



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Investigação das propriedades de interação e
propriedades catalíticas de ferro(III) porfirinas na oxidação de
um fármaco antimalárico”

Ádamo César M. A. dos Santos

Tese apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Investigação das propriedades de interação e
propriedades catalíticas de ferro(III) porfirinas na oxidação de
um fármaco antimalárico”

Doutorando: Ádamo César M. A. dos Santos

Orientadora: Marilda das Dores Assis

Tese apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2005

AGRADECIMENTOS

À meus pais, Darcy e Maria Cecília pelo apoio e incentivo. E por todas as lições de vida que me ensinaram. Amo vocês!

À Kátia, minha linda, por ter estado do meu lado nos momentos mais difíceis, por ter sempre acreditado em mim e no meu potencial e por nunca ter me deixado desistir.

Aos meus irmãos, Evelyn, Rômulo e Stéphanie pelos momentos de carinho e amizade desde nossa infância. Tenho orgulho de ser irmão de vocês.

À minha Vó Maria, minha segunda mãe, eu agradeço pela sua alegria contagiante e sua fé.

Aos meus tios Toninho e Tereza pelo apoio incondicional. Aos meus tios Luis, Lécio e Cleusa, Estela e Marcos, Laércio e Renata, José e Josiane. Ao meu cunhado Paulo e também a todos os meus primos pela amizade.

Agradeço ainda,

À Profa. Dra. Marilda das Dores Assis por me acolher em seu laboratório nos últimos 6 anos, por sua orientação e pelo seu esforço para conseguir a minha bolsa de doutorado.

Aos amigos do laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química da FFCLRP-USP: Carol, Débora, Faria, Guedes, Juvenal, Tati e Valéria pela amizade, colaboração e auxílio prestado

Ao Prof. John R. Lindsay-Smith, pelas suas sugestões e por ter me acolhido durante parte do meu doutorado em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco pelas sugestões, pelo laboratório e aparelhos cedidos durante a execução deste trabalho.

À Prof. Dra. Pierina Sueli Bonato pelas sugestões e, especialmente, pela cloroquina e metabólitos gentilmente cedidos, sem os quais não haveria este trabalho.

Aos técnicos Zanato, Mércia e Virginia, às secretarias Bel, Lâmia e a todos os funcionários deste departamento.

À CAPES pela bolsa “sandwich” de seis meses (Processo – BEX0779/04-0) que me permitiu realizar parte de meu doutorado na Inglaterra.

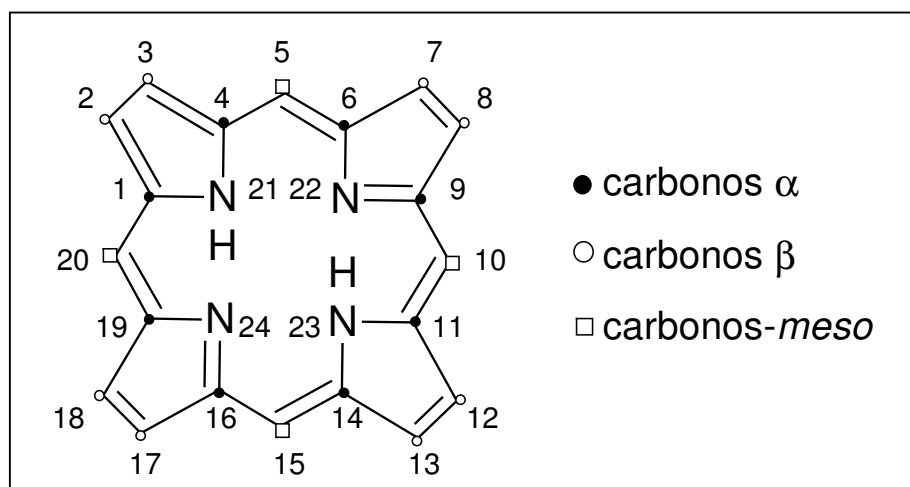
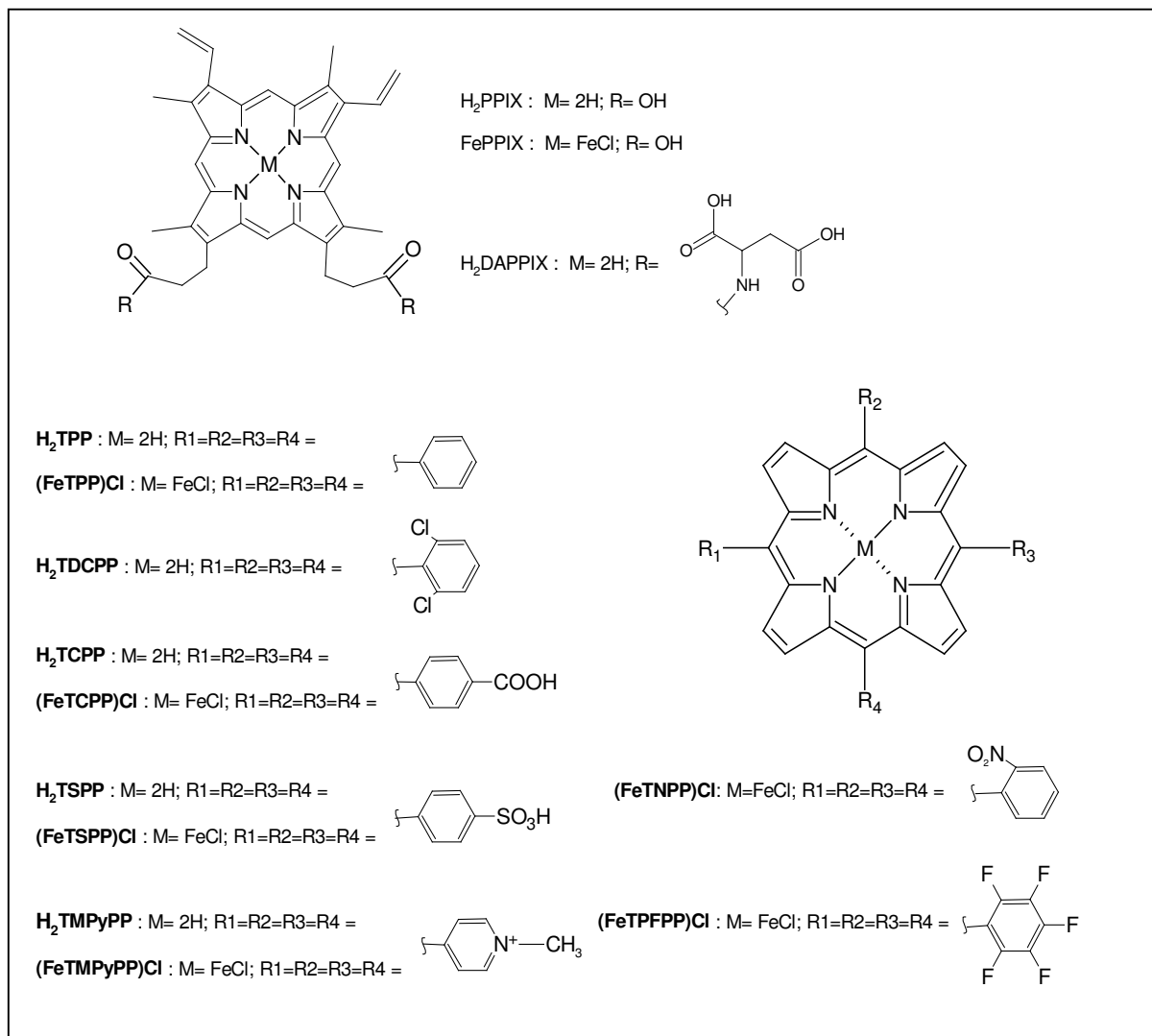
À FAPESP pela bolsa concedida (Bolsa de Doutorado Direto – Processo 02/04409-2) e pela reserva técnica, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ACT	Acetona
CBPA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
COSY(¹H,¹H)	Correlation Spectroscopy
CQ	Cloroquina
CYP-450	Citocromo P450
CYP-450_{cam}	Hidroxilase de canfôra da <i>Pseudomonas putida</i>
DCCI	Diciclohexilcarbodiimida
DCE	Dicloroetano
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMF	N, N' – Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
ES-MS	Espectrometria de Massas por Espalhamento de Elétrons
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FeP	Ferro(III) porfirina
FMN	Flavina mononucleotídica
HAc	Ácido acético
H₂P	Porfirina base-livre

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HRCI-MS	Espectrometria de massas de alta resolução por ionização química
I.V.	Infravermelho
MeOH	Metanol
MeP	Metaloporfirina
NADH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
PhIO	Iodosilbenzeno
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

ABREVIATURAS E ESTRUTURAS DAS PORFIRINAS E FERRO(III) PORFIRINAS ESTUDADAS



Numeração (segundo IUPAC) dos carbonos e nitrogênios (MILGROM, 1997)

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	06
ABREVIATURAS E ESTRUTURA DE PORFIRINAS.....	08
ÍNDICE.....	09
RESUMO	14
ABSTRACT.....	16
I. INTRODUÇÃO.....	18
I.1. Citocromo P-450.....	18
I.2. Compostos Modelos do Citocromo P-450.....	24
I.3. Oxidação de Fármacos.....	27
I.4.. Malária.....	29
I.5.. Drogas Antimalária: Cloroquina.....	32
II. OBJETIVOS.....	37
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
III.1. Materiais utilizados.....	39
<i>III.1.1. Reagentes.....</i>	<i>39</i>
<i>III.1.2. Tratamento dos reagentes.....</i>	<i>41</i>
III.1.2.1. Diclorometano.....	41
III.1.2.2. Trietilamina.....	41
III.1.2.3. Dimetilformamida.....	41
III.1.2.4. Sulfato de magnésio e peneira molecular 4Å.....	41
III.1.2.5. Diciclohexilcarbodiimida.....	41
III.1.2.6. Preparação do iodosilbenzeno.....	42
III.1.2.7. Determinação da pureza do iodosilbenzeno.....	42
III.2. Equipamentos e Dispositivos Utilizados.....	43

III. 3. Métodos.....	45
<i>III.3.1. Estudo espectrofotométrico das interações entre porfirinas de 2a. geração e a cloroquina.....</i>	<i>45</i>
<i>III.3.2. Análise dos metabólitos da cloroquina por CLAE.....</i>	<i>46</i>
III.3.2.A Recuperação dos metabólitos da cloroquina.....	46
III.3.2.B. Análise da cloroquina e seus metabólitos	46
III 3.2.C. Padronização do Método.....	46
<i>III.3.3 Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas usando iodosilbenzeno como oxidante.....</i>	<i>47</i>
<i>III.3.4 Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas (naturais e sintéticas) usando ácido meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio como oxidantes.....</i>	<i>48</i>
<i>III.3.5. Elucidação estrutural dos compostos desconhecidos formados na oxidação da cloroquina e análogos por iodosilbenzeno catalisada pela (FeT CPP)Cl.....</i>	<i>49</i>
<i>III.3.6. Oxidação de substratos orgânicos por iodosilbenzeno catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas imobilizadas em</i>	<i>suportes</i>
<i>sólidos.....</i>	<i>52</i>
III.3.6.A. Utilizando polidimetilsiloxano (PDMS) como suporte.....	52
III.3.6.B Utilizando quitosana como suporte.....	53
III.3.6.C - Padronização do cromatógrafo a gás pelo método de adição de padrão interno	55
<i>III.3.7. Síntese da H₂DAPPIX via ativação da H₂PPIX por trifluoroacetato de p-nitrofenol.....</i>	<i>57</i>

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
IV.1. Estudo espectrofotométrico das interações entre porfirinas sintéticas e cloroquina.....	58
<i>IV.1.1. Estudo espectrofotométrico da interação da cloroquina com porfirinas e ferro(III) porfirinas sintéticas em meio orgânico (MeOH:tampão fosfato pH 6,4; 10:1).....</i>	<i>59</i>
<i>IV.1.2. Estudo espectrofotométrico da interação da cloroquina com porfirinas sintéticas em tampão fosfato pH 6,4.....</i>	<i>61</i>
IV.2. – Análise dos metabólitos da cloroquina por CLAE.....	74
<i>IV.2.1. Recuperação dos metabólitos da cloroquina.....</i>	<i>74</i>
<i>IV.2.2. Análise da cloroquina e seus metabólitos.....</i>	<i>75</i>
<i>IV.2.3 Padronização do método de análise.....</i>	<i>76</i>
IV.3. – Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas usando iodosilbenzeno como oxidante.....	78
<i>IV.3.1. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno em MeOH.....</i>	<i>79</i>
<i>IV.3.2. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno em tampão fosfato 0,025 M, pH 6,4.....</i>	<i>83</i>
<i>IV.3.3. Análise dos produtos de oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno catalisada pela (FeTCPP)Cl, em função do tempo.....</i>	<i>86</i>
IV.4 – Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas (natural e sintéticas) usando ácido meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio como oxidantes.....	88
<i>IV.4.1. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio em MeOH.....</i>	<i>89</i>

IV.4.2. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por ácido meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,025 M, pH 6,4.....	95
IV.5. Elucidação estrutural dos compostos desconhecidos formados na oxidação da cloroquina e análogos por iodosilbenzeno catalisada pela (FeTCPP)Cl.....	97
IV.5.1. Síntese dos análogos da cloroquina.....	103
IV.6. Catálise heterogênea da oxidação de substratos orgânicos utilizando uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas e iodosilbenzeno como oxidante.....	117
IV.6.1. Utilizando polidimetilsiloxano (PDMS) como suporte.....	117
IV.6.1.A Caracterização por espectroscopia UV/Vis das metaloporfirinas ocluídas nas membranas poliméricas.....	120
IV.6.1.B. Atividade catalítica da FePPIX ocluída na membrana.....	121
IV.6.2. Utilizando quitosana como suporte.....	126
IV.6.2.A. Ancoragem em quitosana da (FeTPFPP)Cl por coordenação.....	127
IV.6.2.B. Ancoragem da (FeTPFPP)Cl em quitosana por ligação covalente.....	131
IV.6.2.C. Imobilização da (FeTCPP)Cl em quitosana por ligação covalente.....	133
IV.6.2.D. Estudo da atividade catalítica do sistema (FeTPFPP)Cl:quitosana e (FeTCPP)Cl:Quitosana na oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno.....	138
IV.6.2.E. Estudo da atividade catalítica assimétrica dos sistema (FeTCPP)Cl:Quitosana e (FeTPFPP)Cl:Quitosana na oxidação do estireno por iodosilbenzeno.....	139

IV.7.. Síntese da H ₂ DAPPIX via ativação da H ₂ PPIX por trifluoroacetato de p-nitrofenol.....	140
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	146
ANEXO A. Síntese, Purificação e Caracterização da H₂DAPPIX....	150
– Parte Experimental	150
– Resultados e Discussão	155
VI. REFERÊNCIAS.....	176

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas, por espectroscopia UV-Vis, as interações do fármaco anti-malária cloroquina com uma série de porfirinas *meso* fenilas substituídas aniônicas, catiônicas e neutras, e seus complexos Fe(III), em tampão aquoso e em solução metanólica. Com base nos resultados de interação, as ferro(III) porfirinas *meso* fenilas substituídas e a FePPIX foram utilizadas como catalisadores para a oxidação de cloroquina por iodossilbenzeno (PhIO) e peróxidos (H₂O₂ e ácido *meta*-cloroperbenzóico, CPBA), em ambos os meios.

Dos estudos de interação foi observado, em meio aquoso, pH 6,4, a formação de um complexo π - π , resultante do efeito cooperativo das interações eletrostáticas e da interação π - π entre as espécies aniônicas e a cloroquina. Em metanol nenhuma complexação π - π foi observada. As porfirinas e ferro(III) porfirinas neutras e catiônicas não formaram complexos com a cloroquina. As constantes de formação do complexo π - π entre as porfirinas ou ferro(III) porfirinas e cloroquina foram comparáveis àquelas relatadas na literatura para a cloroquina e outras ferro(III) porfirinas naturais.

As reações de oxidação foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O principal produto obtido em todos os sistemas estudados foi a monodesetilcloroquina. Este é também o principal produto "*in vivo*" da oxidação deste fármaco catalisada por CYP-450. A identificação do produto que é gerado em segunda maior quantidade, o derivado desetilamino da cloroquina, foi realizada por CLAE acoplada a espectrometria de massas.

Dos resultados das reações de oxidação com PhIO e H₂O₂ foi possível constatar que: as ferro(III) porfirinas aniônicas são os catalisadores mais eficientes, com rendimentos de até 30 % de monodesetilcloroquina; em solução aquosa elas são seletivas para a deetilação oxidativa da cloroquina, enquanto que em metanol até cinco produtos de oxidação podem ser observados. As ferro(III) porfirinas neutras apresentam baixa atividade catalítica na oxidação da cloroquina por PhIO ou H₂O₂ pois não interage eletrostaticamente com o substrato. As ferro(III) porfirinas catiônicas não apresentam atividade catalítica devido à repulsão eletrostática com o

substrato. As reações de oxidação por CPBA apresentaram baixos rendimentos devido à rápida destruição dos catalisadores quando se utilizou este oxidante.

Foram ainda realizados estudos catalíticos utilizando ferro(III) porfirinas suportadas em membrana de polidimetilssiloxano (PDMS) e poli-(1→4)-β-d-glucosamina (quitosana) na oxidação de substratos padrões (ciclocteno, cicloexano e estireno). Destes, apenas a quitosana se mostrou um suporte adequado, resultando em um catalisador eficiente. As ferro(III) porfirinas imobilizadas neste suporte foram utilizadas na oxidação da cloroquina por PhIO, levando aos mesmos rendimentos que estas ferro(III) porfirinas apresentaram em meio homogêneo, mostrando também a dependência interação(FeP:substrato)/atividade catalítica previamente observada para as ferro(III) porfirinas em solução.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as ferro(III) porfirinas aniônicas são eficientes catalisadores biomiméticos da oxidação da cloroquina por PhIO e H₂O₂, tanto em solução como imobilizados. Além disso, pode-se concluir que a habilidade do catalisador em interagir com o substrato apresenta forte influência na atividade catalítica e deve ser levada em consideração nos estudos de outros sistemas modelos do CYP-450.

ABSTRACT

In this work, the interaction between the antimalarial drug chloroquine with a series of anionic, cationic, and neutral *meso* phenyl substituted porphyrins; and their iron(III) complexes, was investigated by UV-Vis spectroscopy, in aqueous buffer and methanolic solution. On the basis of the interaction results, the *meso* phenyl substituted iron(III) porphyrins and FePPIX were used as catalyst in the oxidation of chloroquine by iodosilbenzene (PhIO) or peroxides (H_2O_2 e *meta*-chloroperbenzoic acid, CPBA), in both media.

From the interaction studies, it was possible to observe the formation of a π - π complex generated from the cooperative effect of the electrostatic and π - π interactions between the anionic species and chloroquine. In methanol, no complexation was observed. The neutral and cationic porphyrins and iron(III) porphyrins did not form complexes with chloroquine. The association constants of the π - π complex formed between the *meso* phenyl substituted porphyrins and iron(III) porphyrins with chloroquine were comparable with those reported in the literature for the interaction of chloroquine with others natural iron(III) porphyrins.

The oxidation reaction products were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The major product obtained in all the studied systems was monodesethylchloroquine. This compound is also the main "*in vivo*" product of chloroquine metabolism catalised by CYP-450. The identification of the second most abundant product, the desethylamine derived from chloroquine, was performed by HPLC coupled with mass spectrometry.

The results obtained from the oxidation reactions of chloroquine by PhIO and H_2O_2 indicated that:

- (i) the anionic iron(III) porphyrins are efficient catalysts, with yields close to 30 % for monodesethylchloroquine;
- (ii) in aqueous buffer they are selective toward the oxidative N-deethylation of chloroquine, while in methanol up to five oxidation products are obtained. The neutral iron(III) porphyrins presented low catalytic activity for the chloroquine oxidation by PhIO or H_2O_2 due to

the lack of electrostatic interaction between the catalyst and the substrate.

- (iii) The cationic iron(III) porphyrins did not exhibit any catalytic activity because of electrostatic repulsion that takes place between the catalyst and the substrate.

Catalyst degradation occurred when CPBA was used as oxidant, leading to very low yields of oxidation products.

Catalytic studies using iron(III) porphyrins supported in polydimethylsiloxane (PDMS) membranes and in poly-(1→4)-β-d-glucosamine (chitosan) were also performed for the oxidation of standard substrates (cyclooctene, cyclohexane and styrene). Only chitosan was considered to be an adequate support, resulting in efficient catalysis. The iron(III) porphyrins immobilized on this support were used for the oxidation of chloroquine by PhIO, leading to the same yields as those obtained with the same iron(III) porphyrins in homogeneous medium. It is noteworthy that the relations between the interaction FeP:substrate and the FeP catalytic activity previously observed for the iron(III) porphyrins in solution was also observed in these heterogeneous catalysis.

The results obtained in this work show that anionic iron(III) porphyrins are efficient biomimetic catalysts for the oxidation of chloroquine by PhIO and H₂O₂, both when supported and in solution. Also, the catalyst ability to interact with the substrate has a strong influence on its activity and must be considered when studying other CYP-450 model systems.

I. INTRODUÇÃO

I. 1. Citocromo P-450

Citocromo P450 (CYP-450) constitui uma superfamília de enzimas cruciais para o metabolismo oxidativo, peroxidativo, e redutivo de diversos grupos de compostos, desde endobióticos, como os esteróides, ácidos graxos e prostaglandinas, até xenobióticos, incluindo a maioria das drogas de ação terapêutica e agentes poluidores do meio ambiente (NELSON et al., 1996; BERTZ; GRANNEMAN, 1997). O primeiro relato da existência da enzima CYP-450 ou um “pigmento microsomal coordenante de monóxido de carbono”, como foi chamado na época, foi publicado em 1958 por Klingenberg (KLINGENBERG, 1958). Esta enzima possuía um pico de absorção ótica distinto em 450 nm, e quando foi reconhecido que era uma hemoproteína, foi-lhe dado o nome de citocromo P450 (OMURA, 1999).

Enzimas da família do CYP-450 são expressas em diferentes formas de vida: animais, plantas, fungos, e bactérias (NELSON et al., 1996). Elas parecem ser indispensáveis para espécies eucariontes, mas não para procariontes, uma vez que

certas bactérias não possuem enzimas da família do CYP-450 (NELSON, 1999). Eucariontes precisam da CYP-450 para a biossíntese de esteróides, que são constituintes da membrana plasmática (OMURA, 1999). Enzimas CYP-450 de eucariontes são ligadas à membranas, geralmente localizadas no retículo endoplasmático, mas algumas CYP-450s estão presentes nas membranas internas das mitocôndrias. Apesar de possuir similaridades menores que 20% em sua seqüência de aminoácidos as diferentes famílias de CYP-450s possuem uma conformação estrutural semelhante, apresentando uma alta conservação da região central (DENISOV, 2005).

Estima-se que nos humanos existem pelo menos 53 diferentes genes para enzimas da família do CYP-450. A grande diversidade destas enzimas deu origem a uma classificação sistemática das formas individuais em famílias e subfamílias (Tabela 1). A seqüência de proteínas dentro de uma dada família é pelo menos 40% idêntica (por exemplo, CYP2A6 e CYP2B6), e a seqüência dentro de uma subfamília é mais que 55% idêntica (por exemplo, CYP2A6 and CYP2A7) (NELSON, 1996). Atualmente são conhecidas 17 famílias diferentes em humanos. As enzimas nas famílias de 1-3 são mais ativas no metabolismo de xenobióticos, enquanto as demais famílias tem funções endógenas importantes (Tabela 1).

Tabela 1. Família de CYP-450 em humanos e suas principais funções. (GONZALEZ, 1992; NELSON et al., 1996; WHITE et al., 1997; NELSON, 1999, LUND et al., 1999).

Família CYP	Principal Função
CYP1	Metabolismo de Xenobióticos
CYP2	Metabolismo de Xenobióticos Metabolismo do ácido araquidônico
CYP3	Metabolismo de xenobióticos e esteróides
CYP4	Hidroxilação de ácidos graxos
CYP5	Síntese do tromboxano
CYP7	Hidroxilação 7α do colesterol

Família CYP	Principal Função
CYP8	Síntese da prostaciclina
CYP11	Quebra da cadeia lateral do colesterol, hidroxilação 11β de esteróide
	Síntese da aldosterona
CYP17	Hidroxilação 17α de esteróide
CYP19	Aromatização de andrógeno
CYP21	Hidroxilação 21 de esteróide
CYP24	Hidroxilação 24 de esteróide
CYP26	Hidroxilação do ácido retinóico
CYP27	Hidroxilação 27 de esteróide
CYP39	Desconhecida
CYP46	Hidroxilação 24 do colesterol
CYP51	Biossíntese de esterol

As reações catalisadas pelo CYP-450 requerem dois elétrons (fornecidos por proteínas redox), oxigênio molecular e dois prótons. Elas ocorrem via uma espécie oxidante ativa que controla a inserção de um átomo de oxigênio no substrato. Para a maioria das bactérias e todas as mitocôndrias de eucariontes os sistemas CYP-450 (CYP-450 + proteínas redox) são constituídos por três sistemas de proteínas (MILES et al., 2000). Nos sistemas da classe I tem-se uma proteína FAD NADH-dependente contendo ferredoxina redutase, uma ferredoxina e o próprio CYP-450. Já os sistemas CYP-450 microsomal de eucariontes (aqueles associados com o retículo endoplasmático) são compostos por dois componentes (classe II): uma diflavina (contendo FAD e FMN) redutase NADPH-dependente e o CYP-450. Na terceira classe (classe III), da qual o sistema representativo é o CYP-450 BM3 bacterial tem-se também a diflavina (contendo FAD e FMN) NADPH-dependente redutase e o CYP-450, similares àqueles da classe II, mas fundidos num único componente. Uma ilustração esquemática destes sistemas está apresentada na Figura 1.

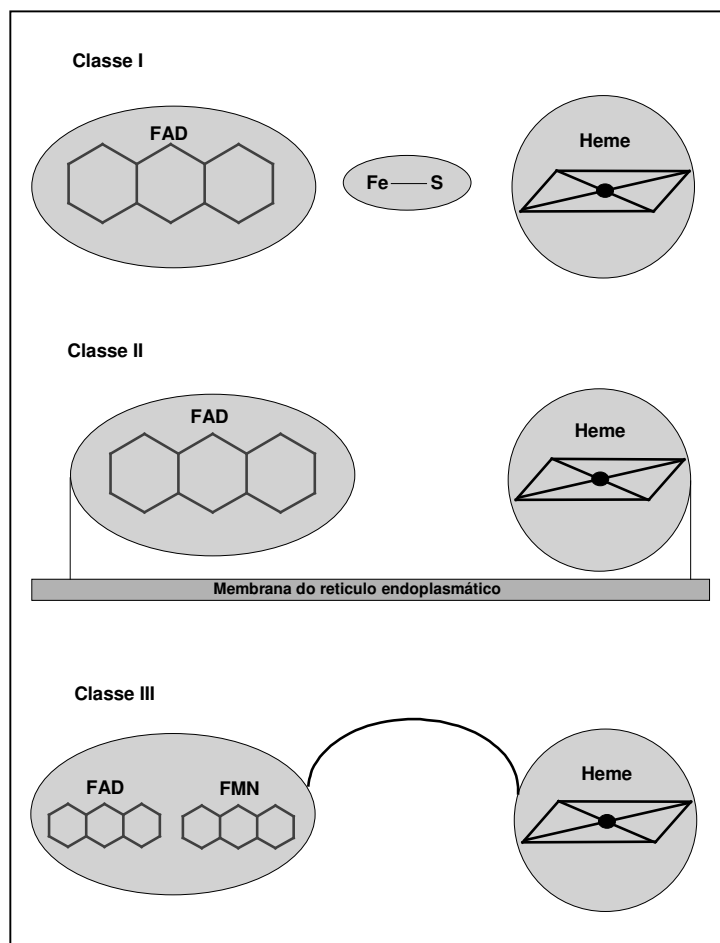


Figura 1. Ilustração esquemática dos sistemas envolvendo CYP-450 (MILES et al., 2000)

O CYP-450, em todos estes sistemas, é constituído por duas partes distintas, como mostra a Figura 2. Uma parte diz respeito à matriz protéica, que é constituída de uma cadeia polipeptídica com peso molecular entre 40 e 60 kD. Esta estrutura protéica é responsável por fornecer um ambiente hidrofóbico para a ligação e orientação do substrato. Assim, a seletividade é resultado da variação na seqüência dos aminoácidos da cadeia polipeptídica e, conseqüentemente, da estrutura da apoproteína na qual o substrato se fixa. A outra parte é o sítio catalítico, constituído por um grupo prostético, o grupo heme, representado pela ferro(III) protoporfirina IX (Figura 3). O ferro(III) central do grupo heme está ligado ao grupo tiolato de uma cisteína (ligante proximal) e, durante o estado de repouso, a uma molécula de água (ligante distal), que é o sitio ativo no qual ocorre a ativação do oxigênio molecular (MONTELLANO, 1995).

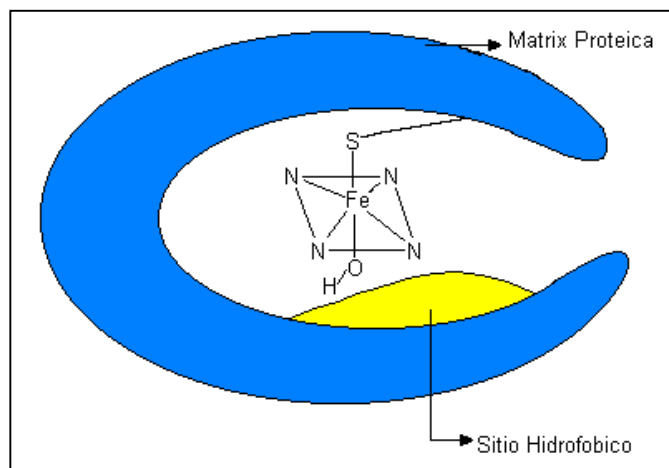


Figura 2: Estrutura esquemática do citocromo P-450 (MONTELLANO, 1995).

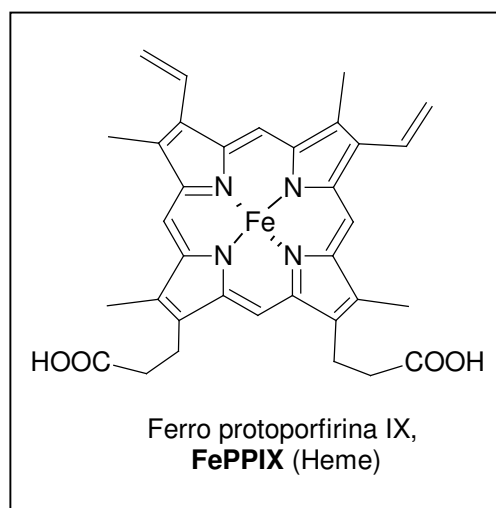


Figura 3. Fórmula estrutural da FePPIX.

O ciclo da reação é representado na Figura 4. As informações mecanísticas deste ciclo vêm, em sua maioria, de estudos realizados para o sistema CYP-450_{cam}, e geralmente é assumido válido para todos os CYP-450s (DENISOV et al., 2005). No início do ciclo, o ferro(III) baixo “spin” central da enzima se encontra num estado de repouso(1). Com a aproximação do substrato à região próxima ao heme o ferro (III) usualmente muda seu estado de “spin” de baixo para alto “spin”(2). Nessas condições o ferro(III) é facilmente reduzido para a ferro(II) (2) que coordena rapidamente ao oxigênio molecular (3). A redução deste intermediário ocorre em etapas: primeiro tem-se a formação do intermediário ferro(III) peroxo (5a); em

seguida este é protonado ao respectivo hidropéroxido (**5b**). Uma segunda protonação leva a quebra heterolítica da ligação O-O e a formação de um intermediário radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion, $\text{Fe(IV)OP}^{\bullet+}$ (similar ao composto I das peroxidases), e a liberação de uma molécula de água (**6**). Por fim, o intermediário radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion ataca o substrato, resultando na monooxigenação do composto (**7**).

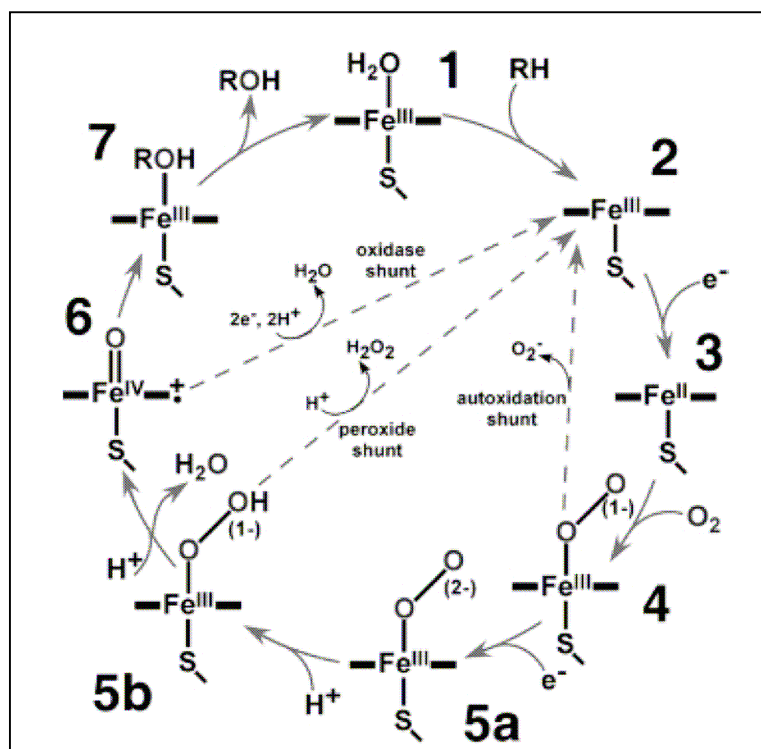


Figura 4. Ciclo catalítico do P-450 (DENISOV et al., 2005).

A presença em organismos tão diferentes, tanto nas bactérias como no homem, e a diversidade de substratos do CYP-450s que vão desde moléculas pequenas, como o óxido nítrico (NAKAHARA et al, 1997) até moléculas grandes, como o colesterol (PIKULEVA et al., 1995) mostra a importância que as reações de oxidação catalisadas por estas enzimas apresentam, tanto nas vias metabólicas quanto biossintéticas. Esta diversidade é atribuída, principalmente, à sua matriz protéica, que embora apresente conformação semelhante entre as várias famílias de CYP-450, é responsável pela regio- e estereosseletividade das reações as quais, em oxidações convencionais, são dificilmente obtidas devido à reatividade do oxigênio. Esta seletividade é um dos pontos de maior interesse no estudo de compostos modelos do citocromo P-450.

I.2.Compostos Modelos do Citocromo P-450

Em 1978, Groves et al, utilizando iodosilbenzeno como doador de oxigênio e uma porfirina sintética, o cloreto de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina ferro(III), (FeTPP)Cl, foi capaz de mimetizar a ação do citocromo P450 e oxidar o cicloexeno à uma mistura de epóxido e álcool alílico (3,6:1), e a hidroxilar o cicloexano à uma mistura de cicloexanol e cicloexanona (15:1), com um rendimento de 8%. (GROVES; NEMO; MYERS, 1979; GROVES; KRUPER JR, 1979)

As metaloporfirinas tetra-aril substituídas como as usadas por Groves apresentaram, no entanto, uma degradação oxidativa muito rápida, especialmente na oxidação de substratos pouco reativos como os alcanos (MANSUY;BATTIONI, 1994; GUNTER; TURNER, 1990). Em substituição a estas metaloporfirinas, chamadas catalisadores de primeira geração (MEUNIER et al., 2000), novas porfirinas com substituintes volumosos, geralmente eletronegativos, nas posições *orto* dos grupos *meso*-arila foram sintetizadas, estes catalisadores de segunda geração, como foram chamados, apresentam maior estabilidade e conseqüentemente maior rendimento dos produtos oxidados (da ordem de 70 %). A presença destes substituintes mais eletronegativos tornou as metaloporfirinas mais resistentes aos ataques eletrofílicos dos agentes oxidantes, o que leva a um aumento da resistência do catalisador (TRAYLOR et al., 1984). Foram obtidas metaloporfirinas ainda mais resistentes pela substituição dos hidrogênio das posições β dos anéis porfirínicos por substituintes mais eletronegativos (como F, Cl ou NO₂). Estes catalisadores de terceira geração são, especialmente para a hidroxilação de alcanos lineares pouco reativos, mais eficientes, pois a introdução de substituintes halogenados no anel pirrólico provoca uma variação na reatividade e na regioselectividade da espécie intermediária ativa ferro(IV)-oxo de alta valência (TRAYLOR, 1991).

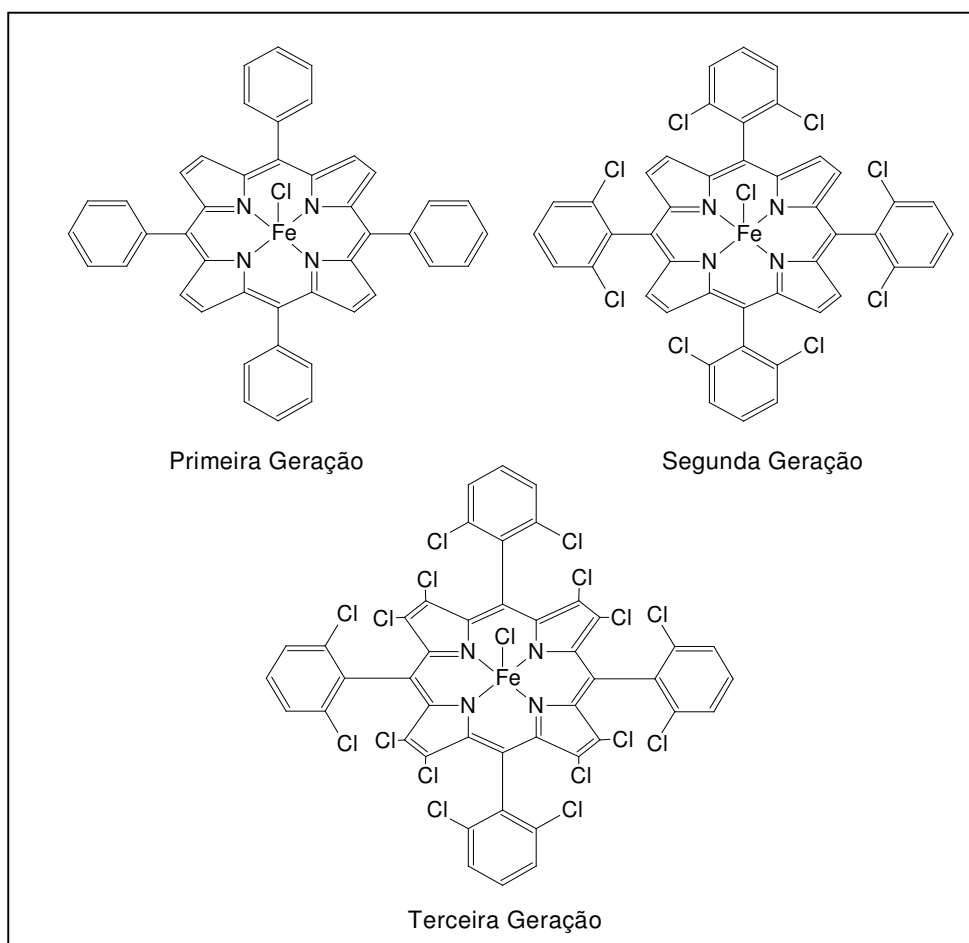


Figura 5 - As diferentes gerações de catalisadores metaloporfíricos (MEUNIER et al., 2000).

As propriedades físicas e químicas das diferentes gerações de metaloporfirinas são fortemente influenciadas pelos grupos substituintes no macrociclo (Figura 5). As variações na conformação destes compostos causam alteração nas propriedades químicas como potencial de redução, atividade catalítica e em propriedades físicas como solubilidade e estabilidade dos estados excitados (Figura 6). Logo, a manipulação dos grupos substituintes é um modo simples para modular em uma larga faixa as propriedades químicas e físicas de derivados porfíricos (FAJER, 1991).

Na área de catálise, os refinamentos dos sistemas catalíticos incluem modificações dos substituintes nos anéis porfíricos e ancoragem das metaloporfirinas em suportes sólidos inertes, sempre visando maior seletividade na

catálise. Além das variações conformacionais, a presença de substituintes polares, como aminoácidos e éteres de coroa (“crown” éteres), favorece interações com o substrato que podem aumentar a seletividade das metaloporfirinas na catálise. No caso da ancoragem busca-se aumentar o período de vida útil do catalisador, impedindo sua degradação e facilitando sua recuperação do meio reacional, além de mimetizar a regio- e estereosseletividade obtida pela presença da matriz hidrofóbica do citocromo P450.

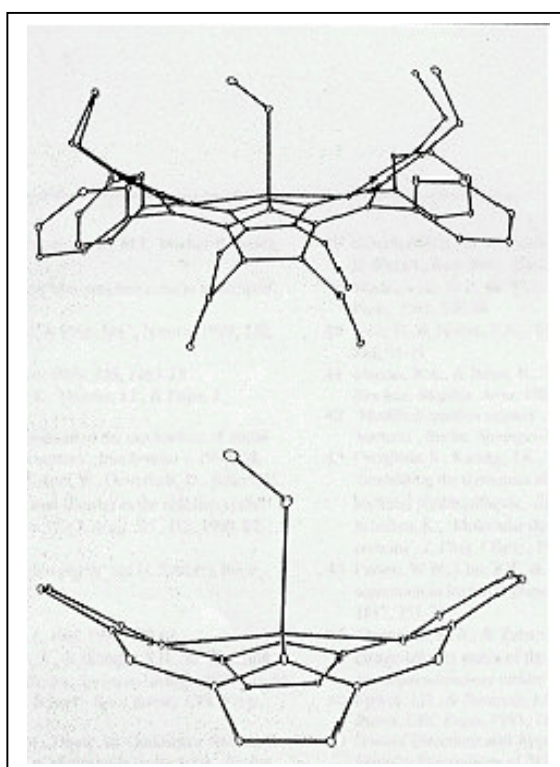


Figura 6. Efeito dos substituintes *meso* na conformação estrutural da zinco octaetil-tetrafenil porfirina, *acima* com substituintes, *abaixo* sem substituintes (FAJER, 1991)

Compostos modelos, capazes de mimetizar o mecanismo de monooxigenação do citocromo P-450, têm recebido muita atenção nas últimas décadas como catalisadores biomiméticos na oxidação de drogas e fármacos (BERNADOU; MEUNIER, 2004). Como já mencionado, o citocromo P-450 é uma das principais enzimas responsáveis pela monooxigenação de compostos endógenos e xenobióticos em organismos vivos, sendo a enzima mais importante em relação ao metabolismo destes últimos. A utilização de enzimas naturais na

oxidação de drogas e fármacos apresentam desvantagens relacionadas à produção e purificação dos metabólitos formados, tornando o uso de compostos modelos uma alternativa interessante.

I.3.Oxidação de Fármacos

O conhecimento do metabolismo oxidativo de xenobióticos, catalisado pelo citocromo P-450, é fundamental no estudo de novos fármacos, pois o metabolismo pode levar tanto à formação de compostos com atividade terapêutica igual ou superior ao composto original quanto à metabólitos com alta toxicidade.

Vários métodos foram utilizados no decorrer dos anos com o intuito de desenvolver modelos práticos capazes de prever o metabolismo de drogas candidatas a fármacos e, eventualmente, produzir em larga escala metabólitos que apresentem uma síntese complicada. Os métodos variam de experimentos diretos com animais ao uso de enzimas, como peroxidases e citocromo P-450 monooxigenases (MEUNIER, 1992; MANSUY,1993; SHELDON, 1994; FEITERS, 2000). Contudo, vários problemas podem ser associados ao uso dessas técnicas (BERNADOU; MEUNIER, 2004).

- i. estudos com animais são dispendiosos e necessitam do sacrifício do animal
- ii. o uso de microssomo leva à rendimentos não reprodutíveis
- iii. o isolamento de intermediários reativos que podem se ligar a polímeros biológicos em oxidações catalisadas por enzimas é difícil e os metabólitos primários são frequentemente hidrofílicos, dificultando sua separação, especialmente daqueles desconhecidos.

Por estes motivos modelos funcionais, como as metaloporfirinas, que permitem um estudo relativamente simples da atividade intrínseca do sítio ativo das enzimas CYP-450 têm recebido grande atenção. Estes modelos fornecem informações importantes, como por exemplo, sobre o mecanismo e possíveis rotas do metabolismo de drogas exógenas.

Infelizmente o uso da FePPIX (Figura 3), o grupo prostético do CYP-450, como modelo tem se mostrado muito difícil devido à auto-degradação sofrida pela

metaloporfirina na ausência da matriz protéica. Em vez disso, devido a sua maior estabilidade, uma série de metaloporfirinas sintéticas vêm sendo utilizadas (BERNADOU; MEUNIER, 2004).

Um grande número de metaloporfirinas já foi utilizado no estudo *in vitro* do metabolismo de várias drogas como lidocaína, antergan, carbamazepina, entre outras (BALOGH; KESERÜ, 2004). Estes estudos mostram que um controle das condições de reação pode levar à produção de determinado metabólito de interesse, o que não pode ser realizado em condições normais. A habilidade biomimética destes compostos pode ser constatada ao se observar que os 15 metabólitos formados pela reação da $Mn(TPFPP)X/H_2O_2$ /piridina¹ com 1-metil-4-piperidil benzilato são praticamente os mesmos obtidos *in vivo* no metabolismo de ratos (BERNADOU; MEUNIER, 2004). Outro exemplo é a oxidação do fármaco anti-helmíntico albendazol por PhIO, catalisada pela ferro(III) *meso*-tetrakis(2-nitrofenil)- β -octacloroporfirina, $Fe(TNPCl_8P)$, para formar os mesmos metabólitos sulfóxido e sulfona obtidos *in vivo* (MAURIN et al., 2003.).

Embora citocromos P-450 monooxigenases e, em menor extensão, peroxidases e catalases sejam as principais enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de xenobióticos *in vivo*, seus compostos modelos como as metaloporfirinas, associadas a um doador de oxigênio, podem, em alguns casos, serem oxidantes muito fortes o que torna necessário o uso de oxidantes mais brandos. Um exemplo do forte poder oxidante destes compostos modelos é o comportamento da droga espasmolítica denaverina, em sistemas aquosos e não-aquosos, baseados em ferro(III) porfirinas/ H_2O_2 /imidazol ou piridina quando comparado com o metabolismo *in vivo* de ratos e humanos (BASSOLI, 1989). Embora apenas dois produtos sejam obtidos *in vivo* no ser humano, o sistema modelo forneceu também os vários metabólitos obtidos em ratos, além de outros compostos ausentes no metabolismo de ambas as espécies (Figura 7).

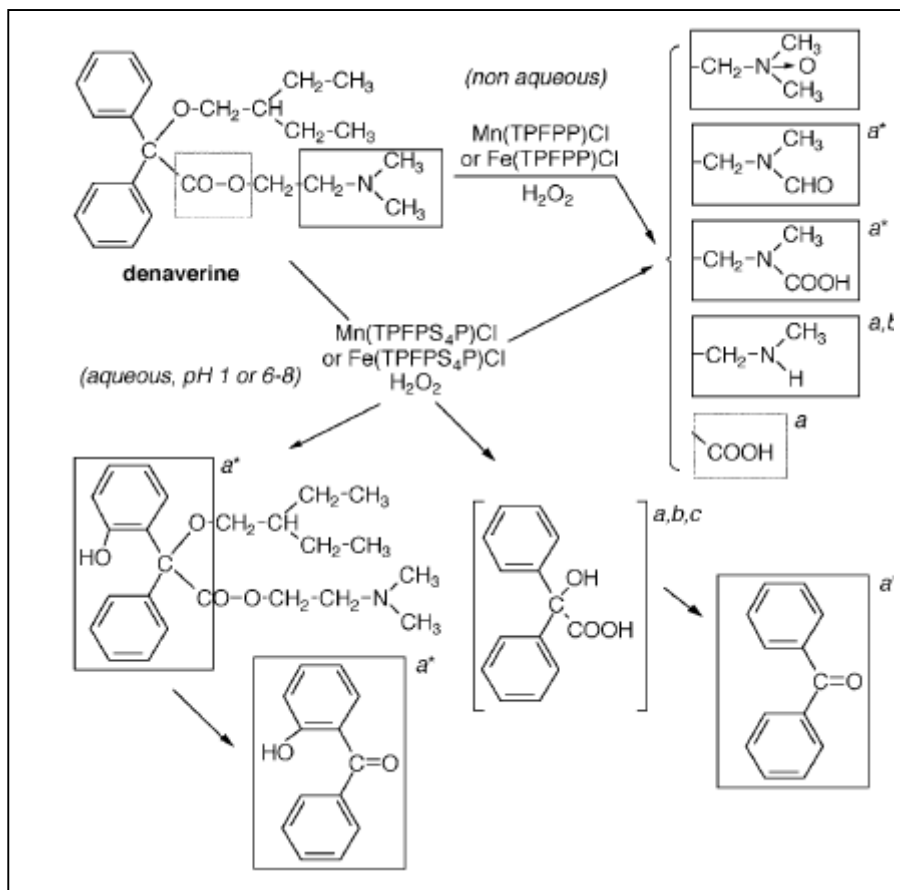


Figura 7. Oxidação biomimética da denaverina em comparação com seu metabolismo *"in vivo"*. ^a Metabolismo do rato ^b metabolismo do homem ^c detectado como éster metílico devido à presença de metanol na reação ^d detectado, mas não identificado.

Sendo assim, o estudo de metaloporfirinas menos reativas como catalisadores de oxidação de drogas e fármacos é um campo de pesquisa interessante, tanto para a medicina como para a indústria de remédios. Para tanto, é necessário encontrar a combinação certa entre substituintes, oxidante e condições reacionais, que permitam obter um catalisador capaz de unir altos rendimentos dos produtos à procedimentos em escala industrial economicamente viável.

I.4. Malária

A *malária*, contra a qual *não estão disponíveis vacinas*, é uma doença infecciosa, potencialmente grave, causada por parasitas (protozoários do gênero *Plasmodium*), que são transmitidos de uma pessoa para outra principalmente pela

picada de mosquitos (*Anopheles*). Estima-se que 2073 milhões de pessoas estão expostas ao risco da malária e algo em torno de 270 milhões estão contaminadas com o parasita, levando a um milhão de mortes por ano (WHO, 2005). Cerca de 40% da população mundial vive em áreas com risco de transmissão de *malária*, resultando em não menos que 300 milhões de pessoas infectadas no mundo a cada ano. A transmissão ocorre em países da América Central, América do Sul, América do Norte (México), África sub-saariana, da Índia, do Sudeste da Ásia, do Oriente Médio, e da Oceania, entretanto, mais de 90% dos casos ocorrem em países africanos, com um número de mortes entre 1 e 1,5 milhões. Os problemas são mais graves em áreas de conflitos armados e deslocamentos de refugiados, e nas "fronteiras" de desenvolvimento econômico da América do Sul e do Sudeste da Ásia. Esta situação tende a piorar uma vez que os parasitas da malária, em especial o *Plasmodium falciparum*, vêm aumentando sua resistência às drogas antimalárias, em especial à cloroquina (O'NEILL, 1998). Este cenário torna necessário o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos e de novas drogas, mais ativas e com menor índice de resistência.

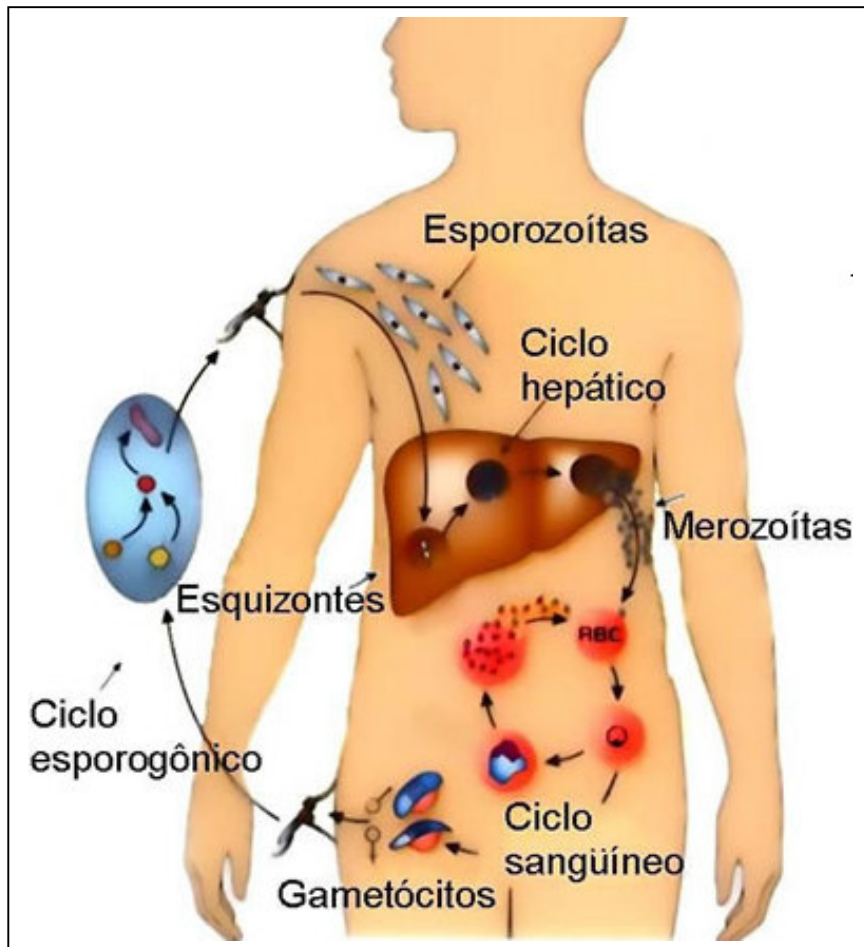


Figura 8. Ciclo de vida da Malária (CANAL CIÊNCIA, 2003)

A infecção pela malária começa quando o mosquito do gênero *Anopheles* inocula no ser humano os protozoários na sua forma infectante (esporozoítas) (Figura 8). Eles circulam pelo sangue, fora das células, por cerca de uma hora. Chegam então às células do fígado (hepatócitos). Nessa fase inicia-se o ciclo hepático ou pré-eritrocítico. Assim que começam as divisões nucleares, os parasitas passam a ser chamados esquizontes e, no fim do ciclo hepático, dão lugar à formação de milhares de elementos filhos: os merozoítas. O ciclo hepático dura de 6 a 16 dias, dependendo da espécie do *Plasmodium*. A célula hepática rompe-se liberando os merozoítas, muitos dos quais são fagocitados e destruídos. Os sobreviventes invadem as hemácias e dão início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo eritrocítico ou ciclo sanguíneo (Figura 8). Neste

ciclo, o parasita da malária digere a hemoglobina do sangue quebrando-as em seus aminoácidos e em uma grande quantidade de ferro(III) protoporfirina IX (FePPIX), que por sua vez é tóxica para o parasita. No vacúolo digestivo do parasita, a FePPIX liberada agrega formando um composto insolúvel conhecido como β -hemozoina ou pigmento da malária (FOLEY, 1998), o que elimina a toxicidade da FePPIX. Depois de algum tempo de evolução da infecção malárica, aparecem no interior das hemácias algumas formas que já não se dividem, denominadas gametócitos. Esta forma do parasita infecta o inseto que vem alimentar-se deste hospedeiro, fechando o ciclo no homem e assegurando a continuidade da espécie. No aparelho digestivo do inseto os gametócitos sofrem novas mudanças até se tornarem novamente esporozoítas, que infectarão uma nova pessoa (UNIFESP, 1997).

