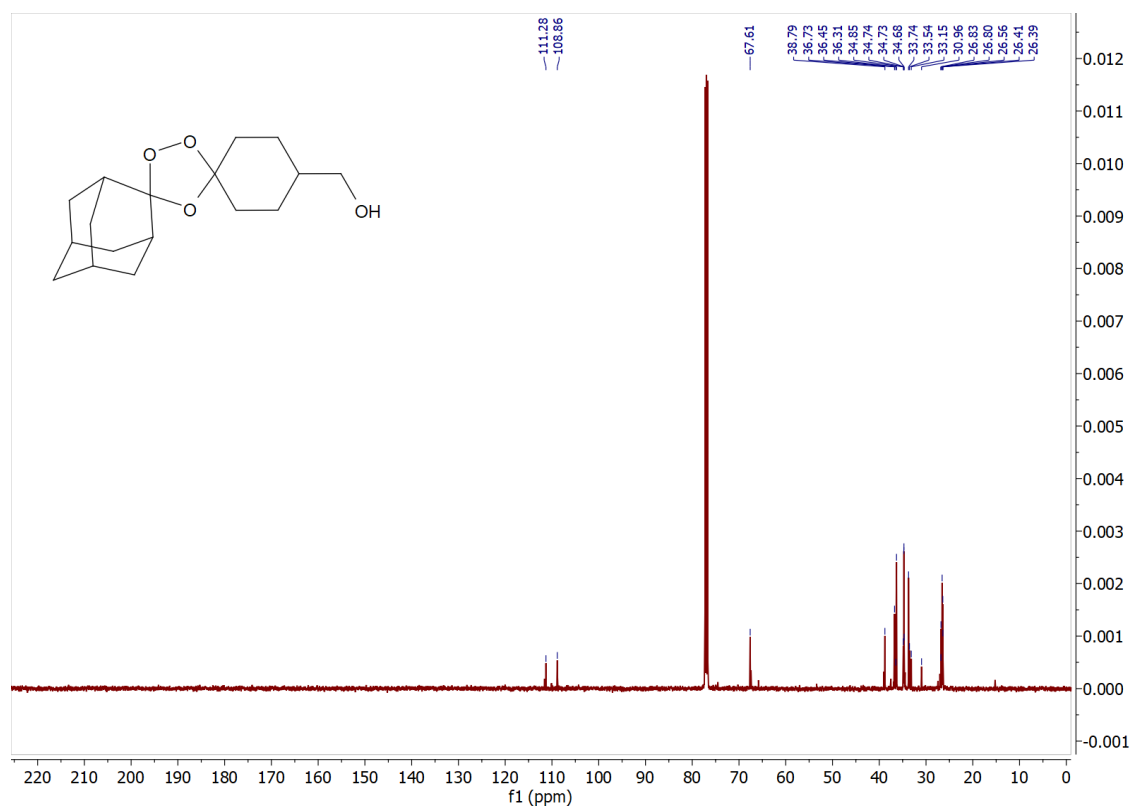


Figura VII-4 – Espetro <sup>13</sup>C-RMN do composto AS2 em CDCl<sub>3</sub>-d.

