

Sara Patrícia Castelo Branco Moreira Dias

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos. Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteróides

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria Luísa Campeão Fernandes Vaz Sá e Melo e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sara Patrícia Castelo Branco Moreira Dias

**Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides**

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria Luísa
Campeão Fernandes Vaz Sá e Melo e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro 2015



Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos. Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela
Professora Doutora Maria Luísa Campeão Fernandes Vaz Sá e Melo e apresentada
à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro 2015

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção grau de Mestre em Química Farmacêutica Industrial, sob orientação científica da Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Agradecimentos

Este trabalho foi possível graças ao apoio, orientação e incentivo que tive durante estes últimos dois anos de diversas pessoas que me ajudaram nesta etapa da minha vida e a quem quero agradecer.

À Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo agradeço a oportunidade que me proporcionou em ter aceitado ser minha orientadora, neste projeto atrativo. Obrigada por todo o apoio e confiança que depositou em mim e pelo esclarecimento de dúvidas e dos resultados que foram surgindo durante este projeto. Também pela revisão do presente trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Salvador agradeço o acompanhamento e apoio que deu ao longo de todo o mestrado.

Ao professor Doutor Alcino Leitão e à professora Doutora Maria Manuel Silva pelo apoio que me deram sempre que necessitei de ajuda.

Quero também aproveitar para agradecer às minhas colegas de laboratório à Sandra, à Sofia, à Vanessa, à Salete e à Carolina pelo carinho com que me receberam, pelo apoio que me deram e a oportunidade de aprender com elas ao deste últimos meses.

À D. Graça Santiago e à D. Anabela Pinto toda a amizade, simpatia e apoio prestado sempre que precisava.

À minha família pais, irmãos (Tiago, Cláudia, Rita e Miguel) pelo incentivo para lutar e triunfar pelos meus sonhos e objetivos.

Ao Fabian pelo carinho, apoio e compreensão que me deu ao longo destes últimos anos.

Aos meus amigos que estiveram junto de mim ao longo desta caminhada.

Obrigada a todos que me ajudaram a alcançar mais este triunfo na minha vida.

Resumo

A malária ou paludismo é um dos problemas de saúde pública com mais importância em todo o mundo. Em 2011 causou a morte a 655.000 pessoas das quais a maioria atingiu crianças com menos de 5 anos. Apesar de as estatísticas indicarem que esta doença está controlada, nos últimos anos temos vindo a assistir a um aumento de resistência aos fármacos utilizados no combate a este flagelo. Daí surge a necessidade de criar novas estratégias que ajudem a erradicar esta doença.

Uma das novas apostas que têm sido estudadas, envolve esteroides, como por exemplo os ácidos biliares. No presente estudo usamos derivados do colestano, nomeadamente os oxiesteróis. Estes podem resultar da auto-oxidação ou por reações enzimáticas do colesterol. Os oxiesteróis desempenham várias funções importantes em ligação com o colesterol e de acordo com o volume deste que podem originar imunossupressão, aterosclerose, apoptose, necrose, inflamação e no desenvolvimento de cálculos biliares.

Neste trabalho é feito um resumo sobre a história da malária, caracterização do parasita, terapêutica utilizada, fatores que condicionam a erradicação da malária, caracterização dos oxiesteróis e suas funções e caracterização de fármacos híbridos.

Durante este trabalho são exploradas diferentes reações com vista à síntese de fármacos híbridos antimaláricos que possuem um núcleo esteroide e um grupo 1,2,4,5-tetraoxano nomeadamente **5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano** e **5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato** e a sua caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Também foi efetuada a síntese em quatro passos do intermediário 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona necessário à preparação dos compostos: **5 α -Hidroxi,6 β -metoxicolestanona-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano** e **5 α -Hidroxi,6 β -metoxicolestanona-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato**.

Numa análise exploratória também foram realizadas reações de preparação de híbridos, quer no derivado do di-hidroperóxido, quer da molécula híbrida final usando o triflato de bismuto.

Abstrat

Malaria or paludism is one of the most important health problems worldwide. In 2011 caused the death of 655,000 people, most of them in children under 5 years. Although the static indicates that disease is controlled in recent years we have seen an increase of resistance to drugs used to fight this calamity. Hence the need for new strategies to help eradicate this disease.

One of the new approaches studied steroid, bile acids. In the present study colestane derivatives will be used, namely oxysterols. These may result from auto-oxidation of cholesterol or them enzymatic reactions. The oxysterols perform various important functions in connection with cholesterol and according to its volume can lead to immunosuppression, atherosclerosis, apoptosis, necrosis, inflammation and the development of gallstones.

In this thesis, a summary about the history of malaria, the parasite characterization, the therapy used, factors that regulate the eradication of malaria, characterization of oxysterols and their functions and characterization of hybrid drugs, is presented.

During this work the synthesis of hybrid antimalarial drugs that have a steroid nucleus and a 1,2,4,5-tetraoxane group including **5 α -colestan-1,2,4,5-tetraoxa-adamantane** and **5 α -tetraoxane-1,2,4,5-cholestane-etylclclohexanocarboxilate** and their characterization by nuclear magnetic resonance spectroscopy.

The synthesis of intermediate 5 α -hydroxy-6 β -methoxycholestan-3-one required for preparation of the compounds: **5,6-oxygenated cholestane 1,2,4,5-tetraoxacyclohexane** and **5,6-oxygenated cholestane-1,2,4,5-tetraoxadamantane**.

An exploratory analysis was also performed using reactions with bismuth triflate to prepare the hybrids molecules.

Objetivo

Dada a problemática da resistência dos fármacos no controlo e erradicação à malária o presente trabalho tem como objetivo principal a síntese de fármacos híbridos antimaláricos com núcleo esteroide com uma porção 1,2,4,5-tetraoxoano e com ciclohexanonas a adamantina e a etil-4-oxociclohexanocarxilato, bem como a sua caracterização.

O objetivo último será a avaliação biológica de híbridos preparados.

Índice geral

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstrat	vi
Objetivo	vii
Índice geral	viii
Índice de figuras	x
Índice esquemas	xii
Índice de tabelas	xiii
Abreviaturas utilizadas	xiv
Capítulo I	1
Introdução	2
1.1 - Breve História da Malária	2
1.2 - Epidemiologia da Malária	3
1.2.1 - O Parasita	3
1.2.2 - Ciclo de Vida do <i>Plasmodium</i>	5
1.3 - Manifestações Clínicas e Fatores que Influenciam a Resposta Clínica	7
1.4 - Tratamento	8
1.5 - Problemática da Resistência aos Fármacos	10
1.6 - Esteroides	13
1.6.1 - Oxiesteróis	13
1.7 - Moléculas Híbridas	15
1.7.1 - Classificação das Moléculas Híbridas	16
1.7.2 - Híbridos Antimaláricos	17
Capítulo 2	18
Síntese e caracterização de moléculas híbridas	18
2.1 - Preparação dos intermediários para a síntese de híbridos antimaláricos. Síntese de oxiesteróis	19
2.1.1 - Síntese da 5α-hidroxi-6β-metoxicolestan-3-ona (5)	19
2.2 - Síntese dos Compostos Híbridos 1,2,4,5-tetraoxanos	24
2.2.1 - Síntese de híbridos 1,2,4,5-tetraoxanos com adamantanona	25
2.2.2 - Híbridos com etil - 4 - oxociclohexanocarboxilato	31
2.3 - Novas abordagens para a síntese dos híbridos com possível atividade antimalárica usando como catalisador triflato de bismuto.	36
2.3.1 - 5α-colestano -1,2,4,5-tetraoxa-adamantano	36
Capítulo 3	38

Conclusões	38
Capítulo 4	41
Experimental	41
4.1 - Equipamentos utilizados	42
4.2 - Reagentes utilizados na preparação dos compostos	42
4.3 - Síntese do intermediário	44
4.4 - Síntese de híbridos	46
Bibliografia	49
Anexos	56

Índice de figuras

FIGURA 1- DISTRIBUIÇÃO DA MALÁRIA NO MUNDO E AS DIFERENTES FASES NO CONTROLO, PREVENÇÃO E ELIMINAÇÃO DA MALÁRIA ADAPTADA [3]	3
FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DO PARASITA (ADAPTADO DO CDC).....	6
FIGURA 3 - PADRÃO ATUAL DE TRATAMENTO (DERIVADOS DE ARTEMISININA, COMBINADO COM LUMEFANTRINA OU PIPERAQUINA) E TERAPIAS DE PRIMEIRA LINHA (SULFADOXINA-PIRIMETAMINA E CLOROQUINA) (ADAPTADA BIAMONTE, 2013)..	9
FIGURA 4 - FÁRMACOS PREFERIDOS PARA A ELIMINAÇÃO DE HIPNOZOÍTOS (PRIMAQUINA), COMBINAÇÃO PREFERIDA PARA A PROFILAXIA (ATOVAQUONE-PROGUANILO), E O METABOLITO ATIVO DA PROGUANILO (CICLOGUANIL). (ADAPTADA BIAMONTE, 2013).....	10
FIGURA 5 - ÁREAS DE MULTIRRESISTÊNCIA DO <i>P.FALCIPARUM</i> À CLOROQUINA E PIRIMETAMINA - SULFADOXINA. ADAPTADO DE (WONGSRICHANALAI ET AL, 2002).....	12
FIGURA 6A- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE ANÉIS DO ESTEROIDE. 6B- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO COLESTANO.....	13
FIGURA 7- ESTRUTURA DE UMA TRIOXAQUINA	15
FIGURA 8 - DIFERENTES HIBRIDAÇÕES: A) HÍBRIDO CONJUGADO, B) HÍBRIDO CONJUGADO CLIVAVÉL, C) HÍBRIDO FUNDIDO D) MISTURA HÍBRIDA (ADAPTADA:)..	16
FIGURA 9 - ESPECTRO DE ¹ H RMN DO COMPOSTO 3B.....	21
FIGURA 10 - ESPECTRO DE ¹³ C RMN DO COMPOSTO 3B.....	21
FIGURA 11- ESPECTRO DEPT 135 COM ¹³ C EM RMN DO COMPOSTO 3B.....	22
FIGURA 12 - ESPETRO DE PROTÃO DO 5 α -HIDROXI-6 β -METOXICOLESTAN-3-ONA(5) ..	23
FIGURA 13- ADAMANTANONA (6) E ETIL - 4 - OXOCICLOHEXANOCARBOXILATO (7) ...	24
FIGURA 14 - ESPETRO DE PROTÃO DO 5 α -COLESTANO -1,2,4,5 - TETRAOXA-ADAMANTANO (10).....	27
FIGURA 15 - ESPECTRO DE ¹³ C DO 5- α -COLESTANO -1,2,4,5 - TETRAOXA-ADAMANTANO (10).....	28
FIGURA 16 - ESPETRO DE ¹³ C E DEPT 135 DO 5 α -COLESTANO -1,2,4,5 - TETRAOXA-ADAMANTANO	28
FIGURA 17 - ESPETRO DE PROTÃO DO COMPOSTO 5 α -COLESTANO -1,2,4,5-TETRAOXA-ETILCICLOHEXANOCARBOXILATO(13)	32
FIGURA 18 - ESPETRO DE CARBONO DO 5 α -COLESTANO -1,2,4,5-TETRAOXA-ETILCICLOHEXANOCARBOXILATO (13)	33
FIGURA 19 - ESPECTRO DE ¹³ C E DEPT 135 DO COMPOSTO 5 α -COLESTANO -1,2,4,5-TETRAOXA-ETILCICLOHEXANOCARBOXILATO (13).....	34
FIGURA 20 - ESPECTRO DE ¹ H E ¹³ C EM RMN FORNECIDO PELA SIGMA ALDRICH DO ACETATO DE COLESTEROL.....	57
FIGURA 21 - ESPECTRO DE ¹ H RMN DA ADAMANTANONA	58
FIGURA 22 - ESPECTRO DE ¹³ C RMN DA ADAMANTANONA	58
FIGURA 23 - ESPECTRO DE PROTÃO COMPOSTO ETIL-4-OXOCICLOHEXANOCARBOXILATO.....	59
FIGURA 24 - ESPECTRO DE ¹³ C RMN DO ETIL-4-OXOCICLOHEXANOCABOXILATO	59

FIGURA 25 - ESPECTRO DE ^{13}C E DEPT 135 RMN DO ETIL-4- OXOCICLOHEXANOCARBOXILATO.....	60
FIGURA 26 - ESPECTRO DE ^1H E ^{13}C DE RMN FORNECIDO PELA SIGMA-ALDRICH DA 5 α-COLESTAN-3-ONA.....	61

Índice esquemas

ESQUEMA 1 - SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 5α-HIDROXI-6β-METOXICOLESTAN-3ONA.	19
ESQUEMA 2 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DOS TETRAOXANOS ASSIMÉTRICOS	24
ESQUEMA 3 - SÍNTESE DO 5α- COLESTANO-1,2,4,5-TETRAOXA-ADAMANTANO(10)	26
ESQUEMA 4 - SÍNTESE DO 5α-HIDROXI,6β-METOXICOLESTAN-3-ONA-1,2,4,5-TETRAOXA-ADAMANTANO(12)	30
ESQUEMA 5 - 5α-COLESTANO -1,2,4,5-TETRAOXA-ETILCICLOHEXANOCARBOXILATO (13)	31
ESQUEMA 6 - SÍNTESE DO 5α-HIDROXI,6β-METOXICOLESTAN-3-ONA-1,2,4,5-TETRAOXA-ETILCICLOHEXANOCARBOXILATO (15)	35
ESQUEMA 7 - SÍNTESE DO 5α- COLESTANO -1,2,4,5-TETRAOXA-ADAMANTANO (10)	37

Índice de tabelas

TABELA 1 - FATORES DE QUE DEPENDE A INFEÇÃO PROVOCADA PELA MALÁRIA	8
TABELA 2 - FATORES DETERMINANTES NA RESISTÊNCIA DOS FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS.....	11

Abreviaturas utilizadas

°C - graus centígrados

μl - microlitros

¹³C RMN - ressonância magnética nuclear carbono

¹H RMN - ressonância magnética nuclear próton

aC - antes de cristo

atm - atmosfera

ATC - artemisininas terapias combinadas

Bi (OTf)₃ - Triflato de bismuto

CH₃COOH - ácido acético

(C₂ H₅)₂ O - éter dietílico

CDC - centro de controlo de doenças (centres for disease control and prevention)

CH₂Cl₂ - diclorometano

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

CH₃CN - acetonitrilo

CH₃OH - metanol

CuI - iodeto de cobre

dC - depois de cristo

d - dubleto

DEPT 135 - aprimoramento sem distorção de transferência de polarização (distortionless enhancement of polarisation transfer)

EMA - Agencia Europeia do Medicamento

g - gramas

h - horas

HCl - ácido clorídrico

H₂O₂ - peróxido de hidrogénio

Hz - herz

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

J - constante de acoplamento

MDR - resistência múltipla a drogas

MHz - mega hertz

min - minutos

mmol - milimol

MMPP - monoperoxifitalato de magnésio hexahidratado

NaHCO₃ - bicarbonato de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

Na₂SO₄ - sulfato de sódio anidro

NaOMe - metóxido de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde

P. - *Plasmodium*

ppm - partes por milhão

q - quarteto

R₁R₂ e R₃ - grupos substituintes

Re₂O₇ - óxido de rênio (VII)

RMN - ressonância magnética nuclear

s - singleto

t - tripleto

t.a. - temperatura ambiente

t- BHP - tert-Butil hidroperóxido

tt - triplo tripleto

WHO - World Health Organization

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

Capítulo I

Introdução

Introdução

1.1 - Breve História da Malária

Os primeiros relatos sobre a malária surgiram nos anos 4000 ao 2700 aC., na China, onde os escritos antigos se referem a sintomas agora comumente associadas à malária.

Os primeiros sintomas da malária começaram a ser descritos em textos antigos, por médicos chineses. Os diferentes sintomas característicos da malária foram descritos em 2700 aC no Nei Ching, O Cânone de Medicina, que foi editado pelo imperador Huang Ti. Na Grécia por volta do século IV aC, a malária foi reconhecida e causou o declínio de muita da população da cidade - estado. Hipócrates observou os principais sintomas. Na era de Péricles, a nível literário houve várias referências à malária e ao despovoamento das zonas rurais por esse motivo. No Susruta, um tratado médico em sânscrito, os sintomas da febre da malária foram descritos e atribuídos à picada de certos insetos. Na China, no século II dC, *artemisia annua*, foi descrita num tratado médico que continha 52 remédios, encontrado no Mawangdui Tomb. Nos Estados Unidos, esta planta é conhecida como absinto anual ou doce. No ano 340 dC, as propriedades antifebris de qinghao foram descritas, pela primeira vez, por Ge Hong da Dinastia Yin Médio. [1]

No século XVII, quando os missionários jesuítas espanhóis chegaram ao Novo Mundo, estes aprenderam com as tribos indígenas Indianas a utilizar a casca de qinghao no tratamento de febres. Foi com esta casca, chamada de quinina, que a condessa de Chinchón, esposa do vice-rei do Peru, curou a sua febre. Depois deste acontecimento as árvores receberam o nome de Cinchona. O medicamento feito a partir da casca é agora conhecido como o anti-malárico, quinina. Em 1880 Charles Louis Alphonse Laveran, um cirurgião que estava ao serviço do exército francês, em Constantine, na Argélia, foi o primeiro a notar parasitas ao analisar o sangue de um doente que sofria de malária.

O ingrediente ativo de qinghao, conhecido como artemisina, foi isolado por cientistas chineses em 1971. Derivados deste extrato, conhecidos coletivamente como artemisina, são hoje muito potentes e eficazes, especialmente em combinação com outros medicamentos (ATC).

O tratamento precoce da malária foi inicialmente desenvolvido na China a partir da planta Qinghaosu, que contém o princípio ativo artemisina, que ainda hoje é usado em medicamentos antimaláricos. [2-3]

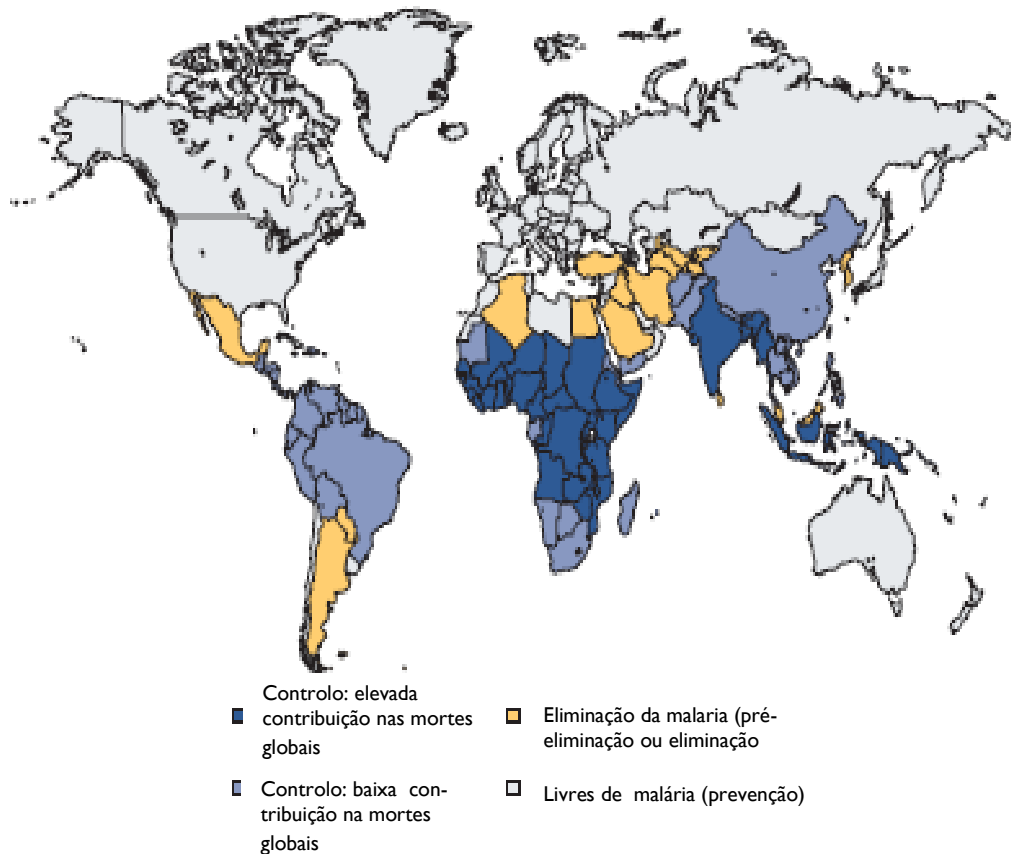


Figura 1- Distribuição da malária no mundo e as diferentes fases no controle, prevenção e eliminação da malária.(Adaptada) [4]

1.2 - Epidemiologia da Malária

A malária ou paludismo é, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um problema de saúde pública e uma das principais causas de morte a nível mundial. Em 2010 houve cerca de 219 milhões de casos de malária que provocaram 660.000 mortes. Cerca de 80 % dos casos e 90 % das mortes ocorrem em África, enquanto os restantes ocorrem, principalmente, no Sudeste da Ásia e nas Regiões do Mediterrâneo Oriental. [5]

1.2.1 - O Parasita

Esta epidemiologia é uma doença infecciosa transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, infetado pelo agente *Plasmodium*. Atualmente são cinco as espécies transmissoras

da malária ao ser humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. [2]

De acordo com a espécie *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, e por *P. malariae* que infeta o hospedeiro, a malária pode apresentar vários tipos de infecções. [6]

Das espécies anteriormente referidas a espécie mais letal é o *Plasmodium falciparum* com especial incidência em África. A infecção por *P. falciparum* é a mais severa, sendo esta espécie a principal causadora de mortalidade e morbidade. Em adultos, causa danos em vários órgãos incluindo falência renal, e em crianças causa debilidade física e/ou psicológica, deficiência respiratória e anemia [7]. A forma mais grave da doença é a malária cerebral, que afeta, principalmente, as crianças causa entorpecimento, coma e morte. [8]

O *P. falciparum* pode levar a estados de malária graves por se multiplicar rapidamente no sangue, e por causar graves perdas de sangue que levam à anemia. Além disso, os parasitas infetados podem obstruir pequenos vasos sanguíneos, o que quando ocorre no cérebro conduz à malária cerebral e ter consequências fatais.

