

BRUNA CRISTINA LOPES DOMINGUES

Desenvolvimento de novos derivados ftalimídicos, candidatos ao tratamento da malária: Estudos computacionais e síntese.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Claro Monteiro

ARARAQUARA

2024

D671d

Domingues, Bruna Cristina Lopes

Desenvolvimento de novos derivados ftalimídicos, candidatos ao tratamento da malária : estudos computacionais e síntese / Bruna Cristina Lopes Domingues. -- Araraquara, 2024

124 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Coorientador: Gustavo Claro Monteiro

1. Malária. 2. Modelagem. 3. Química farmacêutica. 4. Síntese. 5. Plasmodium falciparum. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A malária é considerada um grave problema de saúde pública global, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente no continente africano. Ela acarreta em prejuízos sociais e econômicos aos países endêmicos, afetando a qualidade e expectativa de vida, diminuindo a produtividade, além de gerar elevados gastos financeiros. Apesar do progresso obtido nos últimos anos, o desenvolvimento de resistência aos medicamentos antimaláricos por parte do parasita causador da doença tem dificultado o sucesso dos tratamentos. Assim, o impacto potencial deste trabalho é a obtenção de novas moléculas com atividade frente ao parasita causador da malária. Sendo os resultados positivos, tais moléculas podem ser úteis no desenvolvimento de novas alternativas seguras e eficazes para o tratamento da doença, beneficiando milhares de pessoas infectadas e também países que enfrentam dificuldades devido a presença de cepas resistentes aos antimaláricos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Malaria is considered a serious global public health problem, presenting high morbidity and mortality rates, especially on the African continent. It causes social and economic losses in endemic countries, affecting quality and life expectancy, reducing productivity, in addition to generating high financial expenses. Despite the progress made in recent years, the development of resistance to antimalarial drugs by the parasite that causes the disease has hampered the success of treatments. Thus, the potential impact of this work is to obtain new molecules with activity against the parasite that causes malaria. If the results are positive, such molecules can be useful in the development of new safe and effective alternatives for treating the disease, benefiting thousands of infected people and also countries facing difficulties due to the presence of strains resistant to antimalarials.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de novos derivados ftalimídicos, candidatos ao tratamento da malária: Estudos computacionais e síntese.

AUTORA: BRUNA CRISTINA LOPES DOMINGUES

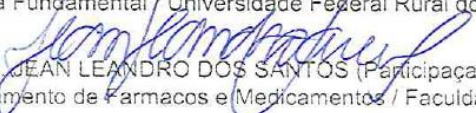
ORIENTADOR: NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

COORIENTADOR: GUSTAVO CLARO MONTEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Química, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. CARLOS MAURÍCIO RABELLO DE SANT'ANNA (Participação Presencial)
Química Fundamental / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ - Rio de Janeiro


Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara

Araraquara, 29 de julho de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Bruna Cristina Lopes Domingues

Nome em citações bibliográficas: Domingues, B. C. L.

Nascimento: 28/09/1999

Naturalidade: Itu/SP – Brasil

E-mail para contato: bclopes99@gmail.com

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Química de Araraquara. Departamento de Bioquímica e Química Orgânica. Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM). Rua Professor Francisco Degni, 55. Jardim Quitandinha, CEP 14800-060. Araraquara/SP - Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em Química: Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IQ – UNESP), Araraquara SP. Título da dissertação: Desenvolvimento de novos derivados ftalimídicos, candidatos ao tratamento da malária: Estudos computacionais e síntese. Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, Bolsa: CNPq.

Graduação em Farmácia-Bioquímica: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCFar - UNESP), Araraquara SP. Período: fevereiro 2017 - março 2023. Título do trabalho de conclusão de curso: Suplementos Alimentares: Aspectos Químicos e Aplicações de Macro e Micronutrientes. Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, Bolsa: FAPESP.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

DOMINGUES, B. C. L.; RIBEIRO, T. R.; NEVES, A. L.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Suplementos Alimentares: Aspectos Químicos e Aplicações de Macro e Micronutrientes. Revista Virtual de Química, 15 (3), 567-607, 2023. [[Crossref](#)]

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

Domingues, B. C. L.; Monteiro, G. C.; Nascimento-Júnior, N. M. Synthesis of pyrrolidine derivatives, targeting the $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2024**, Águas de Lindóia – São Paulo.

DOMINGUES, B. C. L.; BATISTA, V. C.; NASCIMENTO-JUNIOR, N. M. Estudos computacionais de novos derivados ftalimídicos candidatos à inibidores do citocromo bc1, visando atividade antimalárica. 33^o Congresso de Iniciação Científica, Araraquara – SP, **2021**.

DOMINGUES, B. C. L.; MASCARENHAS, D. C. NUNES-DE-SOUZA, R. L. Avaliação comportamental e farmacológica de camundongos derrotados socialmente e expostos ao teste de partição. 30^o, 31^o e 32^o Congresso de Iniciação Científica, Araraquara – SP, **2018-2020**.

DOMINGUES, B. C. L.; BORGES, A. C. T.; SANTOS, C. G.; SILVA, M. C. B.; SILVA, M. H. L.; ASSAD, M. M. S.; MARIN, M. T. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo dos indivíduos atendidos no estande Hipertensão Arterial na 20^a Semana de Atenção Farmacêutica Estudantil (SAFE). VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Araraquara – SP, **2018**.

SILVA, M. C. B.; BORGES, A. C. T.; DOMINGUES, B. C. L.; et al. Incidência dos fatores de risco para hipertensão na população atendida no estande de Hipertensão Arterial durante a 20^a Semana de Assistência Farmacêutica Estudantil (SAFE). VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Araraquara – SP, **2018**.

Apresentações de trabalho e/ou palestra

DOMINGUES, B. C. L.; BORGES, A. C. T.; SANTOS, C. G.; SILVA, M. C. B.; SILVA, M. H. L.; ASSAD, M. M. S.; MARIN, M. T. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo dos indivíduos atendidos no estande Hipertensão Arterial na 20^a Semana de Atenção Farmacêutica Estudantil (SAFE). VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Araraquara – SP, **2018**.

DOMINGUES, B. C. L.; MASCARENHAS, D. C. NUNES-DE-SOUZA, R. L. Avaliação comportamental e farmacológica de camundongos derrotados socialmente e expostos ao teste de partição. 30^o, 31^o e 32^o Congresso de Iniciação Científica, Araraquara – SP, **2018-2020**.

DOMINGUES, B. C. L.; BATISTA, V. C.; NASCIMENTO-JUNIOR, N. M. Estudos computacionais de novos derivados ftalimídicos candidatos à inibidores do citocromo bc1, visando atividade antimalárica. 33^o Congresso de Iniciação Científica, Araraquara – SP, **2021**.

Domingues, B. C. L.; Monteiro, G. C.; Nascimento-Júnior, N. M. Synthesis of pyrrolidine derivatives, targeting the $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2024**. Águas de Lindóia – São Paulo.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Trabalho apresentado: Synthesis of pyrrolidine derivatives, targeting the $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2024**. Águas de Lindóia – São Paulo.

XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Trabalho apresentado: Estudos computacionais, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados ftalimídicos para o tratamento da malária, **2021**. Araraquara – São Paulo.

XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Trabalho apresentado: Caracterização comportamental e farmacológica de camundongos derrotados socialmente e expostos ao teste de partição, **2020**. Araraquara – São Paulo.

XXXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Trabalho apresentado: Avaliação comportamental e farmacológica de camundongos derrotados socialmente e expostos ao teste de partição, **2019**. Araraquara – São Paulo.

XXX Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Trabalho apresentado: Avaliação comportamental e farmacológica de camundongos derrotados socialmente e expostos ao teste de partição, **2018**. Araraquara – São Paulo.

VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Trabalho apresentado: Adesão ao tratamento anti-hipertensivo dos indivíduos atendidos no estande Hipertensão Arterial na 20^a Semana de Atenção Farmacêutica Estudantil (SAFE), **2018**. Araraquara - São Paulo.

PRÊMIOS E TÍTULOS

Menção Honrosa para o trabalho: DOMINGUES, B. C. L.; BORGES, A. C. T.; SANTOS, C. G.; SILVA, M. C. B.; SILVA, M. H. L.; ASSAD, M. M. S.; MARIN, M. T. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo dos indivíduos atendidos no estande Hipertensão Arterial na 20^a Semana de Atenção Farmacêutica Estudantil (SAFE). VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Araraquara – SP, **2018**.

DEMAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS

Estágio de Docência UNESP – Curso de Bacharelado em Química, auxiliando na disciplina de Tópicos Complementares em Química Orgânica, adquirindo experiência na comunicação com os discentes e na prática de docência, supervisionada pelo Prof. Dr. Gustavo Claro Monteiro no ano de **2024** (Carga horária: 60h).

Curso de Extensão Universitária – Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. **2021**. (Carga horária: 60h).

Curso de Extensão Universitária - XII Escola de Férias em Neuropsicofarmacologia. Araraquara/SP, **2018** (Carga horária: 40h).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO CIENTÍFICO

Membro da Comissão Organizadora: X Congresso Farmacêutico da Unesp e VI Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, **2022**.

Membro da Comissão Organizadora: 3ª Escola de Modelagem Molecular da UNESP, Araraquara/SP, **2021**.

Membro da Comissão Organizadora: IX Congresso Farmacêutico da Unesp e V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, **2021**.

Membro da Comissão Organizadora: XIII Escola de Férias em Neuropsicofarmacologia, Araraquara/SP, **2020**.

*Dedico este trabalho, com muito carinho e gratidão, aos meus pais Rita e Emerson,
meus maiores e melhores orientadores na vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família. Minha mãe, **Rita de Cássia Lopes Dias Domingues** e meu pai, **Emerson Ronei Domingues**; sou eternamente grata por todo apoio, incentivo e amor incondicional. O suporte de vocês, tanto em minha formação pessoal quanto profissional, é essencial. Obrigada por compreenderem as ocasiões que estive ausente por ir em busca dos meus sonhos. Eu amo vocês.

Aos meus **amigos** que me acompanharam nesta caminhada e eu sempre pude contar. Pelo convívio, carinho e todo suporte nos momentos cruciais, bem como os momentos incríveis que vivemos juntos. Em especial ao meu também amado **Augusto**, por compartilhar a vida comigo e deixá-la mais leve.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior**, por abrir as portas de seu grupo de pesquisa, ainda na graduação, depositando confiança em mim para realização dos trabalhos. Obrigada pela orientação e aprendizados ao longo desses anos.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Gustavo Claro Monteiro**, por seus ensinamentos, dicas, disponibilidade e todo auxílio prestado no decorrer deste projeto.

Aos colegas do **LaQMedSOMM**, pelas trocas de conhecimento e discussões científicas, bem como os momentos de descontração no dia-a-dia.

A toda equipe de funcionários do Instituto de Química, em especial **Nivaldo, Uenifer, Lidiane e Rafael**, pelas análises realizadas e por sempre serem solícitos e prestativos para comigo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pela bolsa de mestrado concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**, Processo 2018/00187-7) pelos recursos fornecidos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa febril, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo transmitidos para humanos pela picada da fêmea infectada do mosquito *Anopheles*. Apesar de curável, caso não seja realizado o diagnóstico e tratamento adequado, pode evoluir para sua forma grave. Estima-se que 249 milhões de casos e 608 mil mortes ocorreram em 2022 e, além disso, os parasitas estão adquirindo resistência aos fármacos disponíveis atualmente para o tratamento. Assim, é de extrema urgência o desenvolvimento de novos fármacos capazes de combater eficientemente essa doença. Um possível alvo terapêutico é o complexo citocromo *bc1*, que atua na transferência de elétrons na mitocôndria do parasita. Ao ser inibido, ocorre perda da função mitocondrial e, conseqüentemente, morte do parasita. No presente projeto de pesquisa foram realizados estudos computacionais e a síntese de novos derivados ftalimídicos com potencial atividade frente ao citocromo *bc1*. Os estudos *in silico* foram executados por meio da estratégia SBDD (*structure-based drug design*), realizando a triagem virtual de 48 derivados ftalimídicos. Após análise dos dados obtidos, os compostos mais promissores foram selecionados para etapa de síntese com uma rota planejada em 3 etapas. Dentre os compostos, 4 foram obtidos até a segunda etapa, envolvendo a formação da ftalimida e redução do grupo nitro, em rendimentos globais variando entre 46% e 62%.

Palavras-chave: Malária; triagem virtual; docagem molecular; síntese; citocromo *bc1*; derivados ftalimidícos.

ABSTRACT

Malaria is a febrile infectious disease, caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, transmitted to humans through the bite of an infected female *Anopheles* mosquito. Although it is curable, if adequate diagnosis and treatment are not carried out, it can progress to a serious form. It is estimated that 249 million cases and 608 thousand deaths occurred in 2022 and, in addition, the parasites are acquiring resistance to the drugs currently available for treatment. Therefore, the development of new drugs capable of efficiently combating this disease is extremely urgent. A possible therapeutic target is the cytochrome bc1 complex, which acts in the transfer of electrons in the parasite's mitochondria. When inhibited, there is loss of mitochondrial function and, consequently, death of the parasite. In this research project, computational studies and the synthesis of new phthalimide derivatives with potential activity against cytochrome bc1 were carried out. The *in silico* studies were carried out using the SBDD (structure-based drug design) strategy, performing virtual screening of 48 phthalimide derivatives. After analyzing the data obtained, the 8 most promising compounds were selected for the synthesis stage with a route planned in 3 steps. Among the compounds, 4 were obtained until the second stage, involving the formation of phthalimide and reduction of the nitro group, in global yields ranging from 46% to 62%.

