



SINÉSIO BOAVENTURA JUNIOR

**“SÍNTESE DE DERIVADOS DA ARTEMISININA E ESTUDOS DA ATIVIDADE *in vitro*
CONTRA *Schistosoma mansoni*”**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SINÉSIO BOAVENTURA JUNIOR

**“SÍNTESE DE DERIVADOS DA ARTEMISININA E ESTUDOS DA ATIVIDADE *in vitro*
CONTRA *Schistosoma mansoni*”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.

ORIENTADORA: DRA. VERA LÚCIA GARCIA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO SINÉSIO BOAVENTURA JÚNIOR E
ORIENTADA PELA DRA. VERA LÚCIA GARCIA.

CAMPINAS

2015

Agência de fomento: Não se aplica
Nº processo: Não se aplica

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B63s Boaventura Junior, Sinésio, 1964-
Síntese de derivados da artemisinina e estudos da atividade *in vitro* contra
Schistosoma mansoni / Sinésio Boaventura Júnior. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Vera Lúcia Garcia.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Artemisinina. 2. Esquistossomose. 3. *Schistosoma mansoni*. I. Garcia, Vera
Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Synthesis of artemisinin derivatives and studies of *in vitro* activity against *Schistosoma mansoni*

Palavras-chave em inglês:

Artemisinin

Schistosomiasis

Schistosoma mansoni

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Vera Lúcia Garcia [Orientador]

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Marta Cristina Teixeira Duarte

Data de defesa: 31-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 31 de julho de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Vera Lucia Garcia


Assinatura

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte


Assinatura

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya


Assinatura

Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Assinatura

Profa. Dra. Angela Regina Araújo

Assinatura

RESUMO

A esquistossomose é uma doença crônica negligenciada causada por trematodeos do gênero *Schistosoma*. O praziquantel é o fármaco de referência, mas é imprescindível prosseguir na pesquisa de novos quimioterápicos, pois há relatos de resistência na literatura. A síntese de compostos potencialmente esquistossomicidas, como os derivados da artemisinina contribuirão para evitar resistência, seja na ação isolada ou na associação com o praziquantel. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos sintetizar e avaliar a atividade *in vitro* de sete derivados da artemisinina sobre vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem BH. Os derivados de artemisinina foram sintetizados utilizando como material de partida a diidroartemisinina, a qual foi obtida através da reação de redução da artemisinina com boroidreto de sódio como agente redutor. Posteriormente, foram realizadas reações de esterificação da diidroartemisinina com vários tipos de anidridos de ácidos carboxílicos para obtenção dos demais derivados. Nos ensaios biológicos utilizou-se fêmeas de camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss-SPF, infectadas com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni* através da técnica de imersão caudal. Os vermes adultos foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas e transferidos para placas de cultura contendo RPMI-1640. As amostras foram incorporadas em polivinilpirrolidona (PVP) e testadas *in vitro*, nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL. Foram avaliados: motilidade, oviposição, alterações tegumentares e/ou morfológicas e mortalidade dos vermes. Como resultados, observou-se uma redução da motilidade para todas as amostras testadas, após as primeiras 6 h de incubação. Em relação à mortalidade, verificou-se que esse parâmetro foi diretamente dependente da concentração avaliada e do período de incubação. O tratamento com diidroartemisinina, na concentração de 200 µg/mL, incorreu em 100% de mortalidade após 12 h de incubação, enquanto os ácidos 10–diidroartemisinina glutárico, adípico e o acetato de diidroartemisinina ocasionaram mortalidade entre 20 a 60% nas primeiras 12 h. Contudo, a mortalidade de 100% dos vermes expostos a estes tratamentos ocorreu após 24 a 48 h de incubação. No tratamento com o ácido artesúnic observou-se mortalidade de 100% dos vermes após 24 h de incubação, para a concentração de 200 µg/mL, enquanto o acetato de diidroartemisinina foi ainda mais eficiente com mortalidade de 100% dos vermes no mesmo período, porém na concentração de 100 µg/mL. Todos os vermes machos e fêmeas apresentaram alterações no tegumento e nas ventosas oral e acetabular, exceto na presença de artemisinina e do éster metílico do ácido artesúnic. Estes compostos não apresentaram efeito esquistossomicida na maior concentração testada (200 µg/mL). Não foi observada oviposição nos tratamentos com diidroartemisinina, ácido artesúnic, ácido 10–diidroartemisinina glutárico e acetato de diidroartemisinina. Os tratamentos com artemisinina, ácidos 10–diidroartemisinina ftálico, adípico e o éster metílico do ácido artesúnic apresentaram oviposição em todas as concentrações avaliadas. Os derivados de artemisinina que mostraram maior potencial esquistossomicida *in vitro* foram o ácido artesúnic e o acetato de diidroartemisinina.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected chronic disease caused by trematodes of the *Schistosoma* genus. Praziquantel is the reference drug but it is necessary to continue the search for new chemotherapeutic agents, as there are reports of resistance in the literature. The synthesis of potentially antischistosomal compounds, such as artemisinin derivatives, would help prevent resistance, whether in an isolated action or in combination with praziquantel. Thus, this study aimed to synthesize and evaluate the *in vitro* activity of seven artemisinin derivatives on adult worms of *S. mansoni*, BH strain. The artemisinin derivatives were synthesized using dihydroartemisinin as the starting material, which was obtained by a reduction reaction of artemisinin with sodium borohydride as the reducing agent. Subsequently, esterification reactions of dihydroartemisinin were carried out with various types of carboxylic acid anhydrides to obtain the other products. The biological tests used female mice (*Mus musculus*), Swiss SPF strain, infected with approximately 100 cercariae of *S. mansoni* through the tail immersion technique. Adult worms were recovered by perfusion of the portal-hepatic and mesenteric veins and transferred to culture plates containing RPMI-1640 solution. The samples were incorporated into polyvinylpyrrolidone (PVP) and tested in concentrations of 25, 50, 100 and 200 µg/mL. The following parameters were evaluated: motility, oviposition, skin and/or morphological alterations and mortality of worms. In the results, it was observed that the motility for all samples tested decreased after the first 6h of incubation. With respect to mortality, it was found that this parameter is directly dependent on the measured concentration and incubation period. The treatment with dihydroartemisinin, at a concentration of 200 µg/mL, showed 100% mortality in 12 h of incubation, whereas 10-dihydroartemisinin glutaric acid, 10- dihydroartemisinin adipic acid and dihydroartemisinin acetate caused mortality between 20 and 60% in the first 12h of incubation. However, the mortality of 100% of the worms exposed to these treatments occurred after 24 to 48 h incubation. In the treatment with the artesunic acid, 100% mortality of the worms was observed after 24 h incubation at the concentration of 200 µg/mL; whereas, dihydroartemisinin acetate, at a concentration of 100 µg/mL, was even more effective with 100% mortality of the worms within the same period. All male and female worms showed changes in the tegument and oral and acetabular suction cups, except for those treated with artemisinin and artesunic acid methyl ester. These compounds showed no schistosomicidal effect at the highest concentration tested (200 µg/mL). There was no oviposition in treatments with dihydroartemisinin, artesunic acid, 10-dihydroartemisinin glutaric acid and dihydroartemisinin acetate. Treatment with artemisinin, 10-dihydroartemisinin phthalic acid, 10-dihydroartemisinin adipic acid and the artesunic acid methyl ester showed oviposition in all evaluated concentrations. The artemisinin derivatives which showed the highest schistosomicide potential *in vitro* were artesunic acid and dihydroartemisinin acetate.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ix
AGRADECIMENTOS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Esquistossomose	1
1.2 Quimioterapia da Esquistossomose.....	5
1.3 Artemisinina e Derivados.....	14
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Artemisinina	21
3.1.2 Reagentes.....	21
3.2 Métodos	22
3.2.1 Síntese do reagente anidrido adípico	22
3.2.2 Síntese dos derivados de artemisinina	23
3.2.2.1 Síntese de diidroartemisinina	24
3.2.2.2 Síntese do ácido artesúnicico	25
3.2.2.3 Síntese do ácido 10–diidroartemisinina ftálico	26
3.2.2.4 Síntese do ácido 10–diidroartemisinina glutárico	27
3.2.2.5 Síntese do ácido 10–diidroartemisinina adípico	28
3.2.2.6 Síntese do éster metílico do ácido artesúnicico	29
3.2.2.7 Síntese do acetato de diidroartemisinina.....	30
3.3 Métodos de análise dos derivados de artemisinina	31
3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	31
3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
3.3.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução	31
3.3.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	32
3.4 Incorporação dos compostos sintetizados em polivinilpirrolidona (PVP).....	32
3.5 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade esquistossomicida da artemisinina e seus derivados sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i> BH	33
3.5.1 Manutenção dos vermes e infecção dos animais	33
3.5.2 Ensaios de atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	34

3.5.2.1	Obtenção dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	34
3.5.2.2	Amostras incorporadas em PVP para ensaios de Cultura <i>in vitro</i>	34
3.5.2.3	Ensaio <i>in vitro</i>	34
3.6	Avaliação da citotoxicidade de derivados da artemisinina	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Semi-síntese dos compostos.....	39
4.2	Caracterização dos compostos	43
4.2.1	Artemisinina	43
4.2.2	Diidroartemisinina	46
4.2.3	Ácido Artesúnico	50
4.2.4	Acetato de Diidroartemisinina	54
4.3	Ensaio <i>in vitro</i>.....	58
4.3.1	Dispersão sólida dos derivados da artemisinina em PVP	58
4.3.2	Efeito da artemisinina e seus derivados sobre a motilidade e mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> BH.	58
4.3.3	Efeito da artemisinina e derivados sobre a oviposição e separação de casais do <i>S. mansoni</i>	63
4.3.4	Efeito da artemisinina e derivados sobre as alterações tegumentares e morfológicas do <i>S. mansoni</i>	64
4.4	Avaliação de citotoxicidade.....	71
4.5	O Modelo de Lipinski	74
5.	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS	92

DEDICATÓRIA

À minha mãe Natércia e ao meu pai Sinésio, pelo amor incondicional e pelos ensinamentos, base da minha formação e que guardarei por toda minha vida;

À minha querida esposa Marta e a minha querida filha Tatiana, meus dois amores, pelo carinho, amor, companheirismo, incentivo e compreensão, presentes em todos os momentos, mesmo com a distância;

Ao meu irmão Ademir, minha cunhada Paulinha e meus sobrinhos João Pedro e Marcelo pelos momentos felizes em São João da Boa Vista.

Este trabalho é dedicado a vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de nossa existência;

À minha orientadora e amiga Dra. Vera Lúcia Garcia, que me recebeu no CPQBA no início dos anos 90 e com muita paciência e disposição me ensinou tudo que sei sobre Química Orgânica;

Aos meus amigos da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA / UNICAMP: Adilson, Adriana, Marili, Layany, Renata, Gabrielly, Carol, Gabriela e Letícia, pela amizade, carinho e sugestões;

À equipe do Laboratório de Helminologia do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP: Profa. Dra. Silmara, a Rosy, Sheila, Camila e ao César, pela oportunidade de trabalho em conjunto;

À equipe da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA / UNICAMP coordenada pela Dra. Ana Lúcia Ruiz, pelos ensaios de citotoxicidade *in vitro*;

Aos amigos do CPQBA: Edilberto, Rodney, Ricardo e Gustavo pelas inúmeras ajudas, incentivo, correções e sugestões de grande valor;

Ao Rafael da Secretaria de Pós-Graduação do Programa de Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos pela paciência, bom humor e disponibilidade em auxiliar;

Ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP;

À Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA / UNICAMP pela liberação e disponibilização da infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i>	2
Figura 2: Tártaro emético utilizado no tratamento de esquistossomose.....	5
Figura 3: Compostos antimoniais utilizados na terapia esquistossomocida.....	7
Figura 4: Estruturas moleculares da lucantona e hicantona.....	8
Figura 5: Estrutura molecular do niridazol.....	9
Figura 6: Fármacos disponíveis para o tratamento da esquistossomose após 1960/1970.....	10
Figura 7: Estrutura molecular da oxamniquina e o grupo hidroximetil (carbono-6).....	11
Figura 8: Estruturas moleculares da artemisinina e derivados.....	16
Figura 9: Mecanismo geral da síntese dos derivados de artemisinina, a partir da reação de diidroartemisinina e anidrido de ácido carboxílico.....	18
Figura 10: Estruturas moleculares do monômero e do PVP.....	19
Figura 11: <i>Artemisia annua</i> L. cultivada no Campo Experimental do CPQBA/UNICAMP.....	21
Figura 12: Síntese de derivados da artemisinina através do intermediário diidroartemisinina.....	23
Figura 13: Foto do sistema reacional, composto por um balão de fundo redondo com quatro bocas, equipado com agitador magnético, cotovelo para adição de sólidos e borbulhador de gases.....	24
Figura 14: Placa com 24 poços para avaliação da atividade esquistossomocida de derivados da artemisinina, com distribuição aleatória das amostras (valores expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$), adaptado de Santos, P.E.R.; 2013.....	35
Figura 15: Rendimento (%) das reações de síntese dos derivados de artemisinina.....	41
Figura 16: Estrutura da artemisinina com numeração dos átomos de carbono.....	43
Figura 17: Estrutura molecular da diidroartemisinina com numeração dos átomos de carbono.....	46
Figura 18: Estrutura molecular do ácido artesúnicico com numeração dos átomos de carbono.....	50
Figura 19: Parte da estrutura do ácido artesúnicico, onde observa-se as interações entre H_9 e H_{10} : trans-diaxial (α -ácido artesúnicico) e cis-equatorial-axial (β -ácido artesúnicico), (Haynes et al., 2002; Capela, 2011).....	53
Figura 20: Estrutura molecular do acetato de diidroartemisinina (isômeros α e β , respectivamente) com numeração dos átomos de carbono.....	54
Figura 21: Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em função do período de incubação em diferentes concentrações de artemisinina.....	59
Figura 22: Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em função do período de incubação em diferentes concentrações de diidroartemisinina.....	59
Figura 23: Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em função do período de incubação em diferentes concentrações de ácido artesúnicico.....	60
Figura 24: Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em função do período de incubação em diferentes concentrações do ácido 10–diidroartemisinina ftálico.....	60
Figura 25: Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em função do período de incubação em diferentes concentrações do ácido 10–diidroartemisinina glutárico.....	61
Figura 26: Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em função do período de incubação em diferentes concentrações do ácido 10–diidroartemisinina adípico.....	61
Figura 27: Mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em função do período de incubação em diferentes concentrações do acetato de diidroartemisinina.....	62
Figura 28: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de <i>S. mansoni</i> (A, B, C, D) do grupo controle, mantidos em RPMI-1640 até 48 h.....	64
Figura 29: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de <i>S. mansoni</i> , sendo (A – B) os vermes após 48 h de incubação na presença de artemisinina, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ e (C – D) o	

casal de vermes apresentando dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença de diidroartemisinina, na concentração de 200 µg/mL.	65
Figura 30: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de <i>S. mansoni</i> , onde (A – B) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença de ácido artesúrico, na concentração de 200 µg/mL e (C – D) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após incubação de 48 h na presença do ácido 10–diidroartemisinina ftálico, na concentração de 200 µg/mL.	65
Figura 31: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de <i>S. mansoni</i> , onde (A – B) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença do ácido 10–diidroartemisinina glutárico, na concentração de 200 µg/mL e (C – D) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após incubação de 48 h na presença do ácido 10–diidroartemisinina adípico, na concentração de 200 µg/mL.....	66
Figura 32: Microscopia ótica dos vermes adultos, macho e fêmea, de <i>S. mansoni</i> , onde (A – B) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença do acetato de diidroartemisinina, na concentração de 200 µg/mL.....	66
Figura 33: Estrutura do heme da hemoglobina (Costa et al., 2007).....	68
Figura 34: Formação de radicais primários e secundários de carbono na artemisinina pela ação do Fe^{2+} (Capela, 2011).	69
Figura 35: Alquilação do heme no carbono β , por um radical primário de carbono formado após ativação da artemisinina pelo Fe^{2+} (Capela, 2011).	70
Figura 36: Curvas de crescimento celular em função da concentração de doxorrubicina – quimioterápico de referência e dos derivados de artemisinina (acetato de diidroartemisinina e ácido artesúrico).....	72
Figura 37: Molécula do acetato de diidroartemisinina e parâmetros de Lipinski: miLogP (lipofilicidade), TPSA (área de superfície polar), natoms (número de átomos, exceto hidrogênio, na molécula), MW (massa molecular), nON (somatório de O e H – aceptores de ligação hidrogênio), nOHNH (somatório de NH e OH – doadores de ligação hidrogênio), nviolations (número de violações à regra de Lipinski), nrothb (número de ligações rotacionáveis), volume (volume molecular).	75
Figura 38: Molécula do ácido artesúrico e parâmetros de Lipinski, calculados pelo programa Molinspiration.	76
Figura 39: Molécula da artemisinina e parâmetros de Lipinski, calculados pelo programa Molinspiration.	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para a artemisinina, com dados da literatura.....	44
Quadro 2: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para a artemisinina, com dados da literatura.....	45
Quadro 3: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para a diidroartemisinina, com dados da literatura.....	47
Quadro 4: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para a diidroartemisinina com dados da literatura.....	47
Quadro 5: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para o ácido artesúrico, com dados da literatura.....	50
Quadro 6: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para o ácido artesúrico com dados da literatura.....	51
Quadro 7: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para o acetato de diidroartemisinina, com dados da literatura.....	55
Quadro 8: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para o acetato de diidroartemisinina, com dados da literatura.....	55
Quadro 9: TGI = concentração ($\mu\text{g/mL}$) necessária para inibir totalmente a proliferação celular (atividade citostática).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Linhagem BH
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
HaCaT	Células não-tumorais representando queratinócitos humano
IV	Infravermelho
MW	Massa Molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxamniquina
PVP	Polivinilpirrolidona
PZQ	Praziquantel
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>S. haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>
<i>S. intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. mekongi</i>	<i>Schistosoma mekongi</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
TGI	Total Growth Inhibition – Inibição Total de Crescimento
TMSD	Trimetilsilil-diazometano
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença crônica causada por trematódeo do gênero *Schistosoma*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo (humanos, roedores e alguns primatas) e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Trata-se de uma doença, geralmente assintomática, que pode evoluir para formas clínicas graves e levar o paciente ao óbito. A magnitude de sua prevalência, associada à severidade das formas clínicas e a sua evolução, conferem a esquistossomose uma grande relevância como problema de saúde pública (Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, s.d.). É considerada a segunda doença parasitária mais importante em termos de saúde pública e impactos econômicos, sendo endêmica em aproximadamente 78 países assolados pela pobreza e falta de infraestrutura sanitária, pela urbanização precária e atividades culturais e laborais que favorecem o contágio. Estima-se que aproximadamente 800 milhões de pessoas vivam em áreas de risco de infecção e cerca de 243 milhões encontravam-se infectadas em 2011 (Engels et al., 2002; WHO, 2014).

Acredita-se que esta parasitose seja proveniente da África, por ocasião do tráfico de escravos e na América fixou-se nas Antilhas, Brasil, Guiana Holandesa e Venezuela. Além desses dois continentes, encontra-se também no sudeste

asiático. Atualmente, existem 25 milhões de pessoas que vivem em áreas onde a esquistossomose é endêmica no Brasil, estimando-se que entre 6 a 7 milhões estejam infectadas, segundo dados da SUCEN de 2012. É o país mais afetado nas Américas, de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Há casos da doença desde o estado do Rio Grande do Norte até a Bahia, no interior do Espírito Santo e de Minas Gerais.

Há cinco principais espécies de *Schistosoma* que podem infectar os seres humanos: *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. mekongi*. Destas, apenas *S. mansoni* é encontrada no Brasil.

O ciclo do *S. mansoni* está representado abaixo, (Figura 1), (Santos, P.E.R; 2013).

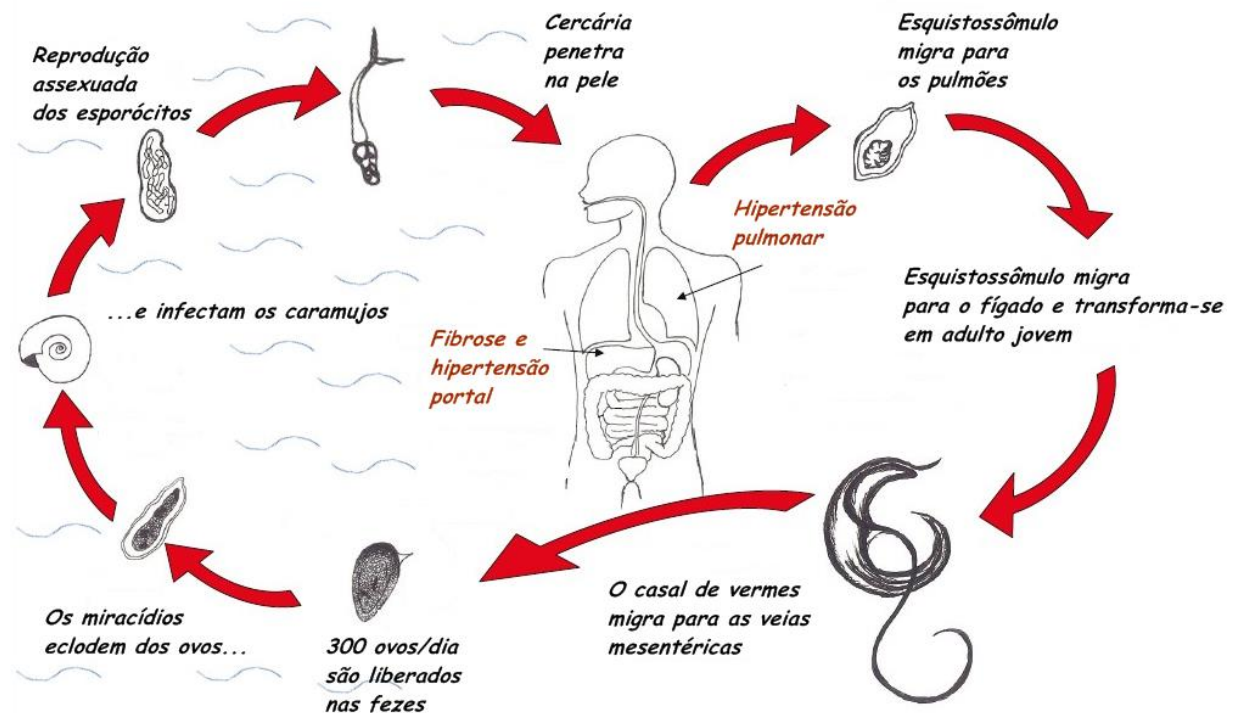


Figura 1: Ciclo do *Schistosoma mansoni*.

Neste ciclo, dois hospedeiros estão envolvidos: um definitivo (vertebrado) e um intermediário (invertebrado). O homem é um importante hospedeiro definitivo e nele o verme se apresenta na forma adulta, se reproduzindo sexuadamente. Os ovos do *S. mansoni* são eliminados no ambiente pelas fezes do hospedeiro definitivo, ocasionando a contaminação de mananciais hídricos. Quando os ovos eclodem, liberam os miracídios que infectam os caramujos (hospedeiros intermediários) de onde, após algumas semanas, retornam à água na forma de cercárias que são formas larvais livres natante do verme. As cercárias penetram através da pele no hospedeiro definitivo e perdem a cauda se transformando em esquistossômulos. Os esquistossômulos, por sua vez, penetram nos vasos sanguíneos e são levados pela circulação para o coração, pulmões e em seguida para o fígado, onde tornam-se adultos jovens e se diferenciam em machos e fêmeas (Katz, 1973). Os vermes adultos acasalados migram para as veias mesentéricas, onde ocorrerá a oviposição. Parte dos ovos atravessa a parede intestinal, alcançam a luz e são eliminados com as fezes para continuar o ciclo de vida do verme, enquanto que outra parte fica retida nos tecidos, como os do fígado, formando ao redor desses ovos uma reação granulomatosa, causa principal da morbidade da doença. Em condições favoráveis o ciclo completo ocorre em torno de 80 dias, ou seja, cerca de 40 dias para cada hospedeiro.

A esquistossomose intestinal pode resultar em dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes. O aumento do fígado é comum em casos avançados, e é frequentemente associada com ascite (barriga d'água) e hipertensão portal. Em tais casos, pode também haver aumento do baço caracterizando um quadro de

hepatoesplenomegalia. Os indivíduos infectados com o *S. mansoni* desenvolvem hepatoesplenomegalia devido aos granulomas formados ao redor dos ovos com produção de antígenos em reação ao esquistossoma no intestino e fígado (Santos, P.E.R; 2013).

Um dos problemas de países onde a esquistossomose é endêmica está relacionado ao controle da doença. A este respeito, medidas isoladas ou combinadas tem sido tomadas, tais como a melhoria do saneamento básico e das condições do abastecimento de água, a educação sanitária das populações expostas, o tratamento individual ou em massa nas áreas de alta incidência, a proteção individual contra a penetração de cercarias, o desenvolvimento de uma vacina e, em menor grau, o controle dos hospedeiros intermediários usando moluscidas (Coura & Amaral, 2004).

No entanto, essas medidas de controle têm muitos inconvenientes, como por exemplo, as elevadas despesas associadas à implementação de condições sanitárias adequadas e de abastecimento de água, o contato intenso da população rural com água potável contaminada e o longo tempo necessário para se realizar uma educação sanitária, os tratamentos individuais ou em massa que embora sejam eficazes na redução da mortalidade, não previnem novas infecções e os pacientes podem desenvolver tolerância e resistência a eles. Além disso, a proteção individual para evitar a propagação da transmissão é improvável, exceto para grupos específicos de pessoas expostas e a ampla disseminação dos hospedeiros intermediários e os seus mecanismos de defesa contra moluscidas,

bem como os altos custos e baixa eficiência desse tipo de controle, estão em desuso devido ao impacto ambiental associado (Coura & Amaral, 2004).

Assim, o método mais eficiente para combater a doença ainda continua sendo o tratamento com uso de medicamentos (Date et al., 2007).

1.2 Quimioterapia da Esquistossomose

A procura sistemática de fármacos quimioterápicos para o tratamento da esquistossomose começou em meados da década de 1920, com o uso do tártaro emético (Figura 2), um antimonial trivalente administrado como injeção intravenosa (Christopherson, J.B.; 1918). Os benefícios foram limitados pelos seus efeitos colaterais; entretanto, tentou-se diminuir esses efeitos e, ao mesmo tempo, preservar a atividade substituindo o tartarato, como transportador de antimônio, por outro composto orgânico. Nestes compostos, a especificidade do efeito quimioterápico está relacionada com a valência do antimônio, com o tipo de ligação à base orgânica e com a natureza dos elementos através dos quais se realiza a união (Narváez, A.J.R., 1983).

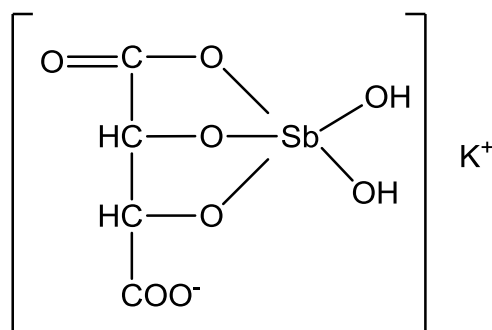
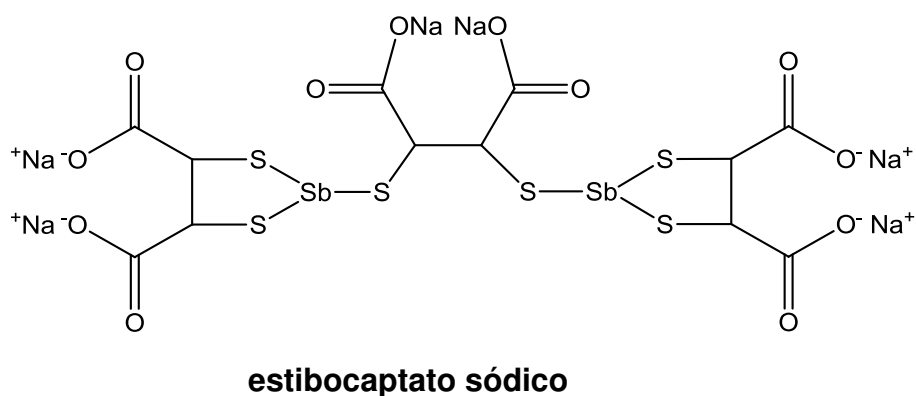
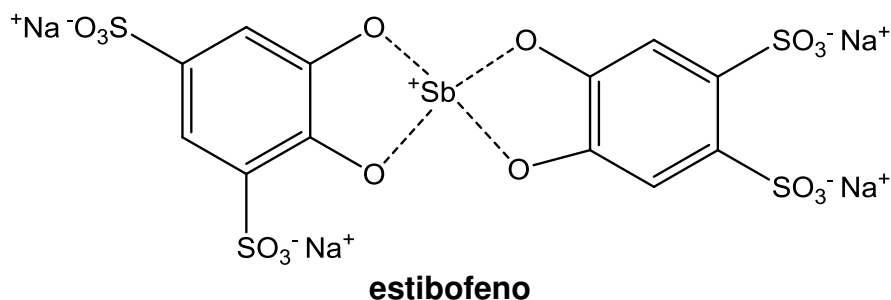


Figura 2: Tártaro emético utilizado no tratamento de esquistossomose.