O *P. vivax*, é encontrado, principalmente, na Ásia, América Latina, e em algumas partes da África. Devido à densidade da população, na Ásia, esta espécie é provavelmente a mais prevalente do parasita da malária humana. O parasita *P. vivax* tem uma incrível capacidade de permanecer dormente no fígado do seu hospedeiro numa forma conhecida como a hipnozoita. Os hipnozoitos podem tornar se ativos e invadir o sangue vários meses ou anos após a picada do mosquito infetante, conduzindo a recaídas, isto é, ao reaparecimento dos sintomas da malária que aparentemente estava curada.

P. ovale é encontrado, principalmente, em África (especialmente na África Ocidental) e nas ilhas do Pacífico Ocidental. É biológica e morfológicamente muito semelhante ao *P. vivax*. No entanto, diferentemente do *P. vivax*, ele pode infetar pessoas que são negativas para o grupo sanguíneo Duffy, que é o caso de muitos habitantes da África subsariana (a maioria dos africanos não têm o antígeno do grupo sanguíneo Duffy que é expresso na superfície dos eritrócitos, um recetor necessário para a invasão de *P. vivax* nessas células), o que explica a maior prevalência de *P. ovale* na maior parte do continente Africano. *P. malariae*, encontrado em todo o mundo, é a única espécie do parasita da malária humana

que tem um ciclo quaternário (malaria quartã), por ter picos de febre de 72 em 72 horas. As espécies referidas anteriormente têm um ciclo terciário, (malária terçã) de 48 em 48 horas apresentam picos de febre. Se não for tratada, a *P.malariae* provoca uma infecção de longa duração, crônica, que em alguns casos pode durar uma vida. Em alguns pacientes cronicamente infetados o *P.malariae* pode causar complicações graves, como a síndrome nefrótica.

P.knowlesi é encontrada em todo o Sudeste da Ásia como um patógeno natural de macacos de cauda longa e rabo-de-porco. Foi recentemente mostrado ser uma causa significativa da malária zoonótica nessa região, particularmente na Malásia. *P.knowlesi* tem um ciclo de replicação de 24 horas e por isso pode progredir rapidamente a partir de uma simples infecção para uma infecção grave tendo sido relatados casos fatais. [1,9-10]

1.2.2 - Ciclo de Vida do *Plasmodium*

O ciclo de vida do *Plasmodium* é complexo, uma vez que ocorre em duas fases: a fase sexuada num hospedeiro invertebrado (hospedeiro definitivo) e a assexuada que decorre num hospedeiro vertebrado (hospedeiro intermediário) em duas etapas: uma exo e outra intra-eritrocitária (Figura 2). Na malária humana, o hospedeiro do mosquito fêmea do género *Anopheles* torna-se definitivo. Nos humanos, o parasita cresce e multiplica-se: primeiro nas células do fígado e depois passa para os eritrócitos do sangue. No sangue os descendentes dos parasitas crescem dentro das células destruindo-as para depois invadirem outras células.

É na etapa da corrente sanguínea que os parasitas causam os sintomas de malária. Quando certos tipos de parasitas do sangue ("gametócitos") são captados por um mosquito *Anopheles* fêmea durante a ingestão de sangue, eles começam outro ciclo diferente de crescimento e de multiplicação do mosquito. Oito a dez dias depois surgem como esporozoítos nas glândulas salivares dos mosquitos. Quando o mosquito fêmea pica outro humano, os esporozoítos são injetados e começa outro ciclo de infecção noutra humano. Assim, o mosquito atua como vetor da doença de um ser humano para outro. De forma diferente do hospedeiro humano, o vetor mosquito não sofre a presença de parasitas.

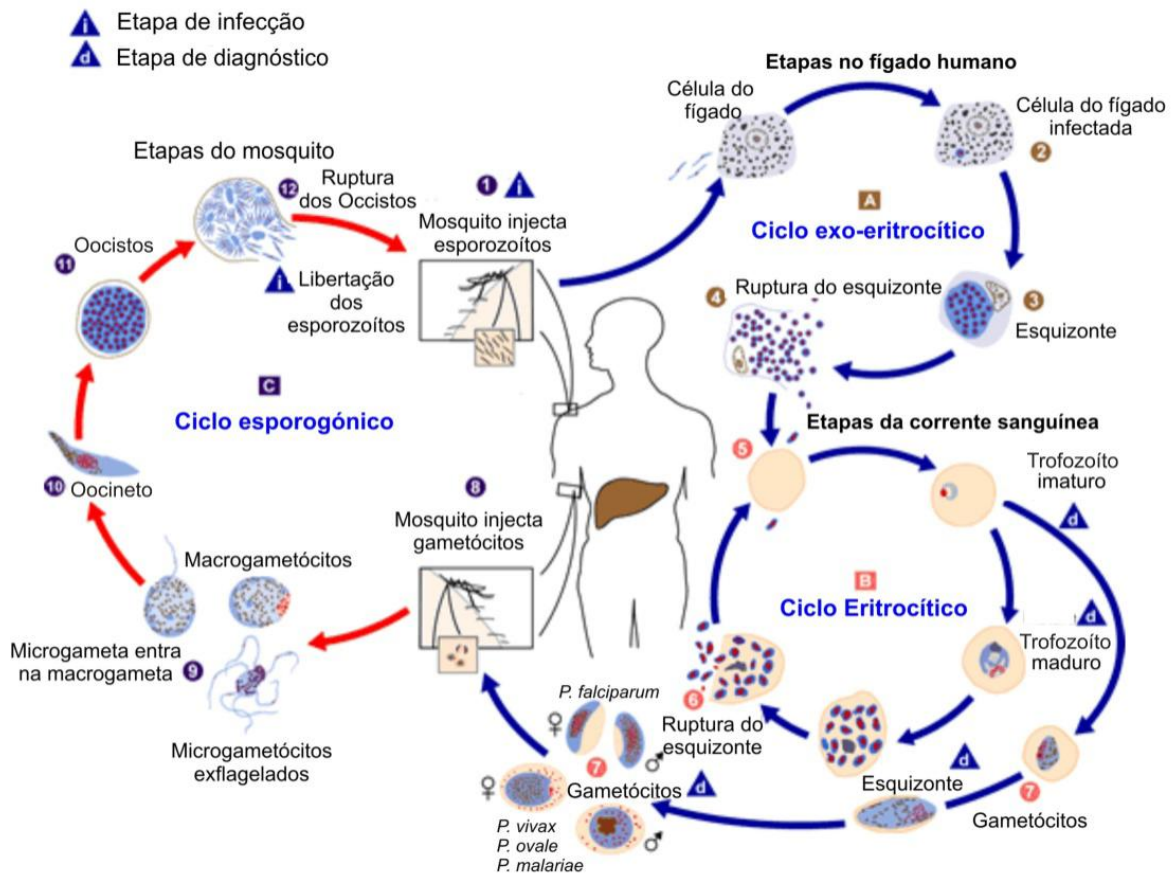


Figura 2 - Ciclo de vida do parasita. (Adaptado do CDC)

O ciclo de vida do parasita da malária envolve dois hospedeiros: durante a picada o mosquito fêmea *Anopheles* infetado com malária inocula esporozoítos no hospedeiro humano (1); após a picada, os esporozoítos infetam as células do fígado (2) e transformam-se em esquizontes (3), rompem as células e libertam os merozoítos (4). Após esta propagação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica A), os parasitas sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica B). Os merozoítos são libertados na corrente sanguínea e infetam as células vermelhas do sangue (5). Os trofozoítos maduros que se encontram na fase de anel evoluem em esquizontes, que se rompem libertando os merozoítos (6). Alguns destes parasitas vão-se diferenciar em fases eritrocitárias sexuais: os gametócitos (7). Os parasitas na fase do sangue são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença.

Os gametócitos, do sexo masculino, microgametócitos, e do sexo feminino, macrogametócitos, são ingeridos pelo mosquito *Anopheles* durante a ingestão de sangue (8).

A multiplicação dos parasitas no mosquito é conhecido como o ciclo do esporogônio (C). Os gametocitos que se encontram no interior do estômago do mosquito libertam-se dos glóbulos vermelhos originando os gametas masculinos e femininos. Os microgâmetas penetram as macrogâmetas gerando os zigotos (9). Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados (oocinetos) (10), invadindo a parede do intestino médio do mosquito onde se desenvolvem em oocistos (11). Os oocistos crescem, rompem e libertam os esporozoítos (12), que fazem o seu caminho para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos (1) em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida da malária. [1,5]

1.3 - Manifestações Clínicas e Fatores que Influenciam a Resposta Clínica

As manifestações clínicas podem ser variadas de acordo com o tipo da infecção. A malária pode começar com sintomas de gripe. Na fase inicial, a infecção por *P. falciparum* é semelhante à infecção por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Pode não se ter sintomas ou os sintomas serem menos graves, quando se é parcialmente imune à malária. [11]

O tempo a partir da infecção inicial da malária até que os sintomas apareçam (período de incubação) varia normalmente entre:

- * 9 a 14 dias para o *P.falciparum*
- * 12 a 18 dias para *P.vivax* e *P.ovale*
- * 18 a 40 dias para *P.malariae*
- * 11 a 12 dias para *P.knowlesi*

Em regiões onde a malária está presente, as pessoas que ficam infetadas podem muitas vezes ter a doença, mas poucas têm os sintomas ou nenhuns. Além disso, como os sintomas da malária são severos podendo variar de acordo com o estado geral de saúde da pessoa; a existência ou não do baço; e do tipo de parasita da malária. Quanto aos sintomas iniciais são idênticos aos de outras infecções causadas por bactérias, vírus ou parasitas. Estes podem incluir: febre, calafrios, dor de cabeça, suores, fadiga, náuseas e vômitos. Outros sintomas comuns da malária incluem: tosse seca (não produtiva), dores musculares ou de costas, ou ambos e aumento do baço. Em casos raros, a malária pode levar a dificuldades de funcionamento do cérebro ou da medula espinal, a convulsões ou perda de consciência. [12]

O diagnóstico da malária é geralmente realizado pela análise microscópica do sangue, onde sob condições ótimas, esta é capaz de detetar 20-50 parasitas por μL de sangue. [13]

A resposta clínica à infecção provocada pela malária depende de fatores relacionados com o parasita, com o hospedeiro e de fatores sócio-geográficos. (Tabela 1) [14]

O PARASITA	O HOSPEDEIRO	SÓCIO GEOGRAFICO
<ul style="list-style-type: none">✓ Resistência ao medicamento✓ Espécies✓ População✓ Capacidade de multiplicação✓ Formação de roseta✓ Antigenicidade✓ Seletividade dos eritrócitos	<ul style="list-style-type: none">✓ Imunidade✓ Estado de saúde✓ Resposta inflamatória✓ Idade✓ Genética✓ Gravidez	<ul style="list-style-type: none">✓ Mudanças climáticas✓ Intensidade de transmissão✓ Acessibilidade ao tratamento✓ Fatores culturais e económicos

Tabela 1- Fatores de que depende a infecção provocada pela malária.

(Adaptada: Weatherall *et al.*, (2002))

1.4 - Tratamento

Os fármacos antimaláricos são utilizados para prevenção e tratamento da malária, sendo que a maioria tem como alvo terapêutico a etapa eritrocitária do ciclo de vida do parasita que corresponde ao período sintomático. A artemisina e seus derivados são dos fármacos mais utilizados no tratamento de primeira linha contra a malária (WHO, 2013) em terapias combinadas (ATC). [14-15]

Artemisinina (1, Esquema 2) e seus derivados (2-4) têm um rápido início de ação, mas são metabolizadas rapidamente (humana $t_{1/2} \sim 1$ h), e, portanto, são combinadas com drogas lentas para matar parasitas residuais. Drogas parceiras típicas incluem lumefantrina (5, humanos $t_{1/2} = 3-4$ dias) e piperaquina (6, humanos $t_{1/2} = 8-16$ dias). A combinação mais popular consiste em comprimidos contendo arteméter (3, 20 mg) e lumefantrina (5, 120 mg), vendido como Coartem™ (Novartis). Em 2011, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou a combinação de dihidroartemisinina (2) e piperaquina (6) que é tomado uma vez por dia durante 3 dias (Eurartesim™, Sigma- Tau). Este tratamento tem superado a sulfadoxina-pirimetamina anteriormente recomendado (7 /8, Fansidar™, Roche), que por sua vez substituiu a cloroquina (9). O artesunato parenteral (4) é a droga utilizada para as situações mais graves da malária. [5]

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

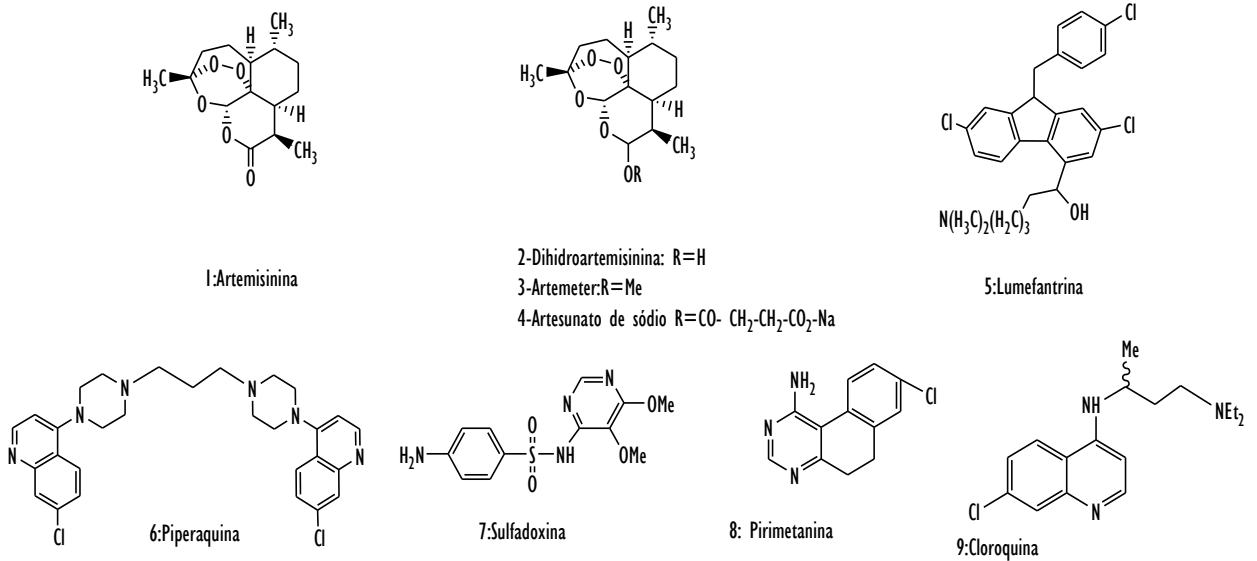


Figura 3 - Padrão atual de tratamento (derivados de artemisinina, combinado com lumefantrina ou piperaquina) e terapias de primeira linha (sulfadoxina-pirimetamina e cloroquina). (Adaptada Biamonte, 2013)

Nas fases de infecção do fígado, a primaquina (10, figura 4) é o único fármaco aprovado para eliminar hipnozoítos. Tal como para o tratamento profilático, a atovaquona- proguanil (11/12) (Malarone, GlaxoSmithKline) é geralmente preferido, por ser bem tolerado, mas é caro. O proguanil é um pró-fármaco, em que o cicloguanil (13) é o metabolito ativo. Para as etapas de transmissão, a primaquina (10) é o único fármaco, registado, ativo contra os gametócitos maduros. [5]

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

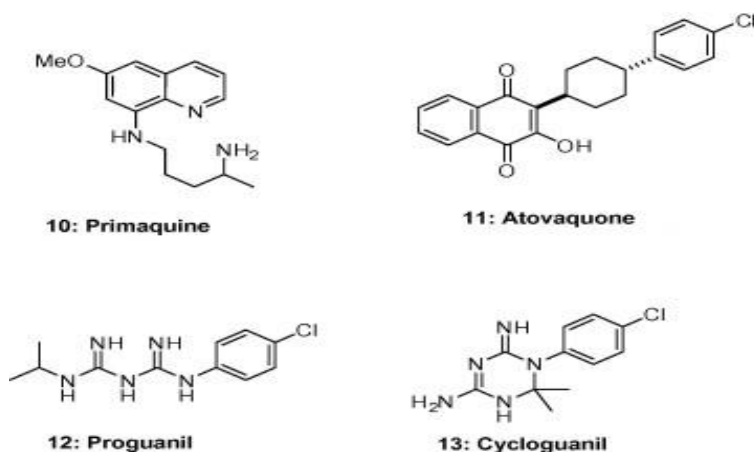


Figura 4 - Fármacos preferidos para a eliminação de hipnozoítos (primaquina), combinação preferida para a profilaxia (atovaquone-proguanilo), e o metabolito ativo da proguanilo (cicloguanil). (Adaptada Biamonte, 2013).

1.5 - Problemática da Resistência aos Fármacos

Diversos fatores têm contribuído para o desenvolvimento e propagação da resistência aos fármacos no combate à malária. Segundo, Wongsrechanali em 2002, são vários os fatores como: a interação do uso padronizado dos fármacos, as características do uso próprio do medicamento, a interação hospedeiro humano, as características do parasita e os fatores vetor ambiente (tabela 2). [16]

Fator	Característica	Exemplo
Fármaco	Tempo de semivida	Resistência a fármacos que têm um tempo de semivida mais curto
	Dose	Uso de fármacos em quantidades sub terapêuticas e administração em massa.
	Não específico	Uso de fármacos sem diagnóstico laboratorial ou com outras indicações terapêuticas
	Farmacocinética	Fórmulas com baixa biodisponibilidade
	Resistência cruzada	Fármacos antimaláricos com antibacterianos
Humano	Imunidade do hospedeiro	Quando existe uma certa imunidade à malária, pode existir cura apesar do facto de haver resistência. Um grave problema com os refugiados que permitem a introdução da malária resistente.
	Manutenção de parasitêmias Residuais	Falência do protocolo terapêutico não detetada
Parasita	Mutações	Mecanismos moleculares de resistência aos antimaláricos
	Nível de transmissão	Risco aumentado de desenvolvimento de resistência tanto ocorrem em zonas de baixa como de elevada transmissão
Vetor e ambiente	Afinidade vetor-parasita	Proliferação de parasitas resistentes

Tabela 2 - Fatores determinantes na resistência dos fármacos antimaláricos.

(Adaptada de Wongsreichanali, em 2002)

A perda de eficácia clínica da cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina, considerados os fármacos de primeira linha pertencentes a classes diferentes estão na base da múltipla resistência aos antimaláricos, o que está a tornar-se um problema emergente, como é possível visualizar através da figura 5 nos países onde se verifica a presença da malária. [16]

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

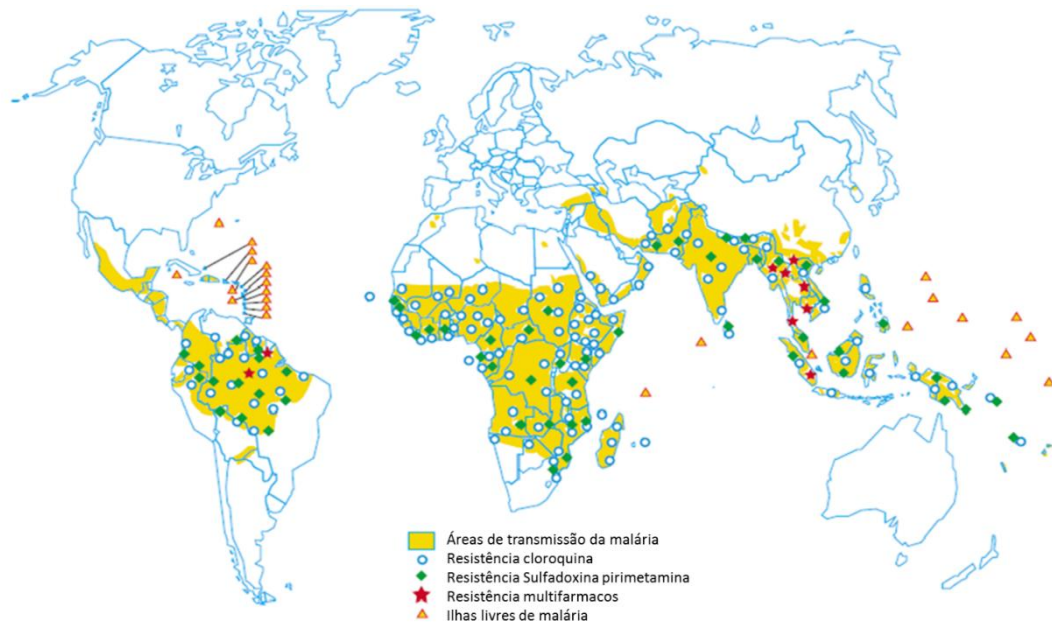


Figura 5 - Áreas de multirresistência do *P.falciparum* à cloroquina e pirimetamina - sulfadoxina. Adaptado de (Wongsrichanalai et al, 2002)

1.6 - Esteroides

Os esteroides são um grupo de lípidos que abrangem um vasto leque de compostos naturais estruturalmente relacionados com importantes funções *in vivo*.

A nível químico os esteroides possuem uma estrutura tetracíclica, com três anéis hexagonais (A, B e C) e um anel pentagonal (D) num total de 17 carbonos. Inúmeros esteroides naturais surgem por modificações que ocorrem em R_1 , R_2 e na cadeia lateral R_3 , e também por diferentes substituições nucleares, grau de insaturação e de diferenças de configuração do núcleo.