I.5.Drogas Antimalária: Cloroquina

Um vasto número de classes de drogas vêm sendo usadas no combate à malária. Estas são derivadas da quinina (Figura 9; **1**) que é encontrada na casca de árvores cinchona, e que por muito tempo foi usada no tratamento desta doença. Na década de 20, descobriu-se que a pamaquina (Figura 9; **2**) apresentava maior ação antimalária que a quinina. Estudos posteriores mostraram que variações no núcleo quinolina e na cadeia lateral 4-amino afetavam tanto a atividade antimalária quanto a toxicidade da droga. Destes estudos iniciais ficou claro que a cloroquina (Figura 9; **3**) era o agente mais efetivo, e variações estruturais levaram à descoberta da hidroxicloroquina (Figura 9; **4**), que apresentava uma toxicidade 3 vezes menor e mesma atividade antimalária. Em 1948, um grupo de 122 heterocíclicos α -dialquil amino-*o*-cresol e grupos benzilaminas foram sintetizados, buscando determinar o melhor agente antimalária. Estes estudos apontaram a amodiaquina (Figura 9; **5**) como aquela com melhor razão atividade/toxicidade (O'NEILL, 1998). A maioria destas drogas age no estágio eritrocítico, com exceção da primaquina (Figura 9; **6**), que é usada contra as formas de parasitas que agem no fígado (*P. vivax* e *P. ovale*).

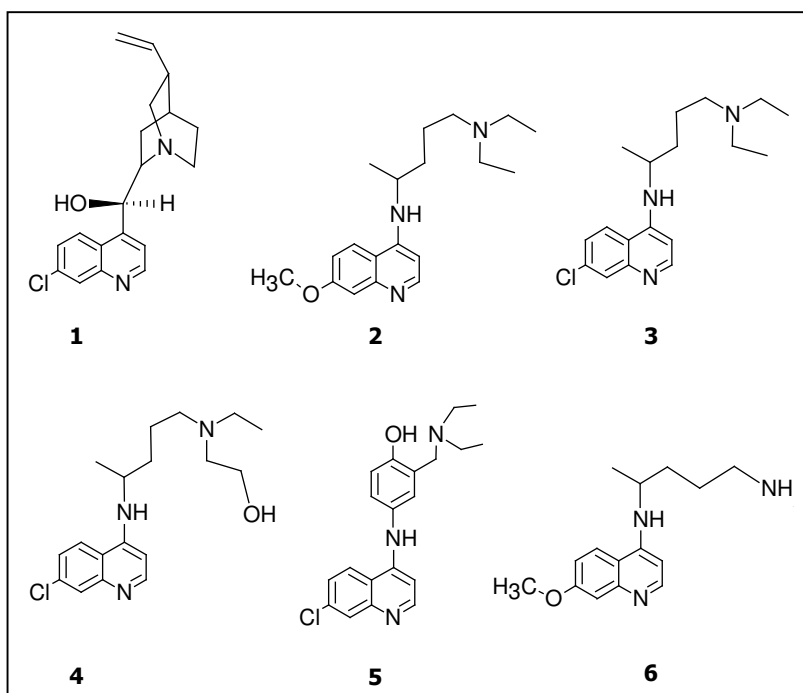


Figura 9 – Fórmula estrutural das classes de drogas antimalária (O'NEILL, 1998), 1. Quinina, 2. Pamaquina, 3. Cloroquina, 4. Hidroxicloroquina, 5. Amodiaquina, 6. Primaquina.

Apesar de décadas de estudos, ainda existe muita controvérsia a respeito do mecanismo de ação destes fármacos 4-aminoquinolínicos, sabendo-se apenas que sua interação com o anel heme é de principal importância na atividade biológica destes compostos. Existem várias hipóteses a respeito destes mecanismos, a mais aceita afirma que estes fármacos impedem a formação da β -hemozoina, mantendo a FePPIX, tóxica ao parasita, em solução (OLLIARO, 2001). Para isso eles se intercalam entre as FePPIX e impedem a ligação entre o grupo carbóxi de uma FePPIX ao ferro(III) central de outra molécula (Figura 10). Acredita-se que empacotamentos do tipo π - π "stacking" entre o anel porfirínico e o grupo quinolina sejam responsáveis por estabilizar a posição das drogas antimalárias sobre a FePPIX. Existe uma segunda interação envolvendo o grupo carbóxi da FePPIX e a ramificação carregada da droga (Figura 11) (O'NEILL, 1998).

Um substrato interessante para estudos de modelos biomiméticos é a cloroquina (Figura 9.3) que, em soluções aquosas, é capaz de formar complexos

π - π com a FePPIX. Estudos recentes mostraram também que a complexação possui, em meio aquoso, um efeito inibidor tanto na atividade de catalase da FePPIX como em sua atividade de peroxidase, sendo a inibição mais significativa no primeiro caso (RIBEIRO et al., 1995, RIBEIRO et al., 1997). Também foi mostrado que, em reações envolvendo a FePPIX e peróxido de hidrogênio, estas interações protegem a ferro(III) porfirina da degradação auto-oxidativa (RIBEIRO et al., 1997), indicando que este complexo pode ser adequado para reações de oxidação catalítica.

O estudo de interação e oxidação deste fármaco usando compostos modelos do citocromo P-450 passa a ser de grande interesse para elucidar o metabolismo desta ou de seus metabólitos. Além disso, espera-se que estes compostos modelos sejam capazes de, ao interagir com o substrato, apresentar uma seletividade similar àquela do sistema enzimático (RIBEIRO et al., 1997).

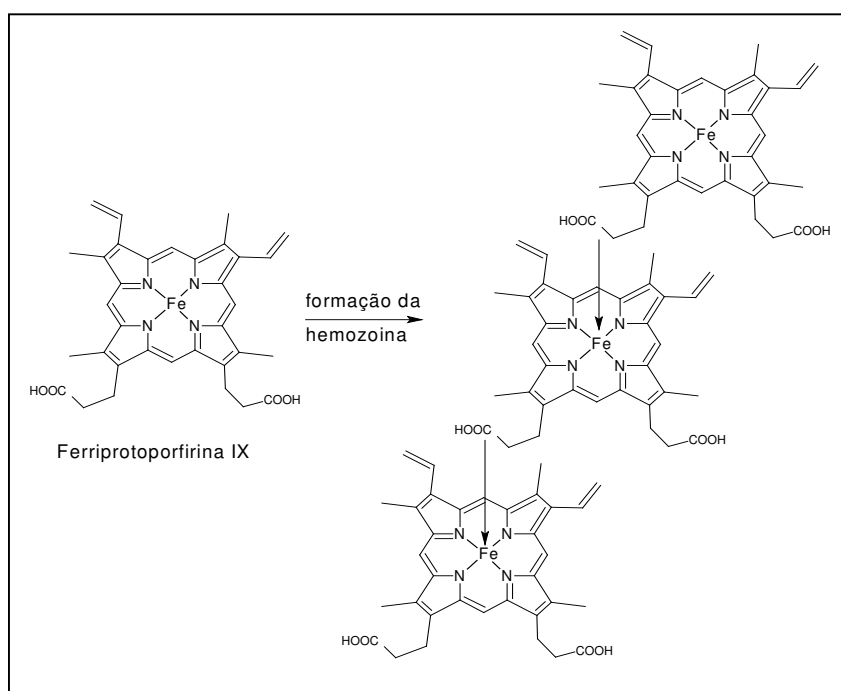


Figura 10. Formação da Hemozoina (O'NEILL, 1998)

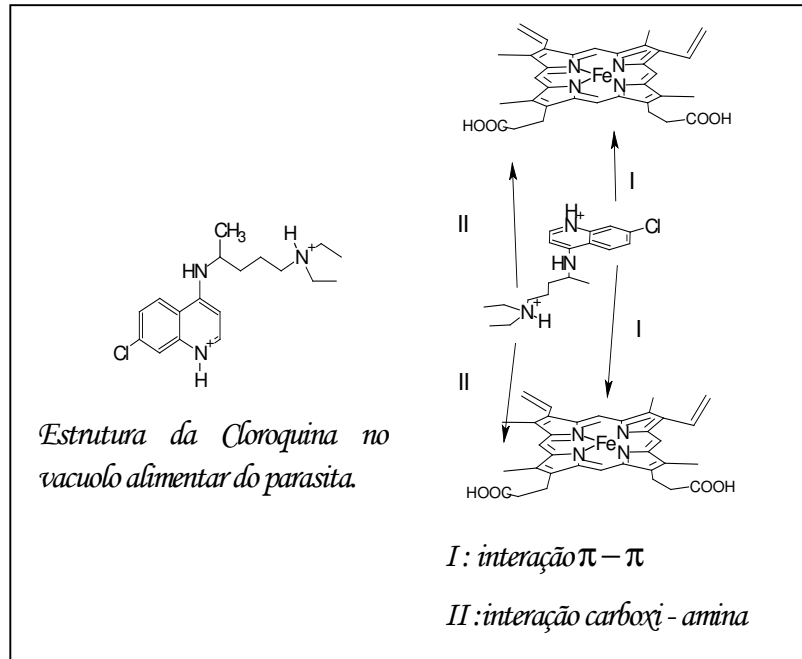


Figura 11. Interações entre amodiaquina e FePPIX

Espera-se que o metabolismo destas drogas seja complexo, uma vez que estes compostos possuem vários grupos reativos em sua estrutura. Estudos recentes do papel de diversas sub-famílias do citocromo P-450 na produção de metabólitos oxidados destas drogas vêm sendo realizados. Estes apontam os metabólitos como responsáveis pela toxicidade das drogas antimalárias em animais e humanos (FOLEY, 1998). Tem-se, por exemplo, o caso da amodiaquina; acredita-se que pelo menos um dos metabólitos formados (Figura 12, **A**), de maior concentração na corrente sanguínea, seja o responsável pela ação antimalária deste fármaco, que seria então uma pró-droga. Por outro lado, o citocromo P-450 também atua na bioativação da amodiaquinona, oxidando o grupo hidróxi e levando à formação do grupo quinona imina (Figura 12, **C**). Nesta forma ativada a amodiaquina conjuga com a glutathiona (GSH) (Figura 12, **D**) formando um novo composto. Ambas as espécies podem se ligar em seguida à macromoléculas e assim afetar o funcionamento das células, diretamente ou via atividade imunológica (O'NEILL, 1998). Resultados semelhantes foram observados para outras drogas antimalárias, como a primaquina e a mefloquina, nos quais os derivados carbóxi são os principais metabólitos observados (VÁSQUEZ-VIVAR, 1992, FONTAINE *et al.*, 2000).

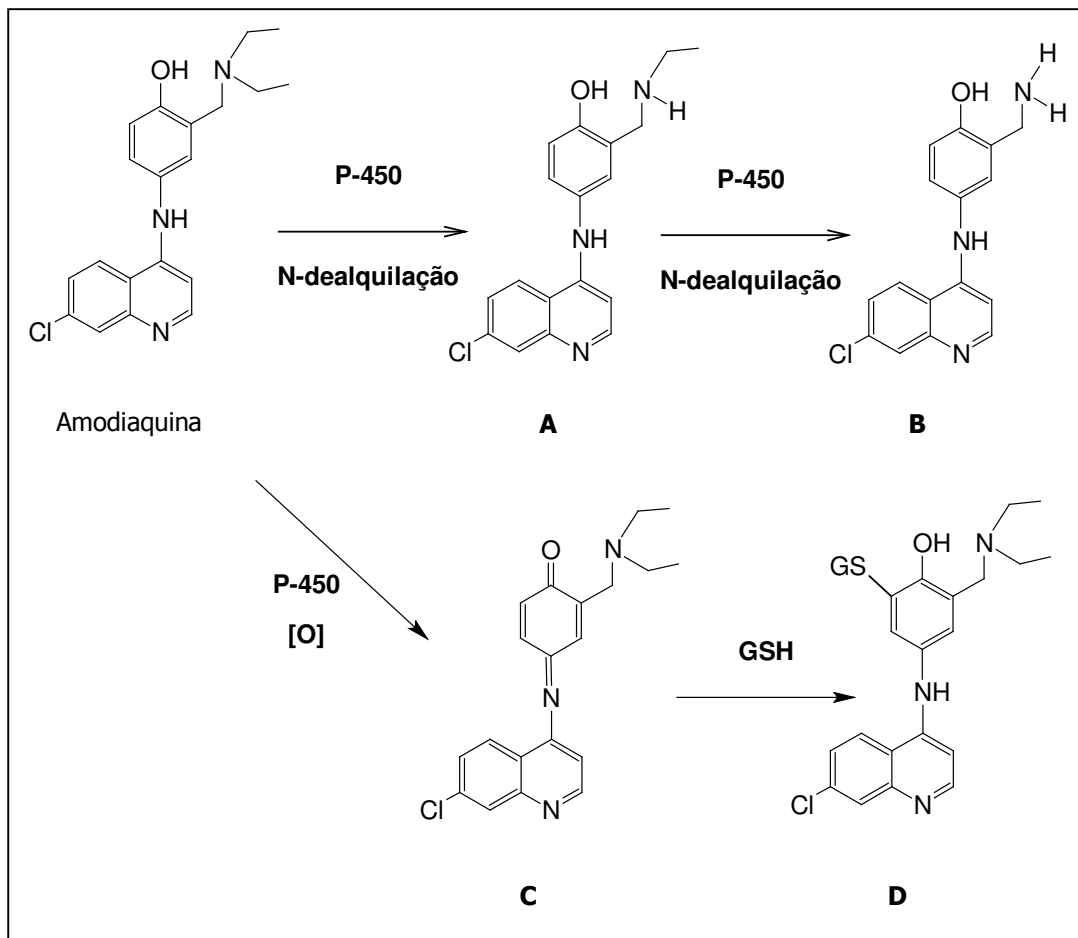


Figura 12. Metabolismo da amodiaquina em humanos (O'NEILL, 1998)

Uma vez que o CYP-450 afeta tanto a atividade quanto a toxicidade desses fármacos, passa a ser interessante realizar um estudo do potencial indutor que modelos do CYP-450 apresentam sobre essas drogas antimalárias e compará-lo com aquele observado *in vitro*.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como principais objetivos:

- 1) Avaliar as interações entre a droga antimalária cloroquina com uma série de porfirinas aniônicas, não-iônicas e catiônicas e suas respectivas ferro(III) porfirinas e, subseqüentemente;
- 2) Avaliar a influência destas interações na oxidação *in vitro* da cloroquina por iodosilbenzeno catalisada por ferro(III) porfirinas em meio homogêneo e ocluída em membranas de polidimetilsiloxano e quitosana os quais, além de mimetizar a cavidade protéica da enzima CYP-450, podem evitar a possível destruição auto-oxidativa da ferro(III) porfirina na catálise;
- 3) Estudar a atividade catalítica de uma série de ferro(III) porfirinas aniônicas, não-iônicas e catiônicas na oxidação *in vitro* da cloroquina por iodosilbenzeno e peróxido de hidrógeno, tentando separar e identificar os produtos de oxidação, e compará-los com os metabólitos obtidos *in vivo* e assim melhor entender a participação do citocromo CYP-450 no mecanismo de ação desse fármaco;

- 4) Sintetizar e caracterizar uma porfirina N-aspartil substituída derivada da protoporfirina IX, para posteriores estudos em terapia fotodinâmica e estudos catalíticos de oxidação da cloroquina e outros fármacos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Materiais utilizados

III.1.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de procedência Merck, Aldrich, Reagen, Vetec ou Synth e grau de pureza P.A. Nos experimentos envolvendo CLAE foram utilizados solventes com grau de pureza CLAE. A cloroquina e seus metabólitos foram gentilmente fornecidos pela Profa. Pierina S. Bonato, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

- Acetonitrila – Mallinckrodt, Merck e OmniSolv;
- Acetona – Mallinckrodt e Synth;
- Ácido clorídrico – Mallinckrodt e Synth;

- Ácido sulfúrico – Synth;
- Alumina Básica 70-230 mesh: Merck;
- Argônio – White Martins
- cicloexanol - Aldrich;
- cicloexanona - Aldrich;
- (Z)-ciclooctenóxido; - Aldrich;
- Cloreto de protoporfirina IX ferro(III)– Mid Century;
- Clorofórmio – Aldrich;
- cromatofolhas Al TLC 20 x 20 cm Sílica gel 60 F₂₅₄ - Merck
- Diclorometano – Aldrich, Mallinckrodt e Synth;
- Etanol – Aldrich, Mallinckrodt e Synth;
- Filtro de papel 40 e 41(125mm Ø) – Whatman;
- Hidrogênio – White Martins;
- Iodobenzeno diacetato – ACROS;
- Iodobenzeno – Aldrich;
- Iodosilbenzeno – (sintetizado neste laboratório), 95% pureza;
- Metanol – Aldrich e Mallinckrodt;
- Nitrogênio – White Martins
- Peneira molecular 4A – Carlo Erba
- Quitosana – Polymar e gentilmente cedida pela Profa. Fernanda N. Raffin da Universidade Federal Rio Grande do Norte;
- Sephadex G-25 : Pharmacia
- Sílica gel 60 230-400 mesh: ACROS, Macherey-Nagel e Merck;
- Sulfato de magnésio – Synth;
- Trietilamina – Aldrich;
- Trifluoroacetato de *p*-nitrofenol – Aldrich;

III.1.2. Tratamento dos reagentes

III.1.2.1. Diclorometano (DCM), (ARMAREGO; PERRIN, 1997)

O DCM foi filtrado em uma coluna de alumina básica 70-230 mesh para eliminação de traços de ácido.

Para eliminação de água o DCM foi destilado em um balão contendo hidreto de cálcio, e recolhido sobre peneira molecular 4Å.

III.1.2.2. Trietilamina (Et₃N), (ARMAREGO; PERRIN, 1997)

Trietilamina, utilizada como solvente nas reações envolvendo a protoporfirina e nas análises por CLAE, foi tratada conforme método descrito por Armarego *et al.* (ARMAREGO; PERRIN, 1997) e destilado para a eliminação de água:

70 ml de trietilamina foram colocados em um balão (uma boca) de 125 mL contendo sulfato de magnésio durante 24 h. A seguir procedeu-se à uma destilação simples, sendo o destilado recolhido sobre peneira molecular 4Å.

III.1.2.3. Dimetilformamida (DMF), (ARMAREGO; PERRIN, 1997)

Foi tratada utilizando o método descrito no item anterior.

III.1.2.4. Sulfato de magnésio e peneira molecular 4Å

Ambos os compostos foram mantidos na estufa à temperaturas acima de 110°C por 24 h ou mais antes de serem utilizados no tratamento de solventes.

III.1.2.5. Diciclohexilcarbodiimida, DCCI

Foi purificada por destilação a pressão reduzida

III.1.2.6. Preparação do iodossilbenzeno

O Iodosilbenzeno foi obtido através da hidrólise alcalina do iodossilbenzeno diacetato, segundo o método descrito por (SHAREFKIN, 1973).

À 3,00 g de iodobenzenodiacetato, em um bequer de 100 mL, adicionou-se lentamente 15 mL de uma solução de hidróxido de sódio 3 M, com vigorosa agitação. A massa pastosa foi triturada com um bastão de vidro por 15 minutos e, em seguida, deixada em repouso por 45 minutos, para completar a reação. Adicionou-se 10 mL de água destilada e agitou-se vigorosamente. O iodossilbenzeno obtido foi filtrado em funil de Büchner. O sólido pastoso foi retirado do funil, triturado com 10 mL de água e novamente filtrado. Uma nova trituração foi feita com 10 mL de clorofórmio. O iodossilbenzeno foi seco por sucção em um funil de Büchner e transferido para um dessecador mantido à vácuo até completa secagem. A seguir o sólido foi macerado em um almofariz até a obtenção de um sólido finamente dividido.

O composto foi transferido para um frasco escuro e armazenado em freezer sob atmosfera de argônio.

A determinação da pureza do iodossilbenzeno foi realizada utilizando a mesma metodologia descrita a seguir.

III.1.2.7. Determinação da pureza do iodossilbenzeno

Para a determinação da pureza do iodossilbenzeno, procedeu-se segundo a técnica descrita por Lucas *et al.* (LUCAS *et al.*, 1963). O iodossilbenzeno, na presença de iodeto de potássio, em meio ácido, libera iodo que é titulado com tiosulfato de sódio na presença de amido como indicador.

A padronização da solução de tiosulfato de sódio de concentração aproximadamente 0,01 M foi realizada com uma solução de dicromato de potássio (padrão primário), conforme a técnica descrita por Baccan *et al.* (BACCAN *et al.*, 1984). As titulações foram realizadas em erlenmeyers de 25 mL. Alíquotas de 5,00 mL de solução de dicromato de potássio ($1,044 \times 10^{-2}$ M), contendo 0,20 g de KI e 0,8 mL de ácido clorídrico concentrado, foram tituladas com a solução de tiosulfato de sódio, que foi adicionada através de uma microbureta de 5,0 mL. O ponto final da

titulação foi determinado utilizando-se como indicador uma solução de amido (1g de amido solúvel em 105 mL de água)(MORITA; ASSUNÇÃO, 1980)

Cerca de 6,00 mg de PhIO foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol em um erlenmeyer (25 mL) com tampa. A esta solução foram adicionados sequencialmente: 4,0 mL de água deionizada, 1,0 mL de ácido sulfúrico 1,0 M, 0,10 g de bicarbonato de sódio, uma ponta de espátula de bórax e 0,2 g de iodeto de potássio.

O erlenmeyer foi tampado e a mistura foi agitada magneticamente por 20 minutos em banho de gelo, na ausência de luz. A mistura foi titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio, usando uma microbureta, com agitação magnética até se observar a mudança de cor de amarelo intenso para amarelo claro, quando então foi adicionado a solução de amido (indicador), tornado a solução azul escura. Prosseguiu-se com a titulação até o desaparecimento da cor.

III.2. Equipamentos e dispositivos utilizados

- Agitador por ultrassom Minisom Thornton, Impec Eletrônica
- Aparelho de CLAE:
 - Shimadzu com detectores UV/Vis Diode Array e SPD-10 AV; bombas: LC-6AD VP;
 - HP 1090 Series II com detectores UV/Vis Diode Array e auto-sampler;
- colunas analíticas:
 - coluna C18 da Merck de 125x4 mm; fase móvel solução aquosa de heptanossulfonato de sódio 0,015 M, trietilamina 0,015 M e ácido fosfórico/acetoneitrila na proporção 7:3 (separação isocrática); fluxo à 1,5 mL/min; temperatura da coluna 35 °C.
 - coluna C1 da SUPELCO de 300x4,6 mm; fase móvel solução aquosa de NH₃ 0,03% (v/v) e solução metanólica 0,3% (v/v) (separação por gradiente); fluxo à 1,5 mL/min; temperatura da coluna 35 °C.
- Balança analítica eletrônica Mettler modelo H 20T.

- Cromatógrafo a Gás:
 - Cromatógrafo Varian Star CX-3400: Os cromatogramas foram obtidos em um cromatógrafo a gás Varian Star 3400 CX acoplado ao computador Mythus 486dx/66 e impressora Epson LX-300. O aparelho é equipado com detector de ionização de chama. O cromatógrafo foi acoplado a uma workstation que utiliza o software Star Chromatography Workstation para tratamento de dados.
 - Cromatógrafo Varian Star 3800 CX acoplado ao computador 486dx/66 e impressora Deskjet 892Cxi HP. O aparelho é equipado com detector de ionização de chama. O cromatógrafo foi acoplado a uma workstation que utiliza o software JCL6000 Workstation para tratamento de dados
- Cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico (Hellma e Beckmann)
- Espectrofotômetro UV-Vis:
 - espectrofotômetro HP 8453 “Diode Array” acoplado ao microcomputador que utiliza o ChemStation Hewlett Packard A.02.05 UV–Vis e impressora Deskjet 892Cxi HP.
 - Espectrofotômetro HP8452 Diode Array acoplado ao microcomputador Hp Vectra XM 5/75, impressora Think Jet HP. Foram registrados espectros de absorção eletrônica, na região de 190 a 820 nm
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear: Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram obtidos em um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Jeol JNM-ECX 400, de 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do próton e 376 MHz para o flúor) do Departamento de Química da Universidade de York - Inglaterra.
- Espectrômetro de massa: Os espectros de massas por electron-spray foram obtidos em um espectrômetro LCQ Finnigan MAT. Os espectros de massas por ionização química foi obtido em um espectrômetro VG

AUTOSPEC do Departamento de Química da Universidade de York - Inglaterra.

- Manta de Aquecimento Fisatom;
- Microseringas Hamilton de diversos volumes (25, 50, 100, 250, 500, 1000) μ L.
- Placa de agitação e aquecimento Corning;
- Rotavapor Büchi RE 114

III. 3. Métodos

III.3.1. Estudo espectrofotométrico das interações entre porfirinas de 2a. geração e a cloroquina.

Este estudo foi realizado em meio orgânico (MeOH), registrando-se as variações na absorção de uma série de porfirinas base livre (H₂TPP, H₂TDCPP, H₂TCPP, H₂TSPP e H₂TMPyPP; página -5-) e ferro(III) porfirinas ((FeTPP)Cl, (FeTCPP)Cl, (FeTSPP)Cl e (FeTMPyPP)Cl, página -5-) com o aumento da concentração da cloroquina, método descrito por Egan *et al* (EGAN et al., 1997). Em meio aquoso (tampão fosfato 0,025 M, pH 6,4, 9,4 e 11,4), apenas as porfirinas e ferro(II) porfirinas solúveis puderam ser estudadas (H₂TCPP, H₂TSPP e H₂TMPyPP, (FeTCPP)Cl, (FeTSPP)Cl e (FeTMPyPP)Cl, página -5-).

Em uma cela de quartzo contendo 2 mL de uma solução de porfirina ou ferro(III) porfirina com concentração variando de 2 a 10×10^{-6} M (de acordo com a porfirina, para maiores detalhes ver discussão) foram adicionadas, com uma microseringa, alíquotas de 5 à 10 μ L de uma solução estoque 2×10^{-2} M da cloroquina. Após agitação foram registrados os espectros de absorção. Foram feitas de 15 a 20 adições. As titulações foram realizadas em um espectrofotômetro de feixe duplo da Hitachi, com a colaboração do Prof. Antônio Claudio Tedesco, deste Departamento.

III.3.2. Análise dos metabólitos da cloroquina por CLAE

III.3.2.A. Recuperação dos metabólitos da cloroquina

A cloroquina e seus metabólitos foram recuperadas da reação conforme método descrito abaixo:

1º) Alíquotas de 300 µL eram recolhidas da mistura de reação, e então secadas por um fluxo de nitrogênio;

2º) Em seguida, o resíduo era solubilizado em 300 µL da fase aquosa do eluente a ser usado na análise por CLAE, (ver próximo item);

3º) A solução, após ser sonicada por 5 minutos, era filtrada e só então injetada no equipamento.

III.3.2.B. Análise da Cloroquina e seus metabólitos

A análise da cloroquina e de seus metabólitos por CLAE foi baseada em método descrito por Houzé *et al* (HOUZÉ et al., 1992). Foi utilizado uma coluna C18 da Merck de 125x4 mm e como fase móvel solução aquosa de heptanossulfonato de sódio 0,015 M, trietilamina 0,015 M e ácido fosfórico/acetonitrila na proporção 7:3 (separação isocrática), fluxo à 1,5 mL/min e temperatura da coluna 35°C. A solução aquosa de heptanossulfonato de sódio foi preparada solubilizando primeiramente 3 g do sal em água deionizada em um balão volumétrico de 1 L, em seguida foi adicionado 2100 µL de trietilamina e o volume foi completado para um litro com água deionizada. O pH foi então ajustado a 3,4 adicionando-se ácido ortofosfórico concentrado.

Todos os solventes eram filtrados antes de serem utilizados na análise por CLAE.

III.3.2.C. Padronização do Método

Para padronização do método de análise foram preparadas soluções de cloroquina com concentração equivalente a 10, 30, 50, 80 e 100 % de rendimento, em tampão fosfato pH 6,4, em balões de 5 mL.

Cada uma das soluções padrão foi submetida ao método de recuperação citado no item III 4.2.A. Após a recuperação, alíquotas de 20 µL foram injetadas no cromatógrafo e as áreas dos picos determinadas. O fator de resposta do detector (F) foi calculado a partir da inclinação das retas nos gráficos da relação de áreas (produto) *versus* concentração (produto/padrão). Diariamente, uma amostra de concentração conhecida e contendo os principais metabólitos foi injetada para avaliar a exatidão do método.

III.3.3. Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas usando iodossilbenzeno como oxidante.

Para o estudo da oxidação catalítica da cloroquina, em MeOH e meio aquoso, foram utilizadas como catalisadores as seguintes ferro(III) porfirinas foram utilizadas:

- **(FeTCPP)Cl**, cloreto de [5,10,15,20-tetra(4-carboxifenil)porfirina ferro(III)];
- **(FeTSP)Cl**, cloreto de [5,10,15,20-tetra(4-sulfonatofenil)porfirina ferro(III)];
- **(FeTMPyPP)Cl**, cloreto de [5,10,15,20-tetra(4-metilpiridiniumil)porfirina ferro(III)];
- **FePPIX**, cloreto de protoporfirina IX ferro(III);

Em metanol também foram realizados estudos catalíticos com a (FeTPFPP)Cl, cloreto de [5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)porfirina ferro(III)].

Foram preparadas soluções estoque destas ferro(III) porfirinas em MeOH na concentração de 1×10^{-3} mol/L de todas as metaloporfirinas utilizadas. As reações de oxidação foram realizadas em meio homogêneo conforme descrito abaixo:

i) Em frasco de 2 mL com tampa rosqueada foram misturados $2,5 \times 10^{-8}$ mols (25 μL de uma solução 1×10^{-3} mol/L) do catalisador, 375 μL de uma solução 2×10^{-2} mol/L de cloroquina e 1050 μL de MeOH ou de tampão fosfato 0,025 M pH 6,4. Em seguida foi adicionada 45 μL de uma solução $2,8 \times 10^{-2}$ M de PhIO em MeOH à mistura reacional. Assim, a relação catalisador: substrato: oxidante utilizada, em número de mols foi 1: 50: 300.

Todas as reações de oxidação foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação magnética. Após 6 h, uma alíquota de 300 μL era retirada da solução e a cloroquina e os metabólitos recuperados conforme método descrito anteriormente. O mesmo ocorreu após 24 h de reação. Os produtos foram analisados por CLAE.

Foram também realizadas reações de oxidação da cloroquina por PhIO na ausência de catalisador, para avaliar a influência do mesmo no rendimento e seletividade da oxidação.

III.3.4. Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas (naturais e sintéticas) usando ácido meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio como oxidantes.

Para o estudo da oxidação catalítica da cloroquina por ácido *meta*-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio foram utilizadas como catalisadores as seguintes ferro(III) porfirinas:

- **(FeTNPP)Cl**, cloreto de [5, 10, 15, 20-tetra(o-nitrofenil)porfirina ferro(III)];
- **(FeTCPP)Cl**, cloreto de [5, 10, 15, 20-tetra(p-carboxifenil)porfirina ferro(III)];
- **FePPIX**, cloreto de protoporfirina IX ferro(III), (em solução e ocluída em membrana)

Foram preparadas soluções estoque na concentração de 1×10^{-3} mol/L de todas as metaloporfirinas utilizadas. As reações de oxidação foram realizadas conforme método descrito no item anterior com uma única modificação de que a solução de oxidante adicionada à reação foi preparada em meio aquoso.

III.3.5. Elucidação estrutural dos compostos desconhecidos formados na oxidação da cloroquina e análogos por iodosilbenzeno catalisada pela (FeTCPP)Cl.

Visando a elucidação estrutural dos produtos desconhecidos formados na oxidação da cloroquina, novos métodos de separação foram testados sem a utilização de agente par iônico, uma vez que este impossibilitava o uso de CLAE-MS para a identificação dos compostos:

- No primeiro, desenvolvido para análises por CG-MS, as amostras foram analisadas numa coluna capilar SGE BP-1 de 30 m de comprimento por 0,025 mm de diâmetro interno e o hélio como gás de arraste, o nitrogênio como gás “make up” e a mistura hidrogênio e ar para a manutenção da chama, com fluxos de 1 mL min⁻¹ (30 mL min⁻¹ para o make up), 30 mL min⁻¹ e 300 mL min⁻¹, respectivamente. O cromatógrafo foi acoplado a uma workstation que utiliza o software JCL6000 da J&W para tratamento de dados. Os metabolitos foram extraídos de alíquotas de 500 µL da reação com 500 µL clorofórmio após adição de NaOH 0,1 M. Antes de serem injetados, os metabólitos foram derivatizados aquecendo o extrato a 50 °C e adicionando 15 µL anidrido trifluoroacético. Após 15 minutos, as alíquotas foram secas sob fluxo de nitrogênio, dissolvidas 500 µL em éter e injetadas no cromatógrafo (volume de injeção – 0,7 µL).

- No segundo, desenvolvido para as análises por CLAE-MS, as amostras foram analisadas numa coluna C1 da SUPELCO de 300x4.6 mm, usando como fase móvel uma solução aquosa de hidróxido de amônio 0.03% (v/v) e uma solução em metanol de hidróxido de amônio 0.03% (v/v). A separação foi obtida via gradiente apresentado na Figura 13, o fluxo foi mantido constante a 1.5 mL/min e a temperatura da coluna 35 °C. A preparação das amostras para análise foi realizada conforme método descrito no item III.3.2.A.

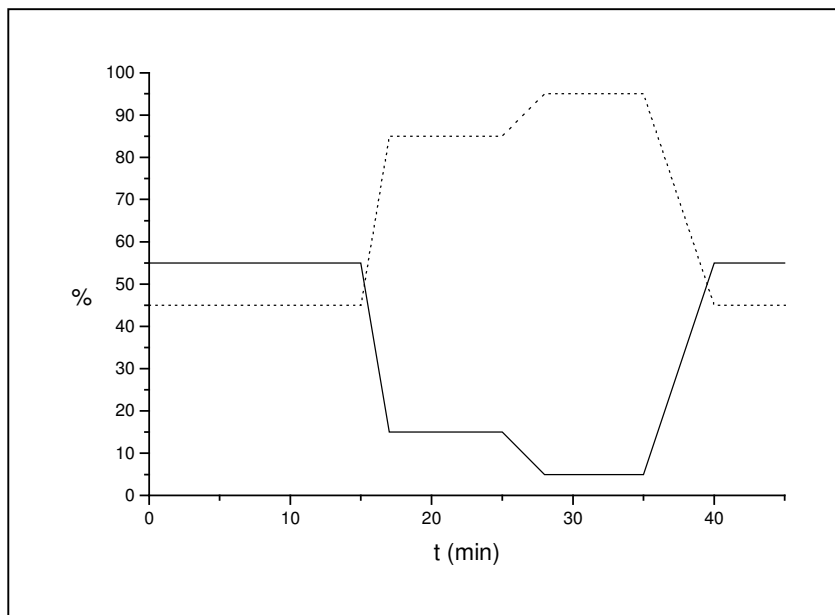


Figura 13. Gradiente de concentração das soluções de NH_3 0.03 % em MeOH(--) e de NH_3 0.03 % em água (—) em função do tempo na análise por CLAE dos produtos da oxidação da CQ.

Buscando também uma maior compreensão do mecanismo de oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno catalisada por FeP foi realizada a síntese de alguns compostos análogos à cloroquina

Dois métodos foram testados:

No primeiro, descrito por Craig *et al.*(CRAIG *et al.*, 1988), 1 g de 4,7-dicloroquinolina (ou a 7-cloro piridina), 1 g de fenol, e 0,8 g (aproximadamente 0,65 mL) da amina correspondente foram mantidas sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio em um balão de duas bocas de 15 mL, a 125 °C por 18 h. O frasco de reação foi então resfriado à temperatura ambiente, e a mistura obtida dissolvida em CHCl_3 (2 x 10 mL). A solução foi lavada com NaOH 15% (5 x 20 mL) a 0 °C e, em seguida, com uma solução 1 M de HCl (5x20 mL). A fase aquosa ácida foi então lavada com éter (5 x 30 mL), em seguida com solução saturada de carbonato de sódio (5 x 30 mL), e os produtos extraídos com clorofórmio (5 x 20 mL). A solução em clorofórmio foi então secada (Na_2SO_4) e o solvente evaporado para dar o produto desejado como um sólido. O sólido foi mais uma vez solubilizado em clorofórmio, e a solução obtida adicionado gota à gota em hexano. Após 24 horas a 0 °C, a mistura foi filtrada e o sólido obtido armazenado em atmosfera de nitrogênio.

No segundo método, descrito por Drake *et al.* (DRAKE *et al.*, 1946) 1 g de 4,7-dicloroquinolina (ou a 7-cloro piridina), e 1,6 g (aproximadamente 1,3 mL) da amina correspondente foram mantidas em um balão de duas bocas de 15 mL sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio, a 165 °C por 5 h. O frasco de reação foi então resfriado à temperatura ambiente, e a mistura obtida dissolvida em CHCl_3 (2 x 10 mL). A solução foi lavada com NaOH 15% (5 x 20 mL) a 0 °C. O volume da fase orgânica foi diminuído a alguns mililitros e então diluída com 50 mL de etanol. Esta solução foi aquecida à temperatura de refluxo e mantida sob agitação constante e, então, foi adicionado ácido fosfórico concentrado gota a gota (3 mL). A mistura foi armazenada no escuro à baixa temperatura e, após 18 h, filtrada. O sólido obtido foi armazenado em atmosfera de nitrogênio.

Os compostos obtidos foram analisados por RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , CI-MS e HRCI-MS e utilizados como substratos em reações de oxidação.

As reações de oxidação foram realizadas conforme método a seguir:

Massa conhecida de ferro(III) porfirina (FeP) foi colocada em um frasco de reação de 5,0 mL, com tampa rosqueável e septo de silicone-teflon. Em seguida foram adicionados: o solvente (cerca de 1,5 mL); o substrato (cloroquina ou substrato análogo). Finalmente foi adicionada massa conhecida de iodossilbenzeno, PhIO, em solução de metanol e iniciada a contagem de tempo. O frasco de reação foi mantido sob agitação magnética à temperatura ambiente. A análise dos produtos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência retirando-se alíquotas (cerca de 500 μL) da mistura de reação em intervalos regulares. A reação prosseguiu até rendimento constante dos produtos oxidados, cerca de 2 h. Como solvente foi empregado metanol ou soluções tampão de fosfato pH 6,4 0,025 M, capazes de solubilizar os substratos orgânicos e as ferro(III) porfirinas.

Os produtos de oxidação foram investigados por cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, acoplada a espectrometria de massas, MS. A preparação das amostras para análise foi realizada conforme método descrito no item III 3.2.A.

Esta etapa do doutorado foi realizada no Departamento de Química da Universidade de York, Inglaterra, sob orientação do Prof. John Lindsay-Smith.

III.3.6. Oxidação de substratos orgânicos por iodosilbenzeno catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas imobilizadas em suportes sólidos

III.3.6.A. Utilizando polidimetilsiloxano (PDMS) como suporte

A membrana de PDMS com a protoporfirina IX ferro(III) ocluída foi preparada e caracterizada por Marcos A. Schiavon, durante seu pós-doutorado no Instituto de Química – UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. I. V. P. Yoshida..

Para verificar a presença da metaloporfirina ocluída na membrana polimérica registrou-se os espectros UV-Vis, utilizando-se como branco a membrana sem a metaloporfirina. As membranas foram colocadas diretamente no caminho óptico do espectrofotômetro.

- Testes de entumescimento;

Foram realizados testes de entumescimento da membrana com cicloexano e cicloexanol; e com os solventes acetonitrila, metanol e diclorometano. O entumescimento corresponde à quantidade de substância que a membrana é capaz de sorver num determinado tempo (NEYS et al., 1999; NEYS et al., 1998). A técnica consiste em mergulhar a massa conhecida da membrana em cada uma das substâncias a serem analisadas. Após 24 h retira-se a membrana do banho, eliminando o excesso de substância e pesa-se. Determinou-se assim o ganho de massa e, conseqüentemente, a quantidade máxima de cada uma das substâncias que poderá solver-se no suporte durante o tempo da reação. Esse valor foi denominado “valor de sorção”.

- Atividade Catalítica

Para o estudo da atividade catalítica da **FePPIX** ocluída na membrana foram realizadas as seguintes reações de oxidação:

- i) Em frasco de 2 mL com tampa rosqueada foram misturados 80 mg da membrana 0,02 % ($7,35 \times 10^{-9}$ mols do catalisador), 1,5 mL da mistura ACN / MeOH (1:1), e 8 mg de PhIO ($3,0 \times 10^{-5}$ mols) ou 10 μ L de

H₂O₂. 2 µL de Substrato ($1,5 \times 10^{-5}$ mols) foram adicionados à mistura reacional. Assim a relação molar catalisador: substrato: oxidante utilizada foi 1: 2000: 4000. Quando usado como substrato o cloocteno foi previamente passado em coluna de alumina.

- ii) Em frasco de 2 mL com tampa rosqueada foram misturados 80 mg da membrana 0,02 % ($7,35 \times 10^{-9}$ mols do catalisador), 1,5 mL da mistura ACN / MeOH (1:1), 5 µL de cicloexano (5×10^{-5} mols) e 8 mg de PhIO ($3,0 \times 10^{-5}$ mols). A relação molar catalisador: substrato: oxidante em número de mols foi 1:6000: 4000, ou seja, um grande excesso de substrato no meio reacional.

Todas as reações de oxidação foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação magnética. Após 24 h a membrana foi retirada da solução e os produtos analisados por cromatografia a gás pelo método da adição de padrão interno. O padrão utilizado foi bromobenzeno (6 µL), adicionado à mistura ao final da reação e imediatamente antes da análise. Após ter sido retirada do meio reacional a membrana era mergulhada em diclorometano, permanecendo sob agitação por 24 h, para extração de produtos da oxidação que poderiam permanecer retidos na sua estrutura. Após extração esta solução também era analisada por cromatografia a gás. Para todos os substratos foram feitos brancos com a membrana sem a metaloporfirina.

III.3.6.B. Utilizando quitosana como suporte

i) Ancoragem em quitosana da (FeTPFPP)Cl por coordenação

A ancoragem da (FeTPFPP)Cl em quitosana foi realizada com base em método descrito por Guo *et al.* (GUO et al., 2003) para a (FeTPP)Cl. Em um balão de 500 mL contendo 25 mL de uma solução 0,1 M de ácido acético foi adicionado 500 mg de quitosana, a mistura foi mantida sob agitação até que toda a quitosana fosse dissolvida. Após 15 min foi adicionado à mistura 100 mL de água destilada e em seguida o pH do meio foi neutralizado por adição de NaOH 0,1 M. Foi adicionado, então, 10 mL de uma solução contendo 5 mg de (FeTPFPP)Cl em diclorometano.

A reação foi mantida à temperatura ambiente por 4 h e então filtrada. O sólido retido foi seco ao ar e pesado, sendo obtidos 150 mg do catalisador sólido.

ii) Ancoragem em quitosana por ligação covalente da (FeTPFPP)Cl

A imobilização por ligação covalente da (FeTPFPP)Cl em quitosana foi realizada com base em método descrito por Kittur *et al* (KITTUR *et al.*, 2002) para imobilização do ácido monocloro acético. Em uma suspensão de 1 g de quitosana em 20 mL de etilenoglicol foi adicionado 3 mL de NaOH 10 M. Após 30 min sob agitação magnética foi adicionada à mistura 10 mg de (FeTPFPP)Cl dissolvida em 5 mL de etilenoglicol. A reação foi mantida a 130 °C por 48 h e então a mistura foi filtrada. O sólido isolado foi lavado exaustivamente com água e metanol, seco à pressão reduzida e pesado, sendo obtido 800 mg do catalisador sólido. A quantidade de catalisador ancorado foi determinada indiretamente por espectrofotometria UV-Vis, pela medida da absorbância da banda Soret (414 nm) da ferro(III) porfirina presente no líquido isolado da filtração e das lavagens.

iii) Ancoragem em quitosana por ligação covalente da (FeTCPP)Cl

- Via $C_2O_2Cl_2$

Em um balão de 50 mL contendo 2,5 mL de DMF foi adicionado 15 mg de (FeTCPP)Cl. A mistura foi mantida sob agitação magnética e, em seguida, foi adicionado 50 mL de tolueno. Após 15 min o balão foi resfriado a 0°C e foi adicionado 1 mL de cloreto de oxalila ($C_2O_2Cl_2$). A reação foi mantida à temperatura ambiente por 8 h. Após este período foi adicionado ao balão uma suspensão de 500 mg de quitosana em 5 mL de tolueno e 2 mL de trietilamina. A reação foi mantida à temperatura ambiente e atmosfera de argônio por mais 48 h.

- Via DCCI

Também foi realizada a ancoragem da (FeTCPP)Cl em quitosana com base em método descrito por Lee *et al* (LEE *et al.*, 1998) para o ácido deoxicólico. Em um balão de 250 mL, 500 mg de quitosana foi dissolvida em 50 mL de solução 1% de ácido acético e, em seguida, foi adicionada a essa mistura 100 mL de isopropanol. Após 15 min foi adicionada 7 mg de (FeTCPP)Cl previamente solubilizada em 10 mL de isopropanol. Em seguida, 15 mg de DCCI recém-destilada foi adicionada ao

meio. Após 48 h a reação foi neutralizada com solução de amônia 1 %. O precipitado formado foi filtrado e lavado exaustivamente com solução de amônia 2 % e cloreto de sódio 2%, água destilada e metanol e em seguida seco à temperatura ambiente sob pressão reduzida. A quantidade de catalisador ancorado foi determinada por espectrofotometria UV-Vis, como descrito no item anterior.

III.3.6.C. Padronização do cromatógrafo a gás pelo método de adição de padrão interno

i) Separação quiral dos produtos da oxidação do estireno por iodossilbenzeno catalisada por ferro(III) porfirinas suportadas em quitosana (Realizada no Departamento de Química da Universidade de York – Inglaterra)

Primeiramente foram investigadas as condições de análise no cromatógrafo a gás para a identificação de todos os possíveis produtos a serem obtidos na oxidação do estireno: o benzaldeído, o fenilacetaldéido, o óxido de estireno (R e S) e o iodobenzeno. Isto foi feito injetando-se separadamente amostras autênticas de cada um dos produtos obtidos. Para cada injeção foi utilizado como padrão interno o *p*-cloro-bromo-benzeno uma vez que este satisfaz o maior número de requisitos possíveis para um bom padrão interno (CIOLA et al., 1985; COLLINS et al., 1997). Em seguida, injetou-se uma solução contendo todos os produtos de cada substrato e estabeleceu-se um método de análise (Tabela 2). Várias programações de temperatura da coluna do cromatógrafo foram estudadas, a fim de se obter um método rápido e confiável de separação e identificação dos produtos.

Tabela 2: Condições de análise para a oxidação do estireno. Programação da Coluna*

Temp. Inicial °C	Temp. Final °C	Veloc. de Aquec. °C.min ⁻¹	Duração (min)
100	100	-	15
100	120	50	5

*coluna: J&W Scientific, cyclosil B, comp. :30 m, diam. :0.025 mm; detector: 250 °C; injetor: 225 °C, "split ratio"=1:100; Relação dos fluxos de gases He:N₂:H₂:Ar 1,2:30:30:300 (mL min⁻¹). Tempo de análise: 20,5 min.

ii) Separação aquiral dos produtos da oxidação do estireno e demais substratos por Iodosilbenzeno catalisada por ferro(III) porfirinas suportadas em quitosana;

Para a padronização do cromatógrafo a gás pelo método da adição do padrão interno, soluções estoques de cada um dos possíveis produtos da oxidação de cada substrato foram preparadas em CHCl₃, por medida de volume em micropipetas automáticas ou pesagem em balança analítica. A partir destas soluções foram preparadas cinco diluições, em DCE, contendo concentração fixa do padrão interno ($3,0 \times 10^{-5}$ mols) e concentrações variáveis dos produtos, levando-se em consideração o rendimento dos produtos das reações de 100, 80, 60 40 e 20 % (baseados no PhIO de partida).

Alíquotas de aproximadamente 1 µL dessas cinco soluções foram injetadas no cromatógrafo utilizando-se o método de análise determinado previamente. As áreas dos picos foram determinadas através do programa JCL 6000 Software, associado ao equipamento.

O fator de resposta do detector, F_1 , foi calculado para todos os sistemas. Através dos gráficos da razão das áreas (produto/padrão) *versus* razão das massas (produto/padrão) determinou-se o F_1 que corresponde ao coeficiente angular da reta.

As reações foram desenvolvidas conforme descrito nos itens anteriores.

A natureza do catalisador, bem como a relação FeP: oxidante: substrato e demais condições da reação foram variadas.

III.3.7. Síntese da H₂DAPPIX via ativação da H₂PPIX por trifluoroacetato de p-nitrofenol

A H₂PPIX (100 mg) foi dissolvida em 50 mL de piridina (armazenada sobre peneira molecular de 4 Å) em um balão de 250 mL. Foi adicionado à esta solução 200 mg de p-nitrofenil trifluoroacetato. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente (20 °C) por 24 h na ausência de luz. A porfirina esterificada foi gradativamente separada na forma de microcristais vermelhos. Hexano (100 mL) foi adicionado e, após 8 h à 0 °C, o produto foi filtrado, lavado com hexano para retirar o excesso de piridina, e seco ao ar (143 mg, 93% de rendimento).

A reação do nitrofenil éster derivado da H₂PPIX com o aminoácido ácido aspártico foi realizada em piridina (armazenada sobre peneira molecular de 4 Å) em um balão de fundo redondo de 2 bocas. O derivado nitrofenil éster (100 mg) foi dissolvido em 100 mL of piridina à 65 °C. Após a completa dissolução do sólido o aminoácido (50 mg), dissolvido em 20 mL de piridina, foi adicionado. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura de 65 °C por 24 h na ausência de luz. A porfirina N-aspartil substituída foi gradativamente separada na forma de microcristais vermelhos. Hexano (100 mL) foi adicionado e, após 8 h à 0 °C, o produto foi filtrado, lavado com hexano para retirar o excesso de piridina, e seco. O produto obtido foi purificado por cromatografia líquida (silica gel, CHCl₃-MeOH, 75:25) realizada na ausência de luz. Foram recolhidas 3 frações correspondentes à porfirina N-aspartil substituída com diferentes graus de esterificação do aminoácido. O solvente destas frações foi eliminado por rotavaporação e os sólidos foram caracterizados por ES/MS.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Estudo espectrofotométrico das interações entre porfirinas sintéticas e cloroquina

Como já mencionado anteriormente a cloroquina (Figura 9.3), em soluções aquosas, é capaz de formar complexos π - π com a FePPIX. A formação destes complexos apresenta um efeito inibidor tanto na atividade de catalase da FePPIX como em sua atividade de peroxidase, sendo a inibição mais significativa no primeiro caso (RIBEIRO et al., 1995; RIBEIRO et al., 1995). Além disso, foi verificado por Ribeiro *et al* que em reações envolvendo a FePPIX e peróxido de hidrogênio, estas interações protegem a ferro(III) porfirina da degradação auto-oxidativa (RIBEIRO, 1997). Estas informações levaram ao questionamento sobre a habilidade de outros modelos biomiméticos em interagir com a cloroquina. Uma vez que apenas as interações entre porfirinas naturais, como a FePPIX, uroporfirina I e urohemia I com cloroquina são descritas na literatura e nenhuma informação está disponível sobre o efeito de substituintes *meso*-arilas no mecanismo de complexação, um estudo espectrofotométrico das interações entre porfirinas sintéticas com este fármaco se

torna necessário para avaliar o papel destas na atividade catalítica destes compostos.

IV.1.1. Estudo espectrofotométrico da interação da cloroquina com porfirinas e ferro(III) porfirinas sintéticas em meio orgânico (MeOH:tampão fosfato pH 6,4; 10:1)

Uma série de porfirinas base livre (H₂TPP, H₂TDCPP, H₂T CPP, H₂T SPP e H₂TMPyPP) e ferro(III) porfirinas ((FeTPP)Cl, (FeT CPP)Cl, (FeT SPP)Cl e (FeTMPyPP)Cl) foram selecionadas para avaliar o efeito de vários parâmetros na formação do complexo entre o substrato e catalisador.

A H₂TDCPP foi escolhida como referência para interação nula entre droga e porfirina, por ser esta uma porfirina com substituintes volumosos (Cl) nas posições *orto* dos grupos fenilas, o que dificultaria as interações π - π entre droga e porfirina.

A porfirina H₂TPP não apresenta substituintes nas posições *orto* dos grupos fenilas e pode, em princípio, interagir com a cloroquina via interações π - π , sendo escolhida para avaliar a importância deste tipo de interação na formação do complexo droga:porfirina em meio orgânico.

A H₂T CPP, que apresenta apenas substituintes carboxi nas posições *para* dos anéis *meso* fenilas, foi escolhida para avaliar a influência de interações eletrostáticas, entre os grupos carboxi desprotonados da porfirina e o nitrogênio protonado da cloroquina, na formação do complexo droga:porfirina.

Além das interações π - π e eletrostáticas, a coordenação da cloroquina através de seu nitrogênio quinolínico ao ferro(III) central de uma metaloporfirina também poderia estabilizar o complexo (ASSIS et al, 1991; KIM et al., 1972). Para investigar esta possibilidade foram escolhidas a (FeTPP)Cl e a (FeT CPP)Cl. A diferença entre as constantes de agregação destas ferro(III) porfirinas e suas respectivas porfirinas, caso existisse, seria causada pela coordenação da cloroquina ao íon férrico central. O uso destas porfirinas e ferro(III) porfirinas também permite estudar a influência dos grupos carregados nos substituintes *meso*-arila da ferro(III) porfirina na formação do complexo.