Dentre os numerosos tipos de compostos antimoniais usados na terapia, quase todos eles mantêm o átomo de antimônio tri ou pentavalente ligado ao oxigênio ou a grupos alifáticos ou aromáticos, ou por enxofre a grupos alifáticos. Os mais usados foram o estibofeno (Fuadina), que era menos tóxico que o tártaro emético, o estibocaptato sódico (Astiban), o menos tóxico dos antimoniais esquistossomicidas, e o tiomalato de antimônio e lítio (Antiomalina), (Figura 3). Entretanto, os sintomas tóxicos produzidos pelos compostos de antimônio orgânico são semelhantes aos do íon antimônio inorgânico. Assim, esses fármacos produziam um grande número de efeitos colaterais, não raramente levando os pacientes a morte súbita e por isto tiveram o seu uso proscrito (Narváez, A.J.R., 1983).



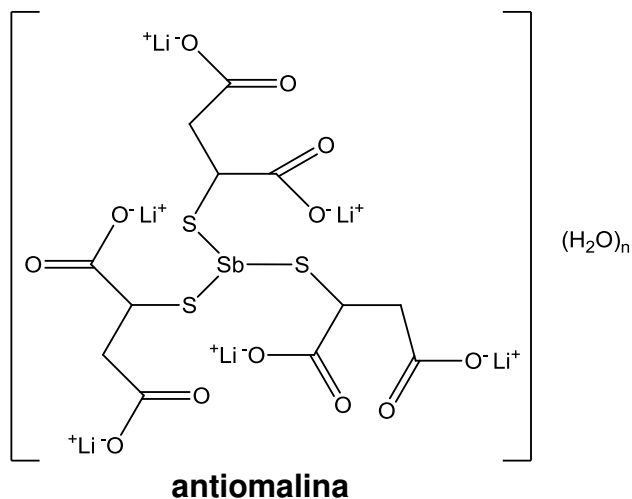


Figura 3: Compostos antimoniais utilizados na terapia esquistossomícida.

Um avanço na quimioterapia da esquistossomose ocorreu a partir de estudos realizados nas décadas de 50 e 60, com a preparação da lucantona (Miracil D), representando o primeiro fármaco não metálico administrado por via oral. No entanto, a lucantona também apresentou alta toxicidade com problemas gastrointestinais e até mesmo comprometimento do sistema nervoso central (Narváez, A.J.R., 1983).

Visando eliminar os efeitos indesejáveis, algumas vezes fatais, foram realizados testes com lucantona em animais para experimentação e foi comprovada a existência de um metabólito ativo hidroximetilado. Desta forma, a hidroximetilação da lucantona deu origem a um fármaco ativo tanto por via muscular como por via oral, em dose única, denominada hicanzona. Assim, a hicanzona apresentava maior atividade esquistossomícida do que a lucantona, em consequência da modificação da reatividade química que lhe confere o grupo hidroximetil na posição 4, (Figura 4). Aceita-se que a característica essencial da

estrutura molecular da hicantona responsável pela eficácia esquistossomicida corresponde ao anel aromático ligado ao grupo hidroximetil e com cadeia alquilaminoetilamina em posição *para* em relação ao referido grupo (Narváez, A.J.R., 1983).

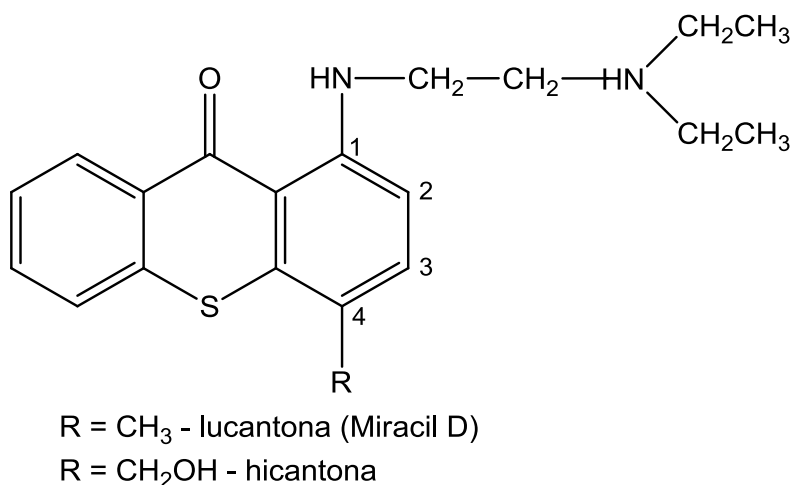


Figura 4: Estruturas moleculares da lucantona e hicantona.

Também neste caso, efeitos tóxicos graves apareceram com o uso da hicantona, causando óbitos (muitos no Brasil) por atrofia amarela aguda do fígado (Andrade *et al.*, 1954), novamente deixando a terapêutica da esquistossomose sem opção.

Em 1964, o niridazol ou 1-(5-nitro-2-tiazolil)-2-imidazolidinona, foi introduzido pela Ciba-Geigy com o nome Ambilhar®, (Figura 5). Este fármaco recebeu considerável atenção, certamente por constituir uma alternativa em relação aos esquistossomicidas utilizados à época. Apresentava a vantagem de ser administrado oralmente, embora exigisse administração da droga por 5 a 7 dias, com baixa tolerância, especialmente causando convulsão e alucinação, além de apresentar mutagenicidade e embriotoxicidade (Albuquerque, 2002). Para que

o niridazol tenha atividade é necessária à presença do grupo 5-nitro. Isso vem corroborar a importância deste grupo na atividade antiparasitária de muitos derivados nitrogenados de heterociclos, como o furano, tiofeno e tiazol, demonstrando que o grupo nitro é parasitóforo. O nitrogênio (N-3') do anel imidazolidínico é característica necessária para a atividade esquistossomicida. Os análogos acíclicos do niridazol são inativos, o que sugere que os anéis devem ser fechados em conformação biológica preferida, que não se apresenta nos compostos de cadeia aberta. A ligação C-N que liga os anéis tiazol e imidazolidínico mostra impedimento estérico, variando o ângulo entre os planos dos anéis e o grau de entrosamento dos elétrons "p" do nitrogênio (N1') do niridazol. Este entrosamento eletrônico pode ser importante para determinar a atividade antiesquistossômica (Narváez, A.J.R., 1983).

A hipótese para o mecanismo de ação do niridazol foi proposta em 1983 por Tracy e colaboradores. Esses autores incubaram *Schistosoma* adulto na presença de [14C]-niridazol e mostraram que a droga não somente foi captada pelo verme, mas se ligou covalentemente às macromoléculas do mesmo (Albuquerque, 2002).

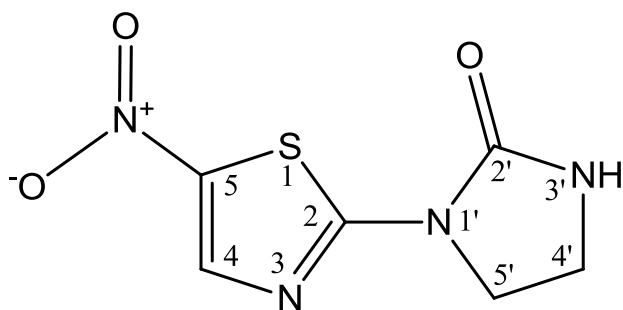


Figura 5: Estrutura molecular do niridazol.

As três espécies principais de *Schistosoma* mostraram-se sensíveis ao niridazol, mas as melhores taxas de cura foram encontradas com o *S. haematobium*, 80-100%, enquanto que a resposta do *S. mansoni* foi de 30-70% e do *S. japonicum* em torno de 50% (Cioli *et al.*, 1995).

No período de 1960 a 1977, três fármacos para o tratamento da esquistossomose tornaram-se disponíveis: metrifonato, oxamniquina (OXA) e praziquantel (PZQ), desenvolvidos pelos laboratórios da indústria farmacêutica alemã Merck, em parceria com a Bayer (Figura 6). Destes, a OXA é utilizada apenas no tratamento de *S. mansoni*. Após a retirada do metrifonato do mercado, devido sua toxicidade e consequentes efeitos colaterais, somente os dois últimos ficaram disponíveis para o tratamento da doença.

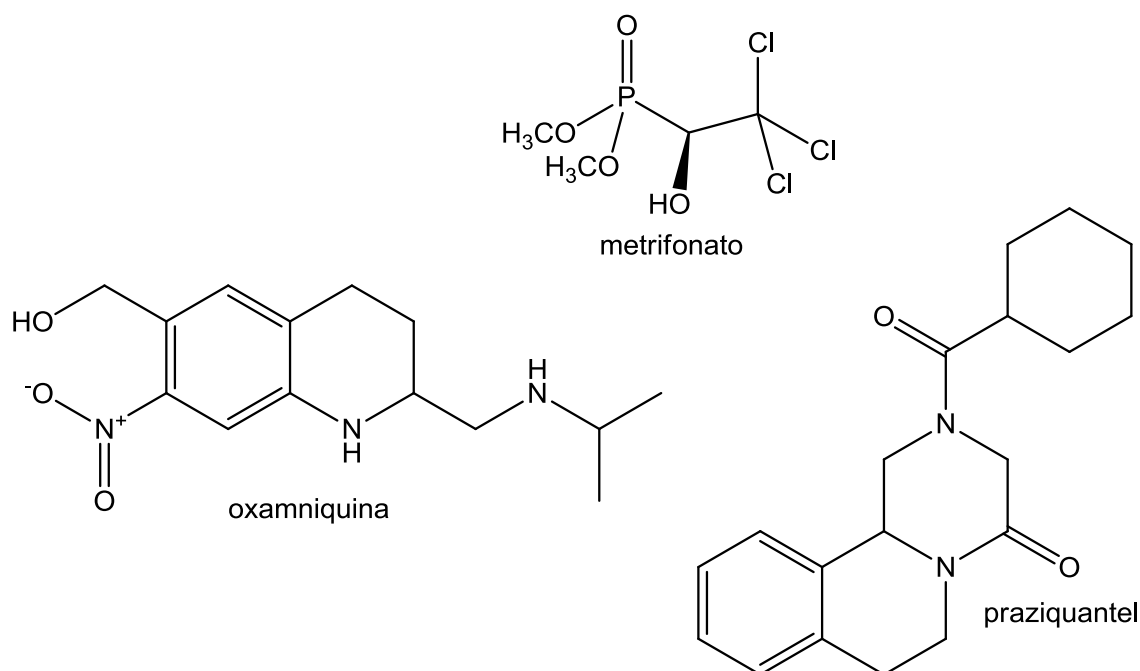


Figura 6: Fármacos disponíveis para o tratamento da esquistossomose após 1960/1970.

No Brasil utilizou-se OXA e PZQ no tratamento convencional da esquistossomose. Os estudos realizados com estes fármacos tiveram início na década de 1970, onde se iniciaram pesquisas com OXA, fármaco de boa tolerância e um elevado percentual de cura, especialmente no Brasil e em alguns países do continente americano, mas sem os mesmos resultados terapêuticos no Egito e no lado oriental e central da África. A OXA apresenta efeitos colaterais no sistema nervoso central, efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Também já foram detectados casos de resistência e tolerância a esse fármaco, além de já ter sido notificada sua baixa atividade nos casos de esquistossomose mansônica aguda (Frézard & Melo, 1997). O mecanismo de ação da OXA não foi completamente elucidado. Alguns autores sugeriram que a OXA é enzimaticamente convertida através de uma quinase ou sulfotransferase para um éster, o qual pode alquilar o DNA do *S. mansoni*, parecendo estar relacionado com a capacidade de inibição irreversível da síntese de ácidos nucleicos nos vermes, e por apresentar um efeito anticolinérgico, o que aumenta a motilidade do verme (Cioli et al., 1995). Neste caso o grupo hidroximetil, presente na posição 6, torna-se essencial à atividade biológica, (Figura 7).

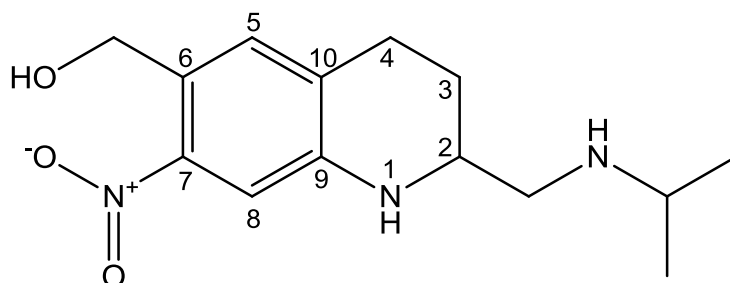


Figura 7: Estrutura molecular da oxamniquina e o grupo hidroximetil (carbono-6).

A OXA apresenta efeito anticolinérgico mostrando-se mais efetiva contra vermes machos de *S. mansoni*, mas sem efeito em outras espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem. Desde meados de 2011, OXA não é mais utilizada no Brasil, permanecendo no mercado nacional apenas PZQ.

O PZQ é o fármaco mais amplamente utilizado para o tratamento e controle da esquistossomose mansônica, apresentando boa tolerância, terapêutica marcante, e também excelente atividade contra todas as demais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, podendo ser usado em larga escala, em dose única oral, além de apresentar preço acessível. Desde os anos 70, é considerado o fármaco de escolha para o tratamento clínico da esquistossomose nas áreas endêmicas.

Desde o início dos ensaios clínicos com esse fármaco, a indústria farmacêutica contou com o apoio da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a realização dos ensaios com protocolos padronizados. Uma série de ensaios laboratoriais e clínicos mostrou a eficácia do PZQ em pacientes de todas as idades e nas diferentes formas clínicas da esquistossomose, incluindo casos avançados como a esquistossomose cerebral causada por *S. japonicum* (Watt et al., 1986) e síndromes neurológicas causadas por *S. mansoni* e *S. haematobium* (Scrimgeour and Gadjusek, 1985).

O PZQ é um fármaco de uso oral que apresenta baixa biodisponibilidade devido a sua alta lipossolubilidade (Mourão et al., 2005). Os fenômenos relacionados com o efeito do PZQ sob o *S. mansoni in vitro* e *in vivo* ainda não foram completamente elucidados. No entanto, se conhece as principais ações,

como por exemplo causar a paralisia muscular do verme após as primeiras horas de exposição ao fármaco, em consequência da inibição da bomba de Na^+ e K^+ dos esquistossomos, provocar rápidas e extensas alterações morfológicas na superfície tegumentar, representada por vacuolizações, destruição dos tubérculos e espinhos, e provocar um aumento da exposição de antígenos na superfície do verme, reação esta relacionada à resposta imunológica do hospedeiro infectado (Cioli et al., 1995). O PZQ é absorvido rápido e completamente ($> 80\%$) após a administração oral, em especial quando ingerido com as refeições. Seu pico plasmático é alcançado de 1 a 3 horas após sua administração. O PZQ sofre uma importante biotransformação metabólica no fígado (fenômeno de primeira passagem hepática) e seus metabólitos inativos são eliminados. Sua meia-vida plasmática oscila entre 1 e 1,5 hora, é bem distribuído no sistema nervoso central (por isso é indicado na neurocisticercose), e a maior parte ($> 90\%$) é eliminada pela urina em 24 horas. Apesar deste perfil, o PZQ apresenta em alguns estudos baixa eficácia no tratamento da esquistossomose. Primeiramente porque esse fármaco, apesar de ser rapidamente absorvido pelo organismo quando administrado oralmente, também desaparece da circulação sanguínea rapidamente, sendo que sua eliminação quase que completa ocorre por volta de 24 horas, através de fezes e urina (Valencia et al., 1994; Leopold et al., 1978). Outro inconveniente é sua baixa solubilidade em água, apresentando problemas de biodisponibilidade da forma farmacêutica convencional, logo, a dose administrada é relativamente alta (Mourão et al., 2005). Por outro lado, ainda é o fármaco mais utilizado para o tratamento da esquistossomose na maioria das

áreas endêmicas em virtude de sua eficácia, facilidade de administração, tolerância às reações adversas, baixo custo e por agir em todas as espécies de *Schistosoma* (Cioli, 1998).

Após o desenvolvimento do PZQ, não houve nenhum progresso significativo em terapias para o tratamento da esquistossomose mansônica. Além disso, o uso extensivo de PZQ e OXA incorreu em casos de tolerância e resistência em algumas linhagens de *S. mansoni* (Parise-Filho & Silveira, 2001; Katz, 2008). A seleção de linhagens resistentes em *Schistosoma* sp. já havia sido comprovada em experimentos que mostraram que doses sub-curativas de PZQ sobre várias gerações, resultaram em vermes menos sensíveis ao fármaco (Fallon & Doenhoff, 1994). Portanto, o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas é extremamente necessário.

1.3 Artemisinina e Derivados

Pesquisas sobre produtos naturais bioativos extraídos de plantas têm sido realizadas, na busca de novos medicamentos que possam substituir os medicamentos atuais ou complementá-los (Matos, 1994; Doenhoff et al., 2009).

Neste contexto, a artemisinina (Qinghaosu), uma lactona sesquiterpênica que contém um grupo endoperóxido (Figura 8), isolada das folhas de uma planta medicinal chinesa, a *Artemisia annua* L. e que apresenta propriedades antimaláricas bastante conhecidas, principalmente contra parasitas resistentes à cloroquina e nos casos de malária cerebral, teve a sua ação esquistossomicida

descrita pela primeira vez em 1980. Em 1982, estudos mostraram que estágios larvares de *S. japonicum* foram sensíveis a artemisinina (Le et al., 1982).

Ainda no princípio da década de 80, a atividade esquistossomicida de alguns derivados de artemisinina, como por exemplo, o artemeter e o artesunato (sal sódico do ácido artesúnico) também foi relatada pelos chineses, os quais através de testes *in vivo*, demonstraram que a administração destes derivados em animais infectados experimentalmente com *S. japonicum*, reduziram sua carga parasitária (Chen et al., 1980).

Outros estudos voltaram a confirmar a atividade esquistossomicida do artesunato e do artemeter, com taxas de cura da ordem de 99% (Le et al., 1983; Le et al., 1982). Em 1984, tais derivados provaram ser eficazes contra estágios juvenis de *Schistosoma* sp., quando os tratamentos realizados com PZQ falharam. Desta forma, tanto artemeter como o artesunato são potenciais fármacos para o tratamento da esquistossomose (Yue et al., 1984; Lu et al., 2010). Ainda, outras pesquisas ampliaram a atividade de derivados de artemisinina para outras espécies de *Schistosoma* sp. que infectam seres humanos. Em particular, os ensaios realizados no Brasil em 1991, mostraram uma redução da carga parasitária em camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com artemeter (Araújo et al., 1991). Na Figura 8, estão apresentadas as estruturas moleculares da artemisinina e os derivados artemeter e ácido artesúnico.

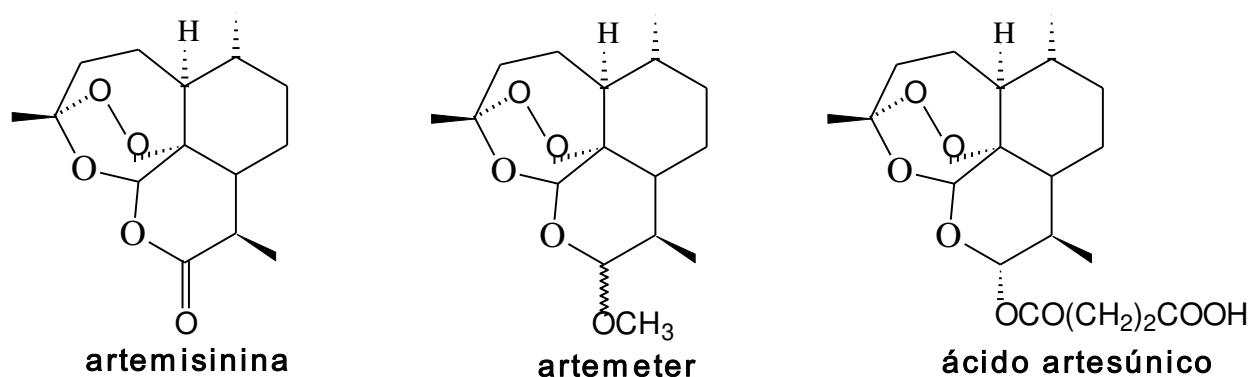


Figura 8: Estruturas moleculares da artemisinina e derivados.

Alterações tegumentares como erosão, a perda de tubérculos nos machos, a formação de vesículas e colapso do tegumento em vermes adultos e esquistossômulos, foram observadas em linhagens de *S. mansoni* tratados com artemisinina e ácido artesúnico (Araújo et al., 1999; Shuhua et al., 2000; Utzinger et al., 2002; Lu et al., 2004; Li et al., 2005; Lu et al., 2006). Estes dados demonstraram o potencial dos compostos mencionados como medicamentos quimioterapêuticos no tratamento de esquistossomose (Utzinger et al., 2000).

Desta forma, um progresso notável foi feito no estudo de atividade anti – *Schistosoma* especialmente com artemeter e artesunato (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003; Xiao et al., 2000; Lu et al., 2010). Também ensaios clínicos com artemeter já foram realizados na Costa do Marfim (África) e demonstraram uma menor incidência de infecções causadas por *S. mansoni* e *S. japonicum* (Utzinger et al., 2003; Xiao et al., 2000). No que diz respeito à toxicidade, foi provado por testes clínicos que derivados da artemisinina são bem tolerados quando administrado por via oral (Nontprasert et al., 2002).

Embora a esquistossomose no Brasil seja causada por uma única espécie, estudos confirmaram a existência de diferentes linhagens de *S. mansoni* e, posteriormente, novas linhagens têm sido isoladas de várias regiões do país.

As linhagens diferem entre si em diversos aspectos, dentre os quais podemos citar a quantidade de vermes que atingem o estágio adulto, o período patente, a infectividade, a patogenicidade, a cinética de liberação de ovos nas fezes e o número de granulomas. Estas diferentes linhagens de *S. mansoni* ainda são conhecidas por exibirem diferenças morfológicas, comportamentais e responderem de forma distinta ao mesmo tratamento. As diferenças de comportamento entre as linhagens, no hospedeiro vertebrado, são esperadas como manifestação da expressão genotípica do verme (Allegretti et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Lemos Neto et al., 1978; Martinez et al., 2003; Yoshioka et al., 2002). Consequentemente, é necessário testar a atividade de potenciais medicamentos esquistossomicidas em diferentes linhagens do verme (Frezza et al., 2013).

O nosso grupo de pesquisa tem estudado a atividade da artemisinina e do ácido artesúnicos em casais adultos de linhagens de *S. mansoni* por meio de testes *in vitro*, com resultados bastante promissores (Allegretti et al., 2012).

No presente trabalho avaliamos a atividade esquistossomicida *in vitro* de alguns derivados da artemisinina, a fim de selecionar os compostos mais ativos para serem utilizados em futuros testes *in vivo*. Os derivados de artemisinina foram sintetizados utilizando como material de partida a diidroartemisinina (Figura 9), a qual foi obtida através da reação de redução da artemisinina utilizando

boroidreto de sódio como agente redutor (Brossi et al., 1988), e posteriormente, foram realizadas reações de esterificação da diidroartemisinina empregando diferentes tipos de anidridos de ácidos carboxílicos para obtenção dos demais derivados (Li et al., 1981).

O mecanismo de reação da síntese dos derivados a partir da diidroartemisinina é caracterizado por uma reação do tipo adição – eliminação nucleofílica, envolvendo inicialmente uma adição nucleofílica no átomo de carbono da carbonila do anidrido de ácido carboxílico utilizado (Figura 9). Este ataque inicial é facilitado pela abertura estérica relativa do átomo de carbono carbonílico e a habilidade do átomo de oxigênio da carbonila de acomodar um par de elétrons da ligação dupla carbono-oxigênio. Após o ataque nucleofílico inicial ter acontecido, o intermediário formado elimina o grupo retirante ligado ao átomo de carbono carbonílico. Esta eliminação leva a regeneração da ligação dupla carbono-oxigênio e a um produto de substituição. Desta forma, o processo global ocorre por um mecanismo do tipo adição-eliminação nucleofílica (Solomons & Fryhle, 2002).

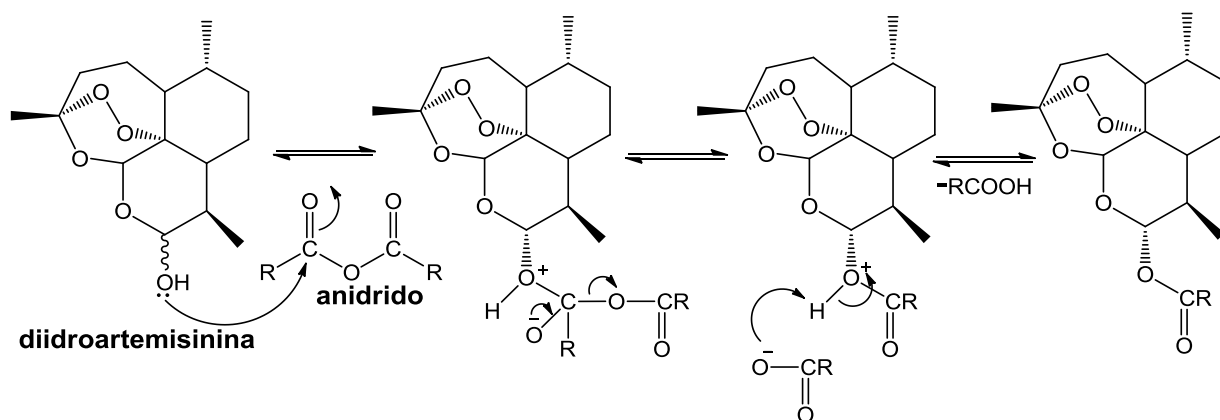


Figura 9: Mecanismo geral da síntese dos derivados de artemisinina, a partir da reação de diidroartemisinina e anidrido de ácido carboxílico.

Com a finalidade de melhorar a solubilidade em água da artemisinina e de seus derivados optou-se pelo uso de polivinilpirrolidona (PVP), que facilita a dissolução de substâncias pouco solúveis em água pelo fenômeno da dispersão sólida. As dispersões sólidas são uma das estratégias mais promissoras para melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água. Com a redução do tamanho das partículas do fármaco ao mínimo absoluto, a biodisponibilidade pode ser melhorada significativamente (Vasconcelos et al., 2007).

O PVP é um polímero formado por unidades monoméricas de vinilpirrolidona (Figura 10), com propriedades bastante interessantes devido a sua alta solubilidade em água. Quando seco encontra-se como um pó de aspecto floculento e por ser inerte em nosso organismo e não absorvido, é utilizado na indústria farmacêutica como excipiente em diversos medicamentos (QNint – Sociedade Brasileira de Química, 2015).

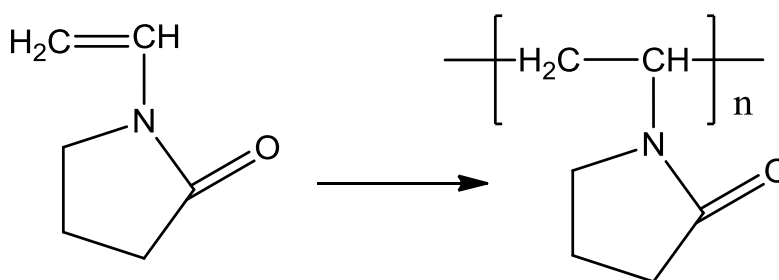


Figura 10: Estruturas moleculares do monômero e do PVP.

Assim, todas as amostras dos compostos submetidos aos testes de atividade esquistossomícida *in vitro* foram previamente dispersas em PVP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivos a síntese de derivados da artemisinina e a avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* contra *S. mansoni* BH.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar e elucidar as estruturas dos derivados de artemisinina, utilizando como intermediário das reações a diidroartemisinina, seguido de reações de esterificação com diversos tipos de anidridos de ácidos carboxílicos.
- ✓ Verificar o efeito da incorporação dos compostos sintetizados em PVP.
- ✓ Avaliar a atividade esquistossomicida, *in vitro*, dos compostos incorporados em PVP, contra *S. mansoni* BH.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade *in vitro* em linhagens celulares humanas, dos compostos que apresentaram maior atividade esquistossomicida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Artemisinina

A artemisinina utilizada como matéria-prima nas reações foi extraída das folhas de *Artemisia annua* L. cultivada no Campo Experimental do CPQBA – UNICAMP (Figura 11), e posteriormente caracterizada através de métodos espectroscópicos.



Figura 11: *Artemisia annua* L. cultivada no Campo Experimental do CPQBA/UNICAMP.

3.1.2 Reagentes

Nas reações de síntese dos derivados de artemisinina foram utilizados os seguintes solventes e reagentes:

Metanol P.A. (Synth®); Boroidreto de Sódio (Acros Organics®); Diclorometano P.A. (Synth®); Piridina P.A. (Synth®); 4-Dimetilaminopiridina (Aldrich®); Anidrido Succínico (Vetec®); Anidrido Acético (Spectrum®); Anidrido Ftálico (J.T. Baker®); Anidrido Glutárico (Fluka®); Ácido Adípico 99% (Acros Organics®); Anidrido Adípico (sintetizado – DQOF/CPQBA); Trimetilsilil diazometano (solução 2,0 M em hexano – Aldrich®); Clorofórmio P.A. (Synth®); Etanol P.A. (Synth®); Hexano P.A. (Synth®); Ácido Acético Glacial P.A. (Synth®); Ácido Sulfúrico 98% P.A. (Synth®); Anisaldeído P.S. (Vetec®); Silicagel 60 (0,040 – 0,063 mm) (Merck®); Placas Cromatográficas Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck®); Polivinilpirrolidona (PVP K-30 – Synth®).