Figura 6A. Na Figura 6B encontra-se representado o colestano. [17]

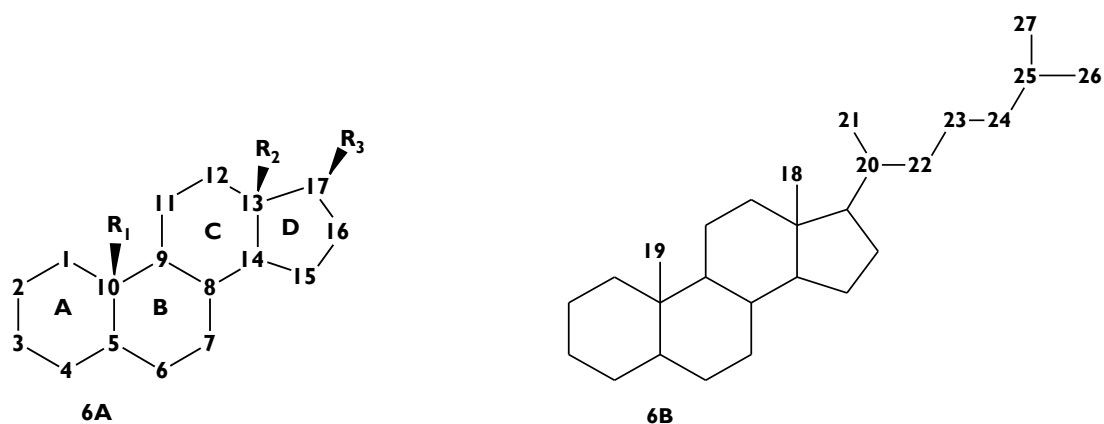


Figura 6A - Representação da Estrutura de Anéis do Esteroide. 6B - Representação da Estrutura do Colestano.

Devido à fusão dos anéis, os esteroides são moléculas estruturalmente rígidas e por isso podem formar estruturas tridimensionais diferentes, de acordo com o tipo de fusão em simultâneo com diferentes pontos quirais.

Muitos dos esteroides biologicamente ativos apresentam uma insaturação no C4 como é o caso na testosterona, progesterona e aldosterona e em C5-6 como é o caso no colesterol e pregnenolona.

Nos últimos anos os esteroides tem disputado grande interesse devido às suas potencialidades como antimaláricos.

1.6.1 - Oxiesteróis

Os oxiesteróis são compostos constituídos por 27 átomos de carbono que resultam da auto oxidação ou oxidação enzimática do colesterol. [18-19] O colesterol é o componente pre-

sente em maior quantidade nas células eucarióticas e constituído por três regiões: uma cadeia lateral hidrocarbonada no C17, uma região de quatro anéis ciclohexanos (A,B,C) e um ciclopentano (D) fundidos originando um ciclopentanoperidrofenantreno com uma insaturação em C5-6 e um grupo hidroxilo no C3. A oxidação pode ocorrer tanto na cadeia lateral como na estrutura dos anéis, segundo Vejux, em 2008. A presença da ligação dupla no anel B entre os carbonos 5,6 pode servir de alvo para o ataque de radicais livres, e por isso, as posições 4,5,6 e 7 são sítios sensíveis para a auto-oxidação. Quando ocorre a auto-oxidação no anel B este torna-se um ótimo líder para a formação do 7- β hidroxicolesterol e do 7-cetocolesterol, os quais constituem bons marcadores na auto-oxidação, do 5 β ,6 β -epoxicolesterol ou do 5 α , 6 α - epoxicolesterol e do colestano-3 β ,5 α ,7 β -triol. [20]

Os oxisterois desempenham diferentes funções consoante a via que seguem. A homeostase do colesterol, a neurogênese, a prenilação ou lipidação de proteínas e do sistema imune são algumas dessas funções. Estes também podem estar associados às doenças neurodegenerativas, importante para a neurogênese no desenvolvimento do cérebro e de doenças inflamatórias. [20] Outra das funções conhecidas destes compostos é servirem como intermediários na biossíntese das hormonas esteroides e dos ácidos biliares. O conhecimento básico dos oxisterois têm contribuído para uma melhor compreensão das patologias associadas e conduzir a novos tratamentos e novos fármacos. [21]

As novas possibilidades para o combate à resistência do tratamento da malária surgiu com o sucesso e a utilidade que os antimaláricos peroxídicos da classe 1,2,4-trioxaciclohexano ou trioxanos, como a artemisina e seus derivados apresentaram. Os 1,2,4,5- tetraoxanos são uma classe de compostos com atividade semelhante à dos antimaláricos derivados de artemisinina e estão a ser investigados devido à sua importante atividade antimalárica. [22]

Diversos estudos com sínteses de tetraoxanos abriram novos horizontes na preparação controlada destes tipos de compostos antimaláricos. Os 1,2,4,5-tetraoxanos são considerados como as estruturas mais simples dos endoperóxidos e por isso a sua síntese pode ser feita através de cetonas cíclicas. [23-24]. Segundo os estudos das equipas de Marti, O'Neil e Kim [25-27] nos seus estudos, tanto os tetraoxanos assimétricos como os simétricos têm sido sintetizados. A funcionalização, tanto por simples diss substituição dos grupos R, bem como a inclusão de funcionalidades espiro mais complicadas, levou a centenas de potenciais candida-

tos que mostram a atividade contra o *P. falciparum* de Malaria. Este tipo de moléculas também tem apresentado baixos níveis de citotoxicidade.

1.7 - Moléculas Híbridas

Desenhar fármacos híbridos, por ligação covalente de dois grupos químicos diferentes com vários efeitos, é uma nova estratégia comum em busca de novos tratamentos para a malária. Nos últimos anos, várias moléculas híbridas, estruturalmente diferentes, foram relatadas para a atividade antimalárica, baseadas no conceito de moléculas híbridas com um duplo modo de ação, como novos antimaláricos chamados de trioxaquinás. Figura 7 [29]

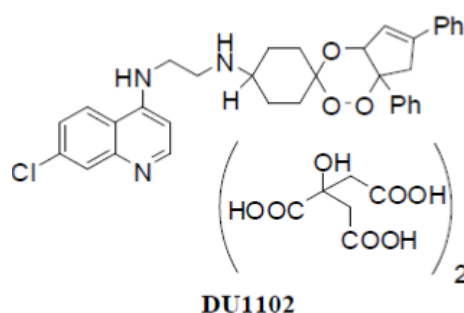


Figura 7- Estrutura de uma Trioxaquina.

(Adaptada de:Shiniha et al, 2010 [29])

Pela abordagem racional na concepção de medicamentos, as moléculas híbridas emergem como uma ferramenta benéfica contra as doenças infecciosas, especialmente contra aquelas que são resistentes ou por possuírem resistência a múltiplas drogas (MDR) [30]. Considerando as diferentes abordagens referentes ao seu desenvolvimento as moléculas híbridas, são definidas como uma entidade química com dois ou mais do que dois domínios estruturais que atuam sobre as mesmas ou diferentes funções biológicas ou em alvos diferentes através de modos de ação diferente. A atividade dupla da molécula híbrida indica que atua como dois farmacóforos distintos dentro do sistema biológico. [29,62-66]

1.7.1 - Classificação das Moléculas Híbridas

De acordo com o tipo de ligação que estabelecem os dois farmacóforos, as moléculas híbridas podem ser classificadas da seguinte forma (figura 8):

- A. Híbridos conjugados - moléculas em que ambos os farmacóforos são unidos através de um ligante metabolicamente estável, que não é parte de um dos farmacóforos individuais. [30-31]
- B. Híbridos conjugados cliváveis - moléculas ligadas através de um ligante concebido para ser metabolizado no interior do sistema biológico para libertar as duas unidades farmacofóricas que interagem de forma independente com alvos diferentes. [32]
- C. Híbridos fundidos - moléculas em que o tamanho do ligante é diminuto ou removido de tal modo que a estrutura dos farmacóforos ficam em contacto. [33]
- D. Híbridos combinados - têm as suas estruturas fundidas, aproveitando o farmacóforo comum nas estruturas dos compostos de partida, o que dá origem a moléculas menores e mais simples. [33-34]

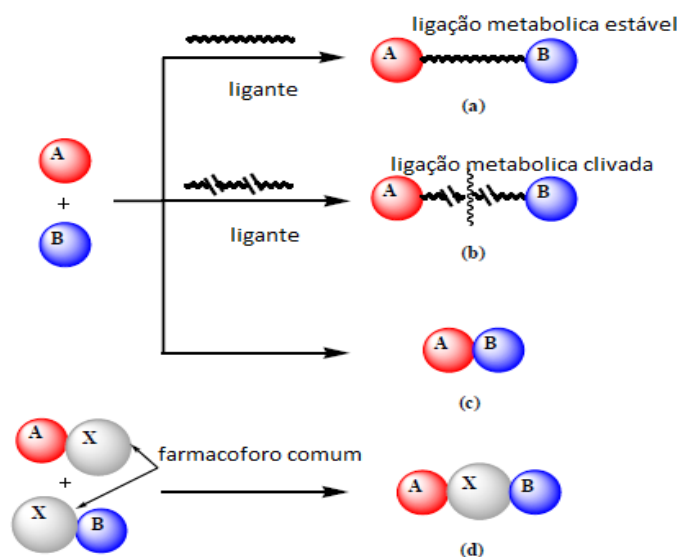


Figura 8 - Diferentes hibridações: a) Híbrido conjugado, b) Híbrido conjugado clivável, c) Híbrido fundido d) Mistura híbrida. (Adaptada de:Shiniha et al, 2010 [29])

I.7.2 - Híbridos Antimaláricos

Nos últimos anos o desenvolvimento de moléculas híbridas tem disputado interesse devido à eficácia e baixa toxicidade que reportam. Outro fator é o baixo risco de interação com outros fármacos. [35]

Uma característica comum na maioria dos híbridos antimaláricos é a presença de um anel endoperóxidos que lhe confere a atividade antimalárica. [36-38,67-72]

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

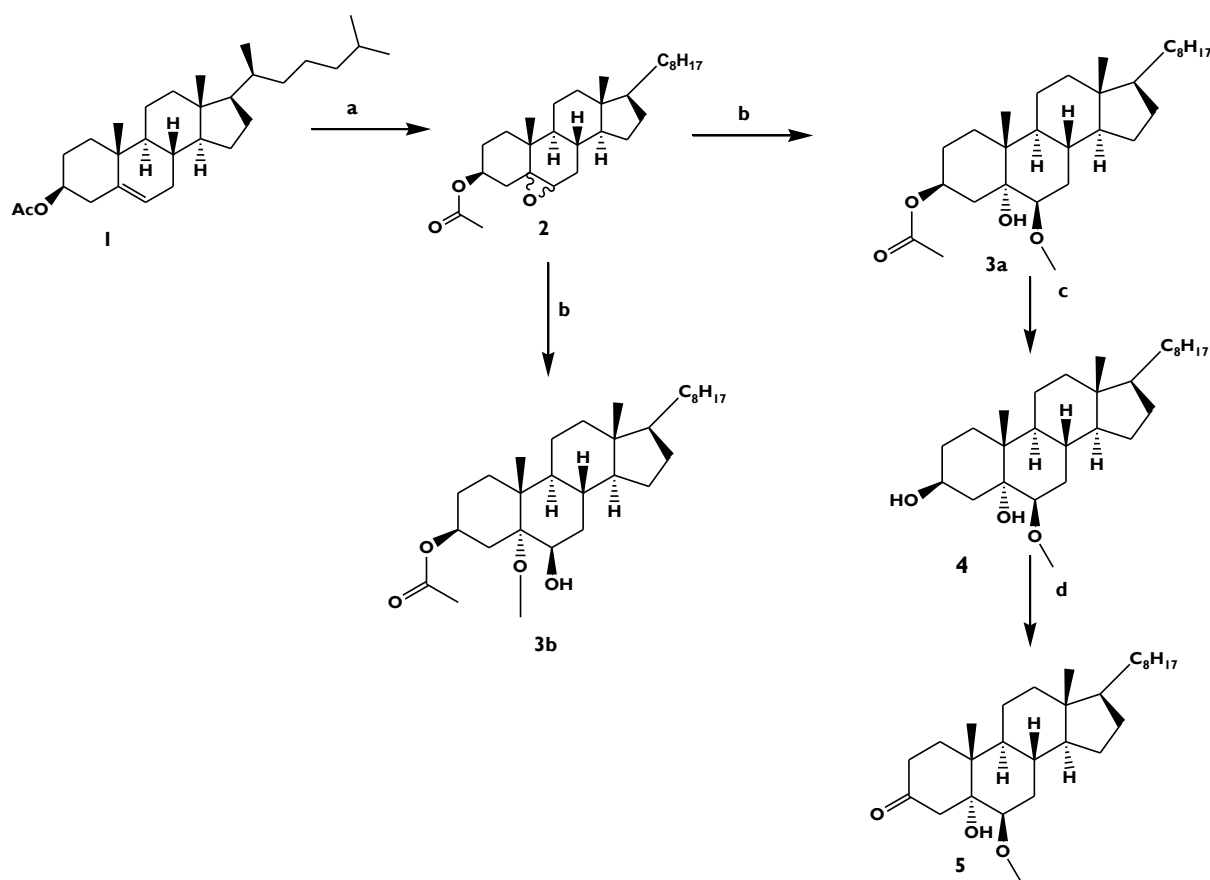
Capítulo 2

Síntese e caracterização de moléculas híbridas

2.1- Preparação dos intermediários para a síntese de híbridos antimaláricos. Síntese de oxiesteroides

2.1.1- Síntese da 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona (5)

A síntese deste intermediário envolveu quatro reações: epoxidação (2), abertura do epóxido (3a+3b), hidrólise (4) e oxidação de Jones (5).



Esquema I - Síntese do intermediário 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3ona.

Condições das reações: a) MMPP, CH₃CN, 36 min, t.r.; b) Bi (OTf₃), MeOH, t.a, 1h45, FCC (éter de petróleo / acetato de etilo 15:1); c) EtOH, CH₂Cl₂, NaOH (10%), t.a.2h; d) acetona seca, reagente de Jones, metanol.

A reação de epoxidação do acetato de colesterol conduziu à formação do composto acetato 5,6 epoxicolestan-3-il (**2**). Na síntese deste intermediário é utilizado o monoperóxifalato de magnésio hexahidratado (MMPP) como agente oxidante, por ser relativamente estável barato e comercialmente viável, numa suspensão de acetonitrilo à temperatura de refluxo (t.r.) [39-40]. Ao produto desta reação foi feita a abertura do epóxido (**2**), onde foi usado como catalisador o triflato de bismuto $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ obtendo-se dois isómeros que foram separados por uma coluna de cromatografia rápida utilizando como solventes de extração (éter de petróleo /acetato de etilo). No composto (**3a**) obtido foi realizada uma hidrólise alcalina com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% em etanol (EtOH) ediclorometano (CH_2Cl_2). O composto (**3b**) foi sujeito a cristalização em etanol e determinado o seu ponto de fusão. Após a hidrólise do composto (**3a**) obteve-se o composto (**4**) que foi sujeito à oxidação de Jones pelo reagente de Jones tendo como resultado a formação do intermediário 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona (**5**). O composto (**4**) foi dissolvido em acetona seca de seguida é adicionado o reagente Jones. Este tipo de oxidações são realizadas à temperatura de 0°C devido a ser uma reação exotérmica. Esta reação é caracterizada pelas mudanças de cor devido aos diferentes estados de oxidação do crómio. O composto (**5**) foi obtido após extração com éter dietílico. (Esquema I)

Análise espectroscópica do composto (**3b**)

Para composto **3b** no espectro de próton é, visível o sinal de um singuleto a 2.02 ppm correspondente ao 3 β - CH_3OCO e a 3.21 ppm o sinal do 5 α - OCH_3 . Outro sinal bem visível é observado a 3.88 ppm que corresponde ao 6 α -H que no composto 3a aparece a 2.94 ppm. Outra característica também visível a existência de um triplo tripleto a 4.87 ppm do 3 α -H.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

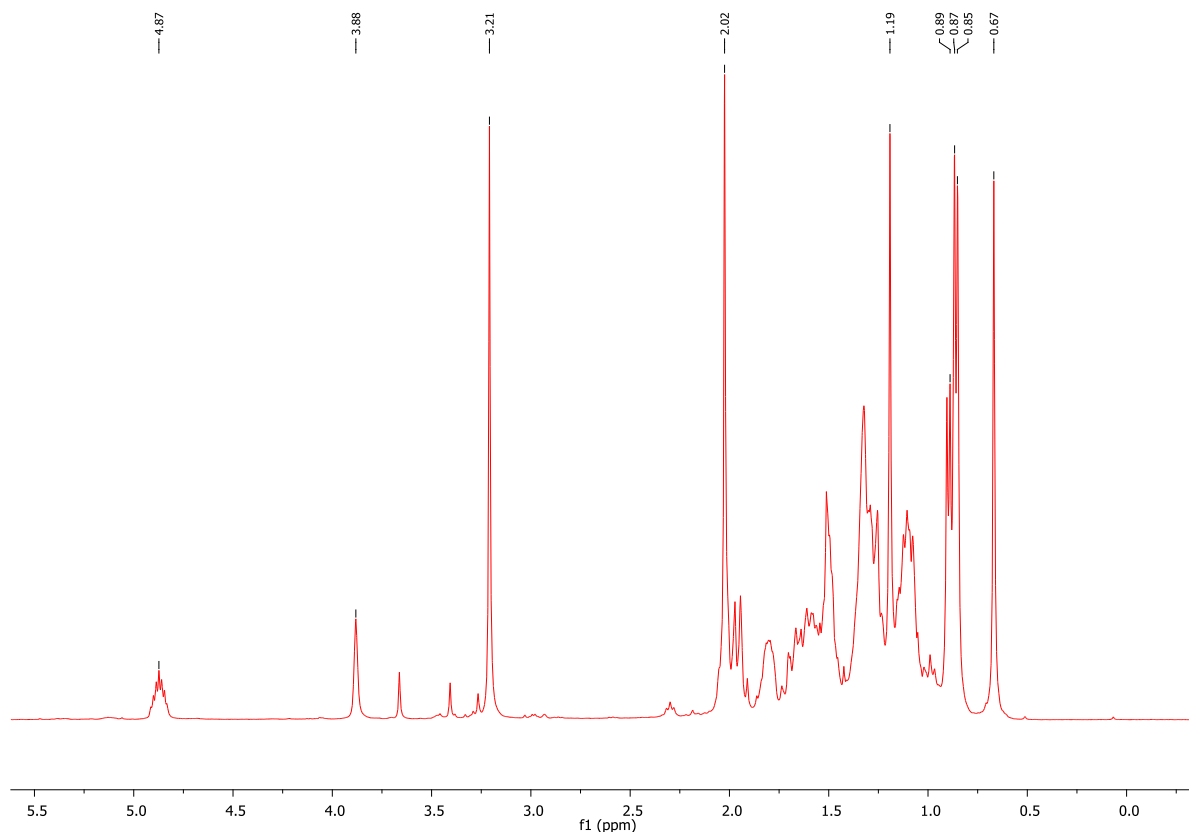


Figura 9 - Espectro de ^1H RMN do composto 3b.

Na análise dos espectros de carbono e Dept 135 é possível identificar a 170.98 ppm o sinal correspondente ao (CH_3COO) e a 78.79 ppm o sinal correspondente ao carbono (C5).

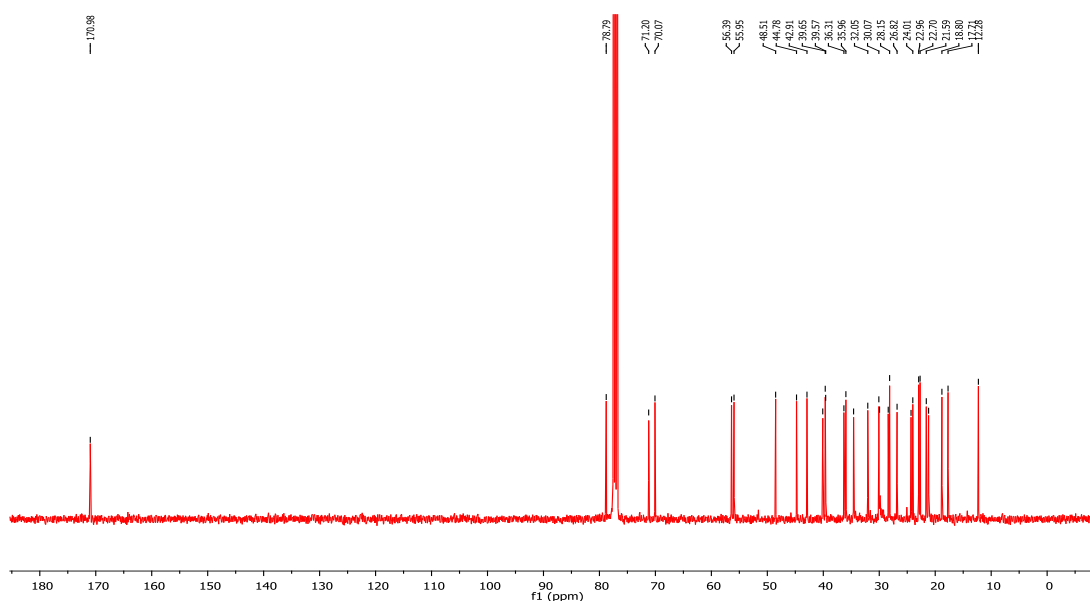


Figura 10 - Espectro de ^{13}C RMN do composto 3b.