As soluções estoques das (ferro) porfirinas de interesse foram preparadas solubilizando inicialmente a (metalo) porfirina em um volume mínimo de co-solvente (DMF para a H₂TDCPP, DCM para a H₂TPP, NaOH 0,01M seguido de tampão fosfato pH 6,4 para a H₂TCPP e (FeTCPP)Cl) sendo em seguida adicionado MeOH até o volume final de 5 mL. As soluções usadas para o estudo das interações cloroquina/metalo porfirina foram preparadas diluindo alíquotas da solução estoque em uma mistura contendo MeOH:tampão fosfato (10:1), de tal modo que a absorção da banda Soret da solução de H₂P estivesse dentro do intervalo de 0,5 a 0,8. Este solvente foi escolhido pois permite realizar o estudo de interação com porfirinas e ferro(III) porfirinas não-polares e insolúveis em meio aquoso. As amostras e uma solução de referência foram tituladas simultaneamente para diminuir as interferências no espectro da porfirina provocada pela absorção da cloroquina adicionada.

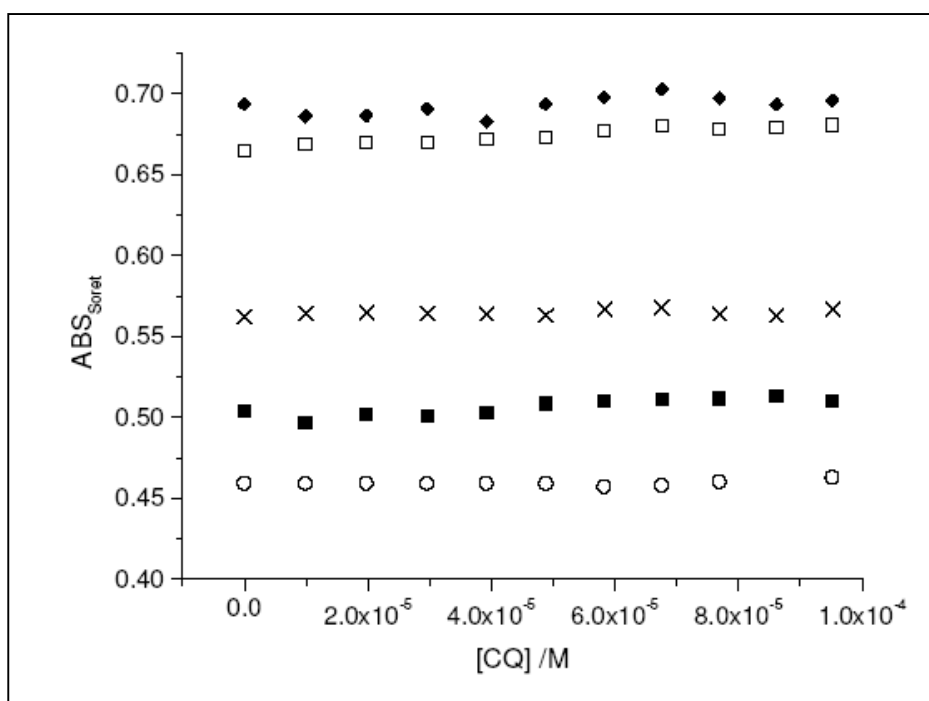


Figura 14. Variação da absorção da banda Soret das porfirinas e ferro(III) porfirinas em função da concentração da droga antimalária cloroquina (CQ), em MeOH. □ - H₂TCPP, 4x10⁻⁶ M; ■ - (FeTCPP)Cl, 1.0x10⁻⁵ M; x - H₂TPP, 2x10⁻⁶ M; ◆ - (FeTPP)Cl, 5x10⁻⁶ M e ○ - H₂TDCPP, 2 x10⁻⁶ M

A variação da absorção da banda Soret para todas as porfirinas e ferro(III) porfirinas, em função da concentração de cloroquina, é desprezível em metanol

(Figura 14) e, portanto, não há nenhuma evidência de complexação π - π ou coordenação entre a cloroquina e as porfirinas e ferro(III) porfirinas neste meio. Resultados semelhantes foram recentemente apresentados para estudos envolvendo a FePPIX e a cloroquina, mostrando que a presença de um solvente orgânico (acetonitrila) em porcentagens maiores que 30 % (v/v) inibiram a complexação (EGAN; NICOKAZI, 2004).

IV.1.2. Estudo espectrofotométrico da interação da cloroquina com porfirinas sintéticas em tampão fosfato pH 6,4.

Em meio aquoso, porfirinas carregadas tendem a formar dímeros e oligômeros. Isto ocorre especialmente com ferro(III) porfirinas que, além de dímeros π - π , podem formar dímeros μ -oxo com um átomo de oxigênio ligado entre duas ferro(III) porfirinas. Assim, a escolha do pH e da força iônica do tampão foi feita de modo a não favorecer a formação de dímeros. Após preparação da solução de (FeTCCP)Cl em vários pHs diferentes foi escolhido o pH de 6,4 para o estudo espectrofotométrico. Neste pH a (FeTCCP)Cl apresenta espectro característico do monômero, com a banda Soret em 416 nm. A concentração do tampão utilizada (25×10^{-3} M), também foi escolhida para evitar variações no pH provocada pela adição de cloroquina. Embora o sulfato de cloroquina usado nas titulações seja um ácido fraco, em altas concentrações poderia levar a uma mudança do pH, o que dificultaria a análise dos resultados.

Devido a problemas de solubilidade as interações com a H₂TDCPP e H₂TPP não puderam ser investigadas neste meio.

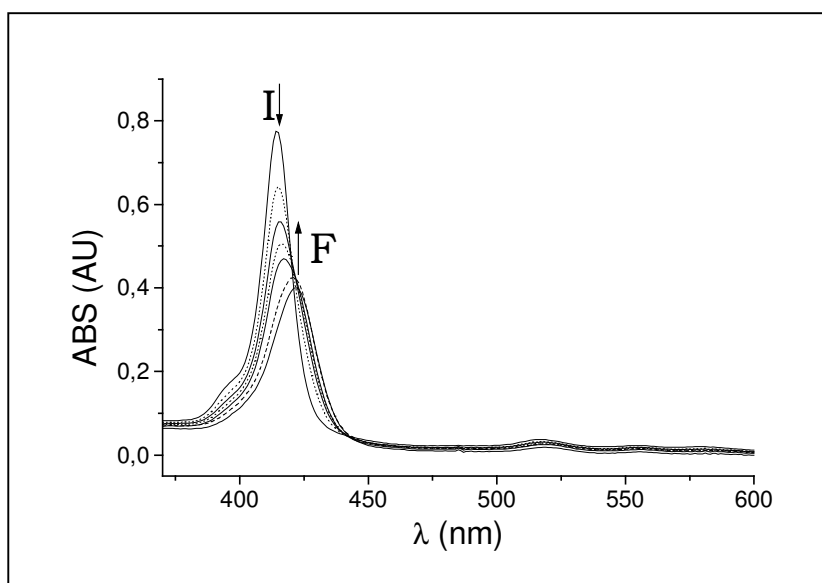


Figura 15. Variação do espectro da H_2TCPP (5×10^{-6} M) com a adição de cloroquina (CQ), em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4. I – 0 equivalentes de CQ; F – 16 equivalentes de CQ. Cada linha corresponde a um aumento de aproximadamente 2 equivalentes de CQ.

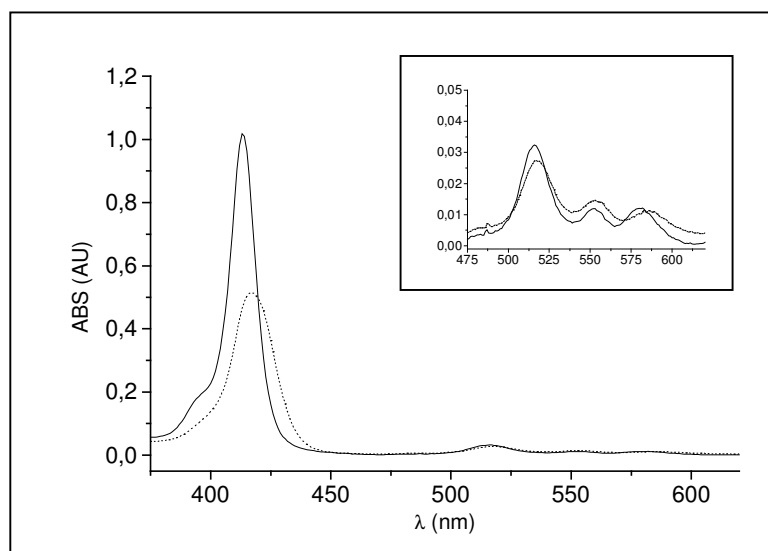


Figura 16. Variação do espectro da H_2TSPP (5×10^{-6} M) com a adição de cloroquina (CQ), em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4. — 0 equiv. de CQ; 20 equiv. de CQ.

Para a H_2TCPP e a H_2TSPP a formação do complexo pode ser claramente vista pela variação do espectro de absorção das porfirinas pela adição de cloroquina (Figura 15 e 16). É interessante observar também o deslocamento da banda Soret

de 416 para 422 nm à medida que a cloroquina é adicionada. A princípio, o deslocamento para o vermelho pode estar sendo causado por três efeitos diferentes:

i) protonação do nitrogênio pirrólico da porfirina pela cloroquina protonada. Esta hipótese pode ser descartada visto que os nitrogênios pirrólicos da porfirina têm pKa abaixo de 4 (PASTERNAK et al., 1972) enquanto os nitrogênios da cloroquina tem pKa acima de 7 (HAWLEY et al., 1996). Ou seja, os nitrogênios da porfirina são mais ácidos que os da cloroquina e dificilmente seriam protonados por esta. Além disso, o mesmo deslocamento é observado para as ferro(III) porfirinas (ver a seguir) que só podem ser protonadas quando demetaladas por ácidos fortes como HCl, em concentrações superiores a 1 M.

ii) agregação da porfirina provocada pela formação de par iônico com a cloroquina, ou por uma alteração na força iônica do meio. A formação de um par iônico diminui a repulsão eletrostática entre as moléculas de porfirina aniônicas, permitindo que estas se aproximem e se agreguem. Um efeito semelhante é observado pelo aumento da força iônica do meio que aumenta a constante eletrostática do meio, o que mais uma vez diminui a repulsão entre as moléculas. Para determinar se estes efeitos estariam causando a alteração observada no espectro a porfirina foi titulada com 1,6-hexanodiamina (HDA; Figura 17), usada como sonda para formação do par iônico. 1,6-Hexanodiamina tem uma longa cadeia alquila, com apenas dois carbonos a menos que a cadeia que separa o átomos de nitrogênio quinolínicos do nitrogênio da cadeia lateral da cloroquina e pode interagir eletrostaticamente com os grupos carregados negativamente da porfirina, facilitando assim a agregação. Nesta titulação foi observado apenas um leve decréscimo na intensidade e alargamento da banda Soret, mas nenhum deslocamento (Figura 17). A H₂P também foi titulada com NaCl 2 M (Figura 18). Mais uma vez, a presença do sal levou apenas a uma pequena diminuição da intensidade e um pequeno alargamento da banda Soret, mas não a um deslocamento como observado com a adição de cloroquina (Figura 19). Assim, mesmo em condições altamente favoráveis à agregação, a banda Soret é alargada e não deslocada. O mesmo comportamento foi observado por Pasternack usando a H₂TCP na presença de KNO₃, em sistemas aquosos (PASTERNAK et al., 1972). Pasternack também observou que a banda em 552 nm é deslocada para o vermelho e a banda em 580 nm desaparece, com o aparecimento de uma nova banda em 556 nm como resultado da agregação da

H₂T CPP. Resultados similares foram observados quando se titulou a H₂T CPP com NaCl neste trabalho, indicando a agregação da porfirina nesta condição. Quando se titulou a H₂T CPP com cloroquina, no entanto, a banda em 580 nm não desapareceu, mas foi deslocada para 586 nm (encarte, Figura 19). Estes resultados mostram que as mudanças espectrais observadas pela titulação com cloroquina não são provocadas pela agregação da porfirina.

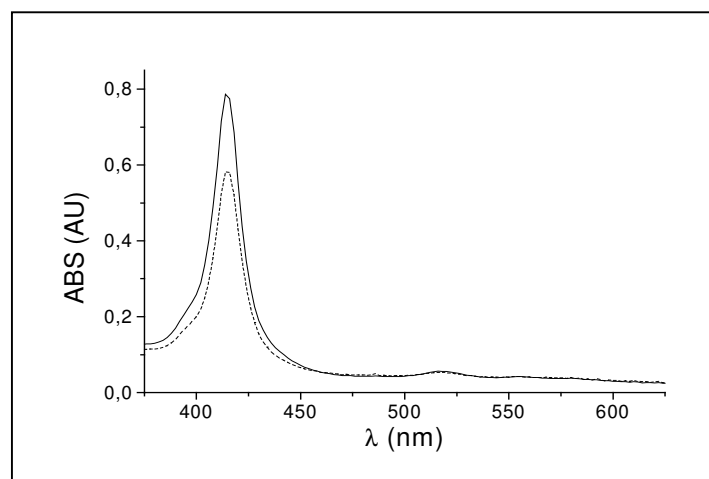


Figura 17. Variação do espectro da H₂TSP (5×10^{-6} M) com a adição de cloroquina (CQ), em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4. — 0 equivalente de HDA; 250 equivalente de HDA.

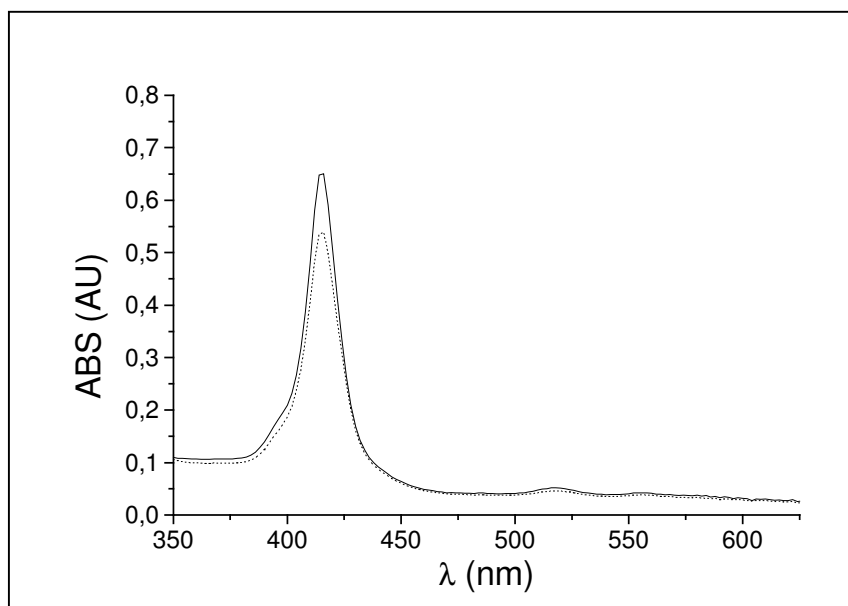


Figura 18. Variação do espectro da H_2TSPP (5×10^{-6} M) com a NaCl, em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4. — 0 equivalente de NaCl; ----- 16000 equivalente de NaCl.

iii) A terceira explicação para o deslocamento da banda Soret para o vermelho é a formação de um complexo π - π estável entre a cloroquina e a porfirina, resultando numa diminuição do “gap” de energia entre os orbitais moleculares HOMO e LUMO da porfirina. Efeitos semelhantes já foram descritos na literatura quando se titulou as porfirinas catiônicas, 5,10,15,20-tetrakis(p-N-tri(metil)amoniofenil)porfirina e 5,10,15,20-tetrakis(N-propilpiridiniomil)porfirina, com uma série de compostos aromáticos (SCHENEIDER; WANG, 1994); em estruturas híbridas porfirina-nucleobase (SCHENEIDER et al., 2002); e quando se titulou Fe(III)uroporfirina com quinina e cloroquina (CONSTANTINIDIS; SATTERLEE, 1988a; CONSTANTINIDIS; SATTERLEE, 1988b). Em todos estes estudos o deslocamento foi considerado um indicativo de que a complexação π - π estava ocorrendo entre os compostos estudados.

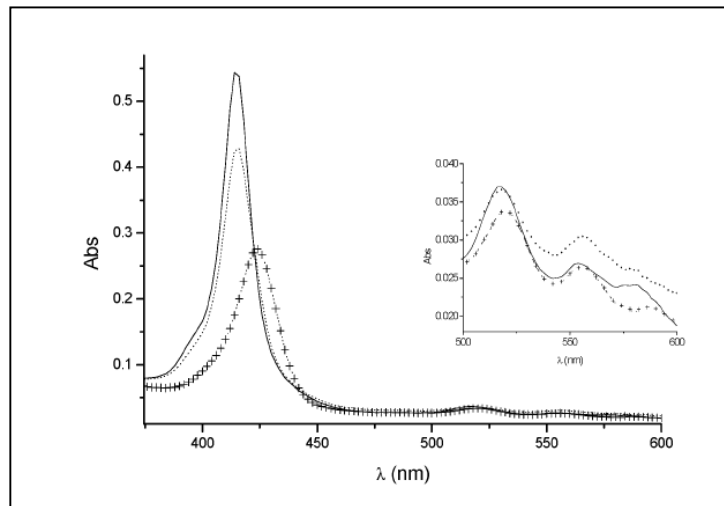
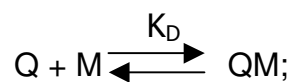


Figure 19. Variação do espectro da H₂TCPP na presença de NaCl (-----) e cloroquina (-x-x-x-) em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4

Para determinar o tipo de agregado FeP:CQ foram considerados os seguintes modelos de agregação, conforme referência (EGAN et al., 1997):

i) Modelo 1: FeP:CQ (1:1)

Para este modelo a agregação pode ser escrita conforme a reação:



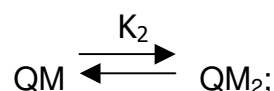
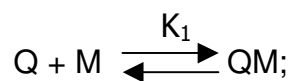
E a absorbância pode calculada a partir da equação 1:

$$A = (A_0 + A_\infty K \cdot [Q]) / (1 + K \cdot [Q]) \quad \text{eq. 1}$$

Onde A é a absorção da solução, A₀ é a absorção da porfirina não complexada, A_∞ é a absorção do complexo FeP:CQ, [Q] é a concentração de cloroquina livre e K é a constante de associação.

ii) Modelo 2: FeP:CQ (2:1, passo a passo)

Para este modelo a agregação pode ser escrita conforme a reação:



E a absorvância pode calculada a partir da equação 2:

$$A = A_0 f_M + A_1 f_{MQ} + A_2 f_{M_2Q} \quad \text{eq. 2;}$$

onde:

$$f_M = M/[M]_T, f_{MQ} = MQ/[M]_T, \text{ e } f_{M_2Q} = ([M]_T - M - MQ)/2[M]_T \quad \text{eq. 3}$$

$$MQ = \{-(1+K_1 \cdot [Q]) + [(1+K_1 \cdot [Q])^2 + 8 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot [Q] \cdot [M]_T^{1/2}]/4 \cdot K_2\} \quad \text{eq. 4;}$$

$$M = \{-(1+K_1 \cdot [Q]) + [(1+K_1 \cdot [Q])^2 + 8 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot [Q] \cdot [M]_T^{1/2}]/4 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot [Q]\} \quad \text{eq. 5}$$

iii) Modelo 3: FeP:Droga (2:1, simultânea)

Para este modelo a agregação pode ser escrita conforme a reação:



Para a absorvância pode calculada a partir da equação 6:

$$A = A_0 f_M + A_\infty f_{M_2Q} \quad \text{eq. 6;}$$

onde:

$$f_M = \{-1 + (1 + 8 \cdot K_D \cdot [Q] \cdot [M]_T^{1/2})/4 \cdot K_D \cdot [Q] \cdot [M]_T\} \quad \text{eq. 7;}$$

$$f_{M_2Q} = \{4 \cdot K_D \cdot [Q] \cdot [M]_T + 1 - (1 + 8 \cdot K_D \cdot [Q] \cdot [M]_T^{1/2})/8 \cdot K_D \cdot [Q] \cdot [M]_T\} \quad \text{eq. 8;}$$

Onde [Q] representa a droga antimalária, [M]_T concentração total de ferro(III) porfirina, A₀ a absorção da porfirina na ausência de cloroquina, A_X a absorção da

éspecie X, f_X a fração molar de X e A_∞ é a absorção a altas concentrações de cloroquina .

A partir destas equações podem ser obtidos os seguintes gráficos teóricos de variação da absorção em função da concentração de droga (Figura 20):

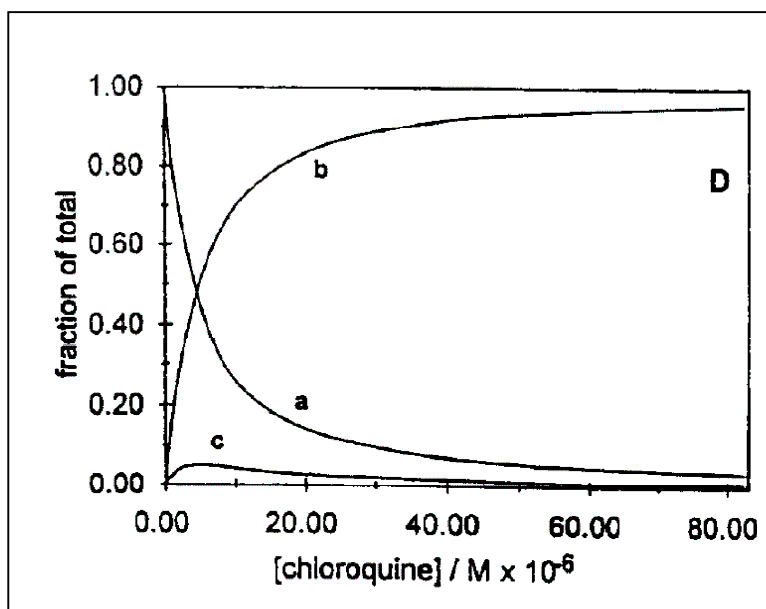


Figura 20. Gráficos teóricos (EGAN et al., 1997) da:

- a) variação da absorbância conforme o modelo 1
- b) variação da absorbância conforme o modelo 3
- c) variação da absorbância conforme o modelo 2

Comparando os gráfico da variação da absorção da H_2TCPP e H_2TSPP em 416 nm em função da concentração de cloroquina (Figura 21) com os gráficos teóricos pode-se concluir que a complexação ocorre conforme o modelo 1 (Figura 20 a). O modelo 2 não se adequou aos dados experimentais, enquanto que o modelo 3 prediz que, para razões de cloroquina/FeP relativamente altas, o complexo 1:1 predomina (EGAN et al., 1997). Assim, utilizando a equação do modelo 1 (equação 1) foram obtidos as constantes de associação ($\log K$) para os complexos formados entre a H_2TCPP e H_2TSPP com a cloroquina, 4.5 ± 0.1 e 4.3 ± 0.1 , respectivamente. Estes valores de constantes de complexação, no entanto, são menores do que aqueles encontrados para a agregação da cloroquina com a FePPIX ($\log K = 5.2 \pm 0.05$, em 40% DMSO, 60% tampão HEPES pH 7.5) (EGAN et al., 1997) e com a Fe(III)uro-porfirina I ($\log K = 6 \pm 0.1$, meio aquoso, pH 6,0, 25 °C)

(CONSTANTINIDIS; SATTERLEE, 1988a). Provavelmente a discrepância é devido aos efeitos estéricos e às distorções na planaridade do anel devido aos grupos *meso* fenilas destas porfirinas sintéticas. Contudo, as constantes obtidas nesse estudo estão próximas daquelas relatadas para a agregação da cloroquina com a N-acetilmicroperoxidase-8 ($\log K = 4,6 \pm 0.05$, tampão fosfato pH 6,4, 25 °C) (MARQUES et al., 1996) e maiores do que as constantes de agregação de outras drogas antimalária, como a quinina ($\log K = 4 \pm 0.1$, 25 °C (EGAN et al., 1997)) e mefloquina ($\log K = 3,8 \pm 0.1$, 25 °C (EGAN et al., 1997)) com a FePPIX, indicando que o agregado π - π formado pelas porfirinas *meso* substituídas tem estabilidade semelhante àquela das ferro(III) porfirinas naturais.

Estes valores de constante de agregação são mais significativos quando se considera que as porfirinas *meso* substituídas não podem interagir com a cloroquina por coordenação e, portanto, só duas interações são possíveis: interações eletrostáticas e as interações π - π .

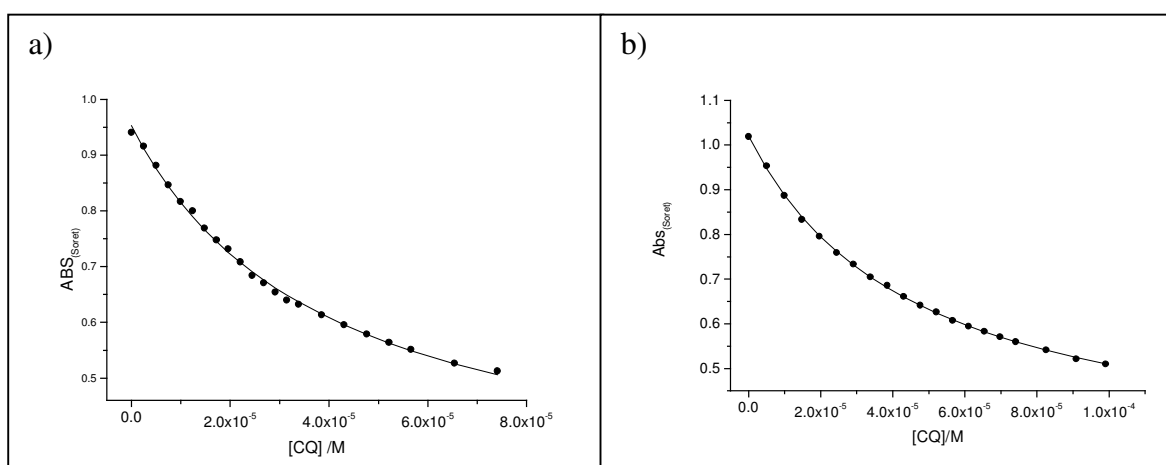


Figura 21. Variação da absorção em 416 nm da (a) H₂TCPP e (b) H₂TSPP em função da concentração de cloroquina.

Embora a titulação com 1,6-hexanodiamina tenha mostrado que a formação de par iônico por si só não leva à agregação é importante determinar se as interações eletrostáticas entre a cloroquina e as porfirinas influencia na formação do complexo π - π . Com este intuito foi realizada a titulação da porfirina H₂TCPP em três diferentes pHs, 6.4, 9.4 e 11.4. Colocando-se em um gráfico a variação da

absorbância em 416 nm (Soret) em função da concentração da cloroquina para os 3 valores de pH (Figura 22) pode-se observar que, em pH 9.4 as mudanças são menores que aquelas observadas em pH 6,4 e, em pH 11.4 nenhuma variação da banda Soret é observada com o aumento da concentração da cloroquina. Para todos os pHs estudados os grupos carbóxi na H₂TCP_P se encontram completamente ionizados. Contudo, enquanto os dois nitrogênios mais básicos da cloroquina, aquele da amina terminal da cadeia lateral (pK_a 10.2) e aquele do anel quinolínico (pK_a 8.2), estão completamente protonados em pH 6.4, em pH 9.4 somente o nitrogênio terminal está protonado e em pH 11.4 nenhum dos nitrogênios está protonado (HAWLEY et al., 1996). Assim, é esperado que as interações iônicas entre as espécies catiônicas e aniônicas seja maior em pH 6.4, o que coincide com o maior deslocamento e variação da absorção da banda Soret. Já em pH 11.4, em que as interações iônicas não são favorecidas, nenhuma variação da banda Soret é observada com o aumento da concentração da cloroquina (Figura 22). A pequena variação da banda Soret em pH 9.4 corresponde à pequena interação iônica entre a porfirina aniônica e a cloroquina mono-catiônica. Estes resultados indicam que a atração eletrostática entre a cloroquina catiônica e a H₂TCP_P aniônica favorece a complexação via interação π - π .

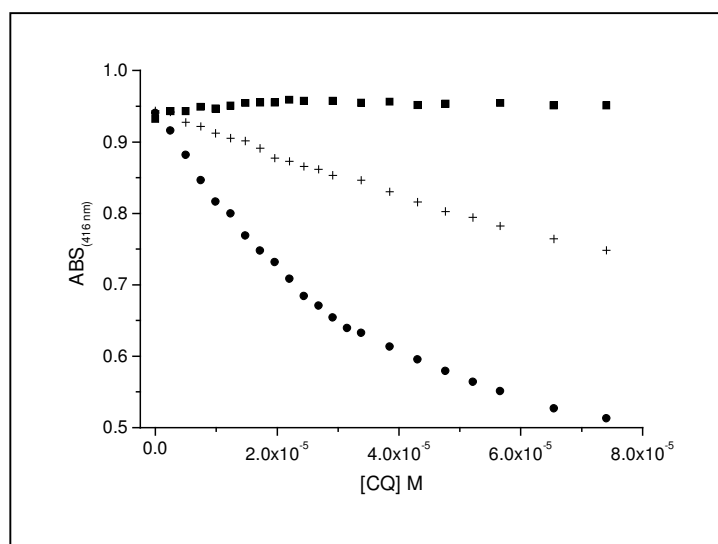


Figura 22. Variação da absorção em 416 nm da H₂TCP_P (4×10^{-6} M) com a concentração da cloroquina, em tampão fosfato pH 6.4 (●), pH 9.4 (+) e pH 11.4 (■).

É também interessante notar que estudos de modelagem molecular usando o campo de força MM+ do programa HYPERCHEM mostraram que a distância entre a cloroquina e o anel porfirínico é de 3.2 Å, valor muito próximo àquele encontrado por Marques para o complexo cloroquina N-acetilmicroperoxidase-8 em trabalho semelhante (MARQUES et al., 1996). Também foi observado que a energia total do sistema, calculada pelo programa considerando a formação do complexo, é 22 kcal.mol⁻¹ menor do que aquela calculada considerando os compostos isolados (distância entre os compostos > 20 Å). Quando calculada em um ambiente com água (caixa periódica suficientemente grande para conter ambas as moléculas), a diferença é ainda maior, 53 kcal.mol⁻¹. Estes valores, embora relativos, refletem os dados experimentais, que mostraram a grande importância da água como solvente, indicando que a modelagem molecular pode ser bastante útil na proposta de estruturas espaciais para complexos deste tipo.

As interações entre as ferro(III) porfirinas, (FeTCPP)Cl e (FeTSPP)Cl, com a cloroquina foram estudadas em água e, como observado para as porfirinas base livre, houve uma diminuição na intensidade e um deslocamento da banda Soret (Figura 23 e 24, respectivamente). O deslocamento para o vermelho indica o mesmo padrão de complexação observado para a porfirina base livre. Este deslocamento, como explicado anteriormente para a H₂TCPP, é causado pela diminuição do “gap” de energia entre os orbitais HOMO/LUMO devido as interações π-π. As ferro(III) porfirinas apresentam uma boa afinidade pela cloroquina, com constantes de complexação para a (FeTCPP)Cl e para a (FeTSPP)Cl de (log K) 4.7 ± 0.1 e 4.6 ± 0.1, respectivamente. Estes valores são muito próximos daqueles observados para a H₂TCPP e H₂TSPP, indicando que, em meio aquoso, a presença do metal central não influencia significativamente na complexação.

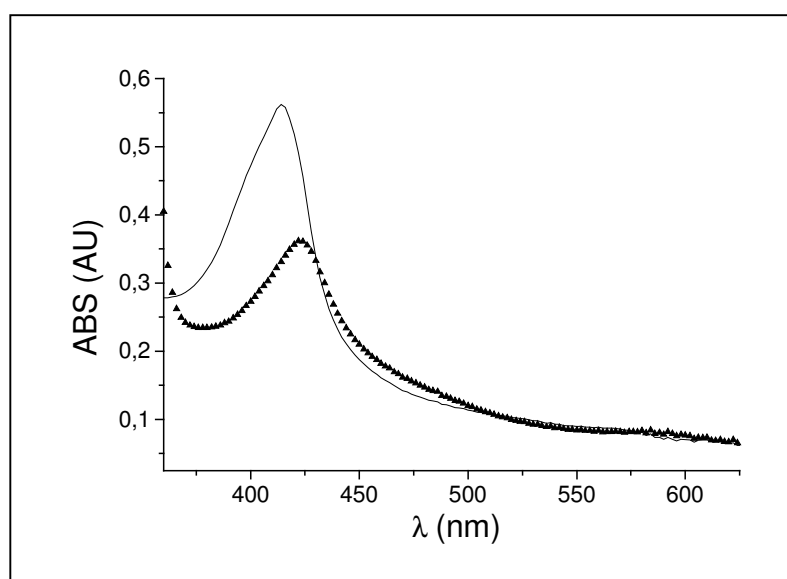


Figura 23. Variação do espectro da $(\text{FeTCPP})\text{Cl}$ (10×10^{-6} M) na presença de cloroquina em tampão fosfato 0,025M pH 6,4; — 0 equiv. de CQ; -▲- 35 equiv. De CQ.

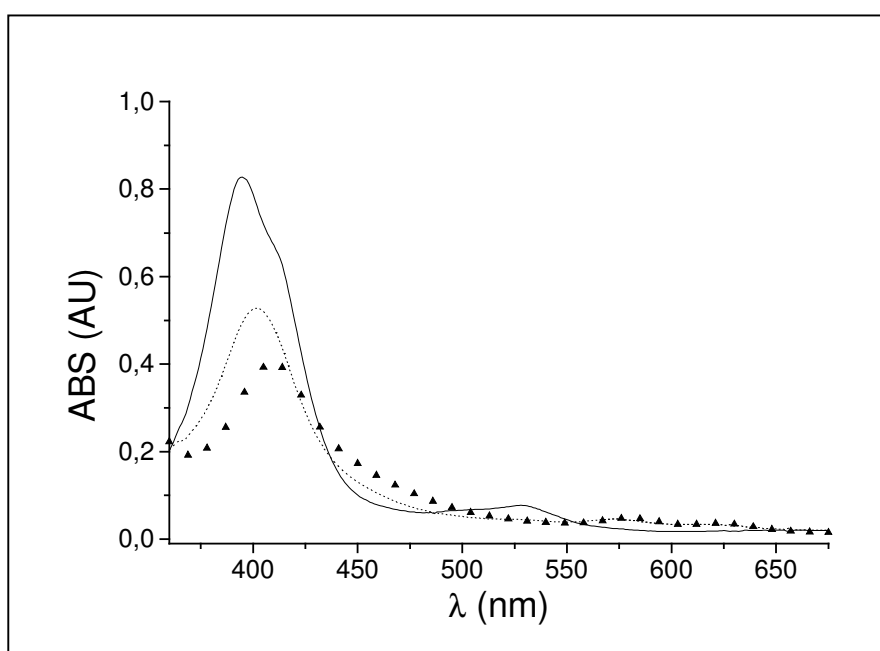


Figura 24. Variação do espectro da $(\text{FeTSPP})\text{Cl}^1$ (10×10^{-6} M) com a adição de KCl e com adição de CQ, em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4. — $(\text{FeTSPP})\text{Cl}^*$, ----- 2 M de KCl; -▲- 35 equivalent de CQ.

¹ A deformação da banda Soret no espectro de absorção da FeTSPP é causada pelo equilíbrio entre as duas espécies presentes em tampão fosfato pH 6,4. $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2\text{TSPP}]$ com Soret em 392 nm; e $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})(\text{TSPP})]$ com Soret em 415 nm (FLEISCHER, 1971).

Além das porfirinas e ferro(III) porfirinas aniônicas, o estudo espectroscópico da interação da cloroquina em tampão fosfato pH 6,4 também foi realizado com as porfirinas catiônicas, H₂TMPyP e FeTMPyP, no entanto, nenhuma variação foi observada nos espectros com a adição da cloroquina, indicando que nenhuma complexação π - π ocorre entre a porfirina catiônica e a cloroquina protonada (Figura 25).

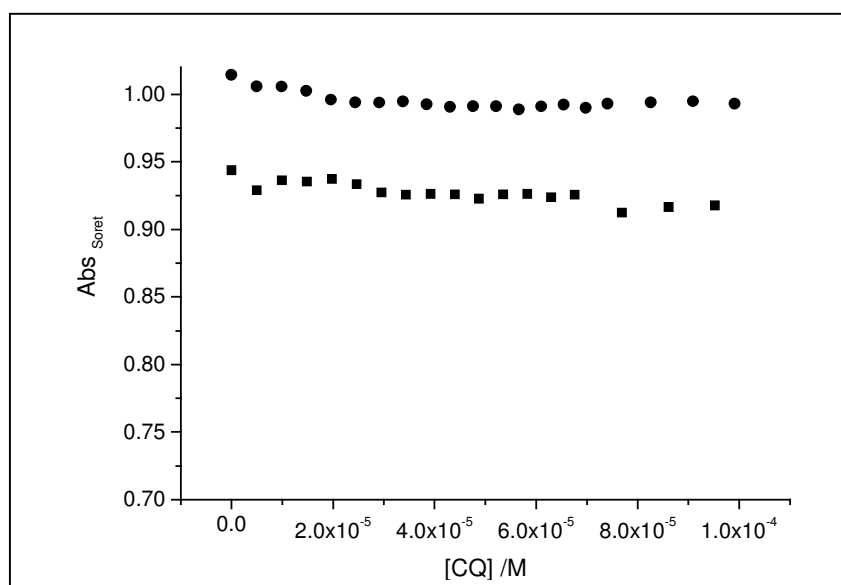


Figure 25. Variação do espectro da H₂TMPyP (●) FeTMPyP (■) com adição de CQ, em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4.

A maior estabilidade dos complexos π - π porfirinas ou ferro(III) porfirinas aniônicas/cloroquina em meio aquoso comparada àquela observada em MeOH pode ser atribuída à maior polarizabilidade do metanol em relação a água. Embora pares iônicos entre as porfirinas e a cloroquina sejam possíveis em metanol, a solvatação de ambas as moléculas competem efetivamente com a complexação π - π (SCHENEIDER; WANG, 1994). Resultados semelhantes foram relatados na literatura em estudos da complexação da 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-trimetilamoniumilfenil)porfirina e 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-propilpiridiniumil)porfirina e H₂TCPP com uma série de compostos aromáticos aniônicos, catiônicos e neutros, os quais mostraram que forças de dispersão (como empacotamento π - π) são desfavorecidas em solventes orgânicos (SCHENEIDER et al., 2002; SCHENEIDER; WANG, 1994).

Conclui-se desses estudos que, em água, a complexação entre a porfirina (ou ferro(III) porfirina) e a cloroquina origina-se de um efeito cooperativo entre as interações π - π e eletrostáticas envolvendo ambos os compostos. Pode-se também concluir que a cloroquina não coordena no metal central da porfirina.

IV.2. – Análise dos metabólitos da cloroquina por CLAE

Para que fosse possível a realização dos estudos de oxidação da cloroquina catalisadas pelas ferro(III) porfirinas sintéticas foi necessário, primeiramente, desenvolver um método de extração ou recuperação do meio reacional e análise dos possíveis metabólitos conhecidos deste fármaco.

A cloroquina é usualmente excretada do corpo humano na forma de 2 metabólitos, a monodesetilcloroquina e a bisdesetilcloroquina, cujas estruturas são apresentadas na Figura 26.

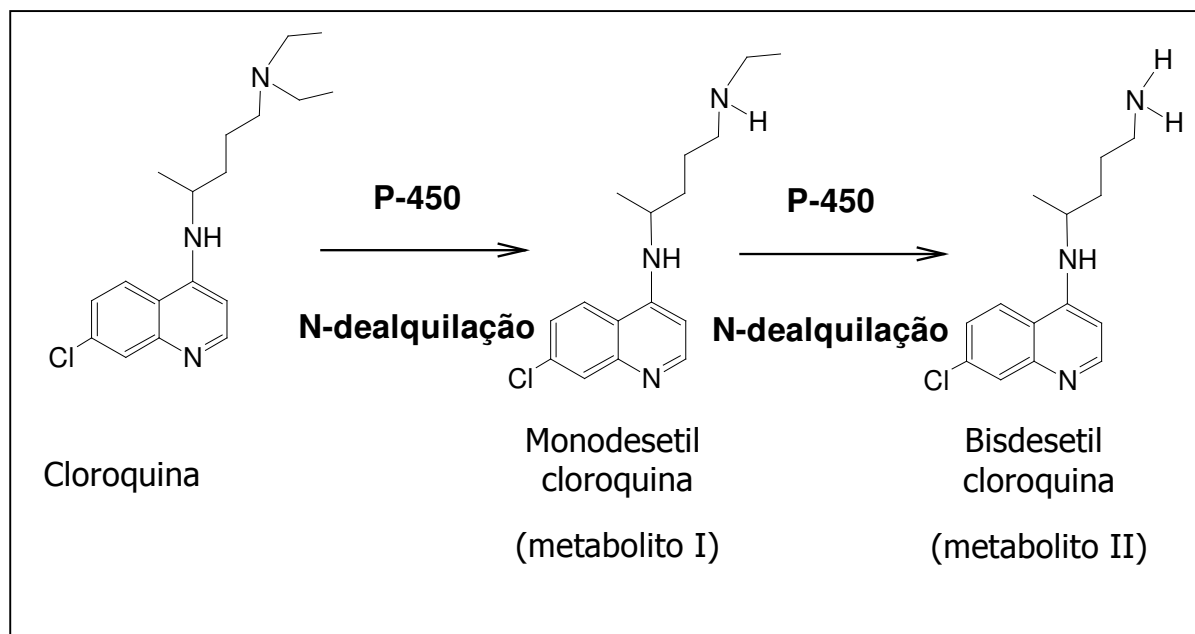


Figura 26. Principais metabólitos da cloroquina encontrados no ser humano (O'NEILL, 1998)

IV.2.1. Recuperação dos metabólitos da cloroquina

A recuperação dos produtos do meio reacional é uma etapa de grande importância, pois evita que a ferro(III) porfirina e o oxidante sejam injetados na coluna de separação, juntamente com os produtos da oxidação, o que levaria a uma

rápida degradação da fase estacionária (C-18) da coluna visto que as ferro(III) porfirinas poderiam precipitar no interior da mesma, causando entupimento.

O método utilizado foi baseado nas diferentes solubilidades apresentadas pelas ferro(III) porfirinas e pela cloroquina e seus metabólitos em diferentes pHs. As ferro(III) porfirinas carboxi substituídas estudadas são solúveis em meio aquoso somente quando o pH é maior que 5. A extração envolveu a retirada de alíquotas do meio reacional que, após secagem sob jato de ar quente, foram solubilizadas em solução aquosa de heptanossulfonato de sódio 0,015 M, trietilamina 0,015 M e ácido fosfórico (pH 3,4), conforme descrito no item III.3.2.A. A etapa de secagem prévia da alíquota é fundamental pois, uma vez solubilizadas, as ferro(III) porfirinas carboxi substituídas não precipitam facilmente e quando o pH é abaixado acabam formando emulsões, de difícil separação.

Como a secagem envolve aquecimento, uma das alíquotas analisadas foi injetada no cromatógrafo CLAE sem ser secada, para avaliar o efeito desta etapa nos produtos da reação. A comparação dos resultados das duas análises não mostrou nenhuma diferença significativa e, portanto, a etapa de secagem foi mantida para todas as análises seguintes uma vez que, como mencionado anteriormente, esta etapa é fundamental para uma maior vida útil da coluna de separação.

A recuperação foi também bastante eficiente tanto para a cloroquina quanto para seus metabólitos. Os valores médios de recuperação para os três compostos variaram em torno de 95%.

IV.2.2. Análise da cloroquina e seus metabólitos

A análise da cloroquina e seus metabólitos foi baseada em método descrito por Houzé *et al* (HOUZÉ *et al.*, 1992) e otimizada variando-se fluxo, proporção dos eluentes e força iônica da fase aquosa.

A condição ótima para análise foi aquela utilizando uma coluna C18 da Merck de 125x4 mm e como fase móvel solução aquosa de heptanossulfonato de sódio 0,015 M, trietilamina (0,015 M) e ácido fosfórico (até pH 3,4)/acetonitrila na proporção 74:26 (separação isocrática), fluxo à 1,5 mL/min e temperatura da coluna 35 °C. O cromatograma obtido, Figura 27, indica uma boa separação dos compostos além de um curto tempo de análise e boa reprodutibilidade

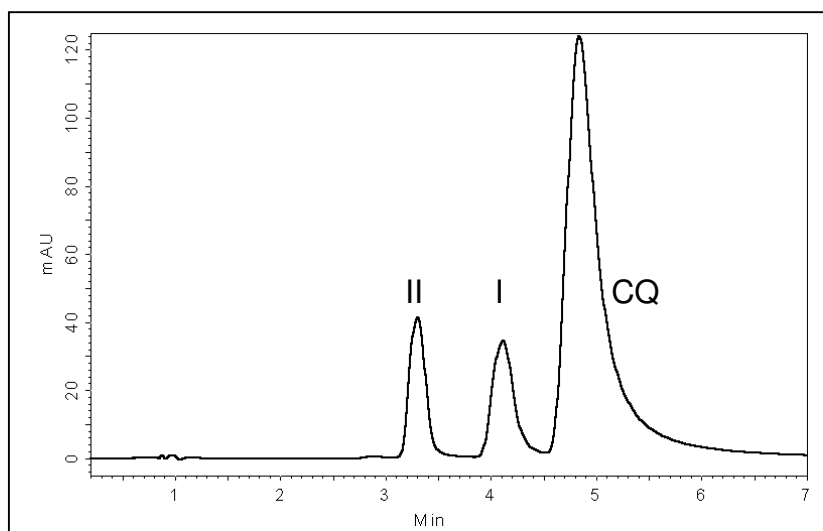


Figura 27. Cromatograma da análise da cloroquina e de seus metabólitos, eluidos com 0,015 M, trietilamina (0,015 M) e ácido fosfórico/acetonitrila na proporção 74:26 (separação isocrática), fluxo à 1,5 mL/min e temperatura da coluna 35 °C.

Para a atribuição dos picos a cloroquina e seus metabólitos foram injetados primeiramente de forma isolada. Para garantir que os compostos não sofriam variação significativa dos seus tempos de retenção quando presentes em uma mesma solução, uma amostra contendo os três compostos foi analisada e, em seguida, foi adicionada à mesma uma quantidade extra conhecida do metabólito 1. A análise posterior permitiu determinar com precisão a ordem de eluição e também concluir que a presença simultânea dos compostos não interferia no tempo de retenção de cada um.

A ordem de eluição, metabólito 2 ($tr=3,3$ min), metabólito 1 ($tr=4,2$ min) e cloroquina ($tr=5,1$ min), segue a ordem decrescente de polaridade e concorda com aquela apresentada na literatura (HOUZÉ et al., 1992; PUSSARD et al., 1986)

IV.2.3. Padronização do método de análise

Em geral a análise da cloroquina e de seus metabólitos é feita a partir de amostras de sangue e/ou urina, e do mesmo modo que o método utilizado neste trabalho, tem como etapa inicial a extração dos compostos. A análise quantitativa com maior exatidão requer a presença de um padrão interno conhecido, que tenha como principal característica a habilidade de ser extraído conjuntamente com os

demais metabólitos presentes na amostra. Esta característica é garantida pela similaridade de estrutura e reatividade entre padrão e droga. No entanto, encontrar um padrão com estas características, mas que não interfira na análise é bastante difícil. Por este motivo, optou-se pela não utilização de padrão interno, como geralmente é observado nos trabalhos da literatura (MAURIN et al., 2003; KESERÜ et al., 1999). Embora os resultados quantitativos, nesse caso, não sejam exatos, em termos qualitativos o método possui maior confiabilidade.

Na padronização do método de análise por CLAE foi determinado o valor do fator resposta (F_1) do detector apenas para a cloroquina, através da construção de curvas de calibração lançando na abscissa a concentração da droga e na ordenada a área do pico. Através de regressão linear determinou-se o coeficiente linear da curva, que corresponde ao fator resposta. Esse valor foi aplicado para determinação da massa do substrato não oxidado através da equação:

$$[CQ] = A_p/F_1 \quad \text{eq. 9}$$

Onde, [CQ] é a concentração da cloroquina e A_p , a área do pico do substrato. O valor de F_1 encontrado para a cloroquina foi $1,42 \times 10^{+10}$.

A determinação do fator de resposta F_1 para os metabólitos da cloroquina foi impossibilitada pela falta de massa suficiente destes compostos padrões para preparar as soluções estoque. As soluções dos metabólitos fornecidas pela Profa. Pierina, usadas no desenvolvimento do método analítico, tinham concentração aproximada e assim não puderam ser utilizadas como soluções padrão. Uma vez que a detecção é feita por um detetor UV-Vis, e que as estruturas dos metabólitos só diferenciam da cloroquina por variações nas cadeias laterais e não no centro cromóforo, assumiu-se que o fator resposta F_1 para os metabólitos é o mesmo que o da cloroquina.

IV.3. – Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas usando iodosilbenzeno como oxidante

A oxidação da cloroquina no sistema biológico ocorre por reação de N-dealquilação da amina terciária presente na cadeia lateral (Figura 28) (O'NEILL, 1998; FOLEY, 1998). Inicialmente, pela reação de oxidação da ferro(III) porfirina forma-se a espécie catalítica de alta valência, radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion, $\text{Fe(IV)OP}^{\bullet+}$. A partir daí existem dois mecanismos propostos para a reação (Figura 28). O primeiro mecanismo (A) propõe que a etapa inicial da N-dealquilação envolve a transferência de um elétron do nitrogênio da amina substituída para o intermediário reativo radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion. O segundo (B) propõe que, na etapa inicial, ocorre a extração de um hidrogênio do carbono alfa ao nitrogênio da amina substituída. Em ambos os casos, após a etapa inicial o carbono alfa é hidroxilado e, em seguida, a ligação carbono-nitrogênio é quebrada. Estudos realizados têm apontado fortes evidências de que a etapa inicial da N-dealquilação ocorre segundo o mecanismo B (KARKI et al. 1995, BHAKTA et al., 2002). Assim sendo, o mecanismo geral é muito semelhante àquele observado para as reações de hidroxilação de alcanos (MEUNIER, 1992).

A atividade catalítica das ferro(III) porfirinas carbóxi substituídas foi investigada utilizando-se inicialmente o iodosilbenzeno como doador de oxigênio. O PhIO é um oxidante de dois elétrons bastante conhecido e freqüentemente utilizado em sistemas metaloporfirínicos, além de apresentar baixo rendimento na oxidação de alcanos e alcenos sem a presença do catalisador (MEUNIER, 1992). Iodosilbenzeno é considerado um “oxidante padrão” dos sistemas catalíticos metaloporfirínicos e a grande quantidade de resultados disponíveis permite que se faça comparações com o sistema estudado.

As reações de oxidação foram realizadas em meio orgânico e aquoso uma vez que foram observadas diferenças na interação entre catalisador e substrato nestes meios.

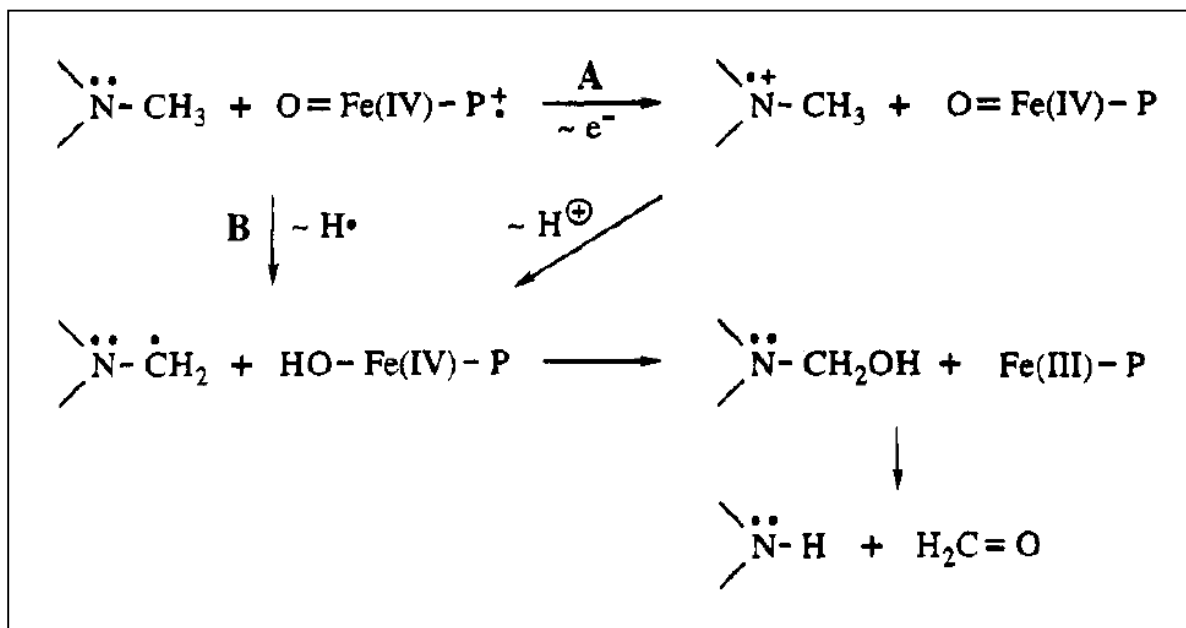


Figura 28. Mecanismo de N-dealquilação catalisada pelo P-450 (KARKI et al., 1995)

IV.3.1. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno em MeOH

As reações foram realizadas utilizando uma relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8}$: $1,25 \times 10^{-6}$: $7,5 \times 10^{-6}$ mols (1:50:300). A alta concentração relativa do substrato é importante porque favorece a reação desejada frente às reações competitivas, como por exemplo, a destruição auto-oxidativa da ferro(III) porfirina. No entanto, no caso de estudos de fármacos, a concentração absoluta deste não pode atingir valores muito altos, pois extrapolaria o limite de detecção do equipamento (UV/Vis) e dificultaria a quantificação do substrato consumido na reação.

A cloroquina usada apresenta grau de pureza maior que 99 %, ainda assim, ao ser analisada por CLAE na concentração de análise, foram observados alguns picos de impurezas com tempo de retenção referentes àqueles dos metabólitos. Assim, o valor de todas as áreas dos produtos de oxidação foi corrigido subtraindo do valor obtido na análise o valor encontrado para o respectivo pico na cloroquina de partida.