Keywords: Malaria; virtual screening; molecular anchoring; synthesis; cytochrome bc1; phthalimide derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa de casos e óbitos (em porcentagem) por região da OMS, 2022	23
Figura 2 - Ciclo de transmissão	25
Figura 3 – Estrutura química dos antimaláricos quinina (1), pamaquina (2), primaquina (3), cloroquina (4), mefloquina (5) e amodiaquina (6)	28
Figura 4 - Artemisinina (7) e seus derivados artesunato de sódio (8), artemeter (9), dihidroartemisinina (10) e deoxiartemisinina (11)	29
Figura 5 – Estrutura química da atovaquona (12), ubiquinona (13) e proguanil (14)	30
Figura 6 - Estrutura química do fármaco clindamicina (15), utilizado no tratamento da malária grave, e dos inseticidas DEET (16) e DDT (17)	32
Figura 7 - Esquema cronológico aproximado da descoberta dos fármacos antimaláricos (em verde) e surgimento da resistência de <i>P. falciparum</i> aos mesmos (em vermelho)	33
Figura 8 - Principais etapas realizadas utilizando a técnica SBDD	34
Figura 9 - Planejamento estrutural dos fragmentos de N-fenil ftalimida da atovaquona. Adaptado de Okada, 2018	35
Figura 10 – Planejamento estrutural dos derivados ftalimídicos (19a-v')	37
Figura 11 - Estrutura química da estigmatelina (20)	38
Figura 12 – Modo de ligação do ligante co-cristalizado SMA4025 (carbonos em azul claro e oxigênios em vermelho) e resíduos da região do sítio ativo do citocromo bc1. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofres em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.....	39
Figura 13 – Gráfico de Ramachandran, gerado no servidor online procheck, para a estrutura cristalográfica 5CX5	42
Figura 14 - Modo de ligação do ligante co-cristalizado (carbonos em azul claro) sobreposto ao docado (carbonos em roxo), mostrando também os resíduos de aminoácidos. Átomos de hidrogênio foram otimizados para maior clareza. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofres em amarelo. Figura gerada através do software PyMol	43
Figura 15 - Modo de ligação com melhor pontuação da atovaquona (12), mostrando também os resíduos de aminoácidos. Átomos de hidrogênio foram otimizados para maior clareza. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde,	

nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofres em amarelo. Figura gerada através do software PyMol45

Figura 16 – Fórmula estrutural dos 8 ligantes selecionados via docagem molecular pela função de pontuação CHEMPLP.....47

Figura 17 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **BzAr8** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **BzAr8** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol49

Figura 18 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **BzAr9** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **BzAr9** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol50

Figura 19 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **EtAr7** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr7** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol52

Figura 20 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **EtAr9** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr9** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol53

Figura 21 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **EtAr10** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr10** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol55

Figura 22 – Interações previstas para a pose de maior pontuação de **EtAr11** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr11** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol56

Figura 23 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **iPrAr4** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **iPrAr4** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol58

Figura 24 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de iPrAr8 obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de iPrAr8 são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol	59
Figura 25 - Radar de biodisponibilidade dos 8 compostos selecionados	61
Figura 26 – Rota de síntese para a obtenção dos derivados ftalimídicos	61
Figura 27 - Reação de obtenção das ftalimidas	62
Figura 28 - Mecanismo proposto para primeira etapa de síntese.....	63
Figura 29 - Síntese por micro-ondas dos compostos 22a e 22c	65
Figura 30 - Estruturas de ressonância para as moléculas 2-aminopiridina (25), 4-aminopiridina (26) e 3-aminopiridina (27)	66
Figura 31 - Reação de redução do grupo nitro	66
Figura 32 - Proposta do mecanismo da segunda etapa de síntese.....	67
Figura 33 – Fluorescência dos intermediários 23b , 23d , 23e e 23e observada com a radiação UV em 365 nm.....	67
Figura 34 – Reação de aminação reductiva	69
Figura 35 – Mecanismo proposto para terceira etapa de síntese.....	69
Figura 36 – Espectro de RMN ¹ H (150 MHz) iPrAr4	70
Figura 37 – Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) iPrAr4	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de diagnóstico para malária	27
Tabela 2. Esquemas de tratamento recomendados no Brasil.....	31
Tabela 3. Interações entre os resíduos de aminoácidos e o ligante SMA4025 no sítio de ligação	39
Tabela 4. Tabela com as interações previstas entre SMA4025 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	41
Tabela 5. Interações relevantes entre os resíduos chave na redocagem da estigmatelina (20).....	44
Tabela 6. Interações previstas para atovaquona (12) com resíduos de aminoácidos do sítio de ligação	44
Tabela 6. Interações previstas entre as 8 melhores poses de ligantes com resíduos de aminoácidos do sítio de ligação	41
Tabela 7. Tabela com as interações previstas entre a atovaquona (12) e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.....	45
Tabela 8. Interações previstas entre as melhores poses dos compostos planejados com resíduos de aminoácidos do sítio ativo de citocromo bc1, utilizando a função CHEMPLP	46
Tabela 9. Interações previstas entre as 8 melhores poses de ligantes com resíduos de aminoácidos do sítio de ligação	47
Tabela 10. Tabela com as interações previstas entre BzAr8 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	48
Tabela 11. Tabela com as interações previstas entre BzAr9 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	50
Tabela 12. Tabela com as interações previstas entre EtAr7 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	51
Tabela 13. Tabela com as interações previstas entre EtAr9 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	53
Tabela 14. Tabela com as interações previstas entre EtAr10 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	54

Tabela 15. Tabela com as interações previstas entre EtAr11 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	56
Tabela 16. Tabela com as interações previstas entre iPrAr4 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	57
Tabela 17. Tabela com as interações previstas entre iPrAr8 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação	59
Tabela 18. Parâmetros computacionais de biodisponibilidade obtidos na plataforma SwissADME.....	60
Tabela 19. Atribuição dos principais modos vibracionais (cm ⁻¹), indicativos da formação dos compostos 22b , 22d , 22e e 22f	64
Tabela 20. Deslocamentos químicos (d), em ppm, mais relevantes dos compostos 22b , 22d , 22e e 22f	64
Tabela 21. Atribuição da banda (cm ⁻¹) referente a presença do grupo amino para os compostos 23b , 23d , 23e e 23e	68
Tabela 22. Deslocamento químico (d), em ppm, do NH ₂ e dos hidrogênios da porção 1,4-naftoquinona dos compostos 23b , 23d , 23e e 23e	68
Tabela 23. Valores de pontos de fusão e aspectos físicos dos intermediários obtidos	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de etila

AcOH: Ácido acético

ADMET: Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

ART: Artemisinina

ATP: Trifosfato de adenosina

ATV: Atovaquona

CASF: Avaliação Comparativa de Funções de Pontuação

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COVID-19: Doença por Corona Vírus 2019

CQ: Cloroquina

DCM: Diclorometano

dd: Duplo duplete

ddd: Duplo duplo duplete

DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano

DEET: *N-N*-dietilmetatoluamida

DEPT: Transferência de Polarização Aprimorada sem Distorção

DHFR: Diidrofolato redutase

DHODH: Diidroorotato desidrogenase

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSV: Discovery Studio Visualizer

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EM: Espectro de massa

Fe: Ferro

g: Gramas

GTS: Estratégia Técnica Global

h: Horas

H₂O: Água

HBA: Aceptor de hidrogênio

HBD: Doador de hidrogênio

HCl: Ácido clorídrico

HF: Halofantrina

HSQC: Correlação Quântica Heteronuclear Simples

IFA: Imunofluorescência Indireta

IV: Infravermelho

LBDD: Planejamento Baseado na Estrutura do Ligante

m: Multiplete

MC: Malária cerebral

min: Minutos

mL: Mililitros

mmol: Milimol

MQ: Mefloquina

MW: Micro-ondas

NaBH(OAc)₃: Triacetoxiboro-hidreto de sódio

NH₄Cl: Cloreto de amônio

OMS: Organização Mundial da Saúde

P.F.: Ponto de fusão

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PDB: Banco de Dados de Proteínas

pHRP-2: Proteína II Rica em Histidina de *Plasmodium*

pLDH: Proteína Lactato Desidrogenase

PMA: Ácido fosfomolibdico

ppm: Partes por milhão

PRG: Proguanil

QN: Quinina

R_f: Fator de retenção

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RMSD: Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio

s: Simpleto

SBDD: Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor

sl: Simpleto largo

S-PIR: Sulfadoxina-pirimetamina

t.a.: Temperatura ambiente

TCA: Terapia Combinada com Artemisinina

TDR: Teste de Diagnóstico Rápido

UV: Radiação Ultravioleta

°C: Graus Célsius

λ : Comprimento de onda

δ : Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Malária – Aspectos gerais	23
1.2 Fisiopatologia e Manifestações Clínicas	24
1.3 Diagnóstico	26
1.4 Prevenção e Tratamento Medicamentoso	28
1.5 Docagem Molecular	33
2. OBJETIVO	35
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	36
4. MATERIAL E METODOLOGIA	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Análise das Interações Presentes na Estrutura Cristalográfica	39
5.2 Redocagem da Estigmatelina	42
5.3 Docagem da Atovaquona	44
5.4 Triagem Virtual dos Derivados Ftalimídicos	45
5.5 Síntese, Mecanismos e Elucidação Estrutural dos Derivados	61
5.5.1 Formação da ftalimida	62
5.5.2 Redução do Grupo Nitro	66
5.5.3 Aaminação Redutiva	69
6. CONCLUSÃO	71
7. PARTE EXPERIMENTAL	72
7.1 Métodos Cromatográficos	72
7.2 Análises Espectrométricos	72
7.3 Procedimentos e Caracterizações	72
7.3.1 Metodologia para obtenção dos intermediários 22a-f	72
7.3.1.1 Intermediário 22b	73
7.3.1.2 Intermediário 22d	73
7.3.1.3 Intermediário 22e	74
7.3.1.4 Intermediário 22f	74
7.3.2 Metodologia para obtenção dos intermediários 23a-f	74
7.3.2.1 Intermediário 23b	75
7.3.2.2 Intermediário 23d	75
7.3.2.3 Intermediário 23e	76
7.3.2.4 Intermediário 23f	76
7.3.3 Metodologia para obtenção de 24a-h	77
7.3.3.1 iPrAr4 (24g)	77
REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária - Aspectos gerais

A malária é uma doença infecciosa potencialmente fatal ocasionada por protozoários do gênero *Plasmodium*, dos quais cinco espécies podem infectar seres humanos: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. O *P. falciparum* é o mais prevalente entre as espécies, sendo responsável por aproximadamente 90% da mortalidade mundial.¹

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2022, houveram 249 milhões de novos casos em 85 países, apresentando um aumento de 5 milhões em relação a 2021. Quanto ao número de óbitos, estima-se que foram 608 mil, dos quais 4 países foram responsáveis por pouco mais da metade - Nigéria (31%), República Democrática do Congo (12%), Níger (6%) e República Unida da Tanzânia (4%). No mesmo ano, a Região Africana, responsável por uma parte desproporcionalmente alta do fardo global da doença, representava cerca de 93,6% de todos os casos e 95,4% das mortes (**Figura 1**), dentre as quais 78% ocorreram em crianças menores de 5 anos.²

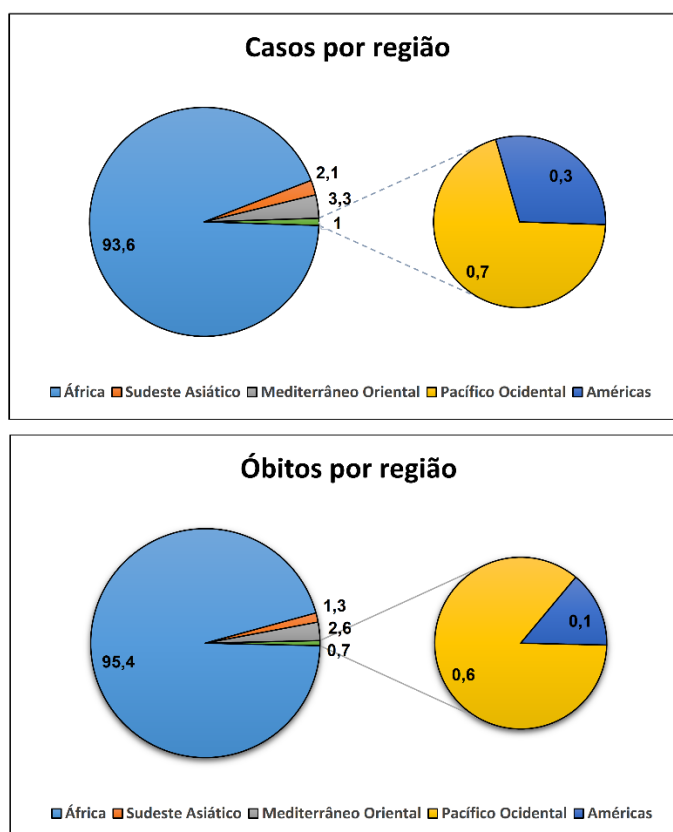


Figura 1 – Estimativa de casos e óbitos (em porcentagem) por região da OMS, 2022. ² Elaborado pela autora.

No Brasil, circulam apenas três espécies (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*). Praticamente a totalidade dos casos ocorrem na região amazônica, devido às condições climáticas e ecológicas favoráveis à sua transmissão. Em 2022, houve uma redução de 6,6% dos casos no país em comparação ao ano anterior, porém vêm sendo observada uma tendência de crescimento em relação ao número de óbitos devido à doença.³

É dito que as primeiras menções a malária datam de 2700 a.C, encontradas em antigos registros de médicos chineses, onde atribuíam a febre a forças sobrenaturais e divindades enfurecidas. Somente em 1880, o francês Laveran descobriu o parasita da doença, observando-o pela primeira vez no sangue de indivíduos contaminados.⁴

O trabalho da OMS frente a malária é guiado pela *Estratégia técnica global para a malária 2016-2030 (GTS)*, que possui quatro metas globais até 2030: 1) redução da incidência de casos em pelo menos 90%, 2) redução das taxas de mortalidade em pelo menos 90%, 3) eliminação da malária em pelo menos 35 países, e 4) prevenção do ressurgimento da malária nos países livres da doença.⁵ Em vista dos dados obtidos nos últimos anos, é perceptível que o progresso na redução da doença estagnou, o que dificulta o alcance de tais metas. Alguns fatores que colaboram para essa estagnação são o desenvolvimento de resistência aos fármacos e inseticidas, restrições de recursos, alterações climáticas e pandemia de COVID-19, que levou à interrupção de programas de saúde específicos para o combate da malária.²

1.2 Fisiopatologia e Manifestações Clínicas

O vetor da malária é a fêmea infectada do mosquito *Anopheles*, a qual inocula os parasitas no momento da picada, através de suas glândulas salivares. Os parasitas entram na corrente sanguínea na forma de esporozoítos, sendo rapidamente captados pelos hepatócitos (células do fígado), onde passam pelo ciclo pré-eritrocítico assexuado como esquizontes hepáticos. Esse ciclo dura em torno de 7 a 14 dias, porém, para as espécies *P. vivax* e *P. ovale* pode perdurar por anos devido aos hipnozoítos, uma forma latente que permanece no fígado e é responsável pelas recaídas da doença.^{6,7}

Conforme se replicam, há liberação de merozoítos no sangue, os quais infectam os glóbulos vermelhos, também chamados de eritrócitos ou hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico. Quando instalados nesses eritrócitos, eles se multiplicam novamente, se desenvolvendo para trofozoítas e, posteriormente, esquizontes eritrocíticos, o que

leva à ruptura dessas células, permitindo a infecção de outras hemácias por novos merozoítos, dando continuidade ao ciclo.⁸