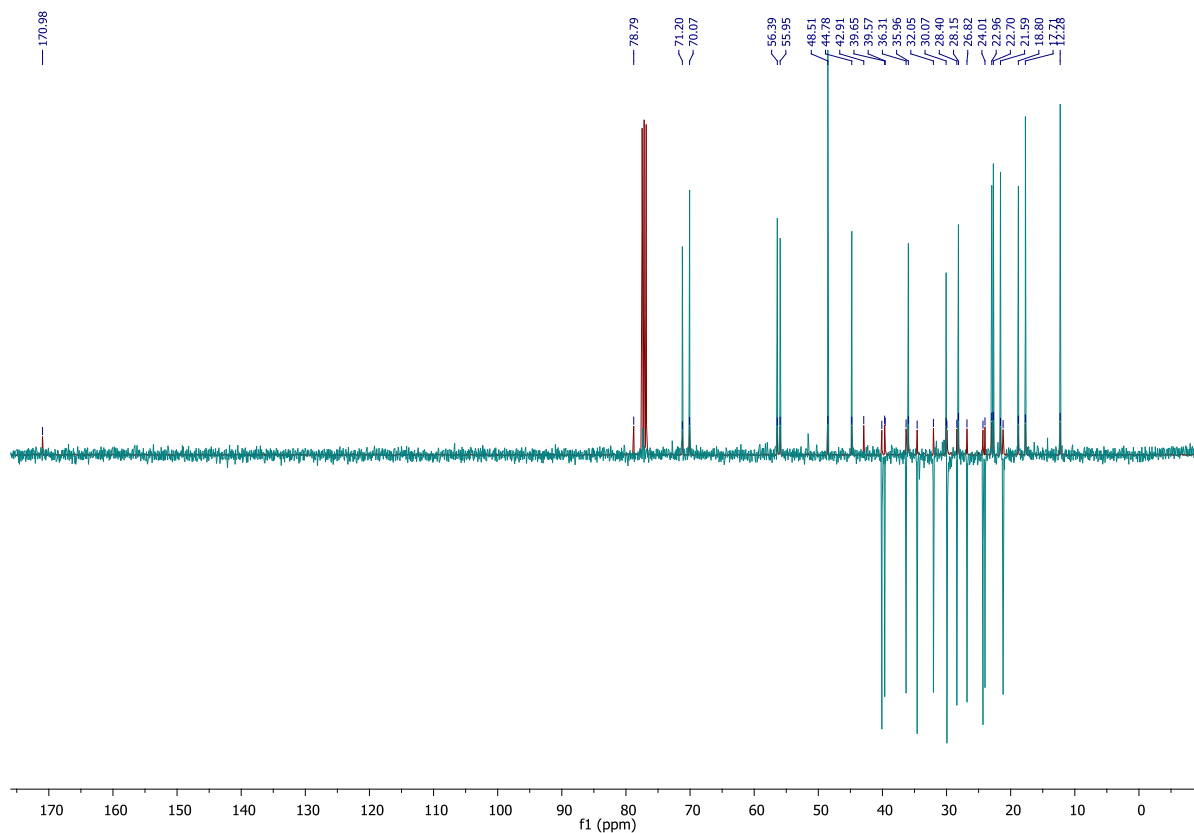


Figura 11- Espectro Dept 135 com ¹³C em RMN do composto 3b.

Análise espectroscópica do composto 5

Todas as reações acima descritas foram controladas por TLC sendo que o composto 5 é mais polar que o acetato de colesterol (composto I). Foi também realizada a análise elementar que comprovou que ser o composto (5).

Na análise do espectro de próton do composto (5) é visível a 2.92 ppm a existência de um tripleto correspondente 6- α -H e a 3.27 ppm um singlete correspondente ao 6- β -OCH₃.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

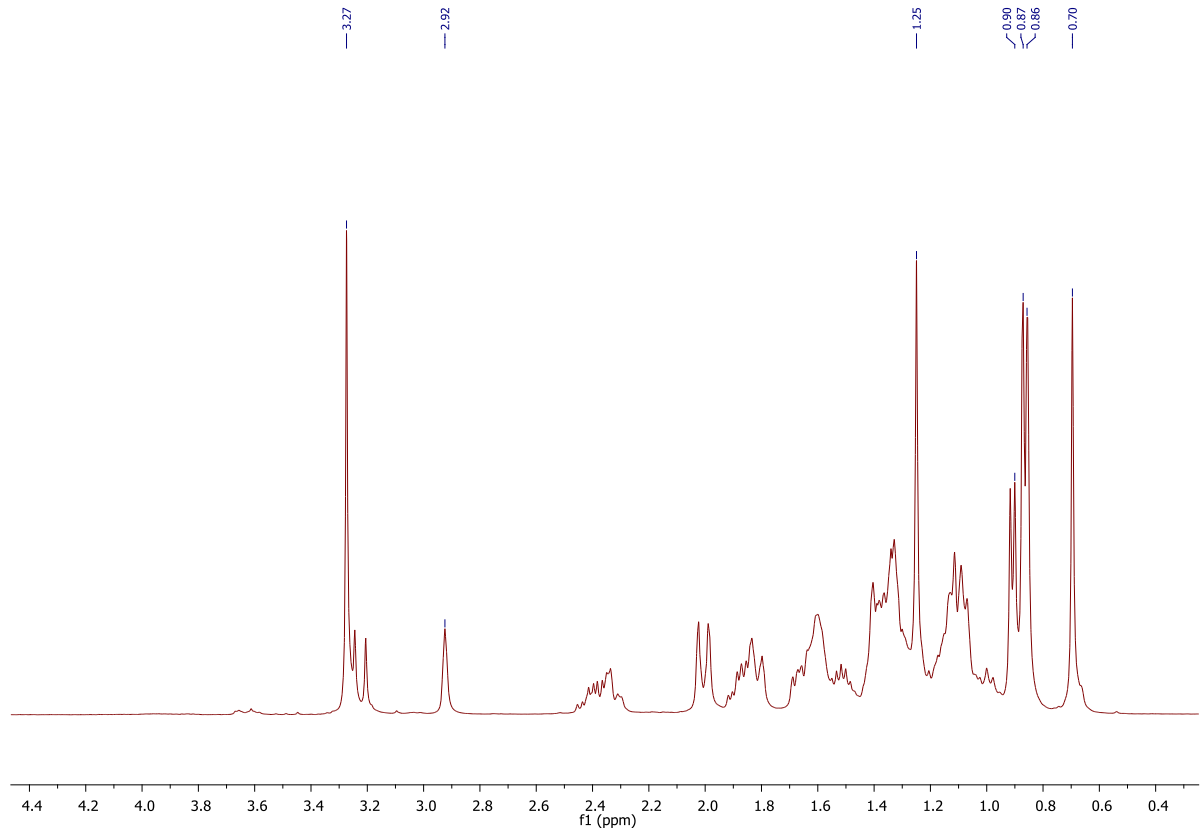


Figura 12 - Espectro de próton do composto 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona (5).

2.2 - Síntese dos Compostos Híbridos 1,2,4,5-tetraoxanos

A ligação endoperóxido na artemisinina e os seus derivados tem sido identificada como um farmacóforo essencial das atividades antimaláricas destas moléculas, e isto conduziu a subsequente interesse no desenvolvimento de uma variedade de moléculas contendo peróxido, em particular, 1,2,4,5-tetraoxanos e 1,2,4-trioxanos. Este tipo de compostos podem potencialmente contornar os problemas associados a biodisponibilidade e altos custos associados com a artemisina e seus derivados. [27-30,42-45]

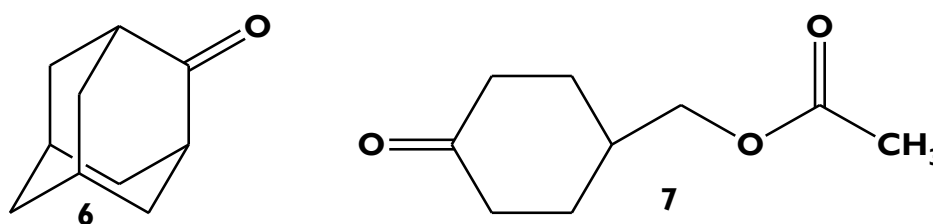
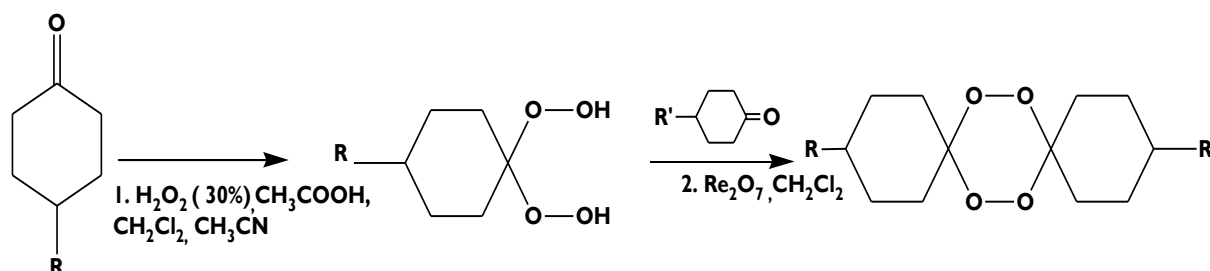


Figura 13 - Adamantanona (6) e etil-4-oxociclohexanocarboxilato (7).

Neste trabalho para a síntese de compostos com anéis tetraoxanos são usadas cicloalcanonas, a adamantanona (6) ou o etil-4-oxociclohexanocarboxilato (7) em conjunto com dois esteroides a 5 α -colestan-3-ona (8) ou a 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona (5).

A adamantanona tem sido um composto muito utilizado que segundo O Neill et al. em 2010 concluíram que a inclusão de um grupo adamantano num sistema de diespiro-1,2,4,5-tetraoxano pode gerar moléculas com melhor atividade antimalárica. A formação deste tipo de compostos ocorre em duas fases conforme se pode ver no esquema 2.



Esquema 2 - Mecanismo de Formação dos Tetraoxanos Assimétricos.

(Adaptada: tetraoxanes as antimalarials: harnessing the endoperoxides).

Numa primeira etapa ocorre a formação de um di-hidroperóxido por adição de peróxido de hidrogénio a 30% (H_2O_2), ácido acético glacial (CH_3COOH) e acetonitrilo (CH_3CN) a uma cetona.

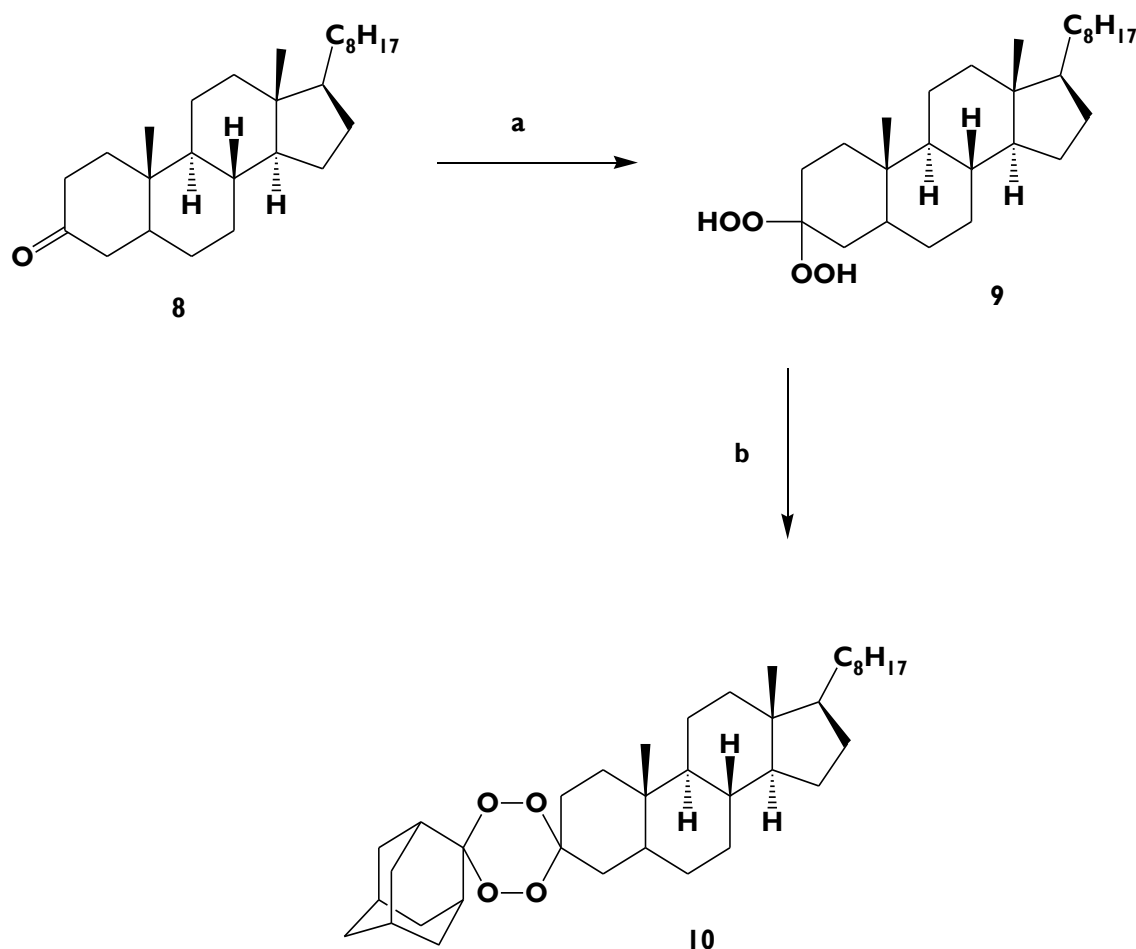
Numa segunda etapa ao di-hidroperóxido formado vai se adicionar um segundo composto carbonílico, uma segunda cetona ou um aldeído. Nesta reação é utilizado o óxido de rênio VII (Re_2O_7) que segundo os estudos de Ghorai e Dussault em 2008 [45], concluíram que, Re_2O_7 em CH_2Cl_2 oferece um catalisador eficaz para a condensação de grupos carbonilo com 1,1-di-hidroperóxidos para formar 1,2,4,5-Tetraoxanos.

2.2.1 - Síntese de híbridos 1,2,4,5-tetraoxanos com adamantanona

2.2.1.1- 5 α -Colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano (com formação prévia do di-hidroperóxido da 5 α -colestano-3-ona)

Nesta reação o di-hidroperóxido é preparado na 5 α -colestano-3-ona (**8**) comercialmente disponível. Inicialmente a 5 α -colestano-3-ona foi dissolvida numa mistura de CH_2Cl_2 : CH_3CN . De seguida foi adicionado a 0°C o ácido acético glacial. Por fim foi adicionado o peróxido de hidrogénio e deixou-se a reação decorrer durante 45h54 min à t.a. sobre agitação. Esta reação foi parada por adição de CH_2Cl_2 , H_2O_2 e água destilada. A fase orgânica foi extraída, lavada e evaporada, tendo-se obtido o di-hidroperóxido (**9**), ao qual foi adicionada a adamantanona (**6**) e CH_2Cl_2 seco e de seguida o Re_2O_7 . Deixou-se a reação decorrer durante 1h sobre atmosfera inerte. Ao final deste tempo a reação foi parada, filtrada num “plug” de sílica para remoção do rênio e evaporada. Por fim o produto foi purificado por uma FCC com éter de petróleo / acetato de etilo tendo-se obtido o composto 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano (**10**).

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.



Esquema 3 - Síntese do 5α-colestan-1,2,4,5- tetraoxa-adamantano.

Condições das reações a: 5α-colestan-3-ona em CH₂Cl₂, CH₃CN, CH₃COOH e H₂O₂ (30%) à t.a. b: adamantanona (6), CH₂Cl₂ seco e Re₂O₇ em atm azoto

Análise espectroscópica do composto (10)

A análise do espectro de próton (¹H) revelou a existência de esteroide. A existência de prótons singletos é visível neste espectro, um a 0.64 ppm correspondente ao 18-C e outro singlete a 0.81 correspondente ao 19-C e, a existência de três dubletos dois a 0.85 e 0.87 ppm com um J=6.5Hz, referentes aos carbonos 26-CH₃ e 27 CH₃ J= 6.7Hz e 0.89 ppm referente ao 21- CH₃ com um J=6.6Hz.

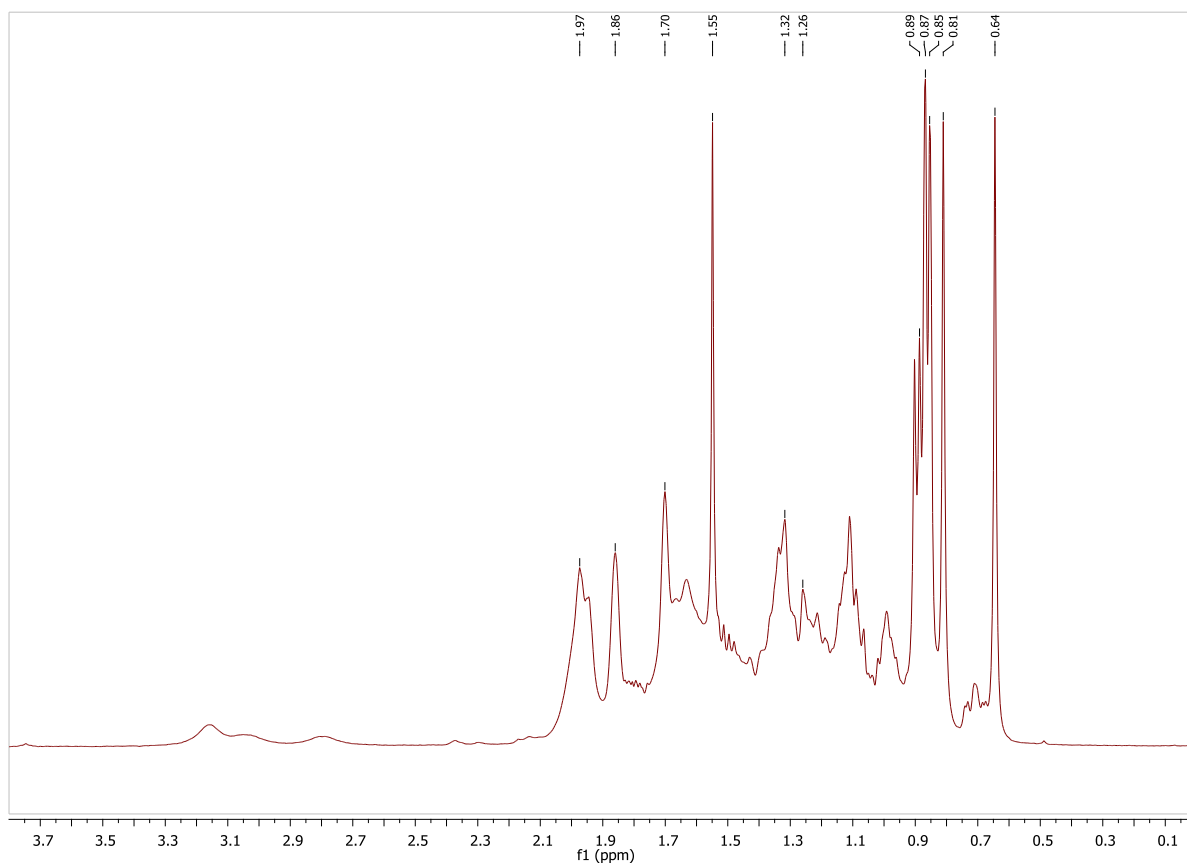


Figura 14 - Espectro de próton do 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano. (10)

Análise do espectro de carbono e Dept 135 do composto (10)

Neste espectro é visível a presença do sinal relativo ao 19-C a 11.56 ppm no lado direito. Também foi possível a identificação dos carbonos quaternários OO-C3-OO a 108.55 ppm e OO-C1'-OO a 110.44 ppm que vem confirmar a presença do grupo tetraoxano.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

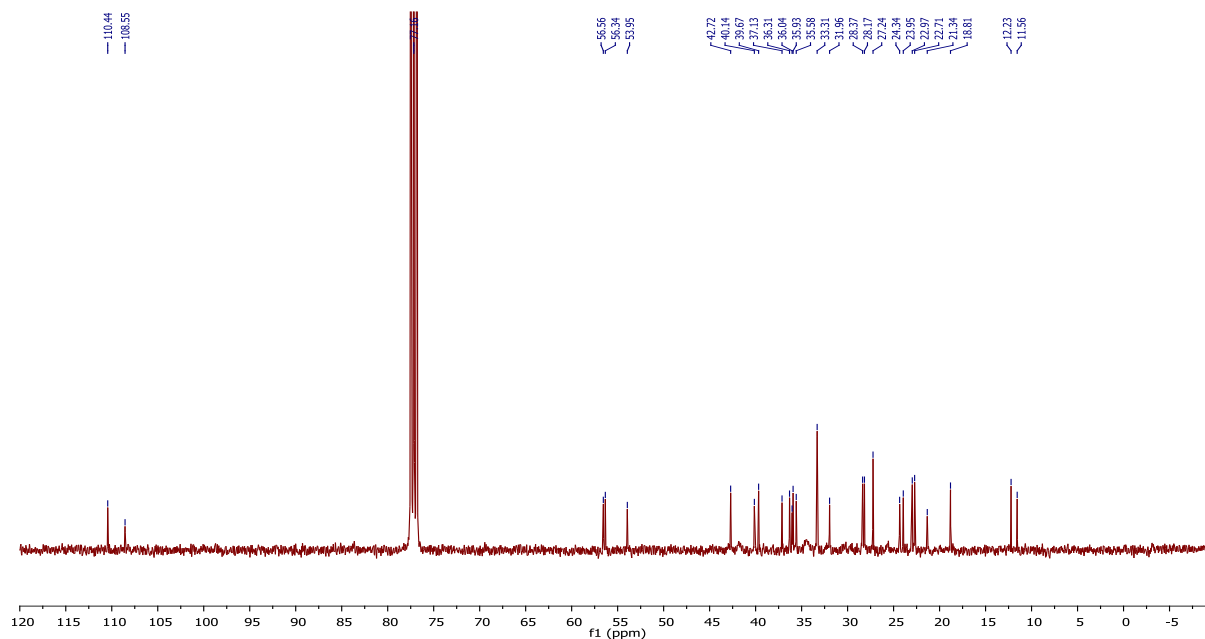


Figura 15 - Espectro de ^{13}C do 5α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano. (10)