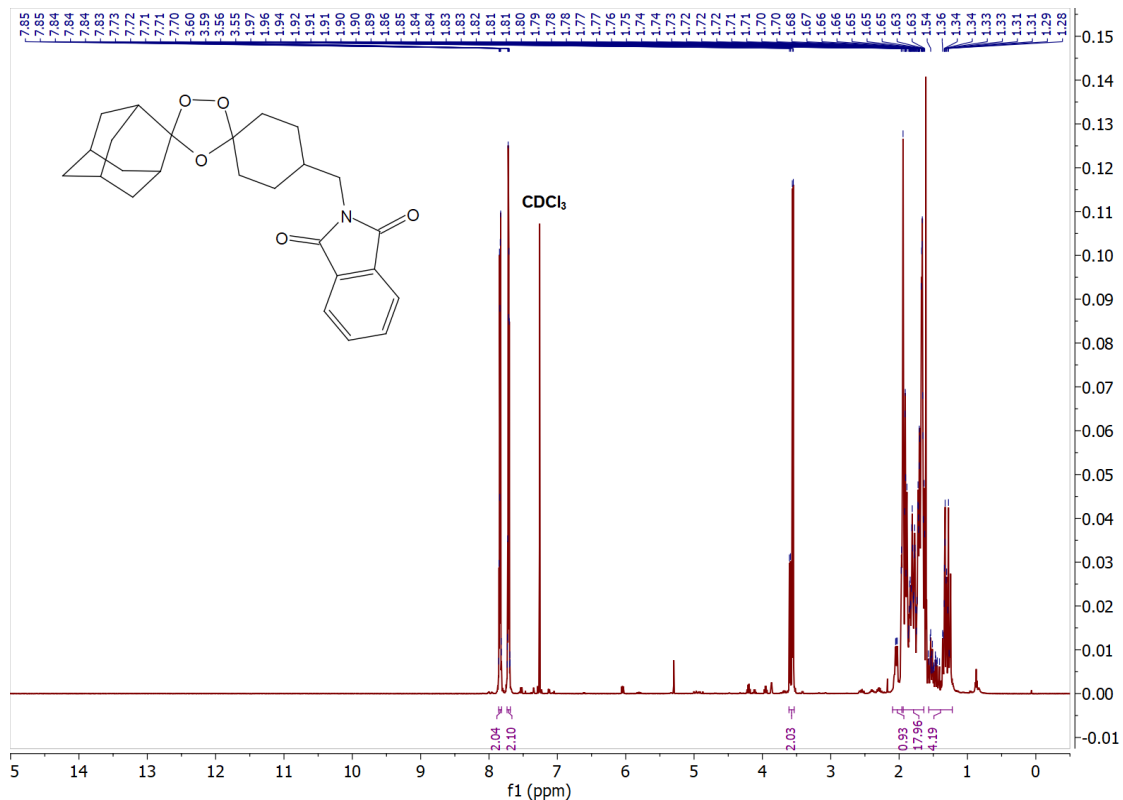


Figura VII-5 – Espetro  $^1\text{H}$ -RMN do composto AS3 em  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ .

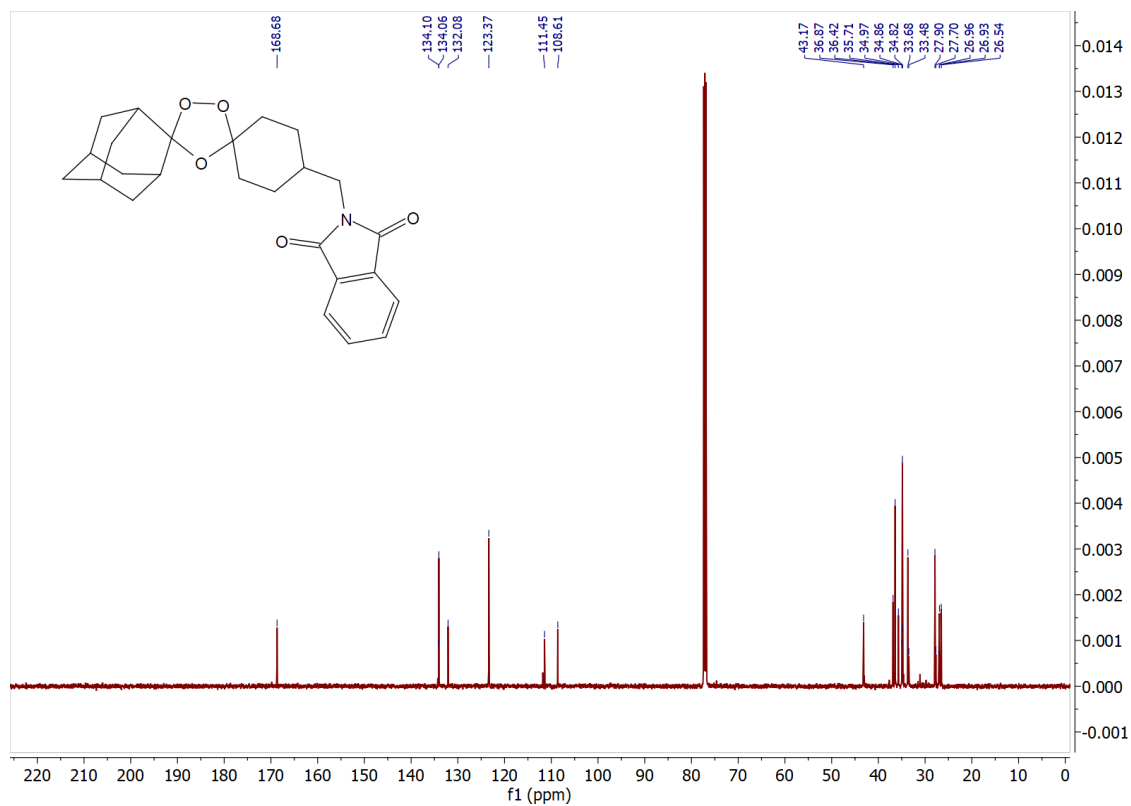


Figura VII-6 – Espetro  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto AS3 em  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ .

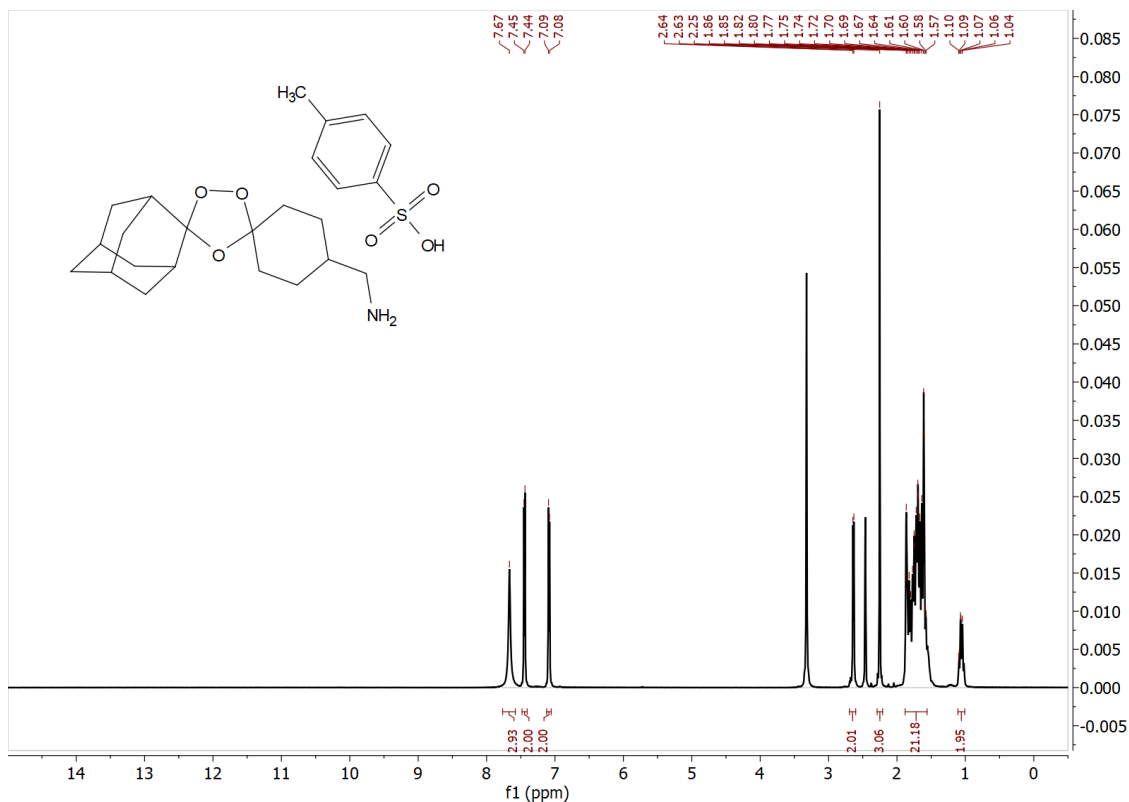


Figura VII-7 – Espectro <sup>1</sup>H-RMN do composto AS4 em DMSO-d<sub>6</sub>.