Uma pequena fração de merozoítos se diferenciam em gametócitos femininos e masculinos e atingem a derme para que, caso o hospedeiro seja picado por um segundo mosquito, ocorra a propagação do parasita. No vetor, a reprodução sexuada é finalizada no intestino médio após um intervalo de 9 a 14 dias e os esporozoítos migram para as glândulas salivares, estando prontos para uma nova inoculação.⁶

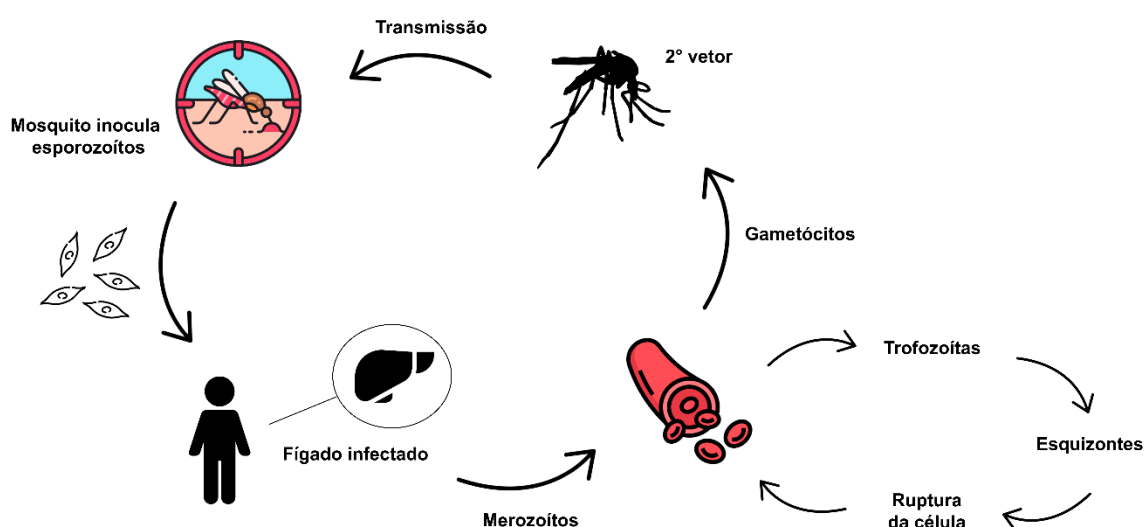


Figura 2 - Ciclo de transmissão.

Os sintomas clínicos da doença são majoritariamente resultado da fase assexuada de replicação do parasita no sangue humano, mais especificamente quando ocorre a ruptura dos glóbulos vermelhos, devido a liberação de pirogênios, causadores do estado febril.¹ De maneira geral, o indivíduo com a malária não complicada apresenta febre intermitente (paroxismo), dor de cabeça, calafrios, sudorese, mal estar, mialgia e fraqueza. Esses sintomas costumam ser inespecíficos e, em alguns casos, ausentes. Ainda, eles podem variar de pessoa para pessoa, de acordo com a idade e também dependem da espécie do parasita causador da infecção, o que pode dificultar o diagnóstico precoce.^{9,10}

A evolução para forma grave da doença está fortemente relacionada à infecção por *P. falciparum*, embora raramente também são vistos casos por *P. vivax* e *P. knowlesi*. A malária grave é considerada uma doença multissistêmica e requer a observação de características clínicas e laboratoriais. Exemplos de manifestações incluem, além da febre, convulsões, icterícia, alteração da consciência, anemia grave, acidose metabólica e insuficiência renal.^{1,10}

Outra possível complicação, quando a infecção ocorre por *P. falciparum* e não é realizado o tratamento adequado, é a malária cerebral (MC). Para diagnóstico, há três critérios: estado de coma do paciente, exclusão de outras encefalopatias e presença de formas assexuadas de *P. falciparum* em exame de gota espessa. A explicação para tal patogênese ainda é incerta, porém, as duas teorias mais aceitas relacionam a MC como 1) consequência direta da citoaderência do *P. falciparum* ao endotélio, somado às demais células que podem se aglutinar aos eritrócitos, como hemácias não infectadas, leucócitos e plaquetas, levando a obstrução do fluxo cerebral e, conseqüentemente, hipóxia; 2) resultado de uma resposta imune acentuada. Apesar de não ser obrigatoriamente fatal, o indivíduo pode desenvolver danos neurológicos perpétuos.⁹

1.3 Diagnóstico

As manifestações da malária podem ser difíceis de serem diferenciadas de outras doenças utilizando somente a abordagem clínica, ou seja, a partir do relato do paciente, pois, como mencionado, engloba sintomas não específicos. Por isso, é recomendado a confirmação da presença do parasita antes de iniciar o tratamento, além de que tal fato possibilita a escolha de um medicamento mais apropriado para a espécie do *Plasmodium* em questão e auxilia na contenção da propagação. A comprovação da infecção pode ser feita por métodos diretos, evidenciando o parasita ou partes dele, e por métodos indiretos, que detectam a presença de anticorpos contra ele.⁴

A microscopia óptica de esfregaços sanguíneos corados é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico. Ela permite detectar e identificar a espécie do *Plasmodium* pelas suas características morfológicas, além de possibilitar a quantificação da intensidade do parasitismo. Entretanto, requer material e reagentes adequados, bem como equipe treinada para sua realização, o que inviabiliza seu uso em várias regiões da África Subsaariana, por exemplo.^{6,11}

Na maioria dos casos, os testes de diagnóstico rápido (TDRs), também chamados de imunotestes, são a primeira opção, pois propiciam um resultado imediato e específico. Eles consistem em uma tecnologia econômica e de fácil uso, podendo ser armazenados sem necessidade de refrigeração, fatores estes que facilitam sua aplicabilidade em áreas endêmicas e/ou com recursos limitados. Eles são principalmente qualitativos, detectando antígenos liberados pelos parasitas no sangue

do indivíduo. Exemplos de antígenos detectados são: proteína II rica em histidina de *Plasmodium* (pHRP-2), específico para *P. falciparum*, lactato desidrogenase (pLDH) e aldolase, encontradas em todas as espécies. Atualmente, os TDRs disponíveis conseguem identificar somente as espécies *P. falciparum* e *P. vivax*. No caso das demais, eles apenas indicam a presença ou ausência do parasita. A desvantagem é que pode resultar em falsos negativos, devido ao aparecimento de parasitas com deleção do gene pHRP-2, e também falsos positivos, pois o pHRP-2 é capaz de permanecer no sangue por até 30 dias, mesmo após o tratamento da infecção.^{6,12}

Outra forma de detecção da malária é a reação em cadeia da polimerase (PCR), um método mais sensível e específico que os demais, capaz de amplificar e detectar o ácido nucleico do parasita. Devido ao tempo para obtenção do resultado não é utilizado em áreas endêmicas, porém é útil na identificação de pacientes assintomáticos e no monitoramento daqueles que estão em tratamento antimalárico.¹²

A imunofluorescência indireta (IFA) ou testes ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) são dois métodos indiretos vantajosos para estudos epidemiológicos, testagem de pessoas em risco de contrair malária ou triagem de possíveis doadores de sangue. São testes que exigem equipe qualificada e acabam não sendo adequados quando há um grande número de amostras, porém possuem alta sensibilidade e especificidade.⁴

Na **Tabela 1** constam os métodos aqui citados, junto a um resumo das principais vantagens e limitações de cada um.

Tabela 1. Métodos de diagnóstico para malária. Adaptado de Talapko, 2019.

Método	Vantagens	Limitações
Microscopia óptica	Teste rápido e barato; diferenciação de espécies	Exige pessoal treinado e manutenção de equipamentos
Teste de diagnóstico rápido (TDR)	Rápido e simples; acessível e estável em condições extremas	Menos sensível e preciso; sem quantificação da parasitemia
Reação em cadeia da polimerase (PCR)	Alta sensibilidade e especificidade; diferenciação de espécies	Alto custo; necessita de conhecimento técnico
Imunofluorescência indireta	Específico e sensível	Avaliação subjetiva dos resultados; tempo de execução
ELISA	Sensível; diferenciação de espécies	Alto custo; tempo de execução

A dificuldade em diagnosticar pacientes assintomáticos pode ser um importante obstáculo para o sucesso do controle e eliminação da malária. Isso porque tais pessoas, desconhecendo seu estado, não procuram tratamento e, dessa forma, continuam transmitindo a doença para outras pessoas. Apenas métodos moleculares, como PCR, são capazes de identificar o parasita, devido a sua alta sensibilidade e baixo limite de detecção.¹²

1.4 Prevenção e Tratamento Medicamentoso

O fármaco antimalárico mais antigo é o alcaloide quinina (**1**). Extraída de cascas da árvore *Cinchona sp.*, ela costumava ser utilizada popularmente em chás para tratamento da febre. A dificuldade de obtenção deste princípio ativo e seus efeitos adversos fomentou a busca por novas moléculas ativas, dando origem a diversos antimaláricos que exploram o núcleo quinolínico (**Figura 3**).⁴

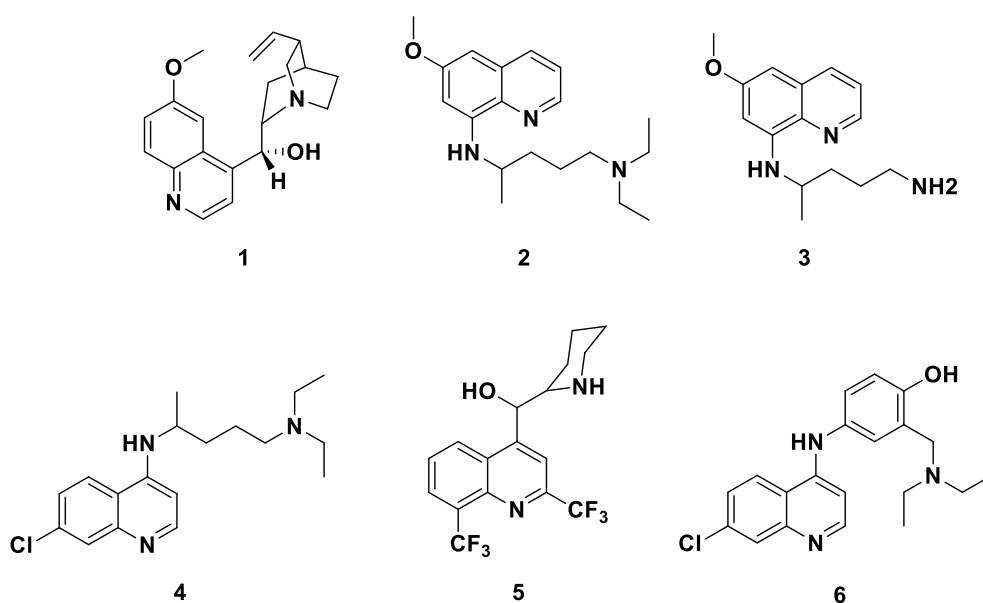


Figura 3 – Estrutura química dos antimaláricos quinina (**1**), pamaquina (**2**), primaquina (**3**), cloroquina (**4**), mefloquina (**5**) e amodiaquina (**6**).¹³

O principal modo de ação das aminoquinolinas parece estar relacionado com a inibição da formação de um polímero inerte denominado hemozoína. Isso ocorre devido ao acúmulo do fármaco no vacúolo digestivo, o qual impede a realização do processo de polimerização do grupo heme da hemoglobina, interrompendo o mecanismo de detoxificação do parasita, onde a ferriprotoporfirina-IX é convertida em hemozoína. Assim, o acúmulo de ferriprotoporfirina-IX, um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina, provoca a morte do parasita. As 8-aminoquinolinas, como

a pamaquina (**2**) e a primaquina (**3**), também atuam contra formas teciduais e em estágios sexuados.¹³

A cloroquina (**4**), devido a características como baixo custo, boa estabilidade, ausência de efeitos adversos graves, tolerância e baixa toxicidade, tornou-se o fármaco de primeira linha para tratamento da malária. Porém, devido ao uso excessivo, principalmente na profilaxia da doença, os parasitas desenvolveram resistência e novas opções tornaram-se necessárias.^{13,14}

Nesse contexto, a artemisinina (**7**) surgiu como uma opção promissora, sendo um produto natural extraído da *Artemisia annua*. Ela possui uma ponte endoperóxido em sua estrutura química, essencial para atividade antimalárica. Tal ponte permite que a molécula, durante a digestão da hemoglobina, seja reduzida pelo íon ferroso do grupo heme e, conseqüentemente, ocorra a produção de radicais livres que levam a alquilação de estruturas proteicas essenciais para a sobrevivência dos parasitas. Derivados carentes desta ligação são completamente inativos, como por exemplo a desoxiartemisinina (**11**) (**Figura 4**).¹⁵

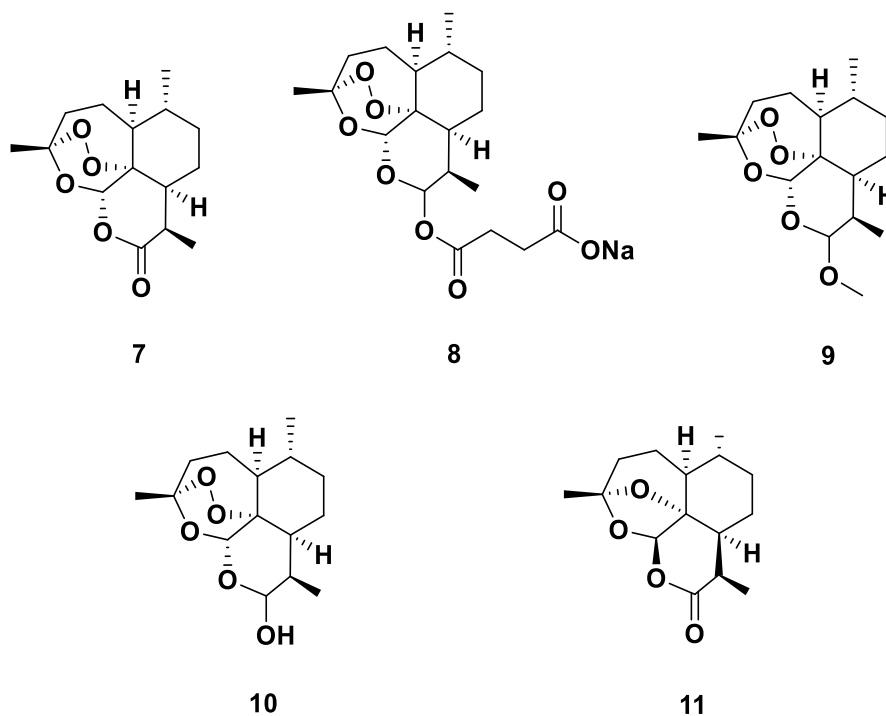


Figura 4 - Artemisinina (**7**) e seus derivados artesunato de sódio (**8**), artemeter (**9**), dihidroartemisinina (**10**) e desoxiartemisinina (**11**).^{13,15}