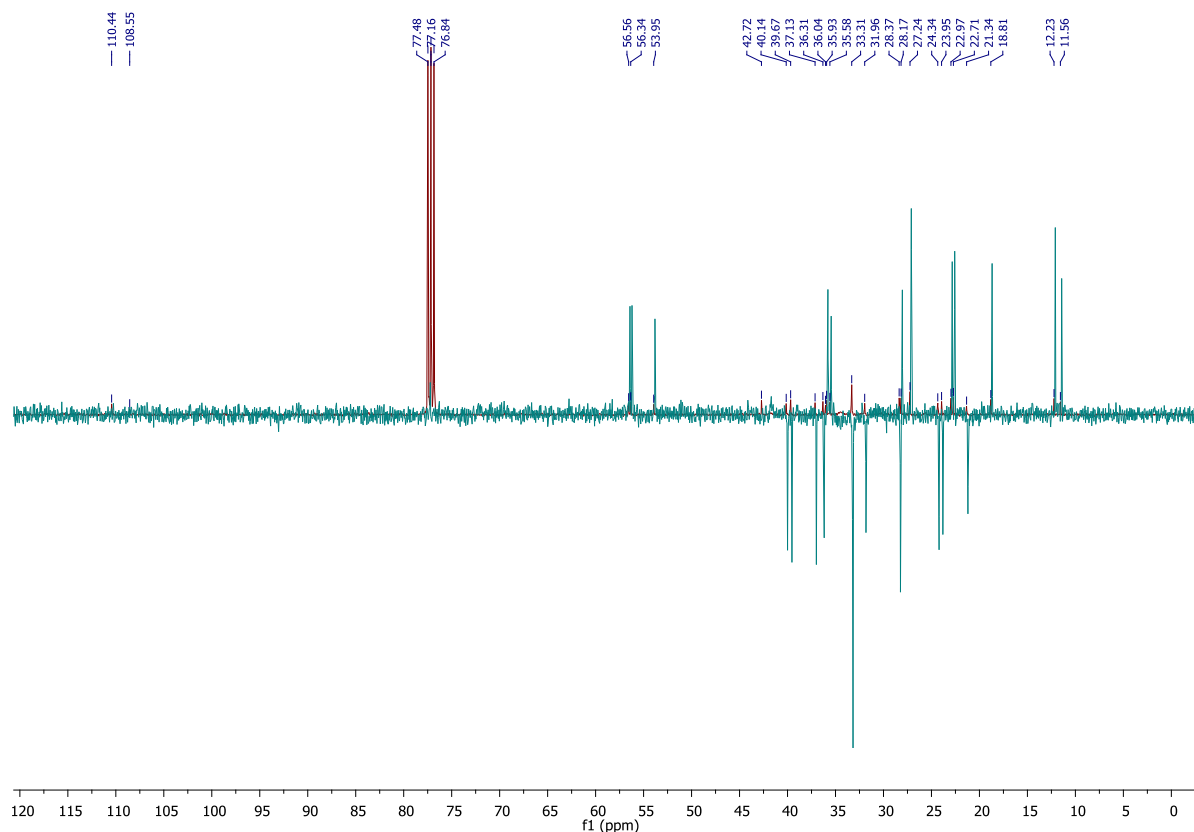


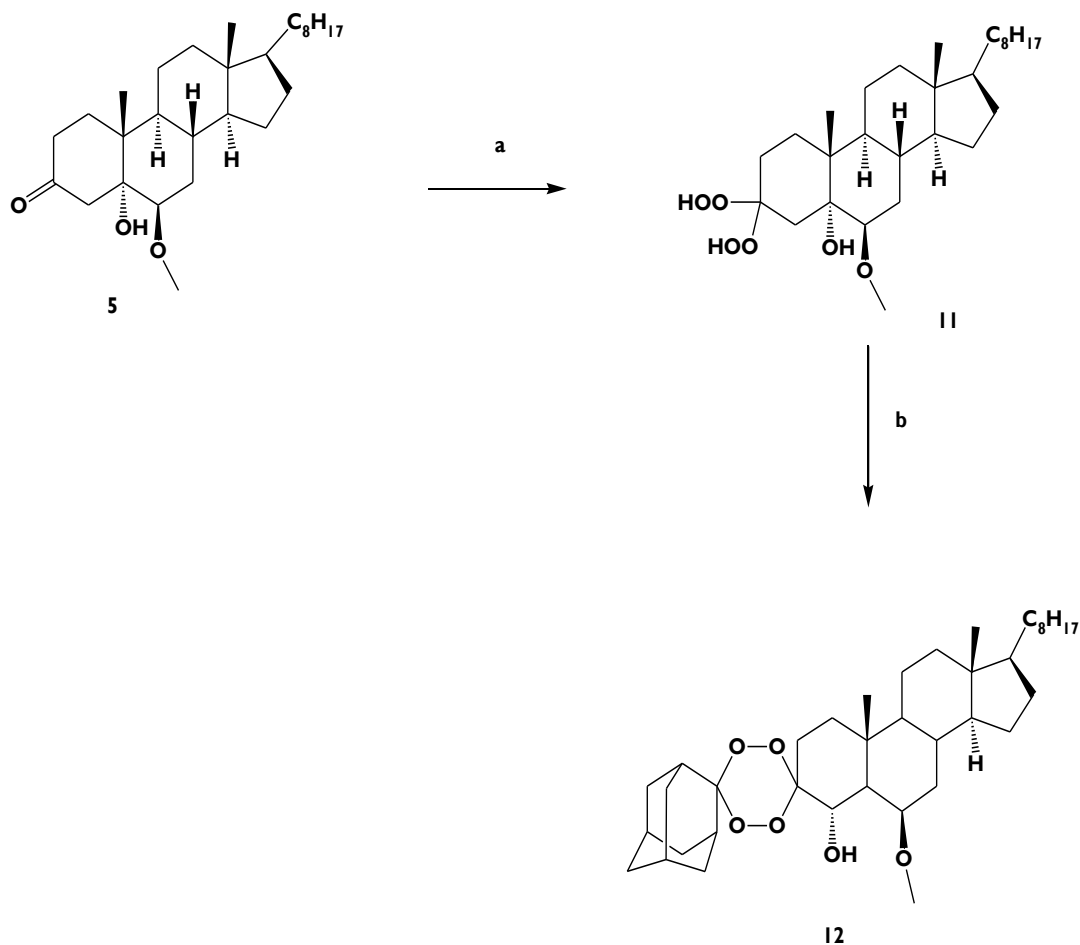
Figura 16 - Espectro de ^{13}C e Dept 135 do 5α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano.(10)

2.2.1.2 - 5 α -hidroxi,6 β -metoxicolestan-3-ona-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano (com formação prévia do di-hidroperóxido da 5 α -hidroxi,6 β -metoxicolestanona)

Nesta reação optou-se por fazer o di-hidroperóxido no intermediário 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona (**5**), por ter sido uma reação anteriormente estudada e produzir bons rendimentos.

O intermediário 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona (**5**) foi dissolvido numa mistura de CH₂Cl₂:CH₃CN à t.a., de seguida foi adicionado ácido acético glacial à temperatura de 0°C e posteriormente foi adicionado H₂O₂ (30%) com adições diárias de H₂O₂ e deixou-se a reação decorrer durante uma semana. Após este tempo a reação foi parada e realizou-se o *work-up* descrito anteriormente. Ao di-hidroperóxido (**11**) formado foi adicionado a adamantanona (**6**) e CH₂Cl₂ seco e de seguida o Re₂O₇. A reação foi mantida em atmosfera inerte durante 2 horas. Ao final deste tempo foi adicionado mais CH₂Cl₂ seco e a solução foi filtrada através “plug” de sílica e evaporada. Posteriormente foi realizado uma FCC com éter de petróleo acetato de etilo para isolamento do produto obtido (**12**).

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.



Esquema 4 - Síntese do 5 α -Hidroxi,6 β -metoxicolestan-3-ona-1,2,4,5-tetraoxaadamantano. (12)

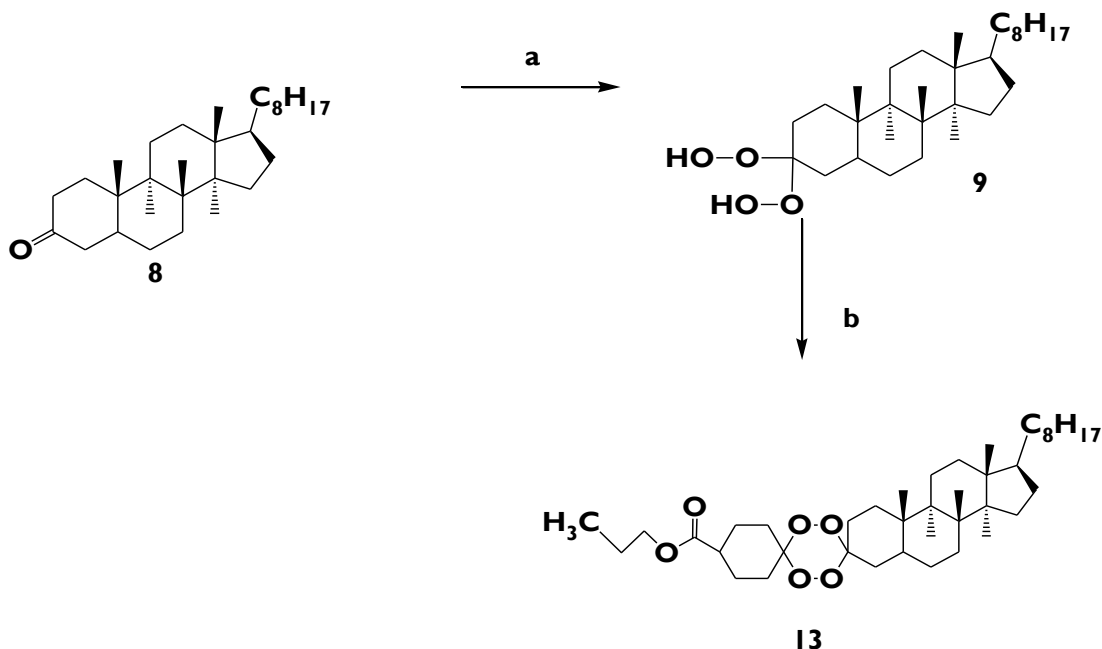
Condições das reações: a) 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestan-3-ona (5) em CH₂Cl₂, CH₃CN, CH₃COOH e H₂O₂ à t.a.; b) adamantanona (6), CH₂Cl₂ seco e Re₂O₇ em atm azoto.

A análise espectro de próton revelou que ocorreu reversibilidade da reação havendo formação do composto **(5)**.

2.2.2 - Híbridos com etil-4-oxociclohexanocarboxilato

2.2.2.1- 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato (com formação prévia do di-hidroperóxido da 5 α -colestano-3-ona)

Tal como na reação com adamantanona a síntese deste composto começa pela formação do di-hidroperóxido na 5 α -colestano-3-ona. Começou por se dissolver a 5 α -colestano-3-ona (**8**) numa mistura de CH₂Cl₂:CH₃CN à t.a., de seguida foi adicionado ácido acético glacial à temperatura de 0°C e posteriormente foi adicionado H₂O₂ (30%) com adições diárias de H₂O₂ e deixou-se a reação decorrer durante uma semana. A reação foi parada por adição de H₂O₂ (30%) e H₂O destilada. Realizou-se um *work-up* seguido de evaporação para retirar o excesso de CH₂Cl₂ para obtenção do di-hidroperóxido. De seguida, ao di-hidroperóxido adicionou-se o etil-4-oxociclohexanocarboxilato (**7**), o CH₂Cl₂ seco e de seguida o Re₂O₇ e deixou-se a reação decorrer em atmosfera inerte durante 2 horas. Após este tempo foi realizada uma filtração num “plug” de sílica. Posteriormente foi feita uma FCC com éter de petróleo: acetato de etilo para obtenção do produto purificado (**13**).



Esquema 5 - 5 α -Colestano-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato. (**13**)

Condições das reações: a) 5- α -colestano-3-ona em CH₂Cl₂, CH₃CN, CH₃COOH e H₂O₂ à t.a.
b) etil-4-oxociclohexanocarboxilato, CH₂Cl₂ seco e Re₂O₇ em atm azoto.

Análise espectroscópica do composto (13)

No espectro de próton do composto (13) é possível verificar semelhanças com o espectro de próton do composto colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantonona dos 0.64 ppm até aos 1.20 ppm, onde a 1.24 ppm ocorre a primeira alteração na qual se verifica a existência de um tripleto e a outra alteração que se verifica é a existência de um quarteto a 4.11 ppm. Estes dois sinais dizem respeito ao grupo $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOC}$. A posição do C-19 também sofre alteração quando comparado com o espectro de próton da 5- α -colestano-3-ona que passa da posição 1.00 ppm para a posição 0.81 ppm (anexo IV).

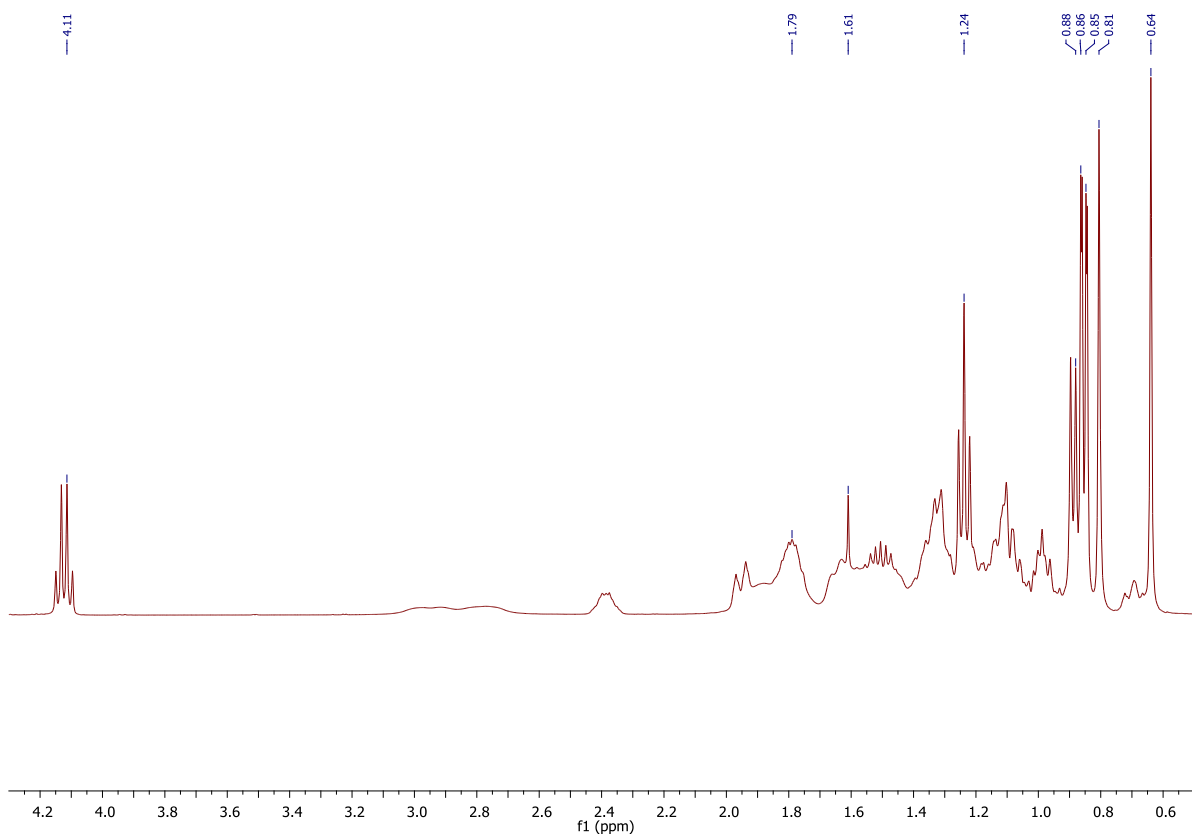


Figura 17 - Espectro de próton do composto 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato. (13)

Análise do espectro de carbono e Dept 135 do composto (13)

No espectro de carbono é possível ver que ocorreu formação de um tetraoxanos entre os dois compostos, o etil 4-oxociclohexanocarboxilato e a 5 α -colestano-3-ona de vido ao aparecimento de dois sinais a 107.47 e 108.93ppm que dizem respeito aos carbonos quaternários OO-C3-OO e OO-C1'-OO.

Outra ligação que também é possível visualizar facilmente é a ligação dupla entre C=O, a 174.76 ppm que não sofreu alteração de posição quando comparamos com o espectro de carbono do etil-4-oxociclohexanocarboxilato (anexo III).

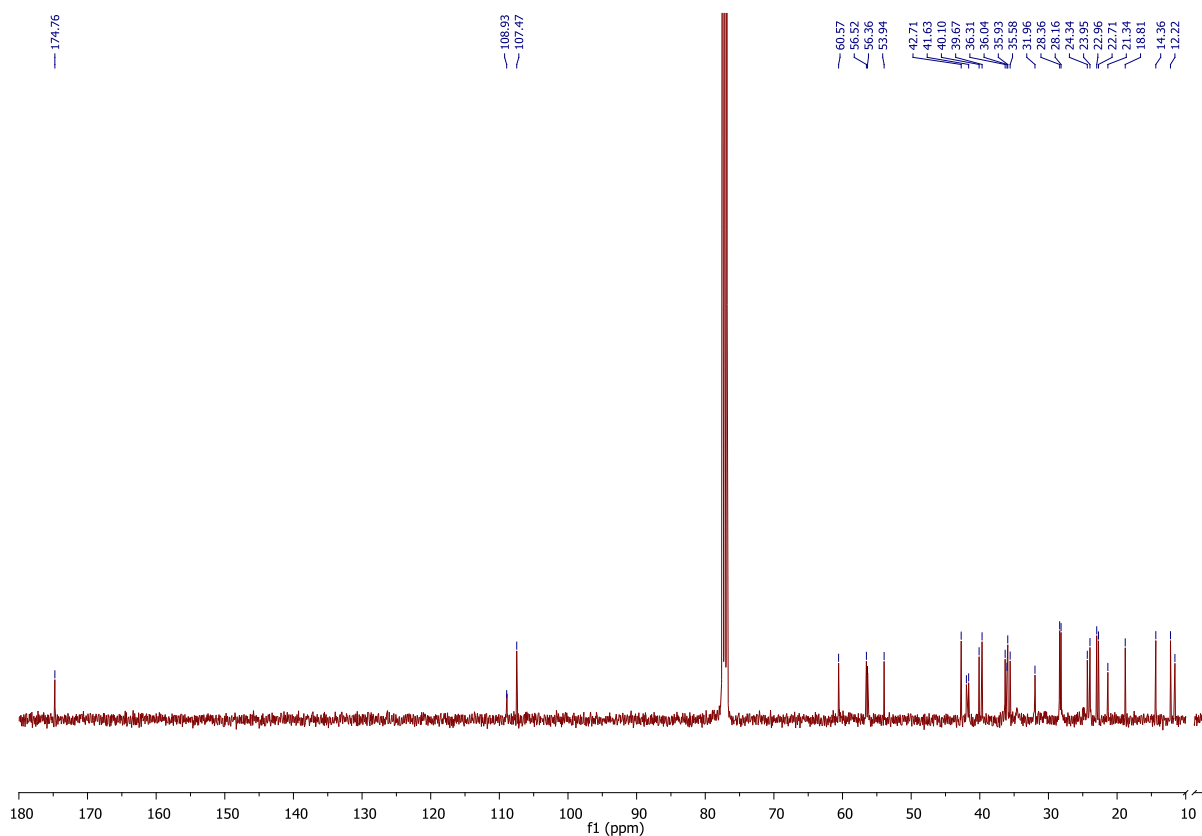


Figura 18 - Espectro de carbono do 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxona-etilciclohexanocarboxilato. (13)

