



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Faculdade de Ciências

**Novos derivados espiroindolin-3-ona(tio)
barbituratos com potencial atividade
antimalárica.**

Domingos Morais Manuel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Medicinal

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida

Co-orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

Covilhã, junho de 2018

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros dos gigantes”

Sir Isaac Newton

Dedicatória

À minha família, que soube suportar a minha ausência, minha querida esposa e meus lindos filhos, a vocês dedico este trabalho!

Ao Professor Doutor Paulo Jorge Silva Almeida, orientador deste trabalho de dissertação

Ao Professor Doutor Samuel Martins Silvestre, co-orientador, deste trabalho de dissertação.

À minha mãe pelos sábios conselhos em todos os momentos!

Ao meu pai (*in memoriam*), meus irmãos e sobrinhos no cômputo geral.

Foi uma longa jornada! A vós com muito amor tenho a honra de dedicar este trabalho

Agradecimentos

Endereço primeiramente meus mais profundos agradecimentos a Deus, Soberano Criador e Mantenedor de todas as coisas, por ter-nos guiado e protegido ao longo da jornada e por permitir o alcance do objetivo preconizado.

Ao Professor Doutor Paulo Jorge Silva Almeida, orientador deste trabalho pelos momentos agradáveis, pela simpatia e boa disposição que lhe são característico, por não ter poupado esforço durante todo o processo de síntese química, pelos tão válidos ensinamentos e incentivos; os meus agradecimentos são extensivos ao Professor Doutor Samuel Silvestre co-orientador deste trabalho, pelo apoio e sempre válidas sugestões dadas pela sua pessoa a quando das reuniões periódicas que o grupo teve, ao Professor Doutor Renato Boto pelas ajudas prestadas no RMN, ao Mestre João Serrano e a Mestre Joana Figueiredo por todo apoio durante a realização laboratorial e não só, ao Pedro e a Melani, companheiros de laboratório de Síntese Química e pela ajuda nos momentos oportunos!

A Universidade de Liverpool no geral e em particular ao Professor Doutor Paul M. O'Neill por ter aceite de bom grado a missão de avaliar a atividade antimalárica de uma série representativa da família de compostos sintetizados pertencente a classe das espiroindolin-3-onas.

Ao Instituto Nacional de Gestão de Bolsas de Estudo da República de Angola pelo apoio financeiro sem o qual não seria possível a conclusão deste trabalho.

Ao Instituto Superior de Ciências da Educação da Huíla, ISCED-Huíla pelo apoio durante todo o processo tendente a formalização da bolsa de estudos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram com que este trabalho chegasse a ser consumado, a vós meus mais profundos sentimentos de gratidão.

Resumo

A malária, doença causada por protozoários do género *Plasmodium*, é um grande problema de saúde pública para as chamadas nações do terceiro mundo, sendo uma das suas principais causas de morte. Existem mais de cento e cinquenta espécies de parasitas deste género, mas apenas cinco têm sido as responsáveis por esta doença em humanos, das quais se destacam, o *Plasmodium falciparum*, o *Plasmodium vivax*, o *Plasmodium malariae*, o *Plasmodium ovale* e o *Plasmodium knowlesi*. A malária é transmitida pelo mosquito fêmea do género *Anopheles*, tendo sido usados diversos tipos de estratégias para o combate deste mal, muitas delas ainda em uso, que incluem a eliminação do vetor, a farmacoterapia e a vacinação. No que concerne à farmacoterapia, têm sido usados ao longo dos anos vários fármacos, entre os quais os pertencentes à família das aminoquinolinas e dos aminoálcoois, os antibióticos e mais recentemente os endoperóxidos, dos quais se destacam a artemisinina e seus derivados.

Recentemente, uma série de novos estudos revelaram que espiroindolin-2-onas possuem potente atividade antiplasmódica, atuando na fase sanguínea do ciclo de vida do parasita. Motivados por estes resultados, e a partir de uma nova via sintética conducente a novos espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos, iniciou-se o presente trabalho aqui descrito pela triagem *in silico* via *docking* molecular de uma série representativa de novas espiroindolin-3-onas e respetivos derivados obtidos por substituição eletrofílica aromática, com a proteína falcipaina-2, responsável pela degradação da hemoglobina no vacúolo alimentar do parasita. Estes resultados revelaram que a maioria dos compostos testados possui a capacidade de efetuar interações por ponte de hidrogénio com os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo da falcipaina-2, isto é, a Cys42, a Gly83, a His174 e a Asn173.

No seguimento desta primeira avaliação *in silico*, realizou-se a síntese e caracterização estrutural de uma série alargada de espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos e seus derivados, a avaliação *in silico* mais completa incluindo *docking* molecular na proteína falcipaina-2 e a previsão de propriedades ADMET, e ainda a avaliação biológica *in vitro* em células NHDF para verificar a citotoxicidade dos compostos sintetizados. A partir dos estudos da atividade antiplasmódica a decorrer em colaboração, aguardam-se os resultados de forma a confirmar a potencialidade efetiva destes novos compostos como agentes antimaláricos. Adicionalmente avaliou-se enzimaticamente a capacidade destes mesmos compostos de inibirem a atividade da xantina oxidase.

Os resultados da avaliação *in silico* mostraram que os derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos possuem grande potencial de ligação à proteína falcipaina-2 podendo efetuar ligações de hidrogénio com o resíduo de Cys42 do sítio ativo. Adicionalmente, os ensaios *in vitro* em células NHDF revelaram que os mesmos não apresentam uma citotoxicidade marcada nestas células normais. Por outro lado, o ensaio enzimático mostrou resultados bastante promissores: de facto, num *screening* a 30 µM, observou-se que dois

derivados espiroindolin-3-ona barbituratos apresentaram capacidades inibitórias superiores às observadas com o alopurinol, o que foi posteriormente confirmado por estudos de concentração-resposta.

Palavras-chave

Espiroindolin-3-ona(tio)barbituratos; síntese e caracterização estrutural; *P. falciparum*; falcipaina-2; *docking* molecular; atividade antimalárica; citotoxicidade; inibição da atividade da xantina oxidase.

Abstract

Malaria, a disease caused by the protozoan of the genus *Plasmodium*, is a major public health problem for the so-called Third World nations, one of its main causes of death. There are over one hundred and fifty species of parasites of this genus, but only five have been responsible for this disease in humans, such as *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium knowlesi*. Malaria is transmitted by the female mosquito of the *Anopheles* genus, and different types of strategies have been used to combat this disease, many of which are still in use, including vector elimination, pharmacotherapy and vaccination. About pharmacotherapy, several drugs have been used over the years, among them those belonging to the family of aminoquinolines and aminoalcohols, antibiotics and more recently endoperoxides, of which artemisinin and its derivatives are outstanding.

Recently, several new studies have shown that spiroindolin-2-ones have potent antiplasmodic activity, acting on the blood phase of the parasite's life cycle. Motivated by these results and starting from a new synthetic pathway leading to new spiroindolin-3-one(thio)barbiturates, the work described here started by *in silico screening* via molecular docking of a representative series of new spiroindolin-3-ones and their derivatives obtained by electrophilic aromatic substitution, with the protein *falcipain-2*, responsible for the degradation of hemoglobin in the alimentary vacuole of the parasite. These results revealed that most of the compounds tested have the ability to effect hydrogen bond interactions with the major amino acid residues of the active site of *falcipain-2*, i.e., Cys42, Gly83, His174 and Asn173.

Following the first *in silico* evaluation, the synthesis and structural characterization of a broad series of spiroindolin-3-one(thio)barbiturates and their derivatives was carried out, the total *in silico* evaluation including molecular docking in the protein *falcipain-2* and the prediction of the ADMET properties, as well as the *in vitro* biological evaluation in NHDF cells to check the cytotoxicity of the synthesized compounds. From the studies of the antiplasmodic activity in collaboration, the results are awaited in order to confirm the effective potential of these new compounds as antimalarial agents. Additionally, the ability of these same compounds to inhibit xanthine oxidase was evaluated.

The results of the *in silico* evaluation show that the spiroindolin-3-one(thio)barbiturate derivatives have high potential to bind the *falcipain-2* protein having the ability to effect hydrogen bonds with the active site cys42 residue. In addition, *in vitro* assays in NHDF cells have shown that they do not have a significant cytotoxic effect on these normal cells.

On the other hand, the enzymatic assay showed very promising results, in fact, in a *screening* at 30 μM , it was observed that two spiroindolin-3-one barbiturates derivatives showed higher inhibitory capacities than those observed with allopurinol, which was later confirmed by concentration-response studies.

Keywords

Spiroindolin-3-one(thio)barbiturates; synthesis and structural characterization; *P. falciparum*; falcipain-2; molecular docking; antimalarial activity; cytotoxicity; inhibition of xanthine oxidase activity.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	A Malária	2
1.1.1.	Epidemiologia da malária no mundo	2
1.1.2.	Agente causador da malária	3
1.1.3.	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	4
1.1.4.	Controlo da doença	5
1.1.5.	Tratamento	5
1.2.	Problemática de resistência aos fármacos	7
1.3.	Processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos	8
1.3.1.	Modelos <i>in silico</i> - <i>Docking</i> molecular	9
1.3.2.	Principais alvos moleculares na descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos	10
1.3.3.	Novas abordagens terapêuticas para o combate à malária	11
1.3.3.1.	Endoperóxidos	11
1.3.3.1.1.	Artemisinina e seus derivados	12
1.3.3.2.	Compostos da família espirociclos	15
1.3.3.2.1.	Espiro(tio)barbituratos	15
1.3.3.2.2.	Espiroindolin-2-onas	19
1.4.	Objetivos do trabalho	22
2.	Resultados e discussão	23
2.1.	Estudos <i>in silico</i>	25
2.1.1.	<i>Docking</i> molecular	25
2.1.2.	Predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes pelo pkCSM online	30
2.2.	Síntese	35
2.2.1.	Precusores	35
2.2.1.1.	2-Nitrobenzilideno 3.	35
2.2.1.2.	Benzisoxazole 4	38
2.2.1.3.	Espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato 5	39
2.2.2.	Derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos 6-9	41

2.2.2.1.	Espiroindolin-3-ona barbiturato 6	42
2.2.2.2.	Derivados halogenados 7 e 8.	43
2.2.2.3.	Derivados <i>N-acilados</i> 9	47
2.3.	Avaliação biológica	52
2.3.1.	Citotoxicidade.....	52
2.3.2.	Determinação <i>in vitro</i> da atividade inibitória da Xantina Oxidase	55
2.3.3.	Atividade antimalárica	59
2.3.4.	REA	59
3.	Conclusões e perspectivas futuras	61
4.	Parte experimental.....	64
4.1.	Síntese.....	65
4.1.1.	Reagentes e equipamento	65
4.1.2.	Procedimento experimental.....	66
4.2.	Estudos <i>in silico</i>	72
4.2.1.	<i>Docking</i> molecular	72
4.2.2.	Predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes.....	72
4.3.	Avaliação biológica	72
4.3.1.	Citotoxicidade.....	73
4.3.2.	Determinação <i>in vitro</i> da atividade inibitória da Xantina Oxidase	74
4.3.3.	Tratamento estatístico	75
5.	Referências bibliográficas.....	76
6.	Publicações no âmbito desta dissertação	85
	Comunicações em painel	86
	Comunicação oral.....	86
7.	Anexos	87
	Anexo 1- Estruturas dos ligandos submetidos a docking molecular	88
	Anexo 2 - Resultados do docking molecular.....	89
	Anexo 3 - Resultados adicionais sobre os ensaios biológicos.....	91
	Anexo 4 - Resumo da comunicação em forma de painel apresentada no âmbito desta dissertação.....	92
	Anexo 5 - Resumo da comunicação em forma de painel apresentada no âmbito desta dissertação.....	93
	Anexo 6 - Resumo da comunicação oral apresentada no âmbito desta dissertação	94

Lista de figuras

Figura 1.1 - Ciclo de vida do <i>P. falciparum</i> (adaptado de ⁵).	5
Figura 1.2 - Algoritmo típico para o docking molecular, com os passos chaves comuns para todos os protocolos (adaptado de ¹⁷).	10
Figura 1.3 - Ligação peroxídica em agentes antimaláricos naturais e sintéticos (adaptado de ³⁴).	12
Figura 1.4 - Mecanismo de ação da ART(adaptado de ⁶).	13
Figura 1.5 - Estruturas de alguns endoperóxidos com potencial atividade antiplasmodica (adaptado de ⁴¹).	15
Figura 1.6 - Compostos biologicamente ativos com o grupo barbitúrico em sua constituição ⁵²	16
Figura 1.7 - Classificação dos espiro(tio)barbituratos de acordo ao tipo de anéis.	16
Figura 1.8 - Exemplos de alguns produtos naturais e compostos farmacêuticos importantes contendo o núcleo espiroindolinona ⁶²	20
Figura 2.1 - Estrutura 3D da PF-2 co-cristalizada com o ligando endógeno E64. (A) Domínio tetramérico, (B) domínio monomérico (https://www.rcsb.org/structure/3BPF).	29
Figura 2.2 - Ligando L57 no sítio ativo da PF-2 (A e B); Interações entre o L57 e os aminoácidos do sítio ativo da PF-2 (C e D).	30
Figura 2.3 - Inibidores da XO usados clinicamente: alopurinol (A), febuxostat (B) e o recentemente aprovado topiroxostat (C).	56
Figura 2.4 - Estrutura geral dos derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos.	59
Figura 7.0.1 - Estrutura dos ligandos submetidos a docking molecular.	88

Lista de esquemas

Esquema 1.1- Representação esquemática do mecanismo de bioativação e ação da ART e derivados mediante a formação de radicais primários e secundários centrados em carbono, após clivagem reductiva mediada pelo Heme-Fe(II) (adaptado de ^{6,39,40}).....	14
Esquema 1.2 - Síntese de espiropirazolobarbituratos através da condensação de um arilideno e uma nitrilamina ⁵⁴	17
Esquema 1.3 - Síntese de espiropirazolobarbituratos através da condensação de um arilideno e uma nitrilamina ⁵¹	18
Esquema 1.4 - Síntese de dispiroxindóis através de uma reação multicomponente de cicloadição 1,3-dipolar ⁵⁵	18
Esquema 1.5- Síntese de dispiroxindóis através de uma reação multicomponente de cicloadição 1,3-dipolar ⁵⁶	19
Esquema 1.6 - Síntese da salacina através de uma reação intramolecular de Mannich ⁶⁸	21
Esquema 1.7- Síntese da horsfilina realizada por Pellegrini et al ⁶⁹	21
Esquema 1.8- Síntese da espirotriptostatina B através da reação de Mannich levada a cabo por Danishefsky ⁷⁰	21
Esquema 1.9 - Ciclização com formação do espiro promovida por catalisadores a base de paládio ⁶²	22
Esquema 2.1- Síntese do 2-nitrobenzilideno.	36
Esquema 2.2- Síntese do benzisoxazole 4.	38
Esquema 2.3- Síntese do espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato 5.	39
Esquema 2.4- Rotas sintéticas para os derivados espiroindolin-3-ona (tio) barbituratos 6-9. 41	
Esquema 2.5- Síntese do derivado espiroindolin-3-ona barbiturato 6.....	42
Esquema 2.6 - Mecanismo reacional para a conversão do grupo tio carbonilo a carbonilo (adaptado de ⁸⁰).	43
Esquema 2.7- Síntese dos derivados halogenados.....	44
Esquema 2.8 - Mecanismo de formação dos derivados mono- e di-halogenados.	47
Esquema 2.9 - Síntese dos derivados N-acilados 9a-c.	47
Esquema 2.10 - Mecanismo para a formação dos derivados N-acilados (adaptado de ⁸²).	52
Esquema 2.11 - Redução do MTT ao produto púrpura (formazano) pela enzima redutase mitocondrial.	53
Esquema 2.12- Diagrama esquemático da hidroxilação oxidativa da hipoxantina a xantina e da xantina ao ácido úrico catalisada pela XO e formação de espécies reativas de oxigénio (adaptado de ⁸⁴⁻⁸⁵).	55

Lista de gráficos

Gráfico 1.1- Principais regiões afetadas pela malária no mundo (adaptado de ²).	3
Gráfico 2.1 - Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF após 72 horas de exposição aos compostos 5-Fu, 7a , 6 , 7b , 9a , 8 , 9b e 9c a uma concentração de 30 μM . Os dados são apresentados na forma de valores médios com os respectivos desvios padrão e são representativos de pelo menos 2 experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo negativo (Teste t de Student).	53
Gráfico 2.2- Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF após 72 horas de exposição aos compostos 5-fu e 9a a várias concentrações, nomeadamente 0,1; 1, 10; 30 e 50 μM para determinação do IC_{50} . os dados são apresentados com os respectivos desvios padrão representativos das experiências independentes realizadas. * $P < 0.05$ em relação ao controlo (Teste t de Student).	54
Gráfico 2.3 - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm, com respetiva equação da reta e r^2	57
Gráfico 2.4 - Percentagem de inibição da XO em relação ao controlo positivo (alopurinol) dos compostos 7a ; 6 ; 7b ; 9a ; 8 ; 9b e 9c . a uma concentração de 30 μM . Os dados são apresentados na forma de média com os respectivos desvios padrão e são representativos das experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste t de Student).	57
Gráfico 2.5 - Percentagem de inibição da enzima XO em função do tempo de reação para o alopurinol e os compostos 7a , 7b e 8 a uma concentração de 30 μM	58

Lista de tabelas

Tabela 2.1- - Energias e interações dos 10 melhores ligandos pelo AutodockTools (58 no total), E64 (ligando endógeno) e o NITD609 ³²	26
Tabela 2.2- Dados computacionais calculados para alguns ligandos (descritores das regras de Lipinski e parâmetros de Veber, determinados através do software pkSCM).	32
Tabela 2.3- Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos vários modelos do software pkCSM on-line para os ligandos.	33
Tabela 2.4- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento do 2-nitrobenzilideno 3.	36
Tabela 2.5 - Dados de RMN de ¹ H para o intermediário 3.	37
Tabela 2.6 - Dados de RMN de ¹³ C para o intermediário 3.	37
Tabela 2.7- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento do intermediário benzisoxazole 4.	38
Tabela 2.8 - Dados de RMN de ¹ H para o intermediário 4.	39
Tabela 2.9 - Dados de RMN de ¹³ C para o intermediário 4.	39
Tabela 2.10- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento do espiroindoline-3-ona (tio)barbiturato 5.	40
Tabela 2.11 - Dados de RMN de ¹ H para o intermediário 5.	40
Tabela 2.12 - Dados de RMN de ¹³ C da zona aromática do intermediário 5.	40
Tabela 2.13 - Dados de RMN de C da zona não aromática do intermediário 5.	40
Tabela 2.14 - Resultados do processo de síntese dos derivados da espiroindolin-3-ona (tio) barbituratos.	41
Tabela 2.15- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para o composto 6.	42
Tabela 2.16 - Dados de RMN de ¹ H para a zona aromática do composto 6.	42
Tabela 2.17- Dados de RMN de ¹³ C para a zona aromática do composto 6.	43
Tabela 2.18 - Dados de RMN de ¹³ C para a zona não aromática do composto 6.	43
Tabela 2.19- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento dos derivados halogenados.	45
Tabela 2.20 - Dados de RMN de ¹ H para os derivados halogenados.	45
Tabela 2.21 - Dados RMN de ¹³ C para a zona aromática dos derivados halogenados.	45
Tabela 2.22 - Dados RMN de ¹³ C da zona não aromática dos derivados halogenados.	46
Tabela 2.23 - Resumo da síntese dos derivados halogenados	46
Tabela 2.24 - Resumo da síntese dos derivados N-acilados 9a-c.	48
Tabela 2.25- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento dos derivados N-acilados 9a-c.	49
Tabela 2.26 - Dados de RMN de ¹ H da zona alifática dos <i>derivados N-acilados 9a-c</i>	50
Tabela 2.27 - Dados de RMN de ¹ H da zona aromática dos derivados N-acilados 9a-c.	50
Tabela 2.28 - Dados de RMN de ¹³ C da zona aromática dos derivados N-acilados 9a-c.	51

Tabela 2.29 - Dados de RMN de ^{13}C da zona não aromática dos <i>derivados N-acilados 9a-c</i>	51
Tabela 2.30 - Dados dos IC_{50} determinados experimentalmente relativo a atividade antiproliferativa para o 5-fluorocilostato e o derivado espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato 9a ...	54
Tabela 2.31 - Dados dos IC_{50} determinados experimentalmente para a inibição da enzima XO para o alopurinol e os derivados espiroindolin-3-ona barbituratos 7a , 7b e 8	59
Tabela 7.0.1 - Resultados gerais do docking molecular.	89
Tabela 7.2 - Resultados globais dos ensaios biológicos.....	91

Lista de quadros

Quadro 1.1- Principais fármacos existentes no mercado para o tratamento da malária (adaptado de ^{6,7}).....	6
Quadro 1.2 - Principais alvos moleculares para agentes antimaláricos ²⁹	11

Lista de Acrónimos, abreviaturas e símbolos

ACT	Terapias de Combinação Baseada na Artemisinina, do inglês <i>Artemisinin-based Combination Therapy</i>
AB	antibiótico/antimicótico
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade, do inglês <i>Absorption Distribution Metabolism Excretion and Toxicity</i>
ART	Artemisinina
Asn	asparagina, do inglês <i>asparagine</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
CADD	Desenho de Fármacos Assistido por Computador, do inglês <i>Computer-Assisted Drug Design</i>
ccf	cromatografia em camada fina
Cys	cisteína, do inglês <i>cysteine</i>
d	Dupleto
dd	duplo dupleto
ddd	duplo, duplo dupleto
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEPT	Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização, do inglês <i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DHA	Dihidroartemisinina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	dimetilsulfoxido hexadeuterado
dt	duplo triplete
FBS	Soro Fetal Bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FTIR	Espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
Gly	glicina, do inglês <i>glycine</i>
HCl	ácido clorídrico
His	histidina, do inglês <i>histidine</i>
HMBC	Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações, do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	Correlação Heteronuclear a Uma Ligação, do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para metade da atividade máxima - do inglês, <i>half maximal inhibitory concentration</i>

logP	logaritmo do coeficiente de partilha
m	Multiplete
MCR	Reação com Vários Componentes, do inglês <i>Multi Component Reaction</i>
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
η	Rendimento
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido, do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NCE	Nova Entidade Química, do inglês <i>New Chemical Entity</i>
NHDF	Fibroblastos da Derme Humana Normais, do inglês <i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i>
NTDs	Doenças Tropicais Negligenciadas, do inglês <i>Neglected Tropical Diseases</i>
OCT2	Transportador de Cátions Orgânicos 2, do inglês <i>Organic Cation Transporter 2</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Banco de Dados de Proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PF-2	Proteína Falcipaina-2
PfATP4	<i>Plasmodium falciparum</i> ATP4
PfATP6	<i>Plasmodium falciparum</i> ATP6
pH	potencial de hidrogénio
pkCSM	do inglês <i>predicting Small-Molecule Pharmacokinetic</i>
ppm	partes por milhão
REA	Relação Estrutura Atividade
RMN - ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN- ¹ H	Ressonância magnética nuclear de ¹ H
RMSD	Desvio Médio Quadrático, do inglês <i>Root Mean Square Deviation</i>
ROS	do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Singuleto
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em Camada Fina, do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>
XO	Xantina Oxidase, do inglês <i>Xanthine Oxidase</i>
δ	desvio químico em ressonância magnética nuclear
5-Fu	5-fluorouracilo

1. Introdução

O presente capítulo visa efetuar uma abordagem sobre a malária, causas e consequências, bem como os esforços que têm sido levados a cabo para a erradicação desta endemia que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo responsável anualmente por milhões de mortes. Assim, far-se-á uma incursão sobre o processo de descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos, sendo igualmente dada atenção às novas abordagens terapêuticas emergentes para o combate à malária, tais como o uso de ART (artemisinina) e seus derivados (ACT, do inglês *Artemisinin-based Combination Therapy*), endoperóxidos sintéticos, dos quais destacam-se os 1,2,4-trioxalanos e os 1,2,4,5-tetraoxanos que são análogos sintéticos da ART. Terminar-se-á abordando o papel das espiroindolin-2-onas como compostos com potencial atividade antimalárica.

1.1. A Malária

A malária ainda é uma das mais terríveis doenças protozoárias que afetam o homem e faz parte das chamadas doenças tropicais negligenciadas - NTDs (do inglês, *Neglected Tropical Diseases*). Recentemente, a malária tinha uma propagação de ordem mundial. No entanto, a doença ocorre principalmente nos países tropicais do mundo (gráfico 1.1), sendo a mesma responsável por mais de seis milhões de mortes por ano, constituindo um grande problema de saúde pública e da economia das nações tropicais, embora a maioria das pessoas afetadas pertencem aos chamados países do terceiro mundo¹. A malária foi erradicada dos países desenvolvidos como resultado do Programa de Erradicação da Malária da Organização Mundial de Saúde (OMS). Isto foi conseguido através da melhoria das condições de vida das populações, da utilização de inseticidas, criação de redes mosquiteiras e do uso de antimaláricos como agentes profiláticos. No entanto, esforços similares nos países em desenvolvimento não obtiveram bons resultados.

1.1.1. Epidemiologia da malária no mundo

Os casos de malária decaíram globalmente do estimado em 2000, cerca de 262 milhões para 214 milhões em 2015, um decréscimo na ordem dos 18%. O número de mortes por malária caiu globalmente do estimado, isto é, de 839.000 em 2000 para 438.000 em 2015, um declínio de 48%. A maior parte das mortes por malária em 2015 tiveram lugar nas regiões africanas (90%), seguida do Sudeste Asiático (7%) e da Região Leste do Mediterrâneo (2%). A taxa de morte por malária que está relacionada com o crescimento populacional, estima-se ter decrescido na ordem dos 37% entre 2000 e 2015. Dos 106 países nos quais tem havido casos de transmissão da malária, 57 sofreram em 2000 uma redução na ordem de >75%².

O número de mortes por malária em crianças com idade abaixo de 5 anos estima-se ter decrescido globalmente em 2000 de 723.000 para 306.000 em 2015. O grosso deste decréscimo ocorreu na Região Africana, onde o número estimado de mortes caiu de 694.000 em 2000 para 292.000 em 2015. Como resultado dos esforços levados a cabo, a malária não é

mais a principal causa de mortes de crianças na África Subariana, constituindo-se, em 2015 em quarto lugar, sendo responsável por 10% de mortes de crianças naquela região.

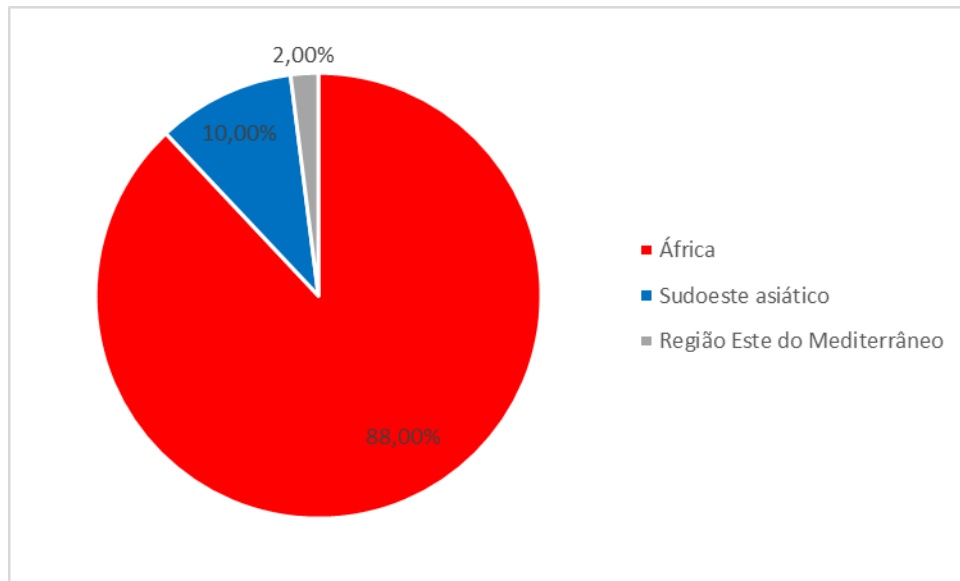


Gráfico 1.1- Principais regiões afetadas pela malária no mundo (adaptado de²).

Entretanto, apesar dos avanços conseguidos nos últimos anos, a malária ainda é um grave problema de saúde pública, portanto todo o esforço tendente a combater este mal, são de todo necessários e pertinentes.

1.1.2. Agente causador da malária

Os organismos responsáveis pela malária pertencem ao género *Plasmodium* que é uma classe de protozoários. Existem aproximadamente 156 espécies de *Plasmodium* que infetam várias espécies de vertebrados. Destas, cinco espécies são consideradas verdadeiros parasitas dos seres humanos, pois utilizam os humanos quase que exclusivamente como hospedeiro intermediário natural: nomeadamente *Plasmodium malariae*, o parasita da malária quartã; *Plasmodium vivax*, parasita da malária terçã benigna; *Plasmodium falciparum*, parasita da malária maligna ou subterçã; *Plasmodium ovale*, parasita que causa um tipo leve de malária terçã e o *Plasmodium knowlesi*, este último conhecido por infetar primatas³. A doença é transmitida quando um mosquito fêmea, do género *Anopheles* pica um indivíduo saudável, inoculando esporozoítos de *Plasmodium* na corrente sanguínea. As manifestações clínicas geralmente começam 8-25 dias após a infeção e incluem febre recorrente com calafrios, fadiga, vômitos, náuseas e dores de cabeça. Dos sintomas clássicos da malária, também conhecida como paroxismo, está a recorrência cíclica da febre a cada 36-48h.

Esses protozoários têm ciclos de vida complexos incorporando tanto o mosquito *Anopheles*, o fígado e os eritrócitos do hospedeiro humano. Desta forma, um antimalárico ideal deve ser capaz de ter efeito em duas frentes simultaneamente, a saber: erradicar o microzoário do sangue e também dos tecidos, a fim de produzir uma efetiva “cura radical”. Foi estabelecido,

que vários antimaláricos diferem essencialmente no seu ponto de interrupção do ciclo do parasita e, portanto, nos estágios de infecção ocorridos⁴.

1.1.3.Ciclo de vida do *Plasmodium*

A figura 1.1 mostra que o ciclo de vida do parasita da malária envolve dois hospedeiros. Durante uma refeição de sangue, um mosquito fêmea, do género *Anopheles* portador do parasita da malária, inocula esporozoítos no hospedeiro humano⁵ (1). Os esporozoítos infetam as células do fígado (2) e amadurecem nos esquizontes (3), que rompem e libertam os merozoítos (4). Em *P. vivax* e *P. ovale*, ocorre uma fase adormecida (hipnozoítos) que pode persistir no fígado e causar recaídas, invadindo dentro de semanas a corrente sanguínea, ou mesmo anos depois. Após esta replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica, A), os parasitas sofrem uma multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária, B). Os merozoítos infetam os glóbulos vermelhos (5), transformando-se em trofozoítos, os quais amadurecem nos esquizontes, que se rompem e libertam merozoítos diferenciados (6). Alguns parasitas diferenciam-se em fases eritrocíticas sexuais (gametócitos) (7). Os parasitas da fase sanguínea são os responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Os gametócitos machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos) são ingeridos por um mosquito fêmea *Anopheles* durante uma refeição de sangue (8). A multiplicação dos parasitas no mosquito é conhecida como ciclo esporogónico (C). Enquanto está no estômago do mosquito, os microgâmetas penetram nos macrogâmetas gerando zigotos (9). Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados (ocinetes) (10) que penetram nas células epiteliais do intestino médio, instalando-se. Posteriormente, transformam-se em oocistos, multiplicando-se estes por um processo de divisão assexuada (11). Os oocistos crescem, rompem e libertam esporozoítos (12), que migram até as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida da malária (1).