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese do reagente anidrido adípico

O reagente anidrido adípico foi preparado conforme literatura disponível (Li et al., 2003). Em um balão de fundo redondo de 100 mL acoplado com um condensador de refluxo e manta com agitação magnética, adicionou-se 17 mL de anidrido acético e 1,70 g de ácido adípico. Em seguida, o sistema foi aquecido até refluxo e permaneceu nesta condição por 7 h. Então, o ácido acético formado e o excesso de anidrido acético foram destilados sob pressão reduzida (20 mmHg), obtendo-se 1,49 g de anidrido adípico que foi estocado sob atmosfera de nitrogênio em um frasco de vidro e guardado em dessecador.

3.2.2 Síntese dos derivados de artemisinina

A rota de síntese dos compostos análogos ao ácido artesúnicos, através do intermediário diidroartemisinina, está esquematizada abaixo (Figura 12).

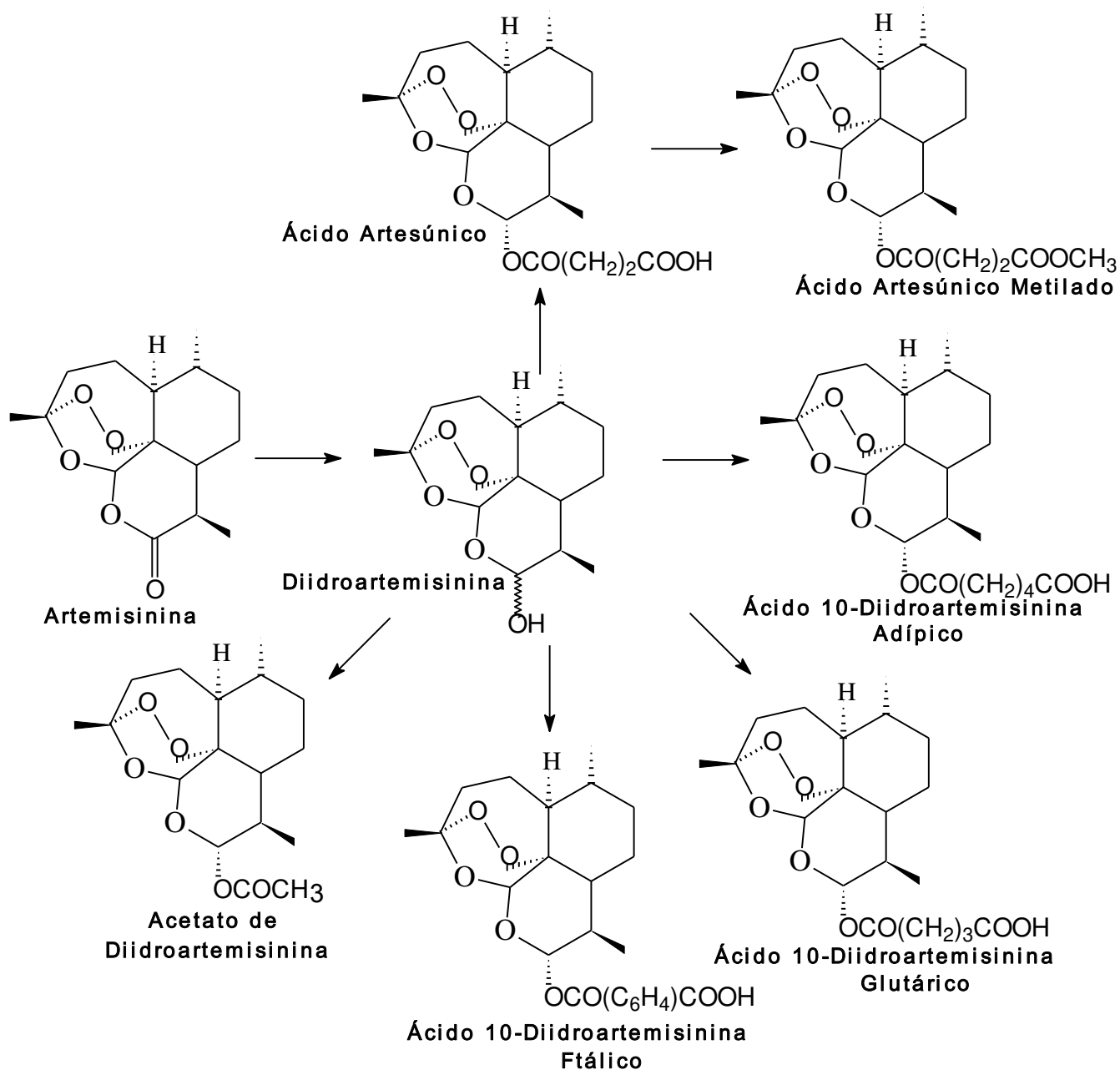


Figura 12: Síntese de derivados da artemisinina através do intermediário diidroartemisinina.

Em todas as reações foram mantidas condições anidras, com passagem de fluxo de nitrogênio pelo sistema reacional, uma vez que anidridos de ácidos carboxílicos podem absorver umidade convertendo-se no ácido correspondente. A Figura 13, ilustra o sistema de reação utilizado na síntese de todos os compostos.



Figura 13: Foto do sistema reacional, composto por um balão de fundo redondo com quatro bocas, equipado com agitador magnético, cotovelo para adição de sólidos e borbulhador de gases.

3.2.2.1 Síntese de diidroartemisinina

A diidroartemisinina foi sintetizada conforme literatura disponível (Brossi et al., 1988). Em um balão de três bocas equipado com um agitador magnético, um borbulhador de gases e um aparato para adição de sólidos, introduziu-se 700 mL de metanol e 28,00 g (0,10 moles) de artemisinina. Em seguida, agitou-se o meio reacional, resfriou-se o sistema a temperatura de 0° a 5° C e adicionou-se por um período de 1 h, sob atmosfera de nitrogênio, a quantidade de 9,70 g (0,26 moles)

de boroidreto de sódio. Manteve-se a agitação e a temperatura por um período de 2 h. Acompanhou-se o progresso da reação através da retirada de alíquotas do meio reacional e posteriormente fez-se a análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se como fase móvel uma solução de clorofórmio / metanol 2%.

Então, adicionou-se 37 mL de ácido acético glacial para neutralizar o meio reacional, mantendo a temperatura entre 0 a 5 °C. Em seguida, adicionou-se 330 mL de água destilada e a solução foi concentrada em evaporador rotativo até que aproximadamente 95% do volume inicial de metanol se evaporasse. Transferiu-se a solução para um becker e agitou-se lentamente por 2 h, mantendo a temperatura entre 0 a 5 °C. Filtrou-se à vácuo o precipitado formado de coloração branca, o qual foi sêco e pesado. A massa do produto bruto obtida foi de 25,50 g. Após cristalização em metanol, obteve-se 22,70 g de diidroartemisinina e ponto de fusão de 152 a 155 °C, com rendimento de 80,5%.

3.2.2.2 Síntese do ácido artesúnic

O ácido artesúnic foi sintetizado conforme literatura disponível (Li et al., 1981). Em um balão de quatro bocas equipado com um agitador magnético, um borbulhador de gases e aparato para adição de sólidos, introduziu-se sob agitação e atmosfera de nitrogênio 200 mL de diclorometano, 3,18 g ($1,12 \times 10^{-2}$ moles) de diidroartemisinina, 3 mL ($3,71 \times 10^{-2}$ moles) de piridina e 0,32 g ($2,62 \times 10^{-3}$ moles) de dimetilaminopiridina (DMAP). Em seguida, adicionou-se 1,68 g ($1,68 \times 10^{-2}$ moles) de anidrido succínico por um período de 30 min.

Manteve-se o sistema reacional nestas condições, à temperatura ambiente, por um período de 24 h. Acompanhou-se o progresso da reação através da retirada de alíquotas do meio reacional e posteriormente fez-se a análise por CCD, usando como fase móvel uma solução de clorofórmio / metanol 10%.

Então, a mistura reacional foi vertida sobre 200 mL de água destilada e gelo moído. Adicionou-se uma solução de ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ até pH 2,0 – 3,0. Em seguida, extraiu-se o meio reacional com três porções de 100 mL de diclorometano. Agrupou-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se até secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 35°C . O produto bruto obtido foi cristalizado em hexano / diclorometano, fornecendo 4,08 g de ácido artesúnico e ponto de fusão de 134 a 137°C , com rendimento de 95,0%.

3.2.2.3 Síntese do ácido 10–diidroartemisinina ftálico

O ácido 10–diidroartemisinina ftálico foi sintetizado conforme literatura (adaptado de Li et al., 1981). Em um balão de quatro bocas equipado com um agitador magnético, um borbulhador de gases e aparato para adição de sólidos, introduziu-se sob agitação e atmosfera de nitrogênio 100 mL de diclorometano, 0,40 g ($1,41 \times 10^{-3}$ moles) de diidroartemisinina, 3,2 mL (0,0396 moles) de piridina e 0,32 g ($2,62 \times 10^{-3}$ moles) de dimetilaminopiridina (DMAP). Em seguida, adicionou-se 4,20 g ($2,83 \times 10^{-2}$ moles) de anidrido ftálico por um período de 30 min. Manteve-se o sistema reacional nestas condições, à temperatura ambiente, por um período de 36 h. Acompanhou-se o progresso da reação através da

retirada de alíquotas do meio reacional e posteriormente fez-se a análise por CCD, usando como fase móvel uma solução de clorofórmio / metanol 10%.

Então, a mistura reacional foi vertida sobre 200 mL de água destilada e gelo moído. Adicionou-se uma solução de ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ até pH 2,0 – 3,0 e extraiu-se o meio reacional com três porções de 100 mL de diclorometano. Agrupou-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se até a secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 35°C . Obteve-se uma massa de 0,58 g de uma mistura de produtos que através de análise por CCD indicaram a presença de diidroartemisinina e ácido 10-diidroartemisinina ftálico. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna sobre silicagel 60 (0,040 – 0,063 mm) e gradiente de solventes (clorofórmio, metanol) fornecendo 0,055 g de ácido 10-diidroartemisinina ftálico, com rendimento de 9,0%.

3.2.2.4 Síntese do ácido 10–diidroartemisinina glutárico

O ácido 10–diidroartemisinina glutárico foi sintetizado conforme literatura (adaptado de Li et al., 1981). Em um balão de quatro bocas equipado com um agitador magnético, um borbulhador de gases e aparato para adição de sólidos, introduziu-se sob agitação e atmosfera de nitrogênio 100 mL de diclorometano, 0,20 g ($7,04 \times 10^{-4}$ moles) de diidroartemisinina, 2 mL (0,0247 moles) de piridina e 0,45 g ($3,68 \times 10^{-3}$ moles) de dimetilaminopiridina (DMAP). Em seguida, adicionou-se 2,41 g ($2,11 \times 10^{-2}$ moles) de anidrido glutárico por um período de 30 min. Manteve-se o sistema reacional nestas condições, à temperatura ambiente, por um período de 36 h. Acompanhou-se o progresso da reação através da retirada de

alíquotas do meio reacional e posteriormente fez-se a análise por CCD, usando como fase móvel uma solução de clorofórmio / metanol 10%.

Então, a mistura reacional foi vertida sobre 200 mL de água destilada e gelo moído. Adicionou-se uma solução de ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ até pH 2,0 – 3,0 e extraiu-se o meio reacional com três porções de 100 mL de diclorometano. As fases orgânicas foram agrupadas e após secagem com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se até secar, sob pressão reduzida, à temperatura de 35°C .

Obteve-se uma massa de 0,26 g de produto bruto, que através de análise por CCD indicou a presença de ácido 10-diidroartemisinina glutárico e impurezas. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna sobre silicagel 60 (0,040 – 0,063 mm) e gradiente de solventes (clorofórmio, metanol) fornecendo 0,08 g de 10-diidroartemisinina glutárico, e rendimento de 28,6%.

3.2.2.5 Síntese do ácido 10–diidroartemisinina adípico

O ácido 10–diidroartemisinina adípico foi sintetizado conforme literatura (adaptado de Li et al., 1981). Em um balão de quatro bocas equipado com um agitador magnético, um borbulhador de gases e aparato para adição de sólidos, introduziu-se sob agitação e atmosfera de nitrogênio 60 mL de diclorometano, 0,11 g ($3,87 \times 10^{-4}$ moles) de diidroartemisinina, 0,5 mL ($6,18 \times 10^{-3}$ moles) de piridina e 0,25 g ($2,05 \times 10^{-3}$ moles) de dimetilaminopiridina (DMAP). Em seguida, adicionou-se 1,49 g ($1,16 \times 10^{-2}$ moles) de anidrido adípico previamente sintetizado, por um período de 30 min. Manteve-se o sistema reacional nestas condições, à temperatura ambiente, por um período de 24 h. Acompanhou-se o progresso da

reação através da retirada de alíquotas do meio reacional e posteriormente fez-se análise por CCD, usando como fase móvel uma solução de clorofórmio / metanol 10%.

Então, a mistura reacional foi vertida sobre 100 mL de água destilada e gelo moído. Em seguida, adicionou-se uma solução de ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ até pH 2,0 – 3,0 e extraiu-se o meio reacional com três porções de 60 mL de diclorometano. Agrupou-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se até a secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 35°C . Deste modo, obteve-se uma massa de 0,03 g do ácido 10–diidroartemisinina adípico e rendimento de 18,8%.

3.2.2.6 Síntese do éster metílico do ácido artesúnico

Em um balão de quatro bocas equipado com um agitador magnético e um borbulhador de gases, introduziu-se sob agitação e atmosfera de nitrogênio, 11,0 mL de diclorometano, 1,0 mL de metanol e 91,6 mg ($2,38 \times 10^{-4}$ moles) de ácido artesúnico. Em seguida, adicionou-se 0,45 mL ($9,0 \times 10^{-4}$ moles) de uma solução $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de trimetilsilil-diazometano (TMSD) em hexano (Leggio et al., 2009). Manteve-se o sistema reacional nestas condições, à temperatura ambiente, por um período de 1 h. Acompanhou-se o progresso da reação através da retirada de alíquotas do meio reacional e posteriormente fez-se a análise por CCD, usando como fase móvel uma solução de clorofórmio / metanol 5%.

Em seguida, transferiu-se a solução para um balão de uma boca de 100 mL e o solvente foi evaporado até a secura, sob pressão reduzida, à temperatura de

35 °C. Deste modo, obteve-se uma massa de 94,8 mg do éster metílico do ácido artesúnicos (ácido artesúnicos metilado) com rendimento de 100,0%.

3.2.2.7 Síntese do acetato de diidroartemisinina

O acetato de diidroartemisinina foi sintetizado conforme literatura disponível (adaptado de Haynes et al., 2002). Em um balão de quatro bocas equipado com um agitador magnético, um borbulhador de gases e funil de adição, introduziu-se sob agitação e atmosfera de nitrogênio 100 mL de diclorometano, 0,40 g ($1,41 \times 10^{-3}$ moles) de diidroartemisinina, 4 mL (0,0494 moles) de piridina e 0,32 g ($2,62 \times 10^{-3}$ moles) de dimetilaminopiridina (DMAP). Em seguida, adicionou-se 2,76 g ($2,70 \times 10^{-2}$ moles) de anidrido acético por um período de 15 min. Manteve-se o sistema reacional nestas condições, à temperatura ambiente, por um período de 24 h. Acompanhou-se o progresso da reação através da retirada de alíquotas do meio reacional e posteriormente fez-se a análise por CCD, utilizando como fase móvel uma solução de clorofórmio / metanol 5%.

Então, a mistura reacional foi vertida sobre 200 mL de água destilada e gelo moído. Adicionou-se 30 mL de uma solução de ácido clorídrico $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ até pH 2,0 – 3,0 e extraiu-se o meio reacional com três porções de 100 mL de diclorometano. Agrupou-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se até a secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 35 °C. Deste modo, obteve-se uma massa de 0,39 g do acetato de diidroartemisinina e ponto de fusão de 125 a 128 °C, com rendimento de 84,9%.

3.3 Métodos de análise dos derivados de artemisinina

3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por CCD foram efetuadas em cromatoplaças de alumínio, silicagel 60 F₂₅₄, marca Merck, utilizando fases móveis definidas de acordo com a polaridade dos compostos.

A detecção dos compostos foi realizada por irradiação com lâmpada Ultravioleta (UV) a 254 nm e 366 nm e/ou pulverização com solução de anisaldeído (ácido acético : ácido sulfúrico : anisaldeído (50:1:0,5 v/v) e aquecimento em estufa a 100 °C por 5 min. (Wagner & Bladt, 1996).

3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os compostos artemisinina, diidroartemisinina, ácido artesúrico e acetato de diidroartemisinina foram solubilizados em clorofórmio deuterado e as soluções obtidas encaminhadas para análise em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, marca Bruker Avance 500 MHz.

3.3.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O composto acetato de diidroartemisinina foi analisado por espectrometria de ressonância ciclônica de íons por transformada de Fourier no modo positivo, em equipamento FT–ICR MS, marca Thermo Scientific.

3.3.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os compostos artemisinina, diidroartemisinina, ácido artesúnicos, acetato de diidroartemisinina e éster metílico do ácido artesúnicos foram analisados em espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier, após preparo de pastilhas das amostras misturadas com brometo de potássio. Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} e 16 varreduras em equipamento Spectrum One – FTIR Spectrometer, marca Perkin Elmer.

3.4 Incorporação dos compostos sintetizados em polivinilpirrolidona (PVP)

Todas as amostras dos compostos sintetizados foram testadas dispersas em PVP. Conforme protocolo do laboratório (Santos, P.E.R.; 2013), na preparação das amostras utilizou-se a relação 1:4 de quantidade de massa do composto sintetizado / quantidade de massa de PVP, como a melhor proporção para solubilização das amostras a serem encaminhadas para os testes de atividade esquistossomícida *in vitro*.

Deste modo, pesou-se cinco amostras de 10 mg dos compostos ácido 10–diidroartemisinina ftálico, ácido 10–diidroartemisinina glutárico, ácido 10–diidroartemisinina adípico, éster metílico do ácido artesúnicos, acetato de diidroartemisinina, ácido artesúnicos e diidroartemisinina em cinco frascos de vidro de 10 mL, seguido da adição de 2,5 mL de uma solução de 4,00 g de polivinilpirrolidona (PVP – K30) em 250 mL de etanol 99%. As amostras foram

solubilizadas com auxílio de um banho de ultrassom, à temperatura ambiente, e secas sob fluxo de nitrogênio.

3.5 Avaliação *in vitro* da atividade esquistossomicida da artemisinina e seus derivados sobre vermes adultos de *S. mansoni* BH

3.5.1 Manutenção dos vermes e infecção dos animais

Os testes *in vitro* da atividade esquistossomicida foram realizados pela doutoranda Rosimeire N. de Oliveira, no Laboratório de Helmintologia do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. Silmara M. Allegretti. A linhagem de *S. mansoni* estudada foi a BH (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), mantida em moluscos planorbídeos *Biomphalaria glabrata*. A infecção dos animais foi realizada de acordo com o método descrito por Oliver & Stirewalt, em 1952. Neste estudo, fêmeas de camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss-SPF com 30 dias de idade e pesando aproximadamente 22 g foram infectadas individualmente com cerca de 100 cercárias de *S. mansoni*, utilizando-se a técnica de imersão caudal em suspensão cercariana, durante 2 h com exposição à luz e temperatura de 28 °C. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. O presente trabalho está vinculado a projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob protocolo nº 3248-1 (Anexos – Figura 18).

3.5.2 Ensaios de atividade esquistossomicida *in vitro*

3.5.2.1 Obtenção dos vermes adultos de *S. mansoni*

Após 60 dias de infecção do hospedeiro definitivo, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os vermes adultos de *S. mansoni* foram recuperados por meio da perfusão do sistema porta-hepático e das veias mesentéricas, de acordo com Pellegrino & Siqueira (1956). Os mesmos foram lavados cuidadosamente por três vezes em meio de cultura RPMI-1640 (Nutricell®).

3.5.2.2 Amostras incorporadas em PVP para ensaios de Cultura *in vitro*

As amostras incorporadas em PVP foram solubilizadas em solução tampão fosfato-salino (PBS). As amostras avaliadas foram: artemisinina, diidroartemisinina, ácido artesúico, ácido 10–diidroartemisinina ftálico, ácido 10–diidroartemisinina glutárico, ácido 10–diidroartemisinina adípico, éster metílico do ácido artesúico e acetato de diidroartemisinina.

3.5.2.3 Ensaios *in vitro*

Após recuperação e lavagem dos vermes, um casal dos mesmos foi transferido para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços (TTP®) (Figura 14), contendo meio de cultura RPMI-1640 (Nutricell®) composto por 0,05 g.L⁻¹ de estreptomicina, 10000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 0,30 g.L⁻¹ de L- Glutamina, 2,00 g.L⁻¹ de D- Glicose, 2,00 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 5,96 g.L⁻¹ de Hepes. Posteriormente, foram alicotadas as concentrações das amostras avaliadas – 25, 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹,

totalizando um volume final de 2 mL por poço. O grupo controle negativo foi mantido em meio RPMI sem adição de compostos/fármacos. Sequencialmente, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C (Xiao et al., 2007). Todos os ensaios foram realizados em cinco réplicas. As placas foram observadas em microscópio invertido (Leica®) DMI-500, em intervalos crescentes e regulares de 2h até 72 h. Para análises, foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade, oviposição, alterações tegumentares e/ou morfológicas e mortalidade dos vermes (De Oliveira et al., 2013).

	1	2	3	4	5	6
A	200	200	50	100	25	100
B	25	200	50	100	50	50
C	CTRL	25	CTRL	200	100	CTRL
D	100	50	25	200	CTRL	25

Figura 14: Placa com 24 poços para avaliação da atividade esquistossomicida de derivados da artemisinina, com distribuição aleatória das amostras (valores expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$), adaptado de Santos, P.E.R.; 2013.

3.6 Avaliação da citotoxicidade de derivados da artemisinina

Os testes de citotoxicidade foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA – UNICAMP, sob coordenação da Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz. As amostras avaliadas neste ensaio foram: ácido artesúnicos e acetato de diidroartemisinina.

A linhagem celular não tumoral de queratinócitos humanos (HaCaT) utilizada neste estudo foi obtida na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP e as demais linhagens tumorais vieram do National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos. As linhagens foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina:estreptomicina (100 UI/mL : 100 µg/mL), na densidade de inoculação de $3,0 \times 10^4$ cel/mL. Foram inoculados 100µL/compartimento de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, as quais foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T0), que continha a mesma linhagem celular utilizada no experimento. As amostras foram diluídas em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) na concentração de 0,1 g/mL.

Para adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em meio de cultura, o que evita a toxicidade do DMSO. As amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, (100 µL/compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubadas por 48 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. No momento da adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T0 foram fixadas com 50µL/compartimento

de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma®), para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal T0. Após 48 h de tratamento, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA) e incubadas por 1 h, a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, foram adicionados 50 µL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB, Sigma®) a 0,4% (massa/volume) dissolvido em ácido acético a 1% e, a seguir, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 min. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150µL/compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada. Se $T > C$ a amostra-teste estimulou o crescimento celular. Se $T \geq T_0$ e $< C$, a amostra-teste inibiu o crescimento celular, ou seja, houve um efeito citostático. Sendo T a média da absorbância da célula tratada, C o controle de célula e T0 o controle das células no dia da adição das amostras, o resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento.

Para estas condições, o cálculo do crescimento celular (%) é realizado pela fórmula $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$. Se $T < T_0$, a amostra-teste induziu morte celular, ou seja, efeito citocida e pode ser calculada por $100 \times [(T - T_0) / T_0]$ (Monks et al., 1991). Esses resultados foram expressos em curva de crescimento celular em função da concentração da amostra e, a partir deles, pode-se calcular a concentração efetiva GI50 (concentração necessária para inibição de 50% da proliferação celular), através de regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation) (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006; Denny et al., 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Semi-síntese dos compostos

A artemisinina e seus derivados têm sido amplamente utilizados no tratamento de diversos tipos de malária. A partir da década de 80, estes compostos também revelaram atividade esquistossomicida em estudos realizados por cientistas chineses. Neste trabalho foram sintetizados alguns derivados de artemisinina e avaliada a atividade esquistossomicida *in vitro* contra *S. mansoni* BH. O nosso grupo de pesquisa tem estudado também a ação da artemisinina e derivados contra vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem SE, avaliando a atividade esquistossomicida *in vitro* e buscando elucidar o mecanismo de ação destes compostos, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sonda fluorescente.

As etapas para a obtenção dos derivados da artemisinina estão descritas e esquematizadas no **item 3.2.2**.

A conversão de artemisinina em diidroartemisinina ocorreu através de uma reação de redução com boroidreto de sódio, utilizando-se metanol como solvente à temperatura de 0 °C. O grupo endoperóxido, o qual é responsável pela atividade antimalárica da molécula, é instável na presença de ácidos e bases. Porém, segundo Cabri et al., 2011; e Butler & Wu, 1992; a redução com boroidretos não provoca qualquer alteração no grupo endoperóxido, sendo esta a razão para a escolha do método de redução empregado. Obteve-se um rendimento de 80,5% para a reação de redução da artemisinina e a diidroartemisinina sintetizada foi utilizada como material de partida das reações de síntese dos demais derivados.

Assim, foram realizadas reações de acilação da diidroartemisinina com diversos tipos de anidridos, na presença de uma base como a piridina e do catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP), produzindo o ácido artesúnicos e seus análogos. Deste modo, a conversão de diidroartemisinina em ácido artesúnicos foi executada utilizando-se o anidrido succínico. Nas sínteses de ácido 10-diidroartemisinina ftálico, ácido 10-diidroartemisinina glutárico e ácido 10-diidroartemisinina adípico utilizou-se o anidrido ftálico, anidrido glutárico e anidrido adípico, respectivamente.

Os rendimentos das reações de síntese do ácido artesúnicos e seus análogos foram muito discrepantes entre si. Enquanto o rendimento obtido na síntese do ácido artesúnicos foi de 95,0%, na síntese do ácido 10-diidroartemisinina ftálico o rendimento foi de apenas 9,0%. A explicação para estes dados reside no fato do composto ácido 10-diidroartemisinina ftálico ser quimicamente instável, sendo facilmente hidrolisado, originando o produto de partida, a diidroartemisinina (Capela, 2011). Na síntese dos outros dois compostos análogos do ácido artesúnicos, os rendimentos obtidos nas reações foram de 28,6% para o ácido 10-diidroartemisinina glutárico e 18,8% para o ácido 10-diidroartemisinina adípico (Figura 15).

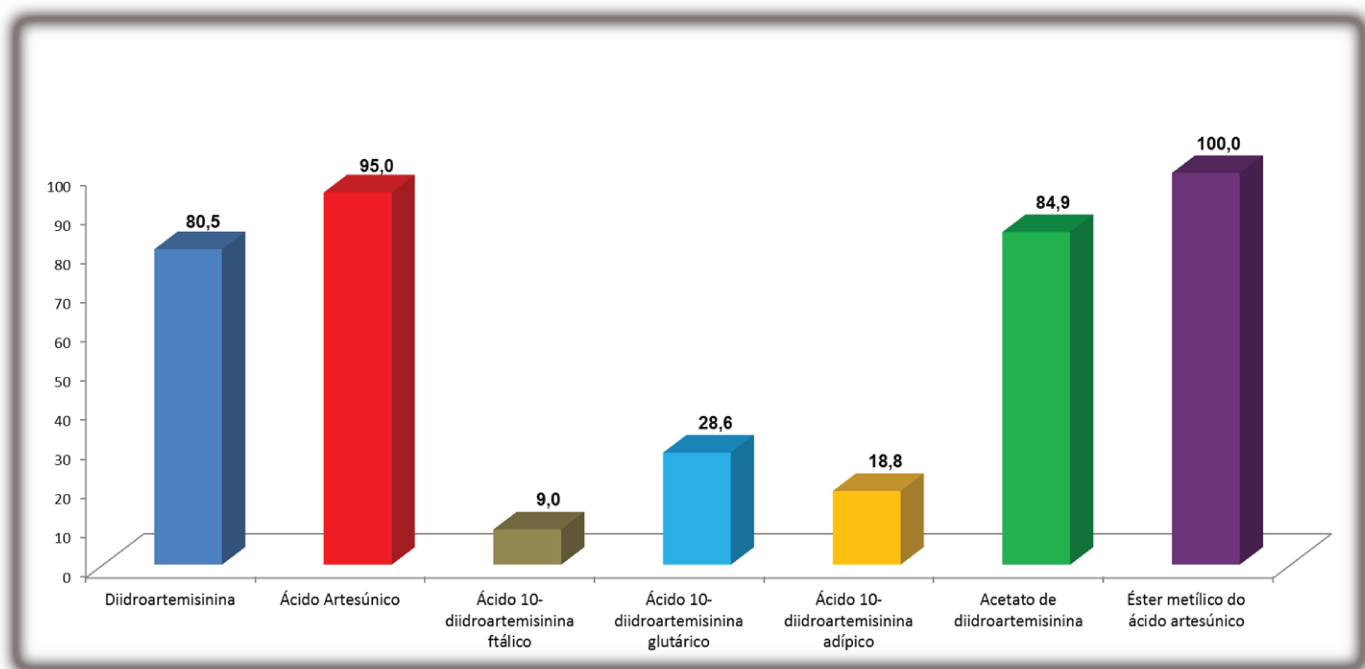


Figura 15: Rendimento (%) das reações de síntese dos derivados de artemisinina.