Outro fármaco antimalárico é a atovaquona (**12**), pertencente à classe das naftoquinonas e estruturalmente semelhante a coenzima Q10 (ubiquinona, **13**) (**Figura 5**), essencial no transporte de elétrons na mitocôndria do parasita. Assim, o

mecanismo de ação desse fármaco consiste na competição com a ubiquinona (**13**), inibindo seletivamente o complexo citocromo *bc1* do parasita, impedindo a bomba de prótons e levando a perda da função mitocondrial. Sua atividade é aumentada e a possibilidade de resistência é diminuída quando utilizada em combinação com proguanil (**14**), um pró-fármaco da classe das biguanidas, que atua como antagonista do folato, inibindo a enzima diidrofolato redutase (DHFR), envolvida na replicação do parasita.^{16,17}

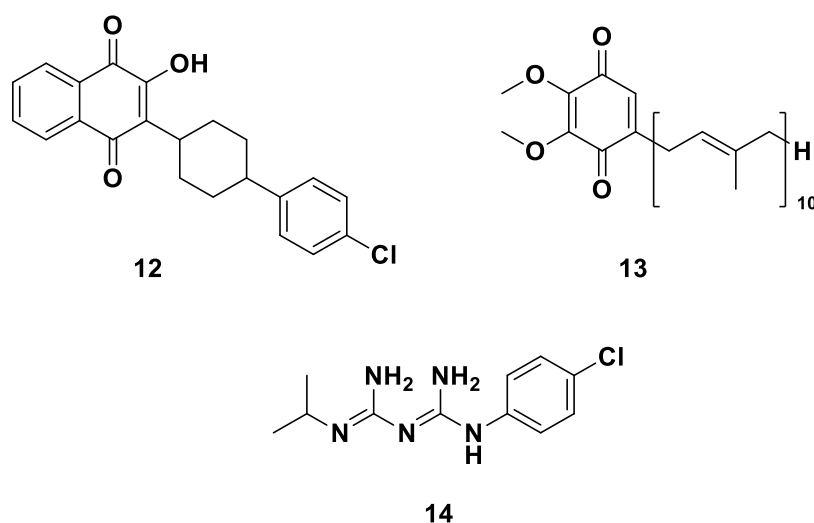


Figura 5 – Estrutura química da atovaquona (**12**), ubiquinona (**13**) e proguanil (**14**).¹³

No ano de 2021, a OMS recomendou a primeira vacina contra a malária. Denominada RTS,S/AS01 (Mosquirix[®]), ela tem sido utilizada em crianças a partir dos cinco meses de idade para prevenção da doença por *P. falciparum* em zonas onde a transmissão é moderada a alta. Em esquema de 4 doses e com eficácia modesta, ela atua na fase pré-eritrocítica, ou seja, impede os parasitas de infectar as células do fígado do hospedeiro. Em comparação a áreas onde a vacina não foi implementada, houve uma redução considerável da malária grave (45%) e uma queda de 13% das mortes na primeira infância (período que compreende os primeiros 72 meses de vida).^{2,18}

Em outubro de 2023, uma segunda vacina, a R21/Matrix-M, foi indicada pela OMS como segura e eficaz contra a malária. Também de 4 doses, possui ação semelhante à RTS,S, porém com maior eficiência (68-75%) e menor custo por dose. Apesar das vacinas para controle da malária significarem um avanço apreciável, seu fornecimento inicial é insuficiente para cobrir toda população-alvo.¹⁸

Atualmente, o tratamento da malária consiste em terapias combinadas, visando combater o parasita por mais de um alvo bioquímico, visto que a monoterapia pode contribuir para seleção de parasitas resistentes aos fármacos. A recomendação é o uso de terapias combinadas com artemisinina **(7)** (TCAs), onde um derivado de artemisinina **(7)** (que possui ação rápida e é eliminado rapidamente) é associado com outro antimalárico de eliminação mais lenta e prolongada.¹⁹ A seguir, é apresentado, de forma resumida, os esquemas recomendados para o tratamento da malária não-complicada no Brasil.

Tabela 2. Esquemas de tratamento recomendados no Brasil.²⁰

Espécie	Medicamentos	Observação
<i>P. vivax</i> e <i>P. ovale</i>	Cloroquina e primaquina	Gestantes e crianças com menos de 6 meses não podem usar primaquina
<i>P. malariae</i>	Apenas cloroquina por três dias	-
<i>P. falciparum</i>	TCA, como artesunato/mefloquina e artemeter/lumefantrina	TCA podem ser utilizados em mulheres grávidas, quando necessário, ao longo de toda a gestação, sempre monitorando a gestante
Infecções mistas	Artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina, associados à primaquina por sete dias	Infecções por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> (ou <i>P. ovale</i>)

A malária complicada, no país, ocorre majoritariamente por infecções de *P. falciparum* e, em menor quantidade, *P. vivax*, sendo que, às vezes, também pode estar associada a uma coinfeção, por exemplo a dengue. A recomendação é de que o tratamento seja feito com artesunato **(8)** intravenoso ou intramuscular durante, no mínimo, 24 horas e até que o paciente possa tomar medicação oral. O uso de clindamicina **(15)** intravenoso, apesar de sua ação mais lenta, é uma alternativa quando artesunato **(8)** não estiver disponível para uso imediato. Posteriormente, deve ser preconizado o tratamento de acordo com a espécie parasitária, prescrevendo um TCA por três dias.²⁰

Além dos medicamentos, também é recomendada a prevenção contra picadas de insetos, a qual pode ser feita pelo uso de medidas de barreira (como telas, ar-

condicionado e mosquiteiro impregnado com inseticida) e a aplicação de repelente à base de *N-N*-dietilmetatoluamida (DEET, **16**).²⁰

Um inseticida muito conhecido e que, atualmente, possui rigoroso controle de utilização e/ou é proibido em diversos países, é o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT, **17**). Devido a sua eficácia, foi utilizado excessivamente e os insetos adquiriram resistência, fazendo com que doses maiores passassem a ser necessárias. Seus malefícios foram descobertos quando entenderam que se tratava de um composto organoclorado que não possui o inseto como alvo específico, tendo elevada capacidade de bioacumulação, inclusive em seres humanos.²¹

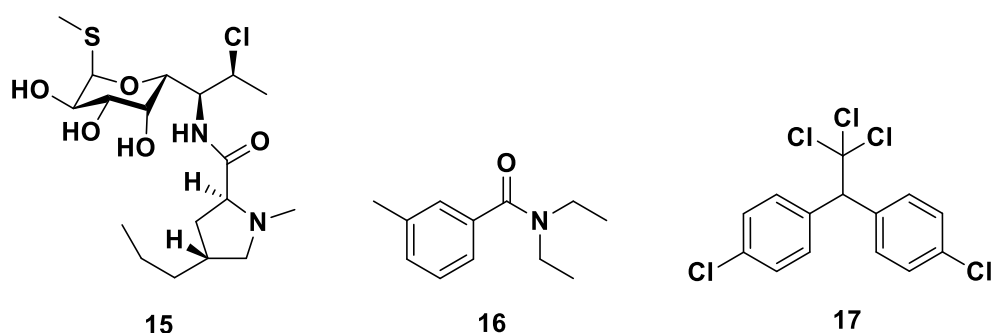


Figura 6 - Estrutura química do fármaco clindamicina (**15**), utilizado no tratamento da malária grave, e dos inseticidas DEET (**16**) e DDT (**17**).

Apesar dos avanços no controle da doença, a propagação da resistência aos inseticidas por parte dos vetores e as crescentes falhas terapêuticas, principalmente em áreas endêmicas, formam uma barreira para a erradicação da malária. O longo tempo de tratamento, os efeitos adversos severos, o uso inadequado e a administração de fármacos com baixa qualidade, somados com a grande capacidade de adaptação dos parasitas (principalmente do *P. falciparum*), são fatores que corroboram para seleção e espalhamento de parasitas resistentes.¹³

Desde o final dos anos 50 são relatadas ocorrências de cepas de *P. falciparum* resistentes, existindo uma variação em sua distribuição geográfica. Primeiro foi o proguanil (**14**) e alguns anos depois a cloroquina (**4**). No caso da atovaquona (**12**), casos de resistência foram descritos após 10 anos do início de sua utilização. Hoje também já existem casos de resistência emergente aos derivados da artemisinina (**7**) e, conseqüentemente, aos medicamentos utilizados em conjunto nas TCAs. A **Figura 7** esquematiza, de forma cronológica, a descoberta dos antimaláricos, bem como o aparecimento de resistência de *P. falciparum* aos mesmos.^{19,22}

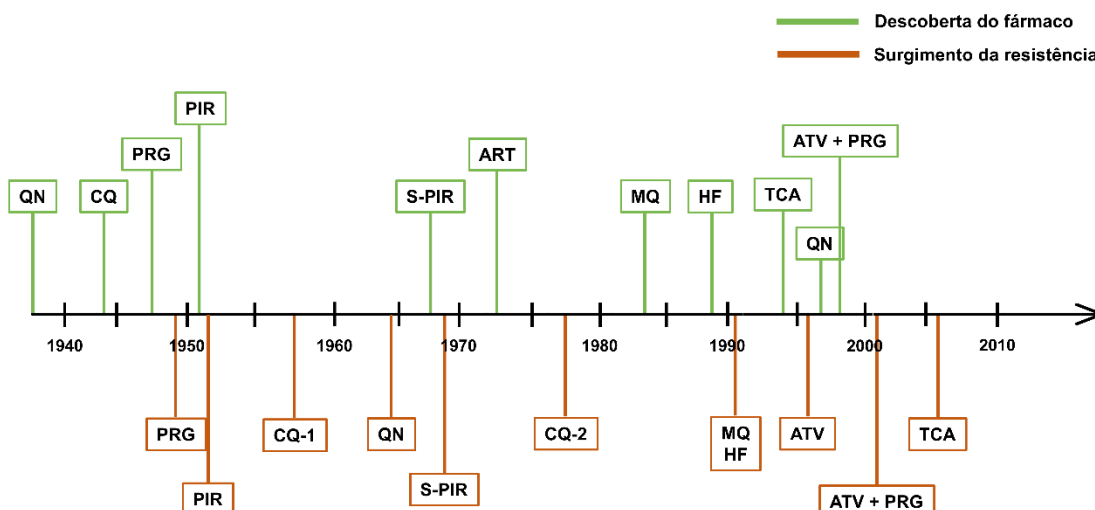


Figura 7 - Esquema cronológico aproximado da descoberta dos fármacos antimaláricos (em verde) e surgimento da resistência de *P. falciparum* aos mesmos (em vermelho). QN = quinina; CQ = cloroquina; PRG = proguanil; S-PIR = sulfadoxina-pirimetamina; ART = artemisinina; MQ = mefloquina; HF = halofantrina; TCA = terapia combinada de artemisinina; ATV = atovaquona; ATV + PRG = atovaquona + proguanil. Adaptado de Pradines, 2010.

Diante dessas informações, é visível uma melhora da situação da malária frente aos avanços obtidos em sua prevenção, diagnóstico e tratamento. Entretanto, com o surgimento de cepas multirresistentes e considerando a variabilidade entre as espécies, se faz essencial o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos.

1.5 Docagem Molecular

O planejamento e desenvolvimento de novos fármacos é um processo extenso que envolve altos custos. Nesse sentido, a modelagem molecular possui um papel fundamental ao auxiliar em uma maior compreensão das interações ligante-receptor o que, conseqüentemente, permite priorizar moléculas que demonstram maior eficiência biológica em triagens experimentais. Assim, seu uso possibilita a redução de gastos, tempo, reagentes e também do impacto ambiental. Em outras palavras, a modelagem permite um planejamento racional de compostos bioativos.²³

Dois técnicas largamente utilizadas são: 1) planejamento baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*), onde a estrutura da macromolécula é conhecida experimentalmente ou obtida através de modelagem por homologia, e 2) planejamento baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*), em que se utiliza o estudo de características de ligantes bioativos. É aconselhável que as propriedades farmacodinâmicas (como afinidade, potência e seletividade) e farmacocinéticas de ADMET (absorção, distribuição,

metabolismo, excreção e toxicidade) sejam consideradas em conjunto com essas técnicas.^{23,24}

Dentro do SBDD, como uma das principais ferramentas, temos a docagem molecular. Ela é capaz de prever a orientação e a conformação preferencial, além das interações que ocorrem no sítio de ligação de uma macromolécula (por exemplo um receptor ou enzima) e seu ligante, sendo muito aplicada na triagem virtual de novas moléculas.²⁵ Na **Figura 8** são apresentadas as principais etapas desta abordagem.

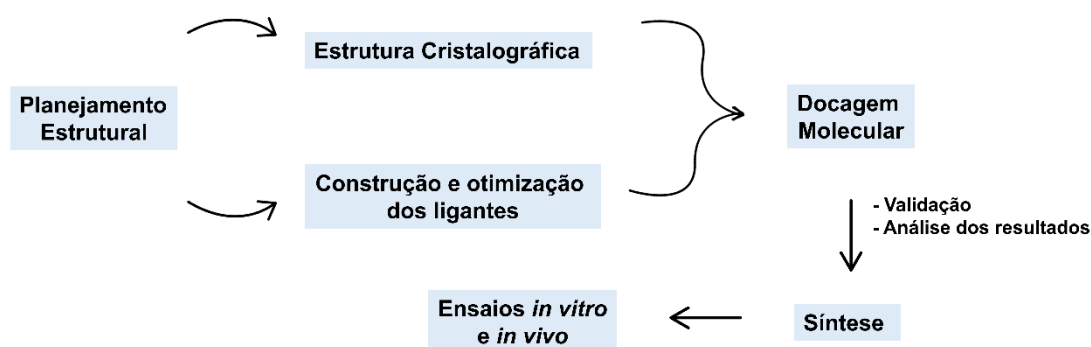


Figura 8 - Principais etapas realizadas utilizando a técnica SBDD. Adaptado de Batista, 2018.