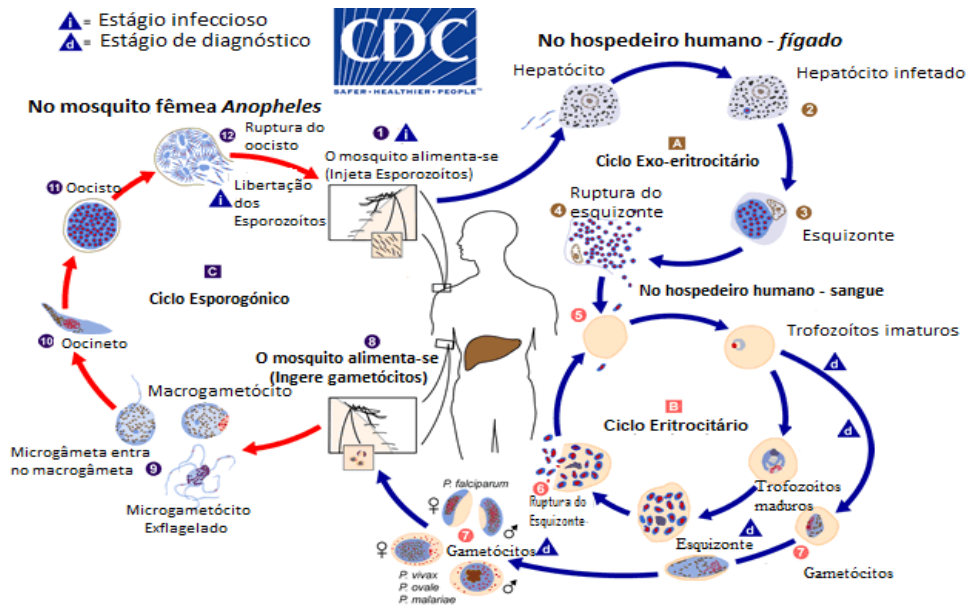


Figura 1.1 - Ciclo de vida do *P. falciparum* (adaptado de⁵).

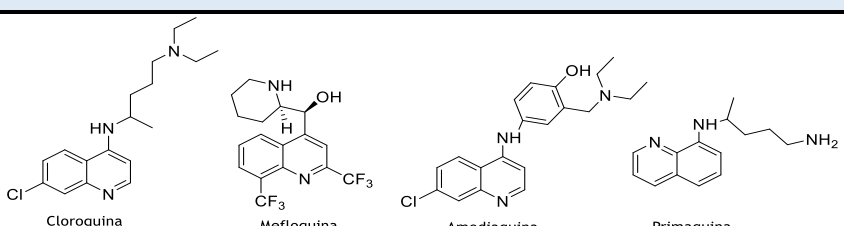
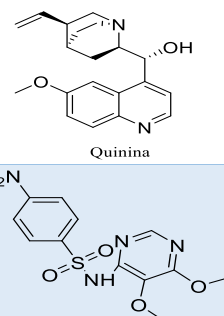
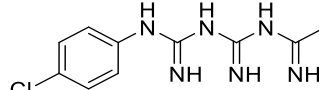
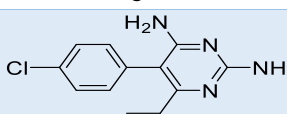
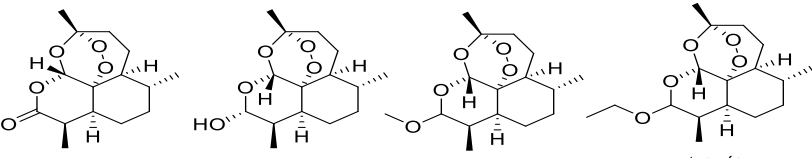
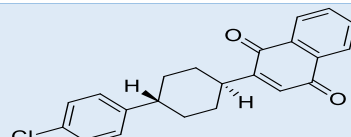
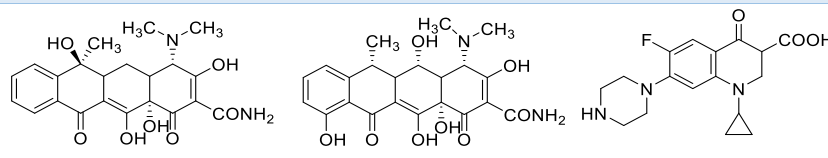
1.1.4. Controlo da doença

Na prática, os três processos bem conhecidos e predominantes para controlar a malária eficazmente, são nomeadamente: eliminação do vetor, farmacoterapia, e a vacinação². A farmacoterapia baseia-se no uso de antimaláricos, que são agentes quimioterapêuticos utilizados na prevenção e tratamento da malária.

1.1.5. Tratamento

Os principais fármacos usados no tratamento da malária podem ser subdivididos em substâncias medicamentosas isoladas de plantas, tais como: quinina, quinidina, cinchonina, cinchonidina e artemisinina; ou compostos sintéticos, por exemplo: cloroquina, paludrina, pamaquina, entre outros, sendo usados profusamente em países ameaçados pela malária como "medicamentos que salvam vidas"^{3a}. Vale a pena notar nesta conjuntura que os antimaláricos empregados atualmente (quadro 1.1), embora sejam eficazes contra certas espécies, também apresentam certas reações adversas, verificando-se uma resistência notória que está a aumentar também de uma forma progressiva.

Quadro 1.1- Principais fármacos existentes no mercado para o tratamento da malária (adaptado de^{6,7}).

Principais agentes antimaláricos	
Família de compostos	Fármacos
Aminoquinolinas e Amino-álcoois	 <p style="text-align: center;">Cloroquina Mefloquina Amodiaquina Primaquina</p>
Sulfonamidas e sulfonas	 <p style="text-align: center;">Sulfadoxina</p>
Biguanidas	 <p style="text-align: center;">Proguanilo</p>
Diaminopirimidinas	 <p style="text-align: center;">Pirimetamina</p>
Lactonas sesquiterpénicas com endoperóxidos	 <p style="text-align: center;">Artemisinina Dihidroartemisina Arteméter Arteéter</p>
Naftoquinonas	 <p style="text-align: center;">Atovaquona</p>
Antibióticos	 <p style="text-align: center;">Tetraciclina Doxiciclina Clindamicina</p>

Os fármacos antimaláricos podem ter designações diferentes consoante a fase do ciclo de vida dos parasitas em que atuam. Por exemplo, aqueles que exercem a sua ação antimalárica contra as formas tecidulares dos parasitas do género *Plasmodium* no estágio hepático, tais como a primaquina, são designados por esquizonticidas tecidulares. Os agentes antimaláricos ativos na fase eritrocítica são denominados esquizonticidas sanguíneos, sendo estes de capital importância na quimioterapia da malária, dada esta ser a fase sintomática da doença. A cloroquina, a quinina, a mefloquina, a halofantrina, a pirimetamina, a sulfadoxina, as sulfonas, a ART e as tetraciclina, são fármacos que exibem este tipo de ação. Os fármacos cuja ação incide sobre as formas sexuais sanguíneas do parasita e que previnem a transmissão da infecção ao mosquito, como a primaquina, são denominados gametocidas. Já os esporonticidas englobam todas as moléculas que, tal como a primaquina e o cloroguanilo, previnem o desenvolvimento de oocistos no mosquito e a subsequente transmissão da malária.

Desta forma, uma terapia ideal para o combate a malária deve combinar um esquizonticida sanguíneo, um gametocida e um esquizonticida tecidular^{2,6}

1.2. Problemática de resistência aos fármacos

As infeções por malária continuam a ser um problema devido à adaptação dos parasitas causadores de doenças aos fármacos existentes⁴. Têm sido levados a cabo vários estudos com o objetivo de entender melhor o ciclo de vida do parasita da malária e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de novos fármacos com melhores propriedades farmacológicas, de onde se destacam estudos no âmbito dos produtos naturais, processos semissintéticos e sintéticos.

Com a constatação de que as doenças afetam amplamente a saúde, a economia e o bem-estar dos habitantes dos países em desenvolvimento, a OMS iniciou uma missão de maneira a controlar e eliminar a malária já no século passado⁸. A principal estratégia foi eliminar a população de mosquitos usando inseticidas como o DDT (Diclorodifeniltricloroetano). Logo se percebeu que a estratégia de controlo do vetor era inadequada e dispendiosa, tanto em termos monetários como de estabilidade ecológica, uma vez que os mosquitos resistentes ao DDT reapareceram ocorrendo também um aumento no número de indivíduos infetados. Uma vez que a população de mosquitos tinha sobrevivido ao DDT, foi um esforço inútil tentar controlar a malária com pesticidas convencionais⁹. Os fármacos usados como antimaláricos, como a cloroquina, mefloquina e doxiciclina, foram as armas principais para combater a doença, mas o seu sucesso foi de curta duração devido à evolução de parasitas resistentes aos mesmos. Como já foi referido, o parasita da malária humana tem uma notável capacidade de adquirir resistência aos fármacos antimaláricos¹⁰. Sob a pressão dos fármacos, o parasita constantemente adapta-se para a sobrevivência, reduzindo de maneira dramática o interesse dos antimaláricos.

A resistência generalizada aos fármacos é a razão subjacente da falha do tratamento usando medicamentos convencionais em zonas de alta transmissão da malária¹⁰. Muitos outros

fármacos antimaláricos como as combinações de amodiaquina, lumefantrina e sulfadoxina/pirimetamina chegaram ao mercado, mas a resistência a esses novos fármacos evoluiu em pouco tempo, complicando o tratamento da malária mais do que nunca. Desta forma e em pleno século XXI, esta doença continua a apresentar um número cada vez maior de indivíduos infetados. Não existe uma vacina para esta doença com um impacto operacional e a dependência cada vez maior de quimioterapia deu origem a várias estirpes de *P. falciparum* resistentes a vários fármacos. Consequentemente, é cada vez mais premente a procura de novos fármacos para o combate à malária, que sejam mais eficazes, seguros e baratos.

1.3. Processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos

Os fármacos podem-se originar de diferentes fontes, destacando-se os princípios ativos extraídos diretamente dos produtos naturais (vegetais e não-vegetais) e/ou os de origem sintética. Entretanto, a descoberta de fármacos é um processo que nem sempre é linear e muitas das vezes envolve o acaso, como foi o caso bem conhecido da penicilina-G. É de referir ainda que, no geral, a maior parte dos fármacos usados no tratamento de enfermidades atualmente são sintéticos, concretamente cerca de 85%.

No que concerne à procura por novos compostos com atividade antimalárica promissora, no seguimento do que foi anteriormente referenciado, destacam-se as fontes naturais, modificações químicas de compostos ativos existentes, desenvolvimento de compostos híbridos, testes de fármacos comercialmente disponíveis aprovados para combate a outras doenças em humanos¹¹, e modelagem molecular fazendo-se recurso as novas tecnologias *in silico* para triagem via *docking* molecular¹². Enquadram-se também nas estratégias anteriormente descritas, a procura de novos alvos macromoleculares para a inibição do desenvolvimento do parasita causador da malária no hospedeiro humano¹³.

O reposicionamento de fármacos, cujo objetivo principal consiste em utilizar fármacos já comercializados para tratamento de outras doenças, é uma abordagem em foco na atualidade. As metodologias de reposicionamento de fármacos *in silico* foram propostas e são análogas à descoberta de fármacos baseada na estrutura em que o rastreio *in silico* é realizado usando bibliotecas de compostos estabelecidos e ou candidatos clínicos¹⁴. Essas abordagens podem ser utilizadas de forma complementar com técnicas experimentais em estudos de reposicionamento. Como exemplo, as bibliotecas virtuais podem ser criadas e selecionadas *in silico* para ajudar a orientar a seleção potencialmente mais intensiva de recursos *in vitro*¹¹. As abordagens computacionais também podem ser valiosas na priorização de alvos para fármacos e na previsão de possíveis alvos para princípios ativos. Um pré-requisito para o reposicionamento de fármacos *in silico* é a disponibilidade e/ou o conhecimento da estrutura 3D, tanto dos fármacos como dos alvos moleculares e modelagem

de farmacóforos. Embora essas abordagens estejam lentamente a ganhar força, seu potencial ainda é dificultado pelo baixo número de moléculas ativas e pela ausência relativa de redes colaborativas através das quais dados e modelos possam ser compartilhados¹⁵.

Todas estas abordagens concorrem para a descoberta de compostos com potencial atividade antimalárica, que, idealmente e simultaneamente, não apresentem problemas de toxicidade, tenham elevada biodisponibilidade e que sejam economicamente mais viáveis.

1.3.1. Modelos *in silico* - *Docking* molecular

Uma das técnicas *in silico* muito utilizada é o *docking* molecular, que se constitui numa ferramenta computacional com papel crucial em biologia molecular e desenho de fármacos assistido por computador (do inglês CADD, *Computer-Assisted Drug Design*) que permite prever o local e modo de ligação dos ligandos aos seus recetores bioquímicos, isto é, alvos macromoleculares. Os algoritmos de ancoragem e as funções de pontuação são capazes de gerar estruturas de complexos recetor-ligando, classificando os compostos e estimando as energias ou afinidades de ligação¹⁶. O *docking* molecular pode ser usado para fazer a triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos, classificar os resultados e propor hipóteses estruturais sobre a maneira como os ligandos inibem o alvo.

Desta forma, o *docking* molecular é um dos métodos computacionais que visa a seleção de compostos para síntese, a eliminação de compostos com perfis indesejáveis antes destes entrarem em fases tardias mais dispendiosas do desenvolvimento de fármacos e a priorização de outros compostos mais propensos a terem sucesso.

Na triagem *in silico* via *docking* molecular para novos ligandos tem sido feito primeiramente um *re-docking*, processo que consiste em retirar a estrutura cristalizada de uma proteína com o seu ligando endógeno do PDB (do inglês, *Protein Data Bank*), separar a proteína do ligando e tornar a efetuar o *docking* novamente com o mesmo ligando, este processo visa validar o método. O parâmetro que serve para avaliar este processo é o RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) das coordenadas cartesianas dos átomos do ligando no complexo ligando-proteína. Considera-se validado o método se o valor do RMSD for inferior a 2 Å. Tal como mostrado na figura 1.2, as etapas principais comuns em todos os protocolos de *docking* molecular consistem em: (1) seleção do alvo e do ligando, (2) preparação do alvo e do ligando, (3) *docking* e (4) análise dos resultados. Todos os métodos de *docking* requerem uma função de pontuação para classificar o modo de ligação dos vários candidatos¹⁷.

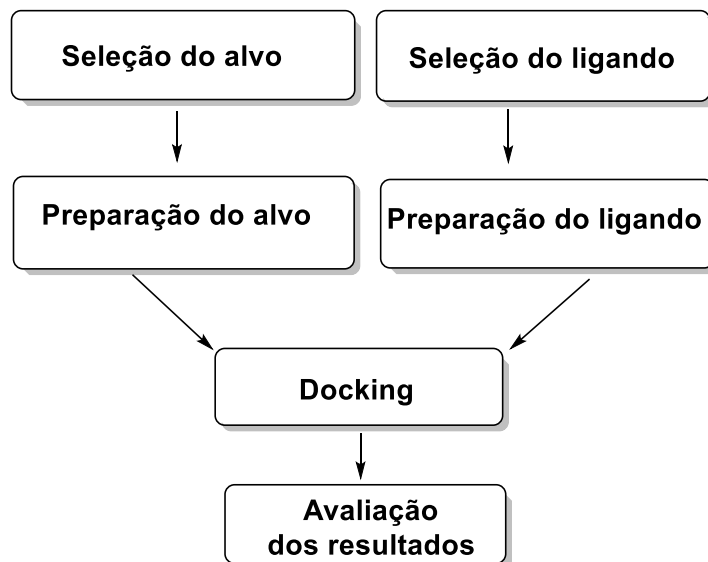
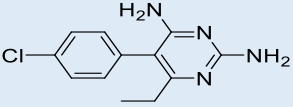
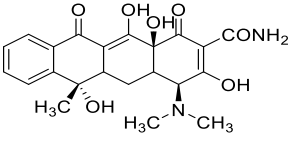
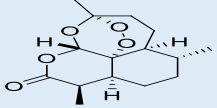


Figura 1.2 - Algoritmo típico para o docking molecular, com os passos chaves comuns para todos os protocolos (adaptado de¹⁷).

1.3.2. Principais alvos moleculares na descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimaláricos

A resistência dos parasitas causadores da malária aos fármacos constitui ainda um grande desafio para a humanidade⁹ tal como referido anteriormente. Desta forma, torna-se pertinente, identificar e validar novos alvos moleculares para travar o desenvolvimento do parasita. Com base no papel desempenhado no ciclo de vida do parasita, os alvos moleculares podem ser classificados genericamente em três grandes grupos: (1) biossíntese; (2) transporte membranar e sinalização; e (3) catabolismo da hemoglobina (quadro 1.2). Os alvos pertencentes ao primeiro grupo são enzimas envolvidas em vários processos biossintéticos, tais como os processos que envolvem os folatos^{18,19,20}, desta forma produzindo nutrientes fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do parasita^{21,22,23}. O segundo grupo envolve os alvos que participam em diversos caminhos tais como a absorção e transporte de nutrientes nas células, geração e manutenção do gradiente eletroquímico transmembranar e enzimas cujos substratos participam na transdução de sinal intracelular^{24,25,26}. O terceiro grupo engloba os alvos que participam na hidrólise da hemoglobina, tendo desta forma um papel crucial no desenvolvimento intraeritrocítico dos parasitas causadores da malária^{27,28,29,30,31}.

Quadro 1.2 - Principais alvos moleculares para agentes antimaláricos²⁹.

	Alvo biológico	Exemplos de fármacos
Grupo 1	Biossíntese	 <p>Pirimetamina</p>
Grupo 2	Transporte membranar e sinalização	 <p>Tetraciclina</p>
Grupo 3	Catabolismo da hemoglobina	 <p>Artemisinina</p>

A partir do ciclo de vida do parasita causador da malária, sabe-se que o estágio sanguíneo é o responsável pelos sintomas da doença, pelo que os fármacos cujo mecanismo de ação se dá neste estágio têm um papel crucial na repercussão dos efeitos causados pela proliferação do microzoário na corrente sanguínea. Entretanto, os fármacos que atuam em vários alvos bioquímicos, chamados de multialvos têm igualmente um papel crucial, uma vez que uma farmacoterapia eficiente contra a malária tal como visto anteriormente, deve englobar um esquizotocida tecidual, um esquizotocida sanguíneo e um gametocida.

1.3.3. Novas abordagens terapêuticas para o combate à malária

O desenvolvimento e a disseminação de resistência aos fármacos antimaláricos aumentaram significativamente bem como o custo global de controlo da malária ao longo do tempo, pelo que novos fármacos, efetivos, seguros e baratos estão a ser continuamente desenvolvidos para substituir os medicamentos que se tornaram, entretanto, ineficazes. Com este objetivo, destacam-se e serão aqui de seguida desenvolvidas a classe dos endoperóxidos, dos quais a ART e derivados têm tido notável destaque, e, mais recentemente, uma nova classe emergente de compostos com potente atividade antimalárica, as espiroindolin-2-onas³².

1.3.3.1. Endoperóxidos

A classe dos endoperóxidos abarca uma série de compostos, tal como descrito acima, designadamente a ART, substância isolada de um produto natural, a *Artemisia annua*, e seus derivados semi-sintéticos e sintéticos. Esforços conducentes à otimização das propriedades da ART, levaram à descoberta dos 1,2,4-trioxalanos e dos 1,2,4,5-tetraoxanos, análogos sintéticos da ART.

1.3.3.1.1. Artemisinina e seus derivados

A ART e seus derivados semi-sintéticos e sintéticos são um grupo de fármacos que possui a ação mais rápida dentre todos os fármacos atualmente usados no combate à malária provocada pelo *Plasmodium falciparum*². A ART é uma lactona sesquiterpénica com uma ponte endoperoxídica (Fig. 1.3) e tem sido produzida em larga escala de forma semi-sintética³³. A descoberta da artemisinina como o princípio ativo do extrato da planta tradicional chinesa *Artemisia annua* foi um grande passo na quimioterapia da malária. No entanto, devido a uma disponibilidade limitada, um custo elevado, uma fraca biodisponibilidade oral, uma taxa de eliminação do organismo rápida, um tempo de meia-vida plasmática baixo e o facto de sofrer hidrólise em condições levemente ácidas, continua a ser necessária e pertinente uma terapêutica antipalúdica alternativa que seja simples e eficaz. Os estudos de relação estrutura - actividade (REA) conduzidos com a ART e os seus derivados semi-sintéticos revelaram que a ligação peroxídica é o principal farmacóforo, crucial para a sua atividade antipalúdica³³.

As terapias combinadas à base da artemisinina (ACT, do inglês *Artemisinin-based Combination Therapies*) são recomendadas pela OMS para o tratamento da malária não complicada causada pelo *P. falciparum*.

A ART e seus derivados semi-sintéticos, tais como o artesunato de sódio, o arteméter e a DHA (dihidroartemisinina) são agentes antimaláricos de curta ação, tal como referido anteriormente, e que levam à morte dos parasitas de maneira mais rápida em relação aos outros fármacos convencionais e são ativos tanto nos estágios sexual e assexual do ciclo do parasita. De facto, a ART reduz o período febril a 32 horas, sendo que os fármacos mais antigos levam de 2 a 3 dias para o fazer. De modo a retardar ou prevenir o surgimento de resistências, a ART é combinada com outros fármacos de ação mais prolongada, incluindo a amodiaquina, a mefloquina, a sulfadoxina/pirimetamina ou a lumefantrina, que, desta forma, permitem a eliminação dos parasitas residuais da malária.

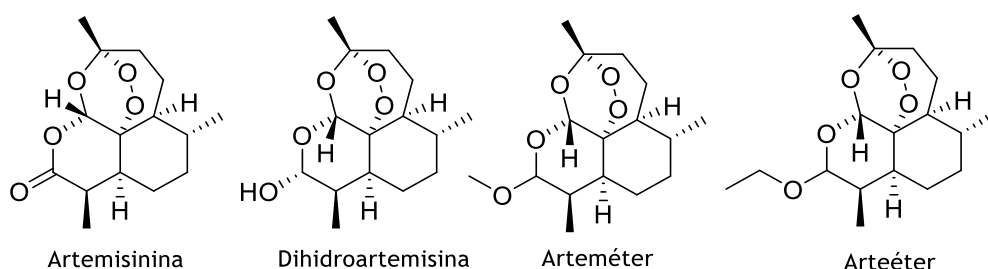


Figura 1.3- Ligação peroxídica em agentes antimaláricos naturais e sintéticos (adaptado de³⁴).

Dentre as combinações baseadas na ART (ACT) recomendadas pela OMS para o tratamento da malária não complicada, destacam-se as seguintes: DHA + piperquina, artesunato + amodiaquina, artesunato + mefloquina, artesunato + sulfadoxina/pirimetamina, artesunato + lumefantrina (coartem) dentre outras.

Mecanismo de ação da artemisinina

O crescimento do parasita da malária nos glóbulos vermelhos depende da disponibilidade de aminoácidos, que são obtidos a partir da degradação da hemoglobina com a ajuda de um grupo de enzimas proteases, concretamente, cisteína proteases e plasmepsinas. Essas proteases degradam a hemoglobina em aminoácidos, um alimento chave para os parasitas e libertam o complexo Fe (II)-heme, que se oxida a Fe (III)-hematina e depois agrega dentro do vacúolo alimentar dos parasitas para formar um pigmento cristalino chamado hemozoina.

Presume-se que a ART é primeiro transportada para o vacúolo alimentar do parasita, onde interage com Fe (II)-heme e gera radicais livres, como mostrado na fig. 1.4. Estes radicais livres interagem com o heme e o heme modificado, lípidos, bem como, pelo menos, quatro proteínas diferentes, resultando na morte do parasita. Neste âmbito, Krishna *et al.*, propôs que a ART é ativada pelo ferro livre ou por um processo dependente do ferro que ocorre perto da PfATP6 no retículo endoplasmático³⁵. A ART ativada liga-se especificamente e irreversivelmente, inibindo a PfATP6 e dificultando, desta forma, o crescimento do parasita³⁶.

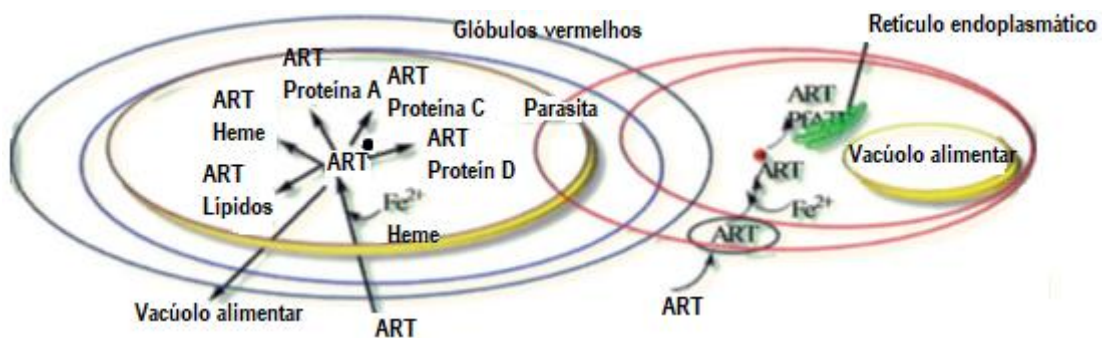
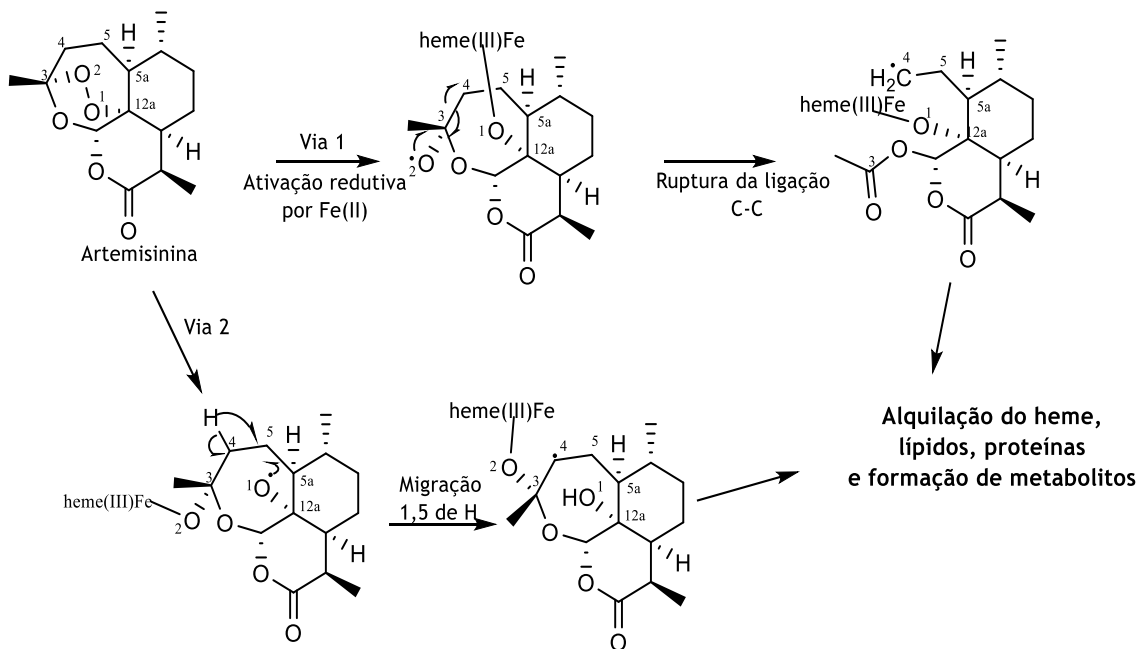


Figura 1.4- Mecanismo de ação da ART(adaptado de⁶).

Foram realizados vários estudos para estabelecer uma correlação mais clara entre a ART e o ferro(II). Estudos *in vitro* confirmaram que a protoporfirina IX de ferro (II), após incubação com ART na presença de um agente redutor, gera heme-ferro (II), que é facilmente convertido num aduto covalente heme-ART. Este aduto resulta da alquilação em quatro posições meso no ligando macrocíclico pelo radical alquilo C4 derivado da ART⁶. A ativação redutiva mediada por heme da ligação peróxido na posição 1 gera um radical alcóxido na ART (esquema 1.1), que se rearranja rapidamente através de um processo de fragmentação β para formar um radical alquilo primário centrado em C4. A adição intramolecular desta espécie alquiladora ocorre sem regiosseletividade nos quatro carbonos meso do ligando de protoporfirina³⁷. A alquilação do heme pela ART ocorre nas quatro posições meso (α , β , γ e δ).

Com base numa série de experiências *in vitro*, foi inicialmente proposto que o mecanismo de ação envolvesse um stresse oxidativo mediado pelo grupo heme que levava à morte do parasita. Neste ponto, as espécies alquilantes, geradas como resultado da clivagem homolítica da ponte endoperoxídica na ART, mediada pelo ferro (II), ou mais

especificamente, o radical alquilo centrado na posição C4 na ART ou compostos relacionados revelaram-se críticos³⁸.



Esquema 1.1- Representação esquemática do mecanismo de bioativação e ação da ART e derivados mediante a formação de radicais primários e secundários centrados em carbono, após clivagem redutiva mediada pelo Heme-Fe(II) (adaptado de^{6,39,40}).

Apesar do grande avanço que representou na quimioterapia da malária pela sua eficácia, a ART e seus análogos ainda têm problemas de solubilidade. Estudos de REA levados a cabo com a ART e seus derivados revelaram que o anel lactona não é essencial para a sua atividade antimalárica. Assim, diversos estudos foram direcionados para uma melhor compreensão das características estruturais essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos, do qual resultaram estruturas de 1,2,4-trioxalanos, 1,2,4,5-tetraoxanos que foram sendo simplificadas e quimicamente modificadas com a finalidade de incorporar as seguintes vantagens⁶: maior eficácia ao passo que se reduz a toxicidade; biodisponibilidade; estabilidade do fármaco; meia-vida longa e maior solubilidade aquosa em pH fisiológico.