A Figura 29 mostra os cromatogramas típicos obtidos das reações de oxidação catalisadas por (FeTCCP)Cl em MeOH (Figura 29). Também podemos observar a presença de monodesetilcloroquina (metabolito I) como impureza na solução padrão de cloroquina (Figura 29, C).

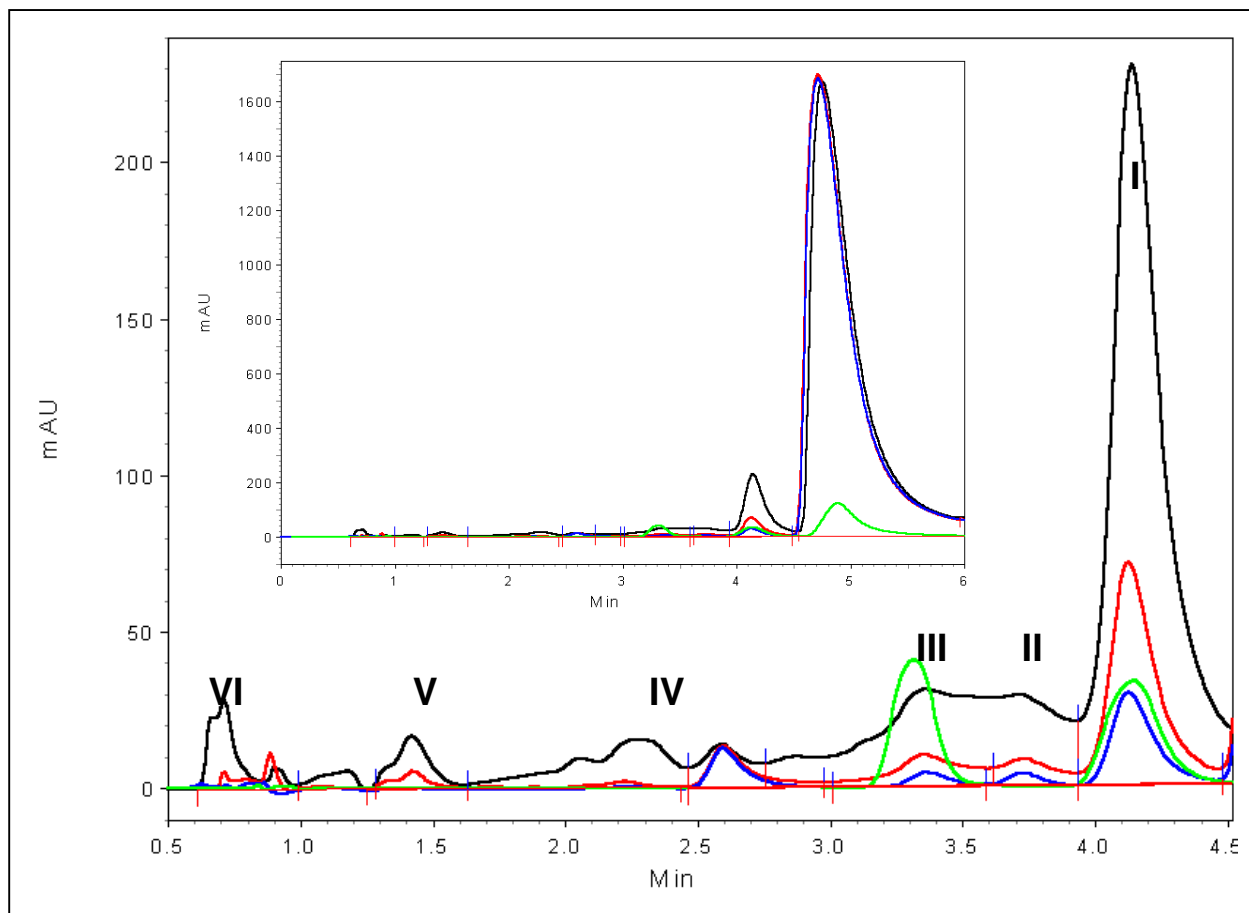


Figura 29. Cromatogramas típicos da análise de uma reação de oxidação da cloroquina por iodossilbenzeno catalisada por FeP (apenas os produtos de oxidação). Encarte: Cromatograma completo com o pico da cloroquina (substrato). A) — Cromatograma de uma reação catalisada pela (FeTCCP)Cl em MeOH; B) — Cromatograma de uma reação de oxidação sem catalisador em MeOH; C) — Cromatograma de uma solução de cloroquina; D) — Cromatograma de uma solução padrão de metabólitos;

Tabela 3. Rendimento (%) da oxidação da cloroquina pelo PhIO, catalisada por ferro(III) porfirinas em MeOH, após 6 h de reação

FeP	Carga do anel	Monodesetil-Cloroquina	Produtos			
			II+III	IV	V	VI
FePPIX	2 -	20	6	1	traço	traço
(FeTCPP)Cl	4 -	29	11	2	traço	1
(FeTSPP)Cl	4 -	15	4	1	-	-
(FeTMPyP)Cl	4+	traço	-	-	-	-
(FeTPFPP)Cl	0	2	-	-	-	-

Observa-se na Tabela 3 que, para todas as metaloporfirinas o principal produto da oxidação da cloroquina é o derivado monodesetil (produto I). Os produtos II e III não apresentam boa separação e, por isso, foi considerada a soma das áreas de cada um para o cálculo do rendimento, ainda assim o rendimento obtido é 2 vezes inferior àquele observado para a monodesetilcloroquina. Os rendimentos para os demais produtos é inferior a 2 %.

Observa-se também que apenas as ferro(III) porfirinas aniônicas são catalisadores eficientes para a oxidação da cloroquina por PhIO, sendo que os maiores rendimentos são observados para as FeP com o maior número de substituintes aniônicos. Estes resultados estão relacionados com as interações cloroquina:FeP discutidas no item IV.1.

A medida que o número de grupos carboxi da porfirina diminui, a interação catalisador e substrato também diminui e, como mostram os resultados da Tabela 3, o rendimento da monodesetil cloroquina é menor. Em geral, observa-se na oxidação de substratos orgânicos que a atividade catalítica das metaloporfirinas aumenta com o número crescente de substituintes eletronegativos no anel porfirínico, os quais aumentam a eletrofilicidade da espécie intermediária ativa, o radical ferro(IV)oxo

porfirina π -cátion, aumentando portanto a velocidade da reação com o substrato (MEUNIER et al., 2000). No entanto, a interação FeP:CQ, bastante favorecida na (FeTCPP)Cl e na (FeTSPP)Cl, parece ter um efeito mais importante na oxidação deste substrato que a própria reatividade do intermediário reativo. Esta hipótese é reforçada pela maior atividade das ferro(III) porfirinas aniônicas, (FeTSPP)Cl e (FeTCPP)Cl do que aquela observada para a porfirina neutra, (FeTPFPP)Cl, (normalmente um ótimo catalisador para a oxidação de hidrocarbonetos) (EVANS; LINDSAY-SMITH 2000; MEUNIER et al, 2000; BALOGH; KESERÜ, 2004). Sugerindo que, em MeOH, as interações eletrostáticas têm um importante papel na oxidação da cloroquina. Estas interações são provavelmente responsáveis por aumentar a concentração de substrato nas proximidades do oxidante ativo, o que favorece a oxidação do substrato em detrimento de reações competitivas, como a auto-oxidação do catalisador.

A ausência de atividade catalítica da ferro(III) porfirina catiônica, (FeTMPyP)Cl, pode ser atribuída à repulsão eletrostática entre o substrato carregado positivamente e o intermediário reativo formado por este catalisador, também com carga positiva.

O resultado mais interessante, no entanto, envolve a oxidação catalisada pela FePPIX. Esta ferro(III) porfirina natural apresenta geralmente baixa atividade catalítica quando isolada, devido à sua rápida degradação na presença de oxidantes. A degradação é resultado da ausência de substituintes nos carbonos *meso*, bastante reativos. Esta degradação é minimizada na presença da cloroquina, por ser esta capaz de formar complexos estáveis em meio orgânico com a FePPIX. O complexo formado impede a autooxidação do anel porfirínico, principal causa de destruição do catalisador e, como resultado, esta FeP é um catalisador quase tão eficiente quanto a (FeTCPP)Cl na oxidação da cloroquina em MeOH (Tabela 3). Proteção semelhante é descrita na literatura em estudos cinéticos em que a FePPIX foi usada como modelo das enzimas catalase e peroxidase (RIBEIRO et al., 1995; RIBEIRO et al., 1997).

Além da monodesetilcloroquina, outros produtos foram obtidos em quantidades relativamente baixas (Figura 29 e Tabela 3). Uma vez que estes compostos apresentam espectro UV-Vis semelhante àquele da cloroquina, mas com um menor tempo de retenção, pode se supor que estes produtos são também

formados pela oxidação da cloroquina e não são impurezas presentes no meio. A elucidação estrutural destes compostos é apresentada no próximo item, no entanto, pode-se afirmar que nenhum deles apresentou tempo de retenção similar àquele da bisdesetilcloroquina.

IV.3.2. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno em tampão fosfato 0,025 M, pH 6,4

As reações realizadas em meio orgânico foram repetidas em meio aquoso (tampão fosfato 0,025 M, pH 6,4). Segundo os resultados dos estudos espectroscópicos de interação entre as porfirinas e ferro(III) porfirinas sintéticas com a cloroquina, são esperados resultados de oxidação catalítica diferentes neste meio daqueles apresentados em MeOH.

As reações de oxidação em meio aquoso foram realizadas nas mesmas condições daquelas em meio orgânico. Um cromatograma típico da reação é mostrado na Figura 30 e os rendimentos, já corrigidos, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimento (%) da oxidação de cloroquina por PhIO, catalisada por ferro(III) porfirinas em tampão fosfato, após 6 h de reação.

FeP	Carga do	metabólito
FePPIX	2 -	4
(FeTCPP)Cl	4 -	18
(FeTSPP)Cl	4 -	14
(FeTMPyP)Cl	4+	Traço
(FeTPFPP)Cl	0	- ^c

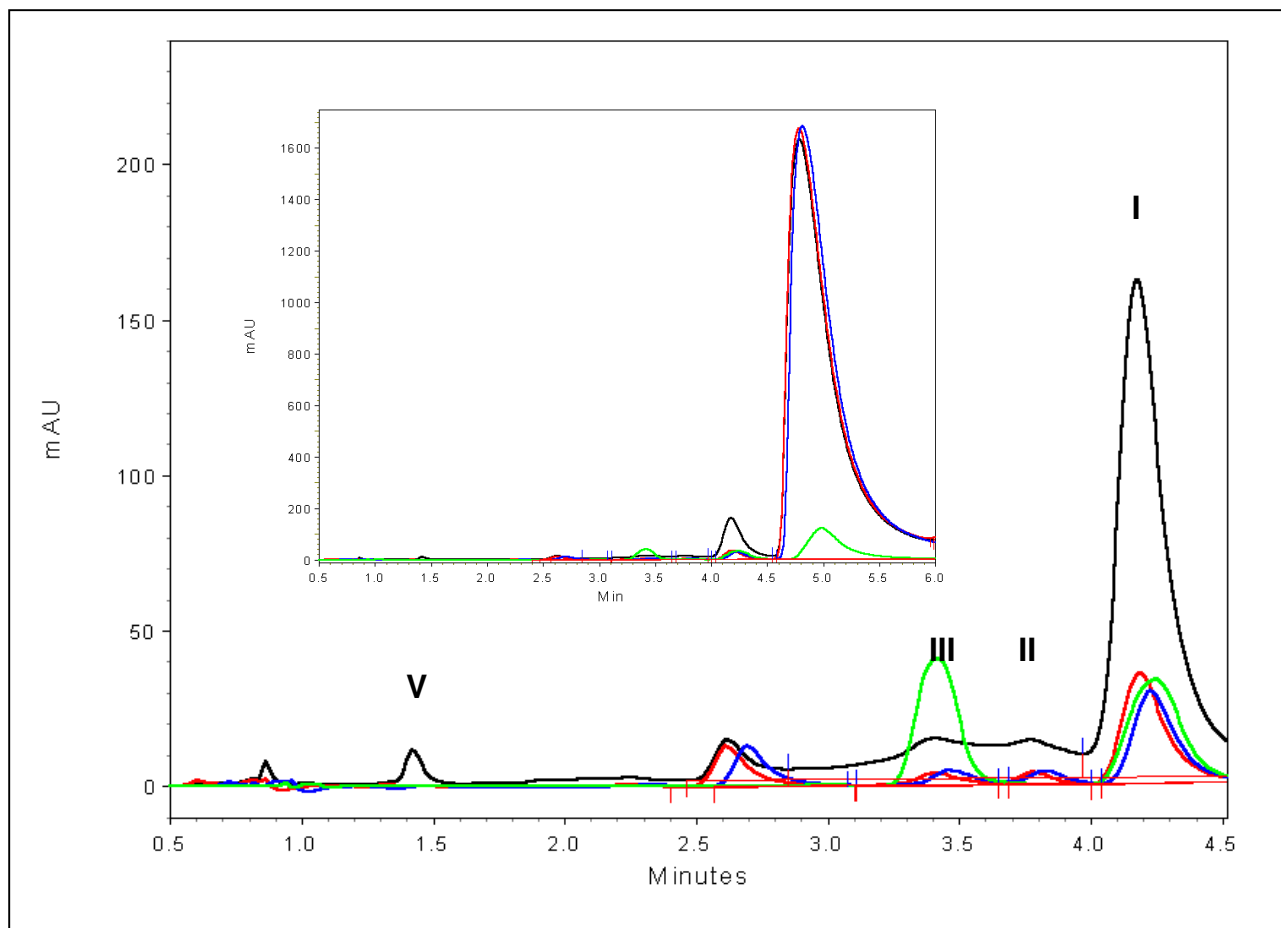


Figura 30. Cromatogramas típicos da análise de uma reação de oxidação da cloroquina por iodosilbenzeno catalisada por FeP (apenas os produtos de oxidação). Encarte: Cromatograma completo com o pico da cloroquina (substrato). A) — Cromatograma de uma reação catalisada pela (FeTCCP)Cl em tampão fosfato 0,025M pH 6,4; B) — Cromatograma de uma reação de oxidação sem catalisador em tampão fosfato 0,025M pH 6,4; C) — Cromatograma de uma solução de cloroquina; D) — Cromatograma de uma solução padrão de metabólitos;

Observa-se na Figura 30 e na Tabela 4 que, em meio aquoso, ao contrário do que foi observado em MeOH, foi obtido apenas o metabólito monodesetilcloroquina. Também se pode observar que os rendimentos obtidos são, de maneira geral, menores que em MeOH. Dos estudos de interação foi possível constatar que em meio aquoso, ao contrário do que ocorre em MeOH, as ferro(III) porfirinas são capazes de formar agregados π - π com a cloroquina. Pode-se assim concluir que a

formação do agregado FeP:CQ em meio aquoso leva a uma diminuição da atividade do catalisador contudo a um aumento da seletividade da reação. Este efeito é pode ser explicado ao consideramos que a molécula de cloroquina, em meio aquoso, se encontra sobre o centro metálico da ferro(III) porfirina. Este posicionamento, observado para o complexo CQ:FePPIX (LEED et al., 2002), dificulta a aproximação do oxidante PhIO ao centro metálico diminuindo a probabilidade de transferência do oxigênio do oxidante para o catalisador. Assim, o PhIO pode participar de reações paralelas, como o desproporcionamento, o que diminuiria o rendimento da reação. No entanto, quando a transferência de oxigênio entre oxidante e catalisador ocorre com sucesso a formação do complexo FeP:CQ torna orienta este substrato para o sítio catalítico de maneira que apenas a região da menos impedida estéricamente pode ser oxidada, resultando em alta seletividade na reação.

Outra importante observação é o baixo rendimento da reação neste meio usando FePPIX (Tabela 4). Foi observado por espectroscopia UV-Vis que, neste meio, a FePPIX é destruída totalmente após alguns segundos de reação. Este resultado indica que o complexo formado em tampão fosfato é incapaz de proteger a metaloporfirina da destruição por autooxidação, como ocorreu em MeOH. Existem vários trabalhos na literatura que estudam o tipo de complexo formado entre a FePPIX e a cloroquina (EGAN et al., 1997; RIBEIRO et al, 1997; MARQUES et al., 1996; Constantinidis; Satterlee; 1988) . Nestes trabalhos é mostrado que o complexo formado entre a metaloporfirina e o fármaco é do tipo 2:1, ou seja, nestes complexos acredita-se que se tem um dímero de FePPIX para cada molécula de cloroquina. Portanto, a dimerização aproxima as moléculas de catalisador, aumentando as chances de que ocorra a degradação autooxidativa do mesmo.

Também é importante salientar que as reações em tampão foram igualmente dependentes do número de substituintes aniônicos no anel porfirínico, mostrando a importância das interações eletrostáticas em aproximar o substrato ao sítio catalítico, favorecendo a formação dos produtos.

IV.3.3. Análise dos produtos de oxidação da cloroquina por iodossilbenzeno catalisada pela (FeTCPP)Cl, em função do tempo

Para a análise dos produtos de oxidação em função do tempo as reações foram realizadas utilizando a relação de FeP : PhIO : cloroquina de (1:50:300). As injeções foram realizadas com 10 e 30 min de reação utilizando apenas a (FeTCPP)Cl como catalisador. A escolha da metaloporfirina foi baseada nos bons resultados catalíticos observados nos estudos anteriores, e no fato desta levar a maior número de produtos em relação às demais ferro(III) porfirinas, o que permite um maior número de informações sobre o mecanismo de formação destes produtos.

A Tabela 5 apresenta o rendimento dos produtos obtidos nas reações de oxidação da cloroquina em MeOH.

Tabela 5. Rendimento (%) em relação ao PhIO dos produtos obtidos nas reações de oxidação da cloroquina por iodossilbenzeno catalisada pela (FeTCPP)Cl, em MeOH.

Tempo de reação (min)	Produto de oxidação (%)				
	I*	II+II	IV	V	VI
Branco (24 h)	5	Traços	0	Traços	0
10	26	12	2	1	1
30	26	12	2	1	1

relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8}$: $1,25 \times 10^{-6}$: $7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300). As injeções foram realizadas com 10 e 30 min de reação * Produto I = monodesetilcloroquina

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que, após 10 min de reação, o rendimento de todos os produtos alcança um valor máximo e permanece constante. Portanto, não é possível observar qualquer interdependência na formação desses produtos. Pode-se concluir apenas que a reação é muito rápida em MeOH, sendo necessário apenas alguns minutos para que seja completada.

As reações foram repetidas em meio aquoso de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,4.

As injeções foram realizadas em 10, 30 e 60 min de reação utilizando apenas a (FeTCPP)Cl como catalisador. Os rendimentos dos produtos estão apresentados na Tabela 6. Em algumas das análises não foi possível separar os produtos II e III, e por isso, mais uma vez, os rendimentos de ambos foram colocados juntos para fins de comparação da seletividade.

Tabela 6. Rendimento (%) em relação ao PhIO dos produtos obtidos nas reações de oxidação da cloroquina por iodossilbenzeno catalisada pela (FeTCPP)Cl, em tampão fosfato 0,025 M, pH 6,4.

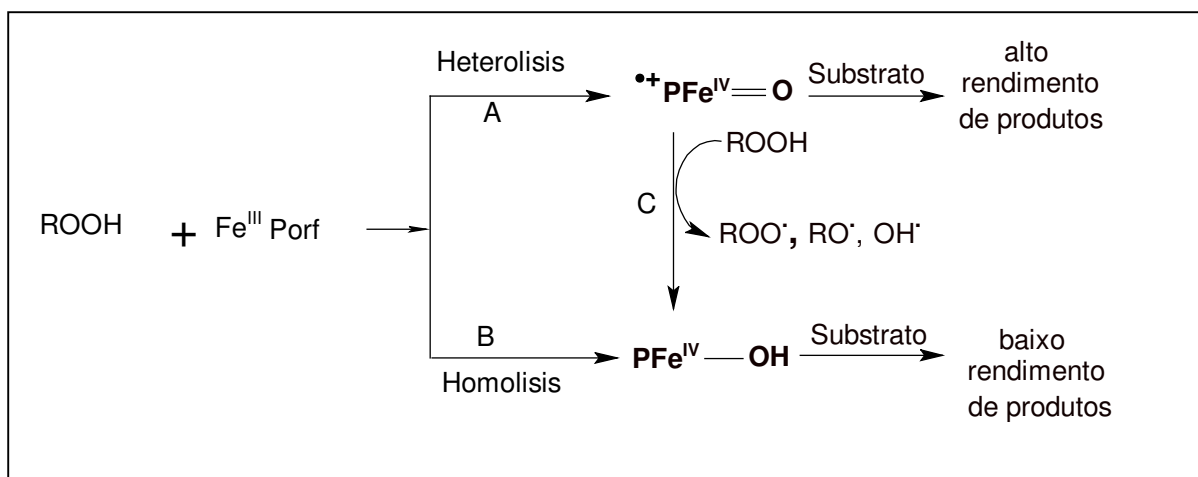
Tempo de reação (min)	Produto de oxidação (%)				
	I*	II+III	IV	V	VI
Branco (24 h)	traço	Traço	nd	nd	nd
10	13	5	nd	nd	nd
30	16	7	nd	1	nd
60	16	7	nd	1	nd

relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8}$: $1,25 \times 10^{-6}$: $7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300).

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que, em meio aquoso, as reações levam um tempo maior para serem completadas. Somente após 30 min de reação o rendimento de todos os produtos alcança um valor constante. Este intervalo de tempo maior para atingir o final da reação sugere que a formação do complexo entre a cloroquina e o catalisador dificulta a aproximação do oxidante à metaloporfirina e, conseqüentemente, aumenta o tempo necessário para que a reação se complete. A formação do complexo mais estável entre a metaloporfirina e a cloroquina foi também evidenciada pela diferença entre os rendimentos de oxidação em meio orgânico e aquoso (Tabelas 3 e 4).

IV.4 – Oxidação da cloroquina catalisada por uma série de ferroporfirinas (natural e sintéticas) usando ácido meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio como oxidantes

A atividade catalítica de ferro(III) porfirinas carboxi substituídas foi investigada utilizando-se o peróxido de hidrogênio e o ácido metacloroperbenzóico (CPBA) como doadores de oxigênio. O peróxido de hidrogênio é considerado um “oxidante limpo” para os sistemas catalíticos envolvendo metaloporfirinas, pois o produto formado da redução do peróxido é a água. Porém, a utilização do peróxido tem como principal problema a formação de radicais durante a transferência do oxigênio do oxidante para o catalisador. Como ilustrado no esquema 1, a transferência pode ocorrer via quebra homolítica ou via quebra heterolítica da ligação O-O do peróxido (NAM et al., 2000). Em metaloporfirinas contendo pequeno número de grupos substituintes eletronegativos, o metal central apresenta uma menor deficiência eletrônica, o que favorece a quebra homolítica da ligação O-O do peróxido (caminho B, esquema 1), levando à formação de radicais e diminuindo a seletividade da reação. Os radicais formados também atacam a metaloporfirina e, conseqüentemente, esta é degradada, diminuindo o rendimento final da reação. Devido a estes problemas, foram realizadas reações também utilizando como oxidante o ácido *meta*-cloroperbenzóico que, devido à presença do grupo Cl no anel benzílico, tende a sofrer quebra heterolítica da ligação O-O do peróxido, levando a formação do intermediário ferro(IV)oxo porfirina radical π -cátion, $\bullet^+PFe(IV)$, o mesmo formado nas reações utilizando iodosilbenzeno (caminho A, esquema 1).



Esquema 1 - Possíveis caminhos para a reação da ferro(III) porfirina com peróxidos

Com o intuito de avaliar a atividade do catalisador e a influência da interação catalisador/substrato nos rendimentos dos produtos, as metaloporfirinas (FeT CPP)Cl, a FePPIX e a (FeTNPP)Cl foram escolhidas como catalisadores. As duas primeiras metaloporfirinas foram escolhidas com base nos bons resultados catalíticos e de interação observados anteriormente, enquanto a (FeTNPP)Cl foi escolhida por apresentar um maior número de grupos eletronegativos e, portanto, uma maior probabilidade de causar a quebra heterolítica da ligação O-O do peróxido, levando a melhores rendimentos dos produtos.

IV.4.1. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio em MeOH

As reações foram realizadas utilizando uma relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8} : 1,25 \times 10^{-6} : 7,5 \times 10^{-6}$ mols (1:50:300). Após 2 h as reações foram interrompidas e o sobrenadante analisado por UV/Vis.

Os resultados catalíticos são apresentados na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7. Rendimento (%) em relação ao oxidante dos produtos das reações de oxidação da cloroquina por ácido metacloroperbenzoico, em MeOH, catalisadas por FeP.

Catalisador	Produto de oxidação (%)		
	I*	II+III	V
Branco	traços	traços	traços
(FeTNPP)Cl	2	traços	traços
FePPIX	1	traços	traços
(FeTCPP)Cl	7	1	traços

relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8}$: $1,25 \times 10^{-6}$: $7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300). * Produto I = monodesetilcloroquina

Os rendimentos das reações com todas as metaloporfirinas foram inferiores àqueles observados quando se utilizou iodosilbenzeno. Estes resultados podem ser atribuídos à rápida degradação dos catalisadores, causada por radicais formados a partir da quebra homolítica da ligação O-O do peróxido.

Ao contrário do que foi observado nas reações utilizando iodosilbenzeno em MeOH, a formação do complexo envolvendo a FePPIX e a cloroquina não foi capaz de proteger a metaloporfirina da degradação, uma vez que não se trata de auto destruição oxidativa mas, provavelmente, do ataque dos radicais ao anel porfirínico.

Quando se utiliza iodosilbenzeno como oxidante, a degradação pode ocorrer via auto-oxidação do catalisador, isto é, o intermediário radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion reage com uma segunda molécula de catalisador, oxidando-a. Quando a metaloporfirina interage com a cloroquina, o intermediário radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion transfere o oxigênio para a molécula do substrato próxima ao sítio catalítico, diminuindo as chances de que ocorra a auto-oxidação.

Utilizando o peróxido como oxidante tem-se, no caso da quebra homolítica da ligação O-O, a formação de radicais próximos ao sítio ativo do catalisador, os quais

dão início à reações radiculares que levam à completa destruição do mesmo, como pode ser observado pelo desaparecimento da banda Soret das ferro(III) porfirinas nos espectros UV/Vis obtidos no final da reação (Figura 31).

É também possível observar na Figura 31 que a (FeTNPP)Cl não foi destruída durante a reação. Ainda assim, a reação com esta FeP apresentou um baixo rendimento de produtos oxidados. A (FeTNPP)Cl é uma porfirina neutra e, conseqüentemente, incapaz de interagir eletrostaticamente com a cloroquina. Além disso, a presença de substituintes volumosos (NO_2) nos grupos *meso* fenilas da FeP dificulta as interações π - π entre o catalisador e o substrato, mostrando mais uma vez a importância da interação entre o catalisador e a cloroquina para a oxidação deste fármaco.

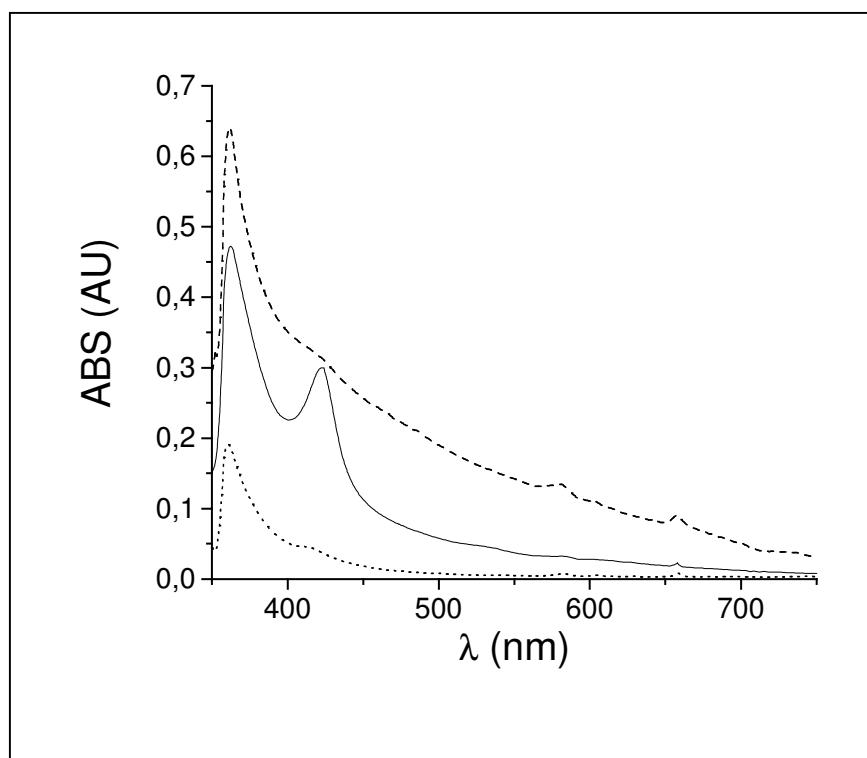


Figura 31. Espectros das FeP ao final da reação de oxidação da cloroquina utilizando ácido *meta*-cloroperbenzóico como oxidante, em MeOH; — (FeTNPP)Cl; ---- (FeTCPP)Cl; FePPIX

Para avaliar a influência do oxidante na formação dos produtos de oxidação da cloroquina foram realizadas algumas reações catalisadas pela (FeTCPP)Cl

utilizando H_2O_2 e CPBA como oxidante (Tabela 8). Pode-se observar que o H_2O_2 apresentou melhores resultados como oxidante.

Tabela 8. Rendimento (%) em relação ao oxidante dos produtos das reações de oxidação da cloroquina, em MeOH, catalisadas por $(\text{FeTCPP})\text{Cl}$.

Oxidante	Produto de oxidação (%)	
	I*	II+II
Branco	traço	traços
CPBA	7	1
H_2O_2	23	10

relação de $\text{FeP} : \text{PhIO} : \text{cloroquina}$ de $2,5 \times 10^{-8} : 1,25 \times 10^{-6} : 7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300). * Produto I = monodesetilcloroquina

O maior rendimento nas reações utilizando H_2O_2 é conseqüência da maior estabilidade do catalisador frente a este oxidante. Ao final da reação utilizando H_2O_2 ainda é possível observar a banda Soret em 422 nm, característica do complexo ferro(III) porfirina:cloroquina, o que indica que o catalisador não foi completamente destruído (Figura 32). A maior estabilidade do catalisador indica que a formação de radicais foi desfavorecida e que predominou a quebra heterolítica da ligação O-O do peróxido.

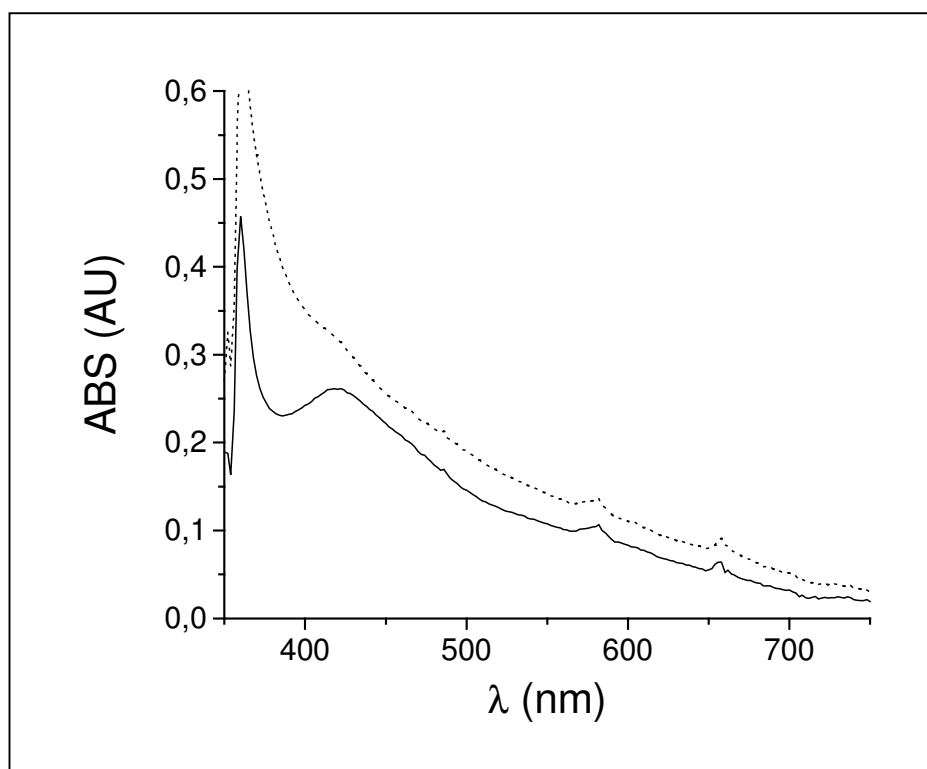


Figura 32. Espectros da (FeTCPP)Cl ao final da reação de oxidação da cloroquina utilizando ácido *meta*-cloroperbenzóico (·····) e H₂O₂ (—) como oxidantes, em MeOH

Com o objetivo de aumentar a estabilidade da (FeTCPP)Cl frente aos oxidantes CPBA e H₂O₂, foi adicionada à reação um co-catalisador, o imidazol. O imidazol age de duas maneiras: i) como um ligante axial do ferro(III) central da ferro(III) porfirina, favorecendo a clivagem heterolítica da ligação O-O do peróxido, fazendo com que a ferro(III) porfirina forme o intermediário mais reativo e ii) como catalisador ácido-base, auxiliando na desprotonação do peróxido e, mais uma vez, favorecendo a quebra heterolítica (NAM et al., 2000).

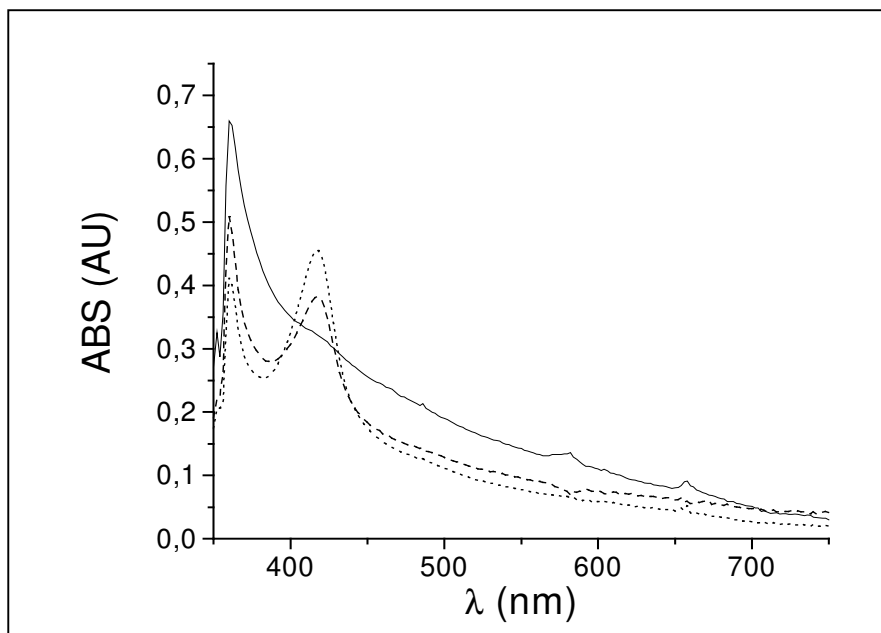


Figura 33. Espectros da (FeTCPP)Cl ao final da reação de oxidação da cloroquina utilizando ácido *meta*-cloroperbenzóico como oxidante, na presença de imidazol, em MeOH; — Sem Imidazol; - - - - FeP:Imidazol 1:1;..... FeP:Imidazol 1:50.

Observa-se na Figura 33 que a banda Soret ainda está presente ao final da reação evidenciando a maior estabilidade da metaloporfirina com o CPBA na presença do co-catalisador. Esta maior estabilidade, no entanto, não resulta em maior atividade catalítica (Tabela 9). Devido à grande afinidade do imidazol pelo íon Fe(III), este ligante pode coordenar às duas posições axiais do metal, resultando no bloqueio do sítio catalítico. Assim, a presença do co-catalisador e a interação da ferro(III) porfirina com a cloroquina dificultam a aproximação do peróxido ao metal central da metaloporfirina, o que impede a formação dos radicais responsáveis pela degradação do anel porfirínico, mas também do intermediário responsável pela oxidação da cloroquina, não resultando em ganho catalítico.

Tabela 9. Rendimento (%) em relação ao oxidante dos produtos obtidos nas reações de oxidação da cloroquina por ácido *meta*cloro perbenzóico e peróxido de hidrogênio catalisada por (FeT CPP)Cl, em MeOH.

Oxidante	Catalisador	Produto de oxidação (%)	
		I*	II + III
CPBA	(FeT CPP)Cl	7	2
	(FeT CPP)Cl:Im (1:1)	7	2
	(FeT CPP)Cl:Im	8	2
H ₂ O ₂	(FeT CPP)	23	12
	(FeT CPP):Im (1:1)	21	8
	(FeT CPP):Im (1:50)	22	10

relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8}$: $1,25 \times 10^{-6}$: $7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300), Im= imidazol. * Produto I = monodesetilcloroquina

IV.4.2. Atividade catalítica das FeP na oxidação da cloroquina por ácido meta-cloroperbenzóico e peróxido de hidrogênio em tampão fosfato 0,025 M, pH 6,4

As reações de oxidação da cloroquina pelo peróxido de hidrogênio e pelo ácido *meta*-cloroperbenzóico foram repetidas em meio aquoso utilizando a (FeT CPP)Cl como catalisador. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Rendimento (%) em relação ao oxidante dos produtos obtidos nas reações de oxidação da cloroquina catalisada por (FeTCPP)Cl, em meio aquoso.

Oxidante	Produto de oxidação (%)	
	I*	II+III
Branco	traços	traços
CPBA	traços	1
H ₂ O ₂	1	1
H ₂ O ₂ (com imidazol)	1	1

¹ relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8} : 1,25 \times 10^{-6} : 7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300); ² relação de FeP : PhIO : Imidazol: cloroquina de $2,5 \times 10^{-8} : 1,25 \times 10^{-6} : 2,5 \times 10^{-8} : 7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:1:300). * Produto I = monodesetilcloroquina

Os rendimentos observados foram muito inferiores àqueles obtidos em MeOH. Embora fosse esperado que as reações em meio aquoso apresentassem rendimentos menores, devido ao efeito inibidor do complexo cloroquina/metaloporfirina, era esperada uma maior atividade catalítica do sistema utilizando H₂O₂, uma vez que os espectros UV/Vis ao final da reação (Figura 34) indicaram que o catalisador não foi destruído. Outros sistemas descritos na literatura utilizando H₂O₂ e FeP (SUGIMOTO; SAWER, 1985; REREK, 1990) justificam que a baixa atividade catalítica é causada pelo desproporcionamento catalisado do H₂O₂ em H₂O e O₂, favorecida em meio aquoso.

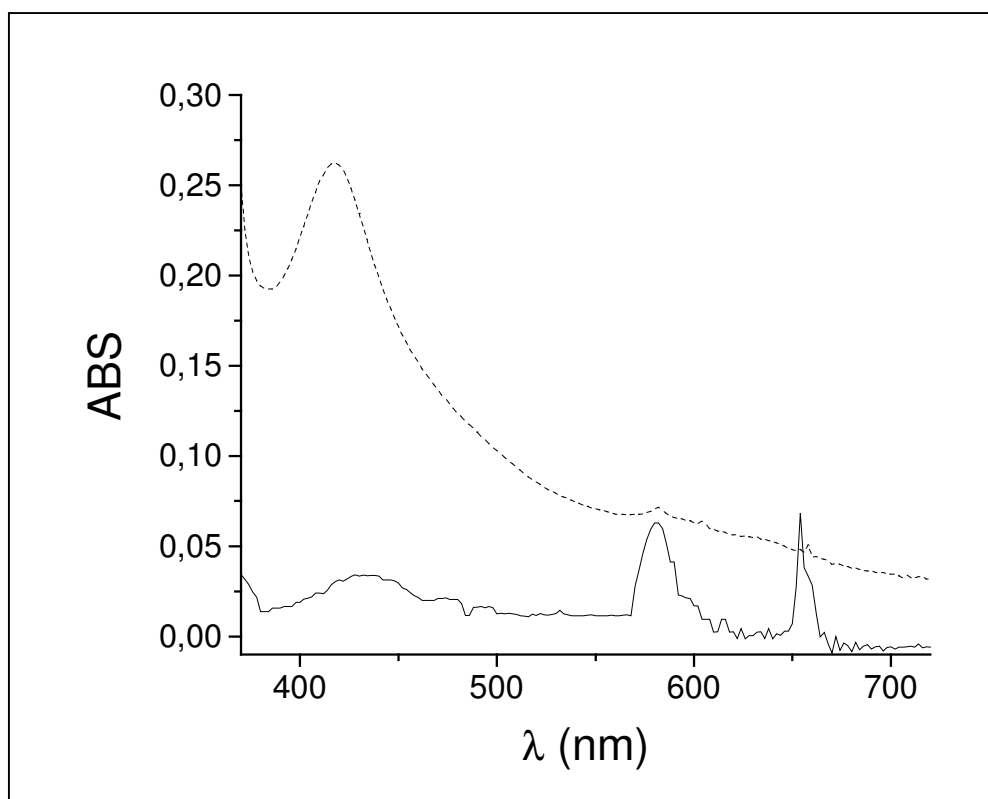


Figura 34. Espectros das (FeTCPP)Cl ao final da reação de oxidação da cloroquina utilizando ácido meta-*cloro* perbenzóico (—) e H₂O₂ (---) como oxidante em tampão fosfato 0,025 M pH 6,4

IV.5. Elucidação estrutural dos compostos desconhecidos formados na oxidação da cloroquina e análogos por iodosilbenzeno catalisada pela (FeTCPP)Cl

Com o objetivo de melhor compreender o mecanismo de oxidação da cloroquina catalisada por metaloporfirinas foram realizadas uma série de experimentos para identificar os produtos desconhecidos da reação.

Novos métodos de separação foram testados sem a utilização de agente par iônico. O método de separação por CLAE usado anteriormente apresentou incompatibilidades com a detecção via espectrometria de massas por “electron-spray”. Foi observado que o agente par-iônico (o heptanossulfonato de sódio) usado

nas análises apresentava vários picos referentes à oligômeros do composto e impedia a identificação dos picos referentes aos produtos da oxidação. Assim, foi necessário desenvolver um método alternativo para a análise dos compostos. Com esse objetivo foram testados:

- i. Análise por CG-MS: foi utilizada uma coluna capilar SGE BP-1 para a análise da cloroquina e seus metabólitos. Uma vez que as amostras não poderiam ser injetadas na forma de solução aquosa, foi realizada a extração dos produtos da reação com NaOH 1 mol/L e clorofórmio. A separação por CG dos metabólitos foi obtida após derivatização dos produtos com anidrido trifluoroacético. Apesar da boa separação obtida, foi observado que o método possuía uma baixa reprodutibilidade quanto à área dos picos, devido à problemas na etapa de derivatização e pela presença de água residual na amostra. Assim, a utilização de CG-MS foi descartada.
- ii. Análise por CLAE-MS: foi utilizada uma coluna SUPELCO C-1 para a análise da cloroquina e seus metabólitos. A coluna C-1 tem caráter polar semelhante à coluna de sílica, mas maior estabilidade na presença de água, o que permite usar este solvente na fase móvel. Assim, foi usada na fase móvel uma solução aquosa de 0.03 % de NH_3 e uma solução 0.03 % de NH_3 em metanol, com fluxo à 1.5 mL/min e temperatura da coluna 35 °C. Para a completa separação dos produtos foi realizado um gradiente da fase móvel, conforme apresentado na parte experimental.

A (FeTCPP)Cl foi escolhida como catalisador da reação uma vez que esta ferro(III) porfirina levou aos melhores resultados catalíticos, além de gerar todos os produtos desconhecidos da oxidação da cloroquina observado com as outras metaloporfirinas.

A análise por CLAE-MS da mistura obtida na reação de oxidação da cloroquina catalisada pela (FeTCPP)Cl, mostrou os picos com os seguintes valores de m/z (Tabela 11 abaixo):

Tabela 11: Principais picos apresentados na análise por CLAE-MS da reação de oxidação da CQ pelo PhIO catalisada pela (FeTCPP)Cl em MeOH

Tempo de retenção (min)	m/z	Atribuição
6.44 (2 picos)	279 e 311	?
7.02 (2 picos)	279 e 311	?
8.24	249	?
9.85	263 e 295	?
33.28	320	Cloroquina
39.18	292	Monodesetilcloroquina

Coluna C-1; Fase móvel: solução aquosa de 0.03 % de NH₃ e uma solução 0.03 % de NH₃ em metanol (gradiente), com fluxo à 1.5 mL/min e temperatura da coluna 35 °C

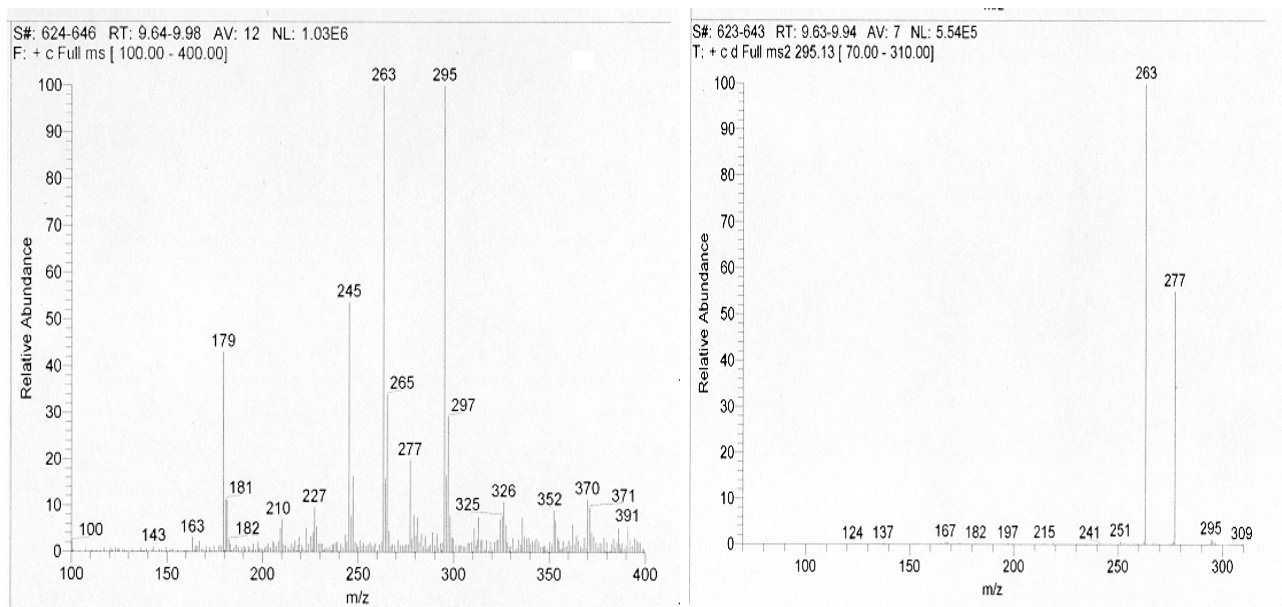


Figura 35. Espectro MS-MS do produto de oxidação com tempo de retenção 9,85 min

A análise por o LC-MS-MS do produto com tempo de retenção igual a 9,85 min apresentou três picos, em m/z iguais à 245, 263 e 295 (figura 35).

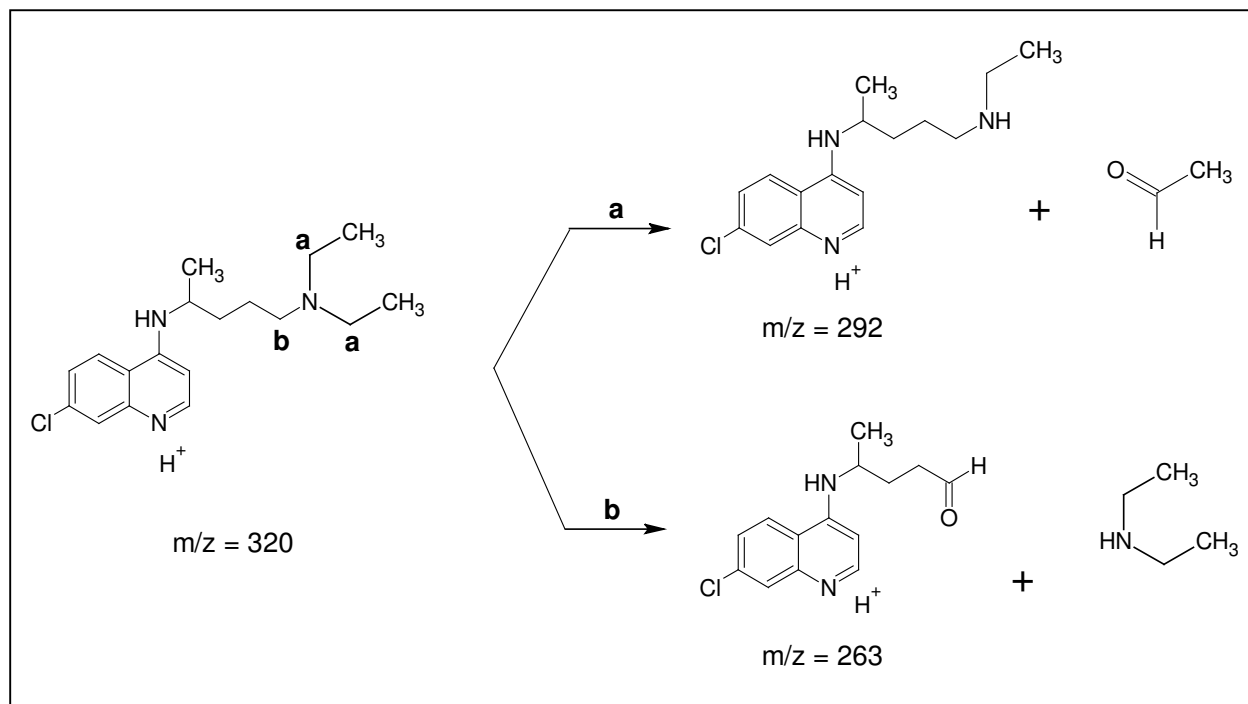


Figura 36. Mecanismo de formação da monodesetilcloroquina e do derivado aldeído da cloroquina

A formação de um produto com fragmentação correspondente a estes valores de m/z (245, 263 e 295) pode ser explicada considerando o mecanismo de N-dealquilação de aminas catalisadas por FeP. Como mostra a Figura 36, a oxidação da cloroquina pode ocorrer em qualquer carbono secundário adjacente ao nitrogênio terciário da cadeia lateral, levando a dois produtos distintos, de acordo com o carbono oxidado. Quando a reação ocorre nos carbonos dos grupos etil (posições a) tem-se a formação da monodesetilcloroquina (m/z = 292). Por outro lado, quando a reação ocorre nos carbonos secundários da cadeia lateral ligada ao anel quinolínico (posição b) tem-se a formação de um aldeído com m/z =263 e que pode sofrer 2 reações (Figura 37).

As estruturas propostas na Figura 37 estão de acordo com os picos observados no espectro de MS-MS do produto com $t_r = 9,85$ min,

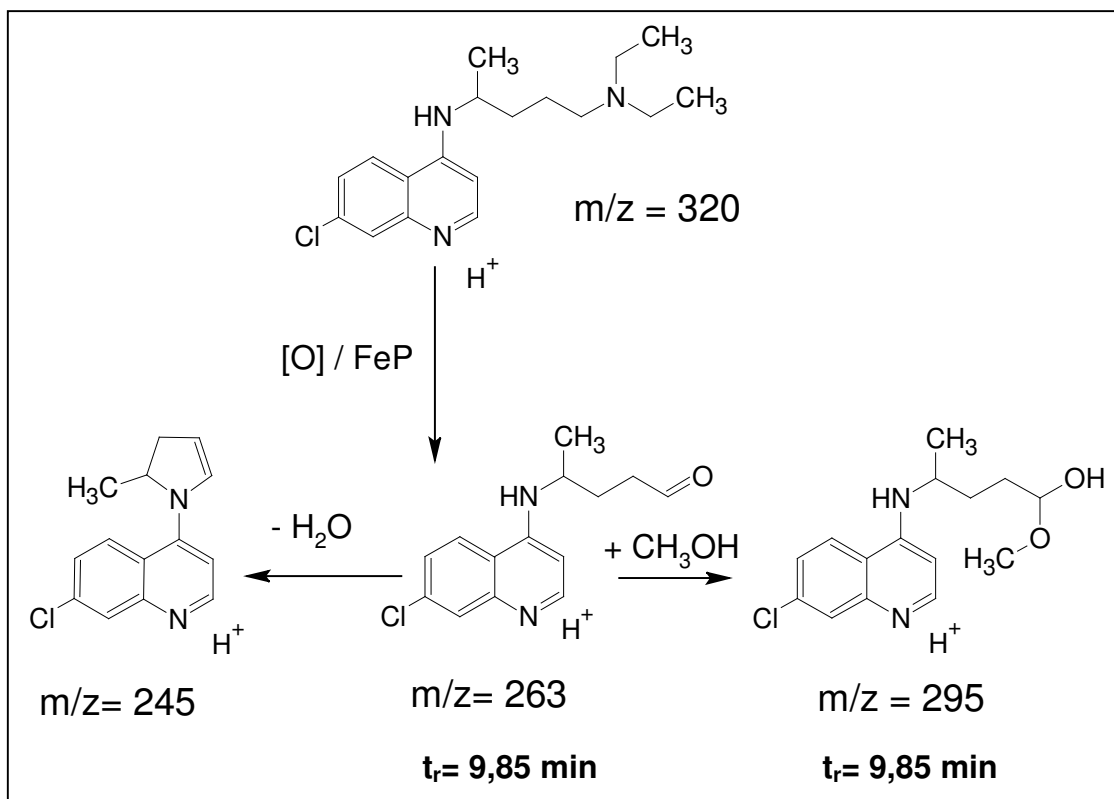


Figura 37. Possíveis estruturas dos compostos formados a partir da oxidação da cloroquina, via intermediário aldeído (pico $m/z=263$) observados no MS-MS.

O aldeído identificado nesta etapa corresponde ao pico de segunda maior área, isto é, o produto com segundo maior rendimento nas reações de oxidação da cloroquina, e pode-se assumir que se trata dos produtos II e III descritos nos itens IV.3 e IV.4. A utilização do agente par iônico (heptanossulfonato de sódio) permitiu a separação do aldeído ($m/z = 263$) da sua forma hemiacetal ($m/z=295$). A separação não foi completa devido à semelhança de polaridade entre os dois compostos.