De maneira resumida, um conjunto de pequenas moléculas são docadas com a macromolécula em um sítio de ligação previamente definido e validado. Essa validação pode ser feita, dentre outras formas, por redocagem, encaixando novamente o ligante co-cristalizado para comparação entre as interações já calculadas e as obtidas experimentalmente. A melhor pose de acoplamento resultante para cada molécula recebe uma pontuação a qual, juntamente com a análise das interações ligante-macromolécula e a observação da orientação e da conformação adquiridas, permite a escolha dos compostos mais promissores que, conseqüentemente, serão priorizados na etapa de síntese.^{24,26}

Um programa utilizado para docagem molecular é o GOLD, o qual mostra ótimo desempenho para previsão de modos de ligação e na triagem virtual. Possui quatro funções de pontuação disponíveis: GoldScore, ChemScore, ASP e CHEMPLP. Dentre as funções, a GoldScore é baseada em campos de força, ASP em conhecimento, enquanto ChemScore e ChemPLP são classificadas como funções empíricas.^{26,27}

Em um trabalho de modelagem e síntese realizado anteriormente em nosso grupo de pesquisa²⁸, foram publicadas uma série de substâncias baseadas na atovaquona (**12**), explorando o núcleo ftalimídico (**Figura 9**), visando a inibição do citocromo bc1.

As ftalimidas são uma classe importante de compostos, sendo amplamente utilizadas em síntese orgânica e, além disso, estão envolvidas com uma gama de atividades biológicas, atuando, por exemplo, como agentes anti-inflamatório, anticâncer e antimicrobiano.²⁹

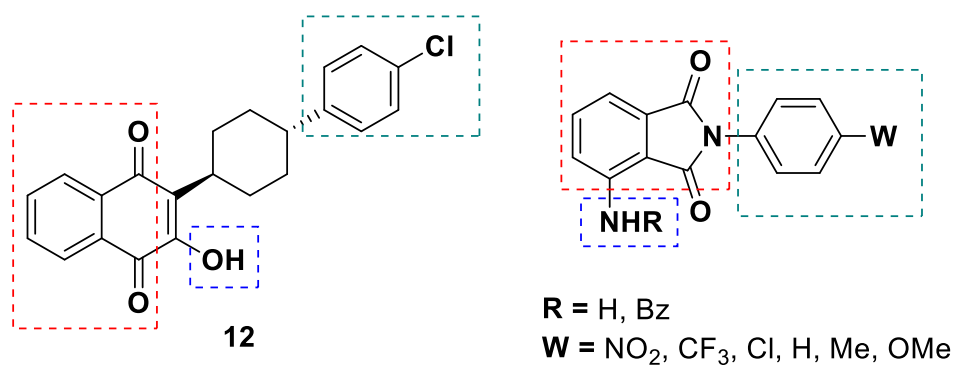


Figura 9 - Planejamento estrutural dos fragmentos de N-fenil ftalimida da atovaquona. Adaptado de Okada, 2018.

Como já mencionado, a inibição do citocromo bc1 leva a perda da função mitocondrial do parasita. Isso porque impede a transferência de elétrons e, conseqüentemente, interrompe a produção de trifosfato de adenosina (ATP), principal fonte de energia para as células do *Plasmodium*. Sem energia, ele não consegue realizar atividades essenciais para sua sobrevivência, havendo acúmulo de substâncias tóxicas, o que leva à sua morte. Além disso, a inibição deste complexo também bloqueia a enzima aceitadora de elétrons conhecida como diidroorotato desidrogenase (DHODH), interferindo na biossíntese de pirimidinas. Por esses motivos e com a introdução da atovaquona (**12**) no mercado, o citocromo bc1 tornou-se um alvo validado para terapia antimalárica, sendo suficientemente distinto das mitocôndrias dos hospedeiros, o que confere aos fármacos que atuam em seu sítio ativo uma ação seletiva contra o parasita.^{28,30}

2. OBJETIVO

O trabalho aqui descrito visa a obtenção de derivados ftalimídicos, em quantidade e em grau de pureza adequados, visando uma atividade inibitória frente ao citocromo bc1 de *P. falciparum*. Atualmente, não está disponível uma estrutura cristalográfica resolvida do complexo bc1 de *P. falciparum*, e, por compartilharem de uma alta identidade de sequência, o citocromo bc1 de *Saccharomyces cerevisiae* é adotado

como modelo para estudos computacionais envolvendo esse complexo enzimático. Assim, podemos descrever as metas específicas a seguir:

- Realização de estudos computacionais para obtenção de um modelo do citocromo bc1 de *Saccharomyces cerevisiae* que possibilite a compreensão das interações entre compostos com atividade inibitória frente ao mesmo;
- Planejamento e triagem virtual de 48 derivados que buscam explorar o potencial do núcleo ftalimídico;
- Síntese, isolamento, purificação e caracterização dos candidatos mais promissores.

3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Com base na estrutura de **18 (Figura 10)**, foi realizado o planejamento estrutural, com a finalidade de se explorar o potencial do núcleo ftalimídico na descoberta de novas substâncias-líderes para o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos.

Neste contexto, propõem-se o estudo computacional de 48 derivados ftalimídicos (**19av'**), em que a subunidade 1,4-naftoquinona foi mantida, porém houve a introdução de diferentes grupos em R, permitindo estimar a contribuição do volume nas interações ligante-biomacromolécula. Já em Ar foram propostos 12 substituintes com um anel heteroaromático piridínico, contendo o átomo de nitrogênio em orto, meta ou para em relação à porção ftalimídica, e outros 36 com diferentes substituintes doadores (OCH₃) ou retiradores (NO₂ ou CF₃) de elétrons.

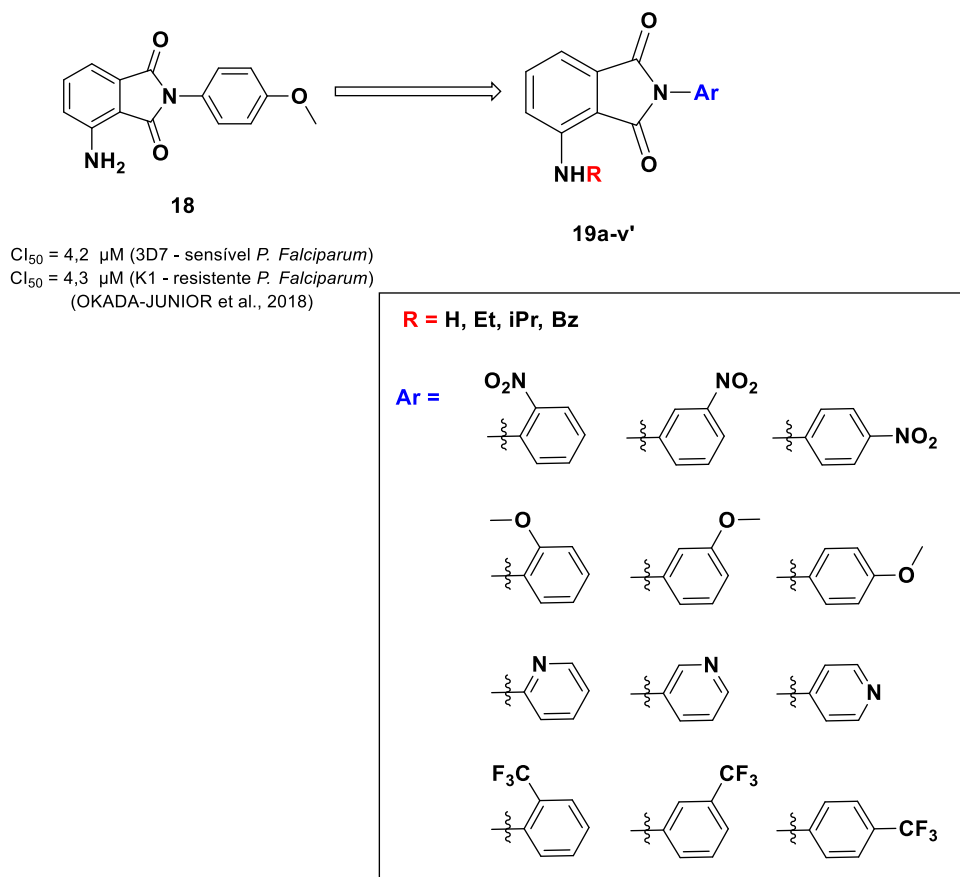


Figura 10 – Planejamento estrutural dos derivados ftalimídicos (**19a-v'**).

4. MATERIAL E METODOLOGIA

Modelagem Molecular

A estrutura cristalográfica do citocromo bc1 de *Saccharomyces cerevisiae*, complexada com o ligante estigmatelina, foi obtida no site PDB (Protein Data Bank, PDB ID 3CX5), tendo sido elucidada por meio da técnica de difração de raios X e apresentando resolução de 1,90 Å. Através do programa Discovery Studio Visualizer (DSV), foi feita uma análise de suas interações relevantes com o ligante co-cristalizado, SMA4025, identificando os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação e suas respectivas interações.

Para validação do modelo computacional, foi realizada a redocagem. Ela foi feita em modo rígido, preservando as posições dos átomos dos resíduos de aminoácidos da estrutura cristalográfica e foram adicionados 39490 átomos de hidrogênio pelo programa GOLD. A estrutura química tridimensional do ligante co-cristalizado (Estigmatelina, SMA4025) foi extraída e salva em uma pasta como arquivo *.mol2. As

coordenadas XYZ ($x = 17,0371$; $y = -21,8159$; $z = 71,3414$) do átomo de carbono n° 2 (**Figura 11**) do ligante estigmatelina (**20**), determinadas no próprio GOLD, foram utilizadas na definição do sítio de ligação. O valor do raio determinado na redocagem foi de 10 Å. Foram calculadas 50 modos de ligação para a estrutura química otimizada do ligante, utilizando o SMA4025 como referência para determinação do RMSD.

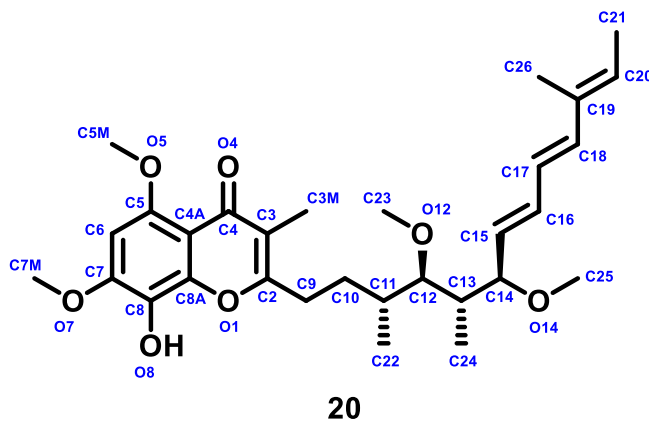


Figura 11 - Estrutura química da estigmatelina (**20**).

A fim de escolher a função de pontuação adequada, a redocagem foi realizada utilizando as funções: ASP, CHEMPLP e ChemScore. Após o término dos cálculos, os complexos ligante-biomacromolécula com maiores valores de pontuação e menores valores de RMSD foram extraídos e salvos, em formato de extensão *.mol2. A GoldScore não foi empregue neste trabalho pois, ao rodar os cálculos com a mesma, estes apresentavam erro antes de serem finalizados.

Cada derivado teve sua estrutura química tridimensional construída utilizando o software DSV e seu estado de protonação em pH=7,4 (pH fisiológico) determinado pelo programa MarvinSketch. A fim de melhorar a qualidade das estruturas, as moléculas foram submetidas à otimização por meio do cálculo semi empírico PM7 com o programa MOPAC2016, na interface do software Mercury. Em seguida, a docagem molecular foi realizada, com os mesmos parâmetros utilizados na redocagem, usando a função de pontuação eleita, CHEMPLP.

Após o término dos cálculos, o complexo ligante-biomacromolécula do modo de ligação de maior pontuação de cada ligante foi extraída e salva como arquivo *.mol2. Caso os dois modos de ligação gerados com maior valor de pontuação tivessem diferença de pontuação menor que 0,5 e orientações distintas, o critério utilizado para selecionar o melhor se baseou nas interações ligante-proteína com resíduos de aminoácidos chave. As interações foram identificadas e classificadas no programa

DSV, sendo construída uma tabela de interações para auxiliar na análise. A escolha dos melhores derivados foi baseada na presença das interações previstas com os resíduos catalíticos H181 e E272, assim como na quantidade de resíduos chave que eles interagiram.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise das Interações Presentes na Estrutura Cristalográfica

De acordo com o programa DSV, o ligante SMA4025 (estigmatelina co-cristalizada) participa de 26 interações com 17 resíduos de aminoácidos distintos, como ilustrado a seguir na **Tabela 3**.

Tabela 3. Interações entre os resíduos de aminoácidos e o ligante SMA4025 no sítio de ligação.

Ligante	H181	E272	C180	M139	I147	A126	M295	V146	I269	L130	L275	L165	F129	Y279	P271	F151	I125	Soma
SMA4025																		26

	Hidrofóbica		Empilhamento-T	π -enxofre
	Ligação de hidrogênio		Empilhamento- π	π -sigma
	Ligação de hidrogênio não-clássica		Átomos da ligação peptídica	Halogênio

O modo de ligação no qual se encontra a estigmatelina (**20**) co-cristalizada e os resíduos presentes na região estão representados na **Figura 12**.