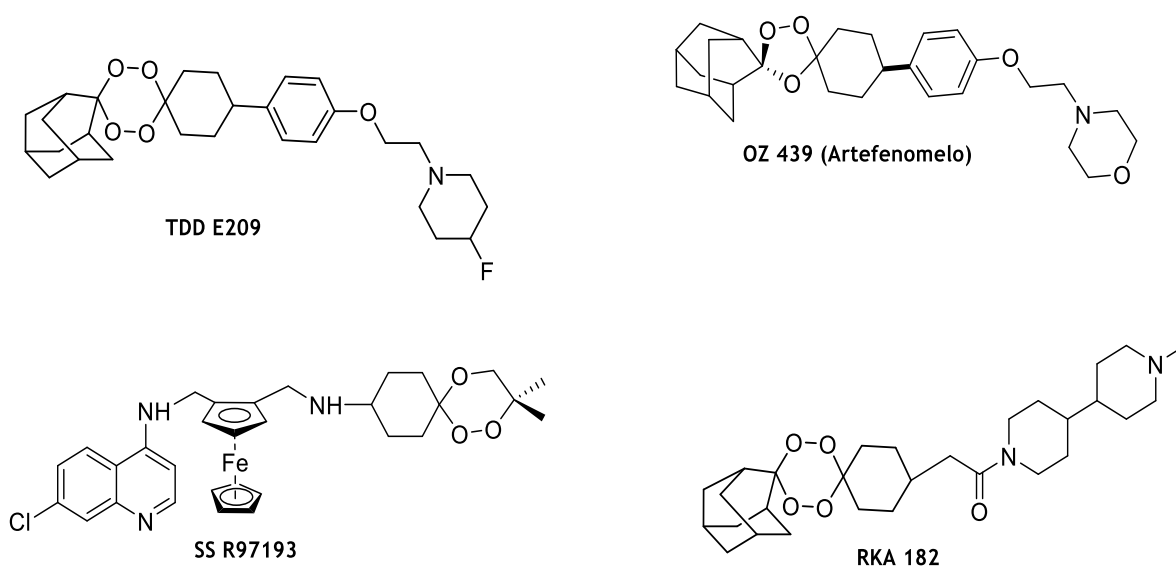


Figura 1.5 - Estruturas de alguns endoperóxidos com potencial atividade antiplasmódica (adaptado de⁴¹).

1.3.3.2. Compostos da família espirociclos

Em 1900, a Bayer sintetizou o primeiro espirano descrito como sendo um hidrocarboneto bicíclico, cujos anéis estão conectados apenas por um único carbono. O termo espirociclanos foi utilizado para descrever a família destes compostos⁴². Dentro desta classe de compostos, existe uma grande diversidade de estruturas. Assim, neste trabalho far-se-á uma pequena abordagem sobre os espiro(tio)barbituratos com especial destaque aos estruturalmente análogos aos apresentados nesta dissertação, destacando aqueles cujos heteroanéis A são de 5 membros. Serão ainda abordadas espiroindolin-2-onas, com destaque nas sínteses e nas atividades biológicas conhecidas para cada uma destas classes de compostos.

1.3.3.2.1. Espiro(tio)barbituratos

Os compostos da família dos espirociclos contendo estruturas cíclicas fundidas no carbono central são de grande interesse devido às suas características conformacionais peculiares e suas implicações estruturais nos sistemas biológicos. Estes espirociclos são conhecidos desde longa data, encontrando-se em produtos naturais de origem vegetal, desde alcalóides, lactonas a terpenóides. São exemplos representativos, os espirocetais que aparecem em uma vasta gama de substâncias com interesse biológico, tais como as feromonas de insetos e algumas classes de antibióticos⁴². Dentro destes, os espirobarbituratos fazem parte de uma classe de compostos com interesse farmacológico e atividade fisiológica^{43,44,45}. Os derivados

do ácido barbitúrico, nos quais se incluem os espirociclos referidos, são bem conhecidos em química medicinal, ocorrendo muitos compostos biologicamente ativos desde quando emergiram como agentes ansiolíticos e sedativo-hipnóticos, antes do advento das benzodiazepinas⁴³. Estudos recentes indicam que essas moléculas podem ser usadas como inibidores de α -glucosidases⁴⁶, anticonvulsivantes⁴³, anti-epiléticos⁴⁷, anestésico-sedativos⁴⁸, anticancerígenos⁴⁹, anti-SIDA⁵⁰ e agentes hipnóticos⁵¹ (figura 1.6).

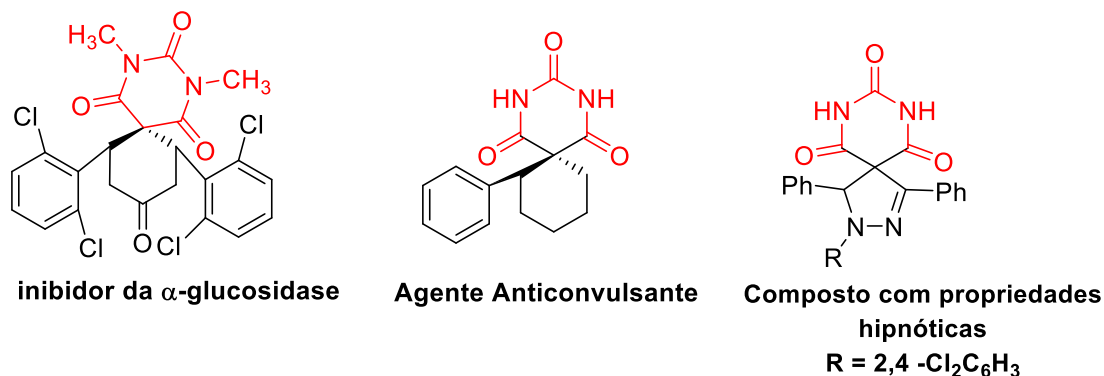
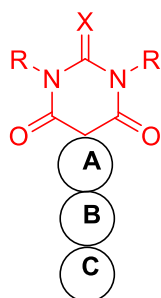


Figura 1.6 - Compostos biologicamente ativos com o grupo barbitúrico em sua constituição⁵².

Os espiro (tio)barbituratos podem ser classificados, tendo em conta o número e a natureza dos anéis fundidos (A, B e C) ligados ao carbono 5 do (tio)barbitúrico base. O anel A apresenta-se como um carbociclo não aromático ou heterociclo de 3 a 7 membros, os anéis B e C podem ser um carbociclo, heterociclo, aromático e/ou heteroaromático, tal como esquematizado na figura 1.7.



X = O, S
R = H, alquilo ou arilo
A = carbociclo não aromático ou heterociclo
B e C = carbociclo, heterociclo, aromático ou heteroaromático

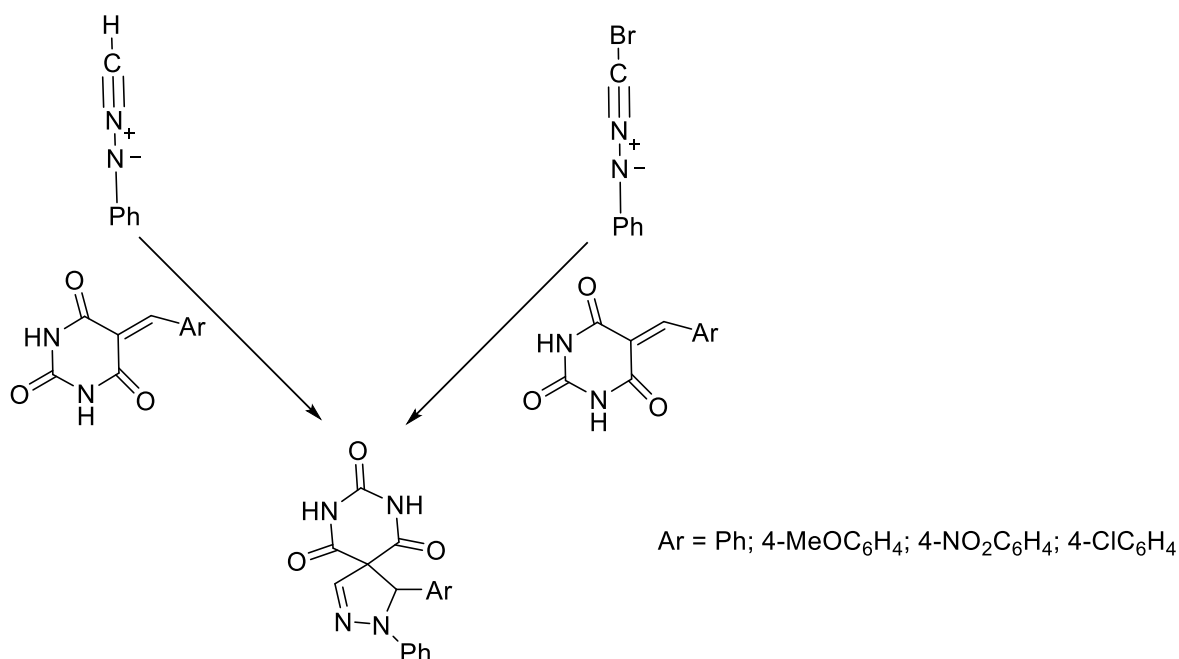
Figura 1.7 - Classificação dos espiro(tio)barbituratos de acordo ao tipo de anéis.

1.3.3.2.1.1. Métodos de obtenção de espiro(tio)barbituratos com anel A de cinco membros e com heteroátomos

Relativamente aos espirobarbituratos com anéis de 5 átomos, sem heteroátomos, a história mostra que foi Dox *et al* o primeiro a sintetizá-los, em 1921, condensando o C5 do ácido (tio) barbitúrico com um ciclobutano ou ciclo-hexano não substituído⁵³.

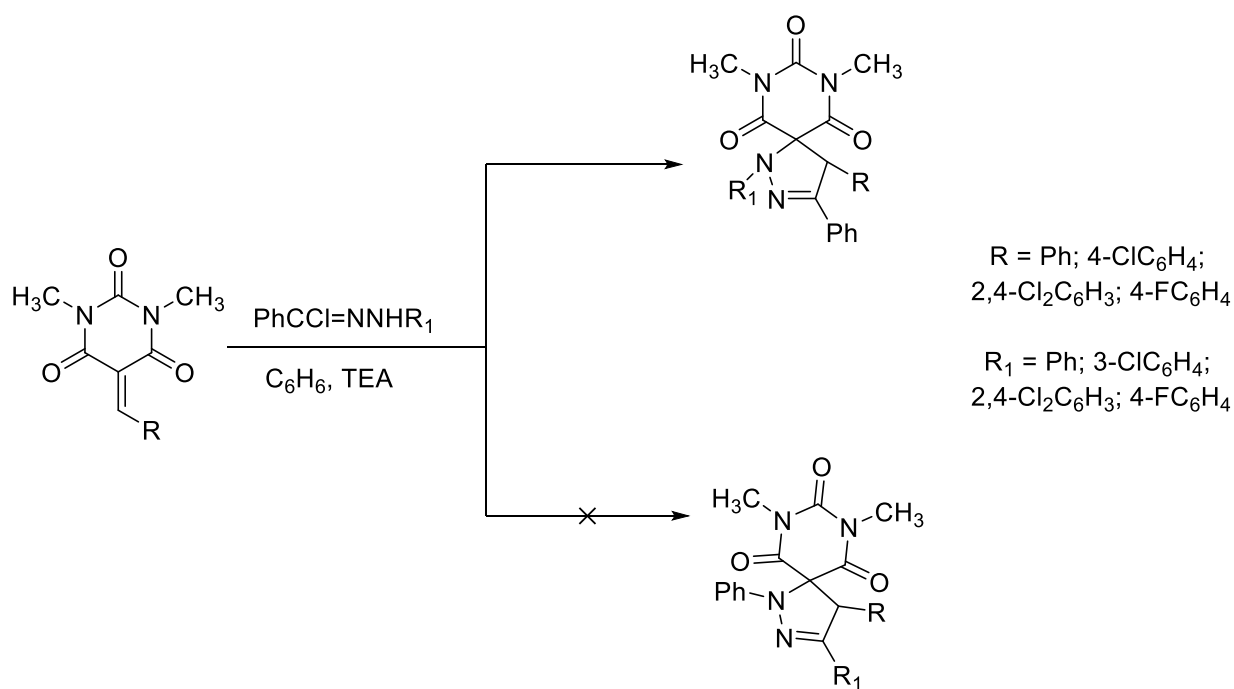
Entretanto e no presente subcapítulo, faremos apenas uma breve abordagem sobre os métodos desenvolvidos para a síntese de espiro (tio)barbituratos com o heteroanel A de cinco membros.

Foti *et al* desenvolveu uma nova metodologia para a síntese de espiropirazolobarbituratos através de uma reação de cicloadição entre um arilideno e um dos dipólos C-Br e C-H de uma nitrilamina⁵⁴ sintetizada *in situ* (esquema 1.2). Em todas as sínteses descritas foi apenas possível isolar um dos regioisômeros com rendimentos moderados (21-55%).



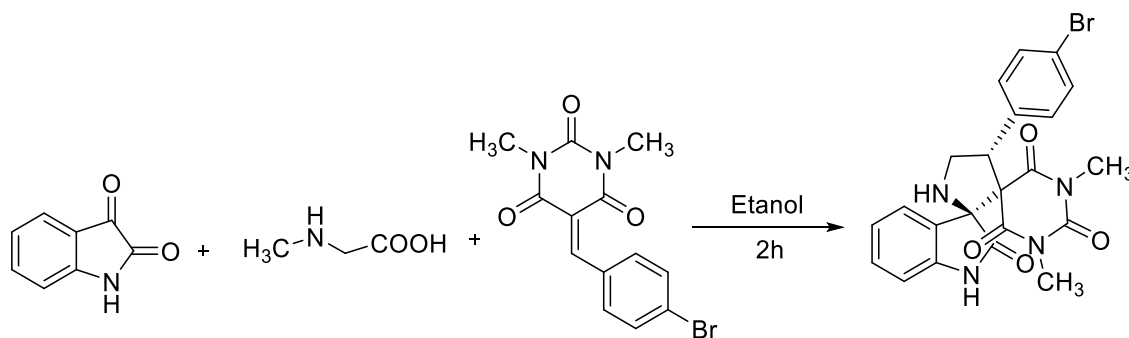
Esquema 1.2 - Síntese de espiropirazolobarbituratos através da condensação de um arilideno e uma nitrilamina⁵⁴.

Girgis *et al*, conseguiu obter espirobarbituratos com anel A de 5 membros, fazendo reagir uma série de 5-arilideno-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6-trionas com nitrilaminas⁵¹ (esquema 1.3) geradas *in situ* através de uma desidrohalogenação do correspondente cloreto de hidrazonoílo em benzeno sob refluxo, obtendo-se um único composto, com bons rendimentos (71-86%).



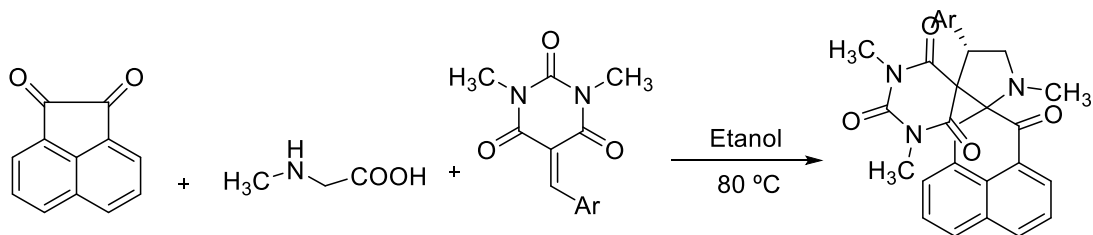
Esquema 1.3 - Síntese de espiropirazolobarbituratos através da condensação de um arilideno e uma nitrilamina⁵¹.

Em 2012, Huang *et al* sintetizou uma série de derivados dispiroxindóis com bons rendimentos (56-84%) através de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar com três componentes (MCR, do inglês *multi componente reaction*) em etanol sob refluxo⁵⁵ (esquema 1.4).



Esquema 1.4 - Síntese de dispiroxindóis através de uma reação multicomponente de cicloadição 1,3-dipolar⁵⁵.

Hu & Shi desenvolveram uma metodologia para a síntese de novos derivados dispiropirrolidina através da reação de cicloadição 1,3-dipolar de íletos de azometino não estabilizadas em etanol sob refluxo⁵⁶ (esquema 1.5), sendo que as reações se processaram com rendimentos que foram de bom a muito bom (70-90%).



Esquema 1.5- Síntese de dispiroxindóis através de uma reação multicomponente de cicloadição 1,3-dipolar⁵⁶.

1.3.3.2.2. Espiroindolin-2-onas

Os indóis e estruturas análogas, especialmente as espiroindolinonas, são uma família de compostos relativamente abundantes na natureza. Desta forma, continuam a ser uma área de interesse em química orgânica devido a sua omnipresença nos produtos farmacêuticos e em alguns alcalóides biologicamente importantes⁵⁷. Neste âmbito e como exemplo, uma nova entidade química (NCE, do inglês *New Chemical Entity*), **NITD609** (figura 1.8), baseada em um esqueleto espirociclo oxindole entrou recentemente em fase de testes clínicos³². A **NITD609** é um dos maiores exemplos de compostos de origem natural que tem levado a triagem de bibliotecas de compostos químicos com o objetivo de se encontrar novos protótipos que apresentem propriedades antimaláricas semelhantes a esta espiroindolinona e desta forma poderem ser enquadrados dentre as atuais alternativas para o tratamento da malária.

O protótipo **NITD609** possui eficácia na gama dos nanomolares contra as estirpes de *P. falciparum* NF54 e K1 (resistentes a cloroquina e pirimetamina)⁵⁸, atuando na fase sanguínea do ciclo de vida do *P. falciparum* e *P. vivax*³², e encontra-se atualmente em fase II de testes clínicos e foi renomeada para KAE609. Evidências científicas têm sugerido que estas espiroindolinonas afetam a homeostase dos iões Na⁺ através da inibição da ATPase do PfATP4⁵⁹. Esta família de compostos tem sido descrita como sendo ativa contra os estágios eritrocíticos assexuais e também têm demonstrado potencial em bloquear a transmissão de nutrientes via membrana⁶⁰. Tendo em conta estes resultados, têm sido levados a cabo esforços significativos para a sua modificação e diversificação estrutural^{61,62,63,64}. No entanto, a maioria das estratégias partem da isatina e seus derivados⁶⁵, o que pode ser considerado como uma grande limitação dos protocolos existentes, tendo em conta que este fato limita o processo de síntese destas estruturas privilegiadas. Desta forma, abordagens metodológicas melhoradas em termos de substratos e da disponibilidade dos materiais de partida são sempre prometedoras e vistas com potencial interesse. Atualmente, estão a ganhar proeminência metodologias de ciclização baseadas em catalisadores metálicos, uma vez que as mesmas permitem um acesso a estruturas policíclicas numa única etapa^{62,66}.

Têm sido várias as estratégias usadas para a obtenção de espiroindolin-2-onas a partir da isatina, das quais se destacam as reações intramoleculares de Mannich, os rearranjos oxidativos sequenciais, o uso de agentes oxidantes, as reações intramoleculares de Heck, a ciclização via reações radiculares, entre outras. Através destas abordagens, tem sido possível sintetizar uma série de espiro (pirrolidina-3,3'-oxindoles), tal como é o caso da ricofilina, da isoricofilina e da salacina (figura 1.8).

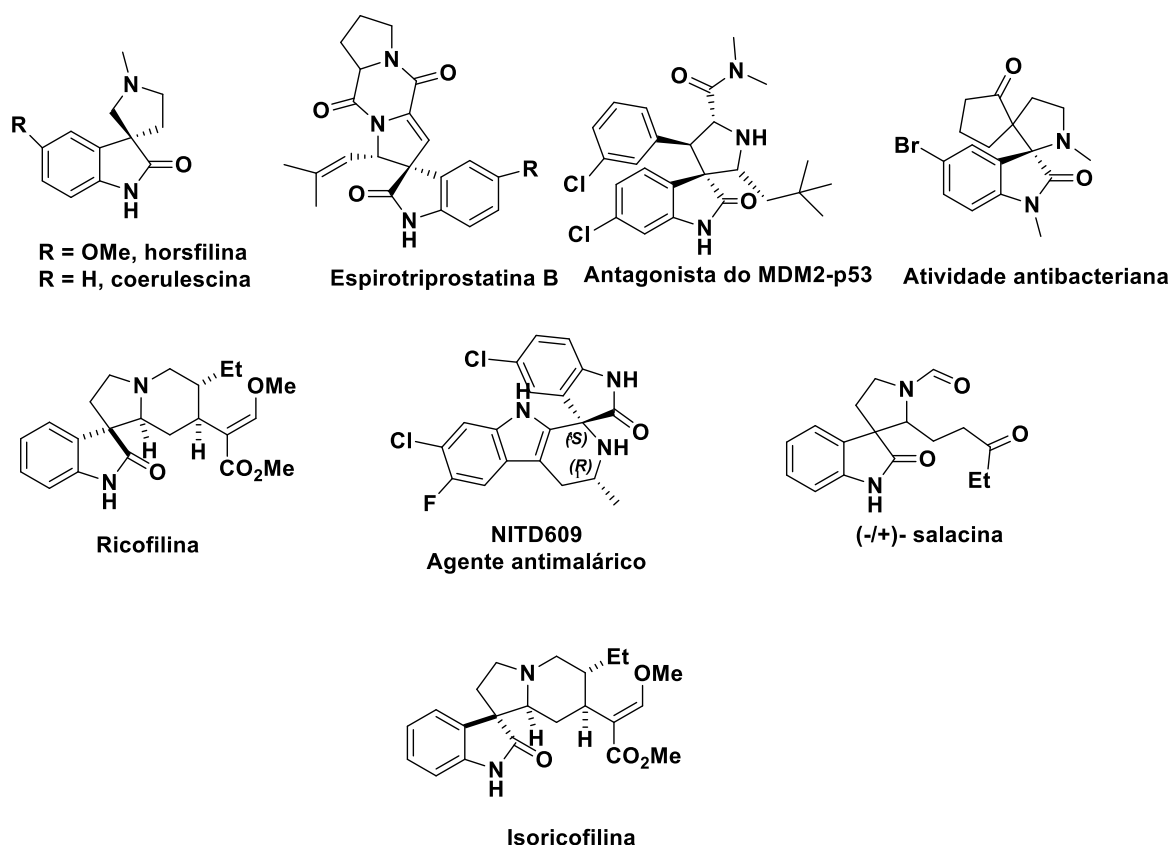
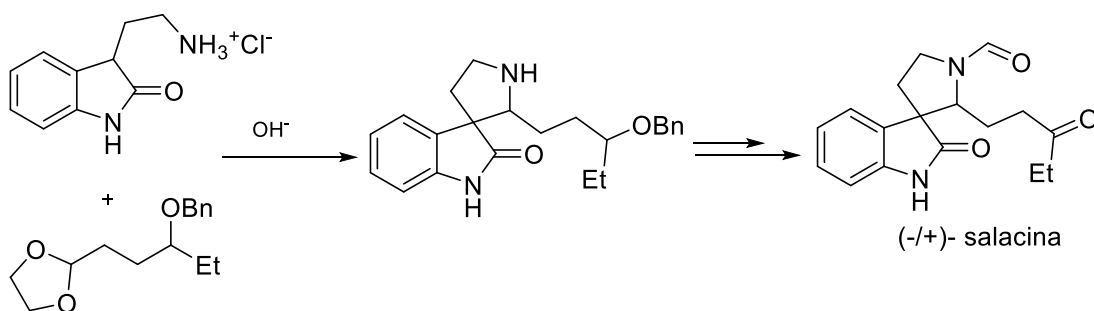


Figura 1.8 - Exemplos de alguns produtos naturais e compostos farmacêuticos importantes contendo o núcleo espiroindolinona⁶².

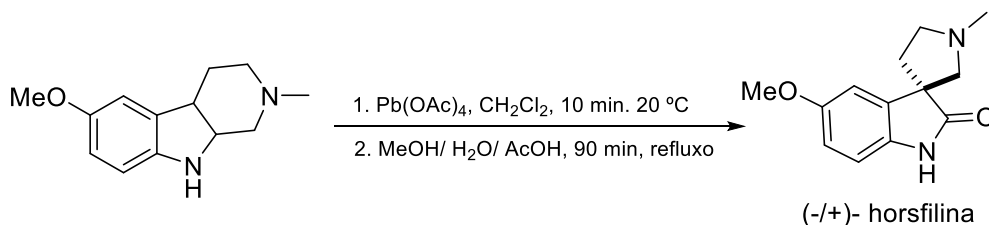
O núcleo espiro (pirrolidina-3,3'-oxindole) pode ser obtido através de uma reação intramolecular de Mannich. Em 1959, verificou-se que os oxindóis muitas vezes ocorrem na natureza em pares de isómeros interconvertíveis, facto que foi elucidado mais tarde por dois grupos de investigadores, liderados por Wenkert e Omarion, tendo os dois proposto a reação de retro-Mannich como envolvendo a abertura do anel⁵⁷. Por este método, a síntese total de uma mistura (+/-)-ricofilol e (+/-)-isoricofilol foi realizada por van Tamelen em 1969⁶⁷.

Em 1990 foi possível isolar a salacina a partir da *Uncaria Salaccensis*, uma planta tailandesa. A estrutura da salacina foi confirmada após a síntese da (+/-)-salacina a partir do cloreto de oxatriptamina. A condensação da amina com o acetal, seguida de uma reação intramolecular de Mannich (esquema 1.6) originou a espiro(pirrolidina-3,3'-oxindole)⁶⁸.



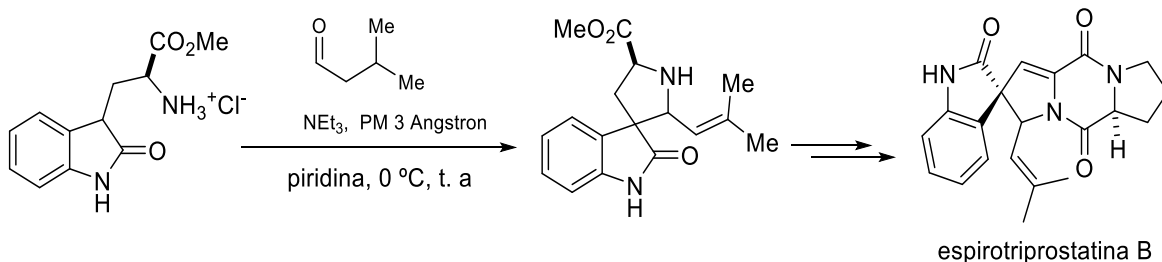
Esquema 1.6 - Síntese da salacina através de uma reação intramolecular de Mannich⁶⁸.

Tentativas posteriores levaram Pellegrini *et al* a sintetizar a horsfilina através de um rearranjo oxidativo do precursor (esquema 1.7), produzindo o oxindole correspondente⁶⁹.



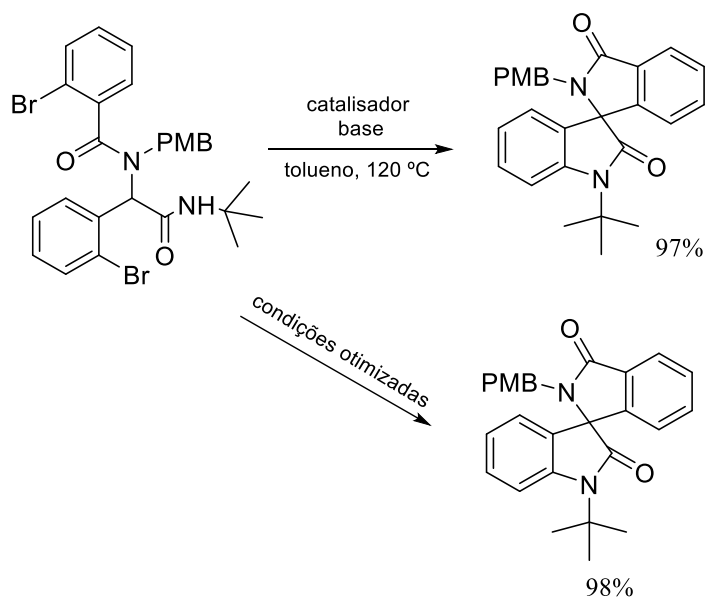
Esquema 1.7- Síntese da horsfilina realizada por Pellegrini et al⁶⁹.

Uma das aplicações recentes mais notáveis da reação de Mannich na síntese de produtos naturais complexos foi levada a cabo por Danishefky, o qual propôs uma nova abordagem para a síntese da espirotriptostatina B ⁷⁰, partindo de um oxindole e de um aldeído (esquema 1.8) tendo conseguido obter uma mistura de diastereoisômeros espiro(pirrolidina-3,3'-oxindole.



Esquema 1.8- Síntese da espirotriptostatina B através da reação de Mannich levada a cabo por Danishefsky⁷⁰.

Dentro das metodologias de ciclização baseadas em catalisadores metálicos, destacam-se os trabalhos de Butani *et al*, que levou a cabo a síntese de espiroindolinonas por aplicação de uma abordagem metodológica, baseada na utilização de catalisadores à base de paládio e tolueno como solvente, obtendo rendimentos na ordem dos 21-97%, tendo sido obtido melhores rendimentos em condições otimizadas⁶² (esquema 1.9).



Esquema 1.9 - Ciclização com formação do espiro promovida por catalisadores a base de paládio⁶².

Para além das reações intramoleculares de Mannich, os rearranjos oxidativos sequenciais, o uso de agentes oxidantes, as reações intramoleculares de Heck, a ciclização via reações radicalares para a síntese de espiroindolinonas, destacam-se igualmente as reações com vários componentes (MCR)⁵⁷, que têm sido largamente utilizadas para a obtenção desta classe de compostos.

1.4. Objetivos do trabalho

No presente trabalho de dissertação, estabeleceu-se como objetivo geral o de desenvolver novos derivados contendo o núcleo espiroindolin-3-ona que possam atuar como agentes antimaláricos e ainda avaliar a sua potencialidade como inibidores da XO (Xantina Oxidase).

Para o alcance do objetivo geral, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar diversos espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos e através de reações de substituição eletrofílica aromática, dessulfurização e *N*-acilação obter uma série de derivados de modo a estabelecer uma diversificação estrutural.
- Efetuar a caracterização estrutural dos compostos sintetizados.
- Avaliar as atividades biológicas dos espiroindolin-3-ona(tio)barbituratos e derivados que se revelarem promissores nos estudos *in silico* de *docking* molecular e predição de propriedades farmacocinéticas, a fim de verificar a possível citotoxicidade, a capacidade de inibição da XO e a atividade antimalárica dos mesmos.

2. Resultados e discussão

No presente capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos estudos *in silico* de *docking* molecular e de predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes; serão igualmente apresentados os resultados experimentais do processo de síntese de espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos e derivados obtidos através de reações de dessulfurização, substituição eletrofílica aromática e *N-acilação*; e terminar-se-á por discutir os resultados obtidos nos ensaios de avaliação da citotoxicidade em células NHDF e no ensaio enzimático de inibição da atividade da xantina oxidase.

Desta forma, são apresentados e discutidos: em 2.1 os resultados dos estudos *in silico*, *docking* molecular (2.1.1), predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas pelo pkCSM online (2.1.2), síntese (2.2), precursores (2.2.1), 2-nitrobenzilideno (2.2.1.1), benzisoxazole (2.2.1.2), espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato (2.2.1.3), derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos (2.2.2), espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato (2.2.2.1), derivados halogenados (2.2.2.2), *derivados N-acilados* (2.2.2.3), avaliação biológica (2.3), citotoxicidade (2.3.1), determinação *in vitro* da atividade inibitória da xantina oxidase (2.3.2), atividade antimalárica (2.3.3) e finalmente em (2.3.4) faz-se uma discussão da relação estrutura atividade referente à citotoxicidade e à capacidade inibitória da xantina oxidase.