O baixo rendimento dos demais produtos obtidos na oxidação da cloroquina (produtos IV, V e VI) torna a sua completa caracterização muito difícil, além de pouco importante. Ainda assim, a análise por LC-MS-MS destes produtos permitiu sua caracterização parcial, o que forneceu informações interessantes. Todos os produtos apresentaram um pico no MS-MS com m/z igual a 205 (Figura 38). Este pico corresponde à massa do anel quinolínico mais os dois carbonos adjacentes ao nitrogênio ligado ao anel (Figura 39), indicando que em nenhum desses produtos a

oxidação ocorreu no anel quinolínico ou nos carbonos da cadeia lateral próximos a ele.

Assim, pode-se concluir de todos os resultados que as reações de oxidação da cloroquina se concentram nas proximidades do nitrogênio terminal da cadeia lateral da cloroquina.

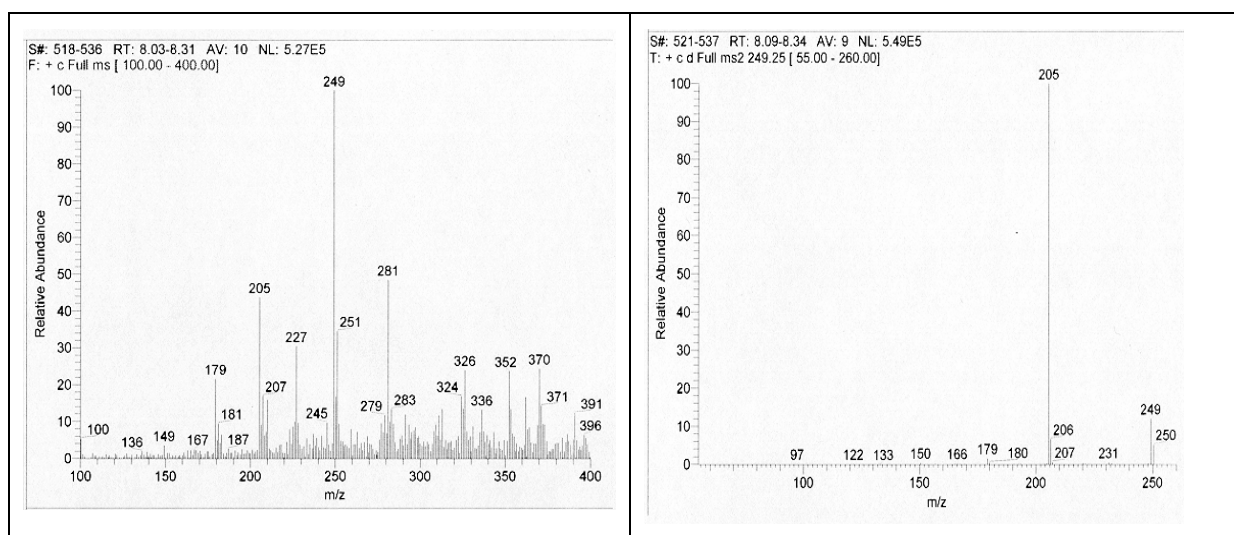


Figura 38. Espectro de MS-MS do produto de oxidação com tempo de retenção igual 8,15 min

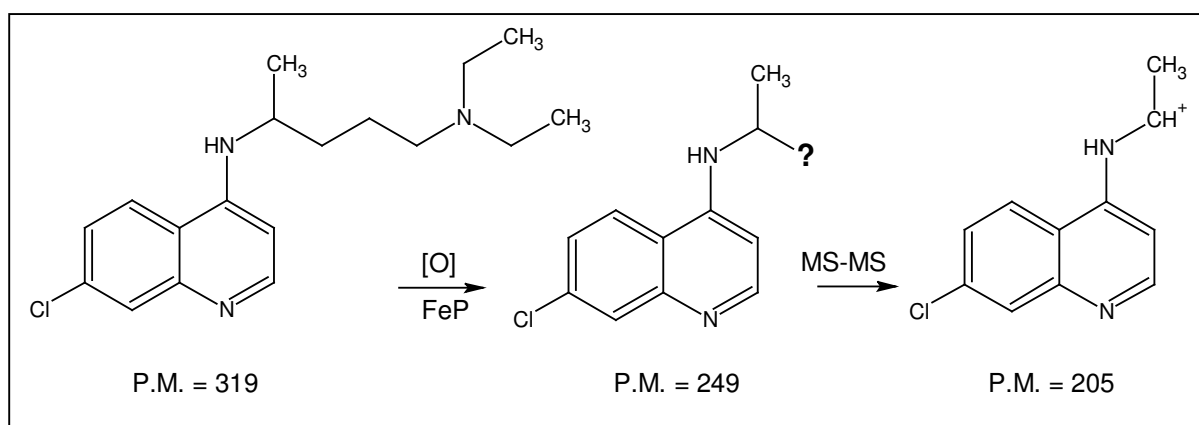


Figura 39. Estrutura da cloroquina e formação do composto com m/z = 205 observado nos espectros de MS-MS

Uma vez que a análise por LC-MS-MS indicou que a oxidação da cloroquina ocorre sempre nas proximidades do nitrogênio terminal da cadeia lateral, foi

realizada a síntese de compostos análogos à cloroquina (Figura 40), com o objetivo de identificar se existia outras regiões da molécula que seriam suscetíveis à oxidação por iodosilbenzeno, catalisada por FeP, e como as interações π - π e eletrostáticas influenciavam os rendimentos e mecanismos da reação com estes análogos.

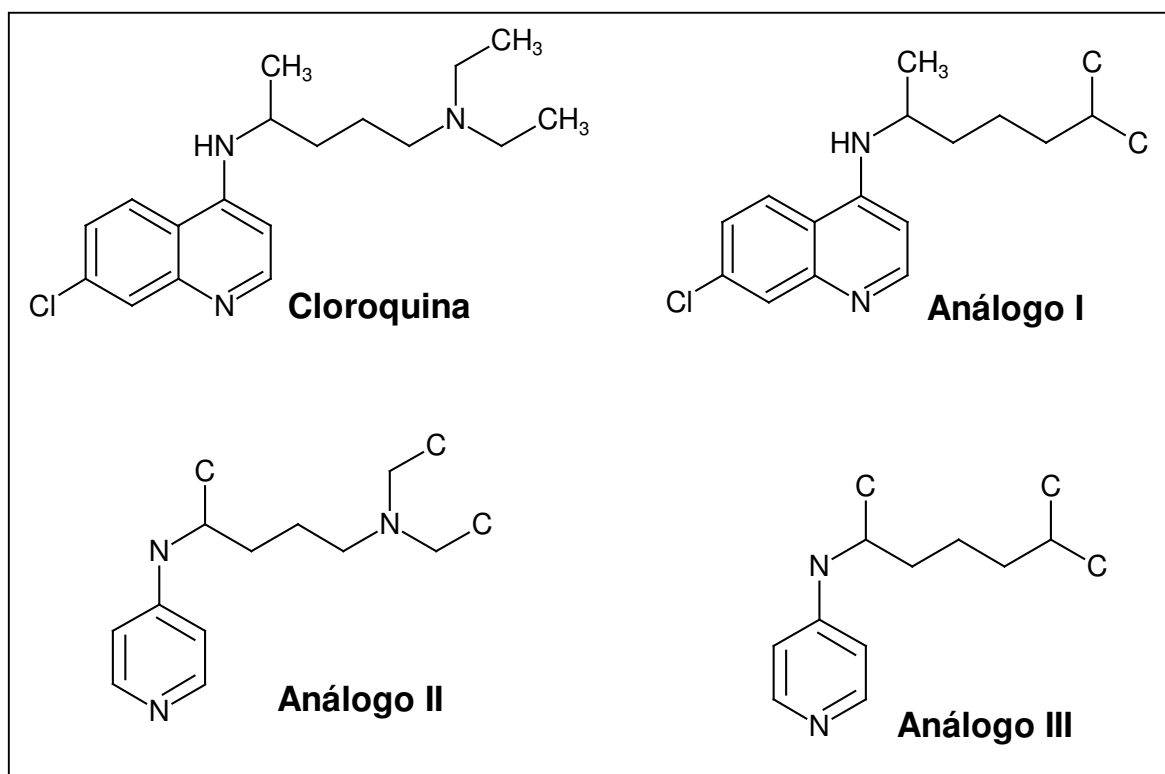


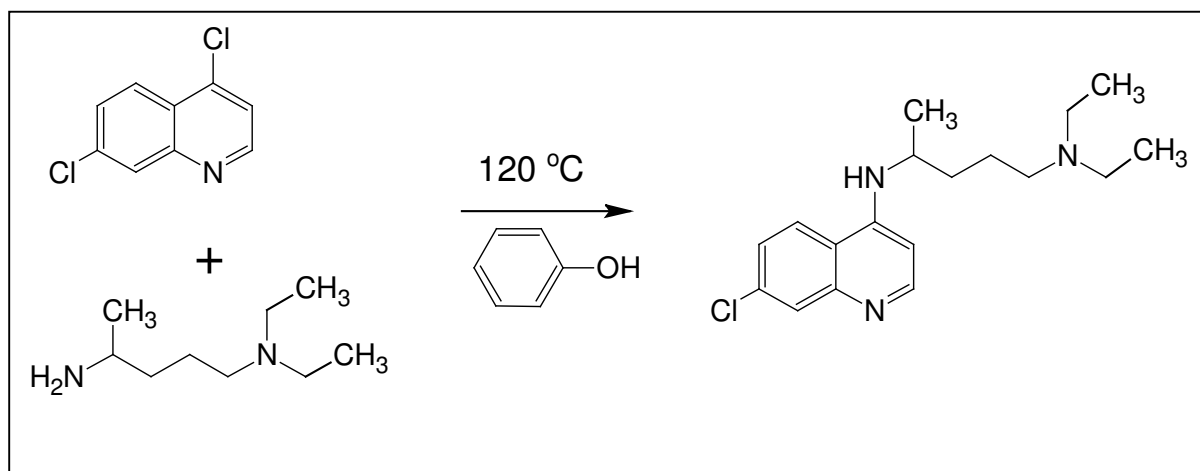
Figura 40. Estrutura da cloroquina e compostos análogos sintetizados neste trabalho.

IV.5.1. Síntese dos análogos da cloroquina

Inicialmente foram testados dois métodos de síntese da cloroquina com o intuito de se identificar o método mais adequado para a síntese dos análogos.

Método A: descrito por Craig *et al.* (CRAIG *et al.*, 1988) envolve a reação da dicloroquinolina (ou a 7-cloro piridina) com o 2-amino 5-dietilamino pentano, na presença de fenol como catalisador da reação (Esquema 2). A adição do fenol leva à formação de um intermediário éter entre o fenol e a dicloroquinolina, o que facilita a reação. Após a formação do intermediário éter este reage com a amina, formando o produto de interesse. A reação deve ser mantida sob atmosfera de nitrogênio para

evitar a oxidação dos reagentes (especialmente da amina) nas altas temperaturas utilizadas (120 °C). Após o fim da reação, o sólido obtido foi resfriado e dissolvido em CHCl_3 . A solução foi lavada com NaOH 15% à 0 °C, para eliminar o ácido formado durante a reação e, em seguida, com HCl . A fase aquosa ácida foi então lavada com éter para eliminar o excesso de fenol e de dicloroquinolina. Em seguida, a fase aquosa foi alcalinizada com carbonato de sódio saturado, para desprotonar os grupos amina do produto de interesse, permitindo que este fosse extraído com clorofórmio. A fase orgânica foi então secada (Na_2SO_4) e o clorofórmio rotavaporado para dar o produto desejado como um sólido laranja. A cor laranja indicou a presença da amina oxidada como impureza no produto. Assim, o sólido foi recristalizado em hexano, sendo obtido um sólido levemente amarelado, rendimento final de 15%. Visando comparar o espectro de RMN da cloroquina sintetizada com aquele da cloroquina comercial (Aldrich), foi preparado o sal fosfato do composto. Inicialmente o sólido amarelado foi dissolvido em etanol em refluxo e recristalizado pela adição de ácido fosfórico ao meio. Obteve-se o fosfato de cloroquina (sólido branco) o qual foi caracterizado por RMN^{-1}H (Figuras 41 e 42).



Esquema 2. Esquema da síntese da cloroquina pelo método A

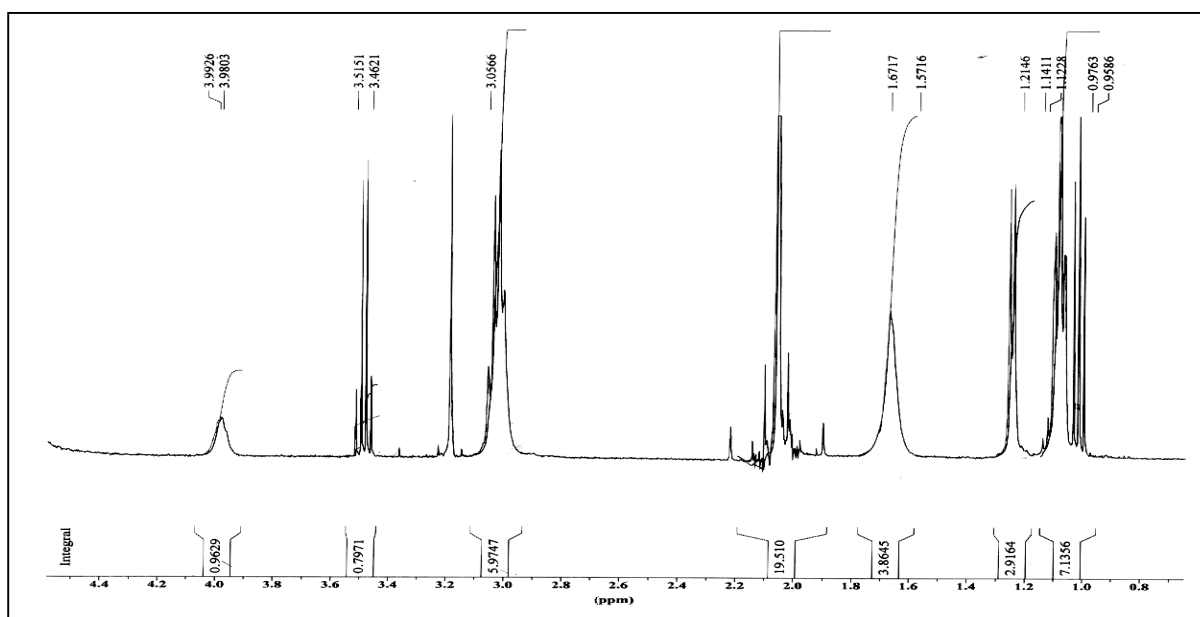


Figura 41. Espectro de RMN-¹H do produto obtido a partir do método A de síntese, em D₂O (de 0 à 4,4 ppm)

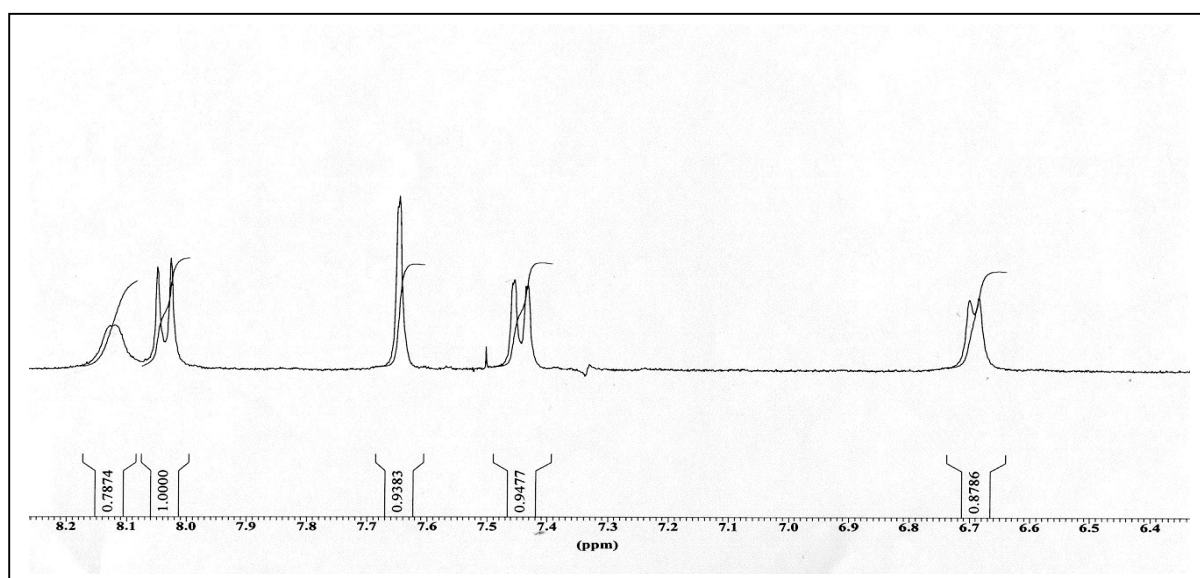


Figura 42. Espectro de RMN-¹H do produto obtido a partir do método A de síntese, em D₂O (de 6,4 à 8,2 ppm)

A atribuição dos picos foi feita com base na análise de RMN-¹H da cloroquina relatada na literatura (NAVARRO et al., 2004). Como pode ser observado na Figura 41, o produto obtido apresenta um tripleto na região de $\delta = 1,1$ ppm, com integral

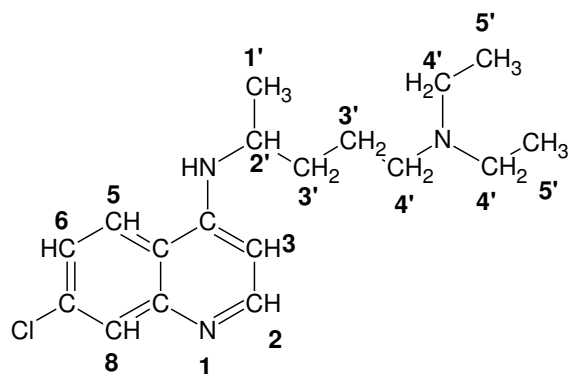
próxima a 6, que foi atribuído aos dois grupos metila, em beta ao nitrogênio terciário (o valor de 7.1, um pouco acima de 6, é causado pela presença de etanol como impureza). Em 1,3 ppm tem-se o outro grupo metila da molécula de cloroquina (duplete com integral igual à 3). Em $\delta = 1,7$ ppm, foi observado um pico com integral igual a 4 e que, a princípio, não pode ser atribuído. Com o intuito de identificar este pico foi realizada a análise por RMN-¹H da cloroquina comercial (Aldrich) em D₂O. O espectro mostrou na mesma região de $\delta = 1,7$ ppm um multiplete pouco resolvido, que se assemelhava muito ao singleto largo citado anteriormente. Este pico foi atribuído aos hidrogênios dos CH₂ presentes na cadeia lateral da cloroquina e que não estão diretamente ligados a nenhum nitrogênio. Já na região de $\delta = 3,0$ ppm tem-se um quadruplete, pouco resolvido, com integral igual a 6 (Figura 41) e que foi atribuído aos hidrogênios dos CH₂ ligados ao nitrogênio terciário. Em $\delta = 4,0$ ppm tem-se outro quadruplete, também pouco resolvido, com intergral igual a 1 e atribuído ao hidrogênio do CH ligado ao nitrogênio da quinolina.

Na Figura 42, aparecem 4 dupletos em $\delta = 6,70$ ppm, 7,65 ppm, 8,03 ppm e 8,14 ppm, além de um duplo duplete em 7,45 ppm, todos com integral igual a 1 e que foram atribuídos aos hidrogênios dos CH do anel aromático da cloroquina. Os picos obtidos nesta região não estão bem resolvidos e por isso sua multiplicidade foi atribuída com base no espectro de RMN-¹H da cloroquina comercial (Aldrich).

As atribuições podem ser vistas resumidamente na Tabela 12 abaixo:

Tabela 12. Atribuições do espectro de RMN-1H da cloroquina obtida através do método A)

δ (ppm)	Integral	multiplicidade	Carbono na estrutura acima
1,05	6	Tripleto	5'
1,25	3	Dupleto	1'
1,70	4	Multipleteo	3'
3,05	6	Multipleteo	4'
4,00	1	Quadrupleto	2'
6,70	1	Dupleto	3
7,45	1	Duplo Dupleto	6
7,65	1	Dupleto	8
8,05	1	Dupleto	5
8,15	1	Dupleto	2



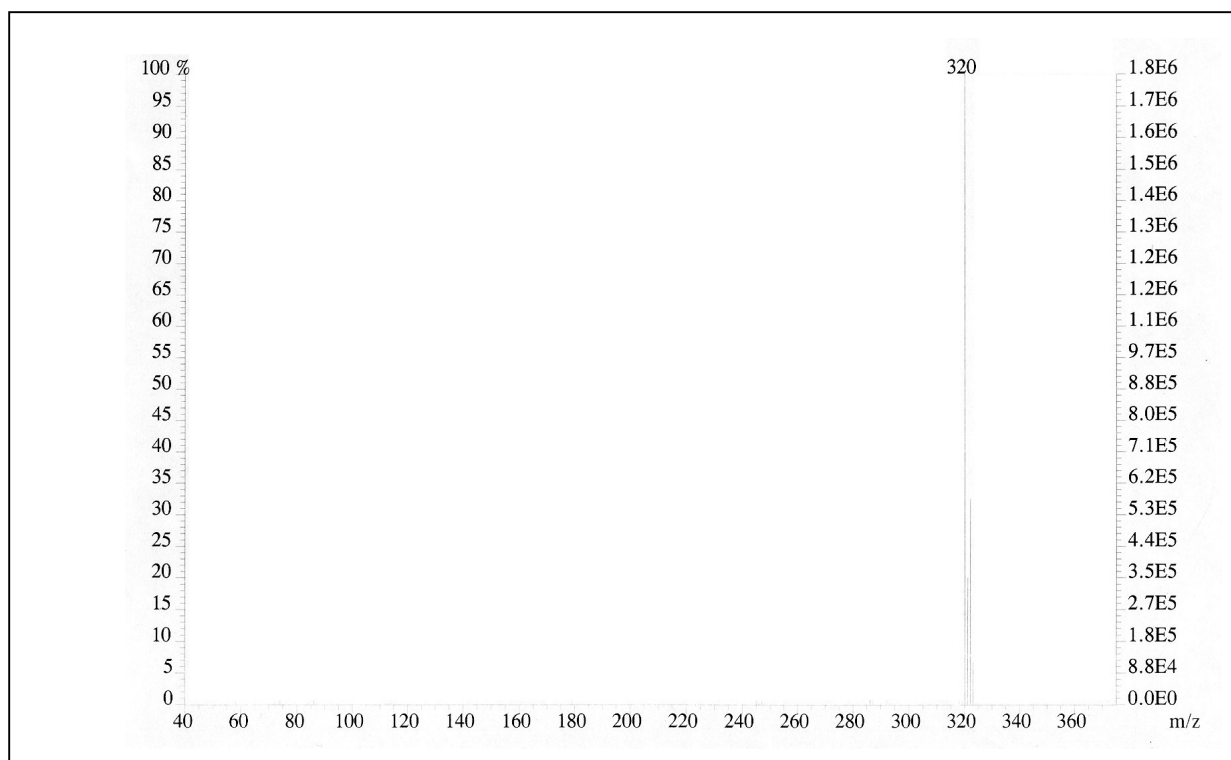


Figura 43. Espectro de CI-MS do produto obtido a partir do método A de síntese.

A análise por CI-MS do produto obtido pela síntese da cloroquina pelo método A indicou dois picos em $m/z = 320$ e $m/z=322$, correspondentes à massa molecular da cloroquina protonada (devido ao isótopos ^{35}Cl e ^{37}Cl)(Figura 43). Assim, pode-se concluir das análises por RMN- ^1H e CI-MS que este método, apesar do baixo rendimento, foi adequado para a síntese da cloroquina.

Método B: descrito por Drake *et al.* (DRAKE et al., 1946) apenas a dicloroquinolina e o 2-amino 5-dietilaminopentano foram misturados e a reação foi mantida sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio, a 165 °C. Este método foi testado visando obter um maior rendimento do que aquele obtido no método A. Contudo, ao contrário do observado para a reação utilizando fenol, o CI-MS do sólido obtido ao fim da reação não indicou a formação de produto, mas apenas a presença de dicloroquinolina na forma protonada ($m/z=198$) (Figura 44).

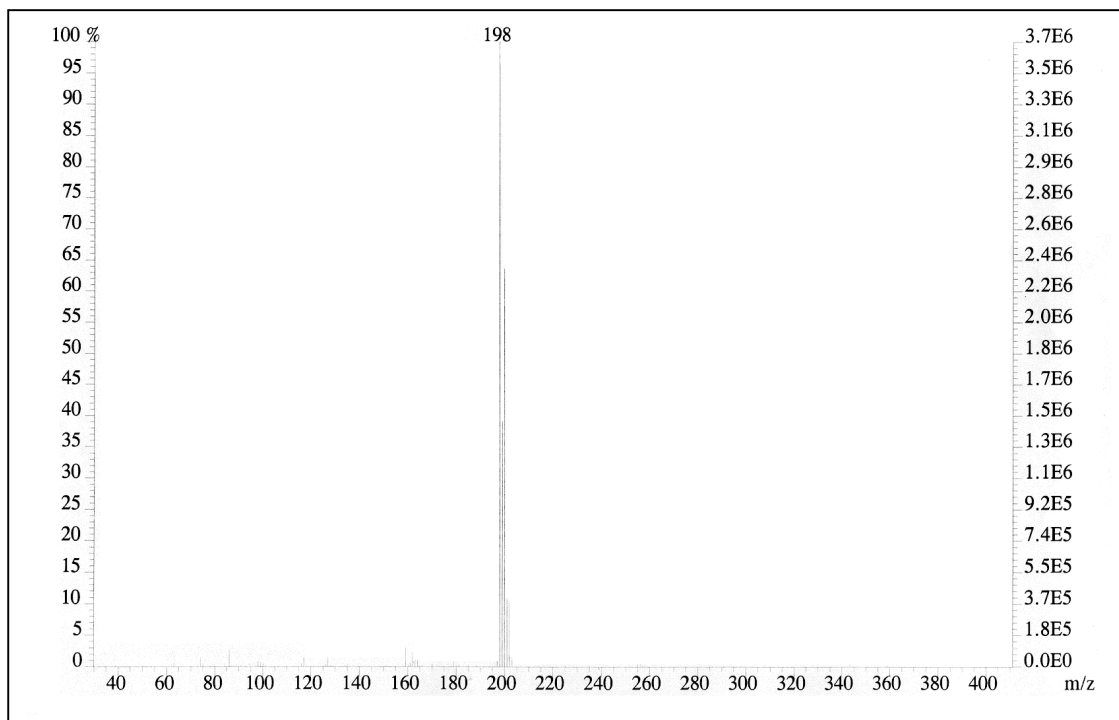


Figura 44. Espectro de CI-MS do produto obtido a partir do método de síntese

B)

Assim, o método utilizando fenol como catalisador foi escolhido para a síntese dos análogos da cloroquina (Figura 40). Os compostos obtidos foram analisados por RMN-¹H, RMN-¹³C, CI-MS. Foi observado nestas análises que, embora o produto de interesse tivesse sido obtido, este ainda estava contaminado com parte da amina de partida, em concentrações que inviabilizavam a utilização destes materiais como substrato nas reações de oxidação catalisadas pela (FeTCCP)Cl. Dos análogos obtidos, apenas aquele tendo o 2-amino 6-metil-heptano como cadeia lateral (Figura 40, Análogo I) apresentou a pureza necessária para ser utilizado como substrato, conforme mostrado nos RMN-¹H, RMN-¹³C, CI-MS (Figura 45 à 47).

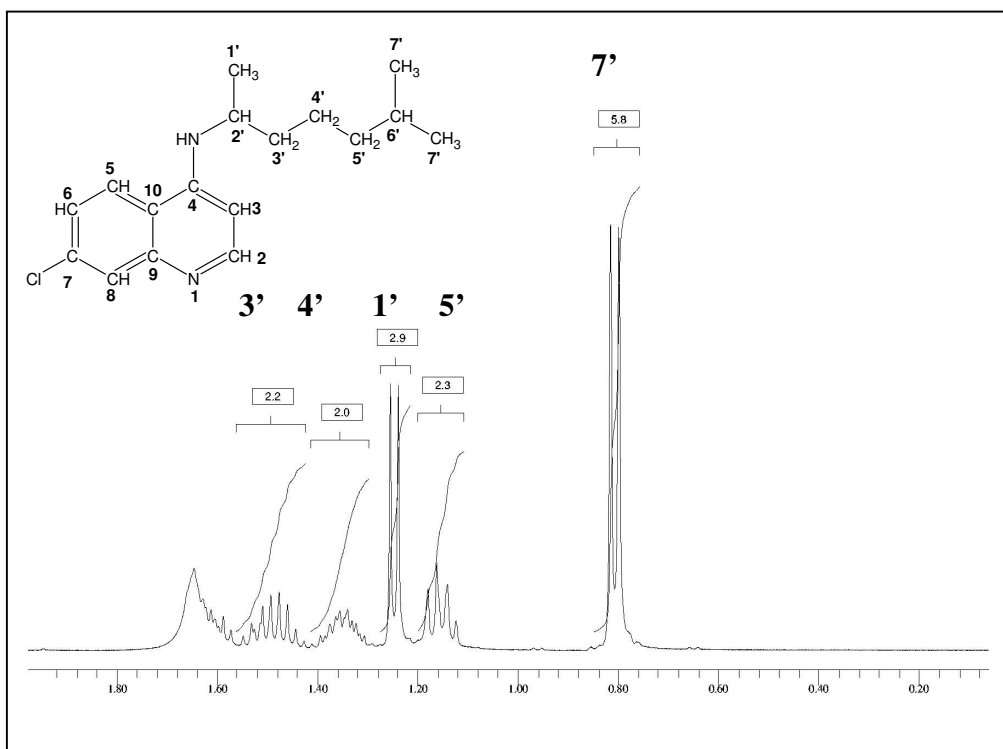


Figura 45. Espectro de RMN-¹H do análogo I obtido a partir do método A de síntese, em CDCl₃.

Na Figura 45, observa-se que o produto obtido apresenta um duplete na região de $\delta = 0,80$ ppm, com integral próxima a 6, que foi atribuído aos dois grupos metila, ligados ao carbono terciário mais afastado do anel quinolínico. Em $\delta = 1,15$ ppm tem-se o grupo CH₂ da molécula de cloroquina ligado ao mesmo carbono terciário mencionado acima (duplo duplete com integral igual à 2). Em $\delta = 1,25$ ppm, foi observado um pico com integral igual a 3 e que foi atribuído ao grupo CH₃ do carbono terciário ligado à amina secundária. Em seguida aparecem dois multipletos na região de $\delta = 1,35$ e 1,50 ppm, que correspondem aos hidrogênios dos CH₂ da cadeia lateral. Por fim, ainda nesta Figura pode se observar um multiplete em 1,60 ppm, parcialmente coberto por um pico de H₂O em 1,65 ppm, e que acredita-se corresponder ao hidrogênio do carbono terciário mais afastado do anel quinolínico.

Na Figura 46, na região próxima à $\delta = 3,60$ ppm encontra-se um multiplete correspondente ao carbono CH ligado ao nitrogênio do grupo amina. E em $\delta = 4,72$ ppm um duplete com integral igual a 1 é atribuído ao hidrogênio da amina.

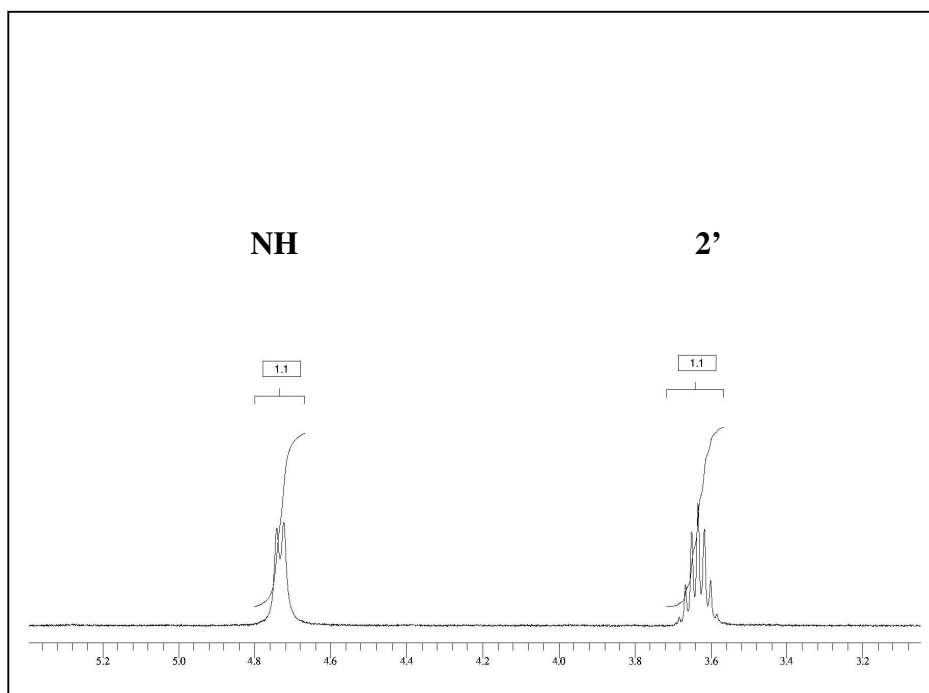


Figura 46. Espectro de RMN-¹H do análogo I obtido a partir do método A de síntese, em CDCl₃.

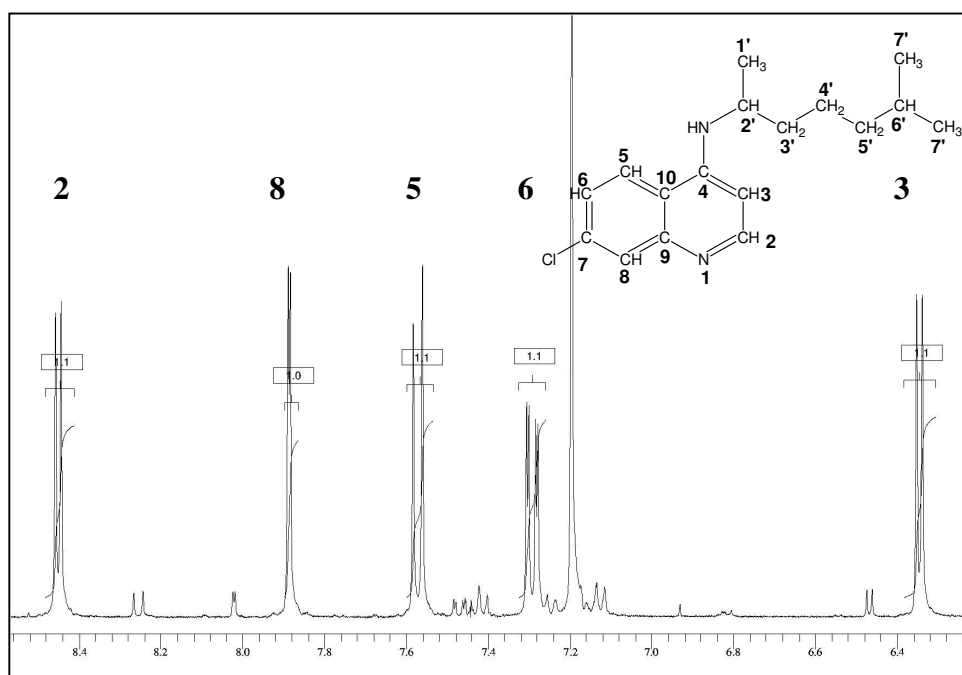


Figura 47. Espectro de RMN-¹H do análogo I obtido a partir do método A de síntese, em CDCl₃.

Na Figura 47, aparecem 4 dupletos em $\delta = 6,30$ ppm, 7,50 ppm, 7,90 ppm e 8,45 ppm, além de um duplo duplete em $\delta = 7,30$ ppm, todos com integral igual a 1 e que foram atribuídos aos hidrogênios dos CH do anel aromático da cloroquina.

As atribuições podem ser vistas resumidamente na tabela 13 abaixo:

Tabela 13. Atribuições do espectro de RMN¹H do análogo I da cloroquina, obtido através do método A de síntese.

δ (ppm)	Integral	multiplicidade	Carbono na estrutura acima
0,8	6	Duplete	7'
1,15	2	Multiplete	5'
1,25	3	Duplete	1'
1,35	2	Multiplete	4'
1,50	2	Multiplete	3'
3,60	1	Multiplete	2'
4,72	1	Duplete	NH
6,30	1	Duplete	3
7,30	1	Duplo Duplete	6
7,50	1	Duplete	5
7,90	1	Duplete	8
8,45	1	Duplete	2

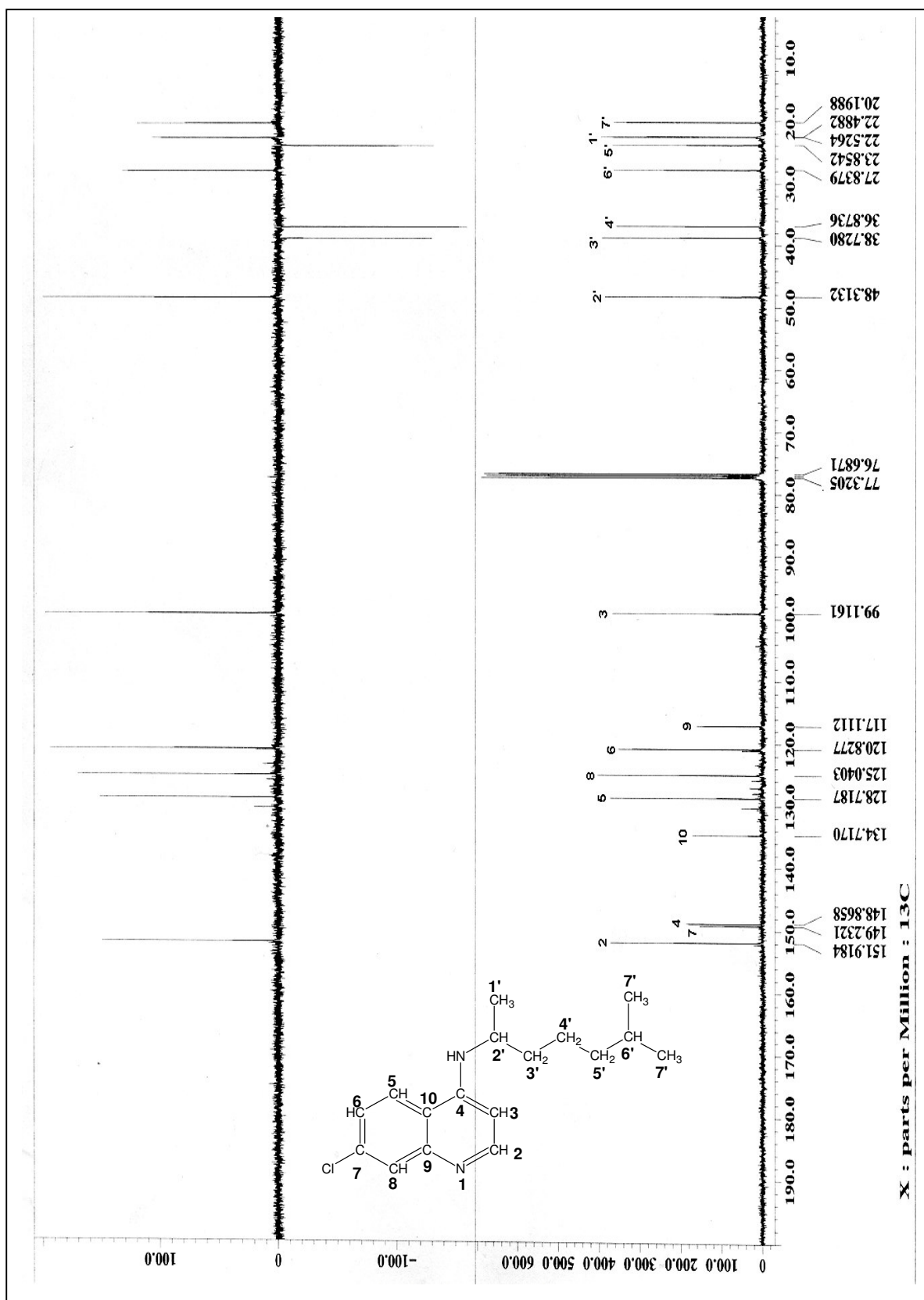


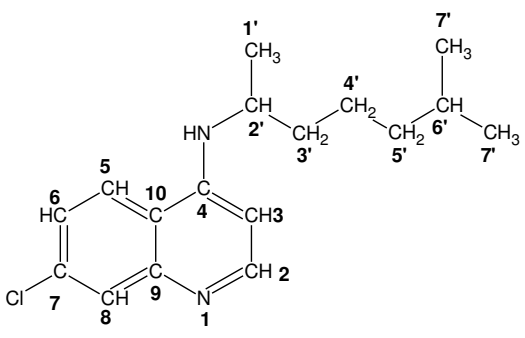
Figura 48. Espectro de RMN-¹³C-DEPT do análogo I obtido a partir do método A de síntese, em CDCl₃

A análise por RMN-¹³C-DEPT, mostrada na Figura 48, foi baseada na atribuição de picos da cloroquina relatada na literatura (DIOS et al., 2003). Assim o espectro de RMN-¹³C mostra na região de 20 ppm os grupos CH₃ mais afastados do anel quinolínico, enquanto que em 22 ppm os CH₃ próximos a amina alifática. O pico em 23.8 ppm, conforme mostra o DEPT, pertence a um CH₂ e, portanto, pertence ao carbono da cadeia lateral mais afastado do anel aromático. Em 27 ppm tem-se o grupo CH alifático que está mais distante da amina alifática. Em 36.7 ppm e 38.7 ppm têm-se ambos CH₂ intermediários da cadeia lateral. Ainda na região de carbonos alifáticos, aparece em 48 ppm o grupo CH ligado ao nitrogênio da amina alifática.

Na região de carbono aromático observa-se, primeiramente, em 99 ppm o carbono do grupo CH adjacente ao carbono quaternário ligado à amina alifática. Em 117 ppm, aparece o sinal do carbono quaternário adjacente ao nitrogênio do anel quinolínico. Entre 120 e 128 ppm tem-se os três carbonos dos grupos CH aromáticos próximo ao carbono quaternário ligado ao átomo de cloro. Já o pico em 134.7 ppm foi atribuído ao carbono quaternário adjacente ao carbono quaternário ligado à amina alifática. Em 148 ppm e 149 ppm aparecem os sinais dos carbonos quaternários ligados à amina alifática e ao átomo de cloro respectivamente. Por fim, em 151 ppm tem-se o carbono do grupo CH adjacente ao nitrogênio do anel quinolínico.

As atribuições podem ser vistas resumidamente na Tabela 14 a seguir:

Tabela 14. Atribuições do espectro de RMN-¹³C/DEPT do análogo I da cloroquina obtida através do método A de síntese.

	
δ (ppm)	Carbono na estrutura acima
20	7'
22	1'
24	5'
27	6'
36	4'
38	3'
48	2'
99	3
117	9
121	6
125	8
129	5
135	10
148,9	4
149,2	7
152	2

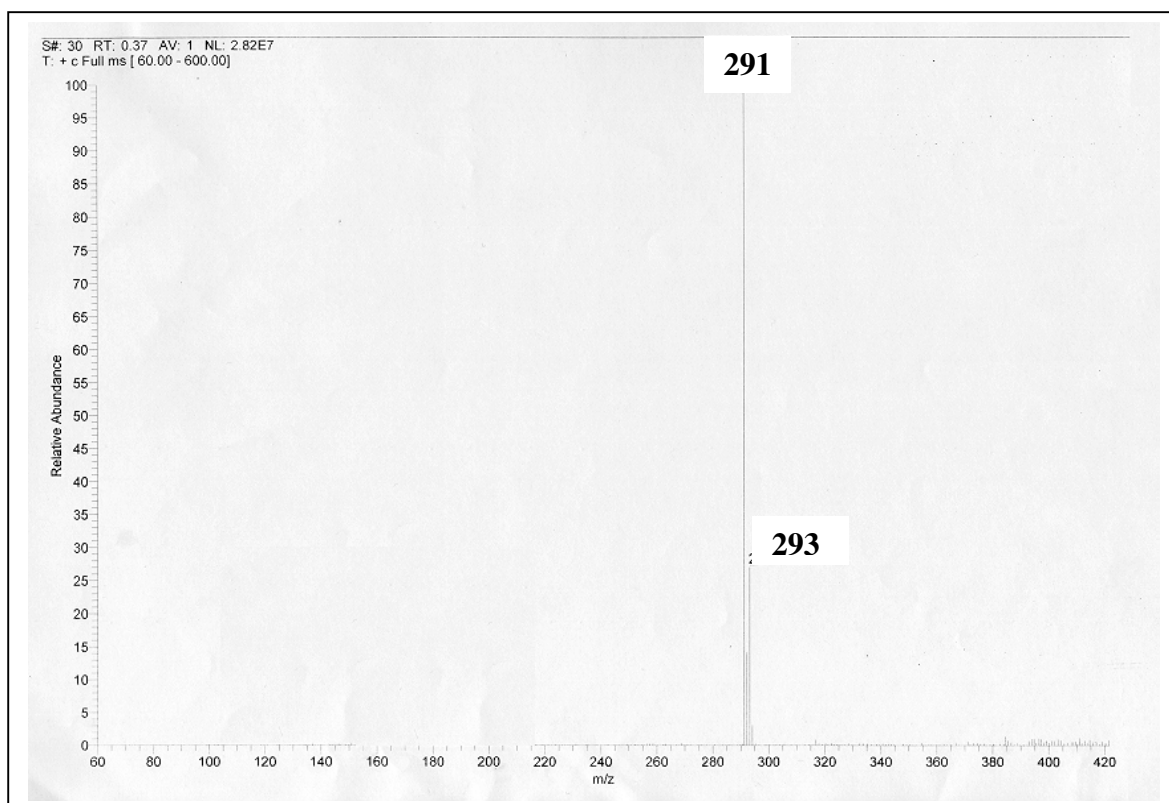


Figura 49. Espectro de CI-MS do análogo I obtido a partir do método A de síntese.

A análise por CI-MS do produto obtido pela síntese do análogo I da cloroquina pelo método A indicou dois picos em $m/z = 291$ e $m/z=293$, correspondentes à massa molecular do análogo I protonado (devido ao isótopos ^{35}Cl e ^{37}Cl). Assim, pode-se concluir pela análise por RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e CI-MS que o análogo I foi obtido.

As reações de oxidação foram repetidas com o análogo I da CQ como substrato. Era esperado que, na ausência do nitrogênio terminal, apenas um dos vários carbonos presentes fosse hidroxilado, levando a um pico com m/z igual a 307. Ao invés disso, uma série de picos com áreas semelhantes e m/z variando de 211 a 307 foram observados na análise dos produtos da reação de oxidação do análogo I por PhIO catalisada pela (FeTCPP)Cl.

O resultado deste estudo com o análogo I permite concluir que a seletividade da oxidação está diretamente relacionada com a presença do nitrogênio terminal da cadeia lateral da cloroquina. Assim, pode-se concluir que a reatividade deste nitrogênio tem fundamental importância no mecanismo de oxidação *“in vitro”* da cloroquina.

IV.6. Catálise heterogênea da oxidação de substratos orgânicos utilizando uma série de ferro(III) porfirinas naturais e sintéticas e iodosilbenzeno como oxidante

Como mencionado anteriormente, a ferro(III) porfirina natural, FePPIX, na ausência da matriz protéica, sofre rapidamente um processo de auto-oxidação, o que a torna um catalisador ineficaz na oxidação de substratos orgânicos. Uma alternativa para o uso deste e de outras metaloporfirinas é sua ancoragem em suportes que mimetizem a matriz protéica, protegendo o catalisador da destruição sem comprometer sua atividade.

Metaloporfirinas suportadas vêm recebendo muita atenção no campo da oxidação catalítica de hidrocarbonetos, pois seu uso não somente aumenta a estabilidade da metaloporfirina e mantém seu poder catalítico nas oxidações, mas também permite uma fácil separação do catalisador do meio reacional e sua posterior reutilização (LEADBEATER; MARCO, 2002). Assim, foram realizados testes catalíticos para identificar um suporte adequado para esta e outras ferro(III) porfirinas que poderiam ser utilizadas na oxidação da cloroquina.

IV.6.1. Utilizando polidimetilsiloxano (PDMS) como suporte

A membrana de PDMS com a protoporfirina IX ferro(III) ocluída foi preparada e caracterizada por Marcos A. Schiavon, durante seu pós-doutorado no Instituto de Química - UNICAMP sob orientação da Profa. Dra. I. V. P. Yoshida.

Este sistema ferro(III) porfirina:membrana de PDMS foi estudado recentemente com a FeP de 1^a. geração, (FeTPP)Cl que, mesmo tendo os grupos fenilas nas posições meso, é destruída nas reações em solução ou quando ancoradas na superfície de suportes como a sílica. No entanto, quando ocluída na membrana de PDMS, esta ferro(III) porfirina apresenta atividade semelhante à outras ferro(III) porfirinas de 2^a. geração (GOTARDO et al., 2005). Assim, a membrana de PDMS tem o papel da proteína nos sistemas naturais, isolando o sítio catalítico numa cavidade hidrofóbica e protegendo-o da destruição bimolecular.

Para a utilização de membranas poliméricas como suportes de catalisadores dois fatores são determinantes (VANKELECOM, 2000):

- A afinidade do polímero pelos reagentes, ou seja, a capacidade das substâncias sorverem-se na membrana. Esta capacidade depende de vários fatores, sendo os principais a polaridade e a estrutura das moléculas, e;
- A difusão dos reagentes através das cadeias do polímero para atingirem o sítio catalítico. A difusão depende da taxa de sorção do reagente e também do grau de cruzamento das cadeias do polímero, o qual é determinado pela sua composição.

Assim, a medida da capacidade de sorção dos reagentes utilizados nas reações com catalisadores ocluídos em membranas poliméricas é fundamental, uma vez que determina a quantidade exata de substrato e oxidante que podem atingir o sítio catalítico. A medida é realizada reproduzindo as condições reacionais e utilizando a membrana branco (sem metaloporfirina). Através da análise por cromatografia a gás ou outras técnicas como titulação, verifica-se a quantidade de substrato e oxidante na solução antes e após contato com o polímero, determinando-se a quantidade de substância que conseguiu sorver-se.

Nas condições reacionais utilizadas neste trabalho não foi possível determinar o valor de sorção dos reagentes no suporte polimérico, em consequência dessas variações serem muito pequenas. Foi realizado, porém, teste de entumescimento da membrana com os compostos puros separadamente. Este teste corresponde à quantidade máxima de substância que a membrana é capaz de sorver num determinado tempo (NEYS et al., 1998, NEYS et al., 1999) e teve como objetivo determinar e comparar a afinidade do polímero para cada um dos reagentes. Os testes foram realizados com cicloexano, cicloexanol, DCM, ACN e MeOH, que seriam utilizados como substratos ou solventes, avaliando-se o ganho de massa da membrana branco após ficar 24 h mergulhada na substância. Os resultados destes experimentos estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de sorção obtidos no teste de entumescimento da membrana com as substâncias puras, após 24 h.

Teste	Substância	Sorção (mmol.g ⁻¹)
1	DCM	5,44
2	MeOH	0,59
3	ACN	0,53
4	Cicloexano	3,15
5	Cicloexanol	0,12

Observa-se que o DCM apresenta a maior tendência a solver-se na membrana, ao contrário do MeOH e ACN. Estes baixos valores de sorção para o metanol e acetonitrila são atribuídos à maior polaridade desses solventes, que dificultam sua sorção na membrana de caráter apolar. O maior valor de sorção do cicloexano mostra que este composto apresenta certa facilidade de sorver-se na membrana, facilitando a interação com o sítio catalítico. Já o cicloexanol, produto de oxidação do cicloexano, tem baixa sorção indicando que, após a reação de oxidação, o cicloexanol será rapidamente levado para fora da membrana, liberando o sítio catalítico para repetir seu ciclo.

Para realização das reações de oxidação escolheu-se a mistura ACN: MeOH (1:1) como solvente, pois somente nesse meio haveria solubilização de todos os reagentes: substratos, oxidantes e padrões para análise cromatográfica. Além disso, a utilização destes solventes permite a comparação dos resultados com outros da literatura. Ambos os compostos podem ser considerados bons meios para reações com esse tipo de suporte. O baixo valor de sorção faz com que estes solventes não sejam sorvidos significativamente na membrana, evitando assim que estes venham a competir com o substrato pelo sítio catalítico.

IV.6.1.A Caracterização por espectroscopia UV/Vis das metaloporfirinas ocluídas nas membranas poliméricas

Trabalhos da literatura recente afirmam, baseados em evidências espectroscópicas (EPR, UV-Vis e outros), que a oclusão de catalisadores homogêneos em membranas poliméricas, principalmente PDMS, ocorre sem interação entre o complexo e as cadeias do polímero (VANKELECOM, 2000; PARTON et al., 1996).

O espectro UV-Vis da FePPIX ocluída na membrana (Figura 50) mostra a banda Soret, indicando que a imobilização no polímero manteve intacta a estrutura do anel porfirínico. Como este espectro foi obtido com a membrana colocada diretamente no caminho óptico, as bandas Q, por serem menos intensas, nem sempre aparecem definidas, e sua atribuição fica comprometida. Praticamente não ocorreu deslocamento da banda Soret pela oclusão na matriz polimérica (400 nm). Esta ferro(III) porfirina não possui substituintes nos carbonos *meso* e acomoda-se mais adequadamente nas cavidades da membrana sem que ocorra distorções do anel e, portanto, sem sofrer deslocamentos provocados por estas distorções. Porfirinas de segunda e terceira geração com substituintes volumosos nos grupos fenilas tendem a sofrer distorção do anel porfirínico o que altera seus espectros de absorção (NEYS et al., 1998).