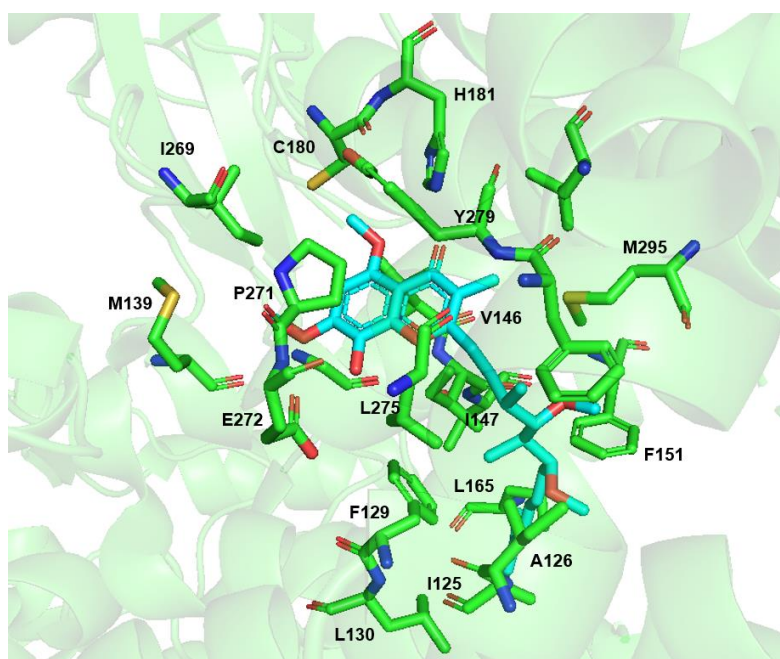


Figura 12 – Modo de ligação do ligante co-cristalizado SMA4025 (carbonos em azul claro e oxigênios em vermelho) e resíduos da região do sítio ativo do citocromo bc1. Átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofres em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

O grupo hidroxila da estigmatelina (**20**) interage com o ácido carboxílico (cadeia lateral) do resíduo E272 através de ligação de hidrogênio (2,80 Å), atuando como doadora de ligação de hidrogênio. Há três ligações de hidrogênio não clássicas, que ocorrem entre as subunidades metoxila e os resíduos C180 (3,64 Å), M139 (3,58 Å) e Y279 (3,75 Å), e também uma interação π -sigma entre a subunidade aromática e a cadeia lateral do resíduo I147 (3,57 Å). Além disso, ocorrem vinte e uma interações hidrofóbicas, dentre as quais doze são do tipo alquil e nove π -alquil. Em relação as interações hidrofóbicas do tipo alquil, três ocorrem entre o grupo metoxila presente no C5 e a cadeia lateral dos resíduos C180 (3,77 Å), V146 (4,31 Å) e I269 (4,73 Å). Outras duas interações são entre o grupo metoxila do C7 e os resíduos M139 (4,35 Å) e I269 (4,75 Å). Também ocorrem interações entre a ramificação do ligante presente no carbono 2 com os resíduos A126 (4,45 Å), I147 (4,21 Å e 4,14 Å), L130 (4,64 Å), L275 (4,47 Å) e I125 (4,58 Å). Por fim, ocorre uma interação entre a metila C3M e o resíduo M295 (4,24 Å). Dentre as interações do tipo π -alquil, três ocorrem entre a subunidade aromática do ligante e a cadeia lateral dos resíduos V146 (4,77 Å) e P271 (4,70 Å e 3,87 Å). Outras duas interações acontecem entre o grupo metoxila do carbono 5 e os resíduos Y279 (4,78 Å) e H181 (4,19 Å). As demais ocorrem com a ramificação do ligante presente no carbono 2, interagindo com os resíduos L165 (4,58 Å), F129 (4,90 Å e 4,98 Å) e F151 (5,01 Å).

Tabela 4. Tabela com as interações previstas entre SMA4025 e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Hidrofóbica	4,19 Å
E272	Ligação de hidrogênio	2,80 Å
C180	Ligação de hidrogênio não-clássica	3,64 Å
	Hidrofóbica	3,77 Å
M139	Ligação de hidrogênio não-clássica	3,58 Å
	Hidrofóbica	4,35 Å
I147	π -sigma	3,57 Å
	Hidrofóbica	4,21 Å
	Hidrofóbica	4,41 Å
A126	Hidrofóbica	4,45 Å
M295	Hidrofóbica	4,24 Å
V146	Hidrofóbica	4,31 Å
	Hidrofóbica	4,77 Å
I269	Hidrofóbica	4,73 Å
	Hidrofóbica	4,75 Å
L130	Hidrofóbica	4,64 Å
L275	Hidrofóbica	4,47 Å
L165	Hidrofóbica	4,58 Å
F129	Hidrofóbica	4,90 Å
	Hidrofóbica	4,98 Å
Y279	Hidrofóbica	3,75 Å
	Hidrofóbica	4,78 Å
P271	Hidrofóbica	4,70 Å
	Hidrofóbica	3,87 Å
F151	Hidrofóbica	5,01 Å
I125	Hidrofóbica	4,58 Å

Verificando-se os ângulos diedros, phi (ϕ) e psi (Ψ), através do gráfico de Ramachandran (**Figura 13**), gerado no servidor online procheck, é possível constatar que não há resíduos de aminoácidos chave em regiões proibidas, somente em regiões favoráveis e permitidas. Do total, 90,5% dos resíduos estão em regiões favoráveis, 9,3% em regiões permitidas e 0,2% em regiões proibidas.

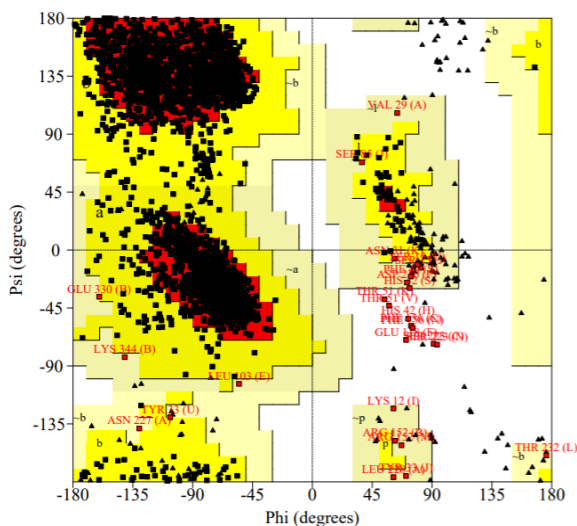


Figura 13 – Gráfico de Ramachandran, gerado no servidor online procheck, para a estrutura cristalográfica 5CX5.

5.2 Redocagem da Estigmatelina

Dentre as três funções utilizadas, a função ASP foi ineficaz na predição da pose da estigmatelina (**20**), não apresentando interações com um dos resíduos de aminoácidos chave, o E272. A CHEMPLP se mostrou adequada para o trabalho, apresentando menor diferença entre o RMSD do modo de ligação com maior valor de pontuação e o menor valor de RMSD obtido, em comparação com a função ChemScore. Além disso, segundo o CASF (Avaliação Comparativa de Funções de Pontuação), a CHEMPLP é uma das funções de pontuação que exibe um desempenho mais equilibrado nos testes de validação.³¹

O modo de ligação com maior valor de pontuação (115.1068) obtida na redocagem da estigmatelina (**20**) apresenta 24 interações com 15 resíduos de aminoácidos distintos, não interagindo com os resíduos de aminoácidos F151 e I125. Como é possível observar na **Figura 14**, os átomos da cadeia carbônica estão deslocados em relação à posição do ligante co-cristalizado, o que pode ter levado ao seu afastamento de alguns resíduos, impossibilitando assim a interação. Porém, as subunidades aromáticas não se distanciam significativamente.

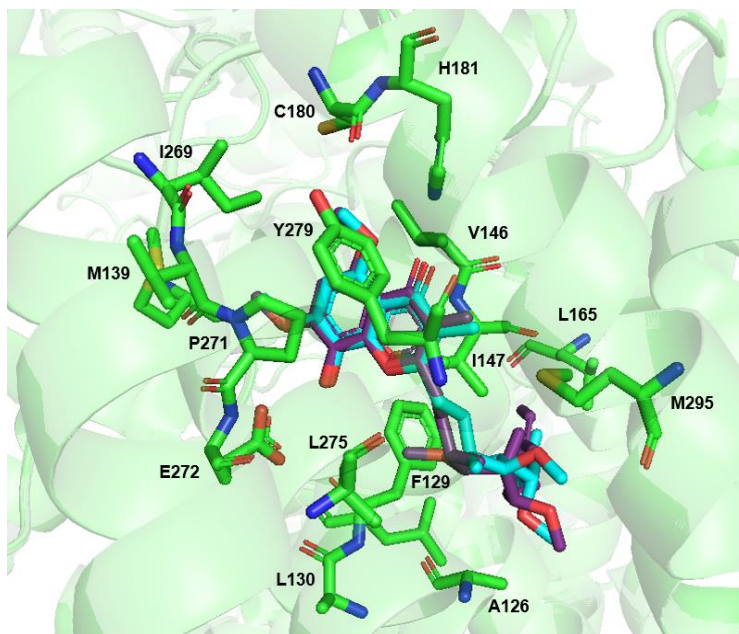


Figura 14 - Modo de ligação do ligante co-cristalizado (carbonos em azul claro) sobreposto ao docado (carbonos em roxo), mostrando também os resíduos de aminoácidos. Átomos de hidrogênio foram otimizados para maior clareza. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofres em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

A função de pontuação CHEMPLP prediz a ocorrência de duas ligações de hidrogênio. A primeira acontece entre a carbonila ligada diretamente à subunidade aromática do ligante e o grupo imidazol (cadeia lateral) do resíduo H181 (1,63 Å). A segunda ocorre entre a hidroxila do ligante e o ácido carboxílico (cadeia lateral) do resíduo E272 (1,77 Å). Há uma interação hidrofóbica do tipo π -sigma entre a subunidade aromática e a cadeia lateral de I147 (3,64 Å). Além disso, a estigmatelina (**20**) realiza outras vinte e uma ligações hidrofóbicas. Uma delas é do tipo empilhamento-T entre a subunidade aromática do ligante e a fenila de Y279 (5,08 Å). Outras seis são do tipo π -alquil, ocorrendo duas com F129 (5,02 Å e 4,76 Å), duas com P271 (3,90 Å e 4,57 Å), uma com H181 (4,52 Å) e uma com V146 (4,79 Å). Por fim, quatorze são do tipo alquil, sendo os resíduos envolvidos: C180 (3,51 Å), M139 (4,24 Å), I147 (4,13 Å e 3,97 Å), A126 (4,66 Å), M295 (4,62 Å e 4,92 Å), V146 (4,00 Å), I269 (4,44 Å e 4,58 Å), L130 (4,86 Å), L275 (4,94 Å e 4,59 Å), e L165 (3,73 Å). A **Tabela 5** mostra tais interações aqui descritas.

Tabela 5. Interações relevantes entre os resíduos chave na redocagem da estigmatelina (**20**).

Ligante	PLP	H181	E272	C180	M139	I147	A126	M295	V146	I269	L130	L275	L165	F129	Y279	P271	F151	I125	Soma	
SMA4025	-																			26
Estigm.	115,1068																			24

	Hidrofóbica		Empilhamento-T	π -enxofre
	Ligação de hidrogênio		Empilhamento- π	π -sigma
	Ligação de hidrogênio não-clássica		Átomos da ligação peptídica	Halogênio

5.3 Docagem da Atovaquona

O modo de ligação com maior valor de pontuação obtido na docagem apresenta 9 interações com 6 resíduos de aminoácidos distintos, sendo que somente 5 destes estão presentes para a estigmatelina (**20**), como pode ser observado na **Tabela 6**.

Tabela 6. Interações previstas para atovaquona (**12**) com resíduos de aminoácidos do sítio de ligação.

Ligante	PLP	H181	E272	C180	M139	I147	A126	M295	V146	I269	L130	L275	L165	F129	Y279	P271	F151	I125	F296	Soma
SMA4025	-																			26
Estigm.	115,1068																			24
Atovaq.	63,1564																			9

	Hidrofóbica		Empilhamento-T	π -enxofre
	Ligação de hidrogênio		Empilhamento- π	π -sigma
	Ligação de hidrogênio não-clássica		Átomos da ligação peptídica	Halogênio

A função de pontuação prediz a ocorrência de uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila presente no ligante e o grupo imidazol (cadeia lateral) do resíduo H181, com distância de 2,10 Å. A subunidade p-clorobenzeno interage com a cadeia lateral de M295, participando de uma ligação π -enxofre (3,50 Å), e ainda interage com F296 (5,00 Å) por meio de uma interação do tipo empilhamento-T. O átomo de cloro participa de duas ligações hidrofóbicas, sendo uma delas do tipo alquil com o resíduo M295 (4,78 Å) e outra π -alquil com a cadeia lateral de F296 (4,11 Å). A subunidade naftoquinona participa de três interações, sendo todas do tipo π -alquil. Duas ocorrem com a cadeia lateral do resíduo P271 (4,20 Å e 3,97 Å) e a última com V146 (4,60 Å). Por fim, o grupo cicloexila realiza uma ligação hidrofóbica alquil com a cadeia lateral do resíduo L275 (5,08 Å). A **Figura 15** apresenta o modo de ligação descrito acima.

Tabela 7. Tabela com as interações previstas entre a atovaquona (**12**) e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	2,10 Å
M295	π -enxofre	3,50 Å
	Hidrofóbica	4,78 Å
V146	Hidrofóbica	4,60 Å
L275	Hidrofóbica	5,08 Å
P271	Hidrofóbica	4,20 Å
	Hidrofóbica	3,97 Å
F296	Empilhamento-T	5,00 Å
	Hidrofóbica	4,11 Å

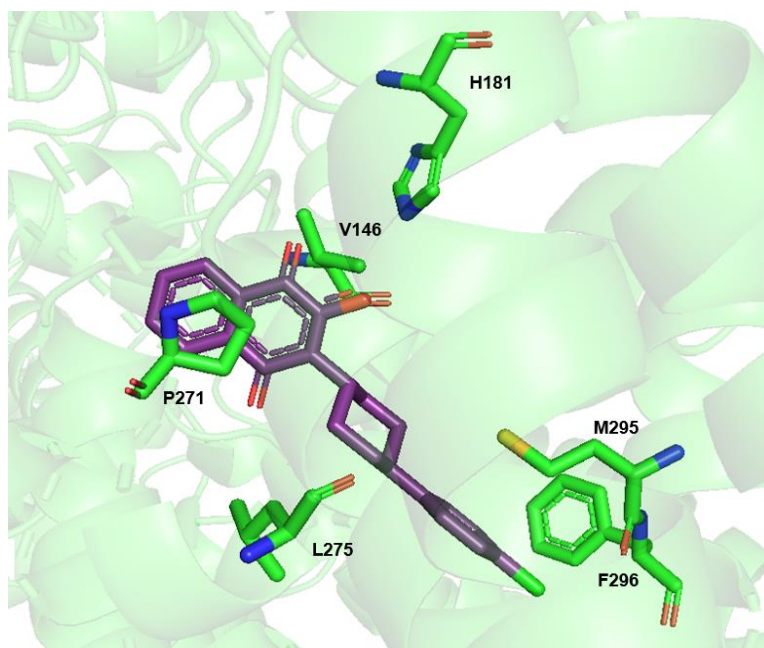


Figura 15 - Modo de ligação com melhor pontuação da atovaquona (**12**), mostrando também os resíduos de aminoácidos. Átomos de hidrogênio foram otimizados para maior clareza. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofres em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

5.4 Triagem Virtual dos Derivados

Após validação do modelo computacional, os compostos tiveram seus melhores modos de ligação de docagem molecular analisados (**Tabela 8**).

Tabela 8. Interações previstas entre as melhores poses dos compostos planejados com resíduos de aminoácidos do sítio ativo de citocromo bc1, utilizando a função CHEMPLP.