2.1. Estudos *in silico*

2.1.1. *Docking* molecular

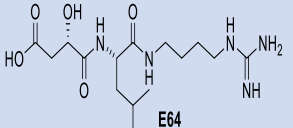
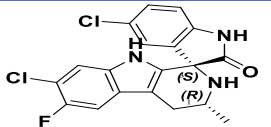
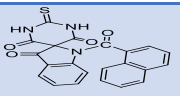
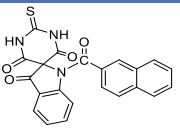
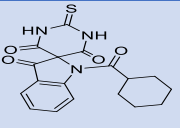
As proteínas com a função de proteases presentes nos protozoários do género *Plasmodium* têm surgido como alvos promissores no desenho e descoberta de novos agentes antimaláricos devido ao papel indispensável que as mesmas possuem no ciclo de vida do parasita. Desta forma, no desenvolvimento de fármacos para o combate à malária causada pelo *P. falciparum* têm sido considerados vários alvos biológicos, dentre os quais a família das cisteínas proteases que participam no processo de degradação da hemoglobina humana⁷¹.

Desta forma, para o presente trabalho, escolheu-se a PF-2 (proteína falcipaina-2) como alvo biológico (figura 2.1). As proteases da família das falcipainas têm funções críticas neste processo metabólico, tornando-as desta forma em alvos importantes para o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos. Como resultado e com o objetivo de avaliar a capacidade de inibição da PF-2 por uma determinada classe de compostos orgânicos, este trabalho iniciou-se com o *design* racional, com recurso às ferramentas *in silico* de modelagem molecular de uma série de derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos, incidindo-se na ocupação do centro ativo da PF-2 e na capacidade de efetuar ligações por ponte de hidrogénio com os resíduos de aminoácidos Cys42, Gly83, His174 e Asn173 desta proteína via *docking* molecular. A seleção da família de compostos avaliados foi feita tendo em conta estudos recentes anteriormente referidos, em que os mesmos mostraram que as espiroindolin-2-onas apresentam atividade antimalárica potente atuando na fase sanguínea do ciclo de vida do parasita.

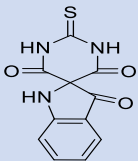
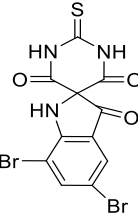
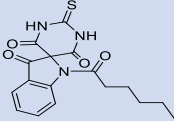
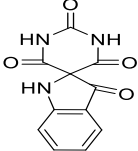
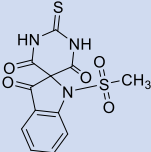
A estrutura co-cristalizada da PF-2 e o Epoxissuccinato (**E64**) com uma resolução de 2,9 Å foi retirada da base de dados de proteínas - PDB (do inglês, *protein data bank*).

Na tabela 2.1 são apresentados os resultados do *docking* molecular para os 10 melhores ligandos num total de 58 avaliados, realçando as médias das energias de ligação e as interações de hidrogénio entre os ligandos e os aminoácidos do sítio ativo da proteína falcipaina-2.

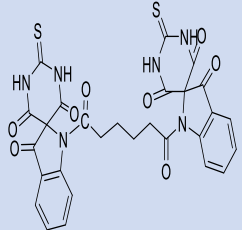
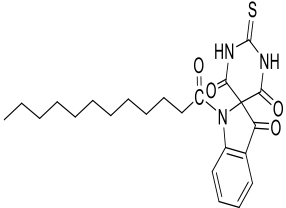
Tabela 2.1- - Energias e interações dos 10 melhores ligandos pelo AutodockTools (58 no total), E64 (ligando endógeno) e o NITD609³².

N.º	Código do composto	Estrutura	Média das energias de ligação (Kcal.mol ⁻¹)	Ligações de hidrogénio	Ligações hidrofóbicas
0	E64		-3,654	Cys42 Gly83 His174	Gln36; Gly40; Trp43; Gly83; Leu84; Ile85; Cys42; Ala175; Asn173; Leu172
1	NITD609		-7,869	Cys42 Gly83 Trp43	His174; Ala175; Ser149; Leu172; Tyr78
2	L61		-8,272	Cys42; Gly83; His174; Asn173	Trp43; Ala175; Leu84
3	L60		-7,770	Cys42; Gly83; Gln36	Ile85; Trp43; Gly82
4	L57		-7,086	Cys42; Gly83; Asn173; Ala175	Gly82, Trp43

Continuação da tabela 2.1.

N.º	Código do composto	Estrutura	Média das energias de ligação (Kcal.mol ⁻¹)	Ligações de hidrogénio	Ligações hidrofóbicas
5	L17		-6,573	Cys42; Gly83; His174; Asp234;	Ser149; Ile85; Leu84
6	L24		-6,332	Cys42; Gly83; Trp43	Gly82; Leu84
7	L56		-6,266	Cys42; Gly83; Asn173	Ala175; Ile85, Gly82; Trp43
8	L18		-6,238	Cys42; Gly83; His174,	Asp234; Ser149; Ile85, Leu84
	L59		-6,204	Cys42; Gly83; His174, Ala175; Leu172	Ile85; Leu84

Continuação da tabela 2.1.

N.º	Código do composto	Estrutura	Média das energias de ligação (Kcal.mol ⁻¹)	Ligações de hidrogénio	Ligações hidrofóbicas
9	L62		-6,900	Cys42, Gly83	Trp43; Leu172
10	L64		-5.541	Cys42; His174; Gln36; Trp206	Gly82; Ile85; Phe236

Neste contexto, é de realçar que estudos recentes mostraram que a maioria dos compostos que revelaram potencial para inibir a PF-2 têm a capacidade de efetuar ligações de hidrogénio com o resíduo de Cys42^{27,31,29,28, 30} do centro catalítico da proteína e adicionalmente com os resíduos polares de Gly83, Asn173 e His174 ao redor do sítio ativo²⁷.

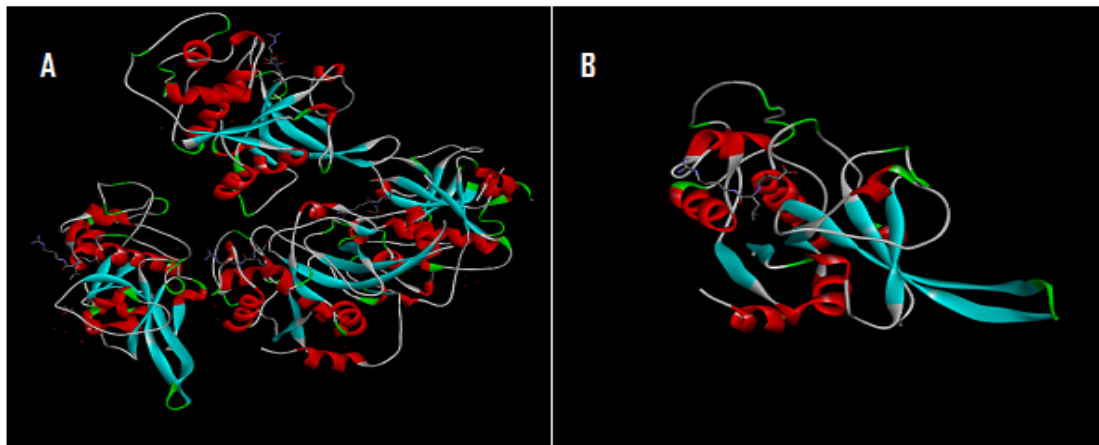


Figura 2.1 - Estrutura 3D da PF-2 co-cristalizada com o ligando endógeno E64. (A) Domínio tetramérico, (B) domínio monomérico (<https://www.rcsb.org/structure/3BPF>).

Pela análise das interações proteína-ligando (figura 2.2), verifica-se que os compostos submetidos a *screening* via *docking* molecular apresentam várias interações com os aminoácidos do sítio ativo da macromolécula, com destaque para os resíduos de Cys42, Gly83, Asn173 e His174 acima referidos. Desta forma, as espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos constituem-se potenciais inibidores da PF-2. Salienta-se o facto de todos os ligandos avaliados apresentarem energias de ligação mais baixas em relação ao E64 (ligando endógeno do alvo) e, em alguns casos, energias mais baixas em relação ao protótipo NITD609³².

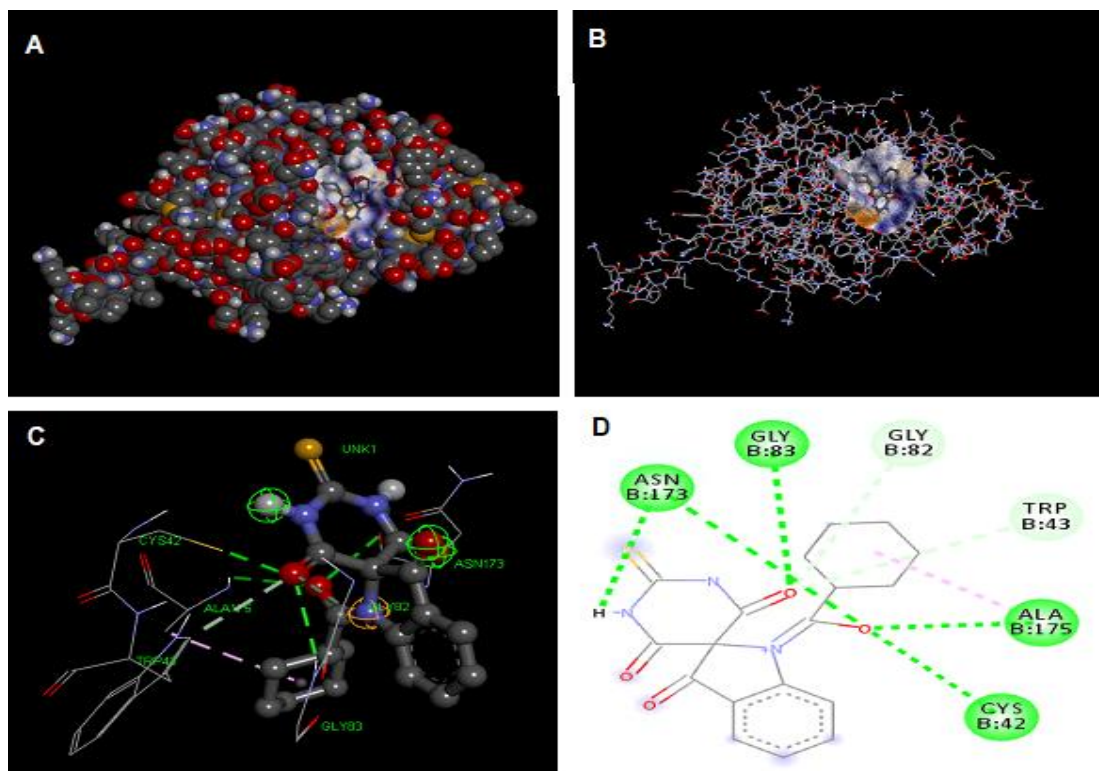


Figura 2.2 - Ligando L57 no sítio ativo da PF-2 (A e B); Interações entre o L57 e os aminoácidos do sítio ativo da PF-2 (C e D).

2.1.2. Predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes pelo pkCSM online

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos tem-se tornado cada vez mais difícil, uma vez que envolve gastos dispendiosos e investimentos arriscados, pois a taxa de sucesso tem sido baixa. De facto, grande parte dos protótipos avaliados em ensaios clínicos não chega ao mercado por causa de pouca eficácia e/ou efeitos colaterais acentuados⁷². O processo de desenvolvimento de novos fármacos preocupa-se basicamente em ter moléculas com a máxima eficácia, segurança e propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET, do inglês *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) adequadas para a sua utilização. Tendo em conta os aspetos acima expostos, no presente trabalho teve-se em conta a avaliação *in silico* de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes dos compostos desenhados e, para levar a cabo este processo, fez-se recurso ao software on-line pkCSM através do link <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction>, de modo a se poder analisar o perfil ADMET dos compostos pretendidos.

Tal como se pode verificar pela análise dos resultados obtidos através da triagem *in silico* (tabelas 2.2 e 2.3), grande parte dos compostos avaliados cumpre as regras de Lipinski e os parâmetros de Veber; adicionalmente, os mesmos satisfazem os requisitos exigidos dentro de critérios importantes de *drug-likeness*, destacando-se elevada absorção intestinal em

humanos, fator importante na biodisponibilidade de fármacos de modo a se atingir uma concentração plasmática capaz de dar uma resposta terapêutica eficaz. Do ponto de vista da química medicinal, a capacidade de projetar fármacos capazes de penetrar na BHE (barreira hematoencefálica) e dar uma resposta biológica desejada é um grande desafio. Por outro lado, os fármacos com ação periférica precisam possuir propriedades físico-químicas específicas que os impedem de atravessar a BHE, tendo os compostos avaliados valores de logBHE que indicam que os mesmos se encontram dentro dos parâmetros aceitáveis, para além de não terem problemas de toxicidade, com exceção do ligando **L36** que pode originar problemas de hepatotoxicidade. Desta forma, motivados por estes resultados, partiu-se para a síntese de um conjunto de derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos.

Tabela 2.2- Dados computacionais calculados para alguns ligandos (descritores das regras de Lipinski e parâmetros de Veber, determinados através do software pkSCM).

Descritor	Regras de Lipinski ^{73, 74} e parâmetros de Veber ⁷⁵	L17	L18	L21	L22	L26	L31	L32	L36	L47	L56	L57
MM (g/mol)	≤ 500 a)	261,3	245,2	279,6	314,1	402,9	289,3	273,2	413,5	303,299	359,41	371,418
Lipofilia (logP)	≤ 5 a)	-0,4355	-0,6004	0,053	0,706	0,9246	0,2489	0,084	3,3985	-0,4945	1,0659	1,0659
Ligações rotáveis	≤ 10 b)	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	1
Aceitadores de pontes de Hidrogénio	≤ 10 a)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dadores de Pontes de Hidrogénio	≤ 5 a)	3	3	3	3	3	1	1	1	2	2	2
Área superficial polar (Å ²)	≤ 140 b)	106,73	100,54	110,84	121,14	128,28	119,88	113,690	177,272	123,839	149,299	154,658
a) Regra de Lipinski												
b) Parâmetros de veber												
Violações às regras de Lipinski		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 2.3- Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos vários modelos do software pkCSM on-line para os ligandos.

Propriedade	Nome do modelo	Unidade	Valor predito										
			L17	L18	L21	L22	L26	L31	L32	L36	L47	L56	L57
	Absorção intestinal em humanos d)	a) (% Absorção)	63	69	70	77	76	70	64	97	64	74	86
	Substrato da Glicoproteína-P	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
	Inibidor da Glicoproteína-P I	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim
	Inibidor da Glicoproteína-P II	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Distribuição	Permeabilidade da BHE c)	a) (log BHE)	-0,51	-0,62	-0,81	-0,98	-1,02	-0,51	-0,63	-0,36	-0,46	-0,29	-0,18
	Permeabilidade do SNC	a) (log PS)	-2,75	-2,85	-3,07	-3,09	-3,09	-2,57	-2,67	-1,88	-3,04	-2,76	-2,58
Metabolismo	Substrato da CYP2D6	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Substrato da CYP3A4	b)	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Inibidor da CYP1A2	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	inibidor da CYP2C19	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
	Inibidor da CYP2C9	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
	Inibidor da CYP2D6	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Inibidor da CYP3A4	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Excreção	Clearance Total	a) (log ml/min/kg)	-0,36	-0,08	-0,29	-0,11	-0,38	0,02	0,08	-0,35	-0,32	-0,26	-0,42
	Substrato da OCT2 Renal	b))	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade	Teste de AMES e)	b)	No	No	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não
	Dose máxima tolerada em humanos	Numeric (log mg/kg/dia)	0,35	0,38	0,40	0,22	0,18	0,23	0,25	0,01	0,39	-0,48	-1,20
	Inibidor da hERG I	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Inibidor da hERG II	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
	Toxicidade oral crónica em ratos (LOAEL)	a) (log mg/kg/dia)	1,80	1,82	1,74	1,67	1,64	1,56	1,58	0,89	1,62	1,09	1,19
	Hepatotoxicidade	b)	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não

Legenda da tabela 2.3

a) Numérico; b) Categórico c) Valores próximos de 1 representam uma melhor permeabilidade através da BHE; d) Valores próximos de 100 representam uma melhor absorção através do intestino humano; e) O teste de Ames indica se um composto é mutagénico ou não. Toxicidade positiva indica que o composto é um provável mutagénico.

2.2. Síntese

Neste subcapítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na preparação e na tentativa de preparação de novos derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos.

Passaremos primeiramente a apresentar as sínteses dos precursores para a obtenção da família de compostos pretendidos neste trabalho, fazendo uma panorâmica de todo o processo até ao alcance do objetivo traçado.

Os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de FTIR, RMN de ^1H e ^{13}C ; para a maioria dos compostos foi realizada ainda a técnica de intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT- do inglês, *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*) e os espectros bidimensionais de correlação heteronuclear a uma ligação (HSQC - do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) de HSQC e correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC - do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

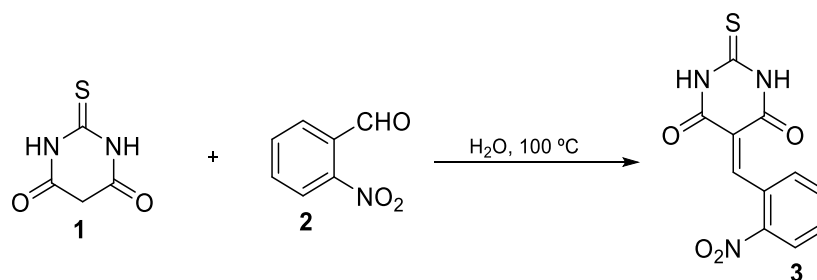
2.2.1. Precursores

Os precursores usados na obtenção dos derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos foram sintetizados através dos procedimentos descritos por Serrano *et al*⁷⁶, desta forma, é apresentada e discutida a síntese do precursor **3** (2.2.1.1), do precursor **4** (2.2.1.2) e do precursor **5** (2.2.1.3).

2.2.1.1. 2-Nitrobenzilideno **3**.

O 2-nitrobenzilideno **3** foi sintetizado de modo a servir como precursor para a síntese benzisoxazole **4**.

A obtenção do 2-nitrobenzilideno **3** envolve uma reação do tipo Knoevenagel que, no caso em questão, consiste na adição do 2-nitrobenzaldeído **2** ao ácido tiobarbitúrico **1** (esquema 2.1; tabelas 2.4 e 2.5). Para esta síntese foi escolhido um método que envolve um procedimento experimental simples e com utilização de água como solvente reacional, e as reações permitiram obter muito bons rendimentos de produto (80-90%).



Esquema 2.1- Síntese do 2-nitrobenzilideno.

No espectro de FTIR do intermediário **3** observam-se as bandas características dos principais grupos funcionais presentes no nitrobenzilideno (tabela 2.4), verificando-se igualmente que o ponto de fusão (239-241°C) determinado não difere muito do apresentado na literatura (246-250)⁷⁶.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C mostram todos os sinais esperados, permitindo desta forma elucidar e confirmar a estrutura do intermediário **3**. É de destacar os sinais característicos a 12,56 e 12,33 ppm, correspondendo aos NH das amidas, os sinais correspondentes aos hidrogénios aromáticos de 8,24 a 7,62 ppm com constantes de acoplamento características (tabelas 2.5 e 2.6). É de referir ainda que os sinais dos RMN dos hidrogénios e dos carbonos se encontram dentro dos desvios químicos esperados, correspondendo ao espectro teoricamente esperado.

Tabela 2.4- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento do 2-nitrobenzilideno **3**.

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	Rendimento (%)
3	3255 e 3156 (N-H) 1718 e 1692 (C=O) 1513 e 1351 (NO ₂) 1203 (C=S)	239-241	246-250 ⁷⁶	90

Tabela 2.5 - Dados de RMN de ^1H para o intermediário 3.

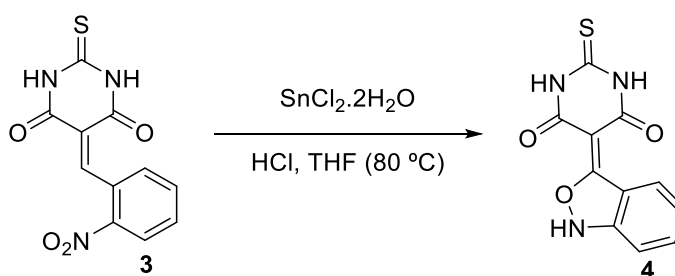
Composto	5-CCH	3'-ArCH (<i>J</i> em Hz)	5'-ArCH (<i>J</i> em Hz)	4'-ArCH (<i>J</i> em Hz)	2'-ArCH (<i>J</i> em Hz)	6'-ArCH (<i>J</i> em Hz)	Outros sinais
3	8,63 (s, 1H)	8,24 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,3; 1,0)	7,80 (td, 1H, <i>J</i> = 7,6; 1,1)	7,72 - 7,66 (m, 1H)	a)	7,62 (dt, 1H, <i>J</i> = 7,7; 1,2)	12,56 (s, 1H, NH), 12,33 (s, 1H, NH)
a) Não aplicável							

Tabela 2.6 - Dados de RMN de ^{13}C para o intermediário 3.

Composto	2-CS	4 e 6-CO	5-CCH	1'-ArC	2'-ArC	3'-ArCH	4'-ArCH	5'-ArCH	6'-ArCH	5-C	Outros sinais
3	179,05	160,63 159,18	153,31	131,57	146,28	124,08	130,48	133,77	130,39	120,60	a)
a) Não aplicável											

2.2.1.2. Benzisoxazole 4

Para posterior utilização como precursor na síntese do espiro(tio)barbiturato **5**, sintetizou-se o benzisoxazole **4** através de uma redução usando-se o cloreto de estanho dihidratado como agente redutor em THF e HCl sob refluxo⁷⁶ (esquema 2.2; tabela 2.7 e 2.8), tendo-se obtido o correspondente benzisoxazole em curto espaço de tempo e com bons rendimentos (75-85%).



Esquema 2.2- Síntese do benzisoxazole **4**.

O espectro de FTIR do benzisoxazole **4**, mostra as bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula, tal como indicado na tabela 2.7, e a estes dados juntam-se os dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (tabelas 2.8 e 2.9), nos quais aparecem todos os sinais para os átomos de hidrogénio e carbono presentes na molécula, complementados pelos espectros bidimensionais de HSQC e HMBC, que permitiram ajudar a elucidar a estrutura da molécula.

Tabela 2.7- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento do intermediário benzisoxazole **4**.

Composto	FTIR (bandas características em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^\circ\text{C}$)	Literatura ($^\circ\text{C}$)	Rendimento (%)
4	3381 (NH) 1664 (C=O) 1357 e 1251 (C-O) 1164 (C=S)	207-208 dec.	a)	85
a) Não descrito				

Tabela 2.8 - Dados de RMN de ^1H para o intermediário 4.

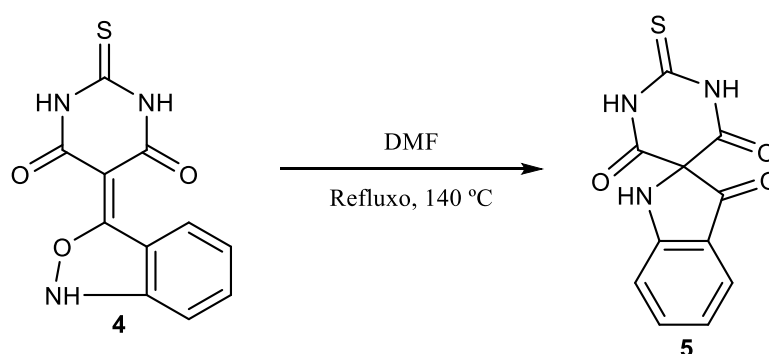
Composto	4-ArCH (J, Hz)	7-ArCH (J, Hz)	6-ArCH (J, Hz)	5-ArCH (J, Hz)	Outros sinais (J, Hz)
4	7,84 (d, 1H, J = 8,8)	7,38 (d, 1H, J = 9,0)	7,25 (dd, 1H, J = 9,0; 6,3)	6,79 (dd, 1H, J = 8,8; 6,3)	11,31 (s, 2H, 1' e 3'-NH)

Tabela 2.9 - Dados de RMN de ^{13}C para o intermediário 4.

Composto	(2'-CS),	(3-C)	(4' 6'-CO)	(7a-ArC)	(6-ArCH)	(4-ArCH)	(5-ArCH)	(3a-C)	(7-ArCH)	(2,5'-C)
4	174,46	166,07	161,01	156,28	130,26	125,43	119,29	114,18	113,12	84,99

2.2.1.3. Espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato 5

Para a obtenção do derivado espiroindolin-3-ona (tio) barbiturato, dissolveu-se o benzisoxazole 4 em DMF (dimetilformamida) a 140 °C e deixou-se reagir após completa dissolução por mais dois minutos, obtendo-se o produto desejado com bons rendimentos (75-85%) (esquema 2.3; tabela 2.10 e 2.11).



Esquema 2.3- Síntese do espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato 5.

Observam-se no espectro de FTIR do intermediário 5 as bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula, nomeadamente os NH e os carbonilos, tal como indicado na tabela 2.10, e a estes dados juntam-se os dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (tabelas 2.11 a 2.13), nos quais aparecem todos os sinais para os átomos de hidrogénio e carbono presentes na molécula, complementados pelos dos espectros bidimensionais de HSQC e HMBC, que permitiram ajudar elucidar a estrutura da molécula. É de referir que os sinais dos hidrogénios e dos carbonos se encontram dentro dos desvios químicos esperados, correspondendo ao espectro teoricamente esperado.

Tabela 2.10- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento do espiroindoline-3-ona (tio)barbiturato 5.

Composto	FTIR (bandas características em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Literatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimento (%)
5	1697 (C=O) 1139 (C=S)	160 dec.	a)	80
a) Não descrito				

Tabela 2.11 - Dados de RMN de ^1H para o intermediário 5.

Composto	5 -ArCH	7 -ArCH	4 -ArCH	6 -ArCH	Outros sinais
5	6,81 (ddd, 1H, $J = 7,8; 7,0; 0,9$ Hz, 5-ArCH)	7,17 (dt, 1H, $J = 8,3; 0,9$ Hz, 7-ArCH)	7,42 (dt, 1H, $J = 7,9; 0,7$ Hz, 4-ArCH)	7,57 (ddd, 1H, $J = 8,4; 7,0, 1,3$ Hz, 6-ArCH)	12,63 (s, 2H, 1' e 3'-NH),

Tabela 2.12 - Dados de RMN de ^{13}C da zona aromática do intermediário 5.

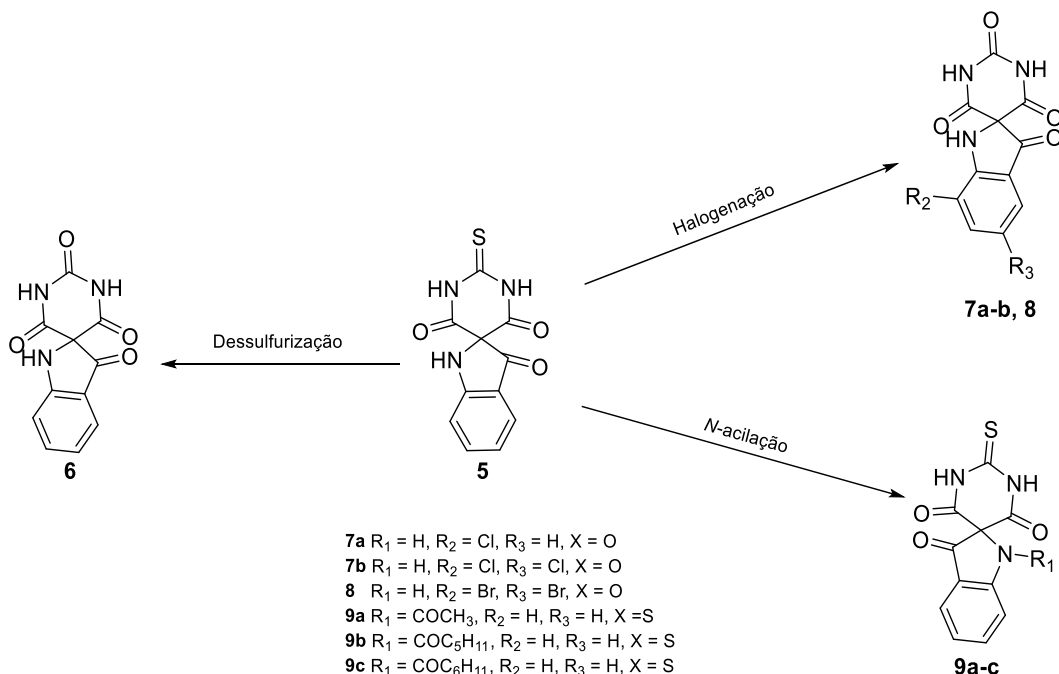
Composto	(7a -ArC)	(6 -ArCH)	(4-ArCH)	(5 -ArCH)	(3a -ArC)	(7 -ArCH)
5	164,99	138,94	125,35	119,07	114,27	113,18

Tabela 2.13 - Dados de RMN de C da zona não aromática do intermediário 5.

Composto	3-CO	2'-CS	(4' e 6' -CO)	(2, 5' -C)
5	189,32	179,66	162,42	78,33

2.2.2. Derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos 6-9

O esquema 2.4 mostra as rotas sintéticas para a diversificação estrutural dos derivados contendo o núcleo espiroindolin-3-ona.



Esquema 2.4- Rotas sintéticas para os derivados espiroindolin-3-ona (tio) barbituratos 6-9.

Partindo do intermediário **5** efetuou-se uma diversificação estrutural, através de reações de dessulfurização⁷⁷, halogenação⁷⁸ e *N*-acilação⁷⁹, tendo sido possível obter vários derivados da classe das espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos, com bons rendimentos, em curto espaço de tempo e com economia de reagentes (tabela 2.14).

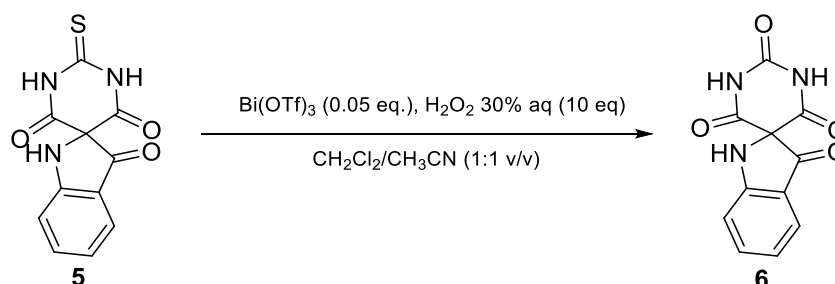
Tabela 2.14 - Resultados do processo de síntese dos derivados da espiroindolin-3-ona(tio)barbituratos.

N.º	Estrutura geral	substituintes				Tempo	η (%)
		X	R ₁	R ₂	R ₃		
1		O	H	H	H	30 min	77
2		O	H	H	Cl	60 min	90
3		O	H	Cl	Cl	60 min	91
4		O	H	Br	Br	10 min	85
5		S	COCH ₃	H	H	120 min	60
6		S	COC ₅ H ₁₁	H	H	60 min	80
7		S	COC ₆ H ₁₁	H	H	180 min	67

Recorreu-se a técnica de recristalização para a obtenção dos produtos com alto grau de pureza, tal como verificado pelos espectros de RMN de ¹H de ¹³C.

2.2.2.1. Espiroindolin-3-ona barbiturato 6

Para a síntese do espiroindolin-3-ona barbiturato **6**, a abordagem usada baseou-se no processo descrito por Wang *et al*⁷⁷, que consiste no uso do peróxido de hidrogénio em meio ácido, de modo a converter o tiocarbonilo no correspondente carbonilo, tendo sido usado neste trabalho um ácido de Lewis, concretamente, o triflato de bismuto (esquema 2.5 e tabelas 2.15 e 2.16).