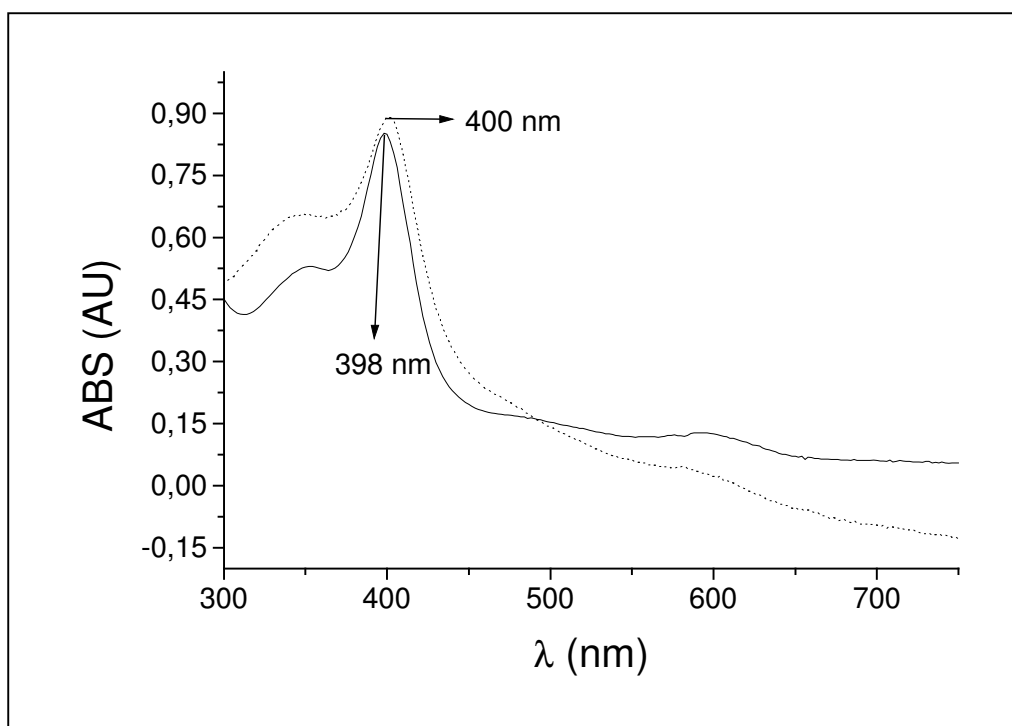


Figura 50: Espectro UV-Vis da FePPIX em MeOH e ocluída na membrana , utilizando como branco a membrana sem catalisador. — FePPIX dietiléster em MeOH; FePPIX em membrana.

IV.6.1.B Atividade catalítica da FePPIX ocluída na membrana

A atividade catalítica do complexo FePPIX ocluído na membrana polimérica foi investigada para a oxidação do cicloexano e epoxidação do (Z)-cicloocteno, utilizando como oxidantes o PhIO e o H₂O₂.

O (Z)-cicloocteno foi escolhido como substrato por levar à formação de um único produto, o ciclooctenóxido (Figura 51), além de ser facilmente oxidado e amplamente utilizado para investigar o potencial catalítico dos sistemas metaloporfirínicos. Já o cicloexano, substrato bem mais inerte, fornece informações quanto à seletividade, uma vez que pode levar à produção de cicloexanol e cicloexanona (Figura 52). Além disso, o uso desses dois substratos no estudo da atividade catalítica das ferro(III) porfirinas e PhIO é bem conhecido na literatura, possibilitando a comparação com outros sistemas.

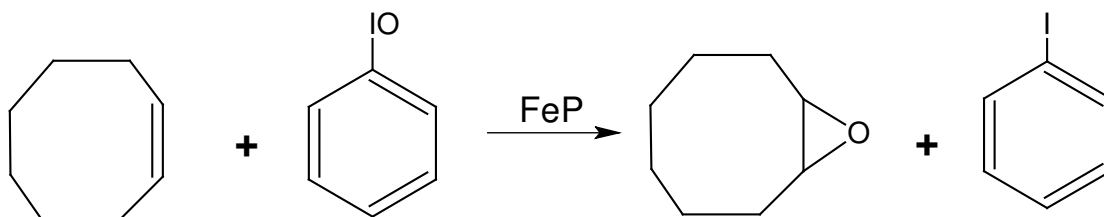


Figura 51: Reação de epoxidação do (Z)-cicloocteno pelo PhIO.

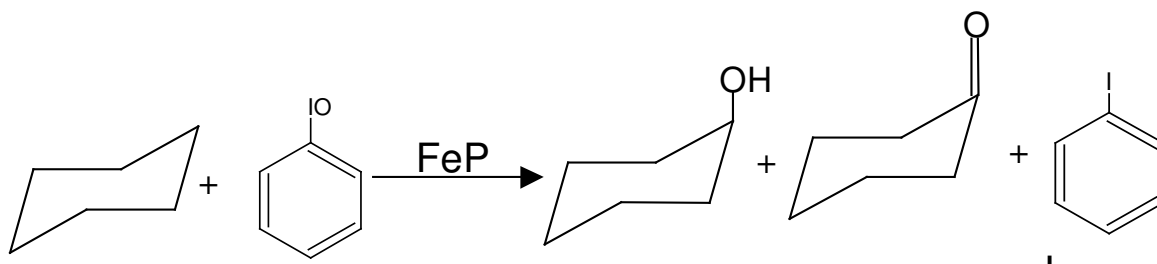


Figura 52: Reação de oxidação do cicloexano pelo PhIO.

O PhIO foi usado como oxidante padrão neste estudo. O MeOH permite completa solubilização desse oxidante, viabilizando sua sorção na membrana. Apesar disso, este solvente tem a desvantagem de poder ser um substrato competitivo para reações de oxidação catalisadas por metaloporfirinas, levando à formação de formaldeído (COOKE; SMITH, 1994). Este efeito, no entanto, tende a ser reduzido pela baixa sorção do MeOH na membrana. A relação catalisador:oxidante:substrato foi de 1:1200:3000.

A atividade catalítica da FeP ocluída na membrana polimérica também foi avaliada com H_2O_2 , por ser um oxidante não tóxico, barato e muito utilizado nos estudos da atividade catalítica dos sistemas membrana polimérica/metaloporfirinas em solução aquosa. Apesar de não ter características hidrofóbicas, esse oxidante atinge o sítio catalítico “arrastado” pelos outros reagentes (NEYS et al, 1998; NEYS et al., 1999)

Neste trabalho os resultados são expressos em número de ciclos catalíticos ou número de “turnover” (TON), que é a relação entre o número de mols do produto e o número de mols do catalisador. Os resultados também são expressos em

rendimento, o qual é calculado em relação à concentração total de oxidante utilizado na reação.

- *Reações de oxidação do cicloexano*

A FePPIX não é utilizada frequentemente como catalisador na oxidação de substratos orgânicos pelo PhIO, pois apresenta baixo rendimento, sendo rapidamente destruída durante a reação. Isto ocorre devido a rápida auto-destruição oxidativa sofrida pela FeP, já que esta não apresenta grupos volumosos nos anéis *meso*-fenilas que possam impedir que a espécie catalítica, geralmente um radical ferro(IV)oxo porfirina π -cátion ((O)FeP^{+•}), oxide outra molécula de FeP levando à sua destruição e conseqüente perda da atividade catalítica (Figura 53) (MANSUY; BATTIONI, 1994).

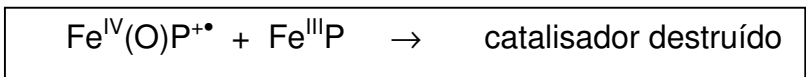


Figura 53: Reação de auto-oxidação destrutiva.

Na condição padrão utilizada nesse estudo, com relação FeP: PhIO:substrato de 1:1200:3000, não se observou a formação de produtos na oxidação do cicloexano com a FePPIX como catalisador em meio homogêneo. Estes resultados são explicados pela rápida destruição do catalisador nestas condições. No entanto, para a reação catalisada por esta ferro(III) porfirina ocluída na membrana polimérica, nas mesmas condições, observou-se a formação de cicloexanol. Embora o número de “turnovers” tenha sido extremamente baixo, de 2 para FePPIX ocluída em membrana (Tabela 16), a membrana manteve a cor característica da FeP mesmo após 24 h no meio reacional, indicando que a FeP não foi destruída. A não destruição também foi comprovada por espectroscopia UV/Vis (Figura 54). É ainda importante dizer que, nestes sistemas metaloporfirina/membrana polimérica, o sítio catalítico está muito menos acessível ao oxidante e substrato quando comparado com a fácil disponibilidade do catalisador em solução, o que por si só já leva a menores rendimentos, independente da estrutura da metaloporfirina.

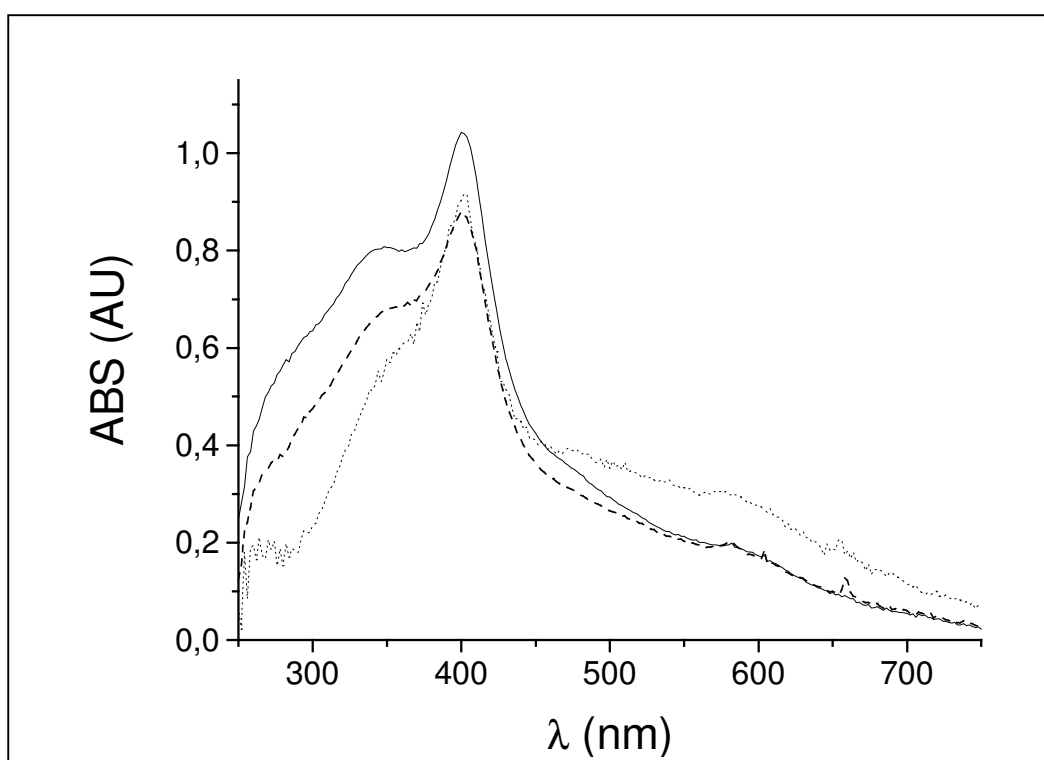


Figura 54: Variação do espectro de absorção da FePPIX ocluída na membrana com o tempo, utilizando como branco a membrana sem catalisador,. — MP:FeP; --- após 6 h de reação; após 24 h de reação

Tabela 16. Número de “turnover” (TON) e seletividade para reação de oxidação do cicloexano na presença da membrana polimérica (MP), FePPIX em solução (FeP) e da FePPIX ocluída na membrana polimérica (MP:FeP).

Catalisador	Cicloexanol (TON)	Iodobenzeno (%)
FeP	0	nd
MP	0	nd
MP:FeP	2	43

nd.: não detectado; rendimentos após 24 h reação

- Reações de oxidação do (Z)-cicloocteno

Com o cicloocteno foram testadas várias condições reacionais que estão mostradas na Tabela 17, e também H₂O₂ como oxidante.

Tabela 17. Número de “turnover” (TON) e rendimento de iodobenzeno para reação de oxidação do cicloocteno na presença da membrana polimérica (MP), FeP em solução (FeP), da FeP ocluída na membrana polimérica (MP:FeP) e apenas substrato e oxidante sem qualquer catalisador (Branco).

Catalisador	Ciclooctenoxido (TON)	Iodobenzeno (%)	Tempo de Reação (h)	Condição*
MP	0	53	6	1
MP:FeP	0	64	6	1
Branco.	0	53	24	2
MP	0	92	24	2
MP:FeP	5	37	24	2
FeP	10	53	24	2
Branco.	0	----	24	3
MP	0	----	24	3
MP:FeP	0	----	24	3
FeP	0	----	24	3

*1 - 1:100:2000 , catalisador:iodosilbenzeno:substrato; 2 – 1:1200:3000, catalisador:iodosilbenzeno:substrato; 3 – 1:1200:3000, catalisador:H₂O₂:substrato

A atividade catalítica foi baixa ou inexistente, tanto para o PhIO como para o H₂O₂. Verifica-se que a FePPIX ocluída em membrana apresentou menor eficiência catalítica com o cicloocteno quando comparada com a mesma em solução. Esse

resultado pode ser explicado pela menor quantidade de substrato dentro da membrana. Este efeito também pode ser observado quando se compara os resultados da Tabela 17. Na condição 1, tem-se tanto o substrato quanto o oxidante em concentração relativamente baixa e, assim, não é observado a formação de produtos. Já na condição 2, o aumento na concentração relativa de ambos os compostos levou à formação de produto. A baixa sorção do H₂O₂ por membranas poliméricas, como já mencionada, é a principal causa da ausência de produtos utilizando este oxidante(Tabela 17, condição 3).

Uma provável explicação para a baixa eficiência catalítica é que esta membrana apresenta um alto grau de reticulação, ou seja, ela é extremamente “fechada” e, portanto, bastante “impermeável” à sorção dos reagentes, resultando na ausência, ou baixa concentração dos substratos e oxidante nas proximidades do sítio catalítico. Uma evidência deste fato são os baixos valores de sorção apresentados na Tabela 15, mesmo para o DCM. Os valores de sorção desta membrana são em média duas vezes menores quando comparados com aqueles obtidos para membranas poliméricas convencionais (GOTARDO et al., 2005), o que permite afirmar que tanto substratos quanto oxidantes têm grande dificuldade em atingir o sítio catalítico levando assim a baixos rendimentos e número de “turnovers”.

Para comprovar esta hipótese foi preparado um novo sistema envolvendo a FePPIX ligada covalentemente pelo grupo vinila ao agente “crosslinking” da membrana, mas com um menor grau de reticulação. No entanto, nesta nova membrana a FePPIX foi prontamente destruída, o que mostra que parte da estabilidade do catalisador se deve à dificuldade de formação do intermediário reativo responsável pela oxidação dos substratos e pela degradação autooxidativa do catalisador.

IV.6.2.Utilizando quitosana como suporte

Uma vez que os resultados catalíticos obtidos com a FePPIX ocluída em membrana polimérica de PDMS não foram satisfatórios, foi escolhido como novo suporte para a FeP a quitosana.

Quitosana (Figura 55) é o derivado *N*-deacetilado da quitina, proteína componente do exoesqueleto de crustáceos, insetos, etc. Quitina e quitosana

possuem propriedades muito interessantes para sua aplicação como suporte. Entre elas destacam-se sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade, podendo ser utilizados como importantes componentes de cosméticos, peles artificiais, medicamentos, etc (KUMAR, 2000).

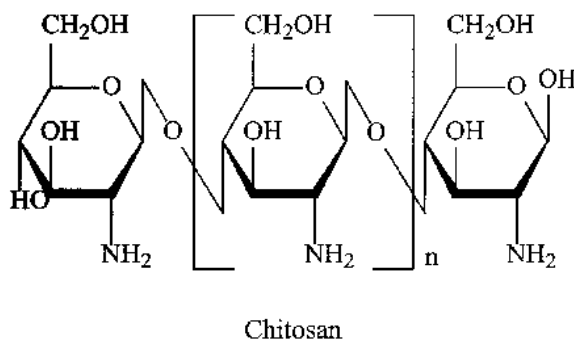


Figura 55. Fórmula estrutural da Quitosana

IV.6.2.A. Ancoragem em quitosana da (FeTPFPP)Cl por coordenação

A ancoragem em quitosana do cloreto de 5,10,15,20-tetrakis-(pentafluorofenil)porfirina ferro (III), (FeTPFPP)Cl, foi realizada através da coordenação do íon férrico central aos grupos NH_2 deste suporte. Esta ferro(III) porfirina foi escolhida por ser comercial e apresentar comprovada eficiência catalítica na oxidação de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos (DOLPHIN et al., 1997), além de ter como único ponto de ancoragem a coordenação do metal. As metaloporfirinas carbóxi substituídas utilizadas neste projeto podem ancorar através da formação de par iônico entre o grupo carbóxi e os grupos NH_2 da quitosana, ou ainda por ligação covalente entre estes grupos, formando a respectiva amida (SCHIAVON et al., 2001).

O catalisador suportado foi preparado através da reação entre a metaloporfirina e a quitosana segundo método descrito por Guo *et al* (GUO et al., 2003), e caracterizado por UV-Vis. Geralmente a quantificação do catalisador no sólido é feita pela análise do espectro de absorção da fase orgânica, resultante das lavagens do sólido após ancoragem. Calcula-se a quantidade de metaloporfirina ancorada pela diferença de absorção da fase orgânica, antes e depois da ancoragem e usando o coeficiente de absorvidade (ϵ) da metaloporfirina. A

ancoragem da (FeTPFPP)Cl foi realizada duas vezes. Na primeira utilizou-se o método descrito no item III.3.6.B.i, solubilizando a metaloporfirina em DCM, devido a menor toxicidade deste em relação ao benzeno utilizado por Guo *et al.* No entanto, a caracterização por UV-Vis do catalisador sólido não foi possível. A fase orgânica da reação de ancoragem apresentou uma absorção muito maior após a reação, indicando uma variação do ϵ , provavelmente pela mudança dos ligantes do metal. A reação foi repetida em benzeno, e desta vez foi possível quantificar a metaloporfirina no suporte, aproximadamente 9 μmol de catalisador por grama de suporte. Para ambos os casos foram obtidos aproximadamente 150 mg do catalisador sólido o que corresponde a um rendimento de 30% em relação à massa de suporte inicial.

A (FeTPFPP)Cl ancorada em quitosana foi caracterizada por espectroscopia UV-Vis de uma suspensão do em DCM numa cela de quartzo de 0,2 cm de caminho óptico (Figura 56).

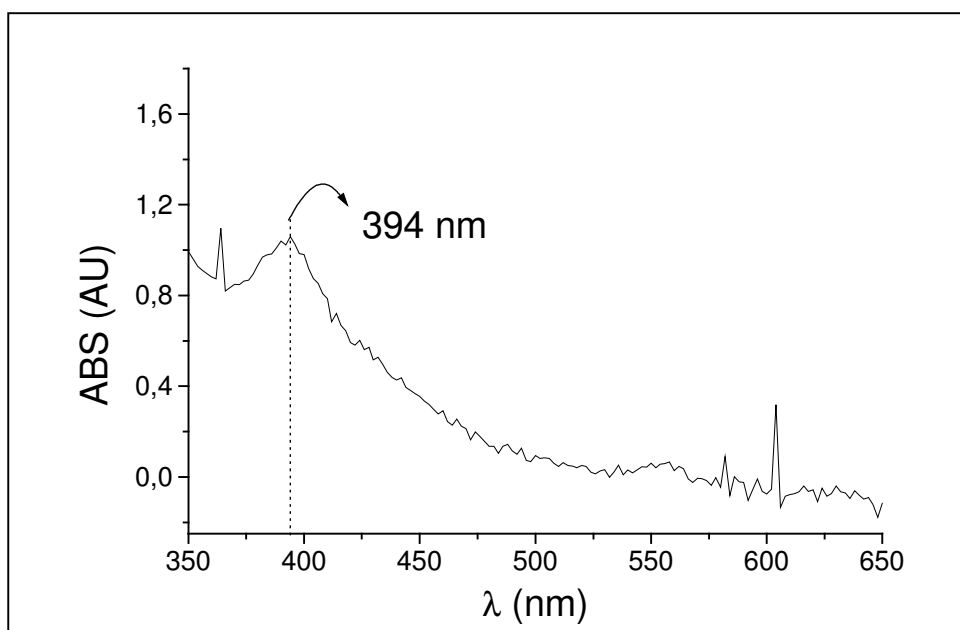


Figura 56 - Espectro UV-Vis de uma suspensão em DCM da (FeTPFPP)Cl imobilizada em quitosana.

Observa-se que o espectro UV-Vis do sólido mostra uma banda Soret em 394 nm, indicando que a imobilização da ferro(III) porfirina no polímero ocorreu com sucesso. Entretanto esta banda está deslocada para o azul quando comparada com a mesma FeP em solução (DCM; 410 nm). Em metaloporfirinas ancoradas as

bandas Q, por serem menos intensas, nem sempre aparecem definidas, e sua atribuição fica comprometida. Este deslocamento, observado para outras ferro(III) porfirinas, como a (FeTSPP)Cl e a, 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dicloro-3sulfonatofenil)porfirina ferro(III) (FeTDCSPP)Cl (FLEISCHER *et al*, 1971; MURATA *et al.*, 1990), pode ser atribuído à coordenação ao ferro(III) central de duas moléculas de água o que sugere que o catalisador não esteja ancorado por coordenação, mas ocluído entre as cadeias poliméricas da quitosana. A bis-coordenação das moléculas de água pode ocorrer durante a reação de ancoragem, pois esta é realizada em meio predominantemente aquoso.

Para avaliar o potencial catalítico deste material foram realizados estudos inicialmente utilizando o cicloocteno como substrato padrão e o iodossilbenzeno como oxidante, em meio de dicloroetano. Os resultados catalíticos são apresentados nas Tabelas a seguir. As reações branco foram realizadas na presença apenas da quitosana comercial

Tabela 18. Rendimentos do epóxido obtidos na oxidação do cicloocteno por PhIO, após 2 h de reação em dicloroetano

Catalisador	Epóxido (%)
Branco	5
Qitosana:(FeTPFPP)Cl	92

relação: 1:100:2000 (metaloporfirina: oxidante: substrato)

As reações de oxidação do cicloocteno utilizando o sistema quitosana:(FeTPFPP)Cl apresentaram ótimos resultados, alcançando rendimento constante de quase 100 % em apenas 2 h de reação. Não houve desancoragem da ferro(III) porfirina, como constatado pelo espectro UV-Vis do sobrenadante após o final da reação. Testes preliminares demonstraram a alta capacidade de reciclagem do sistema, sendo o mesmo suporte utilizado várias vezes sem perda da atividade catalítica (Figura 57). Após 3 reações a atividade foi restaurada mantendo o suporte sob agitação magnética em água por 4 horas.

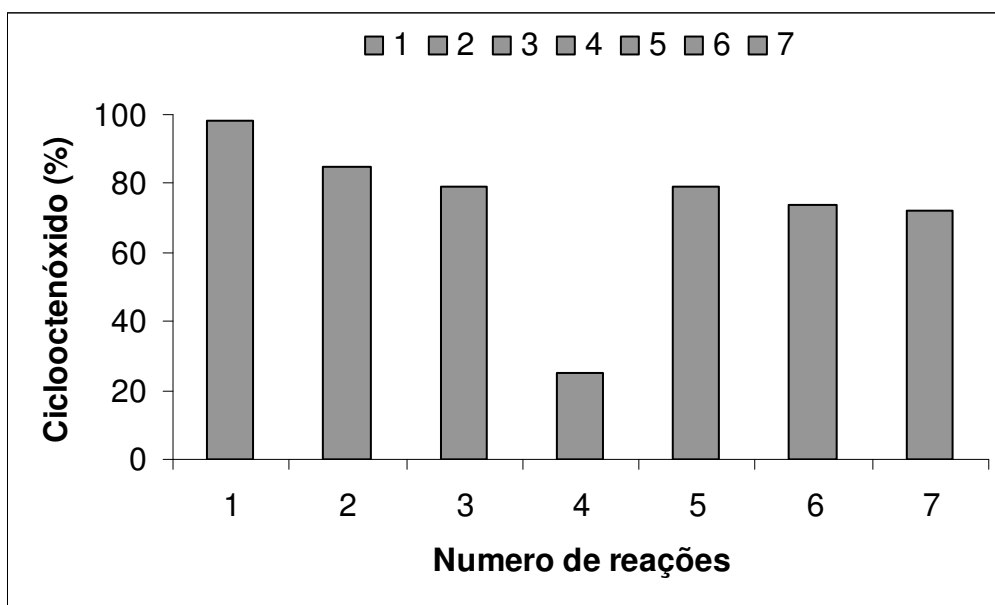


Figura 57. Reciclagem do sistema quitosana:(FeTPFP)Cl

Além do cicloocteno, o estireno foi utilizado como substrato nas reações de oxidação catalisada por este sistema. Este substrato é muito estudado por se tratar de uma olefina terminal, a qual pode gerar diferentes produtos dependendo das condições reacionais (Figura 58) (FARIA et al., 2004; GUEDES et al., 2005). O benzaldeído é formado por mecanismo radicalar e os demais produtos de oxidação são gerados via intermediários ferro(IV)oxo porfirina radical π -cátion. Essa característica possibilita melhor explorar e entender os mecanismos de reação envolvendo ferro(III) porfirinas e sua dependência de fatores como a substituição no anel porfírico, meio de reação e influência do suporte.

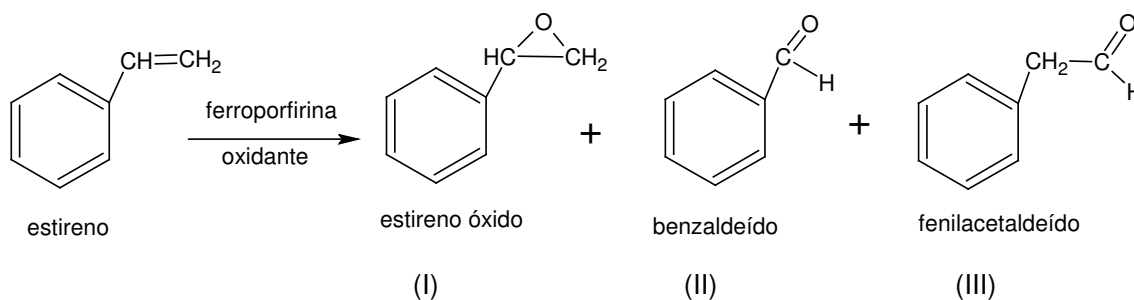


Figura 58 – Oxidação do estireno

Tabela 19. Rendimentos dos produtos obtidos na oxidação do estireno por PhIO em dicloroetano

Catalisador	Tempo reação (h)	I (%)	II (%)	III (%)
Branco	24	8	35	-
Quitosana:(FeTPFPP)Cl	6	103	-	10

1: Estirenoxido; 2: Benzaldeído; 3: Fenilacetaldéido;
Quitosana 2: suporte preparado com quitosana tratada

Assim como para o cicloocteno, o sistema quitosana:(FeTPFPP)Cl foi eficiente para a oxidação do estireno e bastante seletivo para a formação do epóxido. As reações com estireno apresentaram rendimento total acima de 100 %, indicando a participação do oxigênio na reação.

A ancoragem da (FeTPFPP)Cl em quitosana mostrou-se promissora, apresentando alta eficiência catalítica e seletividade, além de fácil preparação do catalisador suportado e possibilidade de reciclagem.

Devido aos bons resultados obtidos pelo sistema quitosana:(FeTPFPP)Cl ancorado por ligação coordenada, foi realizada a ancoragem da (FeTCPP)Cl e da (FeTPFPP)Cl na quitosana por ligação covalente foi estudada a atividade catalítica dos materiais obtidos na oxidação dos hidrocarbonetos padrão e da cloroquina.

IV.6.2.B – Ancoragem da (FeTPFPP)Cl em quitosana por ligação covalente

A ancoragem por ligação covalente do cloreto de 5,10,15,20-tetrakis-(pentafluorofenil)porfirina ferro (III), (FeTPFPP)Cl, na quitosana foi feita através da substituição nucleofílica do flúor na posição *para* dos substituintes *meso* fenilas da ferro(III) porfirina pelos grupos NH₂ do suporte.

O catalisador suportado foi preparado através da reação entre a metaloporfirina e a quitosana segundo método descrito por Kittur *et al* (KITTUR *et al.*, 2002), solubilizando a metaloporfirina em etilenoglicol, devido ao alto ponto de

ebulição desse solvente. Um maior ponto de ebulição é importante devido a menor reatividade da (FeTPFPP)Cl em relação ao ácido monocloro acético utilizado por Tharanathan *et al.* O “loading” do sólido foi calculado pela diferença de absorção da banda Soret da FeP na fase orgânica, antes e depois da ancoragem, e usando o coeficiente de absorvidade (ϵ) da metaloporfirina. Estes cálculos indicaram que 9,5 μmol de metaloporfirina foram ancorados por grama de quitosana. Foi obtido aproximadamente 800 mg do catalisador sólido, o que corresponde a um rendimento de 80% em relação à massa de suporte inicial. Essa perda se deve, em parte, à desidratação a que é submetida a quitosana durante a reação de ancoragem.

O catalisado sólido foi caracterizado por espectroscopia UV-Vis de uma suspensão em DCM (Figura 59).

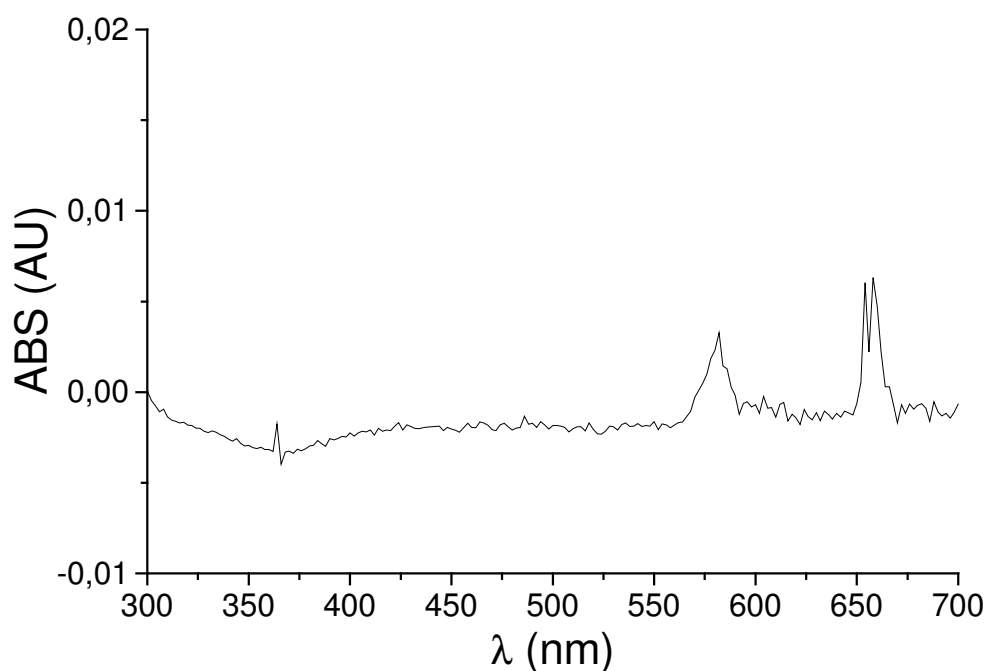


Figura 59 - Espectro UV-Vis de uma suspensão da (FeTPFPP)Cl ancorada covalentemente em quitosana, em DCM.

O espectro UV-Vis não apresentou a banda Soret esperada, indicando que a ancoragem levou a destruição da FeP. Este resultado foi confirmado pelos baixos rendimentos obtidos nas reações de oxidação utilizando o cicloocteno como substrato padrão e o iodosilbenzeno como oxidante, em reações em meio de

dicloroetano. Os resultados catalíticos são apresentados na Tabela 20 a seguir. As reações branco para este e outros substratos foram realizadas na presença apenas da quitosana comercial

Tabela 20. Rendimentos do epóxido obtidos na oxidação do cicloocteno por PhIO, após 4 h de reação em dicloroetano

Catalisador	Epóxido (%)
Branco	5
Quitosana^A	65
Quitosana^B	5

Quitosana^A: 1^a Reação; Quitosana^B :
Quitosana^A após a 1^a reação (reciclagem);
relação 1:100:2000 (metaloporfirina: oxidante:
substrato)

O rendimento de quase 65% obtido na primeira reação foi atribuído a presença de (FeTPFPP)Cl adsorvida na quitosana, que sob agitação magnética foi liberada para a solução o que levou à oxidação do cicloocteno. Em geral, a oxidação do estireno por esta ferro(III) porfirina apresenta rendimentos próximos a 100 % (FARIA *et al.*,2004), no entanto, como boa parte do catalisador foi destruído durante a ancoragem não havia (FeTPFPP)Cl suficiente para catalisar a completa conversão do substrato. A grande perda da atividade catalítica observada na segunda reação utilizando o mesmo suporte, reformula a hipótese de que a FeP foi destruída durante a ancoragem.

IV.6.2.C. – Imobilização da (FeTCPP)Cl em quitosana por ligação covalente

A ancoragem da (FeTCPP)Cl na quitosana foi realizada inicialmente usando cloreto de oxalila. A reação ocorre em duas etapas: na primeira, os grupos carboxi da metaloporfirina reagem com o cloreto de oxalila e são convertidos ao cloreto de acila derivado; na segunda, o cloreto de acila derivado reage com os grupos amina da quitosana levando à formação da amida (Figura 60). Para garantir que os grupos

amina da quitosana estivessem desprotonados, esta foi tratada com uma solução de trietilamina e, em seguida, lavada com MeOH. A quitosana, após o tratamento, foi mantida a uma temperatura elevada (> 120 °C) para diminuir a quantidade de água adsorvida no suporte, que poderia levar a uma diminuição no rendimento de ancoragem. Durante esta etapa foi observado um leve escurecimento do suporte, indicando uma mudança na estrutura do mesmo.

Após o final da reação de ancoragem o material foi lavado exaustivamente com MeOH, resultando em um sólido com a mesma coloração original, indicando que nenhum catalisador foi ancorado. A mudança na coloração do suporte é característica das reações de ancoragem envolvendo metaloporfirinas, devido ao caráter cromóforo deste composto. Resultados catalíticos preliminares mostraram que o suporte, como esperado, não apresentava nenhuma atividade catalítica.

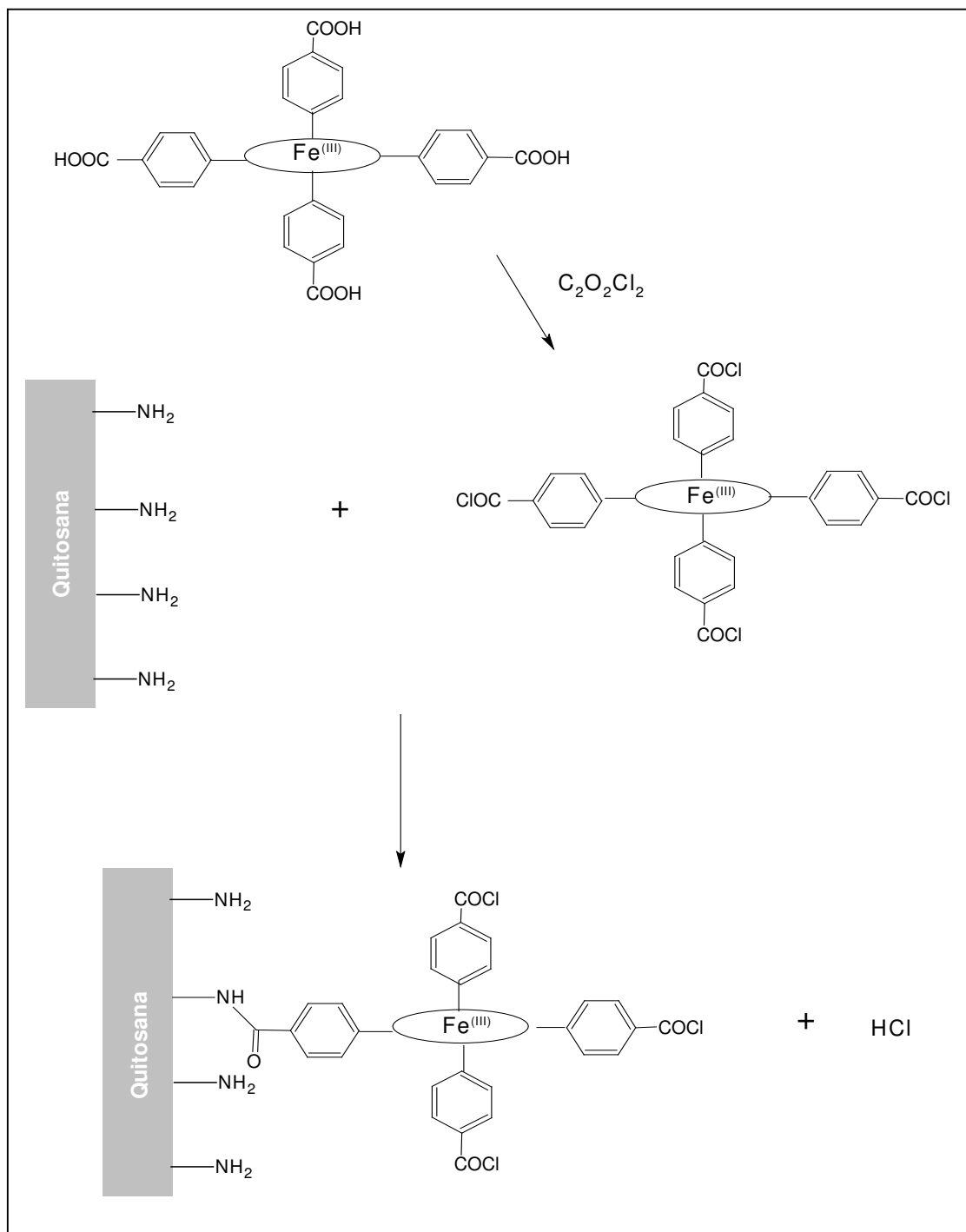


Figura 60. Ancoragem em quitosana da (FeTCPP)Cl via ativação prévia com cloreto de oxalila

Com bases nestes resultados concluiu-se que não ocorreu imobilização da (FeTCPP)Cl na quitosana, provavelmente devido à mudanças na estrutura do

suporte, provocada pelo aquecimento deste a alta temperatura, que dificultaram a reação do grupo NH_2 com a FeP.

A reação de ancoragem foi então repetida utilizando um método descrito por Lee *et al* (LEE et al., 1998). Este método envolve o acoplamento dos grupos carboxi da metaloporfirina com os grupos amino da quitosana via um agente de acoplamento. Inicialmente a quitosana foi solubilizada em ácido acético glacial 1% para facilitar a aproximação da metaloporfirina e do agente de acoplamento, neste caso a DCCI. Após a completa solubilização do suporte a (FeTCPP)Cl foi adicionada, seguida da DCCI.

Após 48 h a reação foi interrompida e neutralizada com NH_4OH . O sólido obtido foi filtrado e lavado exaustivamente com:

- uma solução 2% NH_4OH e 2% NaCl; o primeiro para desancorar qualquer catalisador imobilizado apenas por coordenação dos nitrogênios da quitosana com o metal da FeP, o segundo para eliminar possíveis pares iônicos formados entre a ferro(III) porfirina e o suporte, para garantir que apenas o catalisador imobilizado por ligação covalente ficasse retido no suporte;
- Água destilada; para eliminar o excesso de NH_4OH e NaCl presentes devido à lavagem anterior.

Foram obtidos 300 mg de material sólido, o que corresponde a um rendimento de 60 %. A análise por UV/Vis da água mãe das lavagens e do sobrenadante indicaram que 4,5 μmol de (FeTCPP)Cl foi ancorada por grama de suporte.

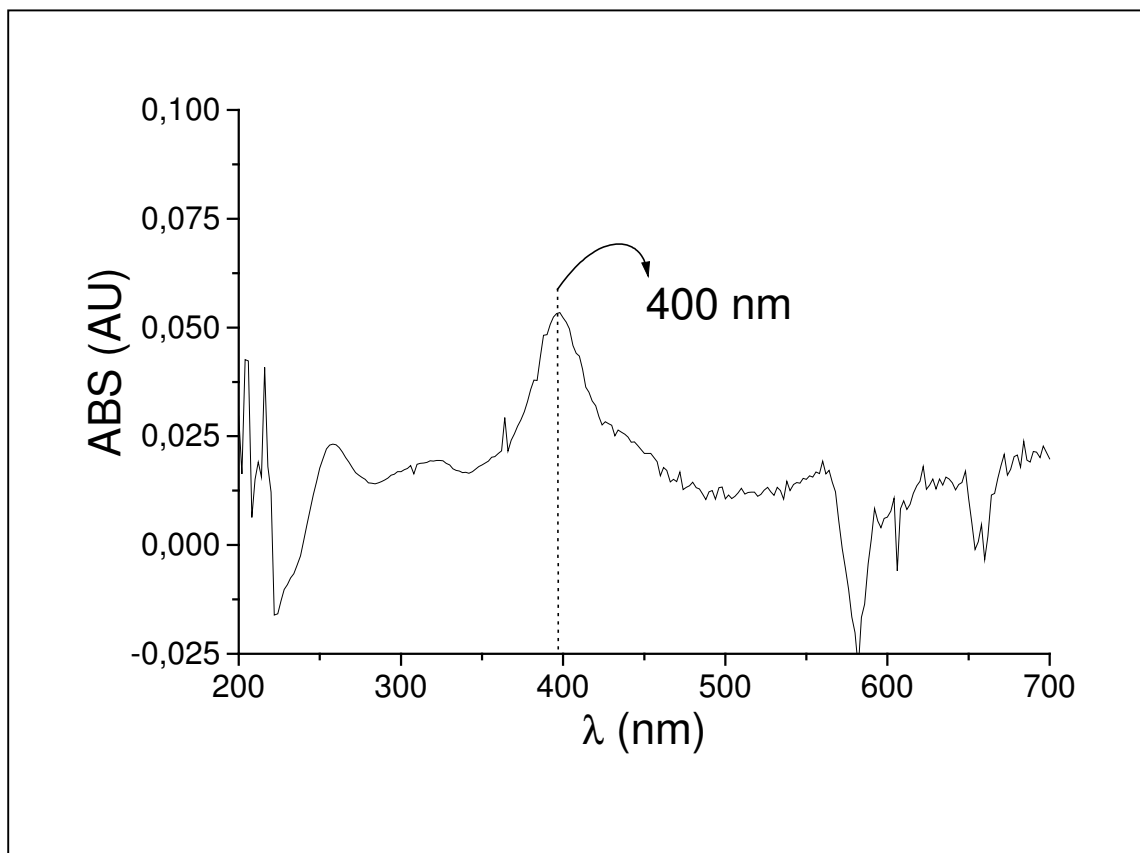


Figura 61 - Espectro UV-Vis de uma suspensão em DCM da (FeTCPP)Cl ancorada covalentemente em quitosana.

Os espectros UV-Vis da (FeTCPP)Cl ancorada (Figura 61) mostra uma banda Soret em 400 nm, indicando que a ferro(III) porfirina foi imobilizada no polímero. Mais uma vez não foi possível observar as bandas Q, menos intensas. O comprimento de onda da banda Soret observado é característico de uma FeP com duas moléculas de água com ligantes axiais. A bis-coordenação das moléculas de água indica que a (FeTCPP)Cl não está coordenada aos grupos NH_2 em excesso da quitosana.

IV.6.2.D. Estudo da atividade catalítica do sistema (FeTPFPP)Cl:quitosana e (FeTCPP)Cl:quitosana na oxidação da cloroquina por iodossilbenzeno

O sistema quitosana:(FeTPFPP)Cl ligada por coordenação foi utilizado como catalisador na oxidação da cloroquina pelo iodossilbenzeno, em reações em meio de dicloroetano. Os resultados catalíticos são apresentados na Tabela 21. As reações branco foram realizadas na presença da quitosana sem a metaloporfirina.

Tabela 21. Rendimentos da monodesetilcloroquina obtida na oxidação da cloroquina por PhIO, após 24 h de reação em tampão fosfato e em metanol

Catalisador	Tampão Fosfato	MeOH
Branco	Traço	1
Quitosana/(FeTPFPP)Cl*	1	5

*Ancoragem por coordenação do metal. Relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8}$: $1,25 \times 10^{-6}$: $7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300).

O sistema (FeTPFPP)Cl–quitosana apresentou uma baixa atividade catalítica na oxidação da cloroquina por PhIO. Estes resultados eram esperados uma vez que esta FeP também não apresentou um bom rendimento em meio homogêneo.

Foram também realizados reações com o sistema quitosana:(FeTCPP)Cl imobilizada por ligação covalente, na oxidação da cloroquina, tanto em MeOH quanto em meio aquoso. Os rendimentos obtidos são apresentados na Tabela abaixo.

Tabela 22 – Rendimentos (%) da oxidação da cloroquina por iodossilbenzeno catalisado pelo sistema Quitosana-(FeT CPP)Cl imobilizada por ligação covalente.

Catalisador	Monodesetilcloroquina	
	MeOH (%)	Tampão Fosfato (%)
Quitosana Branco	3	1
Quitosana: (FeT CPP)Cl	29	18

*relação de FeP : PhIO : cloroquina de $2,5 \times 10^{-8}$: $1,25 \times 10^{-6}$: $7,5 \times 10^{-6}$ mol (1:50:300).

Mais uma vez, os melhores rendimentos foram obtidos para o sistema envolvendo a (FeT CPP)Cl. Enquanto o sistema (FeTPFPP)Cl–quitosana apresentou um rendimento de monodesetilcloroquina próximo a 3 %, o sistema (FeT CPP)Cl–quitosana apresentou rendimento próximo a 30 %, muito similar ao rendimento obtido em solução. Estes resultados indicam que mesmo com o catalisador imobilizado, as interações substrato:FeP têm um papel fundamental na catálise de oxidação da cloroquina por PhIO.

IV.6.2.E. Estudo da atividade catalítica assimétrica dos sistema (FeT CPP)Cl:Quitosana e (FeTPFPP)Cl:Quitosana na oxidação do estireno por iodossilbenzeno.

A quitosana (ou poli d-glucose) vem sendo utilizada em reações enantiosseletivas envolvendo hidrocarbonetos, por exemplo, oxidação do octeno à (S)-(+)-2-octanol, pois este material, devido a sua quiralidade, favorece a formação de apenas um enantiômero, com um excesso enantiomérico entre 80 e 98% (ZHOU et al., 2003; XUE, 2004). Assim, além de seu uso como catalisador biomimético da oxidação da cloroquina, o potencial dos sistemas (FeT CPP)Cl:quitosana e (FeTPFPP)Cl:quitosana como catalisadores assimétricos também foi avaliado.

Nestes estudos, realizados na Universidade de York sob orientação do Prof. John R. Lindsay-Smith, foi utilizado o estireno como substrato padrão e o iodosilbenzeno como oxidante, em meio de diclorometano ou metanol. Os resultados catalíticos são apresentados na Tabela a seguir. As reações branco foram realizadas na presença apenas da quitosana comercial

Tabela 23. Rendimentos (%) do epóxido (enantiômeros R e S) obtidos na oxidação do estireno por PhIO, após 6 h de reação.

<i>Catalisador</i>	<i>Diclorometano</i>		<i>Metanol</i>	
	R	S	R	S
<i>Quitosana</i>	0.7	0.3	1.5	0.5
<i>Quitosana-(FeTPFPP)Cl¹</i>	34.3	33.5	5.3	4.9
<i>Quitosana-(FeTCPP)Cl²</i>	33.3	32.5	4.8	4.3

¹: (FeTPFPP)Cl ancorada por coordenação; ²: (FeTCPP)Cl ancorada covalentemente; relação 1:100:2000 (ferro(III) porfirina:oxidante:substrato)

As reações de oxidação do estireno utilizando o sistema Quitosana-(FeTPFPP)Cl e Quitosana-(FeTCPP)Cl apresentaram bons resultados catalíticos (rendimento total de estireno próximo a 70 %). No entanto, nenhum dos sistemas se mostrou eficiente como catalisador assimétrico. O pequeno percentual de excesso enantiomérico obtido foram observados mesmo nas reações branco, indicando que este excesso foi causado por reações catalisadas pelo suporte em si e não foram favorecidas pela presença da FeP. Estes resultados também sugerem que a oxidação catalisada pela FeP ocorre apenas na superfície do suporte, e que as FeP presentes no interior do suporte, onde o ambiente quiral poderia favorecer a oxidação assimétrica, não participam da reação.

IV.7. Síntese da H₂DAPPIX via ativação da H₂PPIX por trifluoroacetato de p-nitrofenol

A síntese de um derivado N-Aspartil substituído da H₂PPIX (Figura 62), a H₂DAPPIX, foi realizada com o intuito de aumentar o número de grupos carbóxi na porfirina o que, como pode-se concluir dos estudos de interação, aumentaria a

habilidade da porfirina de interagir eletrostaticamente com a cloroquina e, conseqüentemente, a atividade catalítica da ferro(III) porfirina derivada da H₂DAPPIX.

O uso de uma ferro(III) porfirina derivada da H₂DAPPIX, FeDAPPIX, como catalisador pode ser justificado ainda pelos seguintes fatores:

i) Após a adição dos substituintes ácidos aspárticos nas moléculas de H₂PPIX espera-se que esta tenha uma atividade em MeOH superior àquela da FePPIX e, portanto, igual ou maior que àquela da (FeTCPP)Cl.

ii) A porfirina de partida, a H₂PPIX, é muito mais barata que a (FeTCPP)Cl (5 g de (FeTCPP)Cl custariam US\$ 2.720,00 enquanto os mesmos 5 g de H₂PPIX custam US\$ 170,00 – Fonte: Frontier Scientific Inc.). Assim, mesmo após as etapas de síntese é possível obter um catalisador muito mais barato que a (FeTCPP)Cl;

iii) A FeDAPPIX seria uma derivada da FePPIX, o centro prostético do CYP-450, e, portanto, um modelo biomimético mais fiel do que a (FeTCPP)Cl para os estudos catalíticos deste e outros substratos.

Assim, vários métodos foram testados para obter a porfirina N-aspartil substituída, H₂DAPPIX (**ANEXO A**). Foram variados nestes métodos: o agente ativante de síntese de ligação peptídica (SOCl₂, C₂O₂Cl₂, DCCl e trifluoroacetato de *p*-nitrofenol), o método de esterificação do ácido aspártico (HCl gasoso, SOCl₂), o álcool usado na esterificação (CH₃OH, C₂H₆OH), além de diferentes solventes e temperaturas de reação.

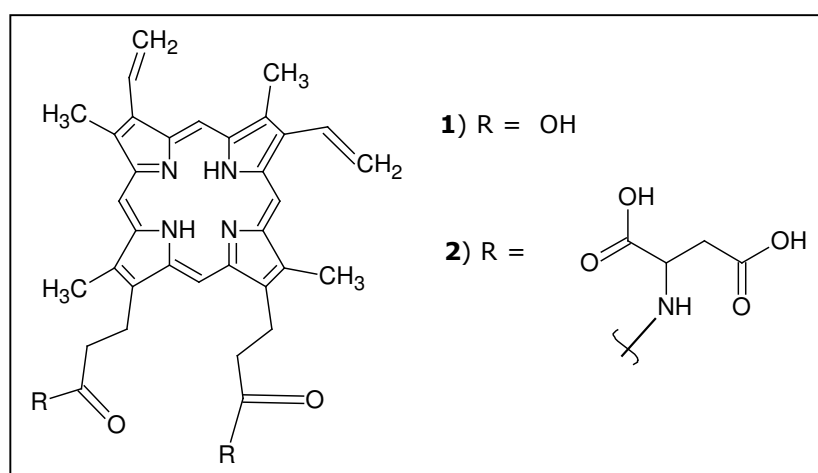
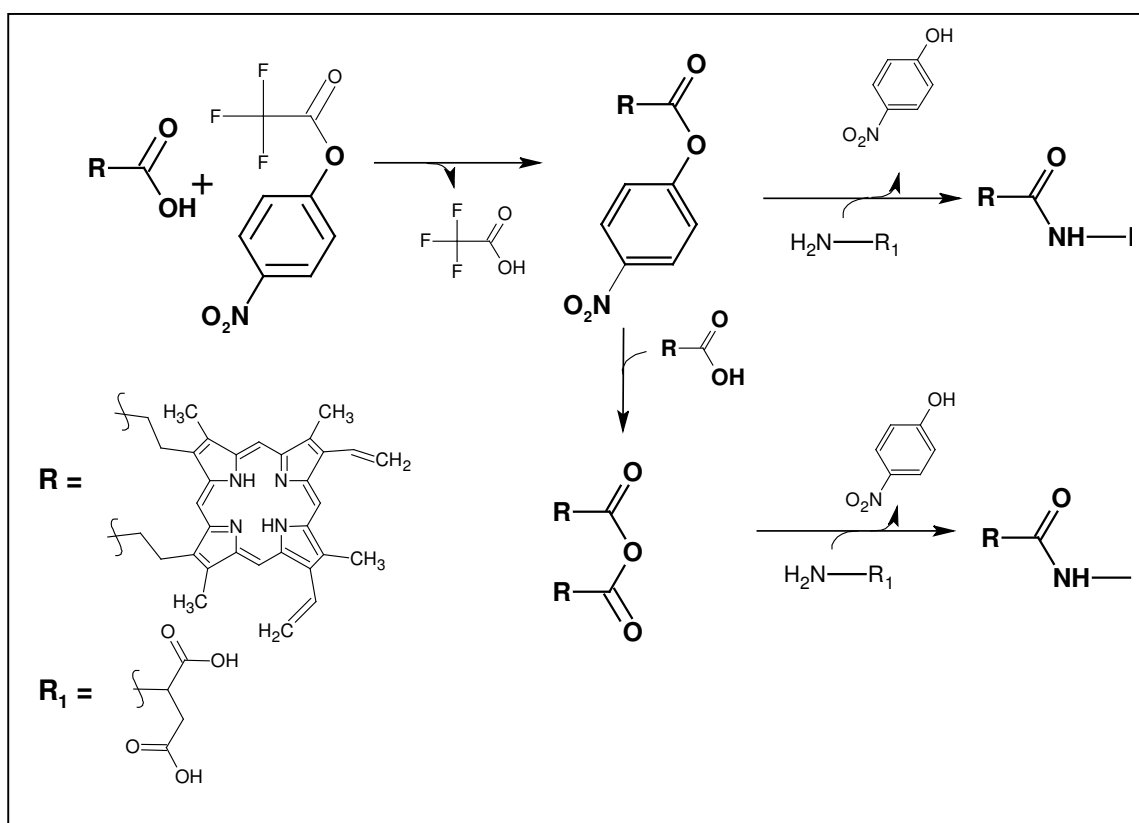


Figura 62. Fórmula estrutural da 1) protoporfirina IX, H₂PPIX; e de 2) seu derivado N-Aspartil substituído, H₂DAPPIX.