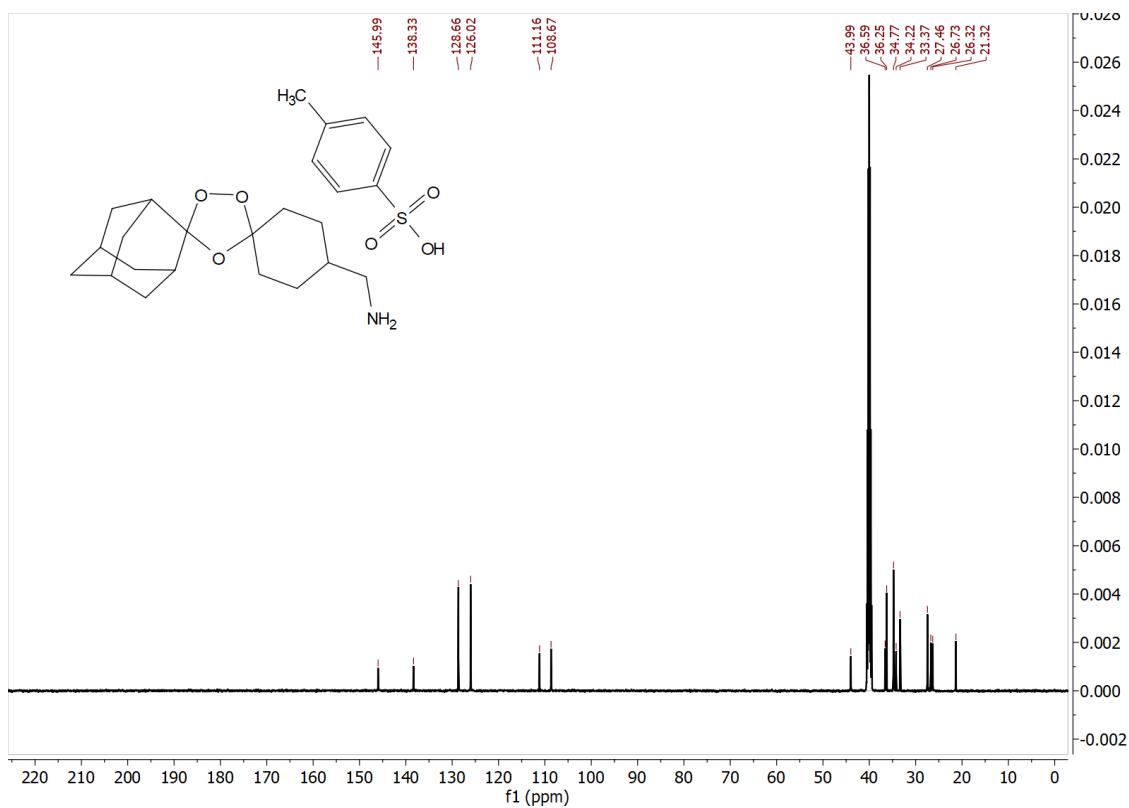


Figura VII-8 – Espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto AS4 em DMSO-d<sub>6</sub>.