Esquema 2.5- Síntese do derivado espiroindolin-3-ona barbiturato **6**.

O espectro de FTIR (tabela 2.15) mostra as bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula, onde se podem ver os sinais correspondentes aos NH e os grupos carbonilos das amidas e da indolinona. Verifica-se nos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C (tabelas 2.16 a 2.18) o desaparecimento do sinal a 179,66 ppm correspondendo ao átomo de carbono ligado ao átomo de enxofre e o aparecimento de um novo pico a 150,29 ppm, o que mostra a transformação esperada do tiocarbonilo ao correspondente carbonilo, o que confirma a estrutura do composto **6**.

Tabela 2.15- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para o composto **6**.

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	Rendimento (%)
6	3391,06 a 3081,62 (NH) 1762,82 a 1693,31 (C=O)	188-189	a)	90
a) Não descrito				

Tabela 2.16 - Dados de RMN de ¹H para a zona aromática do composto **6**.

Composto	5 -ArCH	7 -ArCH	4 -ArCH	6 -ArCH	Outros sinais
6	6,80 (ddd, <i>J</i> = 7,8; 7,0; 0,8 Hz, 1H, 5 -ArCH)	7,16 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H, 7 -ArCH)	7,42 (dt, <i>J</i> = 7,8; 0,9 Hz, 1H, 4 -ArCH),	7,56 (ddd, <i>J</i> = 8,4; 7,0; 1,4 Hz, 1H, 6 -ArCH),	11,62 (s, 2H, 1' e 3' -NH) 7,50 (s, 1H, 1 -NH)

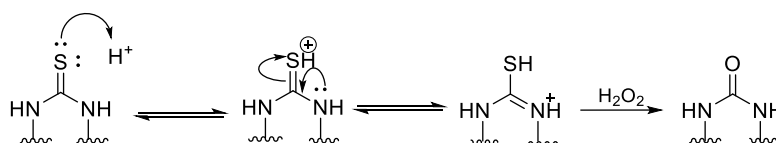
Tabela 2.17- Dados de RMN de ^{13}C para a zona aromática do composto 6.

Composto	(7a -ArC)	(6 -ArCH)	(4-ArCH)	(5 -ArCH)	(3a -ArC)	(7 -ArCH)
6	164,88	138,69	125,13	118,79	114,23	112,92

Tabela 2.18 - Dados de RMN de ^{13}C para a zona não aromática do composto 6.

Composto	3-CO	(4' e 6' -CO)	(2' CO)	(2, 5' -C)
6	189,41	163,80	150,29	77,84

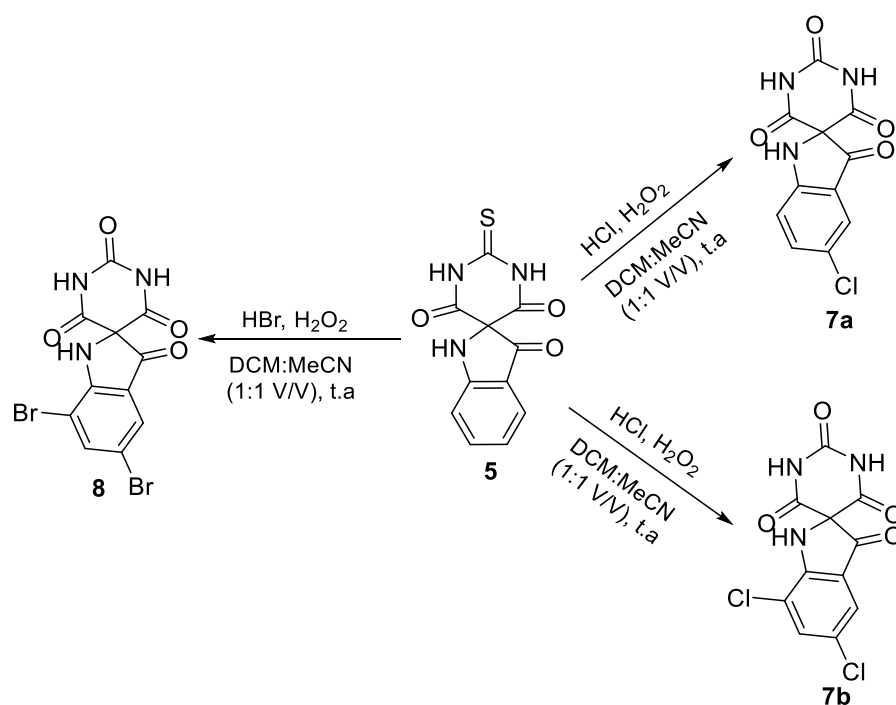
O tratamento de vários heterociclos contendo tiocarbonilos com peróxido de hidrogénio em meio ácido produz tanto um catião heteroaromático como o correspondente carbonilo (esquema 2.6). O resultado deve estar relacionado com características estruturais e eletrónicas. Substratos com anel benzénico ou a presença de grupos fortemente eletroatratores na molécula favorecem a formação do composto carbonílico, onde a presença do azoto trivalente favorece a formação de catiões aromáticos⁸⁰.



Esquema 2.6 - Mecanismo reacional para a conversão do grupo tio carbonilo a carbonilo (adaptado de⁸⁰).

2.2.2.2. Derivados halogenados 7 e 8.

Nas mesmas condições anteriormente descritas para a síntese do composto 6, mas ao invés de um ácido de Lewis usar-se um ácido mineral, no caso o ácido clorídrico ou ácido bromídrico, foi possível, para além de efetuar a dessulfurização do carbono 2', a inserção através de uma reação de substituição eletrofílica aromática de um ou dois átomos de cloro ou bromo, respetivamente, no anel aromático do material de partida (esquema 2.7). As condições para realizar estas reações foram descritas por Vyas *et al*⁷⁸, as mesmas permitiram obter rendimentos excelentes dos produtos (85 a 90%).



Esquema 2.7- Síntese dos derivados halogenados.

Verifica-se através dos espectros de FTIR dos derivados halogenados (tabela 2.19) sinais correspondentes aos principais grupos funcionais presentes na molécula. De maneira adicional, os espectros de RMN de ¹H e ¹³C mostram todos os sinais esperados para os derivados halogenados. Desta forma, no espectro de RMN de ¹H do composto **7a**, verifica-se o desaparecimento de um sinal na zona aromática comparando com o material de partida, correspondendo ao 5-C em que um átomo de hidrogénio é substituído por um átomo de cloro, enquanto que para os compostos **7b** e **8** desaparecem dois sinais na zona aromática nos 5-C e 7-C devido a substituição de dois hidrogénios por átomos de cloro e bromo, respectivamente (tabelas 2.20 a 2.22). Portanto, de acordo o espectro teoricamente previsto.

Tabela 2.19- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento dos derivados halogenados.

Composto	FTIR (bandas características em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Literatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimento (%)
7a	3597,84 a 3083,30 (NH) 1693,68 (C=O)	286-287,8	a)	90
7b	3332,15 a 3230,78 (NH) 1774,99 a 1698,21 (C=O)	301,2-302	a)	91
8	3588,52 a 3068,85 (NH) 1767,73 a 1697,22 (C=O)	299,2-299,7	a)	85
a) Não descrito				

Tabela 2.20 - Dados de RMN de ^1H para os derivados halogenados.

Composto	4 -ArCH	7 -ArCH	6 -ArCH	Outros sinais
7a	7,21 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H)	7,47 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H)	7,59 (dd, $J = 8,9, 2,3$ Hz, 1H)	11,66 (s, 2H, 1' e 3' -NH) 7,68 (s, 1H, 1 -NH)
7b	7,77 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	-	7,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	12,02 (s, 2H, 1', 3' -NH) 7,61 (s, 1H, 1 -NH)
8	7,74 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	-	8,14 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	12,02 (s, 2H, 1' e 3' -NH) 7,55 (s, 1H, 1 -NH)

Tabela 2.21 - Dados RMN de ^{13}C para a zona aromática dos derivados halogenados.

Composto	7a -ArCH	(6 -ArCH)	(7 -ArC)	(5 -ArC)	(3a ArC)	(4 -ArCH)
7a	163,72	138,67	124,11(ArCH)	122,79 (ArC _{Cl})	115,42	114,86
7b	159,17	137,44	117,52 (7ArC _{Cl})	123,78 (ArC _{Cl})	117,14	123,48
8	159,17	137,44	117,52 (7ArC _{Br})	123,78 (ArC _{Br})	117,14	123,48

Tabela 2.22 - Dados RMN de ^{13}C da zona não aromática dos derivados halogenados.

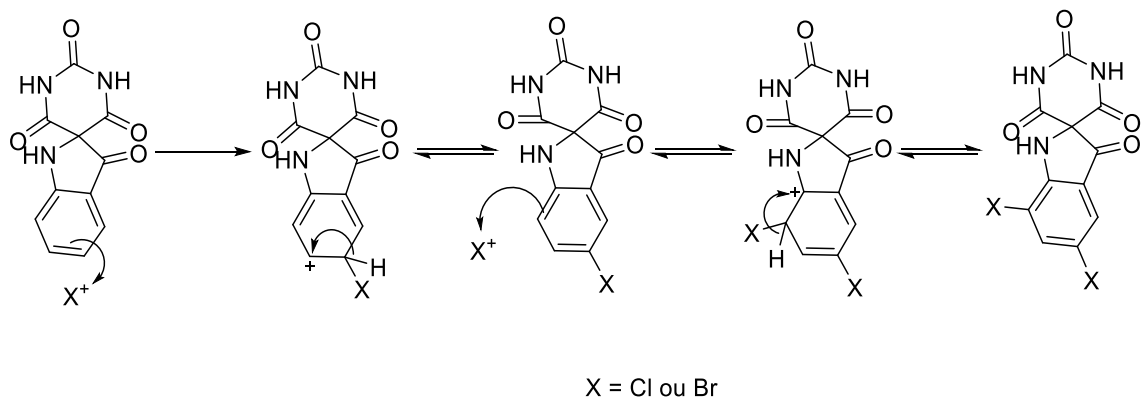
Composto	3 - $\underline{\text{C}}\text{O}$	(4' e 6' - $\underline{\text{C}}\text{O}$)	(2' - $\underline{\text{C}}\text{O}$)	(2,5' - $\underline{\text{C}}$)
7a	188,75	163,58	150,43	78,61
7b	188,15	162,82	149,86	77,54
8	188,15	162,82	149,86	77,54

Tabela 2.23 - Resumo da síntese dos derivados halogenados

Composto	Precursor	Solvente	Condições	Resultado
7a	5	DCM/MeCN (1:1)	HCl/H ₂ O ₂ t. a	Um único produto por ccf e RMN ^1H e ^{13}C
7b	5	DCM/MeCN (1:1)	HCl/H ₂ O ₂ t. a	Um único produto por ccf e RMN ^1H e ^{13}C
8a	5	DCM/MeCN (1:1)	HBr/H ₂ O ₂ t. a	Um único produto por ccf e RMN ^1H e ^{13}C

Neste tipo de reações, os compostos aromáticos com substituintes doadores de elétrons, como o OH⁻ e -NH₂ facilitam a reacção com misturas capazes de efetuar uma halogenação oxidativa (cloração ou bromação)^{78, 81}.

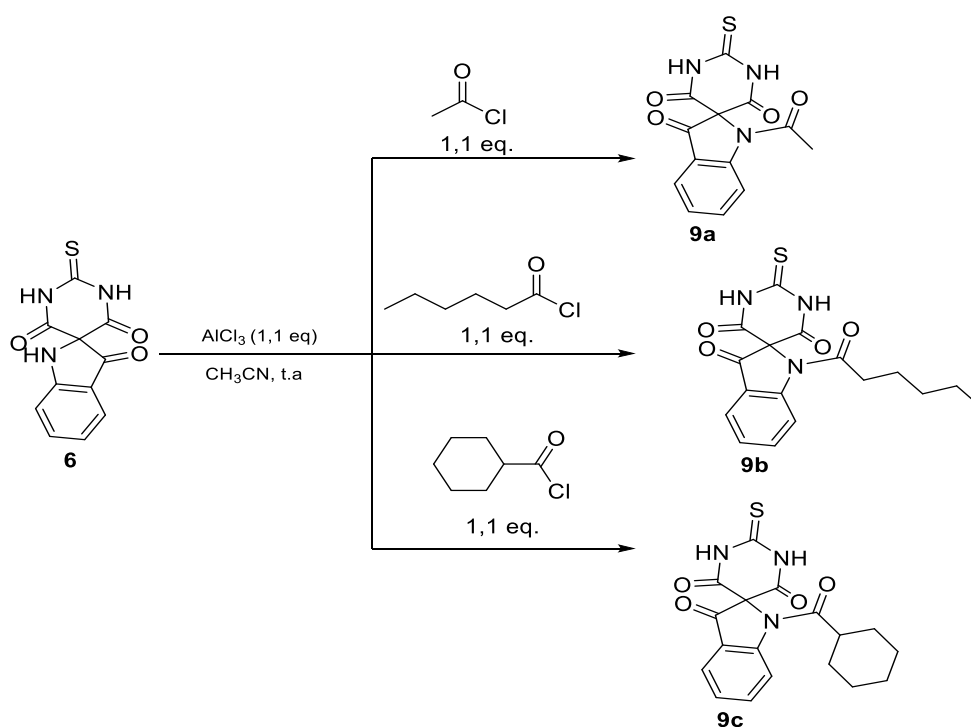
Verifica-se que nos derivados halogenados, os átomos de cloro e bromo foram adicionados em posições *orto* e *para* em relação à amina secundária ligada ao anel aromático, por esta ser um ativador *orto - para* forte e desativador *meta*, favorecendo principalmente o produto *para*-substituído. De facto, observou-se a formação primeiramente do derivado *para*-monossubstituído **7a**, e quando se duplicaram os equivalentes de ácido, verifica-se uma segunda introdução de halogéneo na posição *orto*, dando origem aos derivados **7b** ou **8** quando ao invés de ácido clorídrico se usou o ácido bromídrico, respectivamente. Tendo em conta os substituintes presentes no 3-oxindole, em que o carbonilo no carbono 3 é um desativador *meta* moderado e a amina secundária é um ativador *orto-para* forte, as posições favorecidas para a introdução de um electrófilo são nomeadamente o 5-C e o 7-C. No entanto, a primeira substituição ocorre primeiro no carbono 5 por este ser estereoquimicamente menos impedido, porém, aumentando o número de equivalentes de ácido clorídrico ou bromídrico, verifica-se uma segunda substituição no carbono 7 (esquema 2.8).



Esquema 2.8 - Mecanismo de formação dos derivados mono- e di-halogenados.

2.2.2.3. Derivados *N*-acilados 9

Para a obtenção dos derivados *N*-acilados foram utilizadas as abordagens metodológicas descritas por Tong *et al*⁷⁹, usando-se o tricloreto de alumínio como catalisador e acetonitrilo como solvente, por ser um solvente polar aprótico, tendo-se obtido os derivados *N*-acilados dos **9a-c** (esquema 2.9 e tabela 2.24) com rendimentos moderados (60-80%).



Esquema 2.9 - Síntese dos derivados *N*-acilados **9a-c**.

Tabela 2.24 - Resumo da síntese dos derivados *N*-acilados 9a-c.

Composto	Precursor	Solvente	Condições	Resultado
9a	5	MeCN	CH ₃ COCl/AlCl ₃ , t. a	Um único produto por ccf e RMN ¹ H e ¹³ C
9b	5	MeCN	CH ₃ (CH ₂) ₄ COCl/AlCl ₃ t. a	Um único produto por ccf e RMN ¹ H e ¹³ C
9c	5	MeCN	C ₆ H ₁₁ COCl/AlCl ₃ , t. a	Um único produto por ccf e RMN ¹ H e ¹³ C

Nos espectros de FTIR dos *derivados N-acilados* observam-se os sinais característicos dos principais grupos funcionais presentes na molécula (tabela 2.25). Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (tabelas 2.26 a 2.29) mostram todos os sinais esperados, verificando-se o desaparecimento de um sinal em relação ao material de partida correspondente ao protão ligado ao azoto da indolinona. As estruturas foram confirmadas também por recurso as técnicas bidimensionais de HSQC e HMBC. É de referir que os sinais dos hidrogénios e carbonos se encontram dentro dos desvios químicos esperados, correspondendo ao espectro teoricamente esperado.

Tabela 2.25- Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento dos derivados *N-acilados* 9a-c.

Composto	FTIR (bandas características em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Literatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimento (%)
9a	3307,43 a 3086,93 (NH) 1724,03 a 1698,52 (C=O) 1132,58 (C=S)	284,3-284,9		60
9b	3593,90 a 3092,02 (NH) 1724,45 a 1695,37 (C=O) 1162,99 (C=S)	207,6-208,7		80
9c	3157,26 (NH) 1704,45 (C=O) 1135,29 (C=S)	270,7-273,7		67

Tabela 2.26 - Dados de RMN de ¹H da zona alifática dos derivados *N*-acilados 9a-c.

Composto								2''-CH ₃	Outros sinais
9a	-							2,66 (s, 3H).	13,31 (s, 2H)
			6''-CH ₃	5''-CH ₂	3''-CH ₂	4''-CH ₂	2''-CH ₂		
9b	-		0,87, m (3H)	1,31, dt (J=7.0, 3,9 Hz, 2H)	1,61, t (J=7.1 Hz, 2H)	1,31, dt (J=7.0, 3,9 Hz, 2H)	2,98, dt (J = 7,1 Hz, 2H)		13,29 (s, 2H)
	2''-CH	7''e 3''-CH ₂	4'' e 6'' CH ₂	5''-CH ₂					
9c	3,27 (m, J = 12,2 Hz, 1H)	1,91 - 1,60 (m, 4H),	1,58 - 1,31 (m, 4H).	1,91 - 1,60(m, 2H),					13,27 (s, 2H),

Tabela 2.27 - Dados de RMN de ¹H da zona aromática dos derivados *N*-acilados 9a-c.

Composto	7a -ArC	(5 -ArCH)	(4 -ArCH)	(7-ArCH)	(3a ArC)	6-ArCH
9a	-	7,44 - 7,38 (m, 1H)	7,88 - 7,84 (m, 1H)	7,91 (d, J = 8,6 Hz, 1H),	-	7,98 (ddd, J = 8,5; 7,1; 1,4 Hz, 1H)
9b	-	7,41 (t, J = 7,5 Hz, 1H)	7,86 (dd, J = 7,8; 1,3 Hz, 1H)	7,90 (d, J = 8,7 Hz, 1H)	-	8,02 - 7,94 (m, 1H)
9c	-	7,41 (t, J = 7,5 Hz, 1H)	7,79 (d, J = 8,6 Hz, 1H)	7,86 (dd, J = 7,8; 1,4 Hz, 1H)	-	8,01 (ddd, J = 8,6; 7,2; 1,5 Hz, 1H)

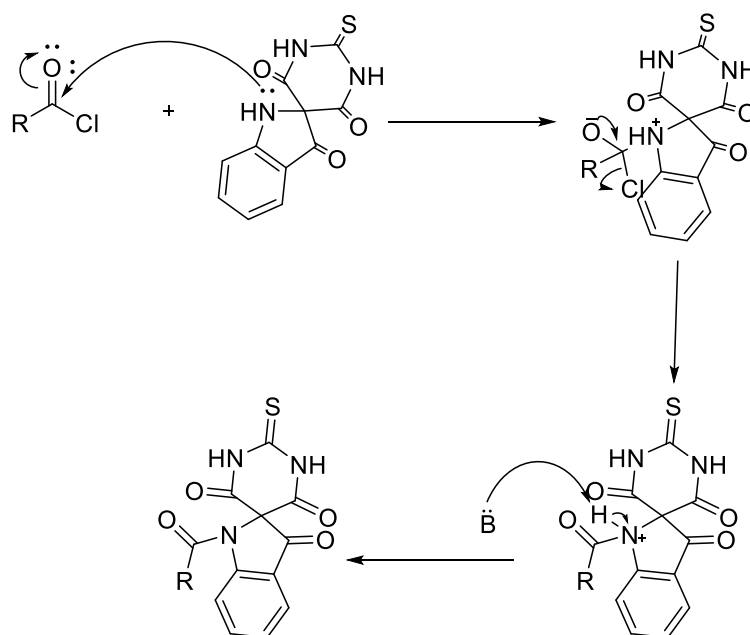
Tabela 2.28 - Dados de RMN de ^{13}C da zona aromática dos derivados *N*-acilados 9a-c.

Composto	7a -ArC	(6 -ArCH)	(4 -ArCH)	(5 -ArCH)	(3a ArC)	7-ArCH
9a	152,69	139,97	126,51	125,21	121,09	115,64
9b	152,47	139,98	126,48	125,08	121,19	115,93
9c	152,26	140,28	126,63	125,11	121,49	115,62

Tabela 2.29 - Dados de RMN de ^{13}C da zona não aromática dos derivados *N*-acilados 9a-c.

Composto	3 -C=O	2' -CS	1'' -NCO	(4' e 6' -C=O)	(2 e 5' -C)	Outros sinais
9a	185,96	178,65	167,52	160,21	76,34	24,38, s (CH ₃)
9b	189,73	178,07	170,23	160,28	76,36	35,41 (2'' -CH ₂); 30,39 (4'' -CH ₂); 23,28 (3'' -CH ₂); 21,96 (5'' -CH ₂); 13,87 (6'' -CH ₃)
9c	186,06	178,75	172,85	160,34	76,43	41,63 (2'' -CH); 27,99 (3'' e 7'' -CH ₂); 25,29 (5'' -CH ₂); 24,44 (4'' e 6'' -CH ₂)

O esquema 2.10 mostra o mecanismo reacional para a formação dos *derivados N-acilados*, em que a reação começa com o ataque nucleofílico da amina secundária ao carbonilo do cloreto de acilo, seguida de uma eliminação do anião cloreto que sai como grupo abandonador e terminando com a desprotonação, originando o produto final.



Esquema 2.10 - Mecanismo para a formação dos *derivados N-acilados* (adaptado de⁸²).

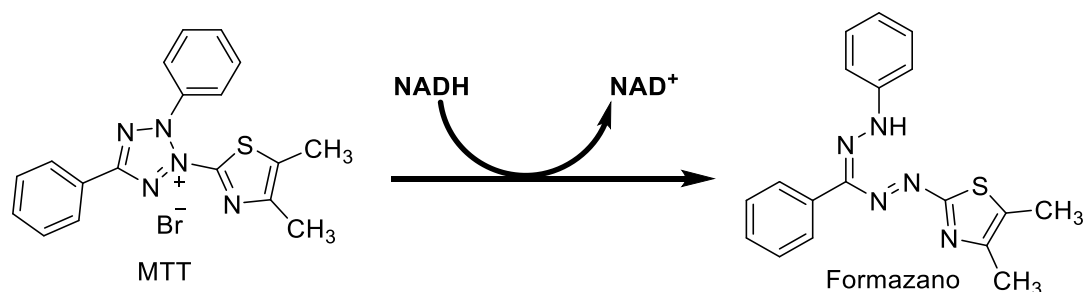
2.3. Avaliação biológica

No presente subcapítulo apresentam-se os resultados experimentais obtidos nos estudos de citotoxicidade e dos ensaios enzimáticos de inibição da atividade da XO. Será igualmente apresentada uma análise de REA para os compostos avaliados em relação a atividade na proliferação celular e inibição da XO.

2.3.1. Citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade dos derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos sintetizados usaram-se fibroblastos normais da derme humana (NHDF, do inglês, *Normal Human Dermal Fibroblasts*) mediante o ensaio MTT, após 72 horas de incubação com os compostos. O ensaio MTT consiste numa determinação colorimétrica realizada em placas de multipos, onde são medidas absorvâncias no fim do ensaio. Este método baseia-se na redução do brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-

il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pelas células viáveis, dando desta forma informações sobre o estado geral da viabilidade celular⁸³. Assim, células viáveis, com actividade mitocondrial efetiva convertem o MTT em formazano, um produto de cor púrpura com uma absorvância máxima próxima a 570 nm (esquema 2.12).



Esquema 2.11 - Redução do MTT ao produto púrpura (formazano) pela enzima redutase mitocondrial.

Os resultados (gráfico 3.1) mostram que quase todos os compostos submetidos a *screening* não reduzem marcadamente a proliferação celular, o que sugere que têm uma relativamente baixa citotoxicidade, o que é um indicador positivo no respeitante à sua potencial futura utilização pela sua atividade antimalárica e como inibidores da xantina oxidase.

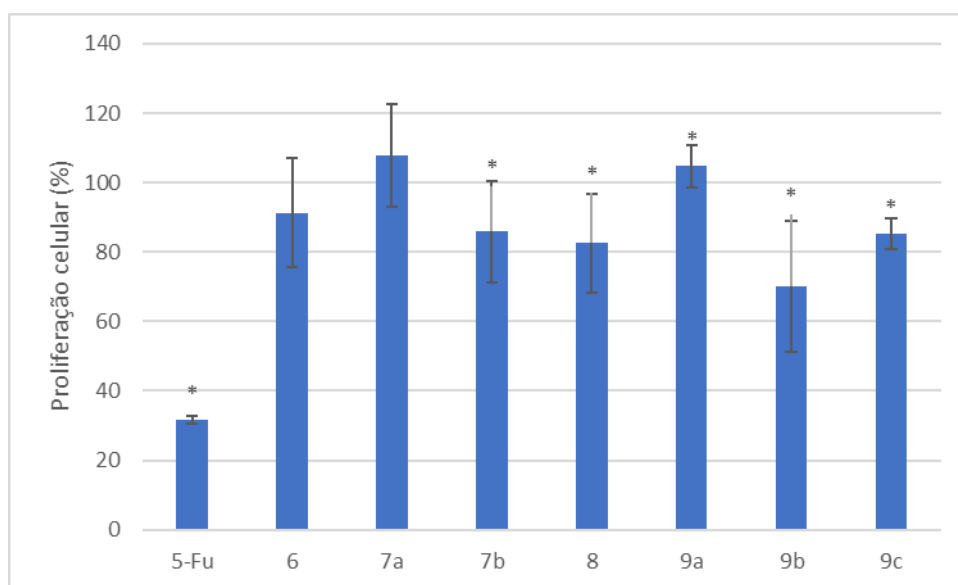


Gráfico 2.1 - Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF após 72 horas de exposição aos compostos 5-Fu, 7a, 6, 7b, 9a, 8, 9b e 9c a uma concentração de 30 µM. Os dados são apresentados na forma de valores médios com os respetivos desvios padrão e são representativos de pelo menos 2 experiências independentes realizadas. *p<0.05 em relação ao controlo negativo (Teste *t* de Student).

Estes resultados levaram a determinação do IC₅₀ para o composto 9a, tendo em conta que o mesmo apresentou percentagens de inibição da proliferação celular inferior a 50% num dos três ensaios realizados.

Tal como se verifica por análise dos resultados apresentados no gráfico 2.2 e na tabela 2.30 o composto **9a** não apresenta citotoxicidade significativa comparativamente ao 5-Fu que foi utilizado como controlo positivo, este resultado a semelhança dos apresentados acima é promissor, uma vez que o desejável é que os compostos não sejam citotóxicos, portanto constituindo-se desta forma num candidato promissor para atividade antimalárica e como inibidor da atividade da xantina oxidase.

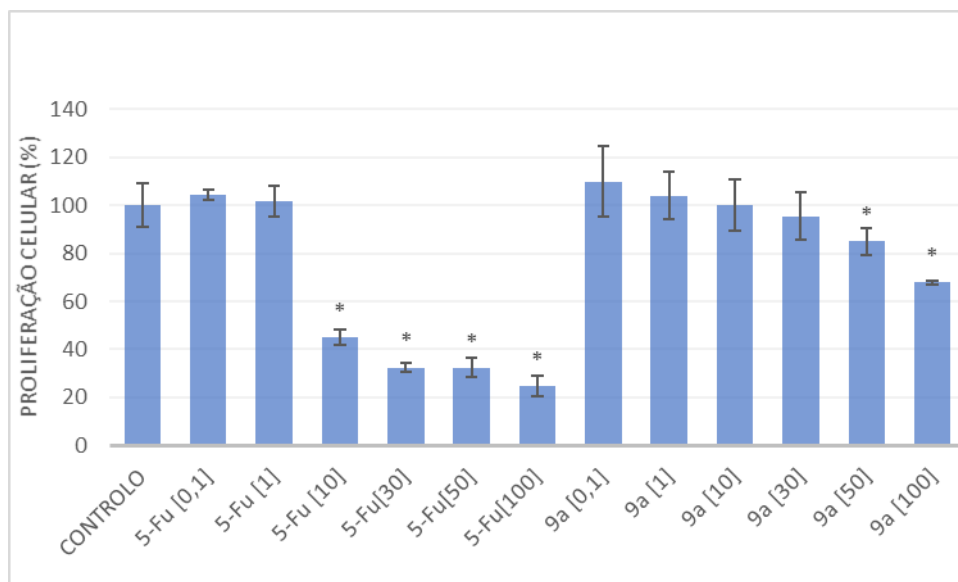


Gráfico 2.2- Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF após 72 horas de exposição aos compostos 5-fu e **9a** a várias concentrações, nomeadamente 0,1; 1, 10; 30 e 50 μM para determinação do IC_{50} . os dados são apresentados com os respetivos desvios padrão representativos das experiências independentes realizadas. * $P < 0,05$ em relação ao controlo (Teste t de Student).

Tabela 2.30- Dados dos IC_{50} determinados experimentalmente relativo a atividade antiproliferativa para o 5-fluoroacilo e o derivado espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato **9a**.

Composto	IC_{50}	R^2
5-Fu	4,744	0,975
9a	>100	0,7187

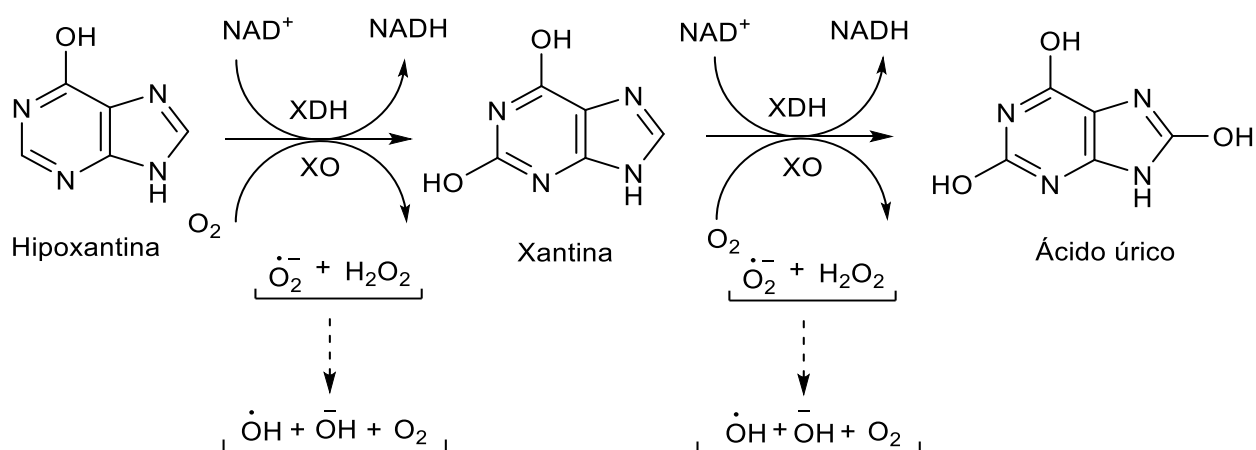
2.3.2. Determinação *in vitro* da atividade inibitória da Xantina Oxidase

A XO é uma flavoproteína complexa, constituída por duas subunidades idênticas e cataliticamente independentes de aproximadamente 145 kDa. Cada subunidade contém um centro de molibdénio, dois centros de ferro-enzofre (Fe-S) e uma flavina adenina dinucleótido (FAD)⁸⁴.