Após várias tentativas (reações 1-6, **ANEXO A**), a H₂DAPPIX foi finalmente obtida através da conversão da H₂PPIX em um éster *p*-nitro fenol altamente reativo e, em seguida, pela conversão deste éster na amida desejada pela reação com ácido aspártico dimetil éster (Esquema 3) segundo método descrito por *et al.*(COLLMAN *et al.*, 1980). O *p*-nitro fenol foi escolhido por se tratar de um ótimo grupo de saída e pela simplicidade da reação de esterificação quando utilizando trifluoroacetato de *p*-nitrofenol como um dos reagentes



Esquema 3. Mecanismo de formação da H₂DAPPIX via trifluoroacetato de *p*-nitrofenol

A reação foi realizada em piridina, à temperatura ambiente, para garantir a solubilidade dos reagentes. A reação, acompanhada por CCD, indicou a formação de uma fração com polaridade menor que a do produto de partida. Ao fim da reação o produto foi precipitado com a adição de hexano. O sólido obtido foi lavado com hexano para eliminar a piridina adsorvida e, após seco, caracterizado por ES-MS (Figura 63).

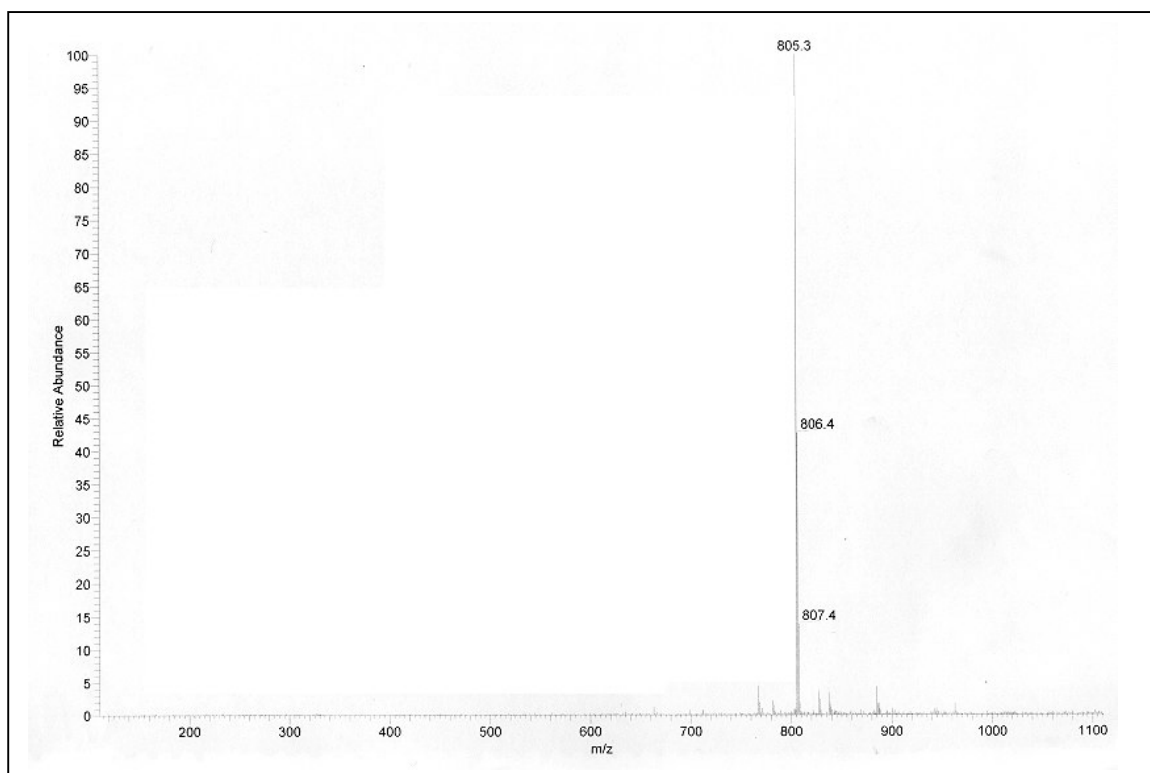


Figura 63. ES-MS do produto da síntese da H₂PPIX esterificada com *p*-nitrofenol

O ES-MS do produto da esterificação apresenta um pico em $m/z = 805$, que pode ser atribuído ao derivado éster di-(*p*-nitrofenol) da H₂PPIX (MM = 804) indicando a completa conversão dos grupos carboxila da H₂PPIX nos ésteres de interesse. Além de seletiva a reação apresentou um ótimo rendimento (~93 %).

Para reagir com o éster *p*-nitrofenol derivado da H₂PPIX, o dimetil aspartato foi dissolvido em piridina para garantir que os grupos amina do ácido aspártico não estivessem protonados. A reação também foi realizada em piridina para garantir a solubilidade dos reagentes durante a reação. A temperatura foi mantida constante a 65 °C por 24 h.

O produto obtido desta reação foi precipitado com a adição de hexano. O sólido foi lavado com hexano para eliminar a piridina adsorvida e, após seco, caracterizado por ES-MS (Figura 64). O espectro apresenta um pico principal em $m/z=821$ (MM = 820), atribuído ao composto I da Figura 65. O segundo pico de maior intensidade, $m/z = 835$ corresponde ao composto II (MM = 834).

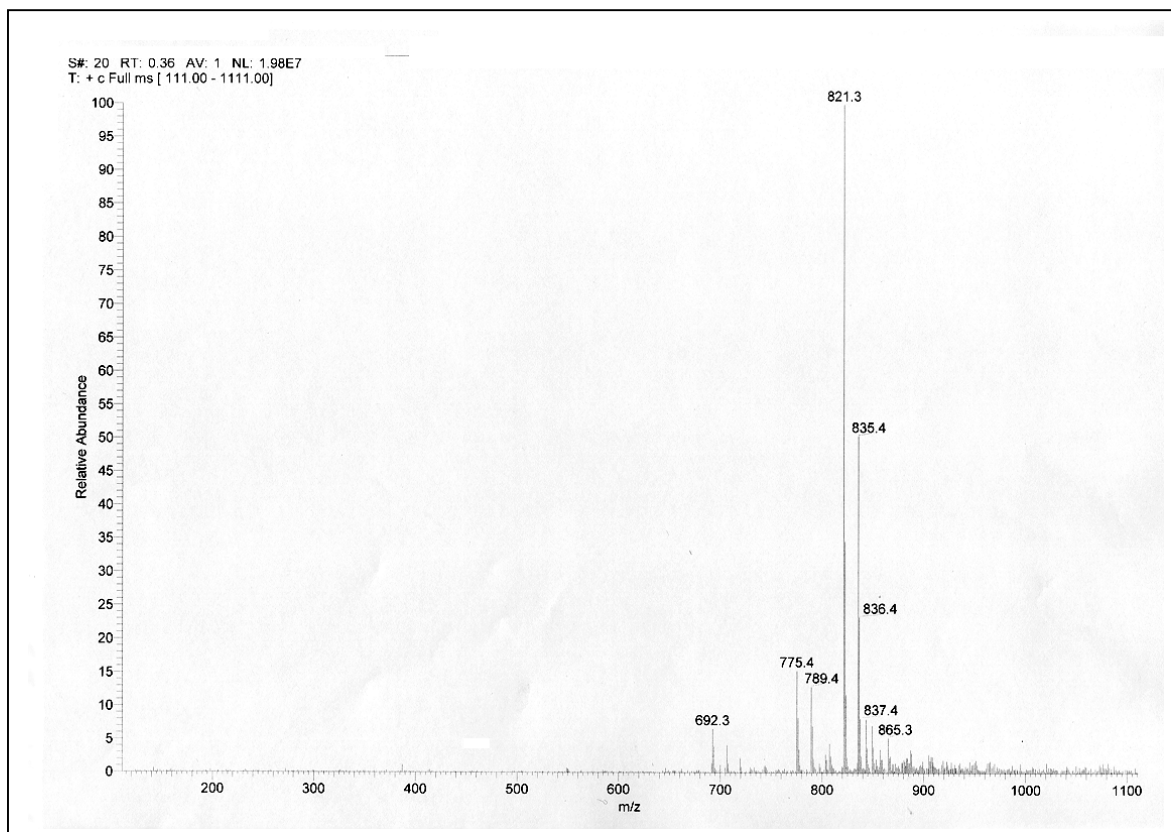


Figura 64. ES-MS do produto da síntese da H₂DAPPIX

Este resultado indica que a formação da ligação peptídica entre a H₂PPIX e o ácido aspártico, via o éster *p*-nitrofenol da porfirina, foi quase completa, apresentando um ótimo rendimento (~90 %). Portanto, o método de síntese utilizando o trifluoroacetato de *p*-nitrofenol se mostrou o mais adequado para a conversão dos grupos carbóxi de porfirinas naturais, como a H₂PPIX, em amidas.

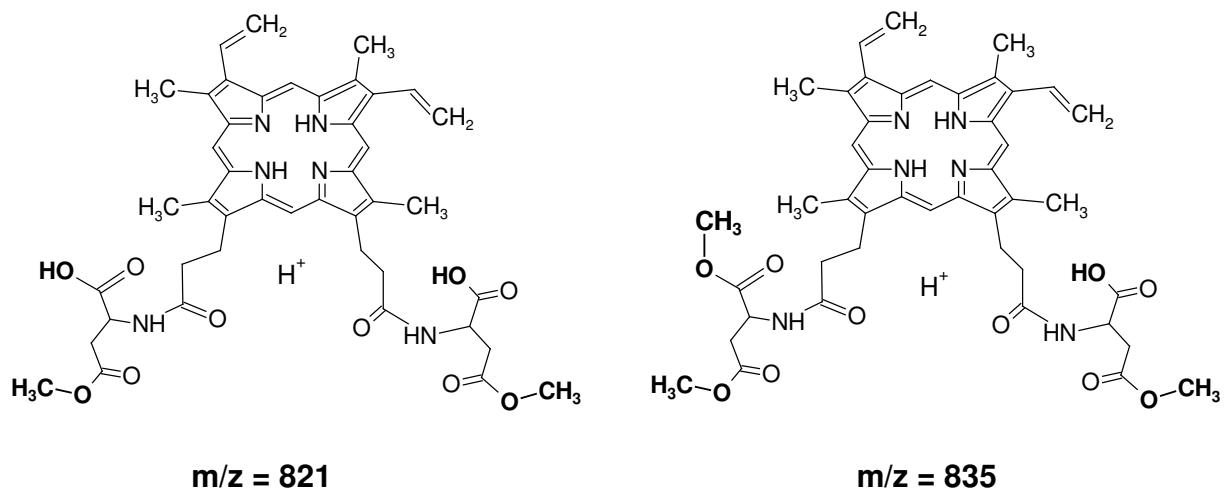


Figura 65. H₂DAPPIX com diferentes graus de esterificação dos ácidos aspárticos.

Infelizmente, esta porfirina só foi obtida no final do doutorado e sua metalação e conseqüente uso como catalisador na oxidação da cloroquina não pode ainda realizada.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi iniciado tendo como objetivo o uso de FeP como modelos biomiméticos do CYP-450 na oxidação de um fármaco antimalárico, a cloroquina. Pretendia-se avaliar a habilidade destes complexos de catalisar, “*in vitro*”, a formação dos metabólitos obtidos “*in vivo*” pela enzima. A seletividade dos sistemas biológicos é atribuída à matriz protéica, responsável por direcionar o substrato para o sítio catalítico, controlando a oxidação. Por sua vez, modelos biomiméticos, quando em solução, são incapazes de reproduzir este controle, principalmente por não terem grupos específicos para interagir com o substrato, além do próprio sítio ativo.

Na ação terapêutica da cloroquina, as interações com os grupos carbóxi da FePPIX tem um papel crucial em impedir a formação da β -hemozoína (polímero formado pela FePPIX), mecanismo pelo qual o plasmódio causador da malária se protege da toxicidade da FePPIX. Após sua ação terapêutica, o fármaco é seletivamente metabolizado pelo CYP-450 por um mecanismo de dealquilação do N-terminal da cadeia lateral da cloroquina.

Estas peculiaridades da ação e metabolismo deste fármaco levaram ao questionamento sobre a capacidade de FeP sintéticas interagirem com a cloroquina e qual o papel dessas interações na atividade catalítica destes modelos biológicos.

Os resultados dos estudos de interação mostraram que, ao contrário do que se pensava inicialmente, o metal não exerce papel importante na formação do complexo FeP:cloroquina. Este é resultado de um efeito cooperativo das interações π - π e eletrostática envolvendo, portanto, tanto os elétrons π de ambos os macrociclos (porfirina e fármaco) como o par iônico $\text{FeP}^{\cdot-}:(\text{fármacoH}^+)$. Observou-se que o complexo é estável somente quando ambas interações são possíveis, o que ocorre apenas em meio aquoso.

O efeito destas interações foi observado nas reações de oxidação da cloroquina por PhIO e H_2O_2 catalisadas por ferro(III) porfirinas. Catalisadores como a $(\text{FeTCPP})\text{Cl}$, que geralmente são catalisadores menos eficientes na oxidação de substratos padrão (hidrocarbonetos) mostraram rendimentos superiores à ferro(III) porfirinas neutras, como a $(\text{FeTPFPP})\text{Cl}$, compostos consagrados na literatura como bons catalisadores para substratos orgânicos. Esta atividade catalítica inesperada é devido a habilidade da $(\text{FeTCPP})\text{Cl}$ em interagir eletrostaticamente com o substrato.

Outro resultado que merece destaque é que a FePPIX, uma ferro(III) porfirina facilmente degradada em outros sistemas catalíticos, apresentou bons rendimentos nas reações de oxidação da cloroquina em metanol, mostrando que interações eletrostáticas com a cloroquina foram suficientes para proteger este catalisador da degradação auto-oxidativa e, portanto, resultando num efeito benéfico sobre a atividade catalítica desta FeP.

A influência das interações catalisador:substrato é observada mesmo em reações de oxidação envolvendo sistemas catalíticos heterogêneos. As FeP aniônicas suportadas em quitosana se mostraram catalisadores mais eficientes que as FeP neutras imobilizadas no mesmo suporte. Este resultado permite considerar o sistema heterogêneo quitosana:FeP aniônica como um catalisador potencial para a obtenção de maiores quantidades de metabólitos, pois apresentam:

- facilidade de recuperação do catalisador;
- facilidade de separação dos produtos e;
- rendimentos semelhantes àqueles obtidos em solução.

Outra importante consideração diz respeito à seletividade das reações de oxidação e, conseqüentemente, à reatividade da molécula de cloroquina. Ao comparar os produtos obtidos “*in vivo*” pelo metabolismo da cloroquina com aqueles obtidos na oxidação da cloroquina “*in vitro*” usando as FeP pode-se constatar que estes sistemas apresentaram como principal produto a monodesetilcloroquina e, portanto, foram capazes de mimetizar o CYP-450. A identificação dos demais produtos de oxidação mostrou que a oxidação deste fármaco se concentra na região próxima ao nitrogênio terciário da cadeia lateral, e que, na ausência deste nitrogênio, a catálise perde sua seletividade. É interessante notar que a formação da bisdesetilcloroquina, um dos metabólitos obtido “*in vivo*”, não foi observada em nenhum dos sistemas modelos estudado, indicando que a formação deste composto é favorecida pela matriz protéica. Ao invés disso, a reação levou a dois produtos diferentes originados a partir da quebra da ligação carbono-nitrogênio da amina terciária. Uma vez que existem 3 carbonos ligados a este nitrogênio, e dois são equivalentes, seria esperada uma razão 2:1 dos produtos obtidos (monodesetilcloroquina e desetilaminocloroquina, respectivamente). No entanto, a razão observada é semelhante a 3:1, o que indica uma pequena orientação do substrato resultante das interações entre catalisador e substrato.

A relação da interação FeP:cloroquina e atividade catalítica observada nestes estudos abre a possibilidade de que este efeito possa ser importante na oxidação de outros fármacos e substratos e deve ser levada em consideração nos estudos de outros sistemas modelos do CYP-450.

Neste trabalho foi desenvolvido ainda um método simples e eficiente para a obtenção de uma porfirina N-aspartil substituída derivada da FePPIX, com objetivo de avaliar se um aumento no número de grupos capazes de interagir eletrostaticamente com a cloroquina (4 grupos COOH) levariam a um catalisador mais eficiente. Infelizmente, uma vez que a síntese só foi concluída com sucesso no final do doutorado, não houve tempo para realizar os estudos catalíticos de oxidação da cloroquina, o que deverá ser feito num futuro próximo.

ANEXO A. Síntese, Purificação e Caracterização da H₂DAPPIX

– Parte Experimental

A.1. Esterificação do Ácido Aspártico com MeOH

Num balão de 50 mL contendo 25 mL de MeOH foram adicionados 5 g de ácido aspártico. A suspensão foi mantida à temperatura ambiente e foi acrescentado SOCl₂ gota a gota. A solução foi mantida em temperatura ambiente durante 2 h e então aquecida à temperatura de refluxo por mais 1 h e meia. O excesso de MeOH e SOCl₂ foi eliminado por rotaevaporação à pressão reduzida, sendo obtido o derivado dimetil éster do ácido aspártico na forma de um sólido branco.

A.2. Síntese da H₂(DAPPIX) via DCCI (reação 1)(JONES, 1997)

Num balão de 125 mL foi adicionado 163 mg (1200 μmol) de ácido aspártico previamente esterificado. Solubilizou-se a amostra com 35 mL de DCM e 35 mL de acetona. Acrescentou-se 70 mg (340 mmol) de DCCI em DCM e deixou-se a mistura

em agitação magnética por 5 min. Em seguida adicionou-se 150 mg (260 μmol) da porfirina H_2PPIX . A reação foi deixada sob agitação magnética e à temperatura ambiente por 24 h, sendo acompanhada por espectroscopia UV/Vis.

A.2.1. Purificação da H_2DAPPIX

i) Coluna de Silica Gel 60 230 – 400 mesh

O produto da reação foi parcialmente solubilizado em DCM. A parte não solúvel correspondia ao material de partida que não reagiu. A solução foi aplicada em uma coluna, de 42,5 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro, preenchida com uma suspensão de sílica gel em DCM:MeOH (9:1) até atingir uma altura de 25 cm. Foi feita a eluição via gradiente de DCM:MeOH (9:1) à DCM:MeOH (0:1) obtendo-se quatro frações. Uma pequena parte do material de partida que não reagiu e foi solubilizado em DCM ficou retido na coluna e foi extraído com a utilização de DMF como eluente.

ii) Recristalização da primeira fração da coluna de purificação

Depois de levada à secura a fração 1 obtida na coluna anterior foi solubilizada num erlenmeyer com um volume mínimo de EtOH, em seguida foi adicionado 75 mL de H_2O e a mistura foi aquecida até a temperatura de ebulição. Após a eliminação do EtOH ocorreu a precipitação da porfirina. Foi mantido o aquecimento até que o volume inicial fosse reduzido à metade, ocorrendo então a recristalização da porfirina.

Foi feita a análise do produto da reação desta síntese da H_2DAPPIX por RMN- ^1H . Para esta análise, parte do sólido obtido na reação (aproximadamente 5 mg), foi dissolvido em dimetil sulfóxido deuterado.

iii) Lavagem do produto da recristalização anterior

Após o processo de recristalização obteve-se 150 mg de sólido que foi adicionado a um erlenmeyer contendo acetato de etila (~50 mL), em seguida a mistura foi sonicada por 40 min. A suspensão foi então filtrada e o sólido obtido foi

lavado repetidas vezes com acetato de etila. A solução de porfirina obtida foi concentrada em um rotaevaporador e aplicada em coluna de sílica-gel (item iv).

iv) Segunda coluna de Silica Gel 60 230 – 400 mesh

A coluna, de 42,5 cm de altura por 5 cm de diâmetro, foi preenchida com uma suspensão de sílica gel em acetato:éter (4:1) até atingir uma altura de 25 cm. Foi feita a eluição com o mesmo solvente citado acima e foram obtidas dez frações. A quinta e a décima fração foram analisadas por UV/Vis e por RMN-¹H. Para análise por RMN as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado e foram analisadas em um espectrofotômetro da Bruker modelo DRX400 (400MHZ)

A.3. Síntese da H₂(DAPPIX) via SOCl₂ usando dimetil aspartato (Reação 2)

Num balão de 25 mL foram adicionados 150 mg (190 µmol) da protoporfirina IX, H₂PPIX. Foi acrescentado ao meio 5 mL de SOCl₂ recém destilado. A solução foi mantida em temperatura ambiente e atmosfera inerte (Ar) durante 18 h. A reação foi monitorada por espectroscopia UV/Vis e CCD. Após 2 h o excesso de SOCl₂ foi eliminado por rotaevaporação à pressão reduzida.

Ao balão contendo o produto sólido da reação com SOCl₂ foram adicionados 10 mL de DCM e 5 mL de Et₃N. A seguir foram adicionados 300 mg do ácido aspártico dimetil éster (Acros) solubilizado em DCM:Et₃N (2:1). A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 24 h. A reação foi monitorada por espectroscopia UV/Vis e CCD. Após a reação o solvente foi eliminado por rotaevaporação à pressão reduzida.

O produto obtido foi solubilizado no menor volume possível de acetona. Foi então adicionada à solução 5 mL de DCM e 45 mL de éter etílico, levando à formação de um precipitado de coloração escura. O sobrenadante foi analisado por CCD e apresentou apenas uma banda, sendo armazenado para análise por RMN-¹H. O precipitado foi solubilizado em DCM e aplicado em uma coluna de sílica gel 60 (Acros) para a purificação. A coluna, de 42,5 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro, foi preenchida com uma suspensão de sílica gel em DCM até atingir uma altura de 25

cm. O sólido obtido na síntese foi dissolvido no menor volume possível de eluente (DCM) e aplicado no topo da coluna. Foram obtidas duas frações, ambas foram analisadas por RMN-¹H.

A.4. Síntese da H₂(DAPPIX) via C₂O₂Cl₂ e dimetil aspartato (Reação 3)

Num balão de 25 mL foram adicionados 150 mg (190 μmol) da protoporfirina IX, H₂PPIX. Foi acrescentado ao meio 1 mL de DMF recém destilada e 15 mL de tetrahydrofurano, THF. A solução foi resfriada a 0 °C em banho de gelo. Após 30 min de borbulhamento de argônio, foi adicionado à mistura, gota a gota, 150 μL de cloreto de oxalila (C₂O₂Cl₂), sendo observado a liberação de gás. Após a adição de C₂O₂Cl₂ foi retirado o banho de gelo e a reação foi mantida à temperatura ambiente por 20 h. A reação foi monitorada por espectroscopia UV/Vis e CCD. Após a reação o excesso de C₂O₂Cl₂ foi eliminado por rotaevaporação à pressão reduzida. Ao balão contendo o produto sólido da reação com C₂O₂Cl₂ foram adicionados 10 mL de THF e 5 mL de Et₃N.

Simultaneamente, 300 mg do ácido aspártico dimetil éster (Acros) foram tratadas com Et₃N e observou-se a formação de um precipitado de coloração branca correspondente ao cloreto de trietilamônio.

A solução de ácido aspártico dimetil éster em Et₃N foi adicionada ao balão contendo o produto da reação com C₂O₂Cl₂ e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 24 h. A reação foi monitorada por espectroscopia UV/Vis e CCD. Após a reação o solvente foi eliminado por rotaevaporação à pressão reduzida.

O produto obtido foi solubilizado em 30 mL de DCM e transferido para um funil de separação. Foi então adicionado ao funil 45 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi isolada e o processo repetido mais 3 vezes. Foi adicionado sulfato de magnésio à fase orgânica sendo a seguir filtrada. Ao filtrado foi adicionado um excesso de éter etílico obtendo-se um precipitado. O sobrenadante e o precipitado foram separados por filtração e purificados conforme método descrito no item anterior.

A.5. Síntese da H₂(DAPPIX) via C₂O₂Cl₂ usando dimetil aspartato recém-sintetizado (Reação 4)

A formação do cloreto de acila derivado da H₂PPIX seguiu método descrito no item anterior.

Ao balão contendo o produto sólido da reação com C₂O₂Cl₂ foram adicionados 5 mL de DCM e 5 mL de Et₃N. A seguir foram adicionados 300 mg do ácido aspártico dimetil éster (recém-sintetizado, ver item A.1.) solubilizado em 2 mL de DCM:Et₃N (1:1) e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 18 h. A reação foi monitorada por CCD.

Após o final da reação foi adicionado ao meio reacional 45 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi separada e o processo repetido mais 3 vezes. Foi adicionado sulfato de magnésio à fase orgânica e esta foi filtrada após 2 h. O solvente foi então eliminado à pressão reduzida.

A.6. Síntese da H₂(DAPPIX) via SOCl₂ usando dimetil aspartato recém-sintetizado (reação 5)

Num balão de 25 mL foram adicionados 150 mg (190 μmol) da protoporfirina IX, H₂PPIX. Foi acrescentado ao meio 5 mL de SOCl₂. A solução foi mantida em temperatura ambiente durante 6 horas. A reação foi monitorada por espectroscopia UV/Vis e CCD. O excesso de SOCl₂ foi eliminado por rotaevaporação à pressão reduzida. O sólido obtido foi tratado conforme método descrito no item A.5.

A.7. Síntese da H₂(DAPPIX) via H₂PPIX dimetil éster e dimetil aspartato recém-sintetizado (reação 6).

i) Esterificação da protoporfirina IX (H₂PPIX) (SMITH, 1975):

Num balão de 10 mL contendo 5 mL de MeOH foram adicionados 100 mg da H₂PPIX. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de H₂SO₄. A reação foi monitorada por CCD. Após 4 h em agitação à temperatura ambiente a mistura foi transferida para um funil de separação de 125 mL contendo 30 mL de diclorometano. Foi adicionado

ao funil 45 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A lavagem foi repetida 4 vezes com solução saturada de bicarbonato de sódio e em seguida foi separada a fase orgânica. Foi adicionado sulfato de magnésio na fase orgânica e esta foi filtrada após 2 h. O solvente foi então eliminado à pressão reduzida.

O produto sólido da reação de esterificação foi adicionado a um balão de 10 mL contendo 2,5 mL de DCM e 2,5 mL de Et₃N. A seguir foram adicionados 300 mg do ácido aspártico dimetil éster (recentemente sintetizado) solubilizado em 2 mL de DCM:Et₃N (1:1). A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 72 h. A reação foi monitorada por CCD. O solvente foi então eliminado à pressão reduzida e substituído por MeOH. Após 24 h o MeOH foi eliminado por rotaevaporação.

O produto obtido foi solubilizado em 30 mL de DCM e transferido para um funil de separação. Foi então adicionada ao funil 45 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi retirada e o processo repetido 3 vezes. Foi adicionado sulfato de magnésio à fase orgânica e esta foi filtrada. O volume da fase orgânica foi reduzido a poucos mililitros e aplicado em uma coluna de sílica gel 60. A coluna, de 42,5 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro, foi preenchida com uma suspensão de sílica gel em DCM:MeOH 1:1 até atingir uma altura de 25 cm. Foi obtida uma fração que, após ter seu volume reduzido a alguns mililitros, foi aplicada novamente numa coluna de sílica gel 60 preenchida com uma suspensão de sílica gel em DCM:MeOH 20:3 até atingir uma altura de 15 cm. As 3 frações obtidas desta 2ª coluna de purificação foram caracterizadas por RMN-¹H.

– Resultados e Discussão

A.8. Síntese da Aspartil H₂(DAPPIX) via diciclohexilcarbodiimida (DCCI)(reação 1)

A síntese da H₂(DAPPIX) foi testada inicialmente pela reação da H₂PPIX com o ácido aspártico utilizando a DCCI como agente ativante de síntese de ligação peptídica, conforme método descrito por Jones *et al* (JONES, 1997). A reação foi acompanhada por UV/Vis e por cromatografia em camada delgada (CCD). Não houve mudança no espectro de UV/Vis durante a reação, mas foi possível identificar

a formação de um produto pela CCD. Também foi observada a presença de um precipitado escuro ao fim da reação, mas as análises por UV/Vis e por CCD indicaram tratar-se da H₂PPIX que não reagiu.

O produto obtido na síntese foi purificado por cromatografia em coluna, com um gradiente de DCM:MeOH (9:1) à DCM:MeOH (0:1) para eliminar a maior quantidade possível de impurezas. Isto foi possível pois tanto o DCCI como o aminoácido esterificado (que não reagiram) eluíam mais rapidamente na presença de DCM do que a porfirina de partida e sua derivada. Com o aumento da porcentagem de MeOH o produto da reação começou a ser eluído. A porfirina de partida só foi eluída após a adição de DMF à coluna. Foram obtidas quatro frações da coluna de purificação. No entanto, estas frações ainda se mostravam contaminadas por DCCI e por ácido aspártico. Para eliminar ambas as impurezas foi realizada a recristalização dos compostos de cada fração.

O método de recristalização envolveu primeiramente a solubilização das porfirinas em um volume mínimo de EtOH e, em seguida, acrescentou-se água ao meio. Ao aquecer a mistura o EtOH foi sendo eliminado, levando a precipitação da porfirina. A massa de porfirina obtida após a purificação da 1^a fração por recristalização foi de 165 mg (rendimento de 80 %). A 2^a e a 3^a frações obtidas da coluna de purificação não foram tratadas por conterem pequena quantidade de porfirina. Estas frações correspondiam, provavelmente, à H₂PPIX que não reagiu e derivados aspartil nos quais a reação de substituição foi incompleta.

O sólido obtido após a recristalização, foi analisado por RMN-¹H, em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira – Depto. de Química da Universidade Federal de São Carlos, e foi possível observar no espectro um único pico na região de $\delta = -3,8$ ppm, atribuído aos hidrogênios ligados aos nitrogênios pirrólicos. O deslocamento deste pico em relação àquele observado na porfirina de partida ($\delta = -4,2$ ppm) sugere que esta sofreu reação (Figura A.1).

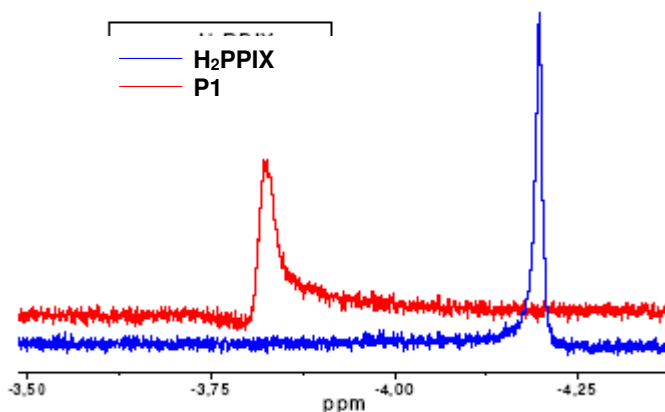


Figura A.1. RMN ^1H dos hidrogênios internos da H_2PPIX e do produto da reação (P_1) obtido após a purificação em cromatografia e recristalização, em DMSO deuterado.

Acima de 6 ppm, é possível observar tanto para a H_2PPIX como para o produto da reação (P_1) a presença de vários picos (Figura A.2.). Os primeiros, dois dupletos na região entre $\delta = 6$ e 6,5 ppm, são atribuídos aos hidrogênios ligados ao carbono primário do grupo vinila ($=\text{CH}_2$). A presença destes sinais mostra que o grupo vinila foi preservado durante a reação com o aminoácido. Para a H_2PPIX , na região de $\delta = 8,4$ ppm, é observado um multipletto referente ao hidrogênio ligado ao carbono secundário do grupo vinila ($-\text{HC}=\text{C}$). Este pico também é observado para o produto P_1 . Contudo, em $\delta = 8,5$ ppm e $\delta = 8,25$ ppm existem outros multipletos que não puderam ser atribuídos. Em $\delta = 10,1$ ppm são observados para, a H_2PPIX , 3 picos singletos que integram na proporção 1:2:1 e são atribuídos aos hidrogênios nas posições *meso* do anel porfirínico. Embora sejam quatro hidrogênios *meso*, dois são equivalentes, o que condiz com os valores de integração. Estes picos também são observados no P_1 , mas na região de $\delta = 10,2$; 10,28 e 10,36 ppm e também integram na proporção 1:2:1. Contudo, o pico em 10,2 ppm não é um singletto simples mas sim a sobreposição de 3 picos menores, o que leva à conclusão de que há pelo menos três porfirinas com vizinhanças diferentes em relação à um dos hidrogênios *meso*. Como os grupos vinílicos não foram afetados pela reação, acredita-se que este pico seja referente ao hidrogênio próximo aos grupos propiônicos que reagiram com o aminoácido.

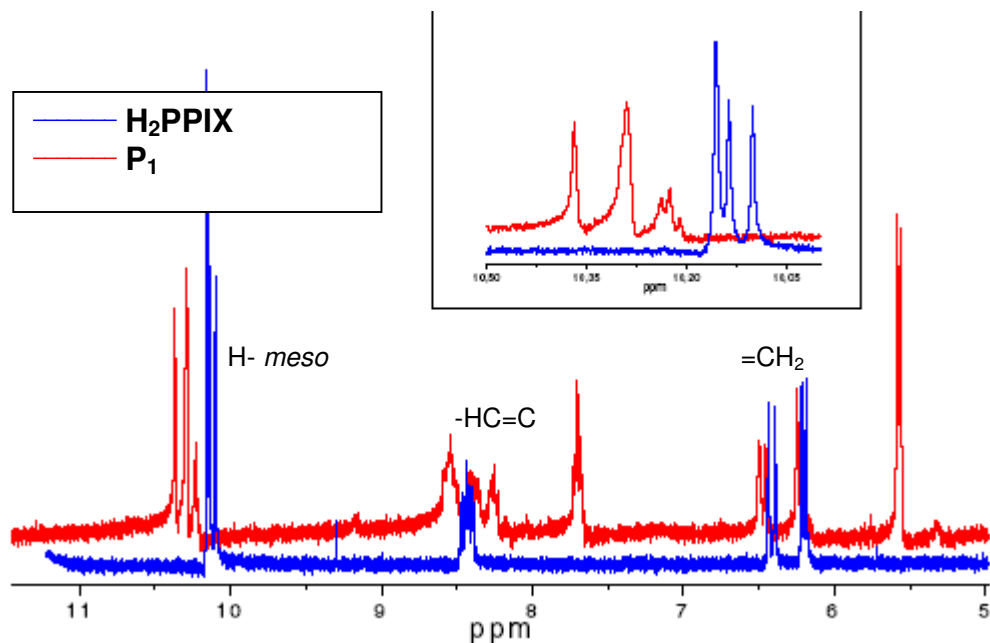


Figura A.2. RMN-¹H dos hidrogênios vinílicos da H₂PPIX e da H₂DAPPIX obtido após a purificação por cromatografia e recristalização, em DMSO deuterado – Encarte: . RMN-¹H dos hidrogenios *meso*.

Foi observado, na região entre $\delta = 5$ e 1 ppm, uma grande quantidade de picos que não puderam ser atribuídos (Figura A.3). Estes picos pertencem provavelmente à impurezas e dificultam a atribuição dos sinais da H₂DAPPIX nesta região. Acredita-se que a fonte destas impurezas tenha sido a sílica gel-60 (Acros) utilizada nas purificações por cromatografia e que ocasionou vários problemas na purificação de outros compostos sintetizados pelo grupo, em especial quando se usam solventes polares, por exemplo metanol, como eluentes.

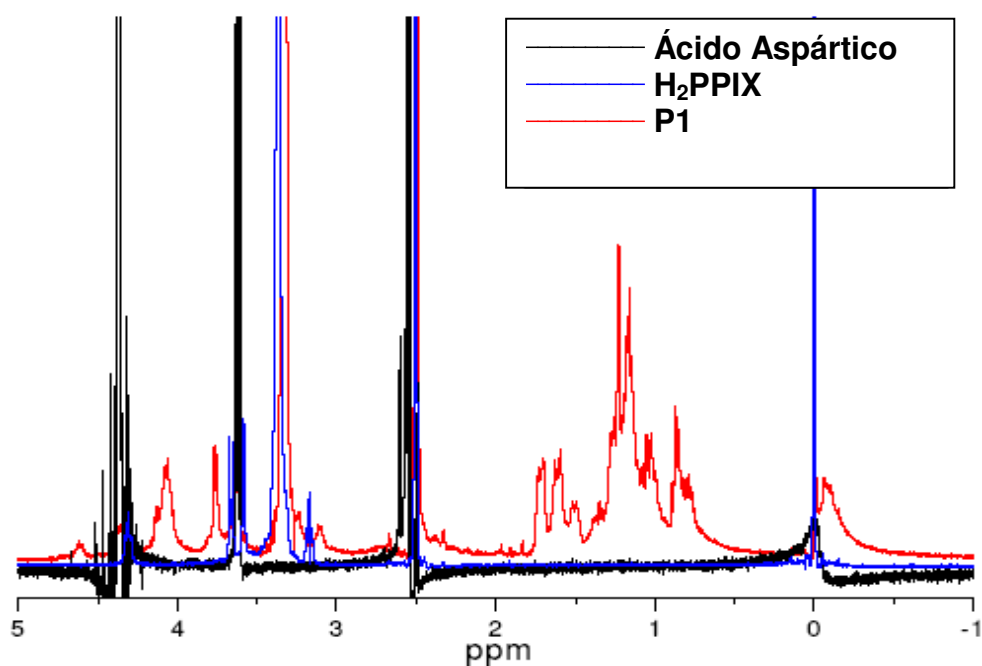


Figura A.3. RMN-¹H dos materiais de partida e do produto obtido após a purificação em cromatografia e recristalização, em DMSO deuterado.

Uma vez que a análise por RMN-¹H do produto P₁ mostrou a presença de impurezas, foi realizada uma nova etapa de purificação.

Em uma síntese anterior utilizando a FePPIX como material de partida, as frações haviam sido analisadas por ES-MS, e indicaram a presença de dicitloexiluréia, proveniente da dicitloexilcarbodiimida, como impureza. Assim, concluiu-se que esta poderia ser uma das impurezas do P₁. Decidiu-se então extrair o P₁ da mistura sólida com acetato de etila. O acetato de etila foi escolhido por ser um solvente no qual a dicitloexilurea, assim como o ácido aspártico, são pouco solúveis.

A suspensão do sólido em acetato de etila foi sonicada e, em seguida, filtrada e lavada várias vezes com acetato de etila, até que não mais fosse possível observar coloração no solvente de lavagem. O solvente foi então eliminado por rotaevaporação e o material obtido foi pesado. A massa final foi de 115 mg de produto (rendimento = 56 %).

Após a extração com acetato, o sólido foi solubilizado numa mistura de acetato de etila:éter etílico (4:1) e aplicada em coluna de sílica gel 60 (Macherey-Nagel). Foram eluídas 10 frações sendo que as principais bandas correspondiam as frações 2, 3, 5 e 10. As frações 2 e 3 foram unidas numa única fração após comparação por CCD e a juntamente com a fração 10 foram analisadas por RMN-¹H para determinar a estrutura e pureza do composto obtido. As demais frações estavam muito diluídas e não puderam ser analisadas.

Para facilitar a discussão das análises por RMN-¹H são mostradas nas Figuras A.4 e A.5 os espectros da H₂PPIX e do dimetil aspartato, respectivamente, com as estruturas e atribuições de sinais.

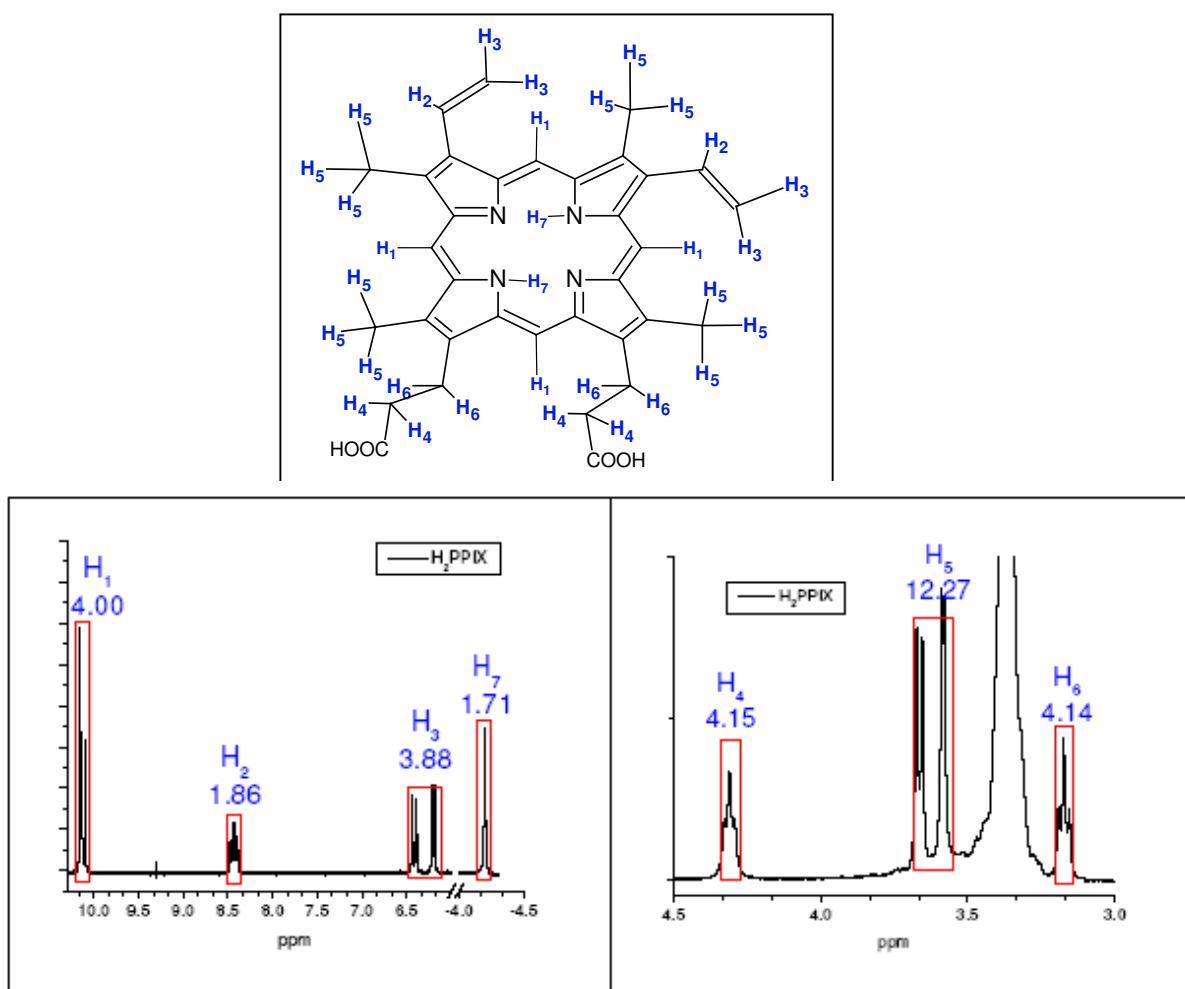


Figura A.4. Estrutura e RMN-1H da protoporfirina IX (H₂PPIX) em DMSO deuterado

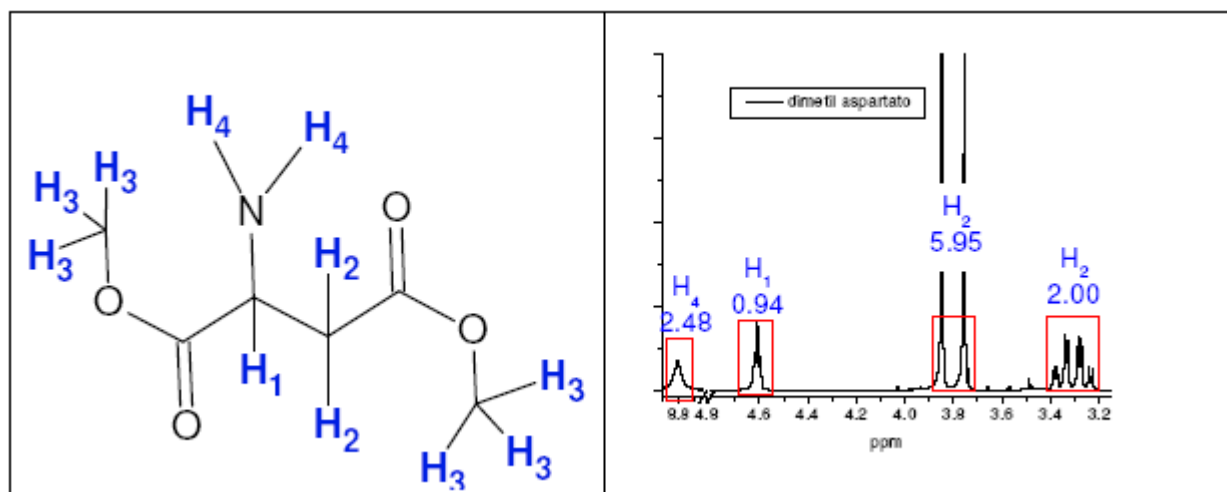


Figura A.5. Estrutura e RMN-¹H do dimetilaspártato em CDCl₃

Os espectros dessas frações, Figura A.6, não apresentaram nenhuma evidência clara de que a ligação peptídica entre a porfirina H₂PPIX e o éster do ácido aspártico foi formada. Em parte devido a permanência de impurezas nas amostras analisadas.

Embora seja possível observar na fração 1 picos referentes à porfirina (Figura A.6.A, -3,8 ppm, e ¹³C, 10,2 ppm, 8.3 ppm e 6.3 ppm) existe ainda uma grande quantidade de impurezas (Figura A.6.B) e nenhum pico apresentado pode ser atribuído ao ácido aspártico ou à ligação peptídica (multiplete esperado na região de 5 à 6 ppm, Figura A.6.D).

Com base nestes resultados conclui-se que o produto de interesse, a H₂DAPPIX, não foi obtido pela reação da H₂PPIX com o dietil éster do ácido aspártico via DCCI. Assim sendo, novas tentativas de síntese foram realizadas usando cloreto de tionila ou de oxalila para a formação do cloreto de acila derivado da H₂PPIX.

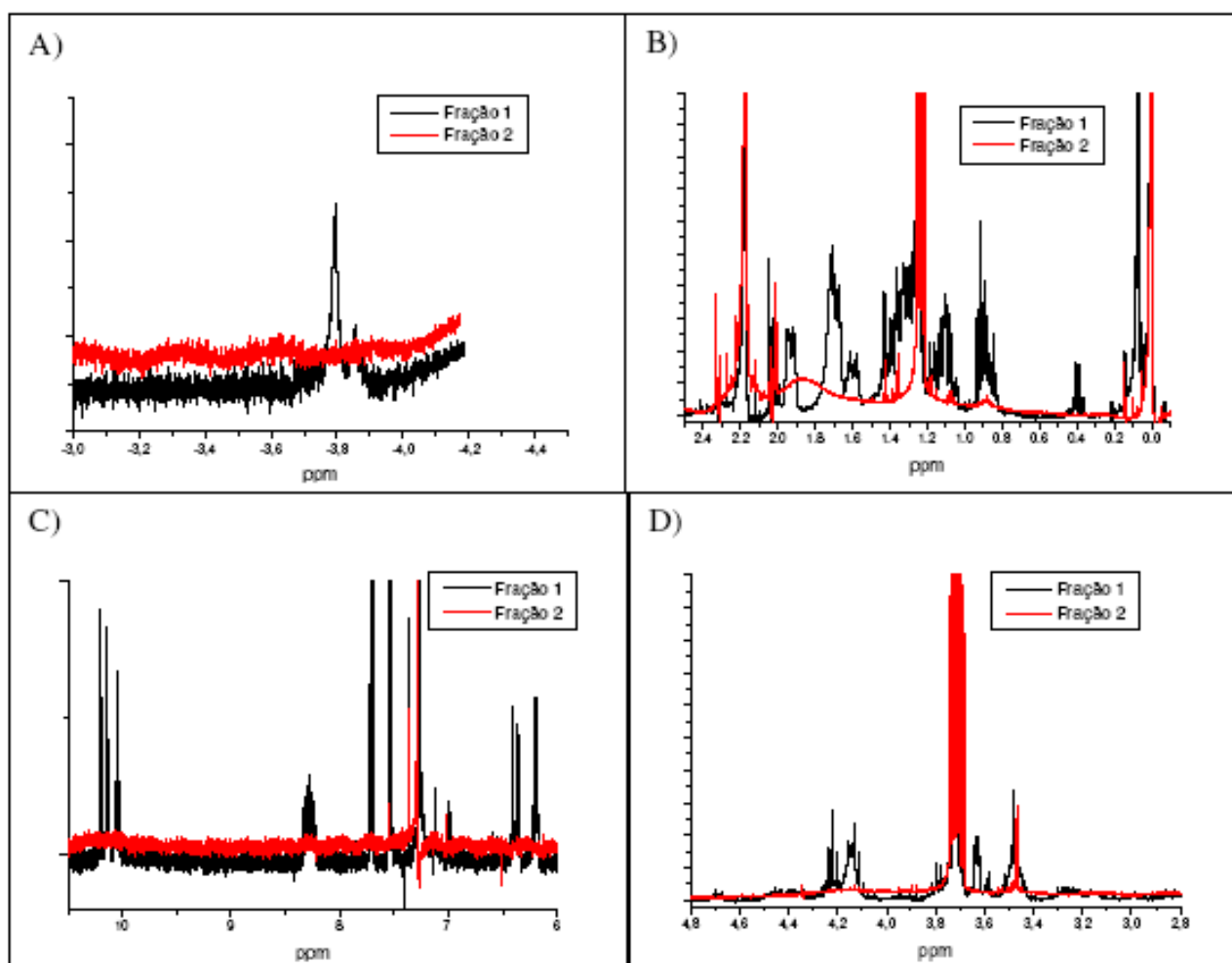


Figura A.6. RMN-¹H das frações obtidas na purificação com acetato de etila e éter etílico, em DMSO deuterado.

A.9. Síntese da H₂DAPPIX via SOCl₂ usando dimetil aspartato comercial (Reação 2)

A reação para a síntese da H₂DAPPIX foi repetida utilizando cloreto de tionila, SOCl₂, para a formação do cloreto de acila derivado da H₂PPIX. A reação de acilação foi realizada à temperatura ambiente, para impedir a decomposição da

porfirina no meio fortemente ácido do SOCl_2 , e acompanhada por CCD, a qual indicou a formação de uma fração com polaridade menor que a do produto de partida, ou seja, o cloreto de acila derivado da H_2PPIX . Ao fim da reação o SOCl_2 foi eliminado a pressão reduzida e o sólido obtido foi solubilizado em um volume mínimo de DMF, sendo em seguida adicionado o DCM.

Para reagir com o cloreto de acila derivado da H_2PPIX , o cloreto de dimetil aspartato foi dissolvido em DCM e tratado com trietilamina, para garantir que os grupos amina do ácido aspártico não estivessem protonados. O cloreto de trietilamina formado foi filtrado antes da solução do aminoácido ser adicionada para reação com a protoporfirina IX. Um excesso de Et_3N foi adicionada para neutralizar o HCl formado durante a reação com o cloreto da H_2PPIX .

O produto obtido desta reação (P_2) foi lavado com solução saturada de NaHCO_3 para viabilizar a solubilização do aminoácido e do cloreto de Et_3N na fase aquosa. A fase orgânica, contendo o produto P_2 , foi tratada com MgSO_4 para eliminar o excesso de água. A adição de éter etílico levou à formação de um precipitado, que posteriormente foi tratado com acetato de etila para solubilização dos possíveis produtos da síntese, conforme realizado no item anterior. O sobrenadante obtido após a adição do éter foi separado e o solvente eliminado. O sólido obtido foi separado para purificação posterior por cromatografia.

As duas frações obtidas da coluna cromatográfica foram analisadas por RMN- ^1H .

Os espectros obtidos para ambas as frações (Figura A.7) não apresentaram nenhum pico característico da H_2PPIX . De fato, as frações apresentaram espectros de RMN muito semelhantes, além de indicar a presença de uma grande quantidade de impurezas.

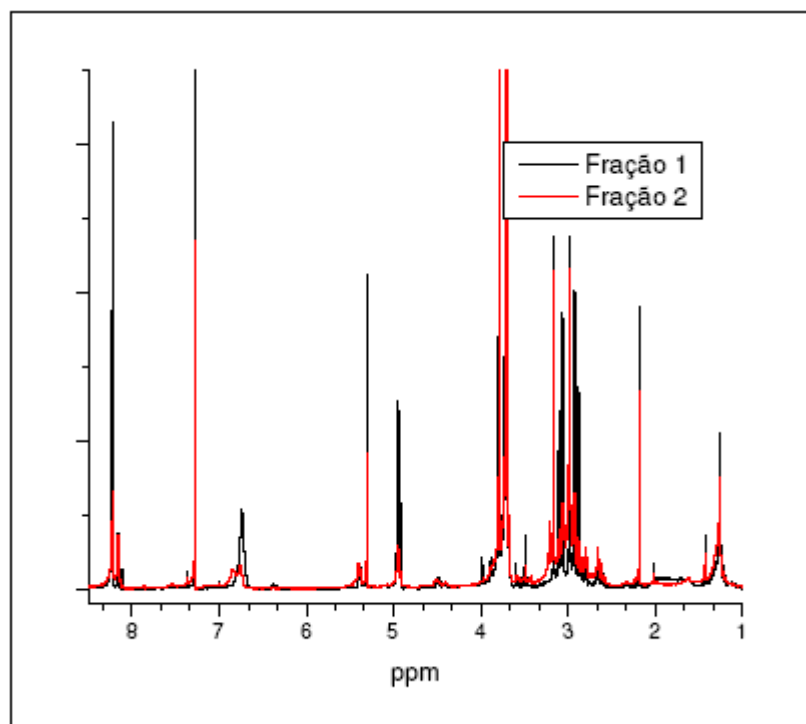


Figura A.7. RMN-¹H das frações obtidas da coluna de purificação do produto P₂, em CDCl₃

Uma vez que o produto de interesse poderia estar formando um sal com o ácido aspártico adicionado em excesso, foi realizada uma segunda purificação em que parte do produto P₂ foi aplicado em uma coluna, adicionando trietiamina ao eluente (DCM:Et₃N 10:0,01), de modo a neutralizar o aminoácido e permitir que o produto P₂ eluísse separadamente do aminoácido. As frações obtidas foram analisadas por RMN-¹H, Figura A.8.