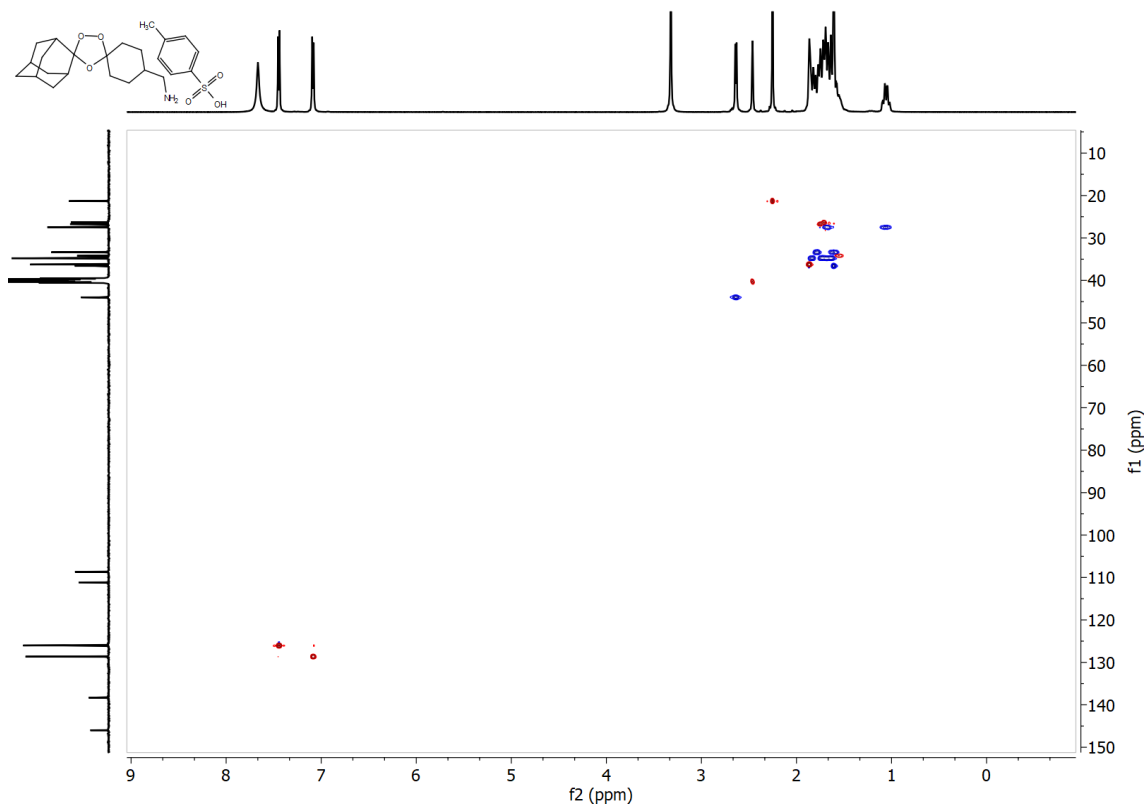


Figura VII-9 – Espectro HSQC do composto AS4 em D<sub>2</sub>O-d<sub>2</sub>.