Comparando-se as condições reacionais utilizadas na síntese destes dois compostos com aquelas verificadas para a síntese do ácido artesúnic, observa-se a necessidade de adicionar uma maior quantidade do anidrido correspondente (glutárico ou adípico), maior quantidade de catalisador e maior tempo de reação para finalizar o processo. Assim, observamos que a reatividade da diidroartemisinina é diferenciada em relação ao anidrido ácido utilizado, uma vez que na presença de anidrido succínico as condições reacionais foram mais brandas do que com anidrido glutárico ou anidrido adípico.

Na síntese do éster metílico do ácido artesúnic fez-se a opção de substituir o reagente diazometano, o qual é tradicionalmente usado em reações de esterificação de ácidos carboxílicos, por trimetilsilil-diazometano (TMSD). O diazometano é um reagente altamente tóxico porque na presença de prótons

relativamente ácidos, forma-se o íon metil diazônio, que é capaz de metilar a hidroxila alcoólica, e funções amino, tiol e carboxílica de estruturas biológicas (Leggio et al., 2009).

Além da elevada toxicidade, o diazometano também é inflamável, fotossensível, termicamente instável e explosivo. Pode ser preparado através do reagente N-metil-N-nitroso uréia, mas este precursor é altamente cancerígeno e deve ser manuseado com cuidado. Assim, na reação de esterificação do ácido artesúnicos que realizamos, o diazometano foi gerado *in situ* a partir de trimetilsilil diazometano, um precursor seguro e disponível comercialmente. O TMSD deve ser utilizado na presença de um nucleófilo prótico como por exemplo metanol, o qual determina a liberação de diazometano no meio reacional, que posteriormente será convertido em íon metil diazônio. Embora o TMSD geralmente reaja mais lentamente do que o diazometano, ele está disponível comercialmente e a sua utilização pode ser estendida também a campos não exclusivamente químicos, como por exemplo em Medicina e Biologia, por causa da segurança do reagente e a ausência de riscos para a saúde (Leggio et al., 2009). Obteve-se um rendimento de 100,0% na formação do éster metílico do ácido artesúnicos.

Na reação de acetilação de diidroartemisinina produzindo o acetato de diidroartemisinina, foi utilizado o anidrido acético. Esta reação apresentou-se muito mais rápida que aquelas realizadas com outros tipos de anidridos ácidos e o produto final obtido, após tratamento do meio reacional, não mostrava impurezas nas análises preliminares por CCD. O rendimento para a síntese de acetato de diidroartemisinina foi de 84,9%.

4.2 Caracterização dos compostos

Dentre todos os compostos obtidos nesta dissertação, realizamos a caracterização de quatro deles de acordo com os resultados dos testes de atividade esquistossomícida *in vitro* para *S. mansoni* BH.

Desta forma, os compostos artemisinina (molécula precursora), diidroartemisinina (intermediário de todas as reações), ácido artesúnico e acetato de diidroartemisinina foram analisados por métodos espectroscópicos e espectrométricos para confirmação de suas estruturas.

4.2.1 Artemisinina

A atribuição dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para a artemisinina, foi realizada por comparação com dados descritos por Yadav et al., 2003; Capela, 2011; (Figura 16), (Quadros 1 e 2).

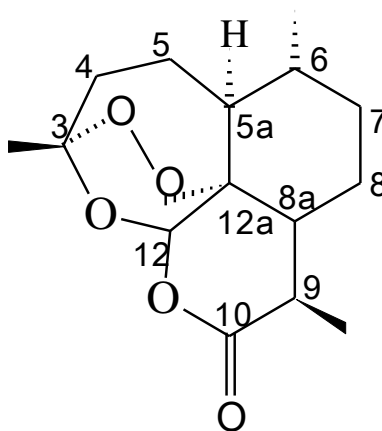


Figura 16: Estrutura da artemisinina com numeração dos átomos de carbono.

O espectro de RMN ^1H da artemisinina (Anexos – Figura 1) mostrou sinais de hidrogênios de três grupos metílicos (δ 1,00; 1,21 e 1,44 ppm) e um sinal do próton ligado ao C_{12} com deslocamento químico de 5,86 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C (Anexos – Figura 2) foram observados 15 sinais referentes a 15 átomos de carbono com um sinal em δ 172,06 ppm característico do carbono do grupo carbonila da lactona.

Quadro 1: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para a artemisinina, com dados da literatura.

Hidrogênios	Literatura* δ (ppm) (multiplicidade, n $^\circ$ de H)	Experimental δ (ppm) (multiplicidade, n $^\circ$ de H)
9-CH ₃	1,00 (d, J = 6,0 Hz, 3H)	1,00 (d, J = 6,0 Hz, 3H)
5-CH ₂	1,01 – 1,13 (m, 2H)	1,04 – 1,13 (m, 2H)
6-CH ₃	1,21 (d, J = 7,4 Hz, 3H)	1,21 (d, J = 7,5 Hz, 3H)
8-CH ₂ ; 8a-CH	1,34 - 1,43 (m, 3H)	1,35 - 1,51 (m, 3H)
3-CH ₃	1,44 (s, 3H)	1,44 (s, 3H)
7-CH ₂	1,74 – 1,79 (m, 2H)	1,74 – 1,79 (m, 2H)
6-CHCH ₃	1,86 – 1,90 (m, 1H)	1,87 – 1,90 (m, 1H)
4-CH ₂	1,97 – 2,07 (m, 2H)	1,97 – 2,09 (m, 2H)
COCHCH ₃ 5a	2,40 – 2,46 (qd, 1H)	2,40 – 2,46 (qd, 1H)
COCHCH ₃ 9	3,36 – 3,41 (qd, 1H)	3,37 – 3,42 (qd, 1H)
OCHO 12	5,84 (s, 1H)	5,86 (s, 1H)

(s: singleto; d: dubleto; m: multiplete e qd: quadruplete)

*Referência: Yadav et al., 2003.

Quadro 2: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para a artemisinina, com dados da literatura.

Carbonos	Literatura* $\delta(\text{ppm})$	Experimental $\delta(\text{ppm})$
3	105,4	105,36
4	35,91	35,87
5	24,86	24,82
5a	50,07	50,03
6	37,54	37,49
7	33,61	33,57
8	23,42	23,37
8a	44,98	44,94
9	32,90	32,86
10	172,10	172,06
12	93,72	93,69
12a	79,51	79,47
$\text{CH}_3\text{--}3$	25,21	25,17
$\text{CH}_3\text{--}6$	19,85	19,80
$\text{CH}_3\text{--}9$	12,57	12,53

*Referência: Capela, 2011.

O espectro no infravermelho da artemisinina (Anexos – Figura 3) demonstrou a presença de duas bandas características, de forte intensidade, em 1736 cm^{-1} relativa ao grupo carbonila da lactona e em 994 cm^{-1} característica para ligação O-O do grupo endoperóxido.

4.2.2 Diidroartemisinina

As comparações dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a diidroartemisinina foram realizadas com dados da literatura (Kardono et al., 2014; Capela, 2011), (Figura 17), (Quadros 3 e 4).

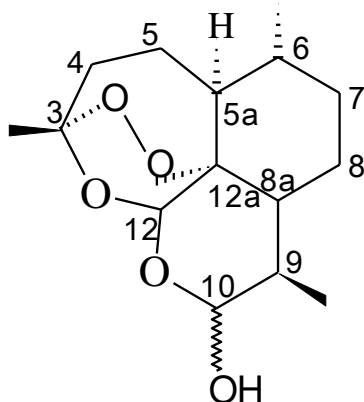


Figura 17: Estrutura molecular da diidroartemisinina com numeração dos átomos de carbono.

A redução da artemisinina utilizando boroidreto de sódio fornece a diidroartemisinina, a qual se apresenta como uma mistura 1:1 de isômeros α e β , fato comprovado pela espectroscopia de RMN. A duplicação de sinais nos espectros de RMN ^1H e de ^{13}C (Anexos – Figuras 4 e 6) indica a existência de duas moléculas, correspondentes aos dois isômeros. O volume reduzido do átomo de hidrogênio e do grupo metila na posição C_9 contribui para a formação da mistura 1:1 de isômeros em C_{10} (Capela, 2011).

Quadro 3: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para a diidroartemisinina, com dados da literatura.

Hidrogênios	Literatura* δ (ppm) (multiplicidade, n ^o de H)	Experimental δ (ppm) (multiplicidade, n ^o de H)
H-4	1,82 - 1,76 (d, 2H)	1,82 (d, 2H)
H-5	1,70 - 1,47 (m, 2H)	1,71 - 1,63 (m, 2H)
H-5a	1,24 (m, 1H)	1,25 (m, 1H)
H-6	1,33 (m, 1H)	1,30 - 1,27 (m, 1H)
H-7	1,64 - 1,23 (m, 2H)	1,58 - 1,47 (m, 2H)
H-8	1,67 - 1,28 (m, 2H)	1,58 - 1,47 (m, 2H)
H-8a	1,49 (m, 1H)	1,50 - 1,49 (m, 1H)
H-9	2,30 (1H)	2,40 - 2,29 (1H)
H-10 α	4,77 (d, J = 9,2 Hz, 1H)**	4,75 (d, J = 9,0 Hz, 1H)
H-10 β	5,33 (d, J = 3,2 Hz, 1H)**	5,32 (d, J = 3,0 Hz, 1H)
H-10	4,75 (s, 1H)	4,75 (1H)
H-12 α	5,41 (s, 1H)**	5,39 (s, 1H)
H-12 β	5,63 (s, 1H)**	5,61 (s, 1H)
3-CH ₃	1,43 (s, 3H)	1,43 (s, 3H)
6-CH ₃	0,96 (3H)	0,98 - 0,94 (3H)
9-CH ₃	0,96 (3H)	0,98 - 0,94 (3H)

(s: singlete; d: dublete e m: multiplete)

*Referências: Kardono et al., 2014; **Capela, 2011.

Quadro 4: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para a diidroartemisinina com dados da literatura.

Carbonos	Literatura* δ (ppm)	Experimental δ (ppm)
3	104,31	104,23
4	36,56	36,29
5	24,90	24,66
5a	51,72	51,99
6	37,67	37,38
7	34,89	34,74
8	30,96	30,76
8a	44,51	44,87
9	35,00	34,18
10	96,60	95,50
12	87,96	89,50
12a	81,31	80,73
CH ₃ -3	26,26	25,95
CH ₃ -6	20,56	20,28
CH ₃ -9	13,37	12,93

*Referência: Kardono et al., 2014.

Os dois sinais a 5,61 e 5,39 ppm, correspondentes ao hidrogênio de C₁₂ são indicação de que estamos na presença de uma mistura de isômeros, uma vez que no espectro da artemisinina, este próton aparece como um sinal único a 5,86 ppm. De modo semelhante, os sinais a 5,32 e 4,75 ppm correspondentes aos hidrogênios de C₁₀ (α / β), evidenciam a redução do grupo carbonila e a formação do lactol. O sinal a 5,32 ppm é um dubleto com a constante de acoplamento (J) calculada experimentalmente igual a 3,0 Hz, condizente com o isômero β , enquanto o sinal a 4,75 é um dubleto com J = 9,0 Hz (valor calculado), característico do isômero α , devido ao maior valor esperado para a constante de acoplamento com o hidrogênio de C₉ (Anexos – Figura 5).

Em estudos reportados na literatura verificou-se que a razão existente entre os isômeros α e β , é principalmente dependente do solvente, apesar de existirem outros fatores que possam afetar este equilíbrio, como o pH, tempo, temperatura e força iônica (Cabri et al., 2011).

Através de estudos teóricos, verificou-se que a razão entre os dois isômeros depende de várias propriedades do solvente, em particular da capacidade deste estabelecer ligações de hidrogênio com o soluto. Uma maior estabilização do isômero α foi obtida na presença de solventes capazes de fazer ligações de hidrogênio, pelo fato deste isômero ser mais polar e ter caráter mais ácido. Assim, de acordo com o aumento da polaridade do solvente foi constatada uma proporção entre os isômeros α e β de 1:1,35 em cloreto de metileno deuterado (CD₂Cl₂), 2:1 em acetona ou metanol, 3:1 em DMSO, e 4,5:1 em solução água / etanol 50% (Capela, 2011).

A diidroartemisinina fornece um espectro de RMN ^1H de difícil interpretação na faixa entre 2,40 – 0,95 ppm, pela quantidade de sinais sobrepostos. A atribuição dos sinais foi possível pela comparação com dados obtidos na literatura (Capela, 2011; Kardono et al., 2014), (Quadros 3 e 4).

A conversão de artemisinina em diidroartemisinina também foi comprovada por espectroscopia de infravermelho (Anexos – Figura 7), através do desaparecimento da banda do grupo carbonila da artemisinina em 1736 cm^{-1} e o aparecimento de uma nova banda em 3378 cm^{-1} característica do grupo hidroxila da diidroartemisinina. A banda observada em 985 cm^{-1} é relativa à ligação O-O do grupo endoperóxido.

O espectro de massas de diidroartemisinina (Anexos – Figura 8) apresentou como íon mais intenso o aduto de amônia, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $m/z = 302,1$ seguido do aduto de potássio, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $m/z = 323,0$.

4.2.3 Ácido Artesúnico

As comparações dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Anexos – Figuras 9 e 11) obtidos para o ácido artesúnico foram realizadas com dados descritos por Haynes et al., 2002; (Figura 18), (Quadros 5 e 6).

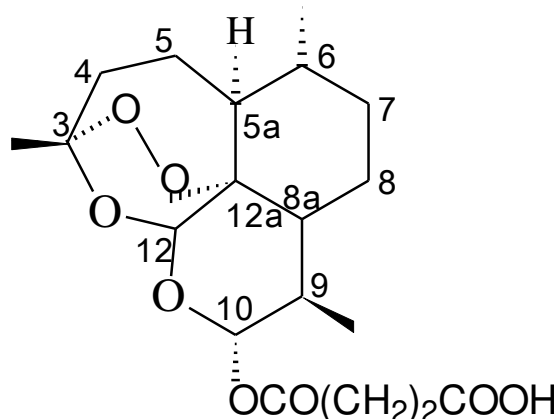


Figura 18: Estrutura molecular do ácido artesúnico com numeração dos átomos de carbono.

Quadro 5: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para o ácido artesúnico, com dados da literatura.

Hidrogênios	Literatura* δ (ppm) (multiplicidade, n° de H)	Experimental δ (ppm) (multiplicidade, n° de H)
6-CH ₃	0,87 (d, J = 7,5 Hz, 3H)	0,85 (d, J = 7,0 Hz, 3H)
9-CH ₃ ; H-5a	0,90 - 1,20 (m, 4H)	0,95 - 1,05 (m, 4H)
3-CH ₃ ; H-6; H-4; H-7; H-5; H-8	1,20 - 2,00 (m, 12H)	1,26 – 1,91 (m, 12H)
H-8a	1,90 - 2,10 (m, 1H)	2,01 - 2,05 (m, 1H)
H-9	2,30 - 2,50 (m, 1H)	2,34 - 2,40 (m, 1H)
10- OCO(CH ₂) ₂ COOH	2,60 - 2,70 (m, 5H)	2,53 – 2,78 (m, 5H)
H-12	5,44 (s, 1H α) 5,47 (s, 1H β)	5,43 (s, 1H)
H-10	5,80 (d, J = 9,9 Hz, 1H α) 6,28 (d, J = 3,3 Hz, 1H β)	5,80 (d, J = 10,0 Hz, 1H)

(s: singlete; d: dubleto e m: multipleteo)

*Referência: Haynes et al., 2002.

Quadro 6: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para o ácido artesúnic com dados da literatura.

Carbonos	Literatura* δ (ppm)	Experimental δ (ppm)
3	104,40	104,48
4	36,20	36,19
5	24,60	24,56
5a	52,30	51,54
6	37,40	37,25
7	34,40	34,07
8	24,10	21,97
8a	43,80	45,22
9	29,80	31,79
10	88,70	91,51
12	95,20	92,26
12a	80,50	80,10
CH ₃ -3	25,90	25,92
CH ₃ -6	20,20	20,19
CH ₃ -9	12,40	11,96
16	170,70	171,00
17	28,70	28,59
18	29,10	28,94
19	174,30	177,41

*Referência: Haynes et al., 2002.

Na síntese do ácido artesúnic, observa-se uma estereoquímica diferente da apresentada pela diidroartemisinina, com predominância do isômero α . A estereoquímica deste composto tem sido tema de ampla discussão. Antes do ano 2000, o *Chemical Abstracts* designava o ácido artesúnic como isômero 10- α , mas a partir desta data foram atribuídas as estereoquímicas 10- α ou 10- β , ou ainda como indefinida. Atualmente, sabe-se que a acilação de diidroartemisinina com anidridos de ácidos carboxílicos na presença de base, como a piridina, origina ésteres com uma estereoquímica 10- α . Por sua vez, a diidroartemisinina existe como uma mistura 1:1 dos isômeros α e β , porém esta proporção pode ser

alterada em função do solvente, conforme visto anteriormente, onde em acetona ou metanol a razão é de 2:1 (α / β) e em DMSO de 3:1 (α / β), (Capela, 2011). Ainda, segundo este mesmo autor, no caso do ácido artesúnicos verifica-se que a adição de um equivalente de DMAP, causa alteração no equilíbrio de aproximadamente 1,5:1 a favor da estereoquímica α .

Então, através de estudos computacionais realizados pode-se chegar as seguintes conclusões: a) a formação exclusiva do 10- α ácido artesúnicos não pode ser atribuída a fatores termodinâmicos, mas sim a fatores cinéticos; b) a presença da base não tem qualquer efeito na estereoquímica adotada durante a acilação; c) são obtidos α -ésteres quando o grupo hidroxila da diidroartemisinina atua como nucleófilo e β -ésteres quando o mesmo é ativado por substituição; d) a formação de éteres catalisada por ácidos de Lewis origina majoritariamente o isômero β (Haynes et al., 2002).

De acordo com Haynes et al. (2002), o próton H₁₀ do α -ácido artesúnicos apresenta um deslocamento químico de 5,80 ppm e exibe uma constante de acoplamento de 9,9 Hz devido ao seu acoplamento com o próton H₉, o que corresponde a um arranjo trans-diaxial destes prótons. Já em relação ao β -ácido artesúnicos, o próton H₁₀ apresenta um deslocamento de 6,28 ppm e exibe uma constante de acoplamento de 3.3 Hz devido a sua interação com o próton H₉, consistente com um arranjo cis-equatorial-axial (Figura 19).

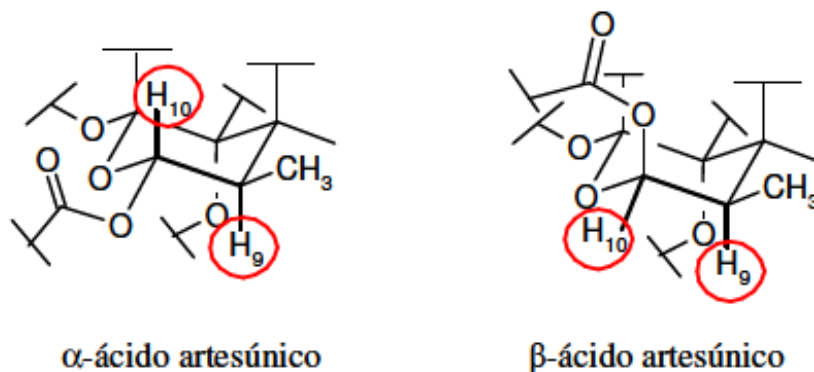


Figura 19: Parte da estrutura do ácido artesúnic, onde observa-se as interações entre H_9 e H_{10} : *trans*-diaxial (α -ácido artesúnic) e *cis*-equatorial-axial (β -ácido artesúnic), (Haynes et al., 2002; Capela, 2011).

Assim, a determinação da estereoquímica C_{10} - α para o ácido artesúnic sintetizado foi verificada através das análises de RMN 1H (Quadro 5), onde pode-se observar o sinal do próton H_{10} como um dubleto, com deslocamento químico de 5,80 ppm (Anexos – Figura 10) e constante de acoplamento calculada experimentalmente igual a 10,0 Hz, devido ao acoplamento com o próton H_9 , condizente com o arranjo *trans*-diaxial reportado por Haynes et al. (2002).

O espectro no infravermelho do ácido artesúnic (Anexos – Figura 12) demonstrou a presença de bandas características em 1756 cm^{-1} de forte intensidade, relativa à presença de grupo carbonila, a banda em 1005 cm^{-1} de forte intensidade relacionada à ligação O-O do grupo endoperóxido, a banda em 3279 cm^{-1} larga e de média intensidade relativa ao grupo OH de ácido, bandas de média intensidade em 2869 cm^{-1} e 2923 cm^{-1} devido a estiramento C-H e bandas intensas em 1376 cm^{-1} relacionada a grupo CH_3 e em 1149 cm^{-1} atribuída à ligação C-O.

A conversão de ácido artesúnic em seu derivado metilado também pôde ser comprovada por espectroscopia de IV (Anexos – Figura 13). No espectro do éster metílico do ácido artesúnic, observa-se o desaparecimento da banda em 3279 cm^{-1} relativa ao grupo OH do ácido carboxílico.

4.2.4 Acetato de Diidroartemisinina

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Anexos – Figuras 14 e 15) obtidos para o acetato de diidroartemisinina foram comparados com dados descritos na literatura (Haynes et al., 2002; Ma, J. et al., 2000), (Figura 20), (Quadros 7 e 8).

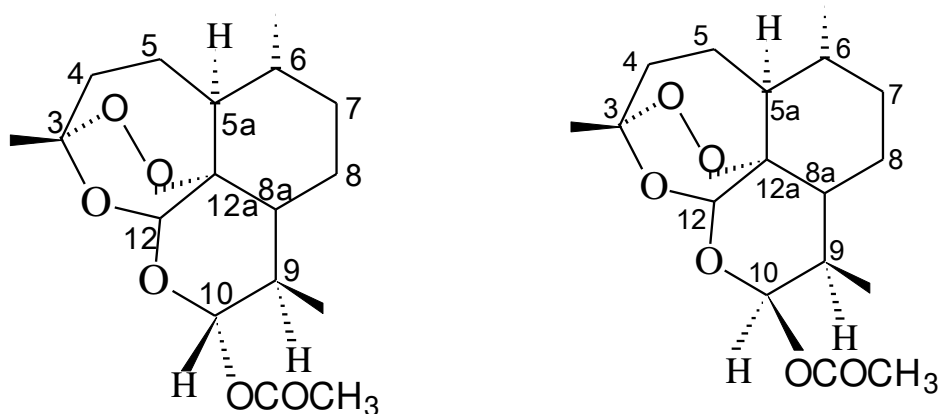


Figura 20: Estrutura molecular do acetato de diidroartemisinina (isômeros α e β , respectivamente) com numeração dos átomos de carbono.

Quadro 7: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^1H (ppm) obtidos para o acetato de diidroartemisinina, com dados da literatura.

Hidrogênios	Literatura* δ (ppm) (multiplicidade, n ^o de H)	Experimental δ (ppm) (multiplicidade, n ^o de H)
9-CH ₃	0,86 (d, J = 7,00 Hz, 3H)	0,85 (d, J = 7,5 Hz, 3H)
6-CH ₃	0,97 (d, J = 5,95 Hz, 3H)	0,97 (d, J = 6,0 Hz, 3H)
3-CH ₃	1,45 (s, 3H)	1,44 (s, 3H)
	1,94 - 1,23 (m, 9H)	1,94 - 1,25 (m, 9H)
	2,04 (ddd, 1H)	2,01 - 2,05 (ddd, 1H)
CH ₃ -CO	2,14 (s, 3H)	2,13 (s, 3H α) 2,08 (s, 3H β)
	2,39 (ddd, 1H)	2,34 - 2,41 (ddd, 1H)
H-9	2,55 (m, 1H)	2,53 - 2,60 (m, 1H)
H-12	5,45 (s, 1H)	5,44 (s, 1H)
H-10	5,80 (d, J=10,0 Hz, 1H)	5,78 (d, J=9,5 Hz, 1H α) 6,25 (d, J=3,5 Hz, 1H β)

(s: singlete; d:dublete; m:multiplete e ddd: triplo dublete); *Referencia: Haynes et al., 2002.

Quadro 8: Comparação dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de ^{13}C (ppm) obtidos para o acetato de diidroartemisinina, com dados da literatura.

Carbonos	Literatura* δ (ppm)	Experimental (α / β) δ (ppm)	
3	104,73	104,46	104,38
4	36,37	36,21	36,21
5	24,71	24,57	24,63
5a	51,73	51,56	52,36
6	37,40	37,26	37,46
7	34,24	34,08	34,48
8	21,25	21,11	21,20
8a	45,42	45,23	43,92
9	31,88	31,75	29,80
10	92,11	91,85	94,69
12	91,74	91,49	88,69
12a	80,33	80,12	80,52
Me – 3	26,11	25,96	25,90
Me – 6	20,34	20,20	20,25
Me – 9	12,14	12,07	12,48
MeCO – 10	22,10	21,99	24,04
CO – 10	170,24	169,82	169,46

*Referência: Ma, J. et al., 2000.

A duplicação de sinais no espectro de RMN ^{13}C do acetato de diidroartemisinina sintetizado indica a mistura dos isômeros α e β . Analisando a intensidade dos sinais obtidos no referido espectro foi possível estimar a razão entre os dois isômeros, sendo a conformação α predominante a β na proporção de 4:1 (Anexos – Figura 15).

Através do espectro de RMN ^1H obtido para o acetato de diidroartemisinina, pode-se calcular a constante de acoplamento para o próton H_{10} e comparar com os valores reportados na literatura (Haynes et al., 2002; Ma et al., 2000; Capela, 2011).

Os prótons vicinais H_9 e H_{10} no isômero α estão ambos em posição axial, devendo apresentar um valor de J entre 7,0 e 14,5 Hz, enquanto no isômero β a relação axial-equatorial entre estes dois prótons, deve fazer com que o valor de J seja entre 2,0 e 6,0 Hz (Capela, 2011).

Assim, observamos que o espectro de RMN ^1H do acetato de diidroartemisinina sintetizado apresenta dois sinais em δ 6,25 ppm e δ 5,78 ppm correspondentes aos prótons H_{10} , indicando a presença da mistura de isômeros. O sinal em δ 6,25 ppm é um dubleto com $J = 3,5$ Hz e corresponde ao isômero β , enquanto o sinal em δ 5,78 ppm também é um dubleto com $J = 9,5$ Hz, característico do isômero α , devido ao maior valor da constante de acoplamento com o próton H_9 . Estes valores estão concordantes com a literatura, que atribui para o próton H_{10} do isômero α , um dubleto em δ 5,80 ppm e $J = 10,0$ Hz (Haynes et al., 2002) ou então um dubleto em δ 5,79 ppm e $J = 9,9$ Hz (Ma et al., 2000).

Analisando a intensidade dos dubletos (δ 6,25 ppm e δ 5,78 ppm) e dos singletos (δ 2,13 ppm e δ 2,08 ppm) no espectro de RMN ^1H , confirmou-se a razão entre os dois isômeros α e β (4:1) do acetato de diidroartemisinina. Esta proporção é a mesma que foi obtida através do espectro de RMN ^{13}C deste composto.

O espectro de massas de alta resolução do acetato de diidroartemisinina 326 Da, forneceu o pico base correspondente ao seu aduto de sódio, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z = 349,16$ (Anexos – Figura 17).

O espectro no infravermelho do acetato de diidroartemisinina (Anexos – Figura 16) apresentou bandas características em 1756 cm^{-1} de forte intensidade, relativa à presença de grupo carbonila, a banda em 1019 cm^{-1} de forte intensidade relacionada à ligação O-O do grupo endoperóxido, bandas em 2877 cm^{-1} e 2934 cm^{-1} devido a estiramento C-H, banda em 1376 cm^{-1} relativa a grupo CH_3 e bandas em 1101 cm^{-1} , 1231 cm^{-1} atribuídas à deformação axial de grupo carbonila de acetato.

4.3 Ensaios *in vitro*

4.3.1 Dispersão sólida dos derivados da artemisinina em PVP

Antes da realização dos testes *in vitro* com os compostos selecionados, o PVP foi testado a fim de verificar sua atividade frente aos vermes. Os resultados destas análises com o PVP confirmaram que este é inerte, não causando alterações na motilidade, tampouco na oviposição, mortalidade e/ou alterações morfológicas e tegumentares nos vermes (dados não mostrados).

4.3.2 Efeito da artemisinina e seus derivados sobre a motilidade e mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* BH.

O efeito da artemisinina e dos seus derivados diidroartemisinina, ácido artesúnico, ácido 10–diidroartemisinina ftálico, ácido 10–diidroartemisinina glutárico, ácido 10–diidroartemisinina adípico, éster metílico do ácido artesúnico e acetato de diidroartemisinina sobre a motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* foi observada a partir das primeiras 2 h de exposição.