Ligante	PLP	H181	E272	C180	M139	I147	A126	M295	V146	I269	L130	L275	L165	F129	Y279	P271	F151	I125	Soma	
SMA4025	-																			26
Estigm.	115,11																			24
Atovaquon	63,156																			7
BzAr1	91,668																			11
BzAr2	78,39																			9
BzAr3	74,224																			8
BzAr4	90,896																			13
BzAr5	83,526																			9
BzAr6	78,007																			9
BzAr7	81,936																			10
BzAr8	83,325																			12
BzAr9	83,202																			11
BzAr10	83,532																			14
BzAr11	79,838																			12
BzAr12	78,266																			9
EtAr1	76,959																			14
EtAr2	72,239																			10
EtAr3	72,952																			8
EtAr4	74,679																			13
EtAr5	72,991																			11
EtAr6	74,696																			13
EtAr7	68,056																			12
EtAr8	68,11																			12
EtAr9	68,086																			11
EtAr10	66,173																			11
EtAr11	76,518																			11
EtAr12	78,678																			11
HAr1	67,403																			10
HAr2	63,484																			7
HAr3	62,208																			6
HAr4	64,425																			9
HAr5	64,223																			9
HAr6	64,273																			9
HAr7	59,973																			8
HAr8	58,288																			7
HAr9	57,87																			10
HAr10	67,631																			8
HAr11	68,191																			7
HAr12	67,657																			8
iPrAr1	79,073																			12
iPrAr2	72,825																			9
iPrAr3	73,62																			8
iPrAr4	78,475																			11
iPrAr5	78,177																			11
iPrAr6	74,475																			11
iPrAr7	71,859																			9
iPrAr8	70,585																			10
iPrAr9	69,12																			10
iPrAr10	82,237																			10
iPrAr11	78,291																			11
iPrAr12	79,369																			11

	Hidrofóbica	Empilhamento-T	π-enxofre
	Ligação de hidrogênio	Empilhamento-π	π-sigma
	Ligação de hidrogênio não-clássica	Átomos da ligação peptídica	Halogênio

A partir da presença das interações com os resíduos catalíticos H181 e E272, e as demais interações com resíduos de aminoácidos chave, assim como o valor de pontuação, os candidatos mais promissores foram selecionados para etapa de síntese, isolamento, purificação e caracterização. Suas fórmulas estruturais são demonstradas pela **Figura 16**.

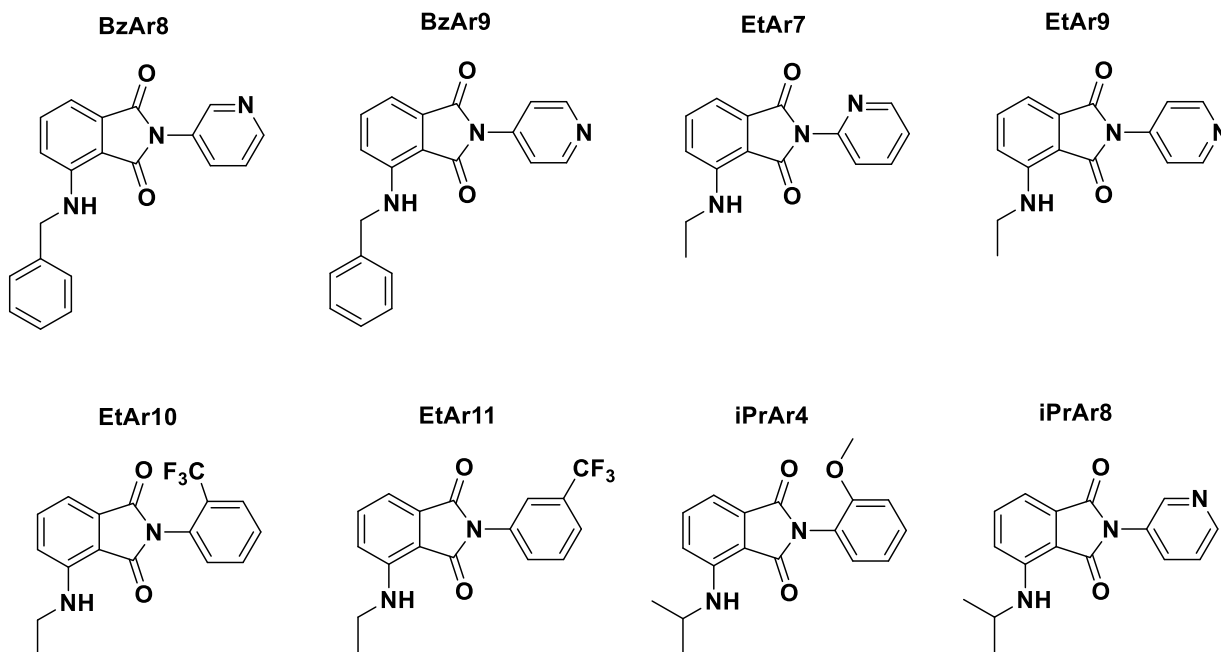


Figura 16 – Fórmula estrutural dos 8 ligantes selecionados via ancoragem molecular pela função de pontuação CHEMPLP.

É possível observar que todos os ligantes compartilham do mesmo núcleo ftalimídico, possuindo diferentes substituintes. O anel heteroaromático piridínico (com o átomo de nitrogênio em orto, meta ou para) está presente em cinco destes ligantes, enquanto o substituinte trifluorometil está em dois e a metoxila somente em um. O programa MarvinSketch prediz que todas as poses melhores ranqueadas não estão ionizadas em pH intracelular (pH=7,4).

Dois modos de ligação melhor ranqueados (**BzAr8** e **iPrAr4**) interagem com 9 resíduos de aminoácidos de interesse, três (**BzAr9**, **EtAr11** e **iPrAr8**) participam de interações com 8 e outros três (**EtAr7**, **EtAr9** e **EtAr10**) apenas com 7 resíduos de interesse. Todas estabelecem interações com os resíduos H181 e E272, como é ilustrado na **Tabela 9**.

Tabela 9. Interações previstas entre as 8 melhores poses de ligantes com resíduos de aminoácidos do sítio de ligação.

Ligante	PLP	H181	E272	C180	M139	I147	A126	M295	V146	I269	L130	L275	L165	F129	Y279	P271	F151	I125	W142	G143	L282	V270	Y132	SOMA
SMA4005	-																							26
Estigm.	115,1068																							24
BzAr8	83,3245																							14
BzAr9	83,2022																							14
EtAr7	68,0562																							14
EtAr9	68,0864																							14
EtAr10	66,1725																							14
EtAr11	76,5178																							11
iPrAr4	78,475																							14
iPrAr8	70,5851																							12

	Hidrofóbica		Empilhamento-T	π-enxofre
	Ligação de hidrogênio		Empilhamento-π	π-sigma
	Ligação de hidrogênio não-clássica		Átomos da ligação peptídica	Halogênio

O melhor modo de ligação ranqueado do ligante **BzAr8** está representado na **Figura 17**. De acordo com a previsão, a subunidade ftalimídica participa de duas interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,75 Å) e P271 (4,35 Å), uma ligação π -enxofre com resíduo M295 (4,54 Å) e duas interações do tipo empilhamento-T com resíduo Y279 (4,86 Å e 4,87 Å). Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (2,74 Å), atuando como acceptor de ligação de hidrogênio. A piridina do ligante apresenta uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil com a cadeia lateral do resíduo P271 (4,40 Å), uma hidrofóbica do tipo empilhamento amida- π abrangendo a ligação peptídica entre os resíduos W142 e G143 (4,41 Å). Dois hidrogênios presentes na piridina formam ligações de hidrogênio não-clássicas com os resíduos E272 (2,83 Å) e M139 (2,59 Å). O grupo benzila participa de duas ligações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos I125 (5,01 Å) e M295 (4,65 Å) e, por fim, o carbono adjacente forma uma ligação de hidrogênio não-clássica com resíduo L275 (2,58 Å).

Tabela 10. Tabela com as interações previstas entre **BzAr8** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	2,74 Å
E272	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,83 Å
M139	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,59 Å
M295	π -enxofre	4,54 Å
	π -alquil	4,65 Å
V146	π -alquil	4,75 Å
L275	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,58 Å
Y279	Empilhamento-T	4,86 Å
	Empilhamento-T	4,87 Å
P271	π -alquil	4,35 Å
	π -alquil	4,40 Å
I125	π -alquil	5,01 Å
W142	Ligação peptídica	4,41 Å
G143	Ligação peptídica	4,41 Å

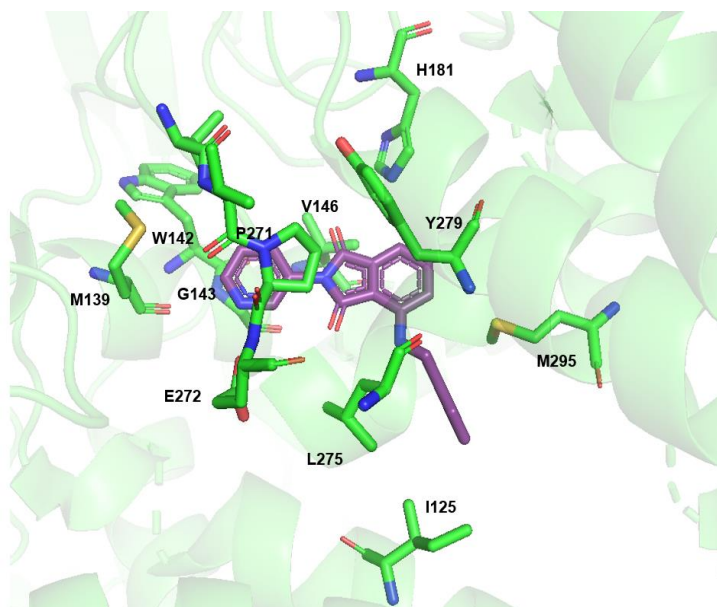


Figura 17 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **BzAr8** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **BzAr8** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

Como é demonstrado pela **Figura 18**, no modo de ligação de maior pontuação do ligante **BzAr9** a subunidade ftalimídica participa de três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,88 Å), L282 (4,93 Å) e P271 (4,53 Å), uma ligação π -enxofre com resíduo M295 (4,12 Å) e duas interações do tipo empilhamento-T com o resíduo Y279 (5,02 Å e 4,81 Å). Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (2,28 Å), atuando comoceptor de ligação de hidrogênio. A piridina do ligante apresenta uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil com a cadeia lateral do resíduo P271 (4,27 Å), uma hidrofóbica do tipo empilhamento amida- π abrangendo a ligação peptídica entre os resíduos W142 e G143 (4,46 Å). O hidrogênio presente no carbono adjacente ao nitrogênio da piridina realiza uma ligação de hidrogênio não-clássica com o resíduo E272 (2,59Å). O grupo benzila participa de duas ligações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos I125 (4,95 Å) e M295 (4,61 Å) e, por fim, uma ligação de hidrogênio não-clássica com resíduo L275 (2,77 Å).

Tabela 11. Tabela com as interações previstas entre **BzAr9** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	2,28 Å
E272	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,59 Å
M295	π -enxofre	4,12 Å
	π -alquil	4,61 Å
V146	π -alquil	4,88 Å
L275	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,77 Å
Y279	Empilhamento-T	5,02 Å
	Empilhamento-T	4,81 Å
P271	π -alquil	4,53 Å
	π -alquil	4,27 Å
I125	π -alquil	4,95 Å
W142	Ligação peptídica	4,46 Å
G143	Ligação peptídica	4,46 Å
L282	π -alquil	4,93 Å

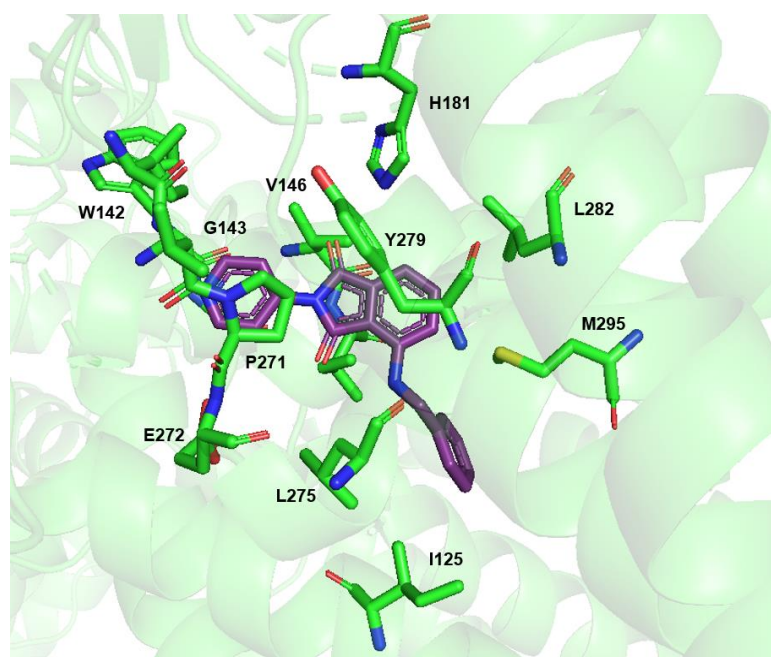


Figura 18 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **BzAr9** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **BzAr9** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

O melhor modo de ligação ranqueado do ligante **EtAr7** está representado na **Figura 19**. De acordo com a previsão, a subunidade ftalimídica participa de três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,74

Å), L282 (5,00 Å) e P271 (4,98 Å), uma ligação π -enxofre com resíduo M295 (4,58 Å) e duas interações do tipo empilhamento-T com resíduo Y279 (4,92 Å e 4,86 Å). Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (2,93 Å), atuando como acceptor de ligação de hidrogênio. A piridina do ligante participa de uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil com a cadeia lateral do resíduo P271 (4,16 Å), uma hidrofóbica do tipo empilhamento amida- π abrangendo a ligação peptídica entre os resíduos V270 e P271 (4,38 Å). O hidrogênio presente no carbono adjacente ao nitrogênio da piridina realiza uma ligação de hidrogênio não-clássica com o resíduo E272 (2,25 Å). O grupo etila participa de duas ligações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos L275 (4,67 Å) e M295 (4,42 Å) e, por fim, uma ligação de hidrogênio não-clássica com resíduo L275 (2,82 Å).