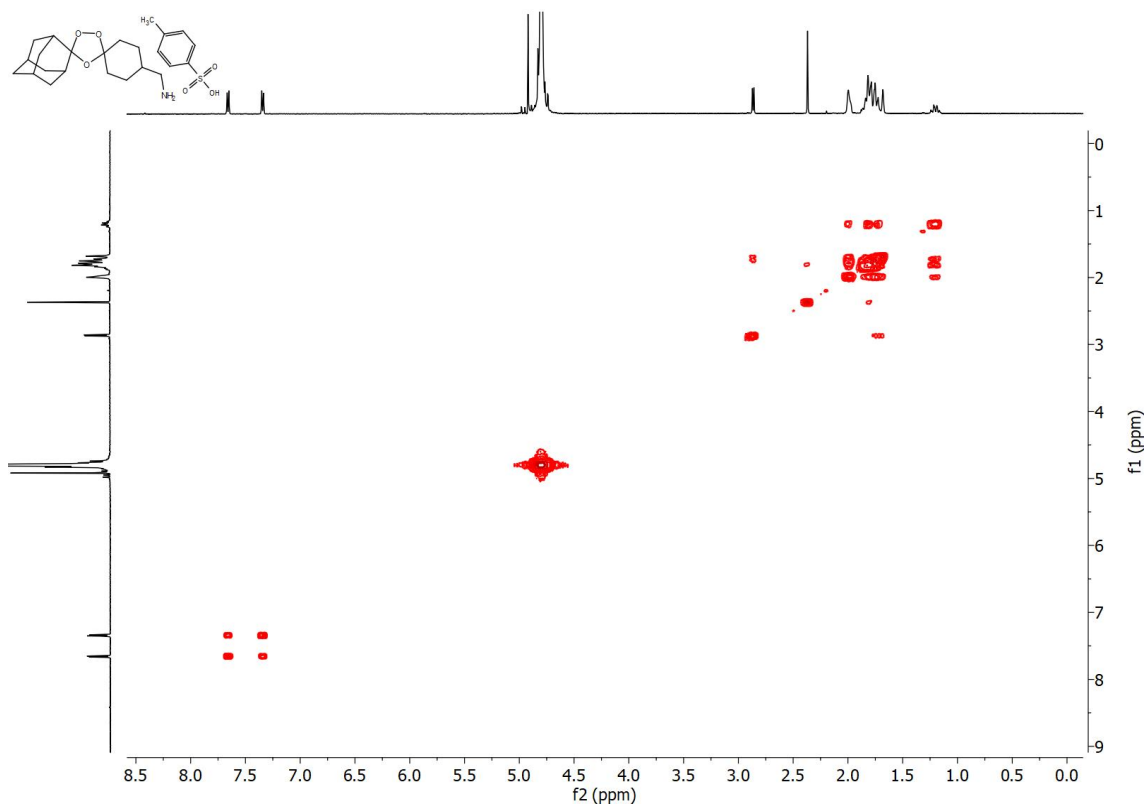


Figura VII-10 – Espectro COSY do composto AS4 em D<sub>2</sub>O-d<sub>2</sub>.

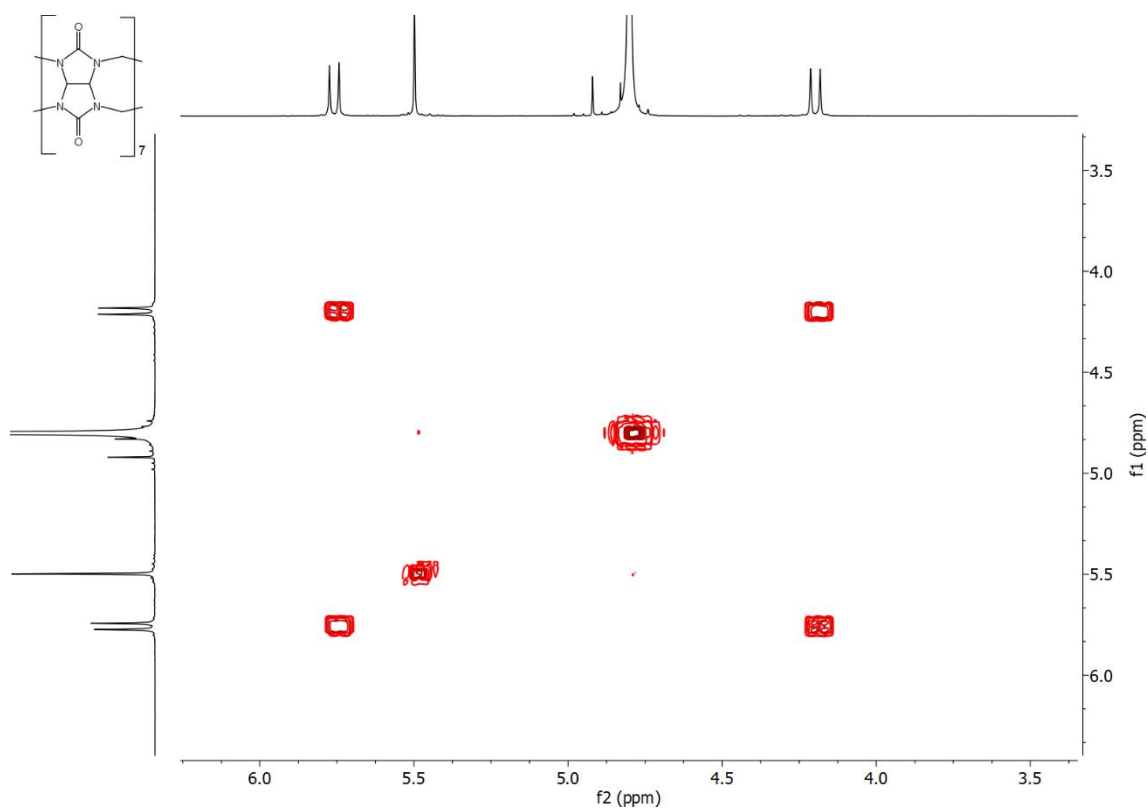


Figura VII-11 – Espetro COSY do CB[7] em D<sub>2</sub>O-d<sub>2</sub>.