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

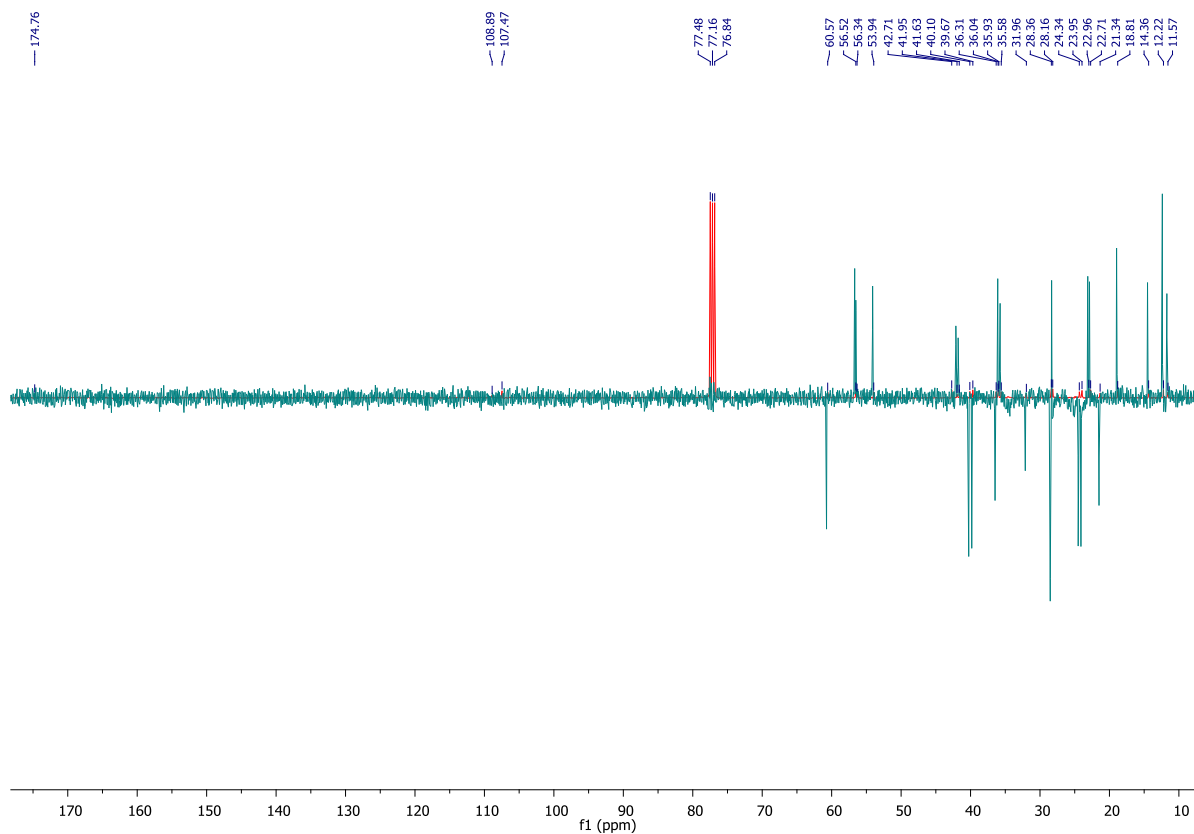
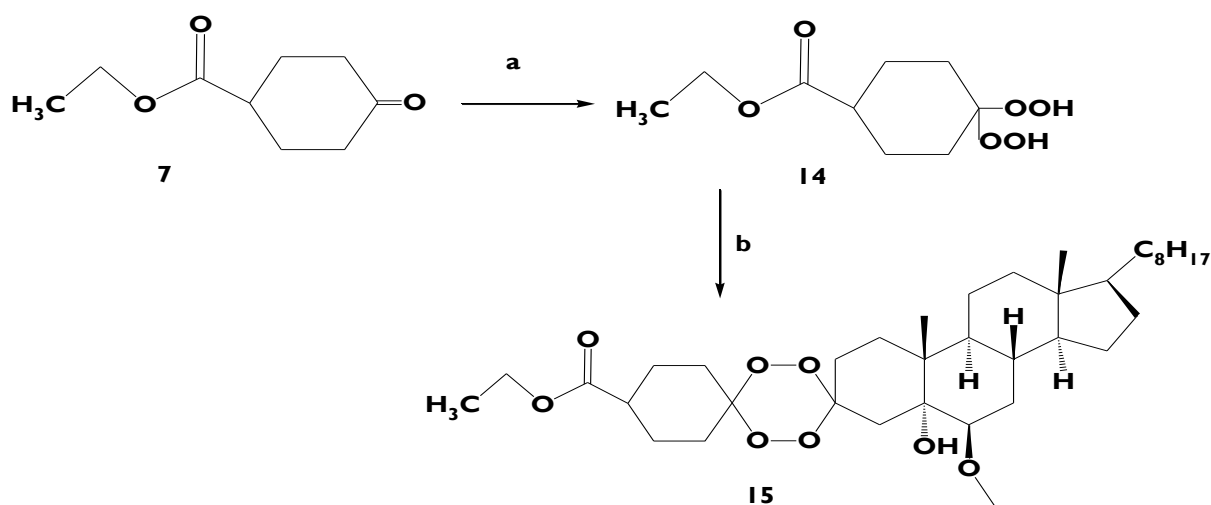


Figura 19 - Espectro de ^{13}C e Dept 135 do composto 5α -colestano-1,2,4,5-tetraqona-etilciclohexanocarboxilato. (13)

2.2.2.2- 5 α -Hidroxi,6 β -metoxicolestan-3-ona-1,2,4,5-teraoxa-etilciclohexano-carboxilato

Na síntese deste composto optou-se por se fazer a formação do di-hidroperóxido no etil 4-oxociclohexanonacarboxilato por ter apresentado melhores resultados em estudos anteriores.

O etil 4-oxociclohexanonacarboxilato (**7**) foi dissolvido em CH₃CN à t.a.. De seguida num banho a 0°C adicionou-se o ácido acético glacial e por fim o H₂O₂. A reação foi deixada à t.a. durante 6 h 30m com pequenas adições a cada hora ao final desse tempo a reação foi parada por adição de CH₂Cl₂, H₂O₂ e H₂O. Posteriormente foi realizado um *work-up* descrito anteriormente. Ao di-hidroperóxido (**14**) adicionou-se o intermediário (**5**) que foram dissolvido em CH₂Cl₂ seco seguido de adição de Re₂O₇ em atmosfera inerte. A reação foi praticamente instantânea. Após este tempo foi adicionado mais CH₂Cl₂ seco seguido de uma filtração num “*plug*” de sílica. Posteriormente foi feita uma FCC com éter de petróleo: acetato de etilo para obtenção do produto purificado (**15**).



Esquema 6 - Síntese do 5 α -Hidroxi,6 β -metoxicolestan-3-ona-1,2,4,5-teraoxa-etilciclohexanocarboxilato

Condições das reações: a) etil-4-oxociclohexanocarboxilato em CH₃CN, CH₃COOH e H₂O₂ à t.a., b) intermediário 5, CH₂Cl₂ seco e Re₂O₇ em atm de azoto.

Devido aos baixos rendimentos desta reação não foi possível proceder à análise espectral do produto final da reação.

2.3 - Novas abordagens para a síntese dos híbridos com possível atividade anti-malárica usando como catalisador triflato de bismuto

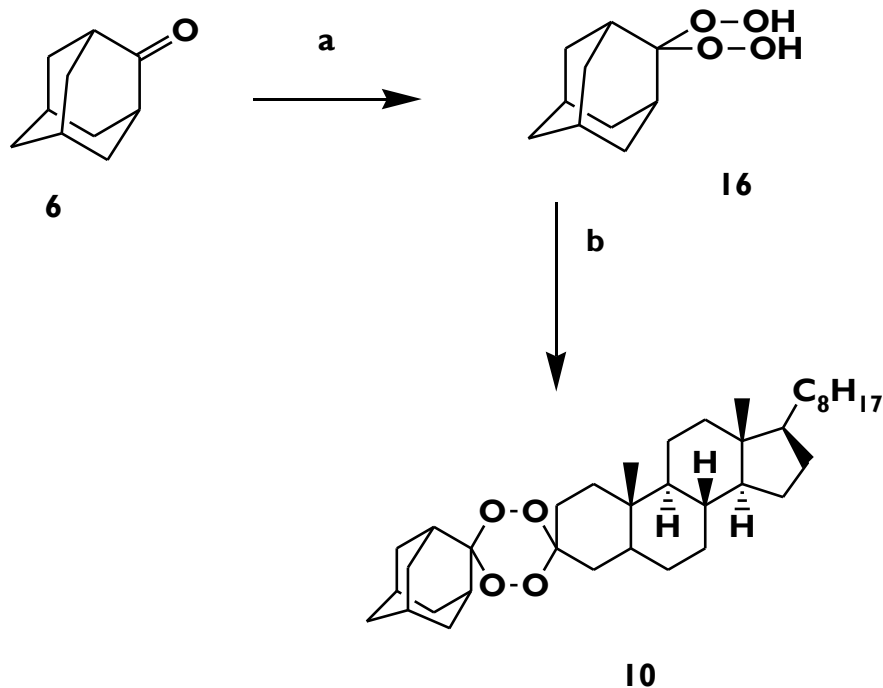
As reações descritas anteriormente apresentaram baixos rendimentos e, por isso, houve necessidade de explorar novas reações para a síntese destes compostos. Este tipo de reações foram estudadas por Koeni e pela sua equipa em 2012 [46], que utilizaram como catalisador Bi (III) por apresentar baixa toxicidade, ser facilmente disponível, de fácil manuseamento e amigo do ambiente [47]. A maioria dos compostos de Bi (III) têm provado a sua utilidade como catalisadores para uma variedade de reações químicas. [25,54-58] Os realizados por Sashidara et al. em 2012 [46], verificaram que as reações em que era utilizado o triflato de bismuto, 5 mol %, apresentavam bons rendimentos e decorriam em intervalos de tempo mais curtos. [52-54] Para além do catalisador também estudaram o efeito do solvente onde concluíram que o melhor solvente para este tipo de catalisador era a mistura $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1). Estudaram também as reações com 1,2,4,5-tetraoxanos onde tanto os tetraoxanos assimétricos como os simétricos apresentaram bons resultados. Uma das reações que estudaram foi com a adamantanona e por apresentar bons rendimentos [59] decidiu-se estudar esta reação e da adamantanona di-hidroperóxido com a 5α -colestano-3-ona.

2.3.1 - 5α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano

Nesta reação optou-se por iniciar a reação com a adamantanona para a formação do di-hidroperóxido. A adamantanona (**6**) foi diluída numa mistura $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1), H_2O_2 (30%) (4mmol) e foi utilizado como catalisador o triflato de bismuto e deixou-se a reação se decorrer à temperatura ambiente. A reação foi monitorizada por TLC utilizando com eluente o clorofórmio e metanol. Após a reação se estar completa foi concentrada e realizou-se o *work-up* com DCM.

Ao di-hidroperóxido (**16**) obtido foi adicionado a 5α -colestano-3-ona (**8**) e dissolvidos numa mistura $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1) e deixou-se a reação decorrer durante uma semana de seguida foi realizado um novo *work-up*, e concentrou-se sobre vácuo.

Aparentemente ocorreu formação do produto desejado por comparação com uma amostra padrão em TLC's realizadas pelos processos anteriores.



Esquema 7 - Síntese do 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano. (10)

Condições das reações: a) adamantanona, $\text{Bi}(\text{OTf})_3$, H_2O_2 , $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ t.a. reação b) 5 α colestano-3-ona, di-hidroperóxido $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $\text{Bi}(\text{OTf})_3$

Nesta reação não houve oportunidade da purificação do produto obtido devido à otimização das condições da reação, pois este tipo de reações nunca tinham sido realizadas com moléculas como a 5- α -colestano-3-ona.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

Capítulo 3

Conclusões

Conclusões

A síntese de compostos híbridos torna-se um desafio aliciante na procura de novas estratégias para a sua obtenção.

Ao longo deste trabalho tive oportunidade de contatar com esta realidade através da síntese deste tipo de compostos.

Estes trabalhos tornam-se cada vez mais importantes para a criação de novos fármacos no combate a este tipo de epidemiologias e à resistência que doenças como a malária ganharam devido ao uso incorreto das terapêuticas atuais e às próprias mutações / alterações que o parasita sofre.

Nas reações que envolveram a 5 α -colestanona com o catalisador Re₂O₇ obtiveram-se os híbridos pretendidos, 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano e 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato, como se comprova pela análise dos espectros de RMN de ¹³C estes confirmaram a formação da ligação 1,2,4,5-tetraoxana, isto é, OO-C3-OO e OO-C1'-OO. No entanto torna-se necessário otimizar as condições da reação para que o rendimento deste tipo de reações aumente. O mesmo é necessário quando estas reações sofrem um aumento de escala.

Neste trabalho foram preparados os compostos 5 α hidroxi-6 β metoxicolestan-3-ona (5), 5 α colestano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano e 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato.

Como os rendimentos das reações de preparação dos híbridos com o Re₂O₇ foram baixos optou-se por experimentar novas metodologias, usando o Bi(OTf)₃ como catalisador por estarem reportados melhores rendimentos [46] e por ser um catalisador economicamente mais vantajoso e menos poluente para o ambiente. Verificamos que na formação do dihidroperóxido não houve grandes perdas de produto.

No futuro, as reações com Bi (OTf)₃ serão uma vantagem dado que reações com este tipo de catalisador em moléculas mais simples são rápidas e obtiveram-se melhores resultados por isso deve-se apostar otimizando as condições das reações para moléculas mais complexas e com peso moleculares maiores, como é caso da 5 α -colestano-3-ona.

A escolha da adamantanona e da 5 α -colestano-3-ona nas reações com o Bi(OTf)₃ deveu-se ao facto de serem reagentes de fácil acesso pois não necessitam de serem preparados no laboratório o que não acontece com o intermediário 5 α -hidroxi-6 β -metoxicolestano-3-ona (5) em que a sua síntese é demorada.

Na síntese destes novos fármacos devemos garantir uma química o mais limpa possível, isto é, que lese o menos possível o ambiente, procurando usar químicos menos tóxicos, que possam ser reciclados para novas utilizações.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

Capítulo 4

Experimental

4.1 - Equipamentos utilizados

Os espectros ^1H RMN, ^{13}C RMN e DEPT 135 RMN - foram realizados num espectrómetro de 400 MHz Bruker Avance III.

Os pontos de fusão foram determinados no aparelho para pontos fusão Buchi-540.

As análises elementares foram realizadas no analisador elementar Carlo Erba 1108/cromatografia de combustão.

As amostras foram concentradas, evaporadas e secas num Rotavapor[®] R-215 da Büchi.

4.2 - Reagentes utilizados na preparação dos compostos

Os reagentes utilizados que se encontravam disponíveis comercialmente foram fornecidos pelos fabricantes. Acetato de colesterol ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$), 5 α -colestano-3ona, acetato de 4-oxociclohexanocarboxilato, adamantanona, óxido de rênio (VII) (Re_2O_7), iodeto de cobre (CuI), triflato de bismuto ($\text{Bi}(\text{OTf})_3$), monoperóxido de magnésio hexa-hidratado (MMPP), solução de peróxido de hidrogénio a 30%, clorofórmio deuterado e trietilamina foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

A sílica gel ultra pura de 40-60 μm , 60A para as FCC foi adquirida à Acros Organics.

O éter dietílico ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$), metanol (MeOH), acetona ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$) e etanol (EtOH), foram obtidos a partir de VWR Co.

O acetonitrilo (CH_3CN), diclorometano (CH_2Cl_2), hidróxido de sódio (NaOH), de Celite[®] 545 e TLC sílica gel 60 F₂₅₄ foram obtidos a partir de MERK Co.

O ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) e o acetato de etilo foram adquiridos à Fisher Chemical.

As soluções aquosas de Na_2SO_3 (10%), NaHCO_3 (sat), HCl (5%), NaOH (10%), NaCl (10%) foram preparadas no laboratório de acordo com os protocolos certificados.

O reagente de Jones (25 g de óxido de cromo (CrO_3) diluído em 25 mL/75 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 / H_2O) assim como a solução de revelação de placas de cromatografia *p*-anisaldeído (2.5 ml de *p*-anisaldeído, 93 ml de etanol , 3.5 ml de ácido sulfúrico H_2SO_4 e 1 ml de ácido acético($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) efetuada no gelo com agitação) e a solução de revelação de esteroides (95 ml de etanol e 5ml de ácido sulfúrico) foram preparados no laboratório de acordo com protocolos de certificados.

4.3 - Síntese do intermediário

Síntese do acetato 5,6-epoxicolestan-3 β -ilo (2)

A 1500 mg de acetato de colesterol (1), adicionou-se o CH₃CN, sobre agitação e à temperatura ambiente. Depois de este se encontrar dissolvido adicionou-se o MMPP. Deixou-se a reação decorrer à temperatura de refluxo 81°C durante 20 min. Após a reação terminar, deixou-se arrefecer, foi filtrada e concentrada sobre vácuo. O resíduo branco foi diluído com éter dietílico e lavado com Na₂SO₃ (10%sol.aq.) e com NaHCO₃ (sol. aq. sat) e H₂O. A fase etérea foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foi filtrada e evaporada, obtendo-se um composto branco (2, 1431,3 mg, 91,99%).

Síntese do acetato 5 α -hidroxi-6 β - metoxicolestan-3 β -ilo (3a) e acetato do 6 α -hidroxi-5 β - metoxicolestan-3- β -ilo (3b)

A 1431,3mg do acetato 5,6-epoxicolestan-3-ilo (2) foram adicionados 16.39 mg de triflato de bismuto (Bi (OTf₃)) e 71.46 mL de metanol (MeOH) e deixou-se a mistura reacional sobre agitação durante 3 horas, a qual foi parada por adição de 3 gotas de trietilamina e duas espátulas de sílica. O produto obtido foi filtrado e evaporado. Por último procedeu-se a uma FCC utilizando como eluente 15:1 (éter de petróleo: acetato de etilo) 15:1 obtendo-se um produto branco depois de seco (3a, 863.8 mg e 56,29%). De seguida obteve-se da FCC com o eluente 13:1 acetato 6 α -hidroxi-5 β - metoxicolestan-3 β -ilo (3b) um produto branco (220 mg).

Caraterização do composto 3b

P. fusão (EtOH) : 157.3-158.1°C

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 0.67(3H, s, 18 – CH₃), 0.85 e 0.86 (3H, 2d, J =6.6Hz 26 – CH₃ e 27 – CH₃), 0.89 (3H, d, J =6.7Hz, 21-CH₃), 1.19 (3H,s, 19 CH₃), 2.02 (3H,s, 3 β -CH₃OO), 3.21 (3H,s, 5 α OCH₃), 3.88 (1H, t, 6 α -H), 4.87(H, tt 3 α -H).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃):12.28, 17.71, 18.80, 21.18, 21.59(CH₂), 22.70, 22.96, 24.01(CH₂), 24.32(CH₂), 26.82(CH₂) 28.15, 28.40(CH₂), 29.95, 30.07(CH₂), 32.05(CH₂), 34.58(CH₂), 35.96, 36.31(CH₂), 39.57(CH₂), 39.65(CH₂), 40.09, 42.91, 44.78, 48.51, 55.95, 56.39, 70.07, 71.20, 78.79(C), 170.98(CH₃COO).

Síntese do 6β-metoxicolestano-3β,5α-diol (4)

A 863.8 mg do composto **3a** foi adicionado 17.5 ml de EtOH, 8.77 ml de CH₂Cl₂ e 2.89 ml de NaOH, deixou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi parada por evaporação. De seguida dissolveu-se o produto em acetato de etilo e lavou-se a fase etérea com HCl (sol.aq.5%), NaHCO₃ (sol.sat) e água. No final adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se, obtendo-se um composto branco (**4**, 845.6 mg, 89.79%).

Síntese do 5α hidroxi-6β metoxicolestan-3-ona (5)

A 845.6 mg do composto **4a** foram dissolvidos em acetona, em gelo. De seguida foi-se adicionando gota a gota reagente de Jones até à mudança para de cor verde para cor castanha. A reação foi parada por adição de metanol até voltar à cor verde, deixando-se repousar durante cerca de 15 minutos. A reação foi evaporada. De seguida dissolveu-se o produto em éter dietílico e lavou-se a fase etérea em água e NaCl (10%). No fim adicionou-se o sulfato sódio anidro para ajudar a tirar o resto de água, filtrou-se e evaporou-se. Obteve-se um produto branco (**5**, 659mg, 77,9 %).

P.f.(MeOH) = 174.7°C -176.4°C.

Analise elementar (C₂₈H₄₈O₃) calculada: 77.72 %C, 11.18 %H, encontrada : 77.1 % C, 11.41% H

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) : 0.69 (3H,s,18 CH₃), 0.86 e 0.87 (cada 3H, 2d,J=6.7Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.89 (3H,t,J= 7.5Hz, 21-CH₃), 1.25 (3H, s,19-CH₃), 2.95 (1H,t,6α-H),3.27 (3H, s,6β-OCH₃)

4.4 - Síntese de híbridos

As reações na síntese dos híbridos foram monitorizadas por TLC e reveladas com solução de p – anisaldeído.

Síntese do composto 5 α -colestano-1,2,4,5 tetraoxa-adamantano (10)

Processo A com o catalisador (Re₂O₇):

200 mg de 5 α -colestano-3-ona(8) foram dissolvidos em 3 ml de CH₂Cl₂ e 20.58 ml de CH₃CN à temperatura ambiente . Após dissolução completa foram adicionados 6,58 ml de ácido acético glacial a 0°C e, 2ml de H₂O₂ a 30% à temperatura ambiente. A reação foi mantida durante 115 horas com adições diárias de H₂O₂ a 30%, a reação foi parada por adição de CH₂Cl₂, H₂O₂ e H₂O. A extração da fase etérea foi feita com CH₂Cl₂ e lavada com solução de NaHCO₃ e H₂O. No fim adicionou-se sulfato sódio anidro para retirar vestígios de água, filtrou-se e evaporou-se o excesso de CH₂Cl₂ . Ao di-hidroperóxido obtido foram adicionados 110 mg de adamantanona (6), 7 ml de CH₂Cl₂ seco e 5mg Re₂O₇. A reação foi mantida sobre agitação e atmosfera inerte de azoto durante 35 min., adicionou-se CH₂Cl₂ seco, filtrou-se num “plug” sílica para remover o catalisador e evaporou-se. O produto obtido foi purificado numa FCC iniciada com éter de petróleo até ao gradiente de (éter de petróleo: acetato de etilo) 98:2 na qual se obteve um produto branco (10, 30 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.64 (3H,s,18-CH₃), 0.81 (3H,s,18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H,2d,J=6.7Hz, 26 -CH₃ e 27-CH₃) 0.89 (3H, d, J= 6.6Hz, 21- CH₃)

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 11.6, 12.2, 18.8, 21.3, 22.7, 22.97 (CH₂), 23.9, 24.3, 27.2, 28.2, 28.3, 31.96, 33.31 (CH₂), 35.58, 35.93, 36.31(CH₂), 36.94(CH₂), 37.13(CH₂), 39.67(CH₂), 40.14(CH₂), 42.72, 53.95, 56.34, 56.56, 77.12, 108.55, 110.44

Processo B com o catalisador Bi(OTf)₃:

150 mg de adamantanona(6) foram dissolvidos em uma mistura de de CH₂Cl₂/CH₃CN (1:1), 0.5 ml de H₂O₂ a 30 % ao qual se adicionou 32.8mg de Bi (OTf)₃. A reação decorreu durante 1 h à temperatura ambiente e foi parada por evaporação. A extração da fase etérea foi

feita com CH_2Cl_2 , lavada com NaHCO_3 (sol. aq. sat.) e H_2O , ao qual se adicionou sulfato sódico anidro para retirar os vestígios de água, filtrou-se e evaporou-se o excesso de CH_2Cl_2 . No final adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se, obtendo-se um composto branco com 150 mg. A este produto branco foram adicionados 383 mg de 5 α -coleston-3-ona numa mistura de 1:1 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ e 32.8mg de $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ e deixou-se à t.a. durante uma semana. A reação foi parada por evaporação. De seguida dissolveu-se o produto em éter dietílico e lavou-se a fase etérea com H_2O e NaCl (10%). No fim adicionou-se um sulfato sódico anidro para ajudar a tirar o resto de água, filtrou-se e evaporou-se, obtendo-se um produto branco.