Todos os compostos avaliados reduziram a motilidade após as primeiras 6h de incubação, até o período que ocorreu a mortalidade dos casais de vermes.

Em relação à mortalidade dos vermes adultos, observou-se que esse parâmetro foi diretamente dependente da concentração avaliada e do período de incubação.

As Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27 representam as porcentagens de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em diferentes concentrações e períodos de incubação para cada um dos compostos avaliados. Não houve

mortalidade dos vermes expostos ao tratamento com artemisinina (Figura 21) em nenhuma das concentrações avaliadas e períodos observados. Este resultado também se repetiu para o composto éster metílico do ácido artesúnicos (dados não mostrados).

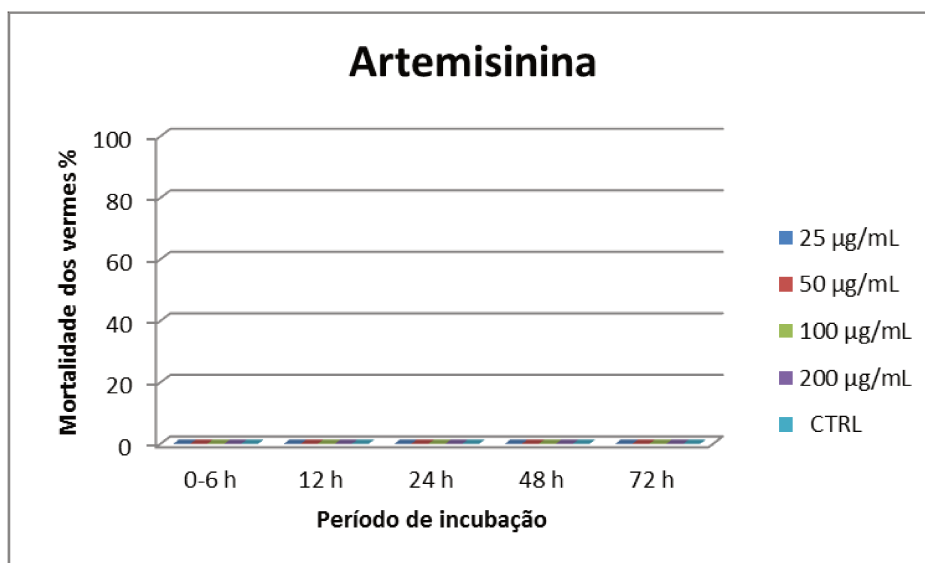


Figura 21: Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em função do período de incubação em diferentes concentrações de artemisinina.

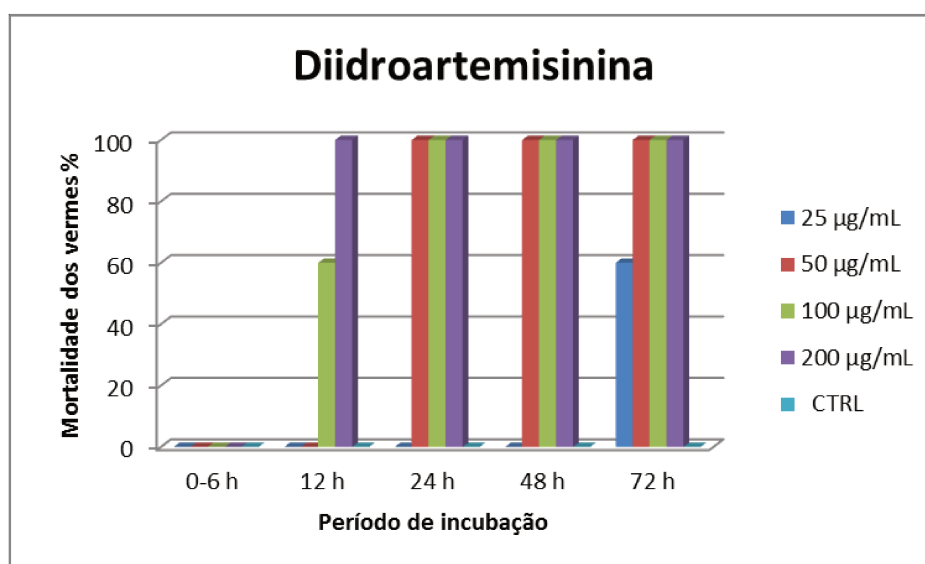


Figura 22: Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em função do período de incubação em diferentes concentrações de diidroartemisinina.

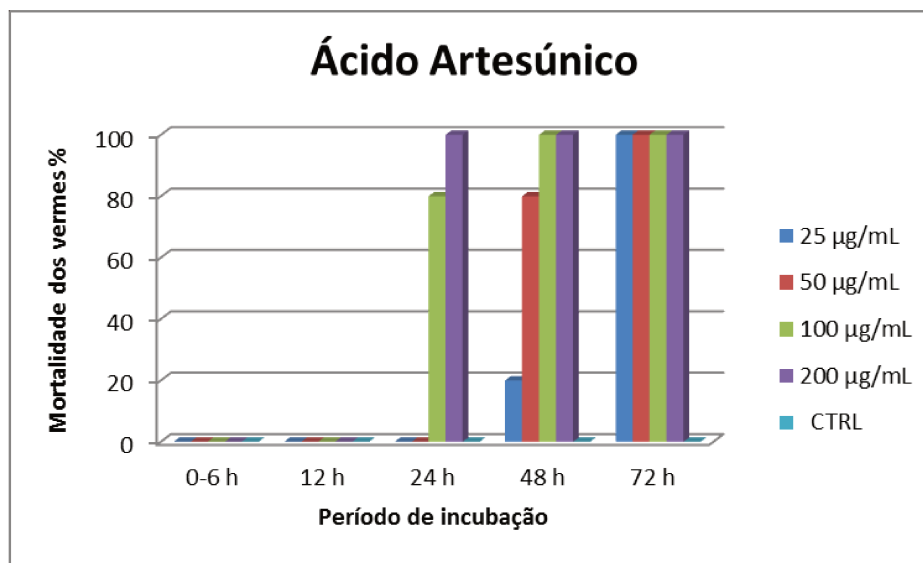


Figura 23: Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em função do período de incubação em diferentes concentrações de ácido artesúnicos.

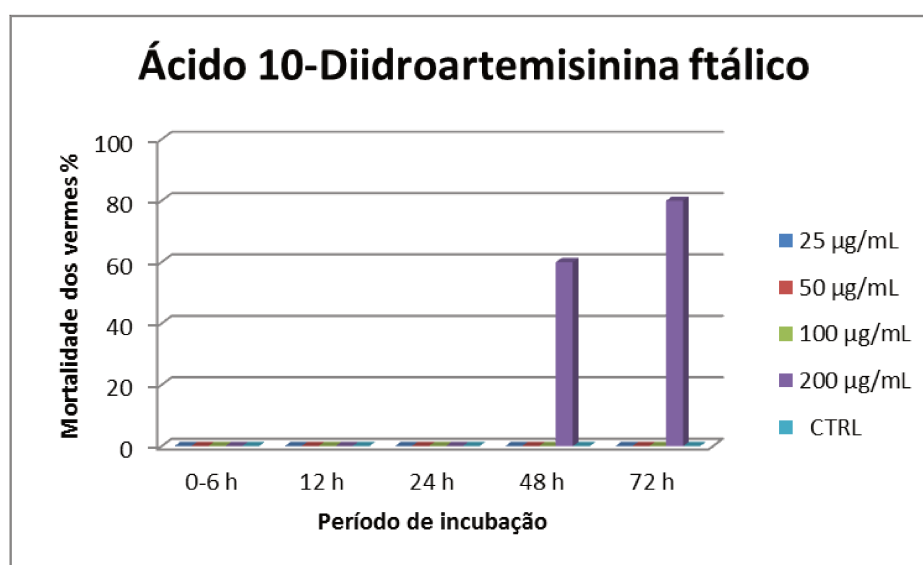


Figura 24: Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em função do período de incubação em diferentes concentrações do ácido 10–diidroartemisinina ftálico.

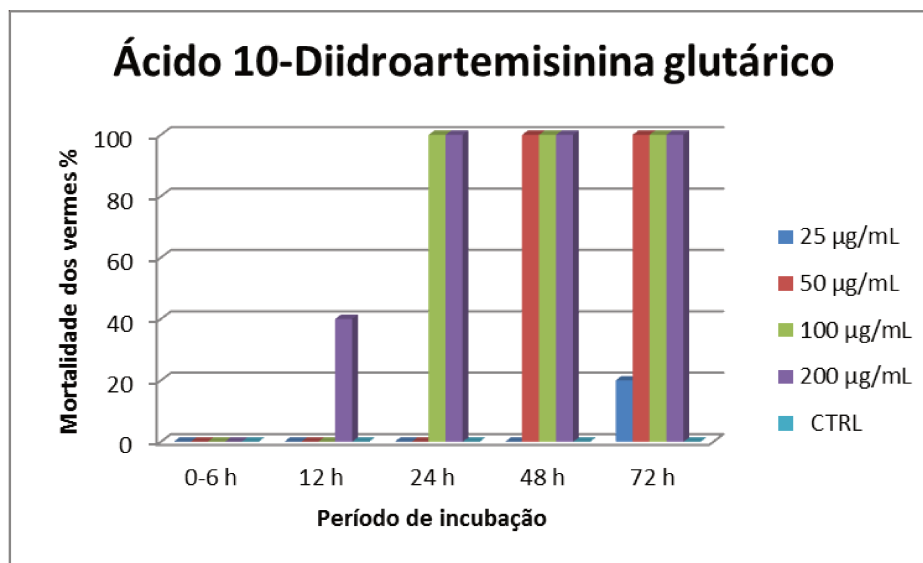


Figura 25: Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em função do período de incubação em diferentes concentrações do ácido 10–diidroartemisinina glutárico.

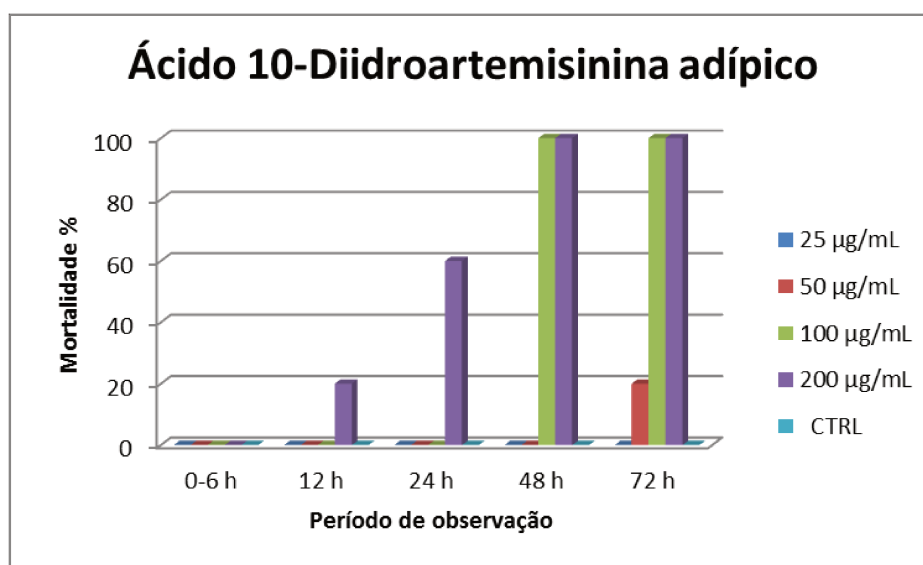


Figura 26: Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em função do período de incubação em diferentes concentrações do ácido 10–diidroartemisinina adípico.

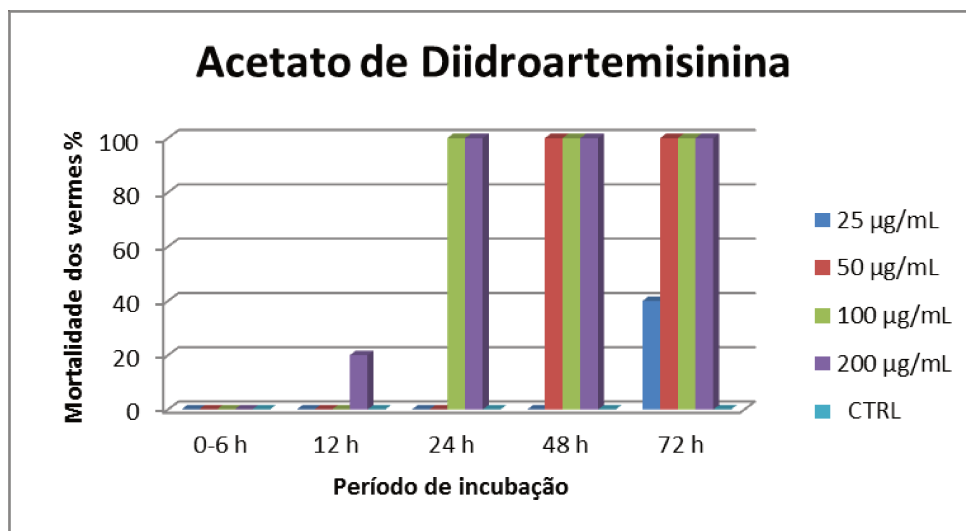


Figura 27: Mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em função do período de incubação em diferentes concentrações do acetato de diidroartemisinina.

Os vermes expostos aos tratamentos com diidroartemisinina, na concentração de 200 µg/mL, apresentaram 100% de mortalidade em um menor período de incubação, 12 h, evidenciando que a redução do grupo carbonila da lactona potencializou a atividade esquistossomicida, mesmo considerando tratar-se de uma mistura de isômeros (α / β) do lactol. Os compostos ácido 10–diidroartemisinina glutárico, ácido 10–diidroartemisinina adípico e acetato de diidroartemisinina também ocasionaram mortalidade entre 20 a 60% nas primeiras 12 h de incubação. Contudo, a mortalidade de 100% dos vermes expostos a estes tratamentos ocorreu após 24 a 48 h de incubação. No tratamento com o ácido artesúnico, observou-se mortalidade de 100% dos vermes após 24 h de incubação para a concentração de 200 µg/mL, enquanto o acetato de diidroartemisinina foi ainda mais eficiente com mortalidade de 100% dos vermes no mesmo período, porém na concentração de 100 µg/mL.

Todos os vermes machos e fêmeas apresentaram alterações no tegumento e nas ventosas oral e acetabular. Este efeito foi observado para todas as amostras avaliadas, exceto para a artemisinina e o éster metílico do ácido artesúnicos. Estes compostos não apresentaram efeito esquistossomicida, mostrando-se inativos na maior concentração (200 µg/mL) e tempo de incubação (72 h). Apesar do éster metílico do ácido artesúnicos não ter apresentado atividade esquistossomicida *in vitro*, isto precisa ser confirmado, pois além do rendimento quantitativo de sua síntese, pode ser que sua atividade esquistossomicida seja manifestada em testes *in vivo*, tal como ocorreu com a própria artemisinina, cuja atividade em testes *in vivo* tem sido reportada na literatura (Araújo et al., 1999; Shuhua et al., 2000; Utzinger et al., 2002; Lu et al., 2004; Li et al., 2005; Lu et al., 2006).

Todos os vermes do grupo controle mantidos em RPMI-1640 permaneceram vivos até o final do experimento.

4.3.3 Efeito da artemisinina e derivados sobre a oviposição e separação de casais do *S. mansoni*.

Além da mortalidade dos vermes, foram observados os efeitos dos derivados da artemisinina na oviposição das fêmeas, na cultura *in vitro* até 72 h de incubação. Não se observou oviposição quando os vermes foram expostos aos tratamentos com diidroartemisinina, ácido artesúnicos, ácido 10–diidroartemisinina glutárico e acetato de diidroartemisinina até o final do experimento. Os vermes expostos aos tratamentos com artemisinina, ácido 10–diidroartemisinina ftálico, ácido 10–diidroartemisinina adípico e o éster metílico do ácido artesúnicos produziram ovos em todas as concentrações avaliadas, ou seja, 25, 50, 100 e

200µg/mL. Em relação à separação de casais, observou-se que todas as amostras ocasionaram uma taxa de 20 a 60% de separação entre 6 e 24 h de exposição.

4.3.4 Efeito da artemisinina e derivados sobre as alterações tegumentares e morfológicas do *S. mansoni*.

A avaliação da morfologia e do tegumento dos vermes expostos aos tratamentos foi realizada de forma qualitativa, por meio da microscopia óptica.

Os resultados evidenciaram alterações no tegumento, seguida de destruição dos tubérculos, formação de “bolhas” e alterações nas ventosas oral e acetabular dos vermes machos e fêmeas. As Figuras 28, 29, 30, 31 e 32 mostram os vermes do grupo controle e as alterações observadas nos demais vermes no período entre 24 e 48 h de incubação, na concentração de 200 µg/ mL, a qual é considerada a mais efetiva no estudo deste parâmetro.

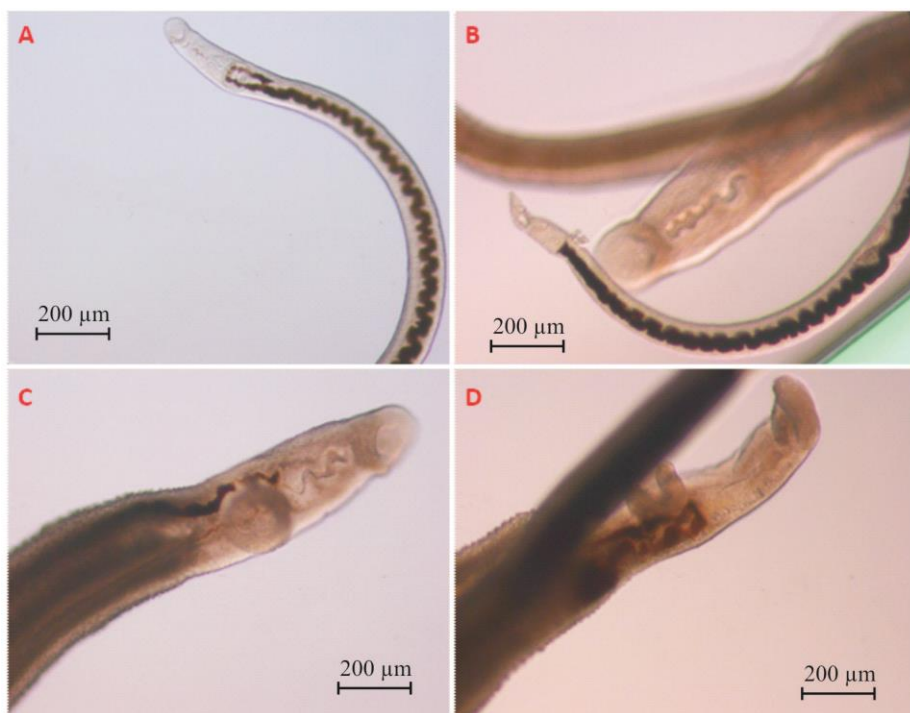


Figura 28: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de *S. mansoni* (A, B, C, D) do grupo controle, mantidos em RPMI-1640 até 48 h.

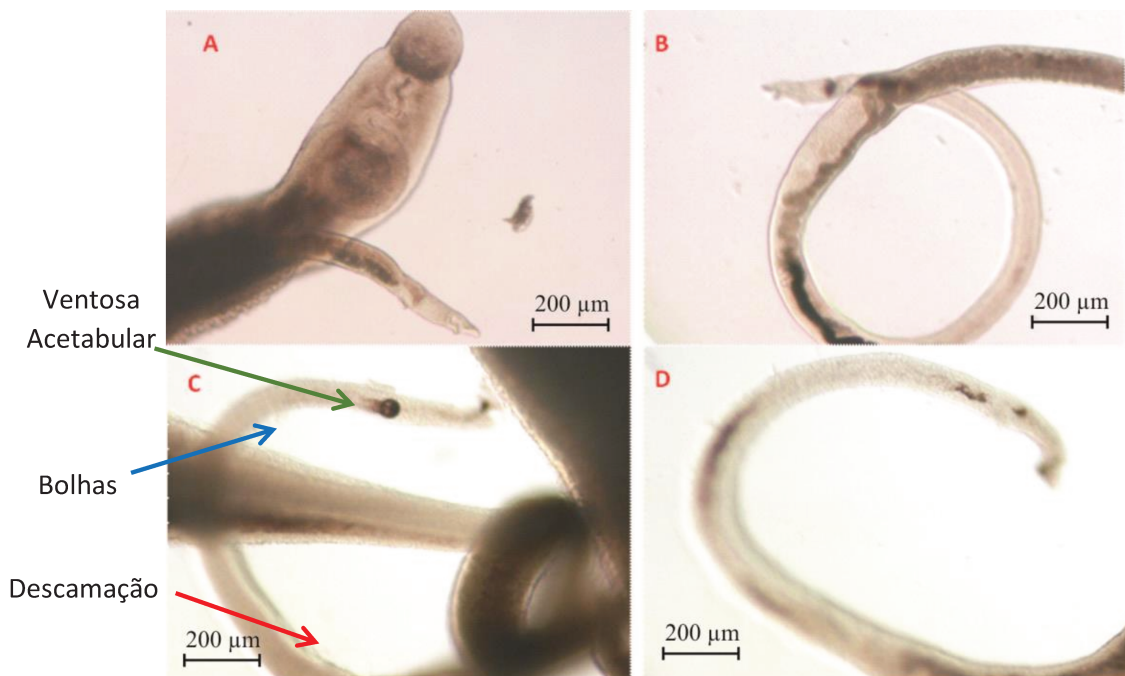


Figura 29: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de *S. mansoni*, sendo (A – B) os vermes após 48 h de incubação na presença de artemisinina, na concentração de 200 µg/mL e (C – D) o casal de vermes apresentando dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença de diidroartemisinina, na concentração de 200 µg/mL.

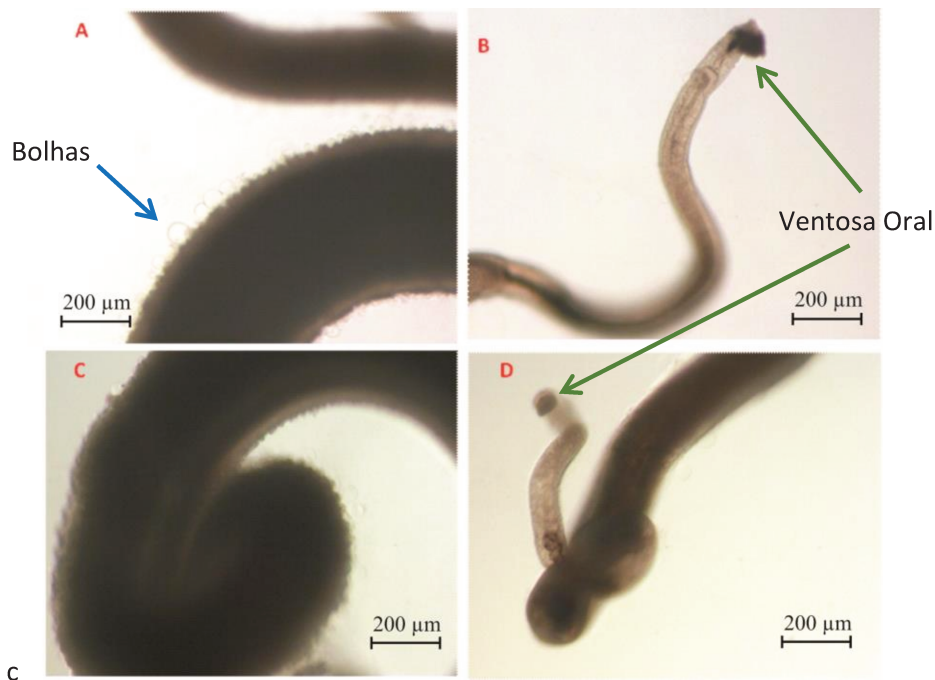


Figura 30: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de *S. mansoni*, onde (A – B) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença de ácido artesúnico, na concentração de 200 µg/mL e (C – D) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após incubação de 48 h na presença do ácido 10–diidroartemisinina ftálico, na concentração de 200 µg/mL.

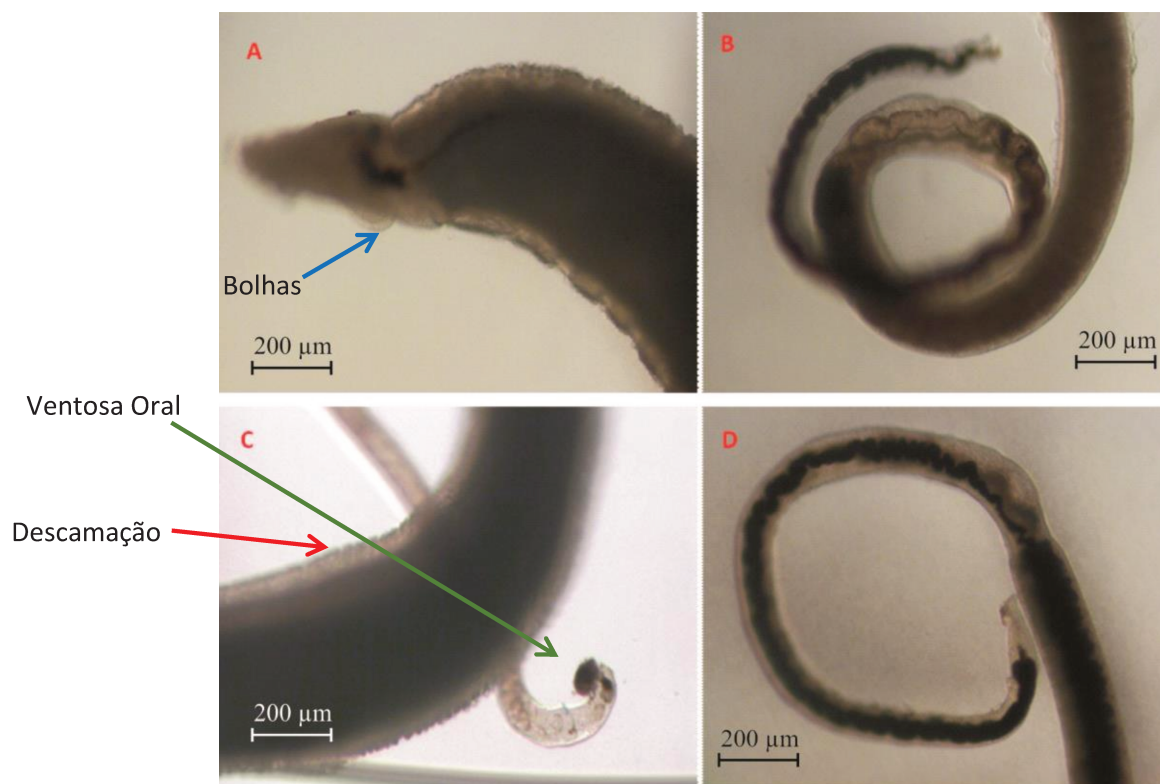


Figura 31: Microscopia ótica dos vermes adultos, machos e fêmeas, de *S. mansoni*, onde (A – B) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença do ácido 10-diiodoartemisinina glutárico, na concentração de 200 µg/mL e (C – D) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após incubação de 48 h na presença do ácido 10-diiodoartemisinina adípico, na concentração de 200 µg/mL.

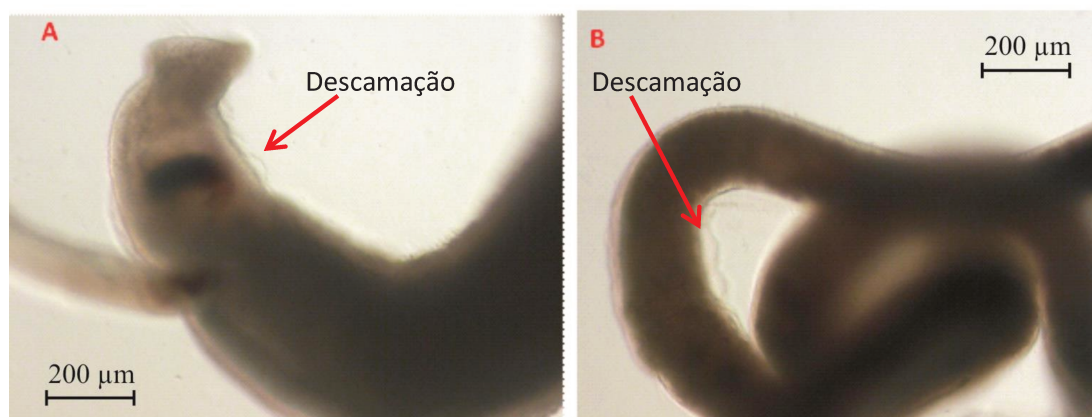


Figura 32: Microscopia ótica dos vermes adultos, macho e fêmea, de *S. mansoni*, onde (A – B) apresenta os vermes com dano tegumentar e nas ventosas oral e acetabular, após 24 h de incubação na presença do acetato de diiodoartemisinina, na concentração de 200 µg/mL.

Apesar da artemisinina e seus derivados serem utilizados como fármacos antimaláricos na terapêutica clínica, o mecanismo e local de ação destes compostos ainda não foram elucidados. Existem várias teorias sobre o modo de ação da artemisinina e derivados, porém todas apontam para a necessidade da presença de Fe^{2+} (Capela, 2011).