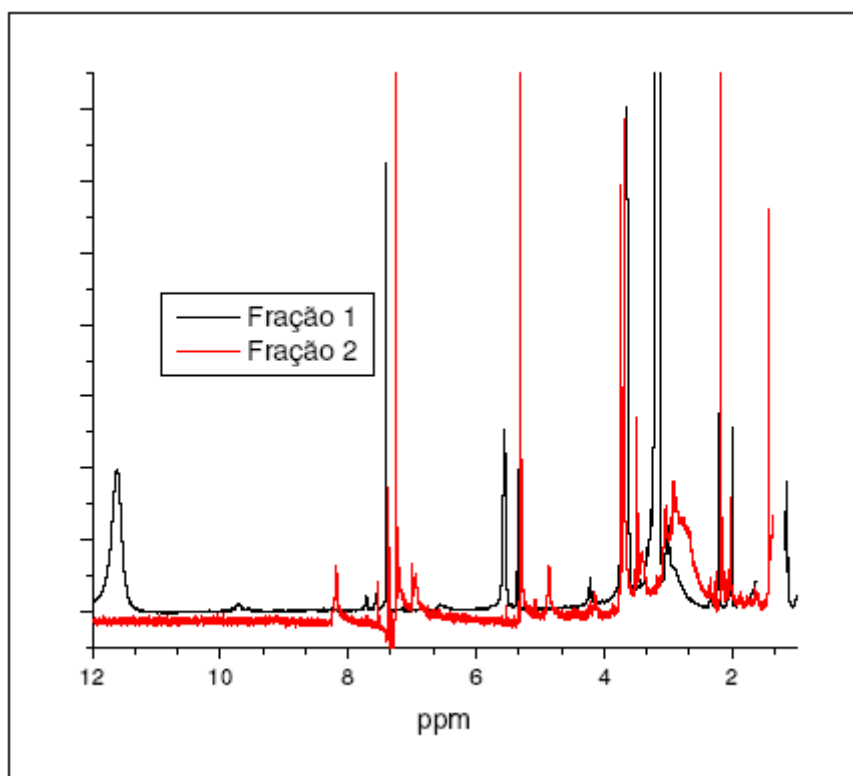


Figura A.8. RMN-¹H das frações obtidas da coluna de purificação do P₂ usando DCM:Et₃N 10:0,01, em CDCl₃

A análise por RMN-¹H das frações obtidas nesta purificação utilizando a trietilamina mostraram que, embora diferentes entre si, nenhuma delas se tratava do produto de interesse.

O solvente das frações recolhidas da coluna de purificação foram eliminados por rotaevaporação e tratado com acetato de etila, conforme mencionado no item anterior. A suspensão do sólido em acetato de etila foi sonicada e, em seguida, filtrada e lavada várias vezes com acetato de etila, até que não mais fosse possível observar coloração no solvente de lavagem. O solvente do sobrenadante foi então eliminado por rotaevaporação e o material obtido foi pesado. O sólido obtido foi aplicada em coluna, sendo recolhidas duas frações, que foram analisadas por RMN-¹H, Figura A.9 e A.10.

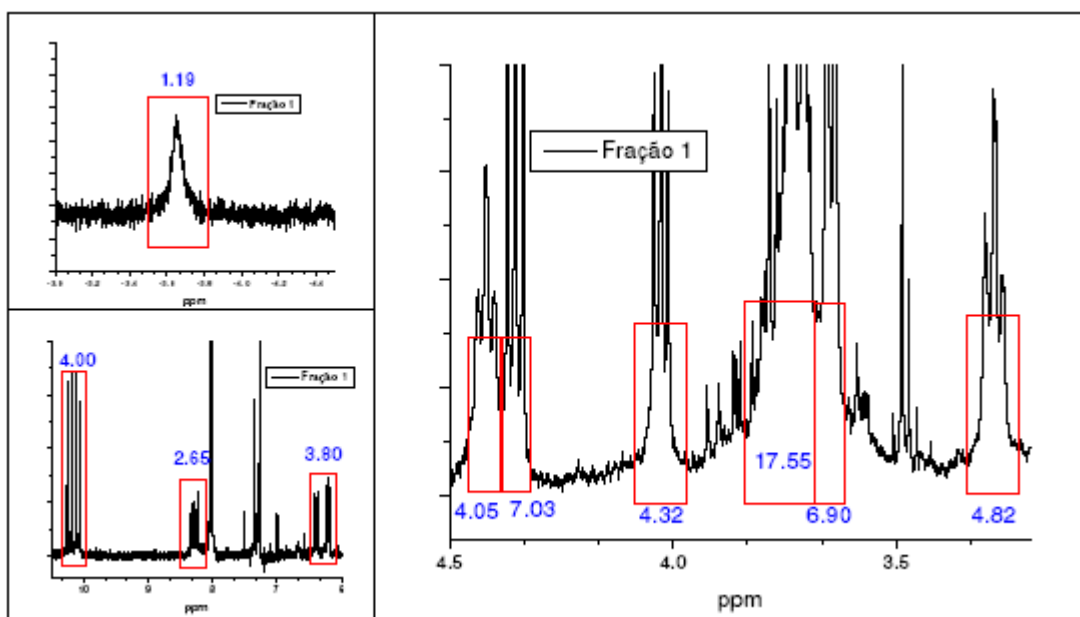


Figura A.9. RMN-¹H da fração 1 obtidas purificação por cromatografia do sólido obtido pela extração com acetato de etila, em CDCl₃

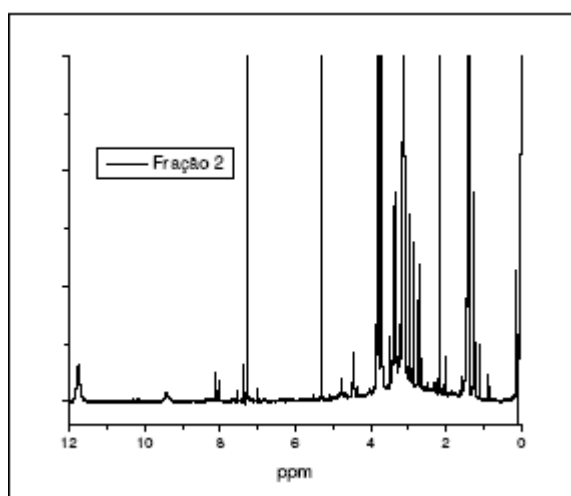


Figura A.10. RMN-¹H da fração 2 obtidas purificação por cromatografia do sólido obtido pela extração com acetato de etila, em CDCl₃

A fração 1 apresentou vários picos referentes à H₂PPIX de partida e ao ácido aspártico. Contudo, as integrais obtidas no espectro de RMN da Figura A.9 não correspondem as esperadas para o produto de interesse. Isto pode ser afirmado especialmente pela presença dos picos próximos a 4,5 ppm. Nesta região se encontra o pico do hidrogênio ligado ao carbono terciário do aminoácido. Em caso de reação completa, este pico deveria integrar um valor igual a 2, um para cada

aminoácido ligado, contudo os dois picos nesta região possuem integrais muito maiores, 4 e 7, permitindo afirmar que a fração 1 é de fato apenas uma mistura dos dois compostos e não o produto desejado.

A fração 2 não apresenta nenhum pico referente à porfirina H₂PPIX. Com base nestes resultados concluiu-se, uma vez mais, que não se obteve a porfirina aspartil substituída desejada, H₂DAPPIX, e a síntese foi repetida usando cloreto de oxalila ao invés do cloreto de tionila. A idéia de utilizar este reagente para sintetizar o cloreto de acila originou-se das discussões com o Prof. John R. Lindsay Smith, da Universidade de York, York, Inglaterra, quando da sua visita em nosso laboratório, em setembro de 2003. Concluiu-se dessas discussões, que a dificuldade em se obter a porfirina aspartil substituída poderia ser devido à dificuldade de síntese do cloreto de acila puro.

A.10. Síntese da H₂DAPPIX via C₂O₂Cl₂ usando ac. aspártico dimetil éster comercial (reação 3)

A reação para a síntese da H₂DAPPIX foi repetida utilizando cloreto de oxalila, C₂O₂Cl₂, para a formação do cloreto de acila derivado da H₂PPIX. Os 150 mg de H₂PPIX foram solubilizados num volume mínimo de DMF e, após 10 minutos de agitação, para garantir completa dissolução, foi adicionado tetrahydrofurano (THF) e a reação resfriada a 0°C em banho de gelo. O cloreto de oxalila foi adicionado gota à gota, sendo observada a liberação de gás (CO₂).

Uma das principais vantagens do cloreto de oxalila sobre o SOCl₂ é que o primeiro libera principalmente CO₂ enquanto o segundo libera SO₂ e HCl. Conseqüentemente, as condições reacionais são menos drásticas com o cloreto de oxalila e a possibilidade de degradação da porfirina é menor. Outra grande vantagem é que o cloreto de oxalila pode ser obtido de fornecedores brasileiros enquanto a compra de cloreto de tionila é bastante difícil, devido ao controle deste reagente pelo governo.

A reação, acompanhada por CCD, indicou a formação de uma fração com polaridade menor que a do produto de partida. Ao fim da reação o DCM e o excesso de C₂O₂Cl₂ foram eliminados a pressão reduzida.

A reação com o éster do ácido aspártico foi realizada conforme descrito no item anterior, com apenas uma modificação: em vez de DCM puro a reação foi realizada em DCM:THF (1:1).

Após a recristalização (ver item anterior) parte do produto foi purificado em uma coluna de sílica gel 60. As frações obtidas foram analisadas por RMN-¹H.

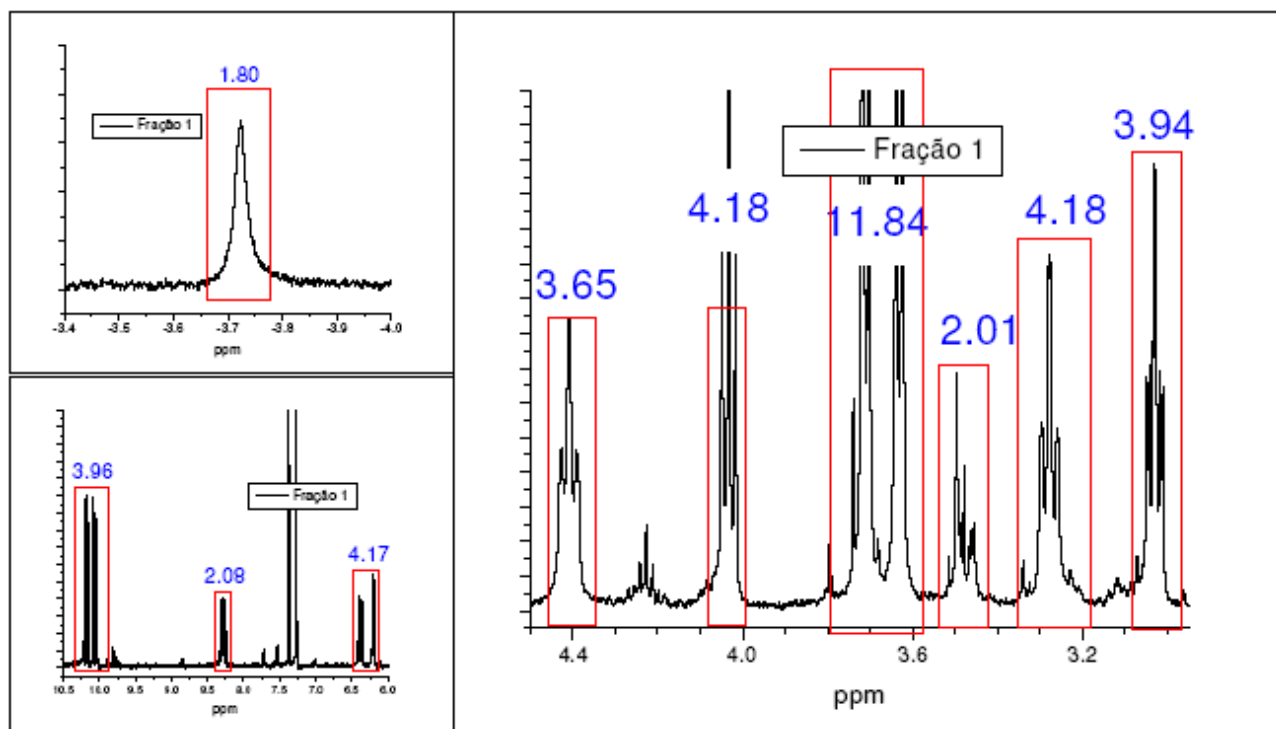


Figura A.11. RMN-¹H das fração 1 obtida da coluna de purificação do produto da reação 3 (P₃), em CDCl₃

A fração 1 apresentou grande solubilidade em acetona, e vários picos característicos da H₂PPIX: 4 singletos em 10 ppm, um multipletto em 8.2 ppm, dois dupletos entre 6 e 6.5 ppm, um triplete em 4.4 ppm e outro triplete em 3.3 ppm, além do picos entre 3.6 e 3.8 ppm referentes aos grupos metila; e ao aminoácido: tripletos em 4 ppm e um duplo dupletto em 3 ppm (Figura A.11). Contudo, alguns picos importantes, que caracterizariam o produto de interesse, não foram observados, como os singletos na região entre 3 e 4 ppm e o multipletto na região entre 5 e 6 ppm. A ausência dos picos referentes aos grupos metila (singletos na região entre 3 e 4 ppm) pode ser explicada pela hidrólise da ligação éster. Foi observado um multipletto em 3.5 ppm, cuja integral (2.01) é aquela esperada para o pico referente

ao hidrogênio ligado ao carbono terciário do aminoácido. Contudo, este multipletto é esperado na região entre 5 e 6 ppm.

Para uma melhor caracterização da fração 1 foi realizada uma análise por COSY(^1H , ^1H). A técnica de COSY(^1H , ^1H) permite apontar com qual hidrogênio “H_A” um hidrôgenio “H_B” está acoplado. Esta técnica permite assim uma melhor caracterização do produto.

A análise do espectro de COSY(^1H , ^1H) indicou que os picos atribuídos ao aminoácido não acoplam entre si mas sim com um pico na região de 1 ppm (Figura A.12). O pico em 3.5 ppm também não acopla com nenhum dos picos observados. Este resultado permite concluir que a fração 1 é de fato a H₂PPIX de partida, contaminada por impurezas.

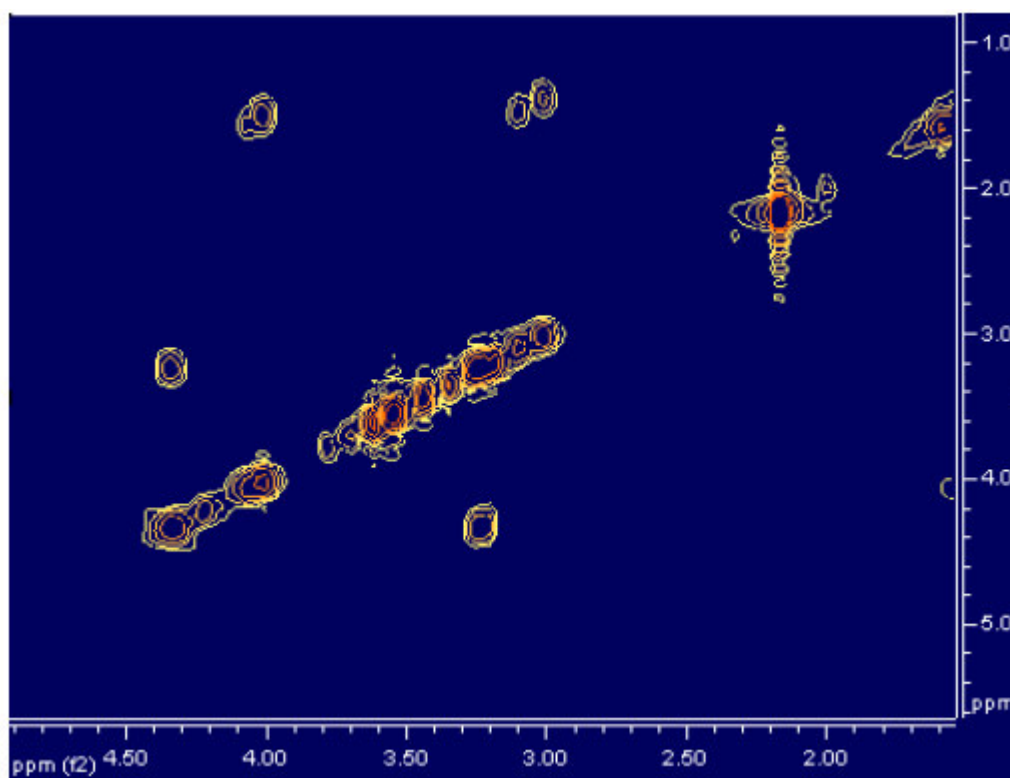


Figura A.12. Espectro de COSY(^1H , ^1H) da fração 1 obtida da coluna de purificação do produto da reação 3 (P₃), em CDCl₃

Além da fração 1, as frações 2 e 4 também foram analisadas por RMN- ^1H . Também foi analisado o precipitado formado durante a recristalização com éter etílico, para verificar se o produto de interesse estava presente neste sólido. Parte

do precipitado foi solubilizado em EtOH, isolado e, novamente solubilizado em clorofórmio deuterado. A parte insolúvel foi solubilizada em DMSO deuterado e também analisada. Os espectros obtidos são apresentados a seguir, Figuras A.13-A.16.

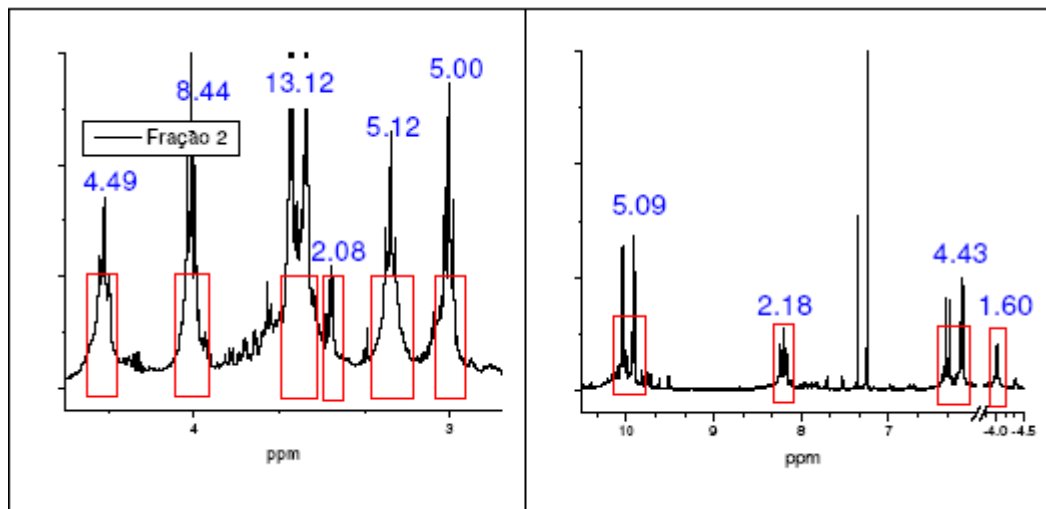


Figura A.13. RMN-¹H da fração 2 da coluna de purificação do P₃, em CDCl₃

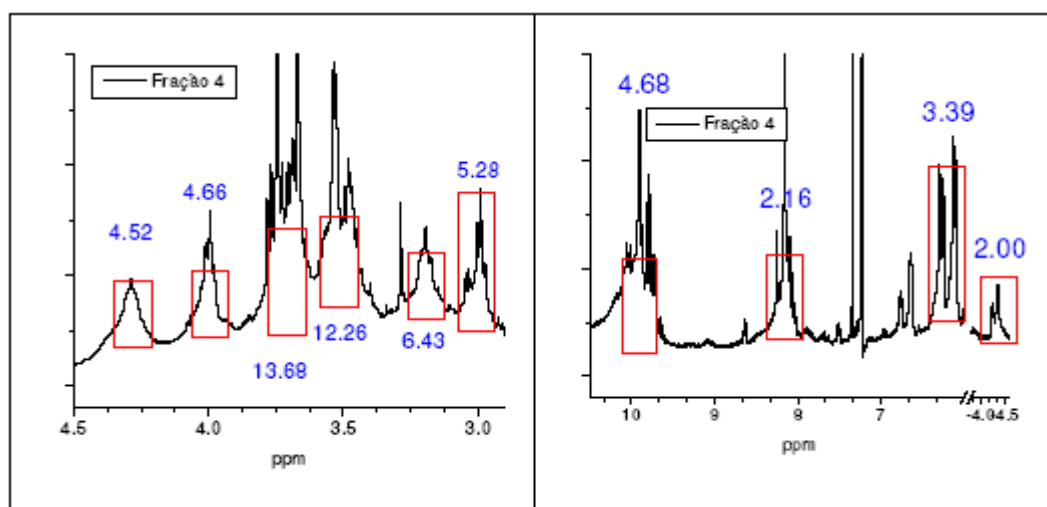


Figura A.14. RMN-¹H da fração 4 da coluna de purificação do P₃, em CDCl₃

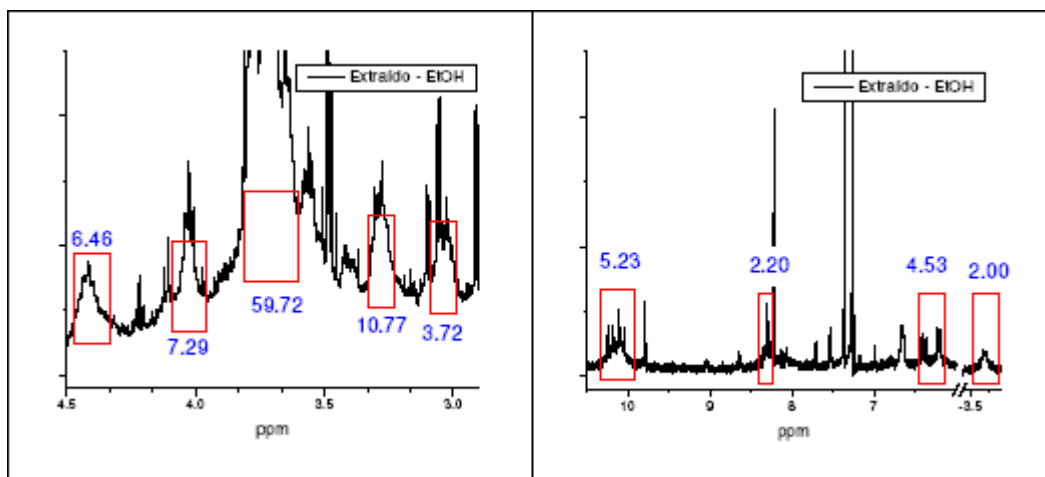


Figura A.15. RMN-¹H da fração solúvel em EtOH da coluna de purificação do P₃, em CDCl₃

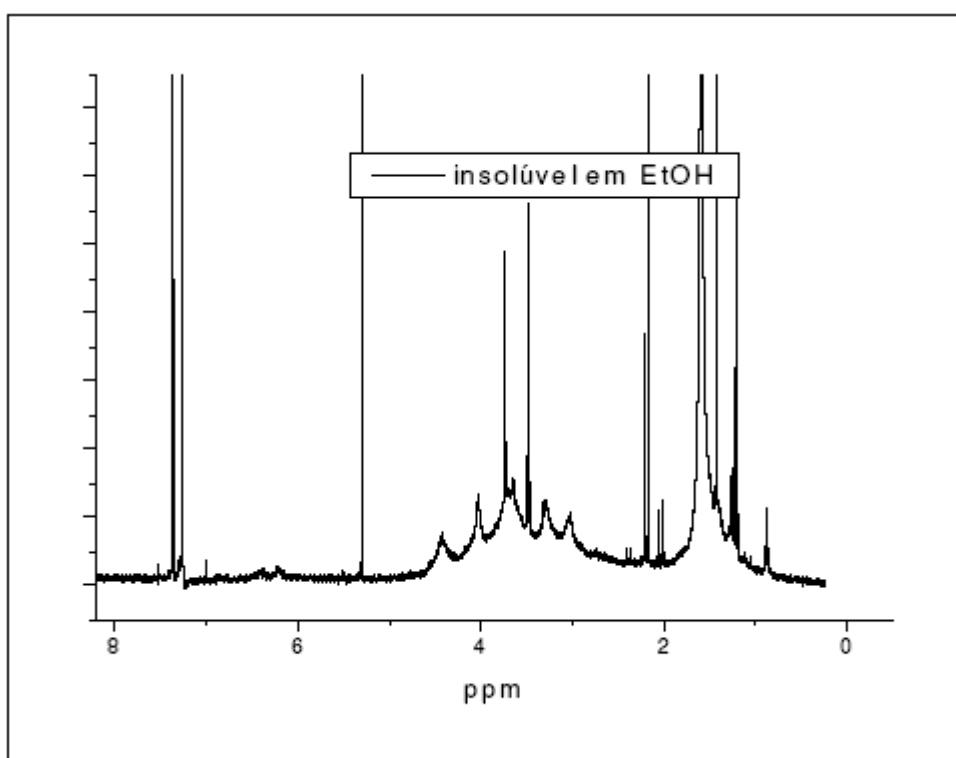


Figura A.16. RMN-¹H da fração insolúvel em EtOH obtida na purificação do P₃, em CDCl₃

Observa-se nos espectros das Figuras A.13 à A.16 que:

- A fração 2 apresenta os mesmos picos que a fração 1 mas com valores de integrais diferentes (Figura A.13). Também é possível observar dois picos de diferentes intensidades na região próxima a -4 ppm, que são característicos dos hidrogênios internos do anel porfirínico, o que permite concluir que a fração é composta aparentemente por duas porfirinas diferentes.

- A fração 4 apresenta uma grande quantidade de impurezas, ainda maior que as frações anteriores, como pode ser observado pelos picos pouco resolvidos da Figura A.14.

- O material extraído com etanol do precipitado da recristalização apresenta uma pequena quantidade de porfirina, mas é constituído principalmente por impurezas;

- O material insolúvel em etanol é formado unicamente por impurezas, podendo ser desprezado.

As observações acima mostram que apenas um composto foi obtido, cujo espectro apresenta os picos e integrais correspondentes à H₂PPIX. As diferenças de solubilidade e deslocamento podem ser atribuídas a formação da ligação iônica entre a porfirina com o aminoácido. As diferentes frações obtidas corresponderiam às diferentes proporções do sal, que pode ser formado por uma molécula de porfirina e uma ou duas de aminoácido.

Portanto, o produto de interesse, a H₂DAPPIX, não havia sido obtido.

A.11. Síntese da H₂DAPPIX via C₂O₂Cl₂ e SOCl₂ usando ácido aspártico dimetil éster recém-sintetizado (reações 4 e 5)

A.11.i - Síntese do dimetil aspartato

Inicialmente, por sugestão do Prof. Pelisson, da Universidade do Vale do Paraíba, foi realizada a síntese do derivado dimetil éster do ácido aspártico, uma vez que o éster formado é altamente higroscópico e, após algum tempo de armazenamento poderia se tornar muito hidratado. Esta água de hidratação, ao reagir com o cloreto de acila da H₂PPIX, poderia desativar a porfirina para a próxima

etapa da reação, isto é, a ligação propriamente dita com o aminoácido, desfavorecendo, ou até impedindo, a formação do produto.

A reação de esterificação foi assim realizada na mesma semana em que as reações de síntese da H₂DAPPIX, para garantir que o éster formado não estivesse hidratado. A esterificação foi feita em MeOH na presença de um excesso de SOCl₂, conforme descrito na parte experimental e, após eliminação do solvente, ocorreu a formação de um sólido branco com alta solubilidade em DCM, indicando a completa conversão do aminoácido, insolúvel em meio orgânico, no derivado éster.

O sólido foi mantido em dessecador para evitar a hidratação.

A.11.ii. Síntese da H₂(DAPPIX) via C₂O₂Cl₂ e via SOCl₂

A reação de síntese da H₂DAPPIX via C₂O₂Cl₂ foi realizada conforme descrito no item A.5, sendo utilizado o éster recentemente sintetizado e DCM:Et₃N como solvente da reação (reação 4). O monitoramento por CCD, utilizando como eluente a mistura de THF:hexano:DMF (7:2:1), indicou a formação de três produtos mas com um rendimento total muito baixo. Por este motivo a síntese foi repetida usando desta vez SOCl₂ para a formação do cloreto de acila (reação 5).

Seguiu-se método descrito no item A.6. e utilizando o éster recentemente sintetizado e DCM:Et₃N como solvente. Observou-se por CCD a formação de vários produtos, os quais foram purificados seguindo o mesmo procedimento descrito no item A.9. Também neste caso obteve-se um rendimento muito baixo.

Com base nos resultados de todas estas sínteses concluiu-se que, o principal problema para obtenção da H₂DAPPIX era a etapa de formação do cloreto de acila. O mesmo foi observado para outra porfirina natural, a mesoporfirina, que sofria degradação no ambiente fortemente ácido formado na presença do SOCl₂ (COLLMAN, 1980). Em ambas as sínteses usando o SOCl₂ e C₂O₂Cl₂ não houve uma evidência clara de que o derivado cloreto de acila estava sendo formado. Embora as análises por CCD indicassem a presença de um novo produto, este poderia ser apenas a porfirina protonada (ou um produto de degradação) e não o derivado cloreto.

IV.7.E. Síntese da H₂(DAPPIX) via H₂PPIX dimetil éster e dimetil aspartato recém-sintetizado (reação 6).

Uma vez que a formação do cloreto de acila apresentou problemas, resolveu-se alterar a rota de síntese, ao invés de preparar o cloreto de acila, a H₂PPIX foi convertida em seu dimetil éster para, em seguida, reagir com o dimetil aspartato e levar à formação da amida. A aminólise de éster é um procedimento simples, em que o éster é misturado com a amina e deixada em temperatura ambiente até a conversão em amida. O rendimento e a cinética da reação são dependentes do solvente, do grupo R do éster e do grau de substituição de ambos, nitrogênio da amina e o carbono alfa da amina. As condições ótimas envolvem solventes próticos, metil e fenil ésteres e aminas pouco substituídas (BALTZLY et al., 1950; ARNETT et al., 1950; GORDON et al., 1949).

A esterificação foi realizada em etanol com 5% de ácido sulfúrico, para evitar a hidrólise dos grupos vinílicos presentes na H₂PPIX, que tendem a ocorrer quando se usa o HCl na esterificação (SMITH, 1975). A reação foi realizada à temperatura ambiente e foi monitorada por CCD e UV/Vis. Após 2 h a reação foi interrompida e neutralizou-se o meio com bicarbonato de sódio. A neutralização é importante para impedir que durante a eluição ocorra a hidrólise do éster formado, ou ainda, dos grupos vinílicos, além de eliminar o excesso de reagente.

A análise do produto da esterificação por CCD mostrou que este possuía um R_f próximo a 1 (em placa de sílica e DCM:MeOH 10:0,1) enquanto que a H₂PPIX não eluía do ponto de aplicação.

Ao fim da reação, 30 mL de DCM foram adicionados, e a fase orgânica lavada com solução saturada de NaHCO₃ para eliminar o excesso de ácido, em seguida a fase orgânica foi tratada com MgSO₄ para eliminar o excesso de água. O sólido obtido apresentou grande solubilidade em DCM, MeOH e em tolueno, diferente da H₂PPIX que geralmente tem baixa ou nenhuma solubilidade nestes solventes. Pode-se concluir então que a fração 1 correspondia à porfirina esterificada. O sobrenadante foi separado e o solvente eliminado, o sólido obtido foi separado para reação com o aminoácido.

A reação foi iniciada solubilizando o produto da esterificação em DCM:Et₃N 1:1, seguida da adição da solução do aminoácido. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 48 h e acompanhada por CCD. Como não se observava a formação de produto, o solvente foi eliminado à pressão reduzida e o material foi solubilizado em MeOH e mantido em temperatura de refluxo por mais 48 h. O produto obtido, P₆, foi lavado com solução saturada de NaHCO₃, como descrito anteriormente e separado para purificação por cromatografia.

A purificação foi feita em coluna de silica-gel utilizando como eluente DCM:MeOH 1:0,1. Foram obtidas 4 frações sendo a primeira a mais concentrada.

A análise da fração 1 por RMN-¹H indicou que o produto de interesse não foi obtido, sendo a fração constituída unicamente pelo éster de partida. Isto pode ser concluído pela presença dos singletos em 3.6 ppm, cuja integral 6 corresponde aos hidrogênios dos grupos CH₃ do éster, Figura A.17.

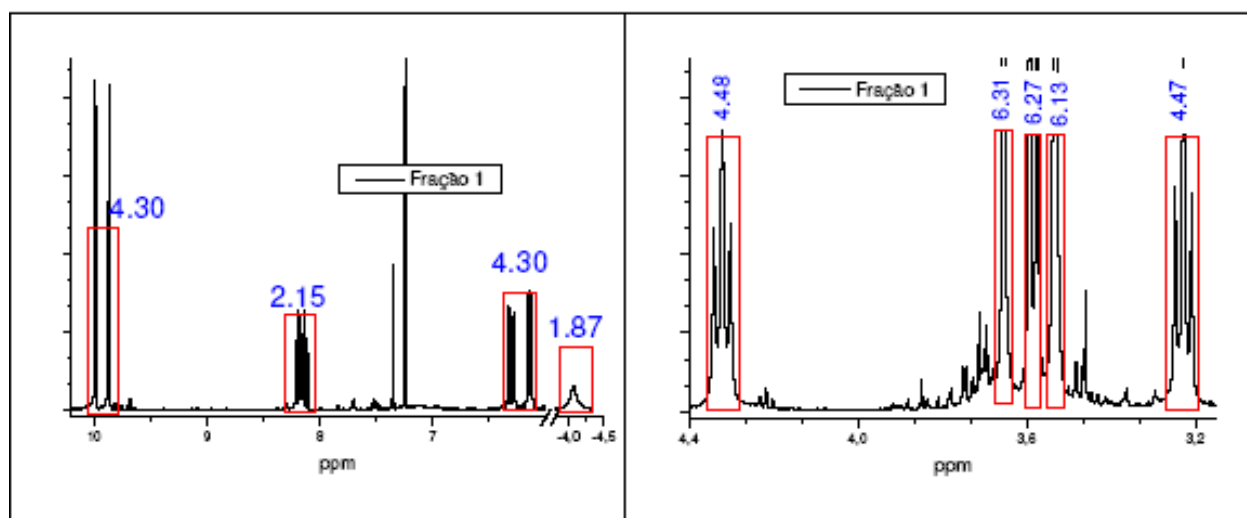


Figura A.17. RMN-¹H da fração 1 obtida da coluna de purificação do produto P₆, em CDCl₃

VI. REFERÊNCIAS

ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. **Purification of Laboratory Chemicals**, 4 ed. Oxford: Ed. Sbutterworth Heinemann, 1997. Cap. 4.

ARNETT. E. McC.; MILLER, J. G.; DAY, A. R. Effect of Structure on Reactivity.1 III. Aminolysis of Esters with Primary Amines2 . **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 72, p. 5635-5638, 1950.

ASSIS, M. D.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y.; NASCIMENTO, O. R. An EPR and electronic spectroscopy study of intermediates in a mono *o*-nitro substituted iron porphyrin reaction with iodosylbenzene. **Inorg. Chim. Acta**, vol.187, p 107-114, 1991.

BACCAN N.; ANDRADE J. C.; GODINHO O. E. S.; BARONE J.S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. Campinas: Ed. Edgar Blücher, 1984.

BALTZLY, R.; BERGER, I. M.; ROTHSTEIN, A. A. The Aminolysis of Esters. A Preliminary Study. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 72, p. 4149-4152, 1950.

BASSOLI, A.; DI GREGORIO, G. , RINDONE, B.; TOLLARI, S.; CHIOCCARA, F. Metal complex-catalysed phenol coupling of phenolic benzyloquinoline alkaloids **J. Mol. Catal.**, vol. 53, p. 173-178, 1989.

BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic Chemical Catalysts in the Oxidative Activation of Drugs. **Adv. Synt. & Catal.**, vol. 346, p. 171-184, 2004.
BERTZ R.J.; GRANNEMAN G.R. Use of in vitro and in vivo data to stimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. **Clin. Pharmacokinet.**, vol. 32, p. 210-258, 1997.

BHAKTA, M. N.; WIMALASENA, K. Microsomal P450-Catalyzed N-Dealkylation of *N,N*-Dialkylanilines: Evidence for a C-H Abstraction Mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 124, p. 1844-1845, 2002.

CANAL CIÊNCIA. Brasília: Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia, 2003. Disponível em <<http://www.canalciencia.ibict.br>>. Acesso em 10 ago. 2005

CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a gás**. São Paulo: ED. EDGARD BLÜCHER LTDA, 1985. CAP. 8

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução à métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1997. Cap. 8 e cap. 9.

COLLMAN J. P.; DENISEVICH, PETER; KONAI, Y.; MARROCCO, MATT; KOVAL, CARL; ANSON, F. C. Electrode catalysis of the four-electron reduction of oxygen to water by dicobalt face-to-face porphyrins. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 102, p. 6027-6036, 1980.

CONSTANTINIDIS, I.; SATTERLEE, J. D. UV-visible and carbon NMR studies of chloroquine binding to urohemin I chloride and uroporphyrin I in aqueous solutions. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 110, p. 4391-4395, 1988.

CONSTANTINIDIS, I.; SATTERLEE, J. D. UV-visible and carbon NMR studies of quinine binding to urohemin I chloride and uroporphyrin I in aqueous solution . **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 110, p. 927-932, 1988.

COOKE, PAUL R.; LINDSAY-SMITH, J. R. Alkene epoxidation catalysed by iron(III) and manganese(III) tetraarylporphyrins coordinatively bound to polymer and silica supports. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 1913, 1994.

CRAIG, J. C.; BHARGAVA, H. N.; EVERHART, E. T.; LABELLE, B.; OHNSORGE, U.; WEBSTER, R. V. Absolute configuration of the enantiomers of 7-chloro-4-[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (chloroquine). **J. Org. Chem.**, vol. 53, p 1167 – 1170, 1988.

DENISOV, I. G.; MAKRIS, T. M.; SLIGAR, S. G. ; SCHLICHTING, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450 **Chem. Rev.**, vol.105, p. 2253-2278, 2005.

DIOS, A. C.; TYCKO, R.; URSOS, L. M. B.; ROEPE, P. D. NMR Studies of Chloroquine-Ferriprotoporphyrin IX Complex. **J. Phys. Chem. A.**, vol. 107, p. 5821-5825, 2003.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G.; XIE, L. Y. Polyhaloporphyrins: Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations. **Acc. Chem Res.**, vol. 30, p 251 – 259, 1997.

DRAKE, N.L.; CREECH, H.J.; DRAPER, D.; GARMAN, J.A.; HAYWOOD, S.; PECK, R.M.; WALTON, E.; VAN HOOK, J.O. Synthetic Antimalarials. The Preparation and Properties of 7-Chloro-4-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)-quinoline (SN-7618) **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 68, p.1214-1216, 1946.

EGAN, T.J.; MAVUSO, W.W.; ROSS, D.C.; MARQUES, H.M. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. **J. Inorg. Biochem.**, vol. 68, p. 137-145, 1997.

EGAN, T.J.; NCOKAZI, K.K. Effects of solvent composition and ionic strength on the interaction of quinoline antimalarials with ferriprotoporphyrin IX. **J. Inorg. Biochem.**, vol. 98, p 144-152, 2004.

EVANS, S.; LINDSAY-SMITH, J.R. The oxidation of ethylbenzene and other alkylaromatics by dioxygen catalysed by iron(III) tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin and related iron porphyrins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p. 1541 – 1551, 2000.

FAJER J. Mysteries of porphyrin chemistry. **Chem. & Ind.**, p. 869-873, 1991.

FARIA, A.L; AIROLDI, C.; DORO, F.G.; FONSECA, M.G.; ASSIS, M.D. Anchored ironporphyrins - the role of talc-aminofunctionalized phyllosilicates in the catalysis of oxidation of alkanes and alkenes. **Appl. Catal. A: Gener.**, vol. 268, p. 217-226, 2004.

FEITERS, M.C.; ROWAN, A.E.; NOLTE, R.J.M. From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 29, p. 375-384, 2000.

FLEISCHER, E.B.; PALMER, J.M.; SRIVASTAVA, T.S.; CHATTERJEE, A. Thermodynamic and kinetic properties of an iron-porphyrin system. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 93, p. 3162-3167, 1971.

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. **Pharmacol. Ther.**, vol. 79, p. 55-87, 1998

FONTAINE, F.; SOUSA, G.; BURCHAM, P. C.; DUCHÊNE, P.; RAHMANI, R. Role of cytochrome P450 3A in the metabolism of mefloquine in human and animal hepatocytes. **Life Sci.**, vol. 66, p. 2193-2212, 2000.

GONZALEZ, F.J. Human cytochromes P450: problems and prospects. **Trends in Pharmacol. Sci.**, vol. 13, p.346-352, 1992.

GOTARDO, M.C.A.F.; GUEDES, A.A.; SCHIAVON, M.A.; JOSÉ, N. M.; YOSHIDA, I.V.P.; ASSIS, M.D. Polymeric membranes: the role this support plays in the reactivity of the different generations of metalloporphyrins. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 229, p. 137-143, 2005.

GROVES, J.T.; NEMO, T.E.; MYERS, R.S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 101, p. 1032-1033, 1979.

GROVES, J.T.; KRUPER JR, W.J. Preparation and characterization of an oxoporphinatochromium(V) complex. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 101, p. 7613-7615, 1979.

GUNTER, M.J.; TURNER, P. Metalloporphyrins as models for the cytochromes p-450. **Chem. Rev.**, vol. 108, p. 115-16, 1990.

GUO, C.; HUANG, G.; ZHANG, X.; GUO, D. Catalysis of chitosan-supported iron tetraphenylporphyrin for aerobic oxidation of cyclohexane in absence of reductants and solvents. **Appl. Catal. A: Gener.**, vol. 247, p. 261-26, 2003.

GORDON, M.; MILLER, J.G.; DAY, A.R. Effect of Structure on Reactivity.1 II. Influence of Solvents on Ammonolysis of Esters. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 71, p. 1245-1250, 1949.

HAWLEY S.R.; BRAY P.G.; PARK B.K.; WARD S.A. Amodiaquine accumulation in Plasmodium falciparum as a possible explanation for its superior antimalarial activity over chloroquine. **Mol. and Biochem. Parasitol.** Vol. 80, pp. 15-25. 1996.

HOUZÉ P.; REYNIES, A.; BAUDM, F.J.; BENATAR, F.; PAYS, M. Simultaneous determination of chloroquine and its three metabolites in human plasma, whole blood and urine by ion-pair high-performance liquid chromatography. **J, Chromatogr. B.**, vol. 574, p. 305-312, 1992.

KARKI, S. B.; DINNOCENZO, J. P.; JONES, J. P.; KORZEKWA, K. R. Mechanism of Oxidative Amine Dealkylation of Substituted N,N-Dimethylanilines by Cytochrome P-450: Application of Isotope Effect Profiles. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 117, p. 3657-3664, 1995.

KESERU, G. M.; BALOGH, G.; CZUDOR, I.; KARANCSI, T.; FEHER, A.; BERTOK, B. Chemical Models of Cytochrome P450 Catalyzed Insecticide Metabolism. Application to the Oxidative Metabolism of Carbamate Insecticides. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 47, p. 762-769, 1999.

KIM, J.B.; LEONARD, J.J.; LONGO, F.R. Mechanistic study of the synthesis and spectral properties of meso-tetraarylporphyrins. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 94, p. 3986-3992, 1972.

KITTUR F.S., PRASHANTH K.V.H., SANKAR K.U., THARANATHAN R.N., Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydr. Polym.**, vol. 49, p. 185-193, 2002.

KLINGENBERG, M. Pigments of rat liver microsomes. **Arch. Biochem. Biophys.**, vol. 75, p. 376-386, 1958.

JONES, J. **Amino acid and peptide synthesis**. New York: Oxford University Press, 1997.

KUMAR, M. N.V. R., A review of chitin and chitosan applications. **Reac. and Func. Polym.**, vol. 46, p 1-27, 2000.

LIPPARD S.J.; BERG, J.M. **Principles of bioinorganic chemistry**. University Science Book, 1994.

LEADBEATER, N. E.; MARCO, M. Preparation of Polymer-Supported Ligands and Metal Complexes for Use in Catalysis. **Chem. Rev.**, vol. 102, p. 3217-3274, 2002.

LEE, K. Y.; JO, W. H.; KWON, I. C.; KIM, Y.-H.; JEONG, S. Y. Structural Determination and Interior Polarity of Self-Aggregates Prepared from Deoxycholic Acid-Modified Chitosan in Water. **Macromolecules**, vol. 31, p. 378-383, 1998.

LEED, A.; DUBAY, K.; URSOS, L. M. B.; SEARS, D.; DE DIOS, A. C.; ROEPE, P. D. Solution Structures of Antimalarial Drug-Heme Complexes. **Biochem.**, vol. 41, p. 10245-10255, 2002.

LUCAS H. J., KENEDY E. R. AND FORNO M. W., Iodosobenzene. **Org. Syntheses Coll.**, vol. 3 , p. 483, 1963.

LUND, E.G.; GUILYARDO, J.M.; RUSSELL, D.W.. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 96, p. 7238-7243, 1999.

MANSUY, D. Activation of alkanes : the biomimetic approach. **Coord. Chem. Rev.** vol. 125, p. 129 - 142, 1993.

MANSUY D. AND BATTIONI P. **Metalloporphyrins in catalytic oxidations.** New York: Marcel Dekker Inc., 1994. Cap.4;

HELDER M. MARQUES, H.M.; VOSTER K.; EGAN, T.J. The interaction of the heme-octapeptide, N-acetylmicroperoxidase-8 with antimalarial drugs: Solution studies and modeling by molecular mechanics methods. **J. Inorg. Biochem.**, vol. 64, p. 7-23, 1996.

MAURIN, A.J.M.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N. P.; LINDSAY-SMITH, J.R.; BONATO, P.S. LC-MS-MS Identification of Drug Metabolites Obtained by Metalloporphyrin Mediated Oxidation. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 14, p. 322-328, 2003.

MEUNIER, B. Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. **Chem. Rev.**, vol. 92, p. 1411-1456, 1992.

MEUNIER B., ROBERT A., PRATVIEL G. AND BERNADOU J., **The Porphyrin Handbook.** New York: New York Academic Press, 2000. Vol.4, Cap. 31

MILES, C.S.; OST, T.W.B.; NOBLE, M.A.; MUNRO, A.W.; CHAPMAN, S.K. Protein engineering of cytochromes P-450. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1543, 383-407, 2000.

MILGROM, L. R. **The colours of life.** New York: Oxford University Press, 1997.

MONTELLANO, P.R.O. **Cytochrome P450 structure, mechanism biochemistry.** New York: Plenum Press, 1995.

MORITA T.; ASSUMPÇÃO R.W.V.; **Manual de soluções reagentes e solventes.** Campinas: Ed. Edgard Blücher, 1980.

MURATA, K.; PANICUCCI, R.; GOPINATH, E.; BRUICE, T.C.; The reaction of 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfonatophenyl)porphinatoiron(III) hydrate with alkyl and acyl hydroperoxides. The dynamics of reaction of water-soluble and non .mu.-oxo dimer forming iron(III) porphyrins in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 112, p. 6072-6083, 1990.

NAKAHARA, K.; SHOUN, H.; OBAYASHI, E.; NAKAMURA, H.; IIZUKA, T.; SHIRO, Y. Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. **Nat. Struct. Biol.**, vol. 4, p. 827-832, 1997.

NAM, W.; HAN, H. J.; OH, S.Y.; LEE, Y. J.; CHOI, M.-H.; HAN, S.Y.; KIM, C.; WOO, S. K.; Shin, W. New Insights into the Mechanisms of O-O Bond Cleavage of Hydrogen Peroxide and *tert*-Alkyl Hydroperoxides by Iron(III) Porphyrin Complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 122, p. 8677-8684, 2000.

NAVARRO, M.; VASQUEZ, F.; SANCHEZ-DELGADO, R. A.; PEREZ, H.; SINOU, V.; SCHREVEL, J.. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 7. Synthesis and in Vitro Antimalarial Activity of New Gold-Chloroquine Complexes. **J. Med. Chem.**; vol. 47, p. 5204-5209, 2004.

NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, vol. 6, p. 1 - 42, 1996.

NELSON, D.R. Cytochrome P450 and the Individuality of Species **Arch. of Biochem. and Biophys.**, vol. 369, p. 1-10, 1999.

NEYS, P.E.F.; SEVEREYNS, A.; VANKELECOM, I.F.J.; CEULEMANS, E.; DEHAEN, W.; JACOBS, P.A. Manganese porphyrins incorporated in polydimethylsiloxane membranes: selective catalysts for the epoxidation of deactivated alkenes. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 144, p. 373-377, 1999.

NEYS, P.E.F.; VANKELECOM, I.F.J.; L'ABBÉ, M.; PARTON, R.F.; CENLEMANS, E.; DEHAEN, W.; L'ABBÉ, G.; JACOBS, P. A. Manganese- and iron-porphyrins embedded in a polydimethylsiloxane membrane: a selective oxidation catalyst. **J. of Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 134, p. 209-214, 1998.

OLLIARO P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacol. & Ther.**, vol. 89, p. 207-219, 2001.

OMURA, T. Forty Years of Cytochrome P450. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.**, vol. 266, p. 690-698, 1999.

O'NEILL, P.M.; BRAY, P.G.; HAWLEY, S.R.; WARD, S.A.; PARK, B.K. 4-Aminoquinolines—Past, present, and future; A chemical perspective. **Pharmacol. & Ther.**, vol. 77, p. 29-58, 1998.

PARTON, R.F.; VANKELECOM, I.F.J.; TAS, D.; JANSSEN, K.B.M.; KNOPSGERRITS, P.P.; JACOBS, P.A. Membrane occluded catalysts: a higher order mimic with improved performance. **J. of Mol. Catal. A: Chem.**, vol. 113, p. 283-292, 1996.

PASTERNAK, R.F.; HUBER, P.R.; BOYD, P.; ENGASSER, G.; FRANCESCONI, L.; GIBBS, E.; FASELLA, P.; VENTURO, G.C.; HINDS, L. Aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 94, p. 4511-4517, 1972.

PIKULEVA, I.A.; MACKMAN, R.L.; KAGAWA, R.L.; WATERMAN, M.R.; MONTELLANO, P.R.O. Active site topology of bovine cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 scc and evidence for interaction of tyrosine 94 with cholesterol, **Arch. Biochem. Biophys.** vol. 322, p. 189-197, 1995.

PUSSARD, E.; VERDIER, F.; BLAYO, M.C. Simultaneous determination of chloroquine, amodiaquine and their metabolites in human plasma, red blood cells, whole blood and urine by column liquid chromatography. **J. Chromatography B.**, vol. 374, p. 111-118, 1986.

REREK, M. E.; WEIL, I.; HILL, M. Kinetics and mechanism of the Mn(III)gluconate catalyzed decomposition of hydrogen peroxide. **Coord. Chem. Rev.**, vol. 105, p. 251-268, 1990.

RIBEIRO, M.C.A.; AUGUSTO, O.; FERREIRA, A.M.C. Inhibitory effect of chloroquine on the peroxidase activity of ferriprotoporphyrin IX. **J. Chem. Soc. Dalton Trans. P.** 3759- 3766, 1995.

RIBEIRO, M.C.A.; AUGUSTO, O.; FERREIRA, A.M.C. Influence of quinoline-containing antimalarials in the catalase activity of ferriprotoporphyrin IX. **J. Inorg. Biochem.**, vol. 65, p. 15-23, 1997.

SHAREFKIN, J.G.; SALTZMAN, H. Iodosobenzene, **Org. Syntheses Coll.**, vol. 5, p. 658, 1973.

SCHNEIDER, H.J.; WANG, M. Supramolecular Chemistry. 49. Ligand-Porphyrin Complexes: Quantitative Evaluation of Stacking and Ionic Contributions. **J. Org. Chem.**, vol. 59, p. 7464-7472, 1994.

SCHNEIDER, H. J.; LIU TIANJUN, L.; SIRISH, M.; MALINOVSKI, V. Dispersive interactions in supramolecular porphyrin complexes. **Tetrahedron**, vol. 58, p. 779-786, 2002.

SHELDON, R. A. **Metalloporphyrins in catalytic oxidations**. New York: Marcel Dekker, 1994.

SCHIAVON, M. A.; IAMAMOTO, Y.; NASCIMENTO, O.R.; ASSIS, M.D. Catalytic activity of nitro- and carboxy-substituted iron porphyrins in hydrocarbon oxidation: Homogeneous solution and supported systems. **J. of Mol. Catal. A: Chem.**, vol 174, p. 213-222, 2001.

SMITH, K. M. **Porphyrins and metalloporphyrins**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1975. Cap. 19;

SUGIMOTO, H.; SAWYER, D.T. Iron(II)-induced activation of hydroperoxides for the dehydrogenation and monooxygenation of organic substrates in acetonitrile **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 107, p. 5712-5716, 1985.

TRAYLOR, P.S.; DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T.G. Sterically protected hemins with electronegative substituents: efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, 279, 1984.

TRAYLOR T.G., Kinetics and mechanism studies in biomimetic chemistry: metalloenzyme model systems, **Pure and Appl. Chem.**, vol. 63, p. 265-274, 1991.

UNIFESP Virtual. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2005. Disponível em <<http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/malaria/>> Acesso em 10 ago. 2005

VANKELECOM, I. F. J.; JACOBS, P. A. Dense organic catalytic membranes for fine chemical synthesis. **Catal. Today**, vol.56, p.147-157, 2000

VASQUEZ-VIVAR, J; AUGUSTO, O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. Oxidation and redox cycling . **J. Biol. Chem.** vol. 267, p. 6848-6854, 1992.

WHITE, J.A.; JONES, B.B., GUO, Y.D.; DILWORTH, F.J.; BONASORO, J.; JONES, G.; PETKOVICH, M. cDNA Cloning of Human Retinoic Acid-metabolizing Enzyme (hP450RAI) Identifies a Novel Family of Cytochromes P450 (CYP26). **J. Biol. Chem.** vol. 272, p. 18538-18541, 1997.

WHO, 2005 – World Health Organization, 2005. Disponível em <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>>. Acesso em 10 ago. 2005

XUE, L.; ZHOU, D.J.; TANG, L.; JI, X.F.; HUANG, M.Y.; JIANG, Y.Y. The asymmetric hydration of 1-octene to (S)-(+)-2-octanol with a biopolymer–metal complex, silica-supported chitosan–cobalt complex. **Reac. and Func. Polym.**, vol. 58, p. 117-12, 2004.

ZHOU, D.Q.; HE, M.; ZHANG, Y.H.; HUANG, M.Y.; JIANG, Y.Y. Asymmetric hydrogenation of diketones catalyzed by magnesium oxide-supported chitosan-Rh complex. **Polym. for Advan. Technol.**, vol. 14, p. 287-291, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)