A XO é uma molibdoflavoproteína versátil, amplamente distribuída, com atividade altamente específica no fígado e no intestino humano, libertada para a corrente sanguínea após período de estresse metabólico. A enzima está envolvida no metabolismo das purinas através da hidroxilação oxidativa⁸⁵.

A hidroxilação oxidativa (esquema 2.13) abrange uma variedade de compostos heterocíclicos aromáticos e aldeídos, com destaque para a hidroxilação oxidativa da hipoxantina à xantina e da xantina ao ácido úrico que ocorre no centro de molibdénio da enzima, que é reduzido de Mo^{VI} a Mo^{IV} , e durante este processo formam-se espécies reativas de oxigénio - ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)⁸⁶

O ácido úrico é o produto final do catabolismo das purinas^{86a}, tanto as de origem endógena como das exógenas.



Esquema 2.12- Diagrama esquemático da hidroxilação oxidativa da hipoxantina a xantina e da xantina ao ácido úrico catalisada pela XO e formação de espécies reativas de oxigénio (adaptado de⁸⁴⁻⁸⁵).

Os fármacos usados para diminuir a produção do ácido úrico no organismo por inibição da XO e, desta forma, amenizar a condição patológica conhecida como gota e outras patologias (figura 2.3) são o alopurinol (**A**)⁸⁷ e o febuxostato (**B**)⁸⁸ e, mais recentemente, foi aprovado o topiroxostato (**C**)⁸⁴. No entanto, estes fármacos apresentam vários efeitos adversos, o que torna pertinente a procura por novos inibidores da XO mais eficazes, de fácil acesso e com menos efeitos colaterais.

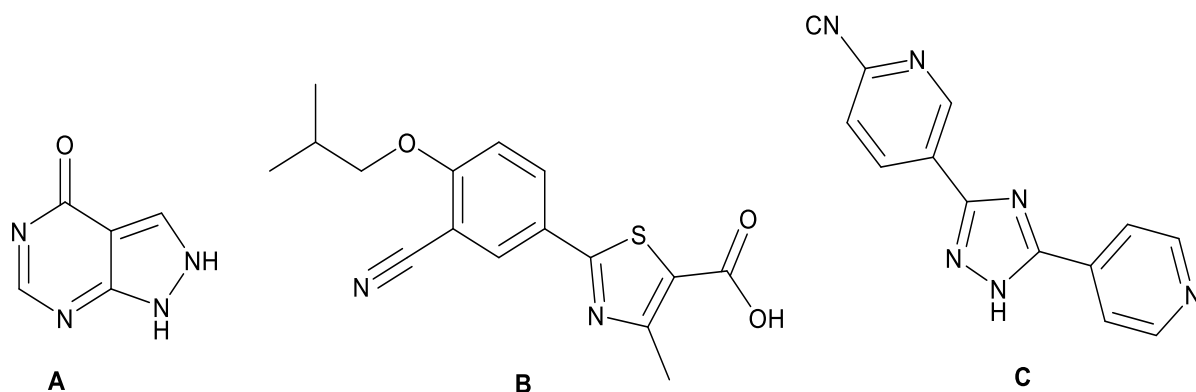


Figura 2.3 - Inibidores da XO usados clinicamente: allopurinol (A), febuxostato (B) e o recentemente aprovado topiroxostato (C).

Com base nas propriedades biológicas da família de compostos apresentados nesta dissertação e tendo em conta os resultados obtidos no ensaio enzimático *in vitro* de inibição da XO com uma série de barbituratos, levado a cabo por Figueiredo *et al*⁸⁹, no presente trabalho efetuou-se também o ensaio enzimático com os derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos sintetizados.

A capacidade inibitória da atividade da xantina oxidase é avaliada espectralmente, utilizando o allopurinol como controlo positivo e medindo os níveis de formação de ácido úrico a um comprimento de onda de 295 nm. De maneira a garantir o intervalo de concentração em que há linearidade de absorvância, teve-se em conta a curva de calibração construída por Figueiredo *et al*⁸⁹ para várias concentrações de ácido úrico a 295 nm, observando-se haver linearidade pelo menos entre 1,5 e 400 μM (gráfico 2.3).

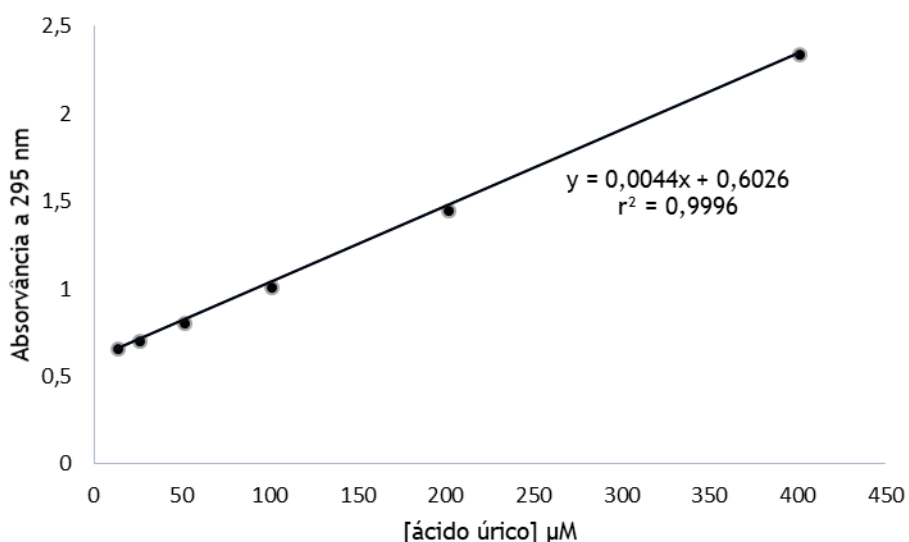


Gráfico 2.3 - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm, com respetiva equação da reta e r^2 .

Um *screening* inicial foi efetuado a uma concentração de 30 μM para cada composto tendo como base as condições estabelecidas por Zhao *et al*⁹⁰ e a metodologia de Gupta *et al*⁹¹.

Os resultados mostram (gráfico 2.4) que os compostos **7a**, **7b** e **8** apresentam inibições acima dos 50% em que os derivados espiroindolin-3-ona barbiturato **7b** e **8** apresentam mesmo inibições superiores ao controlo positivo (alopurinol).

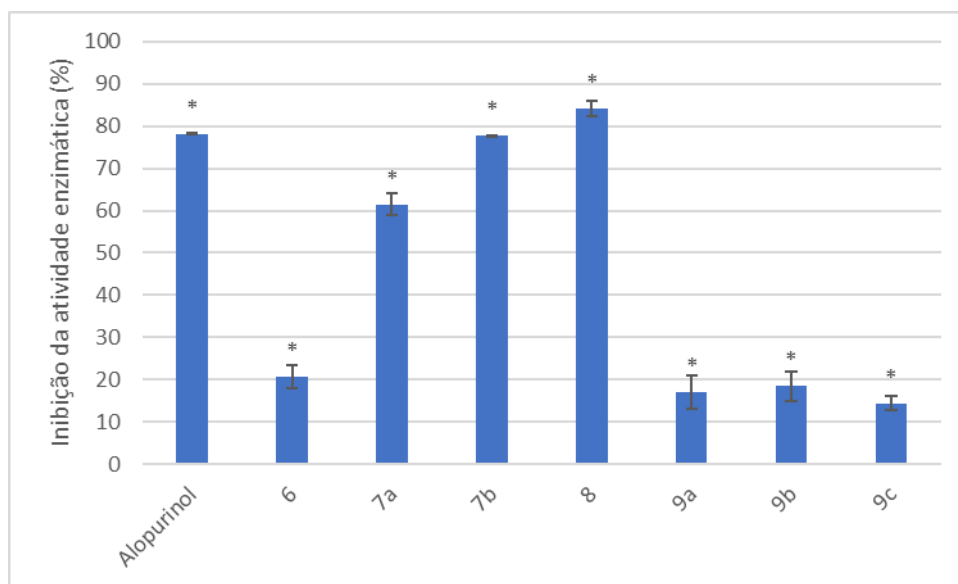


Gráfico 2.4 - Percentagem de inibição da XO em relação ao controlo positivo (alopurinol) dos compostos **7a**; **6**; **7b**; **9a**; **8**; **9b** e **9c**, a uma concentração de 30 μM. Os dados são apresentados na forma de média com os respetivos desvios padrão e são representativos das experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste *t* de Student).

Verifica-se igualmente que (gráfico 2.4) os derivados *N*-acilados (**9a**, **9b** e **9c**) apresentam inibições baixas relativamente aos derivados halogenados (**7a**, **7b** e **8**), o que mostra que o hidrogénio ligado

ao nitrogênio do indole é importante para a capacidade inibitória da atividade da enzima. O espiro barbiturato não substituído no anel aromático, **6**, apresenta uma percentagem de inibição baixa relativamente aos derivados halogenados, levando desta forma a concluir que a introdução de cloro e bromo potencia a capacidade inibitória dos espiroindolin-3-ona barbituratos.

O gráfico 2.5 mostra que os compostos **7b** e **8** possuem um perfil de inibição da atividade da XO ao longo do tempo semelhante ao alopurinol, ou seja, a capacidade inibitória vai aumentando com o passar do tempo até num determinado instante e daí em diante permanece constante e/ou baixa ligeiramente.

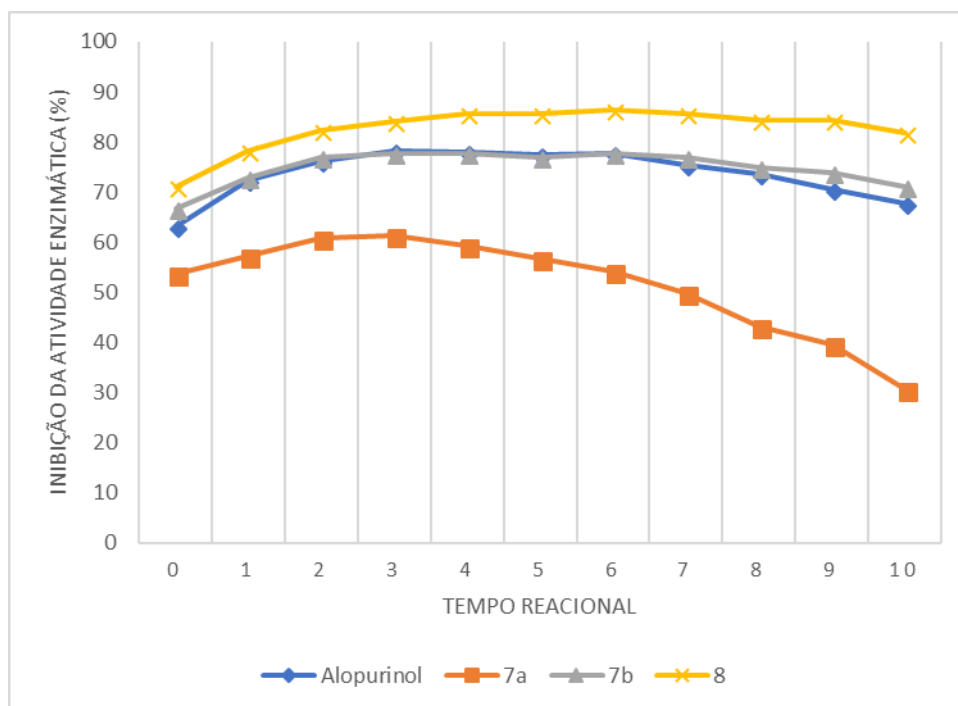


Gráfico 2.5 - Percentagem de inibição da enzima XO em função do tempo de reação para o alopurinol e os compostos **7a**, **7b** e **8** a uma concentração de 30 μM .

Estes resultados levaram à determinação do IC_{50} para os compostos **7a**, **7b** e **8**, visto que os mesmos apresentam percentagens de inibição acima dos 50%. Tal como indicado na tabela 2.31, verifica-se que os compostos **7b** (3,84 μM) e **8** (4,64 μM) apresentam valores de IC_{50} mais baixos que o do alopurinol (9,42) que foi usado como controlo positivo e está de acordo com a bibliografia consultada que apresenta um valor de 11,10 μM ⁹².

Tabela 2.31 - Dados dos IC₅₀ determinados experimentalmente para a inibição da enzima XO para o alopurinol e os derivados espiroindolin-3-ona barbituratos 7a, 7b e 8.

Composto	IC ₅₀	R ²
Alopurinol	9,42 μ M	0,9952
7a	14,13 μ M	0,9589
7b	3,84 μ M	0,9024
8	4,64 μ M	0,9985

2.3.3. Atividade antimalárica

No âmbito da avaliação de atividade biológica *in vitro* e *in vivo* dos derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos, procedeu-se ao envio de cinco amostras para a Universidade de Liverpool, UK, concretamente para o grupo de investigação coordenado pelo Professor Doutor Paul O'Neil, tendo sido selecionados os compostos que apresentaram melhores resultados na triagem *in silico*, tendo em atenção tanto os resultados do *docking* molecular como da predição das propriedades ADMET. Desta forma, foram selecionados os seguintes protótipos: L17, L18, L22, L36 e o L57 (anexo 2), para ensaio de inibição do crescimento de estirpes de *Plasmodium falciparum*.

2.3.4. REA

Com base nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* de inibição da XO, foi possível obter dados relevantes de REA para os derivados espiroindolin-3-ona relativos à sua capacidade de inibição. A figura 2.4 mostra a estrutura geral dos derivados espiroindolin-3-ona(tio)barbituratos.

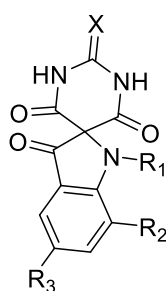


Figura 2.4 - Estrutura geral dos derivados espiroindolin-3-ona (tio)barbituratos.

De facto, por comparação dos resultados obtidos entre os derivados 7a e 7b, verifica-se que o derivado diclorado apresenta maior capacidade inibitória da XO em relação ao derivado monoclorado. Verifica-se igualmente que entre os derivados dihalogenados, o dibromado é melhor que o diclorado, apesar de as diferenças não serem grandes. Além disso, no geral, os derivados sem o hidrogénio ligado ao átomo de azoto da indolinona apresentam percentagens de inibição muito

baixas, o que indica a importância deste hidrogénio para a capacidade inibitória da XO. Entretanto, para a citotoxicidade observa-se o contrário, ou seja, os resultados mostram que os derivados substituídos no nitrogénio 1 são mais citotóxicos, porém, dentro dos derivados *N*-acilados, as que possuem os grupos acetilo e o ciclohexanoílo apresentam maior citotoxicidade em relação a que possui o grupo hexanoílo. Verifica-se também que os compostos tiocarbonílicos são mais citotóxicos em relação aos correspondentes carbonílicos.

3. Conclusões e perspectivas futuras

O presente trabalho teve como foco a descoberta de novos compostos contendo o núcleo espiroindolin-3-ona, que se constituíssem como potenciais agentes antimaláricos e adicionalmente como inibidores da atividade da xantina oxidase. Desta forma foi inicialmente avaliada a capacidade de inibir a proteína falcipaina-2 por *docking* molecular, e ainda foi realizada a previsão *in silico* das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes, onde ficou demonstrado que os mesmos possuem uma grande capacidade de se ligar a proteína falcipaina-2 e adicionalmente, satisfazem os critérios relevantes de *drug-likeness*.

No seguimento desta avaliação inicial *in silico* foi realizada a síntese de uma série de espiroindolin-3-ona(tio)barbituratos representativos, envolvendo reações de substituição eletrofílica aromática, dessulfurização oxidativa e *N*-acilação, tendo posteriormente sido avaliadas as atividades biológicas dos mesmos.

De uma maneira geral, as reações processaram-se com bons rendimentos e em condições relativamente suaves, tendo os produtos obtidos sido caracterizados por espectroscopia de FTIR, RMN de ^1H e ^{13}C .

A avaliação da toxicidade em células NHDF mostrou que os compostos não possuem efeitos citotóxicos marcados nestas células normais, uma vez que a 30 μM quase todos apresentaram valores de proliferação celular superiores a 50%, o que se constitui num resultado bastante positivo, uma vez que se esperava que os mesmos não fossem citotóxicos, mas sim potenciais candidatos a inibidores da atividade da XO e potenciais agentes antimaláricos.

No que diz respeito á inibição da atividade da XO, dois dos compostos sintetizados mostraram capacidades significativas, até superiores ao alopurinol. Concretamente e num *screening* inicial realizado a uma concentração de 30 μM , o alopurinol apresentou uma percentagem de inibição máxima de 78 %, e os derivados espiroindolin-3-ona barbituratos **7b** e **8**, 78 % e 86 %, respetivamente. Estes resultados levaram a construção de curvas concentração-resposta de modo a calcular os valores de IC_{50} , os resultados são bastante promissores uma vez que para o ensaio enzimático obtiveram-se para os compostos **7a**, **7b** e **8** os seguintes valores de IC_{50} : 14,13 μM , 3,84 μM e 4,64 μM , respetivamente, que em comparação com o valor obtido para o alopurinol, 9,42 μM que está de acordo com a bibliografia consultada, verifica-se que os compostos **7b** e **8** apresentam valores de IC_{50} duas vezes menor em relação ao alopurinol que é um fármaco largamente utilizado para o tratamento da gota.

Relativamente à capacidade de inibição da atividade da XO, e de acordo com os resultados obtidos, perspetivamos que num futuro próximo se faça um estudo mais pormenorizado de cinética enzimática de modo a se perceber o mecanismo de inibição dos derivados **7b** e **8**. Adicionalmente, e tendo em conta que na hidroxilação oxidativa dos compostos purínicos pela XO são libertados ROS, avaliar o potencial antioxidante dos derivados espiro(tio)barbituratos destes e doutros análogos a

serem preparados, de forma a se poderem chegar a novas alternativas mais potentes e com menos efeitos adversos para o tratamento da gota.

No que diz respeito á atividade antimalária, espera-se que os resultados que se venham a obter das 5 amostras representativas enviadas para a Universidade de Liverpool, as quais serão testadas em ensaio de inibição do crescimento de estirpes de *Plasmodium falciparum*, venham a confirmar os resultados obtidos através dos estudos *in silico*, e que, num futuro próximo se possam avaliar um conjunto mais alargado de espiro(tio)barbituratos de forma a permitir-nos realizar uma relação estrutura-atividade que nos conduzam a novas alternativas para o tratamento da malária.

4. Parte experimental

A apresentação do trabalho experimental, cujos resultados foram discutidos no capítulo anterior, será pormenorizada na seguinte sequência:

- Síntese (reagentes e equipamento; procedimento experimental).
- Estudos *in silico* (docking molecular; predição das propriedades farmacocinéticas).
- Avaliação biológica.

4.1. Síntese

4.1.1. Reagentes e equipamento

Todos os reagentes e solventes utilizados eram analiticamente puros, e foram adquiridos comercialmente através da *Sigma Aldrich*.

Para as reações que foram seguidas por ccf, utilizaram-se placas de alumínio de 0,2 mm revestidas com sílica-gel (Macherey-Nagel 60 G/UV₂₅₄).

O acompanhamento e controlo das reações foram efetuados por cromatografia em camada fina (“Thin Layer Chromatography”, TLC), o eluente é referido em cada caso, mencionando-se a proporção volumétrica dos vários componentes dos eluentes mistos. Após eluição, as placas foram visualizadas a 254 e/ou 365 nm.

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram obtidos num aparelho “Melting Point Apparatus SMP3, da Bibby Stuart Scientific”.

Os espectros de FTIR foram registados num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR, obtidos por reflectância total atenuada (ATR- do inglês, *Attenuated Total Reflectance*) e software Omnic 8.2, segundo as principais definições de: background com 64 scans; amostra com 32 scans; resolução de 4 cm⁻¹, entre 4000 e 600 cm⁻¹.

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram efetuados num espectrómetro Brüker Avance III 400 MHz (400,13 e 100,62 MHz, respetivamente), sendo processados no *software* Topspin 3.1. Foram utilizados como solvente o DMSO-*d*₆ (dimetilsulfóxido hexadeuterado), sendo ainda utilizados como padrão interno (DMSO-*d*₆, δ = 2,50 ppm e 39,52 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente). Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: para RMN de ¹H - solvente; desvio químico; multiplicidade do sinal (s, d, dd, ddd, t, dt ou m); constante de acoplamento; atribuição do protão na molécula; para RMN de ¹³C - solvente; desvio químico; atribuição do carbono na molécula.

Os espectros foram processados por recurso ao *software* MestReNova® V9.0.1-13254 e ChemBioOffice® V14.0.0.117.

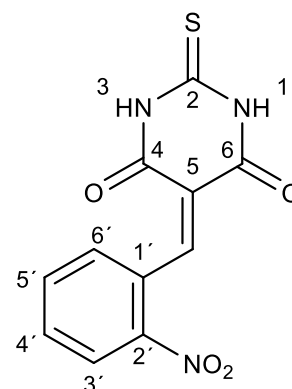
As estruturas químicas apresentadas referentes às reações realizadas foram desenhadas utilizando o *software* ChemBioOffice® V14.0.0.117.

4.1.2. Procedimento experimental

4.1.2.1. Síntese do intermediário 2-nitro-5-benzilidenopirimidina 3

Uma mistura de ácido (tio) barbitúrico 1 (1 mmol) e 2-nitrobenzaldeído 2 (1 mmol) em água (5 mL) foi colocada sob refluxo em banho de parafina durante cerca de 2 horas.

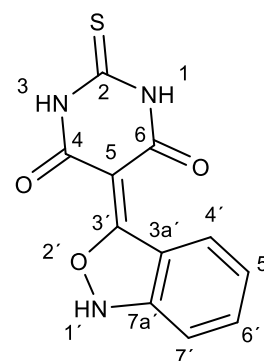
Obteve-se o produto através da filtração após o arrefecimento da mistura reacional, sendo o mesmo lavado com água, etanol e éter etílico, obtendo-se o 2-nitro-5-benzilidenopirimidina⁹³. ($\eta = 90\%$) FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3255 (N-H), 3156 (N-H), 2876, 1718 (C=O), 1692 (C=O), 1626, 1540, 1513 (NO₂), 1439, 1351 (NO₂), 1288, 1203, 1141, 785, 759, 732, RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12,56 (s, 1H, NH), 12,33 (s, 1H, NH), 8,63 (s, 1H, 5-CCH), 8,24 (dd, 1H, *J* = 8,3, 1,0 Hz, 3'-ArCH), 7,80 (td, 1H, *J* = 7,6, 1,1 Hz, 5'-ArCH), 7,72 - 7,66 (m, 1H, 4'-ArCH), 7,62 (dt, 1H, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 6'-ArCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 179,05 (2-CS), 160,63 (CO), 159,18 (CO), 153,31 (5-CCH), 146,28 (2'-ArC), 133,77 (5'-ArCH), 131,57 (1'-ArC), 130,48 (4'-ArCH), 130,39 (6'-ArCH), 124,08 (3'-ArCH), 120,60 (5-C); SMILES S=C(NC(/C1=C/C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2)=O)NC1=O.



4.1.2.2. Síntese do intermediário benzisoxazole 4

Uma mistura de 5-benzilidenopirimidina 3 (1 mmol), cloreto de estanho dihidratado (1,5 mmol) e ácido clorídrico concentrado (1,1 mL) em THF (10 mL) foi colocada em refluxo adaptado de ⁹³.

Após 10 minutos filtrou-se o precipitado obtido e lavou-se com etanol e éter etílico a frio, obtendo-se o intermediário benzisoxazole. ($\eta = 90\%$) sólido amarelo escuro; pf 207-208 °C dec⁷⁶.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3200 a 2200, 3381 (N-H), 2879, 2709, 1664 (C=O), 1607, 1506, 1466, 1357 (C-O), 1282, 1251 (C-O), 1164 (C=S), 1005, 939, 907, 785, 754, 714; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 11,31 (s, 2H, 1' e 3'-NH), 7,84 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, 4-ArCH), 7,38 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, 7-ArCH), 7,25 (dd, 1H, *J* = 9,0, 6,3 Hz, 6-ArCH), 6,79 (dd, 1H, *J* = 8,8, 6,3 Hz, 5-ArCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 174,46 (2'-CS), 166,07 (3-C), 161,01 (4' e 6'- CO), 156,28 (7a-ArC), 130,26 (6-ArCH), 125,43 (4-ArCH), 119,29 (5-ArCH), 114,18 (3a-C), 113,12 (7-ArCH), 84,99 (2,5'-C); ES MS: m/z encontrado 262,0281 (M+H)⁺ e 284,0100 (M+Na)⁺ [calculado para C₁₁H₈N₃O₃S⁺ (M+H)⁺ 262,02809];

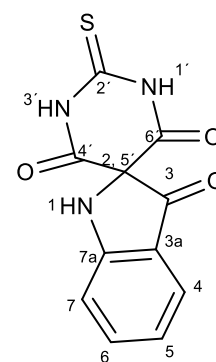


SMILES S=C(NC(C12C(O)=C(C=CC=C3)C3=N2)=O)NC1=O.

4.1.2.3. Síntese do espiroindolin-3-ona tiobarbiturato 5

Uma solução de benzisoxazole 4 (1 mmol) em DMF seco (2,61 mL) foi colocada a 140 °C em banho de parafina. A reação completou-se em 2 minutos após a dissolução do material de partida, de acordo com a monitorização por ccf, em sílica gel usando-se como eluente uma mistura de Diclorometano: Metanol (9:1).

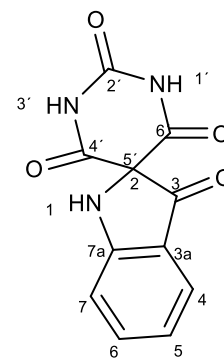
A mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e dissolvida em acetato de etilo, filtrou-se o precipitado e a fase orgânica foi evaporada à securo, em seguida adicionou-se água para precipitar o produto que foi filtrado e lavado com água e éter etílico, obtendo-se cristais castanhos em agulha. (η = 80%), pf: ; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3099, 3027, 2869, 1687, 1644, 1616, 1574, 1525, 1482, 1422, 1382, 1269, 1225, 1201, 1139, 1096, 850, 745, 637; RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 12,63 (s, 2H, 1' e 3'-NH), 7,57 (ddd, 1H, J = 8,4, 7,0, 1,3 Hz, 6-ArCH), 7,47 (s, 1H, 1-NH), 7,42 (dt, 1H, J = 7,9, 0,7 Hz, 4-ArCH), 7,17 (dt, 1H, J = 8,3, 0,9 Hz, 7-ArCH), 6,81 (ddd, 1H, J = 7,8, 7,0, 0,9 Hz, 5-ArCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 189,32 (3-CO), 179,66 (2'-CS), 164,99 (7a-ArC), 162,42 (4',2'-CO), 138,94 (6-ArCH), 125,35 (4-ArCH), 119,07 (5-ArCH), 114,27 (3a-ArC), 113,18 (7-ArCH), 78,33 (2,5'-C); SMILES S=C(NC(C12C(C(C=CC=C3)=C3N2)=O)=O)NC1=O).



4.1.2.4. Síntese do derivado barbitúrico 6

Uma solução de espiroindolin-3-ona tiobarbiturato 5 (1 mmol), triflato de bismuto (5 mol%) e peróxido de hidrogénio (10 mmoles) em diclorometano/acetonitrilo (1:1 v/v) foi posta a reagir a temperatura ambiente. Após aproximadamente cerca de 1 hora, a reação completou-se, tendo sido monitorizada por ccf, em sílica gel usando-se como eluente uma mistura de Diclorometano: Metanol (9:1).

A mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, extraída com acetato de etilo, lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, seca em Na_2SO_4 anidro e posteriormente recristalizada em acetato de etilo e éter de petróleo, filtrada e lavada com éter etílico, tendo sido obtido o espiroindolin-3-ona barbiturato, 6. (η = 73 %). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3391,06; 3081,62; 2861,30; 1762,82; 1693,31; 1609,28; 1589,84; 1486,22; 1464,98; 1367,09; 1325,90; 1267,46; 1243,67; 1192,41, 1141,89; 1102,03; 1046,78; 951,80; 899,23; 846,84; 750,44; 668,56. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,62 (s, 2H, 1' e 3'-NH); 7,56 (ddd, J = 8,4; 7,0; 1,4 Hz, 1H, 6-ArCH); 7,50 (s, 1H, 1-NH); 7,42 (dt, J = 7,8; 0,9 Hz, 1H, 4-ArCH); 7,16 (d, J = 8,3 Hz, 1H, 7-ArCH); 6,80 (ddd, J = 7,8; 7,0; 0,8 Hz, 1H, 5-ArCH); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 189,41 (3-CO),



164,88 (7a -ArCH), 163,80 (4' e 6' -CO), 150,29 (2' CS), 138,69 (6 -ArCH), 125,13 (4-ArCH), 118,79 (5 -ArCH), 114,23 (3a -ArC), 112,92 (7 -ArCH), 77,84 (2, 5' -C).

SMILES: O=C(NC1=O)NC(C1(C2=O)NC3=C2C=CC=C3)=O.

4.1.2.5. Síntese dos derivados halogenados

Condições reacionais A: Uma solução de espiroindolin-3-ona tiobarbiturato **5** (1 mmol), ácido clorídrico e peróxido de hidrogénio em diclorometano/acetonitrilo (1:1 v/v) foi deixada a reagir a temperatura ambiente. Após aproximadamente cerca de 1 hora, a reação completou-se, tendo sido monitorizada por ccf, em sílica gel usando-se como eluente uma mistura de Diclorometano: Metanol (9:1).

Após o término da reação, a mistura reacional foi concentrada a pressão reduzida, extraída com acetato de etilo, lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, seca em Na₂SO₄ anidro e posteriormente recristalizada em éter de petróleo e acetato de etilo, filtrada e lavada com éter etílico.

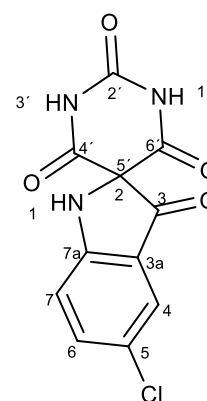
Condições reacionais B: Uma solução de espiroindolin-3-ona tiobarbiturato **5** (1 mmol), ácido bromídrico e peróxido de hidrogénio em diclorometano/acetonitrilo (1:1 v/v) foi deixada a reagir a temperatura ambiente. Após aproximadamente cerca de 1 hora, a reação completou-se, tendo sido monitorizada por ccf, em sílica gel usando-se como eluente uma mistura de Diclorometano: Metanol (9:1).

Após o término da reação faz-se o isolamento de acordo com os procedimentos descritos nas condições A.