No caso específico da malária, durante a fase sanguínea, o parasita do gênero *Plasmodium* degrada grande parte da hemoglobina dentro dos eritrócitos, liberando uma porção proteica (globina) e o heme (complexo ferro-porfirina). Em humanos, os parasitas da malária digerem mais de 70% da hemoglobina dentro das células vermelhas infectadas do sangue. Cerca de 30% ou mais desta globina é digerida pelo parasita e usada como fonte de aminoácidos para a síntese de suas próprias proteínas. O heme proveniente da hemoglobina é tóxico para o parasita. De modo a evitar esta toxicidade, o parasita desenvolveu um mecanismo de desintoxicação do heme com o auxílio da enzima heme polimerase, originando um polímero insolúvel e não tóxico, denominado hemozoína ou pigmento da malária (Costa et al., 2007).

De acordo com Egan, T.J. (2008), a formação da hemozoína é a principal via de desintoxicação heme no parasita da malária *Plasmodium falciparum*, mas segundo o próprio autor, este mecanismo pode ser aplicado também a várias outras espécies de organismos hematófagos, incluindo outras espécies de *Plasmodium* e vermes helmintos como o *S. mansoni*.

A Figura 33 mostra a estrutura do heme, onde o átomo de Fe se encontra no estado de oxidação +2 e os propionatos, na forma iônica.

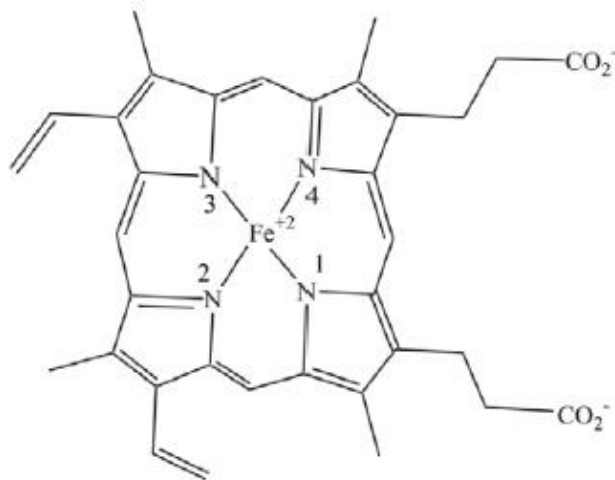


Figura 33: Estrutura do heme da hemoglobina (Costa et al., 2007).

Uma das teorias para o mecanismo de ação da artemisinina ressalta que a molécula é ativada pelo Fe^{2+} , reagindo depois com o grupo heme para formar um complexo de transição heme-artemisinina, impedindo deste modo a sua desintoxicação. A oxidação da artemisinina mediada pelo heme é apontada como uma etapa crítica na atividade biológica deste fármaco.

A ligação do Fe^{2+} com o oxigênio-1 da artemisinina (Figura 34 – via 1), origina um radical de oxigênio que sofre rearranjo para formar um radical de carbono primário, através de uma cisão da ligação $\text{C}_3\text{-C}_4$. Alternativamente, a ligação com o oxigênio-2, Figura 34 (via 2), produz igualmente uma espécie radicalar de oxigênio, que através de uma migração 1,5 de hidrogênio produz o radical de carbono secundário. Estes radicais podem alquilar o grupo heme, resultando na morte do parasita (Capela, 2011).

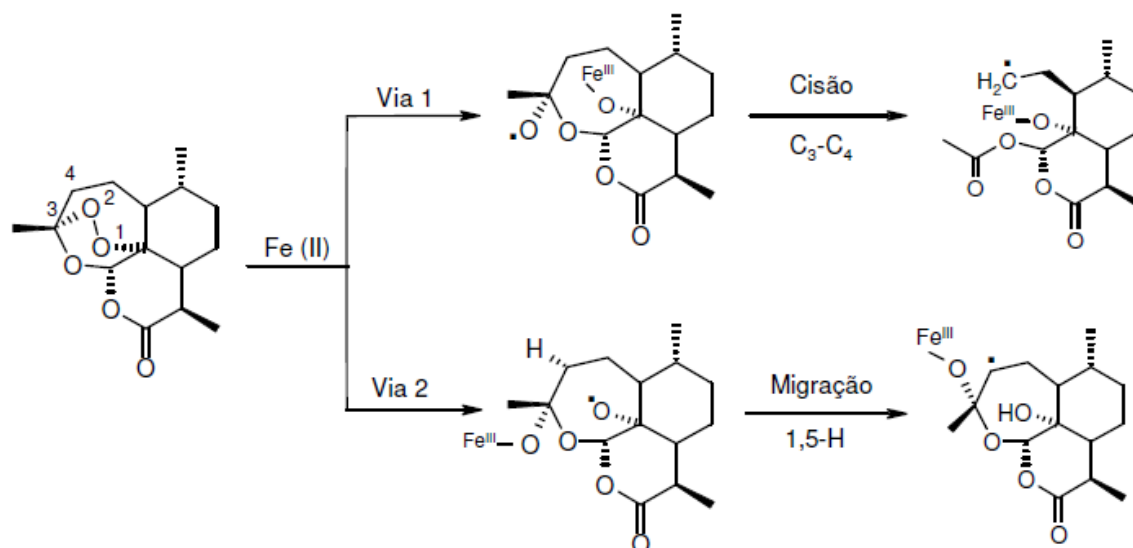


Figura 34: Formação de radicais primários e secundários de carbono na artemisinina pela ação do Fe²⁺ (Capela, 2011).

Atualmente, o mecanismo mais aceito para a ação da artemisinina envolve a formação do complexo de transição, por intermédio dos átomos de ferro do heme e oxigênio-1 do endoperóxido. A posição relativa da artemisinina com respeito ao heme é determinada por interações estereoeletrônicas entre ambos, as quais afetam o rearranjo do complexo até o rompimento da ligação Fe-O. Portanto, a investigação em maiores detalhes de tais interações no complexo é importante do ponto de vista do reconhecimento molecular do heme com respeito à artemisinina (Costa et al., 2007).

A alquilação do heme pela artemisinina foi reportada pela primeira vez por Meshnick, S.R. (2002), após identificação de adutos heme-artemisinina por espectrometria de massas. A alquilação do grupo heme pode ocorrer nos átomos de carbono α , β e δ (Figura 35).

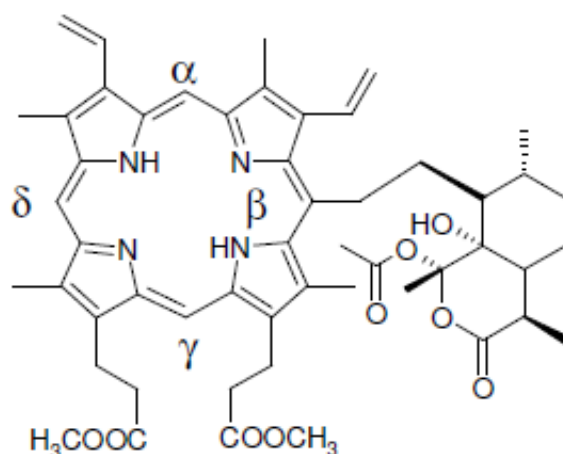


Figura 35: Alquilação do heme no carbono β , por um radical primário de carbono formado após ativação da artemisinina pelo Fe^{2+} (Capela, 2011).

Desta forma, conhecer o mecanismo de ação é de suma importância para o desenvolvimento e descobrimento de um novo fármaco. Normalmente, o fármaco tem seu efeito mediado por um alvo específico, um receptor. Caso a estrutura do complexo receptor-fármaco seja conhecida, as interações entre ambos podem ser investigadas com mais detalhes. Estudos computacionais e quantitativos que correlacionam à estrutura química e a atividade biológica de uma série de fármacos e análogos têm apontado para os mecanismos de ação e têm dado diretrizes para a síntese de novos fármacos (Costa et al., 2007).

4.4 Avaliação de citotoxicidade

Na avaliação da citotoxicidade dos compostos sintetizados foram selecionados aqueles que apresentaram melhores resultados nos testes de atividade esquistossomícida *in vitro*, ou seja, o ácido artesúnico e o acetato de diidroartemisinina. Os referidos compostos foram submetidos aos testes *in vitro* de citotoxicidade frente a diferentes linhagens de células tumorais, a saber: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-03 (ovário); HT29 (cólon); K562 (leucemia); e células não tumoral (HaCaT) de queratinócitos humanos. Os resultados são mostrados na Figura 36, apresentando valores entre 100% e 0% que representam crescimento celular (atividade citostática), enquanto valores negativos representam morte celular (atividade citocida).

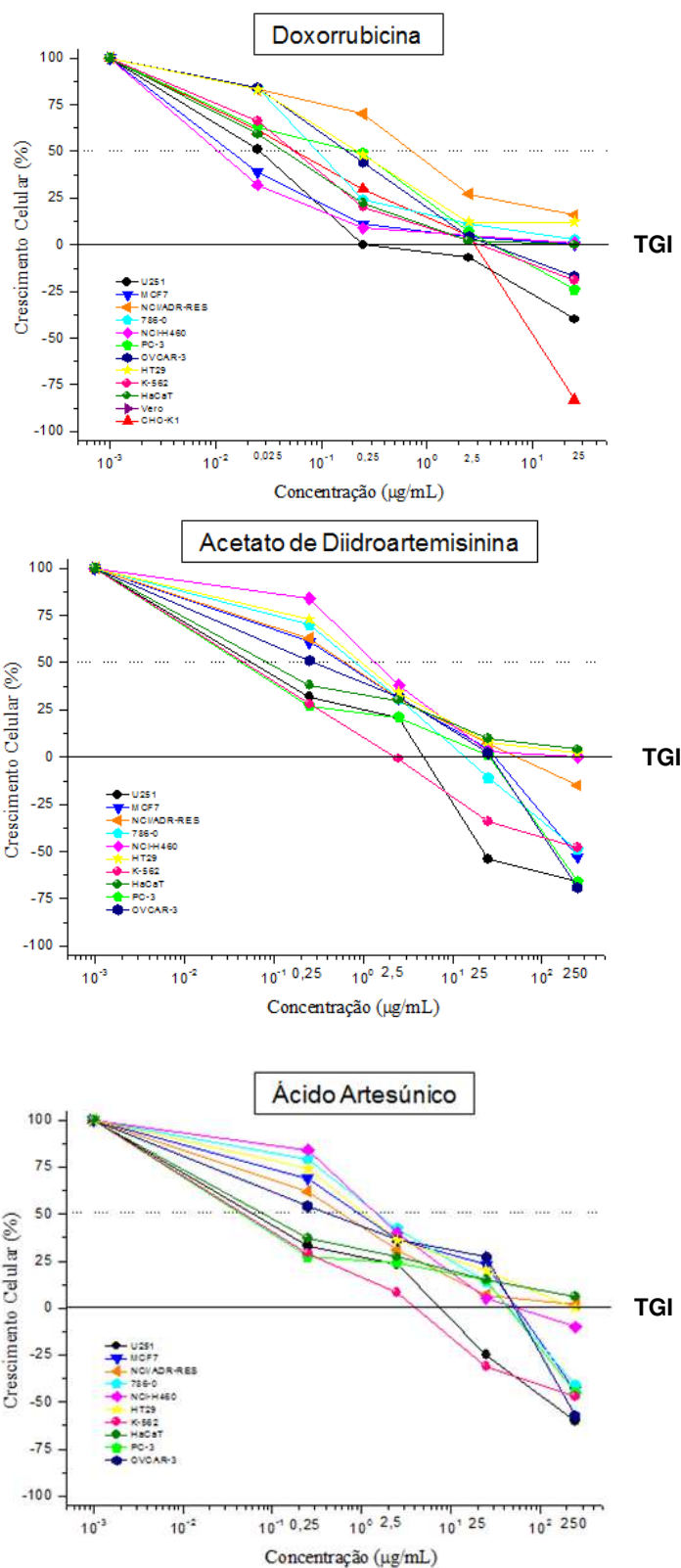


Figura 36: Curvas de crescimento celular em função da concentração de doxorubicina – quimioterápico de referência e dos derivados de artemisinina (acetato de diidroartemisinina e ácido artesúrico).

Estes gráficos relacionam a porcentagem de crescimento em função das concentrações das amostras testadas, em diferentes linhagens de células tumorais e não tumoral, sendo priorizado neste estudo a avaliação dos derivados de artemisinina frente à linhagem HaCat.

Avaliando-se a concentração necessária para inibição total do crescimento (TGI), observou-se que tanto o acetato de diidroartemisinina como o ácido artesúnico, apresentaram valores superiores a concentração de 250 µg/mL para a linhagem HaCat após 48 h de exposição, enquanto o quimioterápico de referência apresentou valor de 9,1 µg/mL, evidenciando desta forma a baixa toxicidade dos derivados de artemisinina (Quadro 9).

Quadro 9: TGI = concentração (µg/mL) necessária para inibir totalmente a proliferação celular (atividade citostática).

	g	m	a	r	pl	pr	o	h	K	q
Doxorrubicina	0,83	9,8	>25	13,1	12,9	4,9	5,5	>25	3,4	9,1
Acetato Diidroart.	2,7	17,2	54,9	14,7	250	6,2	11,7	>250	2,2	>250
Ácido Artesúnico	4,9	35,2	>250	35,3	70,4	14,8	26,0	250	3,1	>250

Legenda: linhagens tumorais humanas: **g** = U251 (glioma); **m** = MCF-7 (mama); **a** = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); **r** = 786-0 (rim); **pl** = NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); **pr** = PC-3 (próstata); **o** = OVCAR-03 (ovário); **h** = HT29 (cólon); **k** = K562 (leucemia).

linhagem não tumoral humana: **q** = HaCat (queratinócitos imortalizados).

Além disso, comparando-se com os valores de TGI da doxorrubicina, verifica-se que ambos os derivados apresentaram resultados bastante promissores contra as linhagens tumorais U251 (glioma) e K562 (leucemia). O acetato de diidroartemisinina também mostrou-se efetivo contra outras linhagens tumorais como, por exemplo, 786-0 (rim) e PC-3 (próstata), (Quadro 9).

4.5 O Modelo de Lipinski

Apesar de não terem sido feitos ensaios de atividade esquistossomicida *in vivo* do acetato de diidroartemisinina contra *S. mansoni* BH, os resultados dos ensaios *in vitro* obtidos para este composto foram promissores. Desta forma, decidiu-se utilizar o modelo proposto por Lipinski e colaboradores em 2001, para estimar as propriedades farmacocinéticas relativas à absorção e permeabilidade desta molécula.

Este modelo conhecido como regra de Lipinski ou “Regra dos 5”, recebeu essa denominação devido aos quatro parâmetros analisados serem múltiplos de 5. O objetivo principal de sua utilização é estimar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos administrados pela via oral, predizendo a influência da estrutura química na absorção de um composto, uma vez que a previsão dos processos farmacocinéticos, logo nos estágios iniciais da pesquisa, é de extrema importância para o desenvolvimento de um candidato a fármaco. Segundo Lipinski, os critérios a serem analisados são: a massa molar, a qual não deve exceder a 500 g/mol; o log P, cujo valor limite é 5; e os grupos doadores (NH + OH) e aceptores (N + O) de ligação hidrogênio, cujas somatórias não devem ultrapassar a 5 e 10, respectivamente. Esses parâmetros estão definidos na “Regra dos 5” original e estão associados a 90% dos fármacos orais que se encontram em nível de desenvolvimento clínico de fase II (Lipinski et al., 2001, 2012).

A extensão de outros parâmetros tem sido proposta para aumentar ainda mais a propriedade de seleção na regra de Lipinski. Entre estes pode-se citar o número de ligações rotacionáveis, que deve ser menor ou igual a 10 e a área

superficial polar cujo valor limite deve ser menor ou igual a 140 Å² (Lipinski et al., 2012; Keller et al., 2006).

Esses valores podem ser calculados através do site: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> disponibilizado livremente pela Novartis. Nesse programa, os parâmetros seguem uma metodologia própria desenvolvida para o programa Molinspiration.

Aplicando-se os parâmetros de Lipinski, calculados pelo programa Molinspiration para as moléculas do acetato de diidroartemisinina, ácido artesúnicos e artemisinina, obtivemos os seguintes dados (Figuras 37, 38 e 39):

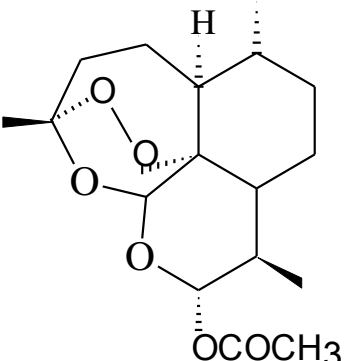
	Parâmetros de Lipinski
	miLogP = 3,48
	TPSA = 63,24 Å²
	natoms = 23
	MW = 326,39
	nON = 6
	nOHNH = 0
	nviolations = 0
	nrotb = 2
	volume = 300,60

Figura 37: Molécula do acetato de diidroartemisinina e parâmetros de Lipinski: miLogP (lipofilicidade), TPSA (área de superfície polar), natoms (número de átomos, exceto hidrogênio, na molécula), MW (massa molecular), nON (somatório de O e H – aceptores de ligação hidrogênio), nOHNH (somatório de NH e OH – doadores de ligação hidrogênio), nviolations (número de violações à regra de Lipinski), nrotb (número de ligações rotacionáveis), volume (volume molecular).

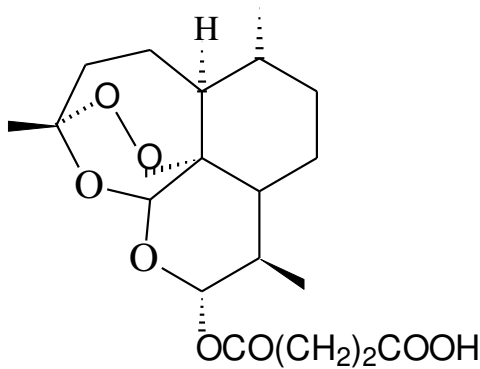
	Parâmetros de Lipinski
	miLogP = 2,75
	TPSA = 100,54 Å²
	natoms = 27
	MW = 384,43
	nON = 8
	nOHNH = 1
	nviolations = 0
	nrotb = 5
	volume = 344,64

Figura 38: Molécula do ácido artesúnic e parâmetros de Lipinski, calculados pelo programa Molinspiration.

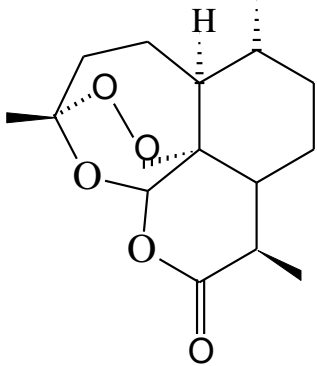
	Parâmetros de Lipinski
	miLogP = 3,32
	TPSA = 54,01 Å²
	natoms = 20
	MW = 282,34
	nON = 5
	nOHNH = 0
	nviolations = 0
	nrotb = 0
	volume = 258,23

Figura 39: Molécula da artemisinina e parâmetros de Lipinski, calculados pelo programa Molinspiration.

De acordo com os parâmetros observados na Figura 37, o acetato de diidroartemisinina encontra-se dentro dos limites considerados favoráveis a uma boa solubilidade e permeabilidade, o que indica a possibilidade deste composto apresentar um bom perfil de absorção.

Segundo a regra de Lipinski, os compostos com maiores pesos moleculares apresentam maior dificuldade de permeação pelas membranas biológicas. Em relação à lipofilicidade, sabe-se que ela é necessária para atravessar a bicamada lipídica das membranas celulares. Entretanto, pela “Regra dos 5”, não existem valores limitantes para os compostos hidrofílicos, sugerindo assim que uma alta lipofilicidade é mais comprometedora na diminuição da biodisponibilidade de um composto. Quanto ao número de doadores e aceptores de ligação hidrogênio, novamente valores excessivos dificultam a permeabilidade (Buzzi, 2007). Desta forma, o acetato de diidroartemisinina apresenta uma boa biodisponibilidade de acordo com os valores estipulados pela regra de Lipinski.

Estes dados auxiliam na identificação de compostos como candidatos promissores a futuros fármacos, uma vez que pontuam as mais importantes propriedades físico-químicas e estruturais características para um fármaco.

Assim, verifica-se que os valores calculados encontram-se dentro dos limites postulados pela regra de Lipinski, tanto para artemisinina e ácido artesúnicos, os quais já são utilizados atualmente como fármacos antimaláricos, como para o acetato de diidroartemisinina.

Este fato é um bom indicativo de que o acetato de diidroartemisinina apresenta potencial para tornar-se um candidato a futuro fármaco também, seja

antimalárico como a artemisinina e o ácido artesúnico, seja esquistossomicida, principal objetivo deste estudo.

5. CONCLUSÕES

- ✓ Os compostos diidroartemisinina, ácido artesúnic, ácido 10–diidroartemisinina ftálico, ácido 10–diidroartemisinina glutárico, ácido 10–diidroartemisinina adípico e acetato de diidroartemisinina apresentaram atividade esquistossomicida *in vitro* sobre vermes adultos de *S. mansoni* BH. Por sua vez, a artemisinina e o éster metílico do ácido artesúnic não apresentaram efeito esquistossomicida *in vitro* até 72 h de incubação, sendo observado apenas uma redução da motilidade dos vermes após 6 h iniciais.
- ✓ Os compostos sintetizados e incorporados em PVP apresentaram melhor solubilização no meio utilizado nos ensaios de atividade esquistossomicida *in vitro*, aumentando a disponibilidade dos mesmos.
- ✓ Os rendimentos obtidos na síntese dos derivados de artemisinina foram discrepantes entre si, tornando-se um fator importante na escolha de um potencial candidato a fármaco esquistossomicida. Deste modo, os compostos, ácido 10–diidroartemisinina glutárico e ácido 10–diidroartemisinina adípico apresentaram rendimentos baixos, 28,6% e 18,8%, respectivamente. O rendimento obtido na síntese do composto ácido 10–diidroartemisinina ftálico foi ainda menor (9,0%), além do mesmo ser quimicamente instável. Por outro lado, os compostos ácido artesúnic e acetato de diidroartemisinina apresentaram rendimentos elevados, 95,0% e 84,9%, respectivamente.

- ✓ O ácido artesúico proporcionou mortalidade de 100% dos vermes após 24h de incubação na concentração de 200 µg/mL, enquanto o acetato de diidroartemisinina foi ainda mais eficiente com mortalidade de 100% dos vermes no mesmo período, porém na concentração de 100 µg/mL.
- ✓ O acetato de diidroartemisinina, por ter apresentado um elevado rendimento de síntese, uma comprovada atividade esquistossomicida *in vitro* e com os valores calculados dos parâmetros de Lipinski, satisfazendo a “Regra dos 5”, mostra-se como potencial candidato a fármaco.

REFERÊNCIAS

Albuquerque, M.C.P.A.; “Novas imidazolidinas potencialmente ativas no combate à esquistossomose: síntese e avaliação da atividade no *Schistosoma mansoni*”, Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco, (2002).

Allegretti, S.M.; de Oliveira, C.N.F.; de Oliveira, R.N.; Frezza, T.F.; Rehder, V.L.G; “The use of brazilian medicinal plants to combat *Schistosoma mansoni*”, *Schistosomiasis*, (January 2012), p. 27-70.

Andrade, Z.A.; Rodrigues, G.; “Manifestações pseudoneoplásicas da esquistossomose intestinal”, *Arquivos Brasileiros de Medicina*, vol. 44, no. 1, (1954), p. 437-444.

Araújo, N.; Kohn, A.; Katz, N.; “Activity of the artemether in experimental *Schistosoma mansoni*”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 86, Suppl. 2, (1991), p. 185-188.

Araújo, N.; Kohn, A.; Katz, N.; “Therapeutic evaluation of artesunate in experimental *Schistosoma mansoni* infection”, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 32, (1999), p. 7-12.

Brossi, A.; Venugopalan, B.; Dominguez Gerpe, L.; Yeh, H.J.C.; Flippen-Anderson, J.L.; Buchs, P.; Luo, X.D.; Milhous, W.; Peters, W.; “Arteether, a New Antimalarial Drug: Synthesis and Antimalarial Properties”, *J. Med. Chem.*, 31, (1988), p. 645-650.

Butler, A.R.; Wu, Y.; “Artemisinin (Qinghaosu): A New Type of Antimalarial Drug”, *Chem. Soc. Rev.*, 21, (1992), p. 85-90.

Buzzi, F.C.; “Síntese de novas moléculas com potencial terapêutico: imidas cíclicas, chalconas e compostos relacionados”, *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, (2007).

Cabri, W.; D’Acquarica, I.; Simone, P.; Iorio, M.D.; Mattia, D.M.; Gasparrini, F.; Giorgi, F.; Mazzanti, A.; Pierini, M.; Quaglia, M.; Villani, C.; “Stereolability of Dihydroartemisinin, an Antimalarial Drug: A Comprehensive Thermodynamic Investigation. Part 1”, *J. Org. Chem.*, 76, (2011), p. 1751–1758.

Capela, R.S.S.S.; “Compostos híbridos da artemisinina - direccionamento para as fases sanguínea e hepática do parasita da malária”, *Tese de Doutorado*, Universidade de Lisboa, Portugal, (2011).

Chen, D.J.; Fu, L.F.; Shao, P.P.; Wu, F.Z.; Fan, C.Z.; Shu, H.; Ren, C.S.; Sheng, X.L.; “Studies on antischistosomal activity of qinghaosu in experimental therapy”, *Zhong Hui Yi Xue Zha Zhi*, vol. 80, no. 1, (1980), p. 422-428.

Christopherson, J.B.; “The Successful use of Antimony in Bilharziosis”, *The Lancet*, vol. 2, (1918), p. 325-327.

Cioli, D.; “Chemotherapy of schistosomiasis: An Update”, *Parasitology Today*, v. 14, n. 10, (1998), p. 418-422.

Cioli, D.; Pica-Mattoccia, L.; “Praziquantel”, *Parasitology Research*, vol. 90, Suppl. 1, (June 2003), p. S3-9.

Cioli, D.; Pica-Mattoccia, L.; Archers, S.; “Antischistosomal drugs: past, present...and future?”, *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 68, no. 1, (1995), p. 35-85.

Costa, M.S.; Kiralj, R.; Ferreira, M.M.C.; “Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme”, *Química Nova*, vol. 30, no. 1, (2007), p. 25-31.

Coura, J.R.; Amaral, R.S.; “Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99 (Supl I), (July 2004), p. 13-19.

Date, A.A.; Joshi, M.D.; Patravale, V.B.; “Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, no. 6, (July 2007), p. 505–521.

Denny, C.; Zacharias, M.E.; Kohn, L.K.; Foglio, M.A.; Carvalho, J.E.; “Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae)”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, (2007), p. 598-603.

De Oliveira, R.N.; de Oliveira, C.N.F.; Frezza, T.F.; Rehder, V.L.G.; Allegretti, S.M.; “*Tegument of Schistosoma mansoni as a Therapeutic Target*” In: *Parasitic Diseases – Schistosomiasis*, vol. 1, (2013), p. 151-177.

Doenhoff, M.J.; Hagan, P.; Cioli, D.; Southgate, V.; Pica-Mattoccia, L.; Botros, S.; Coles, G.; Tchuem-Tchuente, L.A.; Mbaye, A.; Engels, D.; “Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs”, *Parasitology*, vol. 136, (2009), p. 1825-1835.

Egan, T.J.; “Haemozoin formation”, *Molecular & Biochemical Parasitology*, 157, (2008), p.127–136.

Engels, D.; Chitsulo, L.; Montresor, A.; Savioli, L.; “The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research”, *Acta Tropica*, 82, (2002), p.139-146.

Fallon, P.G.; Doenhoff, M.J.; “Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific”, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 51, no. 1, (1994), p. 83–88.

Ferreira, M.S.; de Oliveira, D.N.; de Oliveira, R.N.; Allegretti, S.M.; Vercesi, A.E.; Catharino, R.R.; “Mass spectrometry imaging: a new vision in differentiating *Schistosoma mansoni* strains”, *J. Mass Spectrom.*, 49, (2014), p. 86-92.

Frézard, F.; Melo, A. L.; “Evaluation of the schistomicidal efficacy of liposome-entrapped oxamniquine”, *Inst. Med. Trop.*, vol. 39, no. 2, (1997), p. 91-100.

Frezza, T.F.; Oliveira, C.N.F.; Banin, T.M.; Rehder, V.L.G.; Boaventura Jr., S.; Allegretti, S.M.; “Tegumentary changes in two different strains of *Schistosoma mansoni* treated with artemisinin and artesunic acid”, *Revista de Patologia Tropical*, vol. 42 (3), (2013), p. 309-321.

Haynes, R. K.; Chan, H.W.; Cheung, M.K.; Lam, W.L.; Soo, M.K.; Tsang, H.W.; Voerste, A.; Williams, I.D.; “C-10 ester and ether derivatives of dihydroartemisinin – 10- α artesunate, preparation of authentic 10- β artesunate, and of other ester and ether derivatives bearing potential aromatic intercalating groups at C-10”, *Eur. J. Org. Chem.*, (2002), p. 113-132.

Kardono, L.B.S.; Wikara, T.; Tursiloadi, H.; Tursiloadi, S.; “Synthesis of dihydroartemisinin using Ni/TiO₂ catalyst prepared by sol gel method”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 4 (01), (2014), p. 1-8.