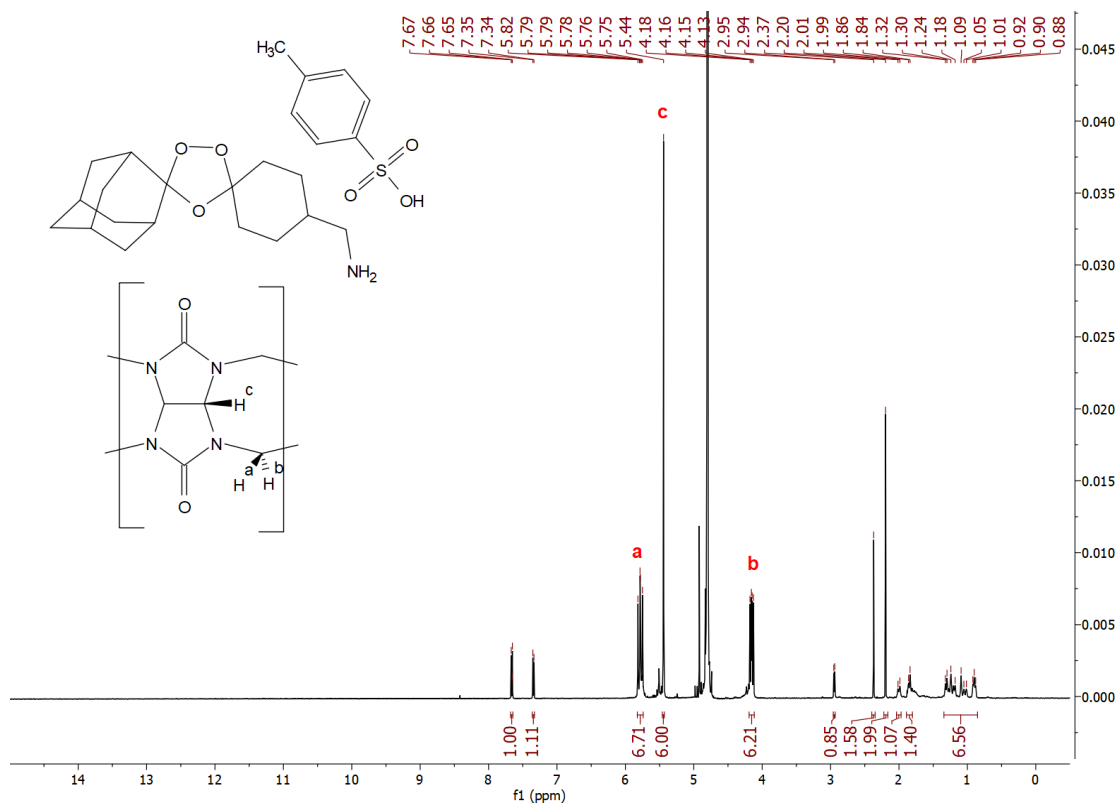
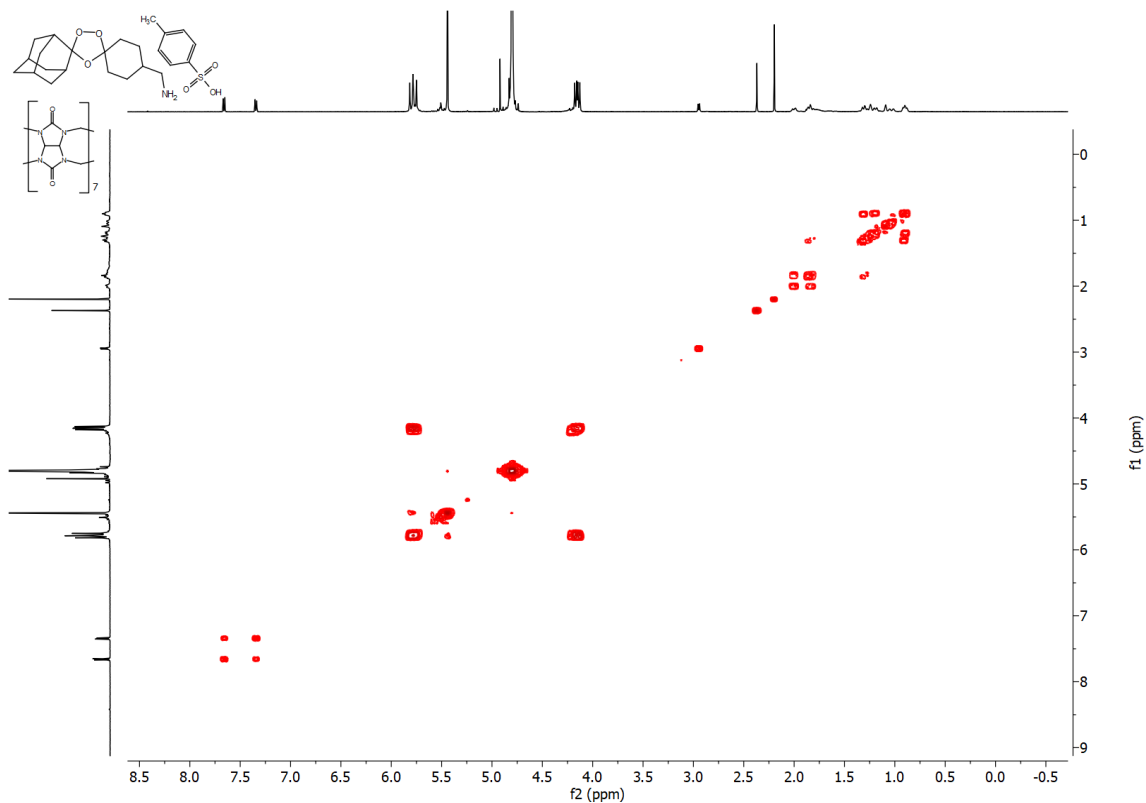
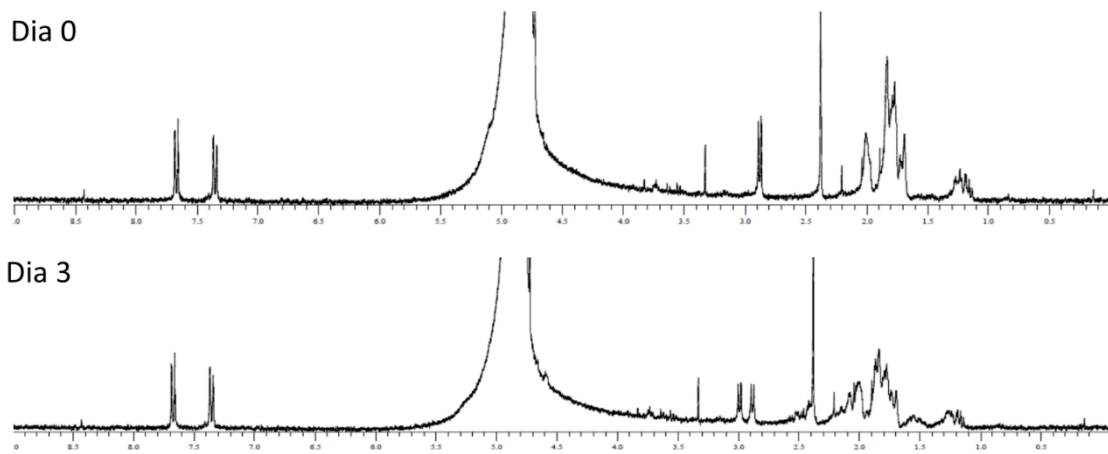


Figura VII-12 – Espetro <sup>1</sup>H-RMN da mistura do composto AS4 com o CB[7] em D<sub>2</sub>O-d<sub>2</sub>.



**Figura VII-13** – Espetro COSY da mistura do composto AS4 com o CB[7] em D<sub>2</sub>O-d<sub>2</sub>.



**Figura VII-14** – Espetros RMN que demonstram uma degradação do composto AS4 após solubilização deste em água, aparecendo novos picos após 3 dias.