Síntese do 5 α -hidroxi,6 β -metoxicoletano-1,2,4,5-tetraoxa-adamantano (12)

270 mg do intermediário **5** foram dissolvidos em 7,07 ml de CH_2Cl_2 e 14,2 ml de CH_3CN a temperatura ambiente. Após a completa dissolução foram adicionados 2,56 ml de ácido acético glacial a 0°C e em 890 μl de H_2O_2 a 30% à temperatura ambiente. A reação foi mantida a temperatura ambiente durante 72 horas com adições diárias de H_2O_2 . A reação foi parada por adição de CH_2Cl_2 , H_2O_2 e H_2O . A extração da fase etérea foi feita com CH_2Cl_2 e lavada com solução de NaHCO_3 e H_2O . No fim adicionou-se sulfato sódico anidro para ajudar a tirar o resto de água, filtrou-se e evaporou-se o excesso de CH_2Cl_2 . Ao di-hidroperóxido foi adicionado 134,4 mg de adamantanona, 8,84 ml de CH_2Cl_2 seco e 5 mg Re_2O_7 . A reação foi mantida sobre agitação e atmosfera inerte de azoto. A reação correu durante quase 30 min. Após estar completa foi adicionado CH_2Cl_2 e filtrada com vácuo num “plug” sílica para remover o catalisador. O produto obtido foi purificado numa FCC começando com éter de petróleo até achar o gradiente de (éter de petróleo: acetato de etilo) 65:5. No final da FCC obteve-se um composto branco (**12**, 244mg).

Síntese do 5 α -colestano-1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato (13)

700mg de 5 α -coleston-3-ona foram dissolvidos em 10,29 ml de CH_2Cl_2 e 20.58 ml de CH_3CN a temperatura ambiente. Após completa dissolução foram adicionados 6,58 ml de ácido acético glacial a 0°C. Em seguida foram adicionados 2ml de H_2O_2 a 30%. A reação foi mantida a temperatura ambiente durante 115 horas com adições de H_2O_2 . Após a reação estar completa esta foi parada por adição de CH_2Cl_2 , H_2O_2 e H_2O . Procedeu-se à extração da fase orgânica com CH_2Cl_2 e lavagem com

solução de NaHCO_3 e H_2O , foi adicionada sulfato de sódio anidro e filtrada. O excesso de CH_2Cl_2 foi evaporado. Ao di-hidroperóxido obtido foi adicionado 250 μl de etil 4-oxociclohexanocarboxilato, adicionou-se 23.84ml de CH_2Cl_2 seco e 5 mg Re_2O_7 . A reação foi mantida sobre agitação e atmosfera inerte de azoto durante 35 min. Ao fim deste tempo foi adicionado CH_2Cl_2 , a solução foi filtrada a vácuo num *plug* sílica para remover o catalisador e evaporada. O produto obtido foi purificado numa FCC começando com éter de petróleo até se achar o gradiente 98:2 (éter de petróleo: acetato de etilo) na qual se obteve um produto branco (**13**, 72 mg).

P.f. (MeOH): 159.3°-161.4°C

RMN:

^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.64(3H,s,18- CH_3),0.81(3H,s,19- CH_3), 0.85 e 0.87(cada 3H,2d,j=6.7Hz, 26- CH_3 , 27- CH_3), 0.88(3H,2d,j=6.6Hz, 21- CH_3), 1.24(2H,t,j=6.8Hz, OCH_2CH_3), 4.11(3H,q,j=6.8Hz, , OCH_2CH_3).

^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm:11.57, 12.1, 14.36, 18.81, 21.34, 22.71, 22.96, 23.95, 24.34, 28.16, 28.36, 31.96, 35.58, 35.93, 39.67, 40.10, 41.63, 41.96, 42.71, 53.94, 56.34, 56.52, 60.67, 107.47 (C), 108.89 (C), 174.76 (C).

Síntese do 5 α -Hidroxi, 6 β -metoxicolestan-3-ona 1,2,4,5-tetraoxa-etilciclohexanocarboxilato (**15**)

66.43 μL de etil-4-oxociclohexanocarboxilato foi diluído em 926.49 μl de CH_3CN , à temperatura ambiente, foi adicionado 312.69 μL de ácido acético glacial à temperatura de 0°C seguido da adição de 159.8 μl , H_2O_2 a 30%. A reação foi mantida à t.a. com adições sucessivas de H_2O_2 a 30%. Após a reação estar completa esta foi parada por adição de CH_2Cl_2 , H_2O_2 e H_2O . Procedeu-se à extração da fase orgânica com CH_2Cl_2 e foi lavada com solução de NaHCO_3 e H_2O . Foi adicionado sulfato de sódio anidro e a solução foi filtrada. O excesso de CH_2Cl_2 foi evaporado. Ao di-hidroperóxido obtido foi adicionado 271 mg do intermediário **5** adicionou-se 3.47 ml de CH_2Cl_2 seco e 5 mg Re_2O_7 . A reação foi mantida sobre agitação e atmosfera inerte de azoto durante 35 min. Após estar completa foi adicionado CH_2Cl_2 , a solução filtrada em vácuo num *plug* sílica para remover o catalisador e evaporada. Obteve-se um produto de cor castanha (**15**, 4 mg)

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

Bibliografia

- [1] **CDC** - www.cdc.gov/malaria/about/history/index.html. Consultado 17/02/2014 às 22.00 h.
- [2] **Malaria police center** - em www.malariapolicycenter.org/malaria.101/history-malaria.
acedido a 12 de março de 2014.
- [3] HSU ELISABETH.- **Reflections on the discovery of antimalarial qinghao**. Br J Clin Pharmacol, 61, (2006), 666-670.
- [4] **Nature** acedido 4 de setembro de 2014 [disponível na internet:
http://www.nature.com/nm/journal/v19/n2/fig_tab/nm.3077_F2.html]
- [5] OMS, - **Epidemiological approach for malaria control**; guide for TUTORS; second edition; V, acedido: 12 de março de 2014 [disponível na internet:
http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_cds_cpe_smt_2000_1/en/]
- [6] BIAMONTE MA., WANNERB J, LE ROCHC KG . - **Recent advances in malaria drug discovery**. Bioorg Med Chem Lett ; 23(10) 2013: 2829-2843.
- [7] GREENWOOD BM, et al, - **Malaria: progress, perils, and prospects for eradication**. The Journal of Clinical Investigation, 118 (2008) 1266-1276.
- [8] KNELL, A.J., - **Malaria: a publication of the Tropical Programme of the Wellcome Trust**. Oxford, Oxford University Press, 1991.
- [9] SINGH B., DANESHVAR - **Human Infections and Detection of Plasmodium knowlesi**. CMR, 26 (2013), 165-184.
- [10] SINGH, B., et al. - **A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings**. Lancet. 363(2004)1017-1024.
- [11] **WEBMD-malalaria symptoms** - acedido a 20 de março 2014 [disponível na internet: <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/malaria-symptoms>].
- [12] FAIRHURST RM, WELLEMS TE. - **Plasmodium species (malaria)**. In GL Mandell et al., eds., Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed., vol. 2, (2010) 3437-3462.
- [13] PHILIPPE J GUERIN, et al., - **Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development**. Lancet Infect Dis, 2 (2002) 564-73.
- [14] WEATHERALL, et al. - **Malaria and Red Cell- American Society of Hematology** (2002), 35-57.

- [15] **OMS** 2013, consultado 20 de março 2014 disponível em http://www.who.int/malaria/media/artemisinin_resistance_qa/en/
- [16] WONGSRICHANALAI, et al. - **Epidemiology of drugs –resistant malaria. The lancet, Infectious Diseases** 2, (2002), 209-210.
- [17] MOSS, GP - **Nomenclature of steroids (Recomendation 1989)**. Pure Appl.Chem, 165(1989), 1783-1822.
- [18] GUARDIOLA F., et al. - **Cholestrol and Phytostero, oxidation prodotus occurrence and biological effects.**, AOCS Press, 2002.
- [19] SMITH LL - **Mecanism of formation of oxysterols: a general survey. Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids**, NATO ASI Series Volume 189, 1991, 115-132.
- [20] GRIFFITHS J., et al. - **Methods for oxysterol analysis: Past, present and future;** Biochemical Pharmacology, 86, (2013)3-14.
- [21] VEJUX A., et al. - **Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidiosis.;** journal of medical and biological research,41(2008):545-556.
- [22] VENNERSTROM J L., et al. - **Synthesis and Antimalarial activity of Sixteen Dispiro-1,2,4,5-Tetraoxanes: Alkyl-Sustituted 7,8,15,16- Tetraoxadispiro[5.2.5.2]-hexadecanes.**, J. Med. Chem,43 (2000) ,2753-2758.
- [23] VENNERSTROM J. L. et al. - **Dispiro-1, 2, 4, 5- tetraoxanes: a new class of antimalarial peroxides**, J. Med. Chem. 35 (1992), 3023-3027.
- [24] FISCHER LC; BLACKIE MAL - **Tetraoxanes as Antimalarials: Harnessing The Endoperoxide**, Mino Reviews In Medicinal ChemisTry ,14 (2014) ,2,1-13.
- [25] MARTI, et al. - **Second generation analogues of RKA182: synthetic tetraoxanos with outstanding *in vitro* and *in vivo* antimalarial activities.** *MedChemComm*, 2(2011) 7, 661-665.
- [26] P. M.O'NEILL, et al. - **Identification of a 1, 2, 4, 5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (RKA 182) with superior properties to the semi-synthetic artemisinins.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010), 33, 5693-5697.
- [27] KIM H.-S. et al. - **Synthesis and antimalarial activity of cyclic peroxides 1,2,4,5,7-pentoxocanes and 1,2,4,5-tetraoxanes.** *J. Med.Chem.*, 42, (1999) 2604-2606.
- [28] (a) N. TERZI, et al. - **Deoxycholic Acid-Derived Tetraoxane Antimalarials and Antiproliferatives.** *J. Med. Chem.*, 2007, (50), 5118-5127.

- (b) I. OPSENICA, et al. - **New Chimeric Antimalarials with 4-Aminoquinoline Moiety Linked to a Tetraoxane Skeleton**. J. Med. Chem., 2008, 51, 6216-6219.
- [29] (a) CHAUHAN, SS, SHARMA M, CHAUHAN, PMS. - **Trioxaquinones: Hybrids molecules for treatment of malaria**, Drugs News & Perspective, 23(2010), 10,632-646.
- (b) RIDLEY, R. G. - **Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs** Nature (2002), 415-686.
- [30] MEUNIER, B. - **Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality**. Acc Chem Res 41(1) (2008), 69-77.
- [31] CABARET, O.D., ET AL. - **Preparation and antimalarial activities of "Trioxaquinones", New modular molecules with a trioxane skeleton linked to a 4-aminoquinoline**. ChemBio Chem, 4(2000) 4, 281-283.
- [32] GRELLEPOIS, F., GRELLIER, P., DELPON - **Design, synthesis and antimalarial activity of trifluoromethylartemisinin-mefloquine dual molecules**. Chem Bio Chem 6(4) (2005) 648-652.
- [33] FIKKERT, V., VAN M.B., VERCAMMEN, J., ET AL. - **Development of resistance against diketo derivatives of human immunodeficiency virus type I by progressive accumulation of integrase mutations**. J Virol, 77 (2013) 11459-11470.
- [34] KELLY, J.X., SMILKSTEIN, M.J., BRUN, R., ET AL. - **Discovery dual function acridone as a new antimalarial chemotype**. Nature lett, 459(2009) 270-273.
- [35] MORPHY R, RANKOVIC Z. - **Designed multiple ligands. Anemerging drug discovery paradigm**. J Med Chem 48(2005).6523-6543.
- [36] SABBANI S, ET AL. - **Piperidine dispiro-1,2,4-trioxane analogues**. Bioorg Med Chem Lett 18: (2008) 5804-5808.
- [37] OPSENICA, D., et al., - **Cholic acid derivatives as 1, 2, 4, 5-tetraoxane carriers: structure and antimalarial and antiproliferative activity**, J. Med. Chem. 43 (2000) 3274-3282.
- [38] EGAN, T. J. - **Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target**. Targets 2 (2003) 115-124.
- [39] CARVALHO] F.S., SILVA M.M.C, SÁ E MELO ML. - **Highly eficiente epoxidation of unsaturated stroids using magnesium bis(monoperyphthalate) hexhydrate**, Tetrahedron ,65 (2009)2773-2781.

- [40] CARVALHO] F.S ET AL - **Seletive Cytotoxicity of Oxysterol; Through Structural Modulation Rings A and B Synthesis in vitro Evaluation and SAR.** JMed-Chem , 54 (2011), 6375-6393.
- [41] KUMAR N, SINGH R, RAWAT DS -**Tetraoxones: synthetic and medical chemistry prespective,** Medicinal Research Reviews, 32 (2012), 581-610.
- [42] TARENT'EV, AO, et al. - **Synthesis of five and six membered cyclic organic peroxides: Key transformations into peroxide ring-retaining products,** Beilstein J.Org.Chem., 10 (2014), 34-114.
- [43] OPSENICA,I., et al. - **Chemical Stability of the Peroxide Bond Enables Diversified Synthesis of Potent Tetraoxane Antimalarial,** J. Med. Chem. 51(2008), 2261-2266.
- [44] AMEWU R., et al. - **Design and synthesis of oral active dispiro 1, 2, 4, 5-tetraoxanes;** Org. Blomol. Chem., 4(2006), 4431-4436.
- [45] GHORAI P, DUSSAULT PH, - **Broadly Applicable syntheses of 1,2,4,5-tetraones.** Org letters, 11 (2009), 1,213-216.
- [46] SASHIDHARA, K. V. et al. - **A facile and efficient Bi(III) catalysed synthesis of 1,1 dihydroperoxides and 1,2,4,5 tetraoxanes.** Tetrahedron Letters, 53 (2012) 4880-4884.
- [47] SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, M.; KUMAR, A. - **A novel route to synthesis of flavones from salicylaldehyde and acetophenone derivatives** Tetrahedron Lett., 53 (2012), 2355-2359.
- [48] SASHIDHARA, K. V. et al. - **A new iodine catalyzed regioselective synthesis of xanthene synthons** Tetrahedron Lett., 53 (2012), 3281-3283.
- [49] SASHIDHARA, KV, et al. - **A simple and efficient access to new functionalized 4-phenacylidene flavones,** Adv. Syn. Catal., 354 (2012), 1129-1140.
- [50] SASHIDHARA KV, PALNATI, GR, AVULA, SR, KUMAR. - **A. Efficient and general synthesis of 3-aryl coumarins using cyanuric chloride.** Synlett, 23 (2012), (4), 611-621.
- [51] SASHIDHARA KV, KUMAR A, BHASKAR K. - **Synthesis of 3, 6-epoxy [1, 5] dioxocines from 2-hydroxyaromatic benzaldehydes.** Tetrahedron Letters., 52 (2011) (43), 5659-5663.
- [52] GASPARD-ILOUGHMANE, H.; LE ROUX, C. - **Bismuth(III) triflate in organic synthesis.** Eur. J. Org.Chem. (2004), 2517-2532.

- [53] BOTHWELL, J. M.; KRABBEZ, S. W.; MOHAN, R.S - **Applications of bismuth(III) compounds in organic synthesis** Chem. Soc. Rev. 40 (2011), 4649-4707.
- [54] LE ROUX, C. DUBAC, J. - **Bismuth(III) chloride and triflate: Novel catalysts for acylation and sulfonylation reactions. Survey and mechanistic aspects**, Synlett (2002), 181-200.
- [55] OLLEVIER, T.; DESYROY, V.; ASIM, M.; BROCHU, M.-C. - **Bismuth Triflate-catalyzed Fries Rearrangement of Aryl Acetates**. Synlett (2004), 2794-2796.
- [56] OLLEVIER, T.; MWENE-MBEJA, T. M. - **Bismuth Triflate Catalyzed Claisen Rearrangement of Allyl Naphthyl Ethers**, Tetrahedron Lett. 47 (2006.), 4051-4055
- [57] OLLEVIER, T.; NADEAU, E. - **An efficient and mild bismuth triflate-catalysed three-component Mannich-type reaction**, Org. Biomol. Chem. 5 (2007), 3126–3134.
- [58] SRIVASTAVA, N.; BANIK, B. K. - **Bismuth nitrate-catalyzed versatile Michael reactions**. J.Org. Chem., 68 (2003), 2109-2114.
- [59] J. KEISER ET AL. - **In vivo activity of aryl ozonides against Schistosoma species**. Antimicrob. Agents Ch., 5 (2012), (2), 1090-1092.
- [60] D. OPSENICA, D. E. KYLE, W. K. MILHOUS, B. A. SOLAJA. - **Antimalarial, antimycobacterial and antiproliferative activity of phenyl substituted mixed tetraoxanes**. J. Serb. Chem. Soc, 68 (2003), (4-5), 291-302.
- [61] H. C. LAI, N. P. SINGH, T. SASAKI. - **Development of artemisinin compounds for cancer treatment**. Invest. New Drugs, 31 (2013), (1), 230-246.
- [62] MEUNIER, B. - **Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality**. Acc Chem Res, 41 (2008), (1), 69-77.
- [63] MUREGI, F.W., ISHIH. - **A. Next-Generation Antimalarial Drugs: Hybrid Molecules as a New Strategy in Drug Design**. Drug Dev Res 2009: 1-13.
- [64] CHEN, C., LI, X., ET AL. - **Convergent Diversity-Oriented Synthesis of Small-Molecule Hybrids**. Angew Chem Int Ed, 44 (2005), (15), 2249-2252.
- [65] CHYAN, C. L., HUANG, P. C., LIN, T. H. - **Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of a calmodulin-OLFp hybrid molecule**. Acta Cryst, 61 (2005), (8), 785-787.
- [66] SINGH, P., PAULA, K., HOLZERB, W. - **Synthesis of pyrazole-based hybrid molecules: Search for potent multidrug resistance modulators**. Bioorg Med Chem, (14) 2006, 5061-5071.

- [67] POSNER, G.H., JEON, H.B., PLOYPRADITH, P., et al. - **Orally Active, Water-Soluble Antimalarial 3-Aryltrioxanes: Short Synthesis and Preclinical Efficacy Testing in Rodents.** J. Med. Chem. 45 (2002), (18), 3824-3828.
- [68] O'NEILL, P.M., et al. - **Application of Thiol-Olefin Co-oxygenation Methodology to a New Synthesis of the 1,2,4-Trioxane Pharmacophore.** Org Lett 6 (2004), (18): 3035-3038.
- [69] SINGH, C., et al. - **New Adamantane-Based Spiro 1, 2, 4-Trioxanes Orally Effective against Rodent and Simian Malaria.** J Med Chem 50 (2007), (3): 521-527.
- [70] SABBANI, S., et al. - **Piperidine dispiro-1,2,4-trioxane analogues.** Bioorg Med Che Lett (18) 2008, (21): 5804-5808.
- [71] GRIESBECK, A. G., et al. - **Antimalarial Peroxide Dyads from Natural Artemisinin and Hydroxyalkylated 1, 2, 4-Trioxanes.** J Med Chem 52 (2009), (10): 3420-3423.
- [72] SINGH, C., et al. - **6-(40-Aryloxy-phenyl)vinyl-1,2,4-trioxanes: A new series of orally active peroxides effective against multidrug-resistant *Plasmodium yoelii* in Swiss mice.** Bioorg Med Chem Lett 20 (2010), (15): 4459-4463.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

Anexos

ANEXO I

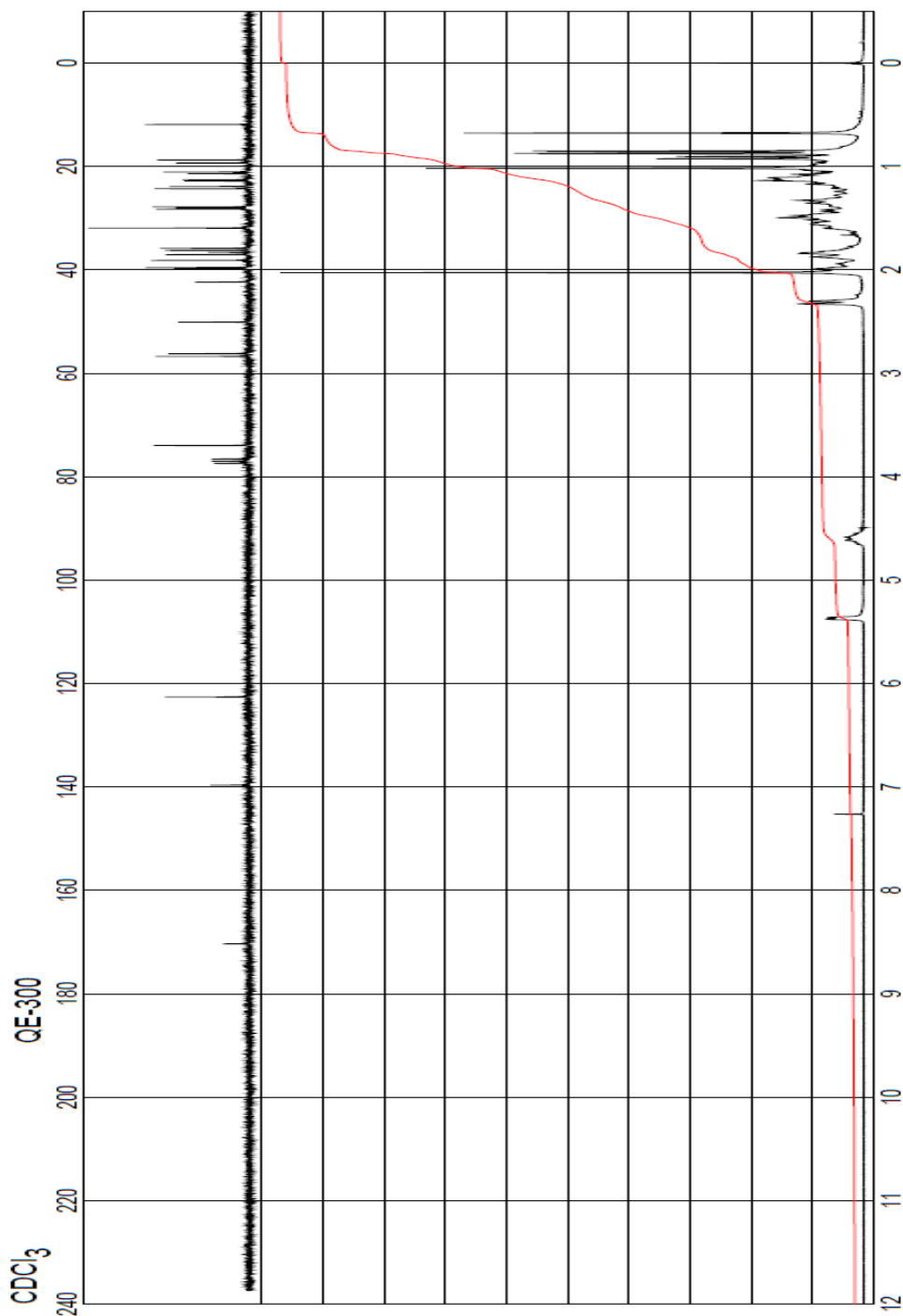


Figura 20 - Espectro de ^1H e ^{13}C em RMN fornecido pela Sigma Aldrich do acetato de colesterol.