5-Cloro-2'H-espiro (indolin-2,5'-pirimidina) - 2',3,4',6'(1'H,3'H)-tetraona (7a)

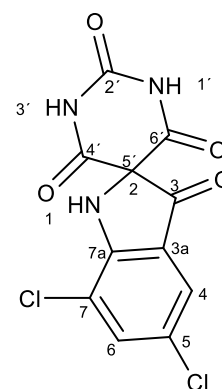
Para esta síntese usaram-se as condições reacionais A, ácido clorídrico (5 mmol) e peróxido de hidrogénio (10 mmol). (η = 90 %). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3597,84; 3376,58; 3308,17; 3215,18; 3083,30; 2850,01 1693,69; 1610,13; 1473,79; 1415,81; 1396,35; 1347,99; 1194,20; 1166,07; 970,28; 833,67; 692,91. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,66 (s, 2H, 1' e 3' -NH); 7,68 (s, 1H, 1 -NH); 7,59 (dd, J = 8,9; 2,3 Hz, 1H, 5 -ArCH); 7,47 (d, J = 2,2 Hz, 1H, 7 -ArCH); 7,21 (d, J = 8,8 Hz, 1H, 4 -ArCH); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 188,75 (3 -CO); 163,72 (7a -ArCH); 163,58 (4' e 6' -CO); 150,43 (2' -CO); 138,67 (7 -ArCH); 124,11(6 -ArCH); 122,79 (4 -ArCH); 115,42 (3a -ArC); 114,86 (5-ArC); 78,61 (2,5' -C).

SMILES: O=C(NC1=O)NC(C1(C2=O)NC3=C2C=C(Cl)C=C3)=O.



5,7-Dicloro-2'H-espiro (indolin-2,5'-pirimidina)-2',3,4',6'(1'H,3'H)-tetraona (7b)

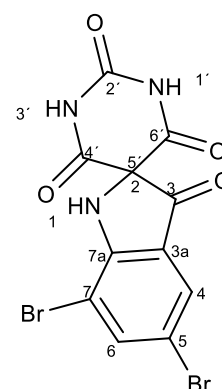
Para esta síntese usaram-se as condições reacionais A, ácido clorídrico (10 mmol) e peróxido de hidrogénio (10 mmol). ($\eta = 91 \%$) FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3332,15; 3230,78; 2827,44; 1774,99; 1698,21, 1611,43; 1575,95; 1478,75; 1391,34; 1347,15, 1312,48, 1282,61; 1178,80; 970,10; 953,54; 885,62; 875,01; 775, 99; 723,18; 678,74. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.02 (s, 2H, 1' e 3'-NH), 7.96 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 7 -ArCH), 7.77 (s, 1H, -NH), 7.61 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 4 -ArCH); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 188.15 (3 -CO), 162.82 (4' e 6' -CO), 159.17 (7a -ArCH), 149.86 (2' -CO), 137.44 (7 -ArC $\underline{\text{Cl}}$), 123.78 (6 -ArC), 123.48 (4 -ArCH), 117.52 (5 -ArC $\underline{\text{Cl}}$), 117.14 (3a -ArC), 77.54 (2, 5' -C).



SMILES: O=C(NC1=O)NC(C1(C2=O)NC3=C2C=C(Cl)C=C3Cl)=O.

5,7-Dibromo-2'H-espiro (indolin-2,5'-pirimidina)]2',3,4',6'(1'H,3'H)-tetraona (8)

Para esta síntese usaram-se as condições reacionais B, ácido bromídrico (2 mmol) e peróxido de hidrogénio (10 mmol). ($\eta = 85 \%$). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3588,52; 3390,95; 3357,81; 3211,23, 3068,85; 2841,26; 1767,73; 1697,22, 1604,39; 1469,25, 1420,64; 1388,51, 1351,19; 1304,79; 1277,71; 1225,32; 1187,77; 1163,64; 967,35; 694,04. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,02 (s, 2H); 8,14 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 7,74 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 7,55 (s, 1H) ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 188,15 (3 -CO); 162,82 (4' e 6' -CO); 159,17 (7a -ArCH); 149,86 (2' -CO); 137,44 (7 -ArC $\underline{\text{Br}}$), 123,78 (6 -ArC), 123,48 (4 -ArCH), 117,52 (5 -ArC $\underline{\text{Br}}$); 117,14 (3a -ArC); 77,54 (2, 5' -C). SMILES: O=C(NC1=O)NC(C1(C2=O)NC3=C2C=C(Br)C=C3Br)=O.



4.1.2.6. Síntese dos derivados N-acilados

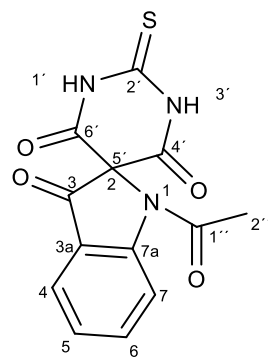
Uma solução de espiroindolin-3-ona (tio)barbiturato 5 (1 mmol), cloreto de alumínio (1,1 mmol) e cloreto de acilo (1,1 mmol) em acetonitrilo foi deixada a reagir a temperatura ambiente sob agitação magnética. Após aproximadamente cerca de 2 horas, a reação completou-se, tendo sido monitorizada por ccf, em sílica gel usando-se como eluente uma mistura de Diclorometano:Metanol (9:1).

Após o término da reação, filtrou-se o precipitado e lavou-se primeiramente com uma solução de ácido clorídrico 2 M e posteriormente com uma solução saturada de bicarbonato de sódio.

1-Acetil-2'-tioxo-2',3'-dihidro-4'H-espiro (indolin-2,5'-pirimidina)-3,4',6'(1'H)-triona (9a)

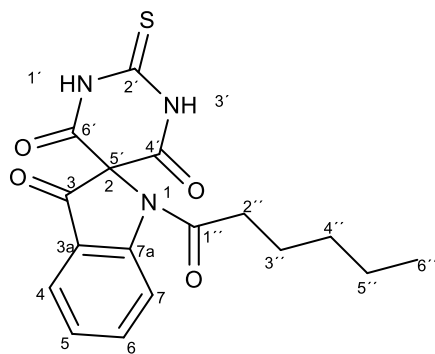
Sólido branco, (η = 60 %). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3307,43; 3086,96; 1724,03; 1698,52; 1635,10; 1606,60; 1590,95; 1470,39; 1379,69; 1353,63; 1336,69; 1306,38; 1263,03; 1185,70; 1164, 95; 1132,58; 756,22. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.31 (s, 2H), 7.98 (ddd, J = 8.5, 7.1, 1.4 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.88 - 7.84 (m, 1H), 7.44 - 7.38 (m, 1H), 2.66 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) 185,96 (3- C_O); 178,65 (2'- C_S); 167,52 (1''- N_CO); 160,21 (4' e 6' - C_O); 152,69 (7a-Ar C); 139,97 (6-Ar CH); 126,51 (4-Ar CH); 125,21 (5-Ar CH); 121,09 (3a-Ar C); 115,64 (7-Ar CH); 76,34 (2 e 5' - C); 24,38 (CH_3).

SMILES: O=C1C2=C(C=CC=C2)N(C(C)=O)C31C(NC(NC3=O)=S)=O.



1-Hexanoil-2'-tioxo-2',3'-dihidro-4'H-espiro (indolin-2,5'-pirimidina)-3,4',6'(1'H)-triona (9b)

Obteve-se um sólido branco, (η = 80 %). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3593,90; 3536,30; 3092,02; 2928,35; 1724,45; 1695,37; 1623,07; 1605,87; 1588,69; 1526,03; 1468,08; 1447,71; 1378,83; 1350,49; 1305,28; 1249,12; 1193,98; 1162,99; 1139,51; 1045,42; 962,09; 756,45. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,29 (s, 2H); 8,02 - 7,94 (m, 1H); 7,90 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,86 (dd, J = 7,8; 1,3 Hz, 1H); 7,41 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 2,98 (t, J = 7,1 Hz, 2H); 1,60 (q, J = 7,2 Hz, 2H); 1,41 - 1,24 (m, 5H), 0,94 - 0,79 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) 189,73 (3- C_O); 178,07 (2'- C_S); 170,23 (1''- N_CO); 160,28 (4',6' - C_O); 152,47 (7a-Ar C); 139,98 (6-Ar CH); 126,48 (4-Ar CH); 125,08 (5-Ar CH); 121,19 (3a-Ar C); 115,93 (7-Ar CH); 76,36 (2,5' - C); 35,41 (2''- CH_2); 30,39 (4''- CH_2); 23,28 (3''- CH_2); 21,96 (5''- CH_2); 13,87 (6''- CH_3). SMILES: O=C(N(C1(C(NC(NC1=O)=S)=O)C2=O)C3=C2C=CC=C3)CCCCC.



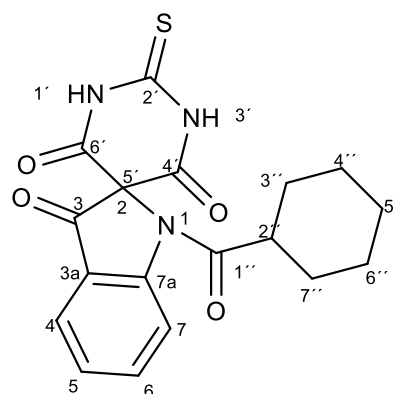
1-(Ciclohexanocarbonil)-2'-tioxo-2',3'-dihidro-4'H-espiro (indolin-2,5'-pirimidina)-3,4',6'(1'H)-triona (9c)

Obteve-se um sólido branco, (η = 67 %). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ 3157,26; 2942,54; 2930,28; 2852,21; 1704,45; 1661,62; 1601,26; 1580,38; 1530,24; 1459,17; 1426,83; 1384,62; 1335,85; 1299,81; 1287,03; 1267,25; 1253,83; 1214,30; 1190,20; 1177,68; 1158,80; 1135,29; 1135,29; 1062,28; 1015,48; 749,46.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.27 (s, 2H), 8.01 (ddd, J = 8.6, 7.2, 1.5 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 3.27 - 3.16 (m, 1H), 1.91 - 1.60 (m, 6H), 1.58 - 1.31 (m, 4H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 186.06 (3-CO), 178.75 (2'-CS), 172.85 (1''-NCO), 160.35 (4',6'-CO), 152.26 (7a-ArC), 140.28 (6-ArCH), 126.52 (4-ArCH), 125.11 (5-ArCH), 121.49 (3a-ArC), 115.62 (7-ArCH), 76.43 (2,5'-C), 41.63 (2''-CH); 27.99 (3'' e 7''-CH₂); 25.29 (5''-CH₂); 24.44 (4'' e 6''-CH₂).

SMILES: O=C1C2=C(C=CC=C2)N(C(C3CCCCC3)=O)C41C(NC(NC4=O)=S)=O.



4.2. Estudos *in silico*

4.2.1. Docking molecular

Para levar a cabo os estudos *in silico* fez-se recurso aos seguintes softwares: ChemBioOffice® V14.0.0.117 da CambridgeSoft, AutodockTools 1.5.6 e o Chimera 1.11.2. A estrutura cristalizada da *P. falcipaina-2* foi obtida através do PDB. Os ligandos foram desenhados no ChemDraw v15.0, onde também foi feita a minimização de suas energias, tratados no Chimera 1.11.2, onde se efetuou também a separação da proteína do ligando com a qual estava cristalizada. A preparação das moléculas para o *docking* molecular, definição de parâmetros e análise de resultados foi feito no AutodockTools 1.5.6. Todos os cálculos de *docking* foram obtidos utilizando o software Autodock4.0. As interações entre o ligando e o sítio ativo da proteína foram visualizadas através do software Discovery Studio Visualizer v17.2.0.16349. A proteína foi preparada removendo as moléculas de água, adicionando cargas Gasteiger e removendo os hidrogénios não polares. Os parâmetros do ligando foram mantidos inalterados.

Os estudos de *docking* molecular foram realizados no sítio ativo da proteína *falcipaina-2*, cujo código no PDB é 3BPF. A validação da função de score foi realizada com base no método descrito por Kumawat *et al*⁹⁴ com a estrutura cristalizada da *P. falcipaina-2* (3BPF) com o inibidor E64 e recorrendo ao *re-docking* com o ligando endógeno, tendo sido obtido um rmsd igual a 1,52 Å, portanto, aceitável, de acordo a literatura, que exige um rmsd inferior a 2 Å. O sítio ativo para o *docking* foi definido recorrendo a uma *grid box* de dimensões 44×44×44 Å, com espaçamento de 0,375 Å à volta do ligando co-cristalizado, garantindo desta forma que os ligandos estudados ocupam o espaço a eles confinado. Apresentam-se os resultados obtidos através do *docking* molecular, bem como as interações complexo PF-2/Ligandos testados no anexo 2. Pela análise dos resultados, verifica-se que os ligandos testados encaixam-se de maneira adequada no local de ligação do ligando endógeno e estabelecem interações por ponte de hidrogénio e hidrofóbicas com aminoácidos fundamentais.

4.2.2. Predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes

Para a previsão de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas relevantes, fez-se recurso ao software pkSCM on-line⁹⁵, através do endereço <http://biosig.unimelb.edu.au/pkscm/prediction>, com o objectivo de prever o perfil ADMET das moléculas sintetizadas.

4.3. Avaliação biológica

Para a avaliação das atividades biológicas dos compostos sintetizados, apenas os compostos que se revelaram puros por RMN de ¹H e ¹³C foram selecionados.

4.3.1. Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos sintetizados foi avaliada e comparada com o controlo positivo 5-Fu nas linhas celulares NHDF (do inglês, *Normal Human Dermal Fibroblasts*). Os meios de cultura RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*), reagentes e suplementos foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Cada experiência foi realizada em quadruplicado tendo sido feito pelo menos dois ensaios independentes.

4.3.1.1. Culturas celulares

As células NHDF mantiveram-se em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*) e antibiótico/antimicótico (AB)- anfotericina (Sp) (1% do volume total) Nos ensaios, as células foram utilizadas nas passagens 8, 9, 10 e 15.

As culturas celulares foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm² e incubadas a 37 °C em atmosfera humidificada com 5% de CO₂, substituindo-se o meio de cultura a cada 2-3 dias.

4.3.1.2. Preparação das soluções dos compostos

Os compostos em estudo foram todos dissolvidos em DMSO a uma concentração de 10 mM e armazenados a 4 °C. A partir desta solução-mãe, as várias soluções dos compostos foram preparadas por diluições com o respetivo meio completo de acordo a linha celular antes de cada ensaio, de modo a se ter uma concentração de 30 µM. Os ensaios foram efetuados de modo a que no final a concentração de DMSO foi inferior a 1% (V/V) de modo a não interferir nos resultados. Adicionalmente, após o *screening* inicial a uma concentração de 30 µM, foi efetuada a determinação dos valores de IC₅₀ para os ensaios de citotoxicidade para os compostos que apresentaram percentagens de inibição da proliferação celular inferiores a 50% desta forma, usaram-se as seguintes concentrações: 0,1; 1; 10; 30; 50 e 100 µM para a construção da curva dose-resposta.

4.3.1.3. Ensaios de viabilidade celular (ensaio MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pela quantificação da extensão da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com o procedimento previamente descrito⁹⁶: após atingirem a confluência adequada, as células foram tripsinizadas, contadas, diluídas em meio de cultura completo, semeadas em placas de cultura de 96 poços com uma concentração celular de 2x10⁴ células/mL e incubadas a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂, durante 48 horas. Após a adesão das células às placas, estas foram tratadas com as diferentes concentrações supracitadas e incubadas durante 72 horas. Foram utilizadas células não tratadas como controlo negativo e o 5-Fu como controlo positivo. No final da incubação, removeu-se o meio, adicionou-se meio de cultura incompleto (sem FBS e AB) contendo solução de MTT (5 mg/mL em solução salina de tampão fosfato) e voltou-se a incubar a 37 °C durante 4 horas. Por fim, removeu-se o

sobrenadante e dissolveram-se os cristais de formazano em DMSO. Registou-se a absorvância num espectrofotómetro de microplacas Bio-Rad xMark™ a 570 nm. A citotoxicidade foi expressa por percentagem de viabilidade celular relativamente às células utilizadas como controlo negativo.

4.3.2. Determinação *in vitro* da atividade inibitória da Xantina Oxidase

4.3.2.1. Preparação das soluções dos compostos

Tal como nos estudos de citotoxicidade, começou-se por preparar uma solução - mãe para cada composto a 10 mM, em que o solvente foi o DMSO, que foi posteriormente diluído para preparar as soluções com as concentrações pretendidas. A solução mãe de xantina 10 mM foi preparada numa solução aquosa de NaOH 25 mM.

Todas as soluções mãe foram armazenadas a 4 °C. A partir destas, foram preparadas as várias diluições em tampão dihidrogénio fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) antes de cada experiência, de modo a garantir uma concentração em cada poço de 30 µM no *screening* inicial e nos ensaios de determinação do IC₅₀. Adicionalmente, após o *screening* inicial a uma concentração de 30 µM, foi efetuada a determinação dos valores de IC₅₀ para o ensaio enzimático de inibição da atividade da xantina oxidase para os compostos que apresentaram percentagens de inibição superiores a 50%, desta forma, usaram-se as seguintes concentrações: 0,01; 0,1; 1; 7,5; 15; 30; e 60 µM, para a construção da curva dose-resposta.

4.3.2.2. Procedimento experimental

Os procedimentos adotados para levar a cabo a determinação da atividade inibitória da XO são adaptações dos métodos descritos por Figueiredo *et al*⁸⁹, baseando-se na medição espectrofotométrica da formação do ácido úrico a partir da xantina. Para cada ensaio, foram adicionados 50 µL da solução de teste e 50 µL de suspensão de XO do soro bovino (0,1 U / mL) ao poço de uma placa de 96 poços, sendo a mistura pré-incubada a 37°C durante 5 minutos. A reação iniciou-se com a adição de 150 µL de xantina 0,42 mM, sendo a mistura resultante incubada a 37°C durante 10 min, com leituras da absorvância a 295 nm de 1 em 1 minuto sob agitação lenta, constante e automática de 20 segundos a preceder cada leitura. O tampão foi utilizado como controlo negativo e o alopurinol como um controlo positivo. De modo a descontar a absorvância de cada composto a este comprimento de onda, foi realizado um branco da amostra constituído por 50 µL da solução de teste e 200 µL de tampão. Cada estudo corresponde a três experiências, cada uma realizada em triplicado. A percentagem de inibição da enzima por cada composto em estudo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = [1 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco da amostra}}) / \text{Abs}_{\text{controlo negativo}}] \times 100$$

4.3.3. Tratamento estatístico

Para a análise estatística dos dados recolhidos através dos ensaios realizados, foi utilizado o software Excel 2016 para o cálculo das médias, desvio padrão, significância estatística dos ensaios repetidos, através do teste *t*-Student em comparação com o controlo negativo, bem como para a construção dos gráficos apresentados nesta dissertação. Adicionalmente, usou-se também o software GraphPad versão 7.04 para a construção das curvas dose-resposta e concomitantemente para o cálculo dos valores de IC₅₀, através de cálculos de ajuste sigmóide (intervalo de confiança a 95%).

5. Referências bibliográficas

1. WHO, Expert, Committee on malaria. Seventeenth report, World Health Organ. Tech. Rep. Ser **1979**, pp 1-71.
2. WHO World Malaria Organization; WHO Document Production Services.: Geneva, Switzerland., **2015**; pp 1-71.
3. (a) Kar, A., Medicinal Chemistry. New Age International Publishers. New Delhi **2007**; (b) Kumawat, M. K.; Parida, P.; Chetia, D., Synthesis, antimalarial activity evaluation and docking studies of some novel tetraoxaquinones. *Med. Chem. Res.* **2016**, 25 (9), 1993-2004.
4. Chakraborty, A., Understanding the biology of the Plasmodium falciparum apicoplast; an excellent target for antimalarial drug development. *Life Sci.* **2016**, pp 104-110.
5. Prevention, C. f. D. C. a. Malaria. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html> (accessed 12/10/2017).
6. Yadav, N.; Sharma, C.; Awasthi, S. K., Diversification in the synthesis of antimalarial trioxane and tetraoxane analogs. *RSC Adv.* **2014**, 4 (11), 5469-5498.
7. Jong, E. C.; Nothdurft, H. D., Current drugs for antimalarial chemoprophylaxis: a review of efficacy and safety. *J. of Travel Med* **2001**, 8, S48-S56.
8. WHO, World Malaria Report 2017. **2017**, pp 1-196.
9. Roberts, D. R.; Manguin, S.; Mouchet, J., DDT house spraying and re-emerging malaria. *The Lancet* **2000**, pp 330-332.
10. Dai, Y. F.; Zhou, W. W.; Meng, J.; Du, X. L.; Sui, Y. P.; Dai, L.; Wang, P. Q.; Huo, H. R.; Sui, F., The pharmacological activities and mechanisms of artemisinin and its derivatives: a systematic review. *Med. Chem. Res.* **2017**, 26 (5), 867-880.
11. Ma, D.-L.; Chan, D. S.-H.; Leung, C.-H., Drug repositioning by structure-based virtual screening. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (5), 2130-2141.
12. Anna Caroline C, A.; Eliana Mm da, R.; Nicolli B de, S.; Tanos Cc, F.; Antoniana U, K., New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, 107 (7), 831-845.
13. Fidock, D. A., Drug discovery: Chemical diversity targets malaria. *Nature* **2016**, 538 (7625), 323-325.
14. Ongarora, D.; Njoroge, M.; Njuguna, N. M.; Mutai, P.; Ongarora, D. S. B.; Chibale, K.; Smith, P. W., Recent Approaches to Chemical Discovery and Development Against Malaria and the Neglected Tropical Diseases Human African Trypanosomiasis and Schistosomiasis. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (22), 11138-11163.
15. Ekins, S.; Ponder, E. L.; Freundlich, J. S.; Sarker, M., Computational Models for Neglected Diseases: Gaps and Opportunities. *Pharm. Res.* **2014**, 31 (2), 271-277.
16. Yuriev, E.; Holien, J.; Ramsland, P. A., Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review. *J. Mol. Recognit.* **2015**, 28 (10), 581-604.
17. Morris, G. M.; Lim-Wilby, M., Molecular Docking. In *Molecular Modeling of Proteins*, Kukol, A., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, **2008**; pp 365-382.

18. Müller, I. B.; Hyde, J. E., Review: Folate metabolism in human malaria parasites—75 years on. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2013**, *188* (1), 63-77.
19. Brabin, B. J.; Alexander Fletcher, K.; Brown, N., Do disturbances within the folate pathway contribute to low birth weight in malaria? *Trends Parasitol.* **2003**, *19* (1), 39-43.
20. Nzila, A.; Ward, S. A.; Marsh, K.; Sims, P. F. G.; Hyde, J. E., Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to *Plasmodium*. *Trends Parasitol.* **2005**, *21* (7), 334-339.
21. Andriantsoanirina, V.; Durand, R.; Pradines, B.; Baret, E.; Bouchier, C.; Ratsimbaoa, A.; Ménard, D., In vitro susceptibility to pyrimethamine of DHFR I164L single mutant *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.*: **2011**; Vol. 10, pp 283-283.
22. Kompis, I. M.; Islam, K.; Then, R. L., DNA and RNA synthesis: Antifolates. *Cheml Rev* **2005**, *105* (2), 593-620.
23. Tipsuwan, W.; Srichairatanakool, S.; Kamchonwongpaisan, S.; Yuthavong, Y.; Uthaiyibull, C., Selection of drug resistant mutants from random library of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase in *Plasmodium berghei* model. *Malar. J.*: **2011**; Vol. 10, pp 119-119.
24. Kelly, J. X.; Winter, R. W.; Braun, T. P.; Osei-Agyemang, M.; Hinrichs, D. J.; Riscoe, M. K., Selective killing of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by a benzylthiazolium dye. *Exp. Parasitol.* **2007**, *116* (2), 103-110.
25. Lisk, G.; Kang, M.; Cohn, J. V.; Desai, S. A., Specific inhibition of the plasmodial surface anion channel by dantrolene. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5* (11), 1882-1893.
26. Quashie, N. B.; Ranford-Cartwright, L. C.; de Koning, H. P., Uptake of purines in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes is mostly mediated by the human equilibrative nucleoside transporter and the human facilitative nucleobase transporter. *Malar. J.*: **2010**; Vol. 9, pp 36-36.
27. Hilgenfeld, R.; lu, w.; Li, H.; Huang, J.; Chen, T.; Zhu, J.; Lu, W.; Li, J.; Jiang, H.; Chen, L.; Liu, X.; Shen, X., Identification of Novel Falcipain-2 Inhibitors as Potential Antimalarial Agents through Structure-Based Virtual Screening. *J. Med. Chem* **2009**, *52* (15), 4936-4940.
28. Mahesh, R.; Mundra, S.; Devadoss, T.; Kotra, L. P., Original article: Design, synthesis and evaluation of 2-(4-(substituted benzoyl)-1,4-diazepan-1-yl)-N-phenylacetamide derivatives as a new class of falcipain-2 inhibitors. *Arab J. Chem* **2014**, 1-11.
29. Roy, K. K., Review: Targeting the active sites of malarial proteases for antimalarial drug discovery: approaches, progress and challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50* (3), 287-302.
30. Ettari, R.; Zappalà, M.; Micale, N.; Grazioso, G.; Giofrè, S.; Schirmeister, T.; Grasso, S., Original article: Peptidomimetics containing a vinyl ketone warhead as falcipain-2 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (6), 2058-2065.
31. Ehmke, V.; Kilchmann, F.; Heindl, C.; Cui, K. Q.; Huang, J.; Schirmeister, T.; Diederich, F., Peptidomimetic nitriles as selective inhibitors for the malarial cysteine protease falcipain-2. *MedChemComm* **2011**, *2* (8), 800-804.

32. Rottmann, M.; McNamara, C.; Yeung, B. K. S.; Lee, M. C. S.; Zou, B.; Russell, B.; Seitz, P.; Plouffe, D. M.; Dharia, N. V.; Tan, J.; Cohen, S. B.; Spencer, K. R.; Gonzalez-Paez, G. E.; Lakshminarayana, S. B.; Goh, A.; Suwanarusk, R.; Jegla, T.; Schmitt, E. K.; Beck, H. P.; Brun, R.; Nosten, F.; Renia, L.; Dartois, V.; Keller, T. H.; Fidock, D. A.; Winzeler, E. A.; Diagana, T. T., Spiroindolones, a Potent Compound Class for the Treatment of Malaria. *Science* **2010**, *329* (5996), 1175-1180.
33. Opsenica, D. M.; Solaja, B. A., Artemisinins and synthetic peroxides as highly efficient antimalarials. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **2012**, *31* (2), 137-182.
34. Sashidhara, K. V.; Avula, S. R.; Singh, L. R.; Palnati, G. R., A facile and efficient Bi(III) catalyzed synthesis of 1,1-dihydroperoxides and 1,2,4,5-tetraoxanes. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (36), 4880-4884.
35. Krishna, S.; Woodrow, C. J.; Staines, H. M.; Haynes, R. K.; Mercereau-Puijalon, O., Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12* (5), 200-205.
36. Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S., Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Letters to Nature* **2003**, *424* (6951), 957-961.
37. Robert, A.; Meunier, B., Characterization of the first covalent adduct between artemisinin and a heme model. *JACS* **1997**, *119* (25), 5968-5969.
38. Robert, A.; Coppel, Y.; Meunier, B., Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Chem. Commun.* **2002**, (5), 414 - 415.
39. Stephen, A. W.; Victoria, E. B.; Paul, M. O. N., The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. *Molecules* **2010**, *15* (3), 1705-1721.
40. Posner, G. H.; O'Neill, P. M., Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (6), 397-404.
41. Rudrapal, M.; Chetia, D.; Singh, V., Novel series of 1,2,4-trioxane derivatives as antimalarial agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32* (1), 1159-1173.
42. Pradhan, R.; Patra, M.; Behera, A. K.; Mishra, B. K.; Behera, R. K., Tetrahedron report number 747: A synthon approach to spiro compounds. *Tetrahedron* **2006**, *62* (5), 779-828.
43. Galati, E. M.; Monforte, M. T.; Miceli, N.; Raneri, E., Anticonvulsant and sedative effects of some 5-substituted bromopyrazolinic spirobarbiturates. *Il Farmaco* **2001**, *56* (5), 459-461.
44. Singh, P.; Paul, K., A practical approach for spiro- and 5-monoalkylated barbituric acids. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43* (3), 607-612.
45. Lomlim, L.; Einsiedel, J.; Heinemann, F. W.; Meyer, K.; Gmeiner, P., Proline Derived Spirobarbiturates as Highly Effective β -Turn Mimetics Incorporating Polar and Functionalizable Constraint Elements. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (9), 3608-3611.

46. Mohan, S.; Eskandari, R.; Pinto, B. M., Naturally Occurring Sulfonium-Ion Glucosidase Inhibitors and Their Derivatives: A Promising Class of Potential Antidiabetic Agents. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (1), 211-225.
47. Lyons, K. E.; Pahwa, R., Pharmacotherapy of Essential Tremor An Overview of Existing and Upcoming Agents. *CNS Drugs* **2008**, *22* (12), 1037-1045.
48. Sriram, D.; Bal, T. R.; Yogeewari, P., Newer aminopyrimidinimino isatin analogues as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors for HIV and other opportunistic infections of AIDS: design, synthesis and biological evaluation. *Il Farmaco* **2005**, *60* (5), 377-384.
49. Maquoi, E.; Sounni, N. E.; Devy, L.; Olivier, F.; Frankenne, F.; Krell, H. W.; Grams, F.; Foidart, J. M.; Noel, A., Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy of a pyrimidine-2,4,6-trione derivative, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (12), 4038-4047.
50. Naguib, F. N. M.; Levesque, D. L.; Wang, E. C.; Panzica, R. P.; Elkouni, M. H., 5-Benzylbarbituric acid-derivatives, potent and specific inhibitors of uridine phosphorylase. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46* (7), 1273-1283.
51. Girgis, A. S.; Farag, H.; Ismail, N. S. M.; George, R. F., Synthesis, hypnotic properties and molecular modeling studies of 1,2,7,9-tetraaza-spiro 4.5 dec-2-ene-6,8,10-triones. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (10), 4964-4969.
52. Nagaraju, S.; Sathish, K.; Paplal, B.; Kashinath, D., "On-water" catalyst-free, one-pot synthesis of quaternary centered and spiro-tetrahydrothiophene-barbiturate hybrids. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (29), 2865-2871.
53. Dox, A. W.; Yoder, L., Spiro-pyrimidines. II. Cyclohexane-1,5-spiro-pyrimidines. *JACS* **1921**, *43*, 1366-1370.
54. Foti, F.; Grassi, G.; Risitano, F., Reverse regioselection in the synthesis of spiropyrazolobarbiturates using C-Br and C-H nitrilimines. *Synlett* **2005**, (1), 125-126.
55. Huang, Z. B.; Zhao, Q.; Chen, G.; Wang, H. Y.; Lin, W.; Xu, L. X.; Liu, H. T.; Wang, J. X.; Shi, D. Q.; Wang, Y. C., An Efficient Synthesis of Novel Dispirooxindole Derivatives via One-Pot Three-Component 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. *Molecules* **2012**, *17* (11), 12704-12717.
56. Hu, Y.; Shi, D. Q., An Efficient Synthesis of New Dispiropyrrrolidine Derivatives via Three-Component 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *J. Heterocycl. Chem.* **2013**, *50*, E121-E125.
57. Marti, C.; Carreira, E. M., Construction of spiro pyrrolidine-3,3'-oxindoles - Recent applications to the synthesis of oxindole alkaloids. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, (12), 2209-2219.
58. Yeung, B. K. S.; Zou, B.; Lakshminarayana, S. B.; Ang, S. H.; Leong, S. Y.; Tan, J.; Wong, J.; Goh, A.; Dartois, V.; Diagona, T. T.; Keller, T. H.; Rottmann, M.; Keller-Maerki, S.; Fischli, C.; Brun, R.; Schmitt, E. K.; Krastel, P.; Petersen, F.; Francotte, E.; Wagner, T.; Kuhen, K.; Plouffe, D.; Henson, K.; Winzeler, E. A., Spirotetrahydro β -carbolines (spiroindolones): A new class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (14), 5155 - 5164.