Katz, N.; Dias, E.P.; Araújo, N.; Souza, C. P.; “Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas”, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 7, no. 1, (1973), p. 381-387.

Katz, N.; “Terapêutica experimental da esquistossomose mansonii”. In: Carvalho, O.S.; Coelho P.M.Z.; Lenzi, H.L.; “*Schistosoma mansonii* & esquistossomose uma visão multidisciplinar”, edições 825-870, Fiocruz, ISBN 978-857541-150-6, Rio de Janeiro, 2008.

Keller, T.H.; Pichota, A.; Yin, Z.; “A practical view of ‘druggability’ ”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 10, (2006), p. 357-361.

Le, W.J.; You, J.Q.; Mei, J.Y.; “Chemotherapeutic effect of artesunate in experimental schistosomiasis”, *Acta Pharmaceutica Sinica*, vol. 18, no. 8, (August 1983), p. 619-621.

Le, W.J.; You, J.Q.; Yang, Y.Q.; Mei, J.Y.; Guo, H.F.; Yang, H.Z.; Zhang, Z.W.; “Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis”, *Acta Pharmaceutica Sinica*, vol. 17, no. 3, (March 1982), p. 187-193.

Leggio, A.; Liguori, A.; Perri, F.; Siciliano, C.; Viscomi, M.C.; “Methylation of α -amino acids and derivatives using trimethylsilyldiazomethane”, *Chemical Biology & Drug Design*, vol. 73, (2009), p. 287-291.

Lemos Neto, R.C.; Magalhães, L.A.; Piedrabuena, A.E.; “Alguns aspectos referentes ao estudo de linhagens de *Schistosoma mansonii* Sambon, 1907, provenientes dos estados de Minas Gerais e de São Paulo, Brasil”, *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, vol. 12, (1978), p. 277-290.

Leopold, G.; Ungethum, W.; Groll, E.; Diekman, H. W.; Nowak, H.; Wegner, D. H.; “Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics”, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 14, n. 1, (1978), p. 281-291.

Li, Y.; Yu, P.L.; Chen, Y.X.; Li, L.Q.; Gai, Y.Z.; Wang, D.S.; Zheng, Y.P.; "Studies on Analogs of Artemisinin. I. The Synthesis of Ethers, Carboxylic Esters and Carbonates of Dihydroartemisinin", *Acta Pharmaceutica Sinica*, 16, (1981), p. 429-439.

Li, Y.S.; Chen, H.G.; He, H.B.; Hou, X.Y.; Ellis, M.; McManus, D.P.; "A double-blind field trial on the effects of artemether on *Schistosoma japonicum* infection in a highly endemic focus in southern China", *Acta Trop.*, vol. 96, (2005), p. 184-190.

Li, Z.; Gao, M.; Yuan, M.; Hao, J.; Deng, X.; "Synthesis and Characterization of Biodegradable Poly(ester anhydride) Based on ϵ -Caprolactone and Adipic Anhydride Initiated by Potassium Poly(ethylene glycol)ate", *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, vol. 41, (2003), p.1511-1520.

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", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, (2012), p. 4-17.

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", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 46, (2001), p. 3-26.

Lu, G.; Hu, X.; Huang, C.; Lu, Y.; Wu, L.; Lihua, L.; Xu, J.; Yu, X.; "Effect of artemether, hemin and Fe^{3+} on recombinant lactate dehydrogenase from *Schistosoma japonicum*", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 3, no. 12, (December 2010), p. 930-933.

Lu, S.H.; Yan, X.L.; Li, S.W.; Shi, J.F.; Liu, X.; Yan, X.H.; Yan, M.J.; Lou, J.L.; Kumagai, T.; Wen, L.Y.; “Prophylatic effect of artesunate against experimental infection of *Schistosoma mansoni*”, *Chinese Journal of Parasitology Parasitic Diseases*, vol. 22, (2004), p. 20-23.

Lu, S.H.; Kumagai, T.; Qinghua, A.; Xiaolan, Y.; Ohmae, H.; Yabu, Y.; Siwen, L.; Liyong, W.; Maruyama, H.; Otha, N.; “Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols”, *Parasitology International*, vol. 55, (2006), p. 63-68.

Ma, J.; Katz, E.; Kyle, D.E.; Ziffer, H.; “Syntheses and antimalarial activities of 10-substituted deoxoartemisinins”, *J. Med. Chem.*, 43, (2000), p. 4228-4232.

Martinez, E.M.; Neves, R.H.; Oliveira, R.M.F.; Machado-Silva, J.R.; Rey, L.; “Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*”, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 36, no. 5, (2003), p. 557-564.

Matos, F.J.A.; *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais. Projeto para pequenas comunidades*, 2th ed. EUFC, Fortaleza, (1994).

Meshnick, S.R.; “Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity”, *Int. J. Parasitol.*, 32, (2002), p.1655-1660.

Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M.; “Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines”, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 83, no. 11, (1991), p. 757-766.

Mourão, S.C.; Costa, P.I.; Salgado, H.R.N.; Gremião, M.P.D.; “Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 295, n. 1-2, (2005), p. 157-162.

Narváez, A.J.R.; “Relação entre estrutura química e atividade biológica nos fármacos esquistossomicidas”, *Química Nova*, (Outubro 1983), p. 134-140.

Nontprasert, A.; Pukrittayames, S.; Dondorp, A.M.; Clemens, R.; Looareesuwan, S.; Whitw, N.J.; “Neuropathologic toxicity of artemisinin derivatives in a mouse model”, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 67, no. 4, (October 2002), p. 423-429.

Oliver, L.; Stirewalt, M.A.; “An efficient method for exposure of mice to cercarias of *Schistosoma mansoni*”, *Journal of Parasitology*, vol. 38, (1952), p. 19-23.

Parise-Filho, R.; Silveira, M.A.B.; “Panorama atual da esquistossomíase no mundo”, *Brazilian J. Pharm. Sci.*, 37, 2001, p.123-135.

Pellegrino, J.; Siqueira, A.F.; “Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas”, *Rev. Bras. Malar.*, vol. 8, 1956, p. 589-597.

QNint – Sociedade Brasileira de Química; Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.267> (acessado em Maio de 2015).

Santos, P.E.R.; “Estudo da composição química e avaliação da atividade esquistossomicida do extrato etanólico e frações das folhas de *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn (Euphorbiaceae)”, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas (SP), Brasil, (2013).

Scrimgeour, E.M.; Gajdusek, D.C.; “Involvement of the central nervous system in *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection: a review”, *Brain*, [S.I.], v. 108, (1985), p. 1023-1038.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde; “Esquistossomose mansônica”, *Guia de Vigilância Epidemiológica* – caderno 10, p. 19.

Shoemaker, R.H.; “The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen”, *Nat. Rev. Cancer*, 6, (2006), p. 813-826.

Solomons, G.; Fryhle, C.; “Química Orgânica”, vol. 2, 7ª ed., (2002), p. 95-96.

Shuhua, X.; Binggui, S.; Chollet, J.; Utzinger, J.; Tanner, M.; “Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether”, *J. Parasitol.*, vol. 86, (2000), p. 1125-1132.

Tracy, J.W.; Catto, B.A.; Webster, L.T.; “Reductive metabolism of niridazole by adult *Schistosoma mansoni*. Correlation with covalent drug binding to parasite macromolecules”, *Molecular Pharmacology*, 24, (1983), p. 291-299.

Utzinger, J.; N’goran, E.K.; N’dri, A.; Lengeler, C.; Xiao, S.H.; Tanner, M.; “Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial”, *Lancet*, vol. 355, (2000), p. 1320-1325.

Utzinger, J.; Chollet, J.; Tu, Z.W.; Xiao, S.H.; Tanner, M.; “Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 96, (2002), p. 318-323.

Utzinger, J.; Keiser, J.; Shuhua, X.; Tanner, M.; Singer, B.H.; “Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials”,

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 47, no. 5, (May 2003), p. 1487-1495.

Valencia, C.I.; Catto, B.A.; Webster, L.T.Jr.; Barcelon, E.; Ofendoreyes, R.; "Concentration time course of praziquantel in Filipinos with mild *Schistosoma japonicum* infection", *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v. 25, n. 1, (1994), p. 409-414.

Vasconcelos, T.; Sarmento, B.; Costa, P.; "Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs", *Drug Discovery Today*, vol. 12, n. 23-24, (2007), p. 1068-1075.

Wagner, H. and Blatt, S.; In: "Plant drug analysis. A thin-layer chromatography atlas", Springer, Berlin, (1996), p. 359.

Watt, G.; Adapon, B.; Long, G.W.; Fernando, M.T.; Ranoa, C.P.; Cross, J.H.; "Praziquantel in treatment of cerebral schistosomiasis", *Lancet*, v. 2, n. 1, (1986), p. 529-532.

World Health Organization; "The control of schistosomiasis – second report of the WHO expert committee – Technical Series no. 830", *World Health Organization*, (1993), Geneva, Switzerland.

World Health Organization; "WHO monograph on good agricultural and collection practice (GACP) of *Artemisia annua* L", (2006), *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.

World Health Organization; "Schistosomiasis", Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> (accessed on February 2014).

Xiao, S.H.; Hotez, P.J.; Tanner, M.; “Artemether, an effective new agent for chemoprophylaxis against schistosomiasis in China: its *in vivo* effect on the biochemical metabolism of the asian schistosome”, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, vol. 31, no. 4, (December 2000), p. 724-732.

Xiao, S.H.; Keiser, J.; Chollet, J.; Utzinger, J.; Dong, Y.; Endriss, Y.; Vernnerstrom, J.L.; Tanner, M.; “*In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosomose species”, *Antimicrob. Agents Chemother*, vol. 51, (2007), p. 1440–1445.

Yadav, J.S.; Satheesh Babu, R.; Sabitha, G.; “Stereoselective total synthesis of (+)-artemisinin”, *Tetrahedron Letters*, 44, (2003), p. 387-389.

Yoshioka, L.; Magalhães E.M.Z.; Magalhães L.A.; Linhares A.X.; “*Schistosoma mansonii*: estudo da patogenia da linhagem santa rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos”, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 35, no. 3, (2002), p. 203-207.

Yue, W.J.; You, J.Q.; Mei, J.Y.; “Effects of artemether on *Schistosoma japonicum* adult worms and ova”, *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 5, no. 1, (March 1984), p. 60-63.

ANEXOS

1. Artemisinina

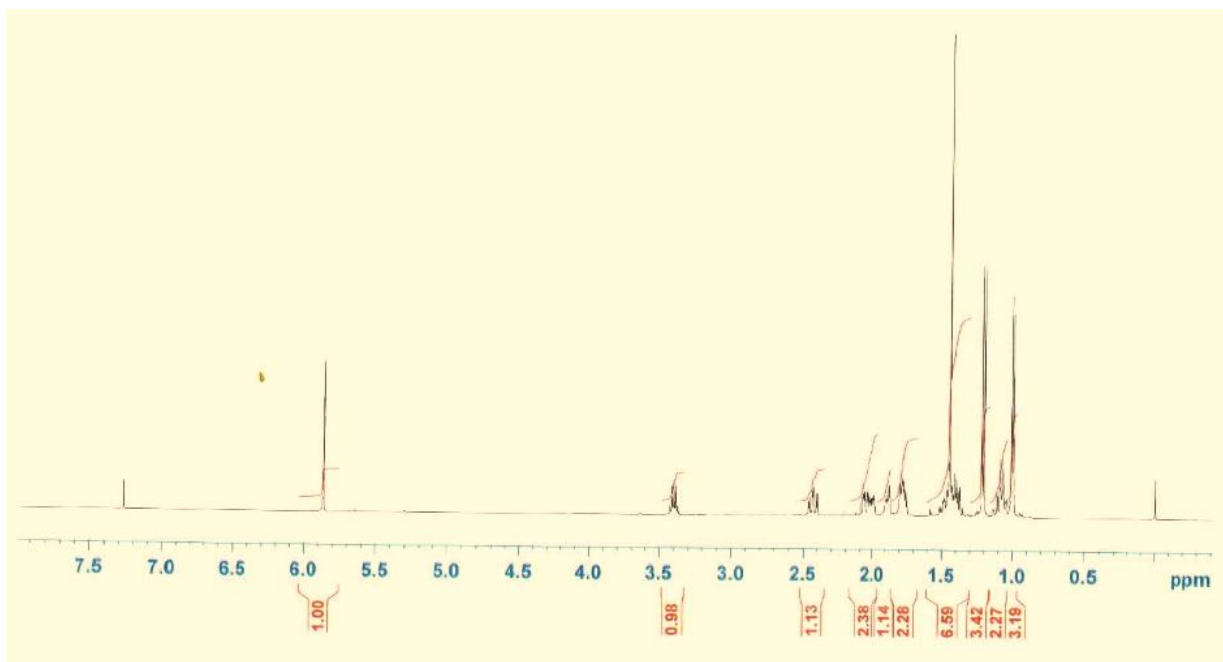


Figura 1: Espectro de RMN ^1H da artemisinina.

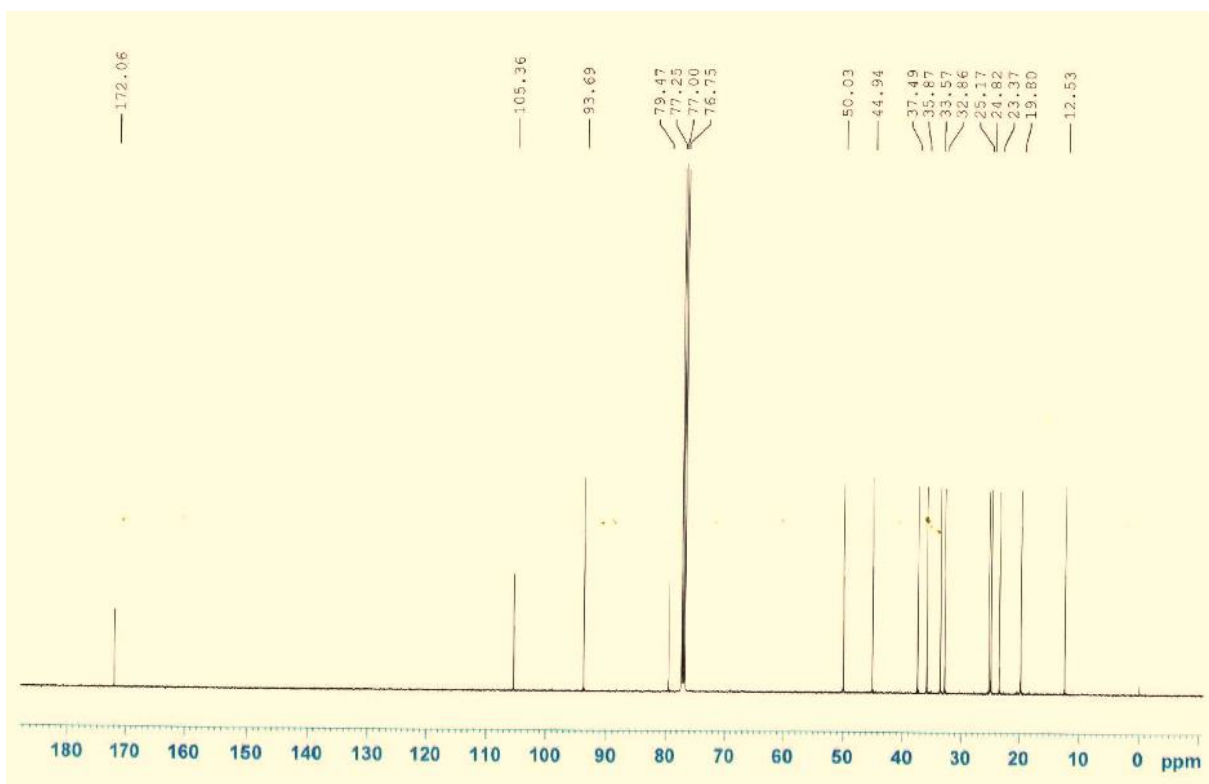


Figura 2: Espectro de RMN ^{13}C da artemisinina.

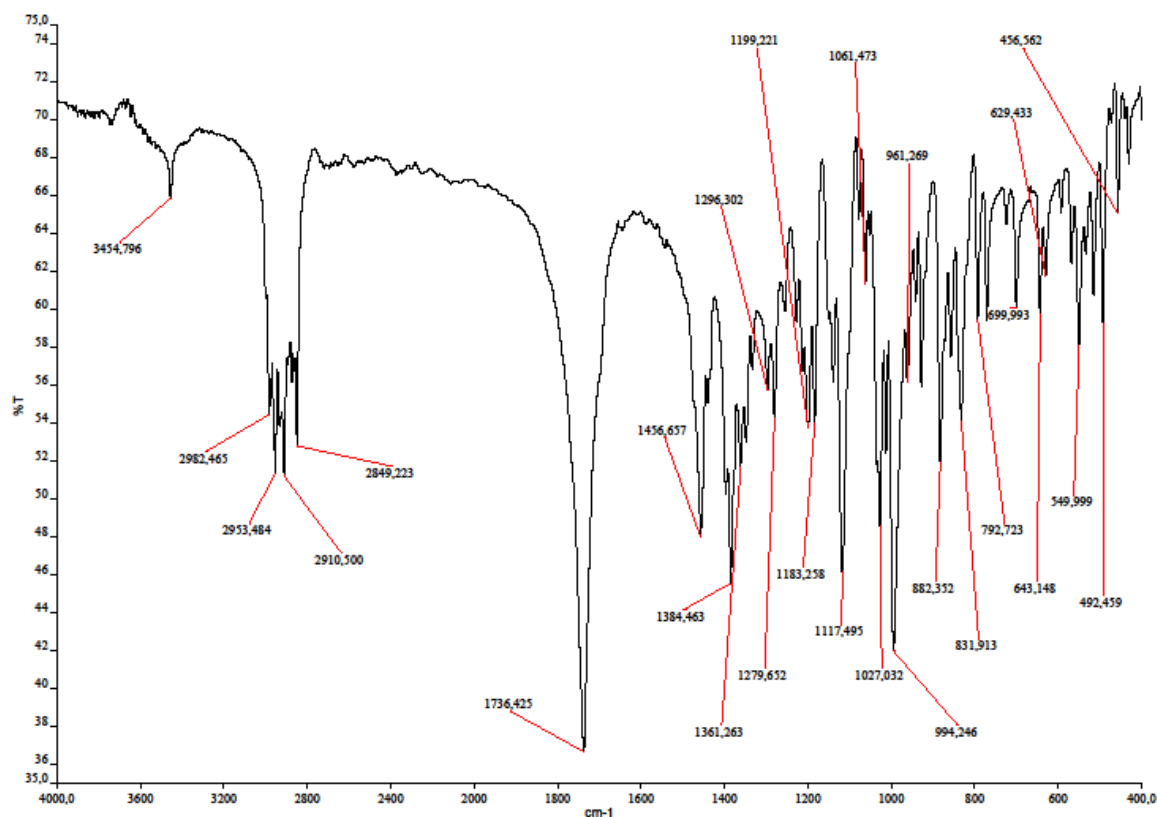


Figura 3: Espectro de Infravermelho da artemisinina.

2. Diidroartemisinina

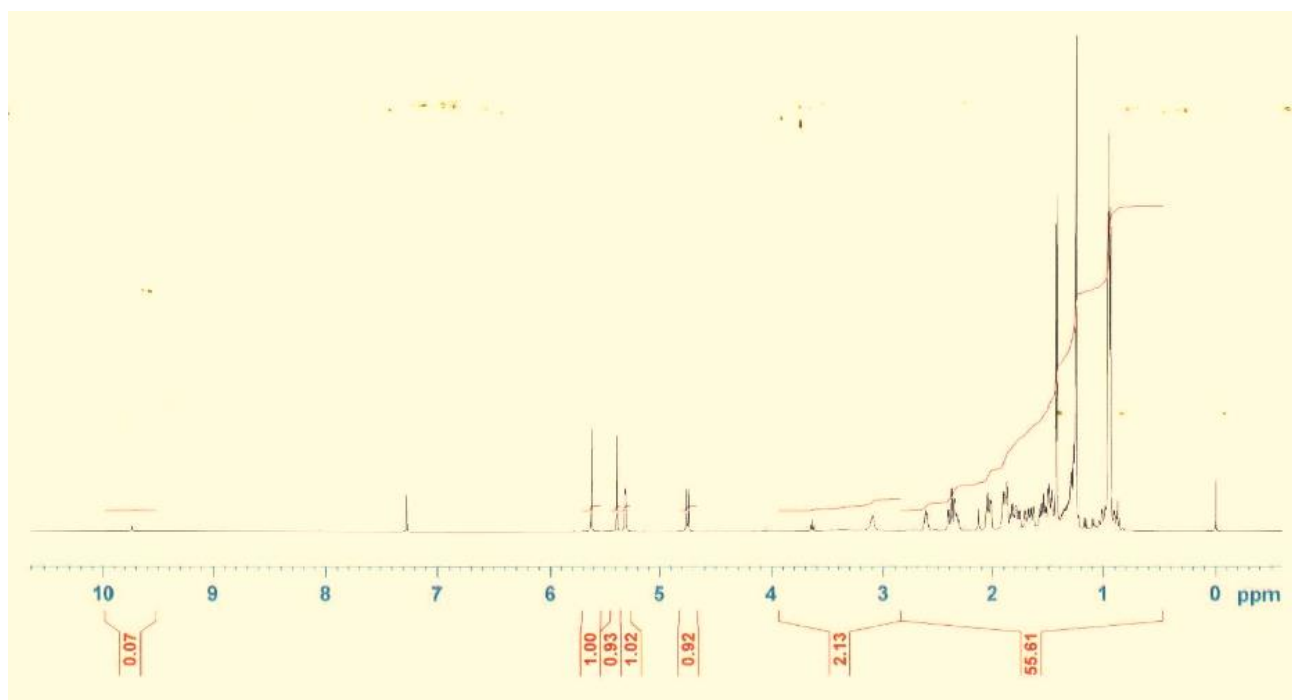


Figura 4: Espectro de RMN ¹H da diidroartemisinina.

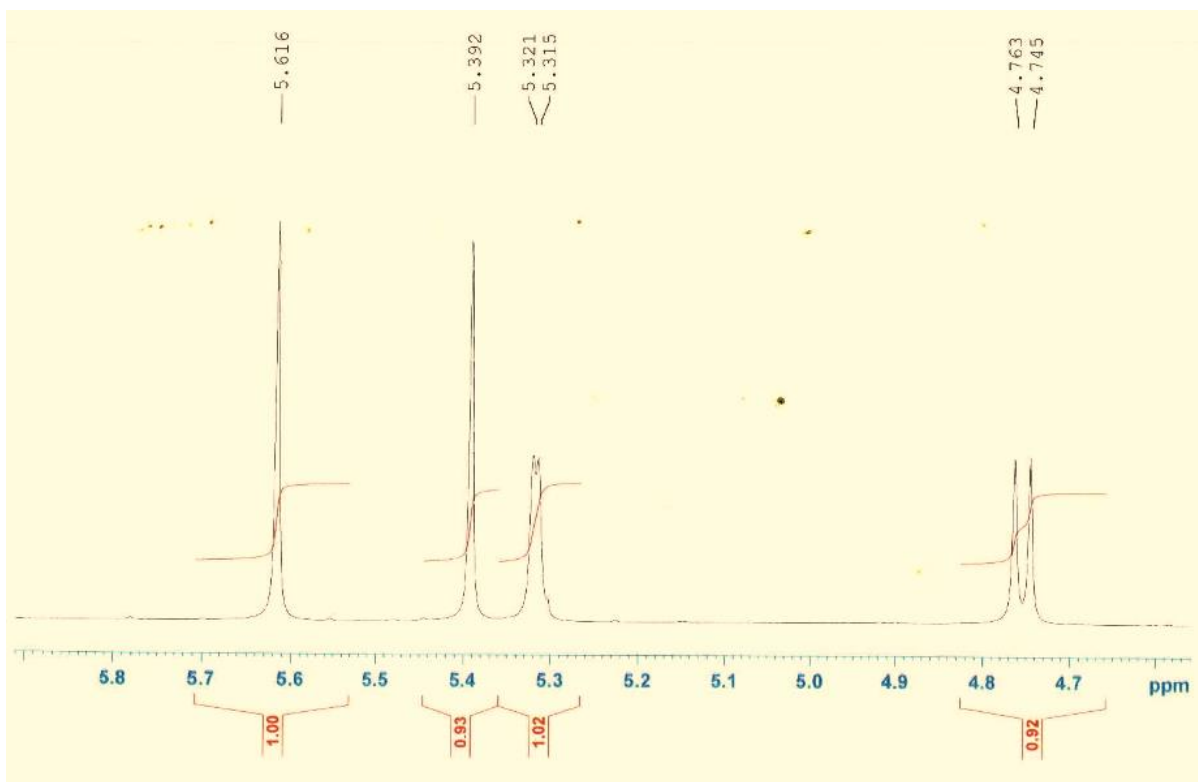


Figura 5: Parte do espectro de RMN ^1H da diidroartemisinina, região entre 5,8 a 4,7 ppm.

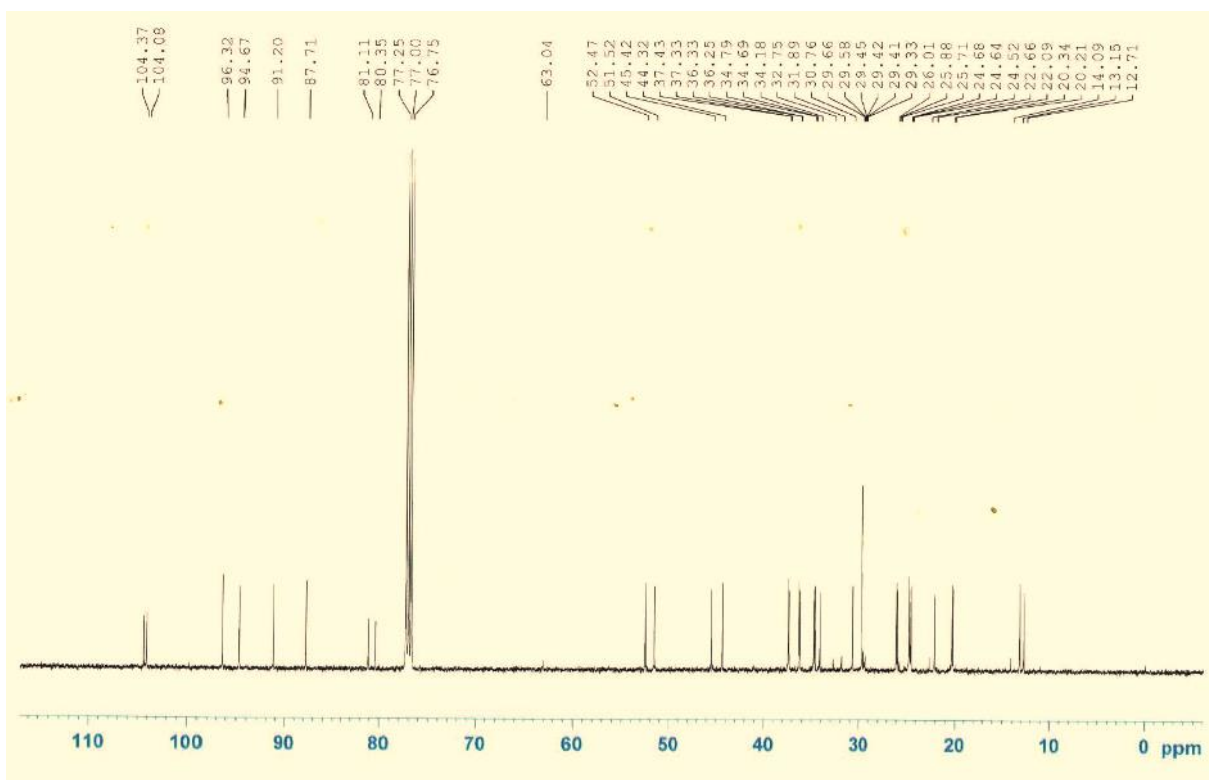


Figura 6: Espectro de RMN ^{13}C da diidroartemisinina.