ANEXO II

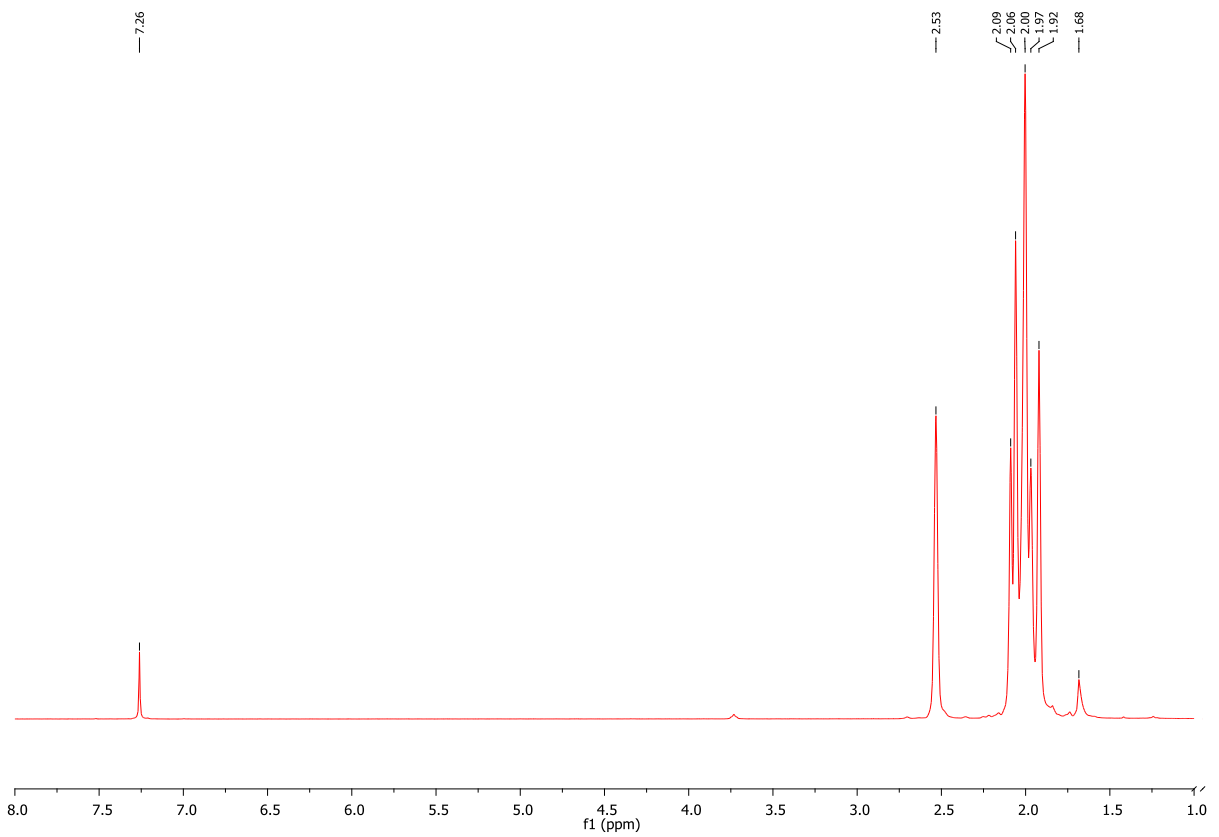


Figura 21 - Espectro de ¹H RMN da adamantanona.

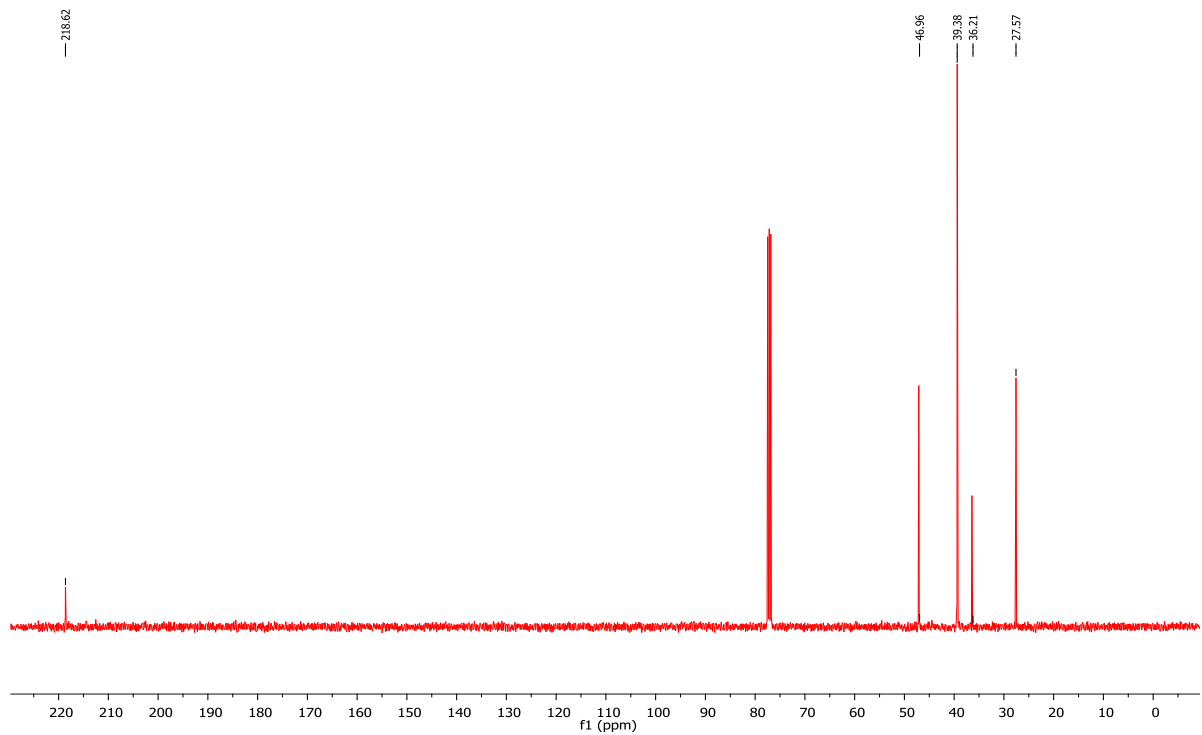


Figura 22 - Espectro de ¹³C RMN da adamantanona.

ANEXO III

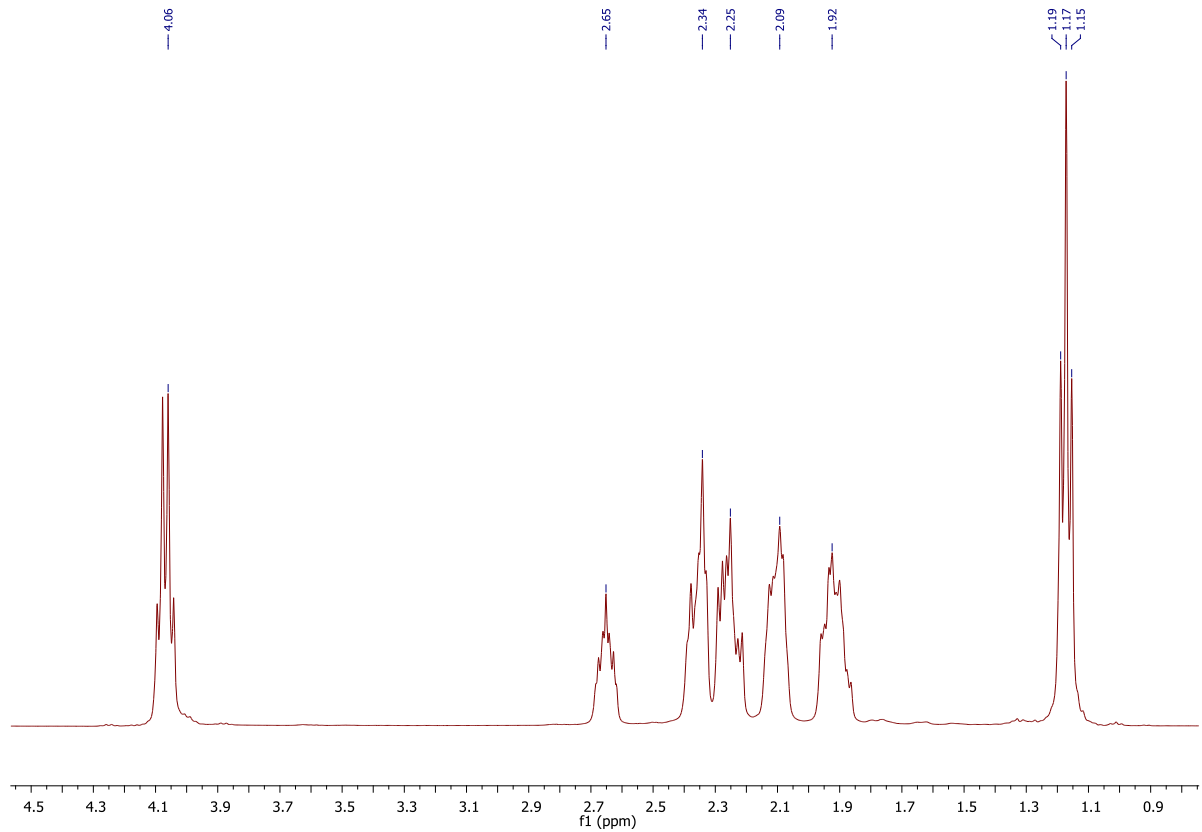


Figura 23 - Espectro de próton composto etil-4-oxociclohexanocarboxilato.

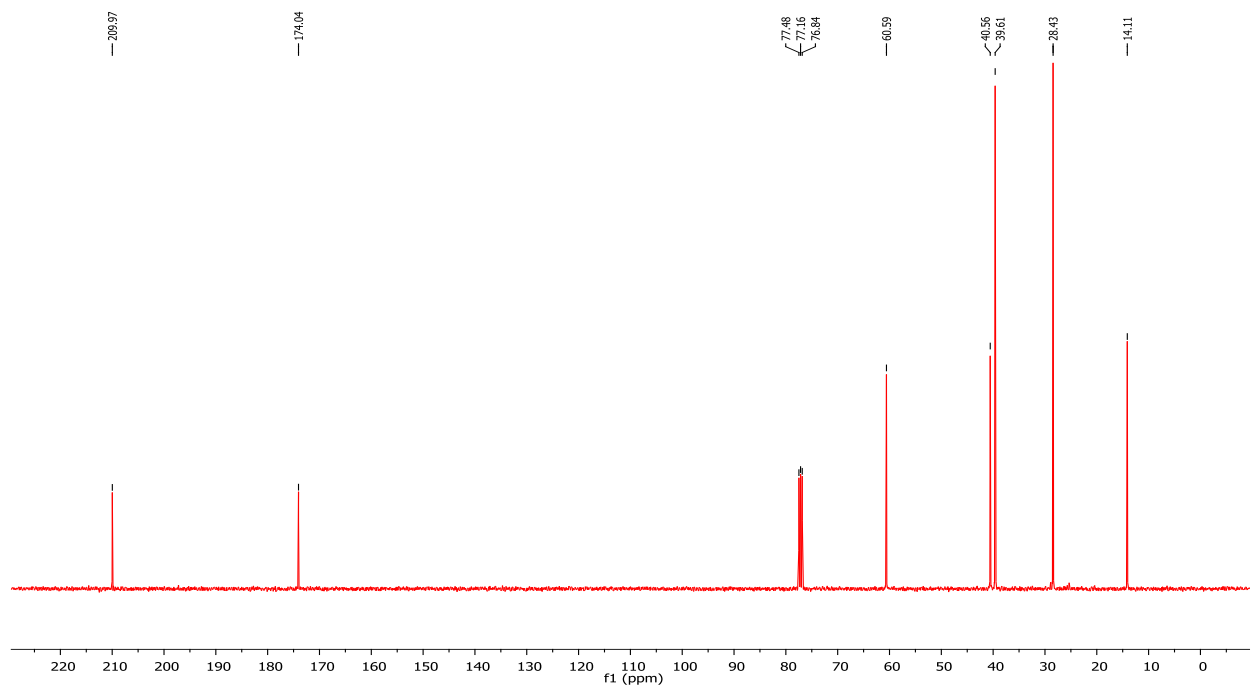


Figura 24 - Espectro de ^{13}C RMN do composto etil-4-oxociclohexanocarboxilato.

Síntese de fármacos híbridos antimaláricos.
Uma nova estratégia terapêutica envolvendo esteroides.

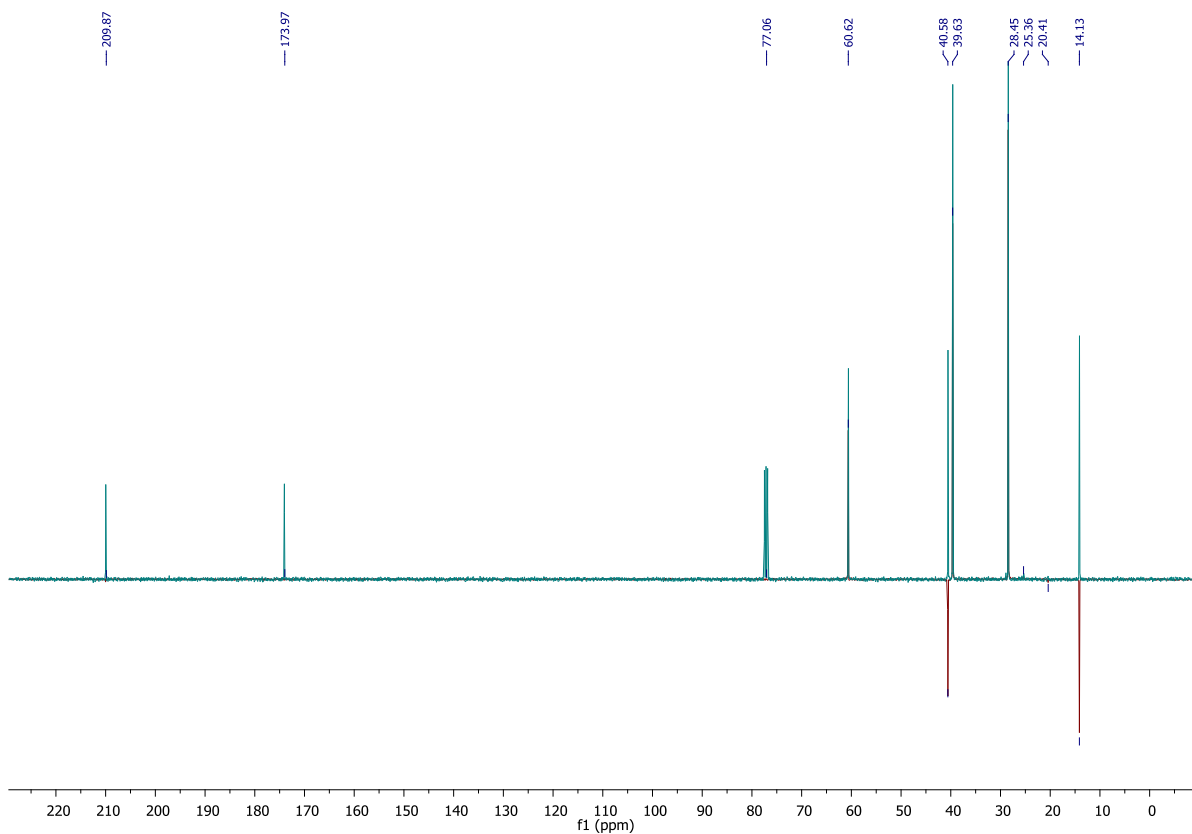


Figura 25 - Espectro de ^{13}C e Dept 135 RMN do composto etil-4-oxociclohexanocarboxilato.

ANEXO IV

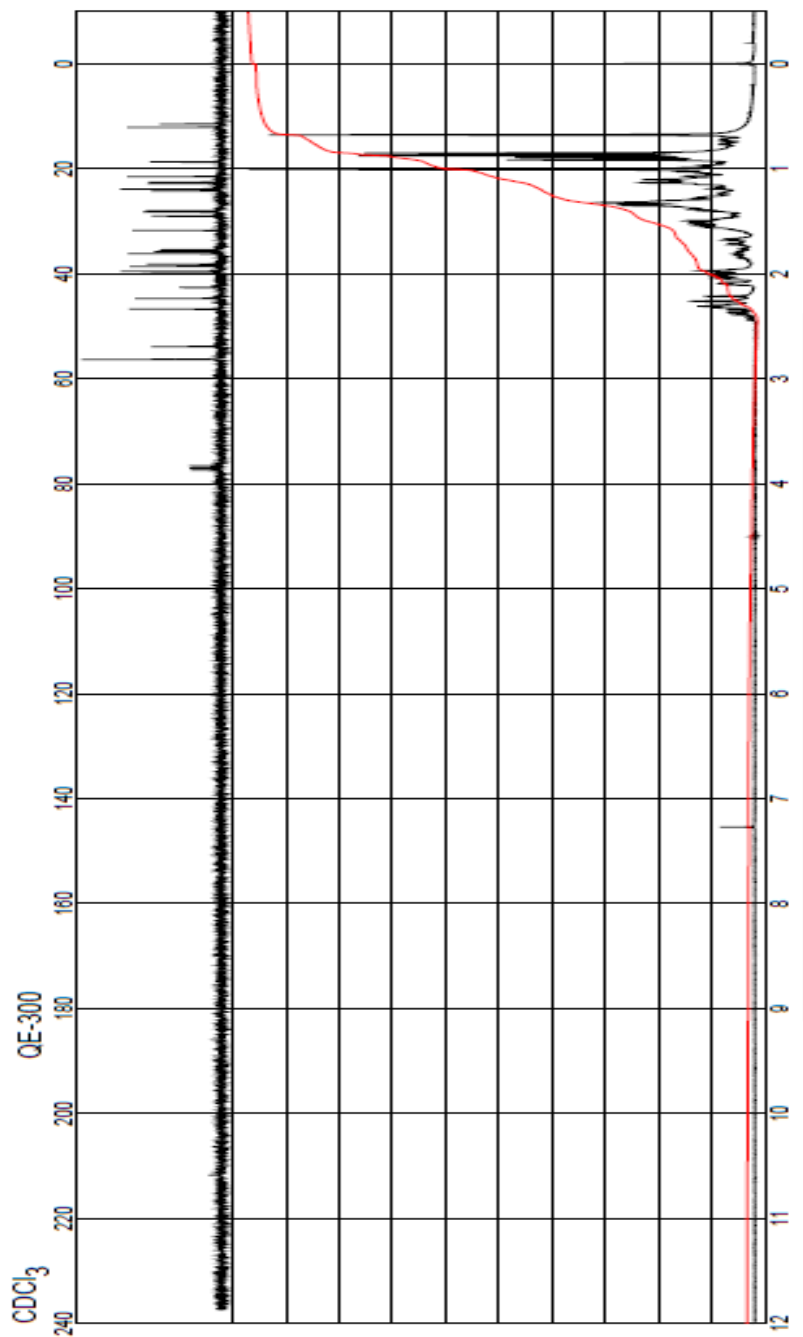


Figura 26 - Espectro de ^1H e ^{13}C de RMN fornecido pela sigma-aldrich da 5 α -coleston-3-ona.