59. Spillman, N. J.; Allen, R. J. W.; McNamara, C. W.; Yeung, B. K. S.; Winzeler, E. A.; Diagona, T. T.; Kirk, K., Na⁺ Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Involves the Cation ATPase PfATP4 and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host & Microbe* **2013**, *13* (2), 227-237.
60. van Pelt-Koops, J. C.; Pett, H. E.; Graumans, W.; van der Vegte-Bolmer, M.; van Gemert, G. J.; Rottmann, M.; Yeung, B. K. S.; Diagona, T. T.; Sauerwein, R. W., The Spiroindolone Drug Candidate NITD609 Potently Inhibits Gametocytogenesis and Blocks *Plasmodium falciparum* Transmission to Anopheles Mosquito Vector. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (7), 3544-3548.
61. Ermut, G.; Karalı, N.; Özsoy, N.; Can, A., New spiroindolinones bearing 5-chlorobenzothiazole moiety. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*: **2014**; Vol. 29, pp 457-68.
62. Butani, H. H.; Vachhani, D. D.; Bhoya, U. C.; Shah, A. K.; Van der Eycken, E. V., Regio- and Chemoselective Formation of Spiroindolinone-Isoindolinone by a Palladium-Catalyzed Buchwald-Hartwig Addition-Elimination Sequence. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, (30), 6634-6638.
63. (a) Medvedeva, S. M.; Sabyinin, A. L.; Shikhaliev, K. S., Efficient methods for the synthesis of spiroheterocyclic systems based on 4,4,6-trimethyl-4H-pyrrolo[3,2,1-ij]quinoline-1,2-diones. *Russian Chemical Bulletin* **2014**, *63* (12), 2693-2701; (b) Quiroga, J.; Portillo, S.; Galvez, J.; Abonia, R.; Insuasty, B.; Perez, A., An efficient synthesis of pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-spiroindolinones by a three-component reaction of 5-aminopyrazoles, isatin, and cyclic beta-diketones. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (21), 2664-2666.
64. Karalı, N.; Güzel, Ö.; Özsoy, N.; Özbey, S.; Salman, A., Original article: Synthesis of new spiroindolinones incorporating a benzothiazole moiety as antioxidant agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (3), 1068-1077.
65. Singh, G. S.; Desta, Z. Y., Isatins As Privileged Molecules in Design and Synthesis of Spiro-Fused Cyclic Frameworks. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 6104-6155.
66. Vlaar, T.; Ruijter, E.; Orru, R. V. A., Recent Advances in Palladium-Catalyzed Cascade Cyclizations. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (6), 809-841.
67. Van Tamelen, E. E.; Yardley, J. P.; Miyano, M.; Hinshaw, W. B., Total synthesis of rhyncophyllol and dl-isorhyncophyllol. *JACS* **1969**, *91* (26), 7333-7341.
68. Aimi, N.; Nishimura, M.; Ishikawa, M.; Haginiwa, J.; Sakai, S. I.; Sada, H.; Ponglux, D.; Wongseripipatana, S., Structure and synthesis of two new types of oxindole alkaloids found from *Uncaria salaccensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38* (2), 573 - 575.
69. Pellegrini, C.; Strässler, C.; Weber, M.; Borschberg, H. J., Synthesis of the oxindole alkaloid (-)-horsfiline. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5* (10), 1979 - 1992.
70. von Nussbaum, F.; Danishefsky, S. J., A Rapid Total Synthesis of Spirotryprostatin B: Proof of Its Relative and Absolute Stereochemistry. *Communications*: **2000**; Vol. 39, pp 2175-2178.

71. Kerr, L. D.; Lee, J. H.; Pandey, K. C.; Harrison, A.; Sajid, M.; Rosenthal, P. J.; Brinen, L. S., Structures of Falcipain-2 and Falcipain-3 Bound to Small Molecule Inhibitors: Implications for Substrate Specificity. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (3), 852-857.
72. Kola, I.; Landis, J., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3 (8), 711-715.
73. Lipinski, C. A., Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol* **2004**, 1 (4), 337 - 341.
74. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**, 64 (SUPPL.), 4 - 17.
75. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Kopple, K. D.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W., Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45 (12), 2615 - 2623.
76. Serrano, J. L.; Cavaleiro, E.; Silvestre, S.; Almeida, P.; Barroso, S.; Romão, M. J., A synthetic route to novel 3-substituted-2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates. *C. R. Chim.* **2017**, 20 (11-12), 990 - 995.
77. Xicun, W.; Aiyang, S.; Jihua, Z.; Zhi, Y.; Zhang, Z., Hydrogen Peroxide-Promoted Transformation of Thioureas/Thiosemicarbazides to Related Ureas/Semicarbazides at Room Temperature via Grinding. *Synth. Commun.* **2007**, 37 (10), 1627-1633.
78. Vyas, P. V.; Bhatt, A. K.; Ramachandraiah, G.; Bedekar, A. V., Environmentally benign chlorination and bromination of aromatic amines, hydrocarbons and naphthols. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (21), 4085-4088.
79. Tong, X.; Ren, Z.; Qu, X.; Yang, Q.; Zhang, W., Efficient amide formation from arylamines and esters promoted by AlCl₃/Et₃N: an experimental and computational investigation. *Res. Chem. Intermed.* **2012**, 38 (8), 1961-1968.
80. Corsaro, A.; Pistara, V., Conversion of the thiocarbonyl group into the carbonyl group. *Tetrahedron* **1998**, 54 (50), 15027-15062.
81. Sheriff, T. S., Applications of hydrogen peroxide and derivatives. By C W Jones, RSC Clean Technology Monographs, Series Editor James H Clark, Royal Society of Chemistry, pp viii 264 ISBN 085404536-8. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2000**, 75 (11), 083-1083.
82. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., Tetrahedron report number 740: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827-10852.
83. Pascua-Maestro, R.; Corraliza-Gomez, M.; Diez-Hermano, S.; Perez-Segurado, C.; Ganfornina, M. D.; Sanchez, D., The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta Histochem.* **2018**, 120 (3), 179-186.
84. Šmelcerović, A.; Tomović, K.; Šmelcerović, Ž.; Petronijević, Ž.; Kocić, G.; Tomašić, T.; Jakopin, Ž.; Anderluh, M., Review article: Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on in silico calculated physico-

- chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 135, 491-516.
85. Voityuk, A. A.; Albert, K.; Rösch, N.; Romão, M. J.; Huber, R., Substrate Oxidation in the Active Site of Xanthine Oxidase and Related Enzymes. A Model Density Functional Study. *Inorg. Chem.* **1998**, 37 (2), 176 - 180.
86. (a) Yamaguchi, Y.; Matsumura, T.; Ichida, K.; Okamoto, K.; Nishino, T., Human Xanthine Oxidase Changes its Substrate Specificity to Aldehyde Oxidase Type upon Mutation of Amino Acid Residues in the Active Site: Roles of Active Site Residues in Binding and Activation of Purine Substrate. *J. Biochem.* **2007**, 141 (4), 513-524; (b) Kelley, E. E.; Hundley, N. J.; Tarpey, M. M.; Khoo, N. K. H.; Malik, U. Z.; Freeman, B. A., Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biol. Med.* **2010**, 48 (4), 493 - 498.
87. Rodríguez-Arámbula, A.; Arenas-Velázquez, E.; Castanedo-Cázares, J. P.; Hernández-Blanco, D.; Oros-Ovalle, C.; Torres-Álvarez, B., [Allopurinol hypersensitivity syndrome. A report of two cases]. *Rev. Med. Inst. Mex.*: **2016**; Vol. 54, pp 261-264.
88. Meng, J.; Li, Y.; Yuan, X.; Lu, Y., Effects of febuxostat on insulin resistance and expression of high-sensitivity C-reactive protein in patients with primary gout. *Rheumatology*: **2017**; Vol. 37, pp 299-303.
89. Figueiredo, J.; Serrano, J. L.; Cavalheiro, E.; Keurulainen, L.; Yli-Kauhaluoma, J.; Moreira, V. M.; Ferreira, S.; Domingues, F. C.; Silvestre, S.; Almeida, P., Trisubstituted barbiturates and thiobarbiturates: Synthesis and biological evaluation as xanthine oxidase inhibitors, antioxidants, antibacterial and anti-proliferative agents. *Eur. J. Med. Chem.*: **2018**; Vol. 143, pp 829-842.
90. Zhao, M.; Zhu, D.; Sun-Waterhouse, D.; Su, G.; Lin, L.; Wang, X.; Dong, Y., In vitro and in vivo studies on adlay-derived seed extracts: Phenolic profiles, antioxidant activities, serum uric acid suppression, and xanthine oxidase inhibitory effects. *J. Agric. Food. Chem.* **2014**, 62 (31), 7771 - 7778.
91. Gupta, S.; Rodrigues, L. M.; Esteves, A. P.; Oliveira-Campos, A. M. F.; Nascimento, M. S. J.; Nazareth, N.; Cidade, H.; Neves, M. P.; Pinto, M.; Fernandes, E.; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Brás, N., Synthesis of N-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43 (4), 771 - 780.
92. Sharma, S.; Sharma, K.; Ojha, R.; Kumar, D.; Nepali, K.; Bedi, P. M. S.; Singh, G., Microwave assisted synthesis of naphthopyrans catalysed by silica supported fluoroboric acid as a new class of non purine xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (2), 495-500.
93. Serrano, J. L.; Cavalheiro, E.; Barroso, S.; Romão, M. J.; Silvestre, S.; Almeida, P., Preliminary communication/Communication: A synthetic route to novel 3-substituted-2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates. *C. R. Chim.* **2017**, 20 (11-12), 990-995.

94. Kumawat, M. K.; Chetia, D., Synthesis, antimalarial activity evaluation and molecular docking studies of some novel dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2015**, *10* (4), 917-923.
95. Pires, D. E. V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B., pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (9), 4066 - 4072.
96. Ramos, S. S.; Almeida, S. S.; Leite, P. M.; Boto, R. E. F.; Silvestre, S.; Almeida, P., VT-nmr and cytotoxic evaluation of some new ortho-(alkylchalcogen)acetanilides. *Tetrahedron* **2014**, *70* (46), 8930 - 8937.

6. Publicações no âmbito desta dissertação

Comunicações em painel

Manuel D., Soeiro P., Serrano J. L., Boto R. E. F., Silvestre S., Almeida P., Looking for new Spiroindolin-3-one barbiturates as Antimalarial Agents, Abstracts book do ENEQUI 2018 (anexo 4).

Manuel D., Soeiro P., Figueiredo, J. Serrano J. L., Boto R. E. F., Silvestre S., Almeida P., New Spiroindolin-3-one(thio)barbiturate derivatives as Xanthine Oxidase inhibitors. CICS-UBI XIII Symposium 2018 (anexo 5).

Comunicação oral

Manuel D., Soeiro P., Serrano J. L., Figueiredo, J., Boto R. E. F., Silvestre S., Almeida P., New Spiroindolin-3-one(thio)barbiturate Derivatives as Antimalarial Agents. CICS-UBI XIII Symposium 2018 (anexo 6).

7. Anexos

Anexo 1- Estruturas dos ligandos submetidos a docking molecular

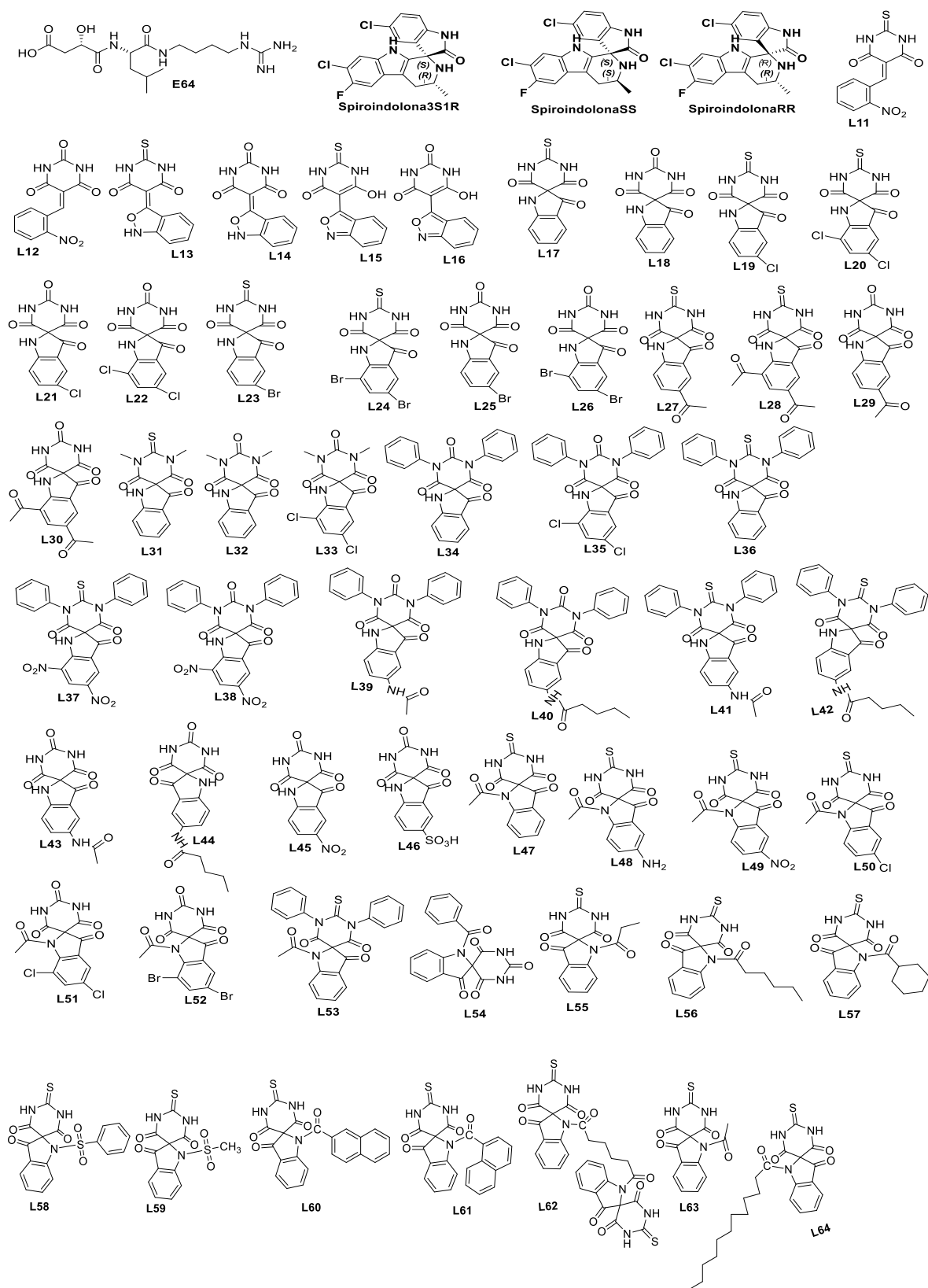


Figura 7.0.1- Estrutura dos ligandos submetidos a docking molecular.

Anexo 2 - Resultados do docking molecular

Tabela 7.0.1 - Resultados gerais do docking molecular.

N.º	Código do composto	Energia de ligação da melhor conformação (kcal.mol ⁻¹)	Média das energias de ligação das diferentes conformações (kcal.mol ⁻¹)	Ligações de hidrogénio
1	Ligando original	-4.42	-3.654	Cys42; Gly83; Trp43; Asp234; Leu172
2	Spiroindolone3S1R	-7.870	-7.869	Cys42; Gly83; Trp43
3	SpiroindoloneRR	-7.670	-7.670	Asn173; Leu172;
4	SpiroindoloneSS	-7.590	-7.587	Gly83
5	Ligando11	-6.110	-5.914	Cys42; Gly83; Ala175; Phe236
6	Ligando12	-6.500	-6.054	Gly83; His174; Asp234;
7	Ligando13	-6.470	-6.348	Cys42; Leu172
8	Ligando14	-6.340	-6.296	Leu172
9	Ligando15	-6.080	-6.017	Gly83; His174; Leu172
10	Ligando16	-6.060	-6.012	Leu172; Asp234
11	Ligando17	-6.590	-6.573	Cys42; Gly83; His174; Asp234;
12	Ligando18	-6.320	-6.238	Cys42; Gly83; His174,
13	Ligando19	-6.230	-6.227	Gly83; His174; Asp234
14	Ligando20	-6.090	-6.090	Cys42; Gly83; Trp43
15	Ligando21	-6.260	-6.258	Gly83; His174; Asp234; Ile85;
16	Ligando22	-6.130	-6.127	Gly83; His174; Asp234;Ile85;
17	Ligando23	-6.310	-6.257	Gly83; His174; Asp234;
18	Ligando24	-6.340	-6.332	Cys42; Gly83; Trp43
19	Ligando25	-6.350	-6.342	Gly83; His174; Asp234; Ile85
20	Ligando26	-6.180	-6.170	His174; Ser149
21	Ligando27	-6.570	-6.438	His174; Asp234; Trp43
22	Ligando28	-6.450	-6.302	Cys42; Gly83; Trp43; Ile85; Leu172
23	Ligando29	-6.570	-6.293	His174; Trp43, Asp234;
24	Ligando30	-6.400	-6.366	Cys42; Gly83; Ile85; Trp43; Leu172
25	Ligando31	-5.820	-5.815	Cys42; Gly83; His174;
26	Ligando32	-6.930	-6.926	Gly83; His174;
27	Ligando33	-6.460	-6.451	Cys42; Gly83; Asn173; Trp43;
28	Ligando34	-8.33	-8.289	Cys42; Gly83; His174; Ala175
29	Ligando35	-8.03	-8.011	Cys42; Gly83
30	Ligando36	-7.970	-7.634	Cys42; Gly83; His174; Ala175;
31	Ligando37	-7.06	-7.037	Cys42; Gly83; Ser41; Gln36
32	Ligando38	-7.450	-7.375	Gly83; His174; Gln171; Trp43; Ala175; Val150; Leu172
33	Ligando39	-8.110	-8.104	Cys42; Gly83; Gln36
34	Ligando 40	-7.460	-7.252	Gly83
35	Ligando41	-7.850	-7.749	Cys42; Asn173; Trp206; Ala175
36	Ligando42	-8.690	-8.300	Gly83
37	Ligando43	-6.140	-6.096	Gly83; His174; Asp234; Ile85
38	Ligando44			
39	Ligando45	-6.270	-5.985	His174; Asp234; Trp43
40	Ligando46	-5.890	-5.761	Gly83; His174; Asn173; Asp234; Phe236
41	Ligando47	-5.940	-5.935	Cys42; Gly83; Trp43

N.º	Código do composto	Energia de ligação da melhor conformação (kcal.mol ⁻¹)	Média das energias de ligação das diferentes conformações (kcal.mol ⁻¹)	Ligações de hidrogénio
42	Ligando48	-6.320	-6.142	His174
43	Ligando49	-6.560	-5.975	His174; Ile85; Trp43
44	Ligando50	-6.980	-6.235	His174; Phe236; Ile85
45	Ligando51	-6.500	-6.440	Cys42; Gly83; His174; Leu172
46	Ligando52	-6.320	-6.295	Cys42; Gly83
47	Ligando53	-7.300	-7.297	Cys42; Ala175
48	Ligando54	-6.880	-6.851	His174, Ile85
49	Ligando55	-6.340	-5.977	Phe236; Ile85
50	Ligando56	-6.440	-6.266	Cys42; Gly83; Asn173
51	Ligando57	-7.090	-7.086	Cys42; Gly83, Asn173; Ala175
52	Ligando58	-7.280	-6.125	Cys42; Gly83; Asn173; Ala175
53	Ligando59	-6.250	-6.204	Cys42; Gly83; His174, Ala175; Leu172
54	Ligando60	-8.110	-7.770	Cys42; Gly83; Gln36
55	Ligando61	-8.330	-8.272	Cys42; Gly83; His174; Asn173
56	Ligando62	-7.700	-6.900	Cys42, Gly83
57	Ligando63	-6.990	-6.480	His174; Val150, Asp234; phe236; Ile85
58	Ligando64	-6.220	-5.541	Cys42; His174; Gln36; Trp206

Anexo 3 - Resultados adicionais sobre os ensaios biológicos

Tabela 7.2- Resultados globais dos ensaios biológicos, a um screening a 30 μ M. Proliferação celular em relação ao controlo negativo em células NHDF e percentagens de inibição da atividade da XO, em comparação com os controlos positivos, 5-Fu e Alopurinol, respetivamente.

Composto	Citotoxicidade em NHDF	Inibição da XO
Controlo	100	0
Alopurinol	-	78,17 \pm 0,15
5-Fu	31,72 \pm 1,18	-
6	91,29 \pm 15,63322	20,58 \pm 2,70
7a	107,91 \pm 14,74844	61,42 \pm 2,58
7b	85,82 \pm 14,64206	77,74 \pm 0,17
8	82,62 \pm 14,28187	84,17 \pm 1,74
9a	104,79 \pm 6,074295	17,07 \pm 3,91
9b	70,08 \pm 18,89796	18,43 \pm 3,44
9c	85,28 \pm 4,471013	14,38 \pm 1,75

Anexo 4 - Resumo da comunicação em forma de painel apresentada no âmbito desta dissertação

Looking for new Spiroindolin-3-one barbiturates as Antimalarial Agents

Manuel D.^a, Soeiro P.^a, Serrano J. L.^a, Boto R. E. F.^a, Silvestre S.^{a,b}, Almeida P.^a

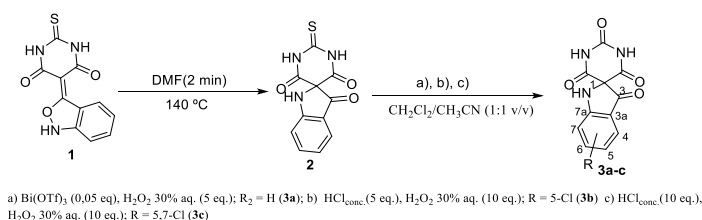
^a CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

^b CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Rua Larga, 3400-517 Coimbra, Portugal

Email: moraisbwill@gmail.com

Spiroindolin-2-ones are a new emergent class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria.^{32,58} Looking for new, alternative and more potent antimalarial agents, new spiroindolin-3-one barbiturates were designed and analysed via molecular docking with the cysteine protease binding pocket residues of falcipain-2 (PDB code 3BPF) as target protein.^{94,3b} Most of the tested compounds revealed lower binding energies than the target endogenous ligand and bind to most important pocket residues. As example, one of the most promising spiroindolinone herein analysed showed a low binding energy (-8.330 Kcal.mol⁻¹) due to the formation of greater intermolecular hydrogen bonding (Cys42, His174, Gly83, Ala175) and hydrophobic interactions (Gly40, Gly82, Ser41, Asn173, Glu171, Leu172, Ile85, Leu84, Ser149, Val150, Phe236) with the amino acid residues of falcipain-2. Moreover, the in silico pharmacokinetic and toxicity evaluation using the pkCSM online software revealed that all spiroindolinones entirely fulfil the parameters of Lipinski's rule of five, suggesting that these compounds have favourable properties regarding drug-likeness criteria.

These results led to the synthesis of several representative spiroindolin-3-one barbiturates from 2,1-benzisoxazoles, obtained by a new synthetic route, as well as several related derivatives obtained by aromatic electrophilic substitution. As representative example, 5-chloro (**3b**) and 5,7-dichlorospiroindolones (**3c**) were synthesized in high yields and structurally characterized by ¹H and ¹³C NMR.



In conclusion, spiroindolin-3-one barbiturates can be potential antimalarial agents allowing further exploration of chemical diversity around the core skeleton to generate some more potent molecules.

Acknowledgements: This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Program Competitiveness and Internationalization in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project POCI-01-0145-FEDER-007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709/2013). D. Manuel acknowledge to National Institute of Scholarship Management of Republic of Angola Government (INAGBE) a fellowship. J. L. Serrano also acknowledge a fellowship from Santander-Totta/UBI (BID/ICI-UID FC/Santander Universidades-UBI/2017).

References:

1. Rottmann, M., *et al.*, *Science* **2010**, *329*(5996), 1175-1180;
2. Yeung, B. K. S., *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*(14), 5155-5164.
3. Kumawat, D. *et al.*, *Medicinal Chemistry Research* **2016**, *25*(9), 1993-2004.
4. Li, H., *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*(15), 4936-4940.

Anexo 5 - Resumo da comunicação em forma de painel apresentada no âmbito desta dissertação

New Spiroindolin-3-one(thio)barbiturate derivatives as Xanthine Oxidase inhibitors

Manuel D. ^{1,2}, Soeiro P. ^{1,2}, Figueiredo, J. ^{1,2}, Serrano J. L. ^{1,2}, Boto R. E. F. ^{1,2}, Silvestre S. ^{2,3}, Almeida P. ^{1,2}

¹ Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

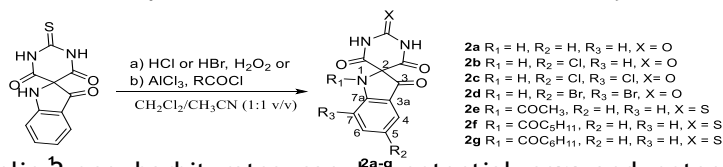
² CICS-UBI, Faculty of Health Science, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

³ CNC, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

(*)Email: d.morais.manuel@ubi.pt

ABSTRACT

Overproduction and/or underexcretion of uric acid can lead to hyperuricemia and subsequently to gout⁸⁴. Xanthine Oxidase (XO), a molybdoflavoprotein, catalyses the oxidative hydroxylation of hypoxanthine and xanthine to produce uric acid. The main drugs used to treat gout are allopurinol and febuxostat. However, these drugs have relatively several adverse effects⁸⁴. Spiroindolinones are a class of compounds with a broad spectrum of biological activity. Thus, looking for new, alternative and more potent XO inhibitors with less side effects, new spiroindolin-3-onebarbiturates were synthesized from 2,1-benzisoxazoles. In addition, several related derivatives of these spiroindolinones were prepared by aromatic electrophilic substitution and *N*-acylation. The *in silico* pharmacokinetic and toxicity evaluation using the pkCSM online software revealed that all spiroindolin-3-ones entirely fulfil the parameters of Lipinski's rule of five, suggesting that these compounds have favourable properties regarding drug-likeness criteria. The *in vitro* MTT assay in NHDF evidenced that the evaluated compounds do not exhibit significant cytotoxicity, which makes them attractive as drug candidates. Additionally the ability to inhibit XO activity was evaluated according to the procedure described by Figueiredo *et al*⁸⁹, and the results seem to be promising. In fact in a 30 μ M *screening* it was observed that compounds **2c** and **2d** showed inhibitory capacities higher than the observed with allopurinol, which was later confirmed by concentration-response studies.



In conclusion, spiroindolin-3-one barbiturates can be potential new and potent XO inhibitors. Further exploration of chemical diversity around the core skeleton is now being performed to generate some even more potent molecules.

Keywords: Spiroindolin-3-one(thio)barbiturates. Synthesis and structural characterization. Antiproliferative activity. Xanthine oxidase.

Preference for communication: poster

Acknowledgements: This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Program Competitiveness and Internationalization in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project POCI-01-0145-FEDER-007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709/2013). Manuel, D. acknowledge to National Institute of Scholarship Management of Republic of Angola Government (INAGBE) a fellowship. Serrano, J. L. and Figueiredo, J., also acknowledge a fellowship from Santander-Totta/UBI (BID/ICI-UID FC/Santander Universidades-UBI/2017).

References:

1- Šmelcerović, A. *et al.*, Review article: Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on *in silico* calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *135*, 491-516.

2- Figueiredo, J. *et al.*, Trisubstituted barbiturates and thiobarbiturates: Synthesis and biological evaluation as xanthine oxidase inhibitors, antioxidants, antibacterial and anti-proliferative agents. **2018**; Vol. 143, pp 829-842.

Anexo 6 - Resumo da comunicação oral apresentada no âmbito desta dissertação

New Spiroindolin-3-one(thio)barbiturate Derivatives as Antimalarial Agents

Manuel D. ^{1,2}, Soeiro P. ^{1,2}, Serrano J. L. ^{1,2}, Figueiredo, J. ^{1,2}, Boto R. E. F. ^{1,2}, Silvestre S. ^{2,3}, Almeida P. ^{1,2}

¹ Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

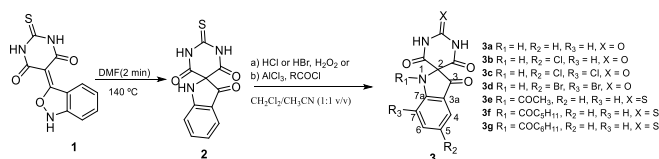
² CICS-UBI, Faculty of Health Science, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

³ CNC, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

(*)Email: d.morais.manuel@ubi.pt

ABSTRACT

Spiroindolin-2-ones are a new emergent class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria⁵⁸. Looking for new, alternative and more potent antimalarial agents, new spiroindolin-3-one(thio)barbiturates were designed and analysed via molecular docking with the cysteine protease *falcipain-2*²⁷. In this context, according to previous studies inhibitors of this protein have the ability to interact with it by means of hydrogen interactions with Cys42 in the active site. Moreover, the *in silico* pharmacokinetic and toxicity evaluation using the pkCSM online software revealed that all spiroindolin-3-ones entirely fulfill the parameters of Lipinski's rule of five, suggesting that these compounds have favourable properties regarding drug-likeness criteria. These results led to the synthesis of several representative spiroindolin-3-one(thio)barbiturates **2** from 2,1-benzisoxazoles **1**, prepared by a new synthetic route, as well as of several related derivatives **3** obtained by aromatic electrophilic substitution and *N*-acylation, in high yields, and were structurally characterized by ¹H and ¹³C NMR. *In vitro* MTT assays in NHDF have shown that the compounds evaluated do not exhibit relevant cytotoxicity, which makes them attractive as potential drug candidates. The *in vitro* and *in vivo* antimalarial assays are being carried out by the group coordinated by Professor Paul M. O'Neill at University of Liverpool.



In conclusion, spiroindolin-3-one(thio)barbiturates can be potential antimalarial agents and further exploration of chemical diversity around the core skeleton should be done to generate more potent molecules.

Keywords: Spiroindolin-3-one(thio)barbiturates. Synthesis and structural characterization. *P. falciparum*. *Falcipain-2*. Molecular docking. Antimalarial; Antiproliferative activity.

Preference for communication: oral

Acknowledgements: This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Program Competitiveness and Internationalization in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project POCI-01-0145-FEDER-007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709/2013). Manuel, D. acknowledge to National Institute of Scholarship Management of Republic of Angola Government (INAGBE) and Professor Paul M. O'Neill at the University of Liverpool for the antimalarial evaluation of synthesized compounds, a fellowship. J. L. Serrano and Figueiredo J. also acknowledge a fellowship from Santander-Totta/UBI (BID/ICI-UID FC/Santander Universidades-UBI/2017).

References:

- 1 - Yeung, B. K. S. *et al.*, Spirotetrahydro β -carboline (spiroindolones): A new class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010, 53 (14), 5155 - 5164.
- 2 - Hilgenfeld, R.; *et al*, Identification of Novel Falcipain-2 Inhibitors as Potential Antimalarial Agents through Structure-Based Virtual Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 52 (15), 4936-4940.