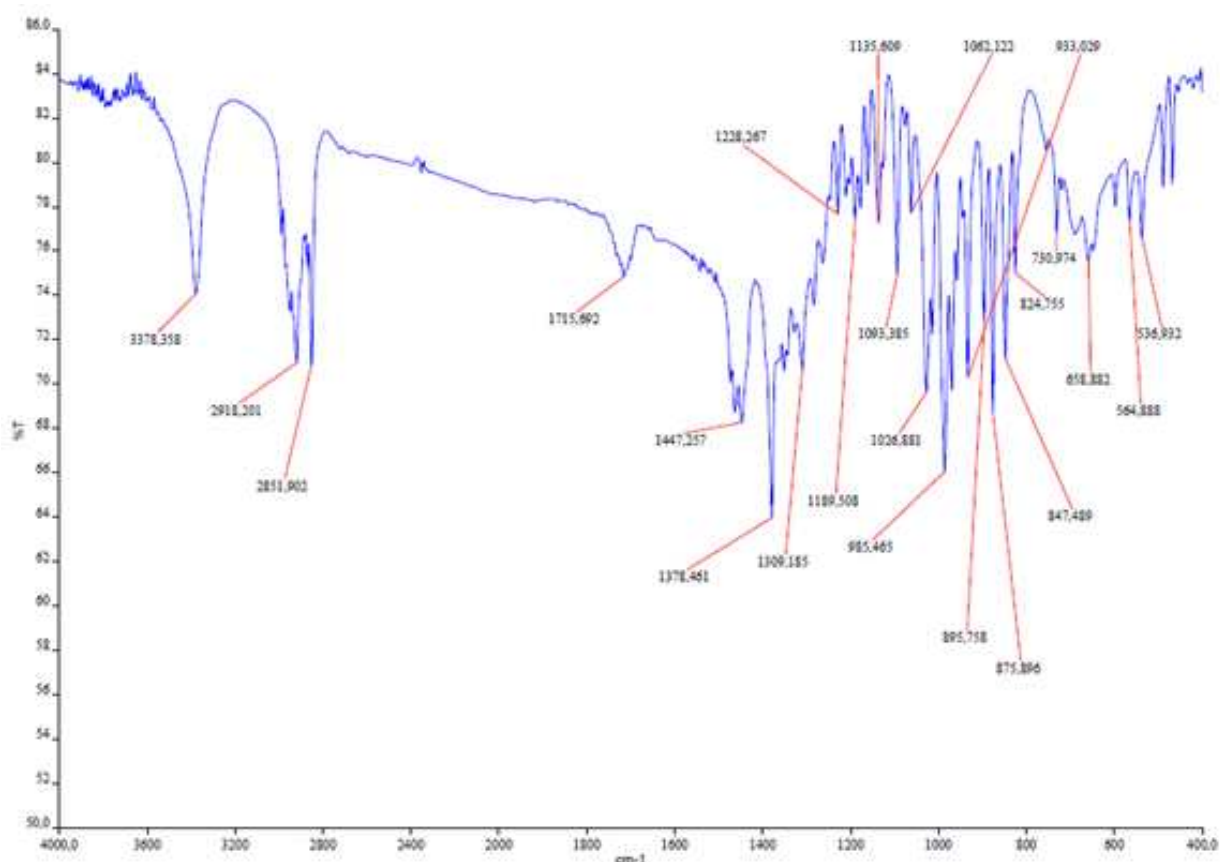


Figura 7: Espectro de Infravermelho da diidroartemisinina.

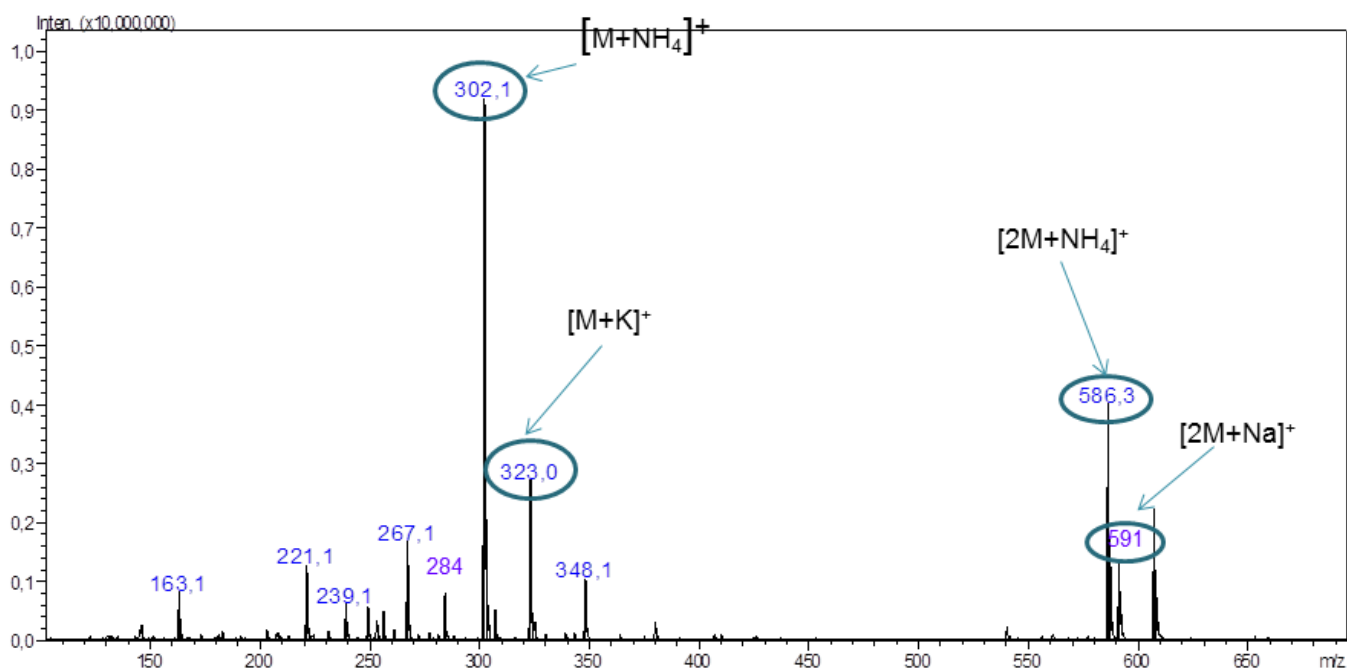


Figura 8: Espectro de massas da diidroartemisinina.

3. Ácido Artesúnic

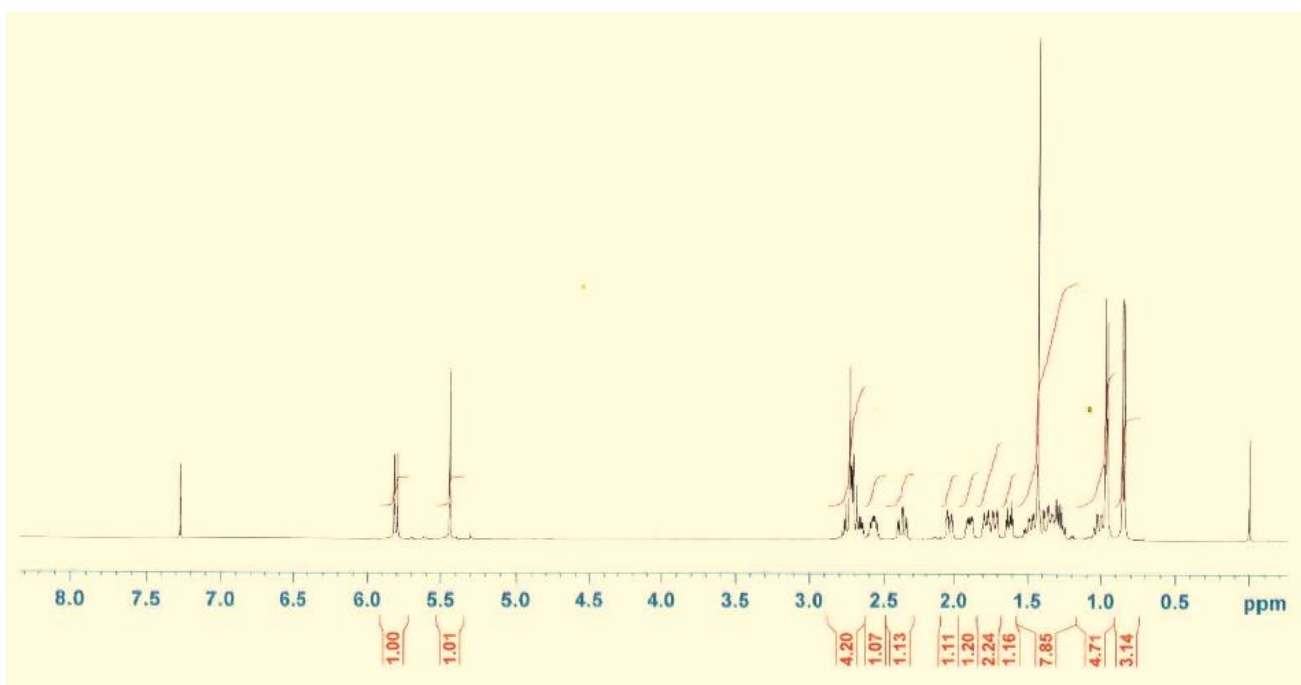


Figura 9: Espectro de RMN ^1H do ácido artesúnic.

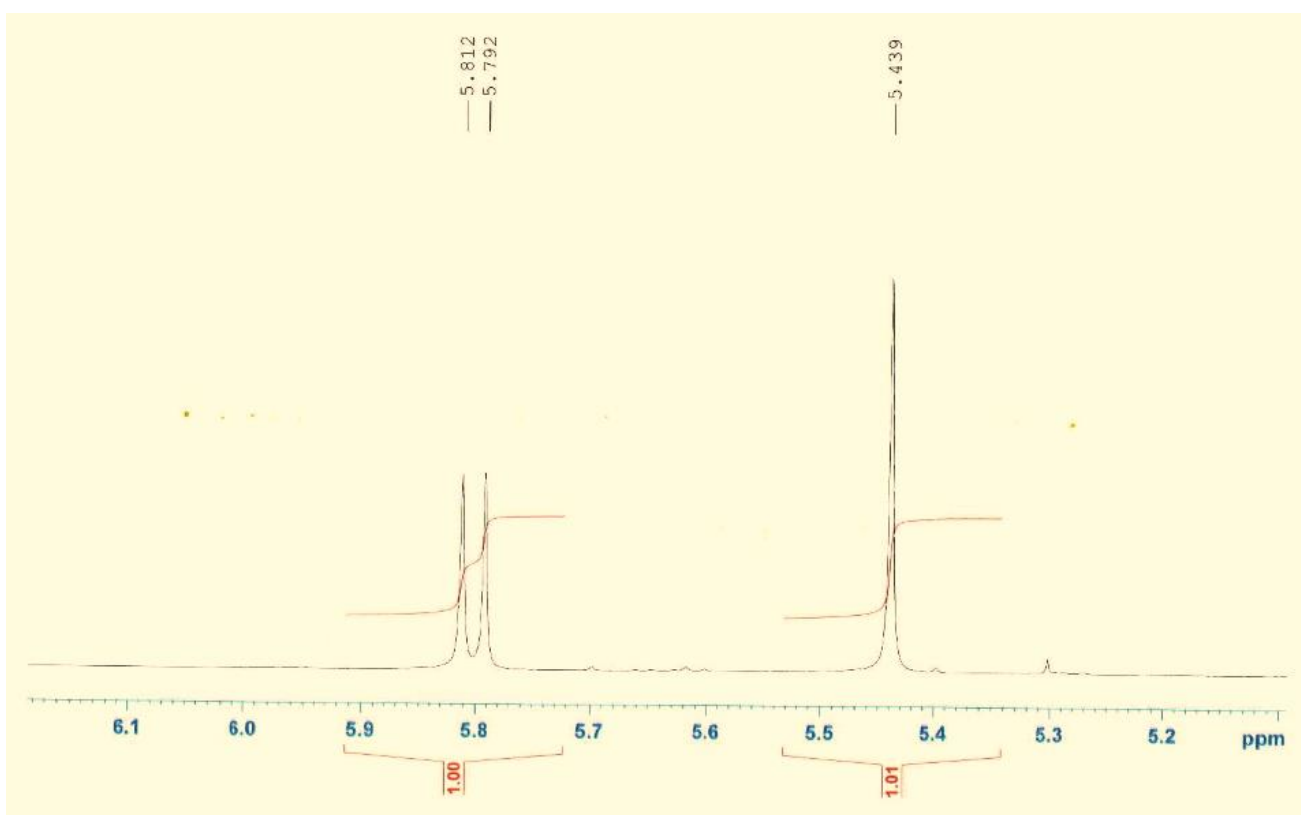


Figura 10: Parte do espectro de RMN ^1H do ácido artesúnic, região entre 6,1 a 5,2 ppm.

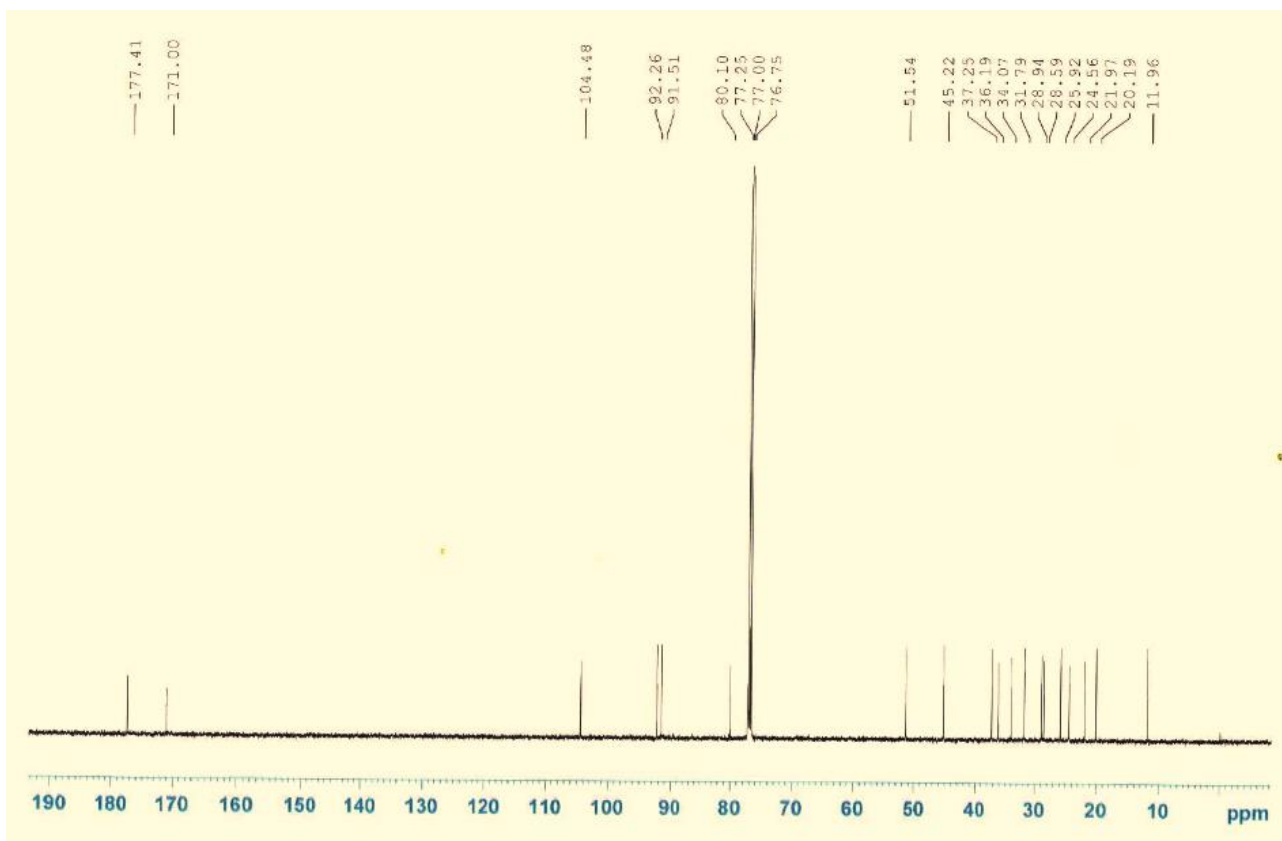


Figura 11: Espectro de RMN ^{13}C do ácido artesúnic.

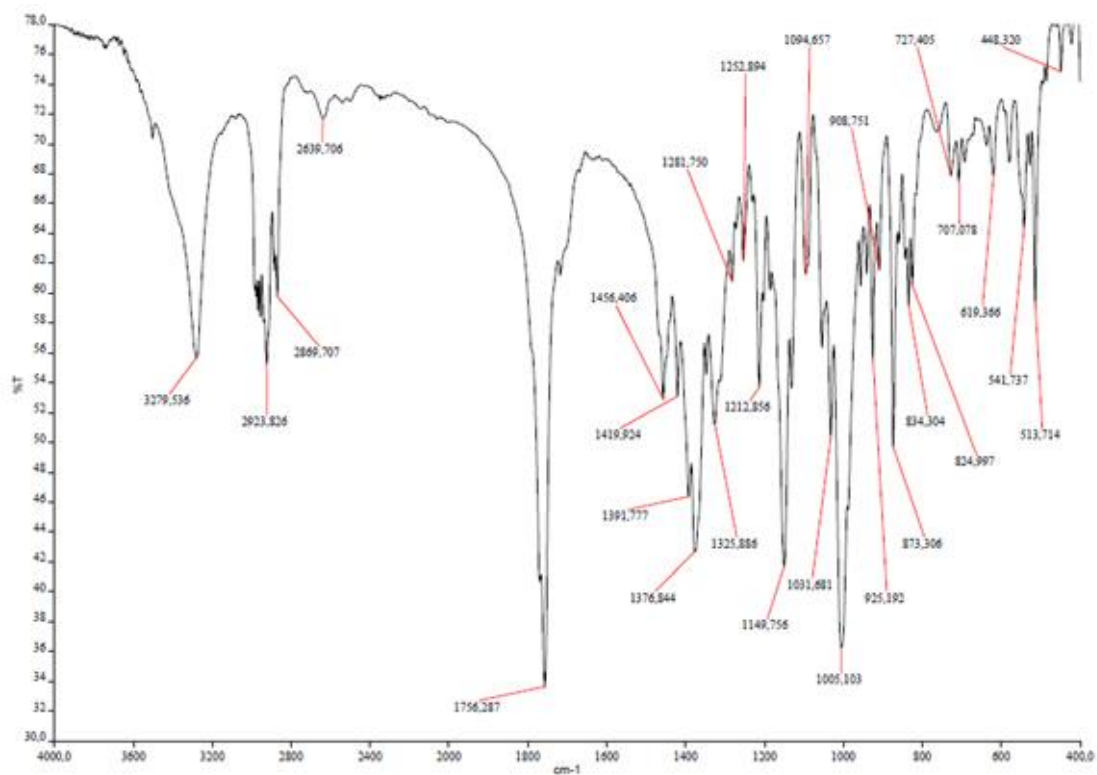


Figura 12: Espectro de Infravermelho do ácido artesúnic.

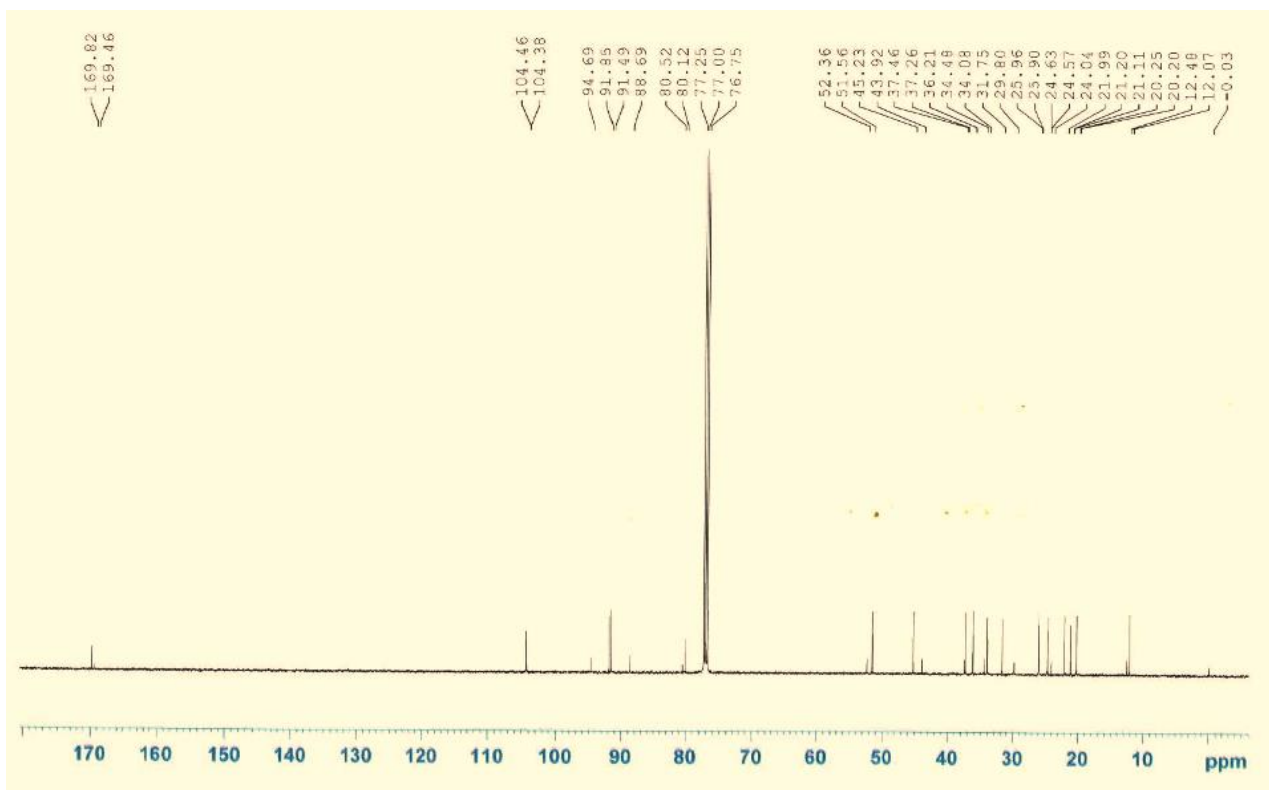


Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C do acetato de diidroartemisinina.

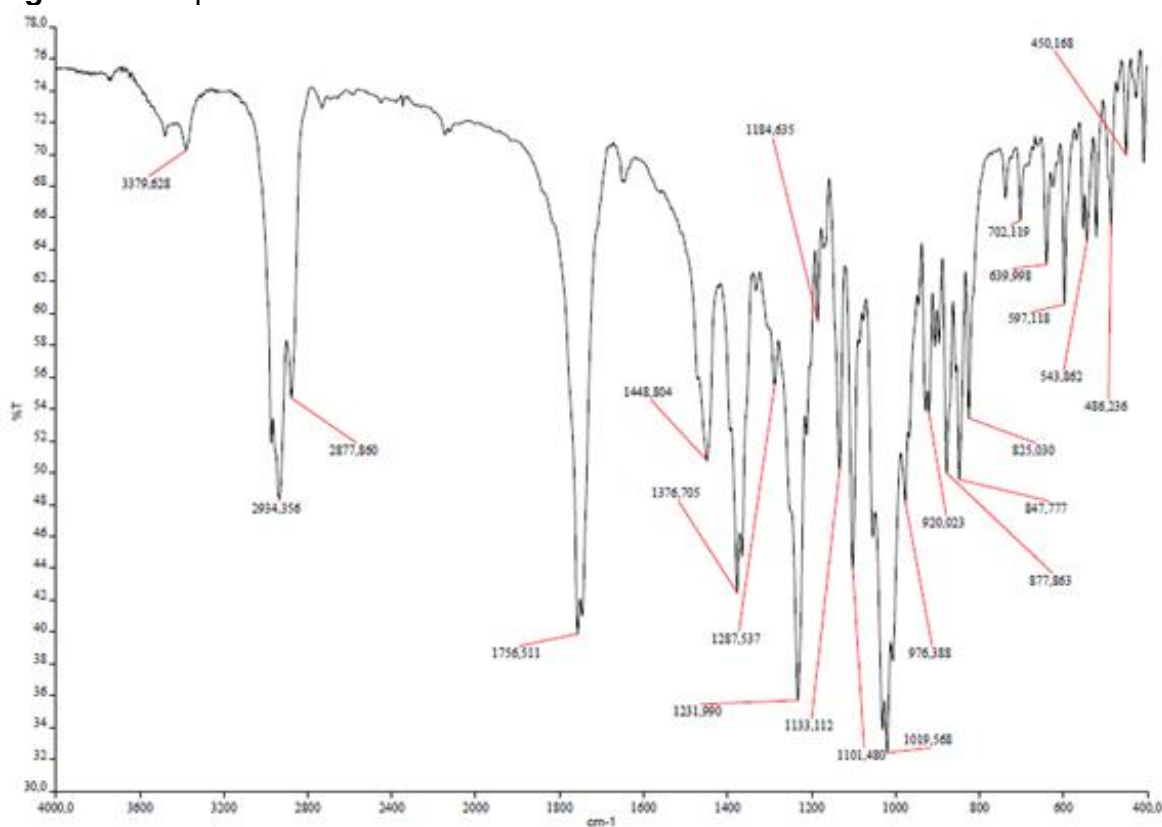


Figura 16: Espectro de Infravermelho do acetato de diidroartemisinina.

$[M+Na]^+$ 349.16216

AM_0208_15_POS_FT_2#1 RT: 35.82 AV: 1 NL: 1.27E5
T: FTMS +p ESI Full ms [150.00-500.00]

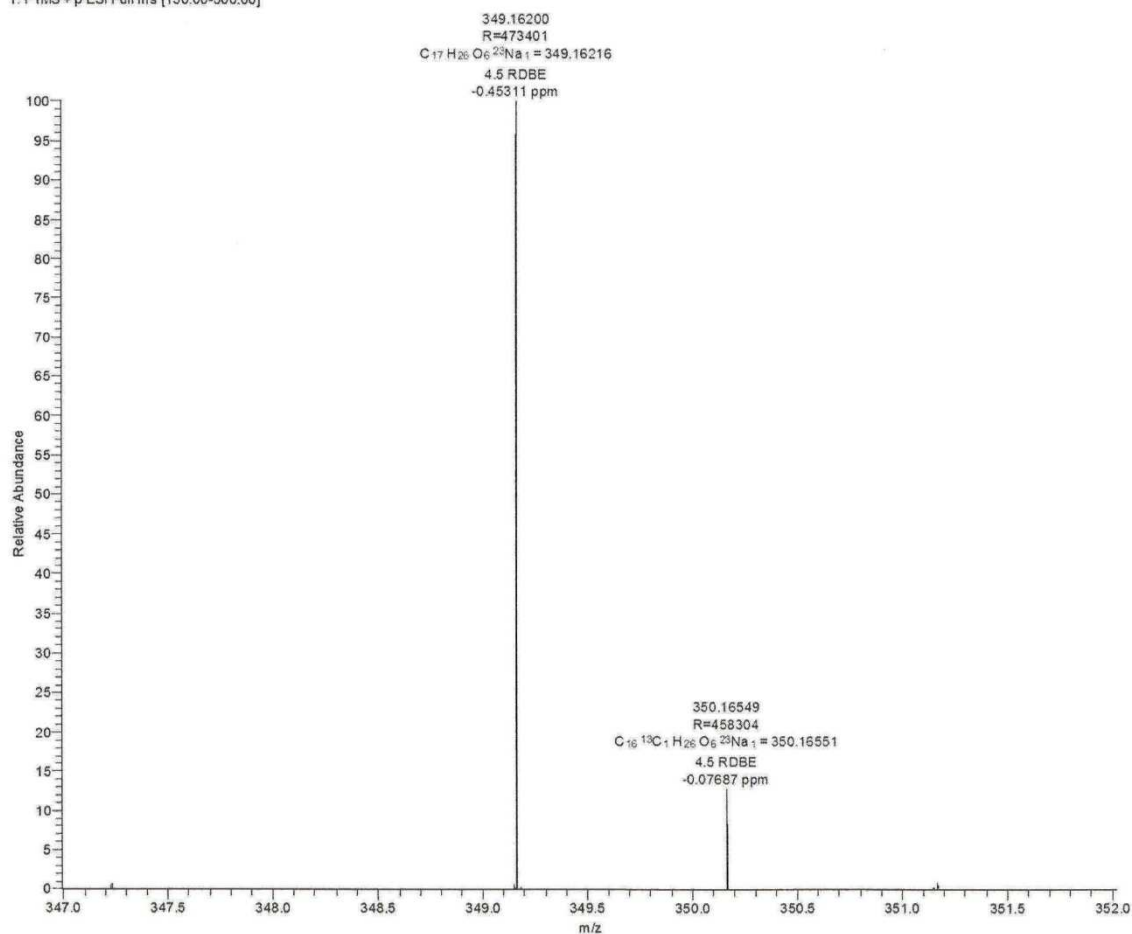


Figura 17: Espectro de massas alta resolução do acetato de diidroartemisinina.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da artemisinina e ácido artesúnico sobre vermes adultos de S. mansoni, linhagem SE: Uma abordagem para identificação de sítios de ação por meio de marcadores fluorescentes" (protocolo nº 3248-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti / Sheila De Andrade Penteado Corrêa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 18 de dezembro de 2013.

Campinas, 18 de dezembro de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Figura 18: Protocolo nº 3248-1 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "SÍNTESE DE DERIVADOS DA ARTEMISININA E ESTUDOS DA ATIVIDADE in vitro CONTRA Schistosoma mansoni":

☐ não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões): CEUA

☐ CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. , Instituição: .

☒ CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 3248-1, Instituição: IB/UNICAMP.

☐ CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. , Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Assinatura: _____

Nome do(a) aluno(a): Sinésio Boaventura Júnior

Assinatura: _____

Nome do(a) orientador(a): Dra. Vera Lúcia Garcia

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

6/6-118250-22:01-5102-170-22- 440147/3.17730296

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **“SÍNTESE DE DERIVADOS DA ARTEMISININA E ESTUDOS DA ATIVIDADE in vitro CONTRA Schistosoma mansoni”**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14 de Julho de 2015.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Sinésio Boaventura Júnior**
RG n.º 10568193-3

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Dra. Vera Lúcia Garcia**
RG n.º 10689834