Tabela 12. Tabela com as interações previstas entre **EtAr7** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	2,93 Å
E272	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,25 Å
M295	π -enxofre	4,58 Å
	π -alquil	4,42 Å
V146	π -alquil	4,74 Å
L275	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,82 Å
	π -alquil	4,67 Å
Y279	Empilhamento-T	4,92 Å
	Empilhamento-T	4,86 Å
P271	Ligação peptídica	4,38 Å
	π -alquil	4,98 Å
	π -alquil	4,16 Å
L282	π -alquil	4,93 Å
V270	Ligação peptídica	4,38 Å

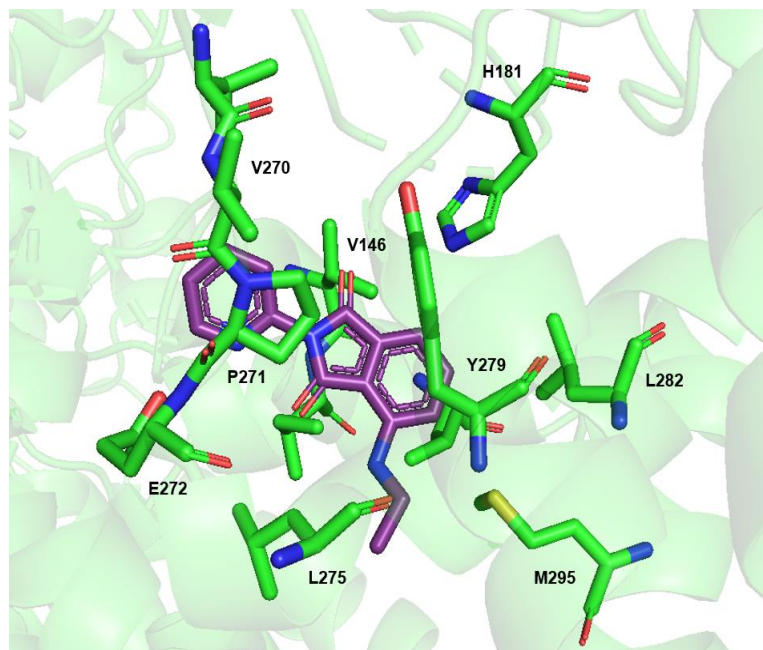


Figura 19 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **EtAr7** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr7** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

Como é demonstrado pela **Figura 20**, no modo de ligação de maior pontuação do ligante **EtAr9** a subunidade ftalimídica participa de três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,91 Å), L282 (4,99 Å) e P271 (4,44 Å), uma ligação π -enxofre com resíduo M295 (4,20 Å) e duas interações do tipo empilhamento-T com resíduo Y279 (4,89 Å e 4,76 Å). Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (2,34 Å), atuando como aceptor de ligação de hidrogênio. A piridina do ligante apresenta uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil com a cadeia lateral do resíduo P271 (4,34 Å), uma hidrofóbica do tipo empilhamento amida- π abrangendo a ligação peptídica entre os resíduos W142 e G143 (4,40 Å). O hidrogênio presente no carbono adjacente ao nitrogênio da piridina participa de uma ligação de hidrogênio não-clássica com o resíduo E272 (2,58 Å). O grupo etila participa de duas ligações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos L275 (4,16 Å) e M295 (4,83 Å) e, por fim, uma ligação de hidrogênio não-clássica com resíduo L275 (2,51 Å).

Tabela 13. Tabela com as interações previstas entre **EtAr9** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	2,34 Å
E272	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,58 Å
M295	π -enxofre	4,20 Å
	π -alquil	4,83 Å
V146	π -alquil	4,91 Å
L275	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,51 Å
	π -alquil	4,16 Å
Y279	Empilhamento-T	4,89 Å
	Empilhamento-T	4,76 Å
P271	π -alquil	4,44 Å
	π -alquil	4,34 Å
W142	Ligação peptídica	4,40 Å
G143	Ligação peptídica	4,40 Å
L282	π -alquil	4,99 Å

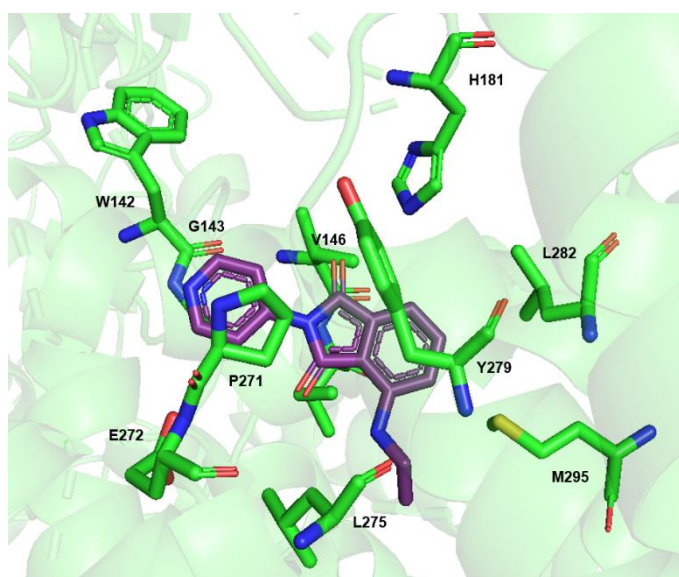


Figura 20 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **EtAr9** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr9** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

O melhor modo de ligação ranqueado do ligante **EtAr10** está representado na **Figura 21**. De acordo com a previsão, a subunidade ftalimídica participa de três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,63 Å) e P271 (4,11 Å e 4,01 Å) e uma hidrofóbica do tipo empilhamento amida-

π abrangendo a ligação peptídica entre os resíduos V270 e P271 (4,34 Å). Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (3,04 Å), atuando comoceptor de ligação de hidrogênio. O anel benzênico apresenta duas interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,99 Å) e L282 (5,00Å), e uma ligação π -enxofre com resíduo M295 (4,55 Å). Já o grupo trifluorometil participa de uma ligação de halogênio e outra hidrofóbica do tipo π -alquil com o resíduo L275 (3,31 Å e 4,55 Å, respectivamente). O grupo etila apresenta uma ligação hidrofóbica do tipo alquil com resíduo Y132 (4,76 Å), e duas ligações de hidrogênio não-clássicas com os resíduos E272 (2,90 Å) e M139 (2,85 Å).

Tabela 14. Tabela com as interações previstas entre **EtAr10** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	3,04 Å
E272	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,90 Å
M295	π -enxofre	4,55 Å
V146	π -alquil	4,63 Å
	π -alquil	4,99 Å
L275	Halogênio	3,31 Å
	π -alquil	4,55 Å
P271	Ligação peptídica	4,34 Å
	π -alquil	4,11 Å
	π -alquil	4,01 Å
L282	π -alquil	5,00 Å
V270	Ligação peptídica	4,34 Å
Y132	π -alquil	4,76 Å

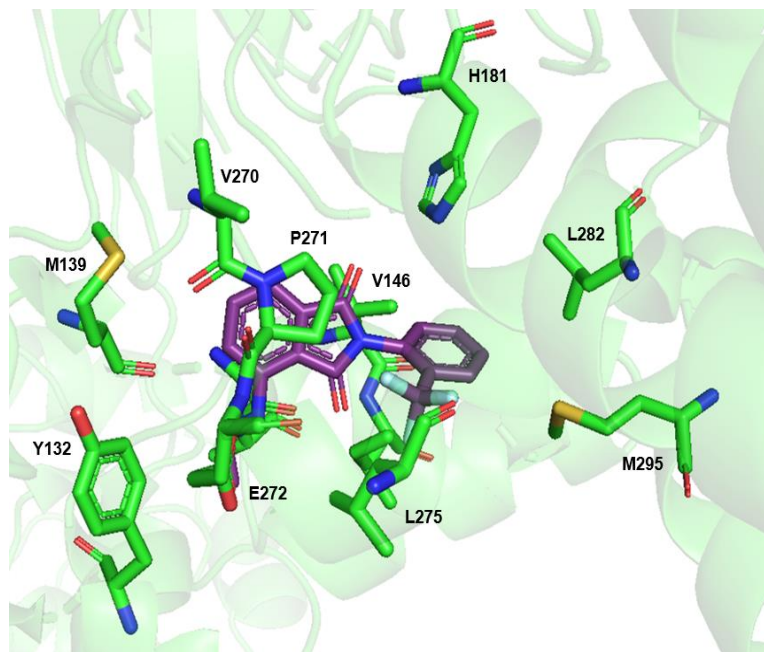


Figura 21 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **EtAr10** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr10** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

Como é demonstrado pela **Figura 22**, no modo de ligação de maior pontuação do ligante **EtAr11** a subunidade ftalimídica participa de três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,07 Å e 5,00 Å) e P271 (4,22 Å), e uma ligação π -sigma com resíduo P271 (2,66 Å). Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (2,80 Å), atuando como acceptor de ligação de hidrogênio. O anel benzênico apresenta duas interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos L275 (4,41 Å) e M295 (4,94 Å), enquanto que o grupo trifluorometil realiza uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil com resíduo I147 (4,79 Å). O grupo etila apresenta duas ligações de hidrogênio não-clássica com os resíduos E272 (3,01 Å) e M139 (2,96 Å). Por fim, o grupo amina realiza uma ligação de hidrogênio com o resíduo E272 (2,75 Å), atuando como doadora de ligação de hidrogênio.

Tabela 15. Tabela com as interações previstas entre **EtAr11** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	2,80 Å
E272	Ligação de hidrogênio não-clássica	3,01 Å
	Ligação de hidrogênio	2,75 Å
M139	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,96 Å
I147	π -alquil	4,79 Å
M295	π -alquil	4,94 Å
V146	π -alquil	4,07 Å
	π -alquil	5,00 Å
L275	π -alquil	4,41 Å
P271	π -sigma	2,66 Å
	π -alquil	4,22 Å

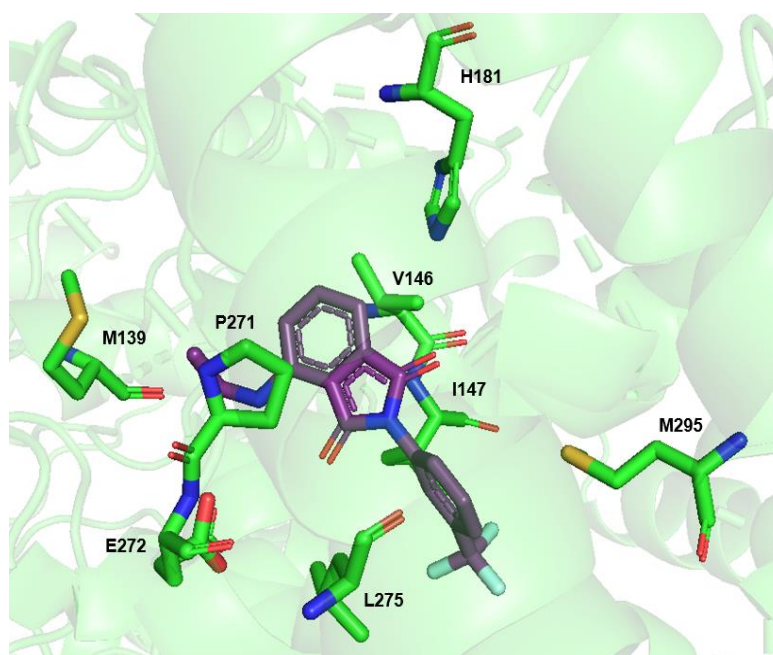


Figura 22 – Interações previstas para a pose de maior pontuação de **EtAr11** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **EtAr11** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

O melhor modo de ligação ranqueado do ligante **iPrAr4** está representado na **Figura 23**. De acordo com a previsão, a subunidade ftalimídica participa de três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,60 Å) e P271 (4,30 Å e 3,94 Å), e uma hidrofóbica do tipo empilhamento amida- π abrangendo a ligação peptídica entre os resíduos V270 e P271 (4,56 Å).

Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (3,02 Å), atuando como acceptor de ligação de hidrogênio. O anel benzênico apresenta uma interação hidrofóbica do tipo empilhamento-T com resíduo Y279 (4,92 Å), uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil com resíduo L282 (4,73 Å) e uma ligação π -enxofre com resíduo M295 (4,47 Å). A metoxila participa de uma ligação de hidrogênio não-clássica e uma interação hidrofóbica do tipo alquil com o resíduo L275 (2,87 Å e 3,85 Å, respectivamente), enquanto o grupo isopropila apresenta duas interações hidrofóbicas, uma do tipo alquil com resíduo I147 (4,55 Å) e outra do tipo π -alquil com F129 (5,00 Å). Por fim, o grupo amina realiza uma ligação de hidrogênio com o resíduo E272 (1,63 Å), atuando como doadora de ligação de hidrogênio.

Tabela 16. Tabela com as interações previstas entre **iPrAr4** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	3,02 Å
E272	Ligação de hidrogênio não-clássica	1,63 Å
I147	π -alquil	4,55 Å
M295	π -enxofre	4,47 Å
V146	π -alquil	4,60 Å
L275	Ligação de hidrogênio não-clássica	2,87 Å
	π -alquil	3,85 Å
F129	π -alquil	5,00 Å
Y279	Empilhamento-T	4,92 Å
	π -alquil	4,30 Å
	π -alquil	3,94 Å
P271	Ligação peptídica	4,56 Å
	Ligação peptídica	4,73 Å
V270	Ligação peptídica	4,56 Å

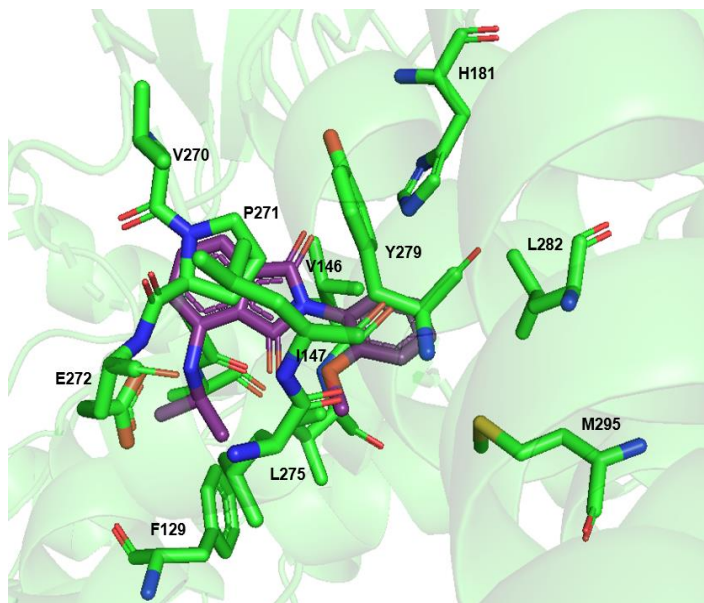


Figura 23 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **iPrAr4** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **iPrAr4** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

Como é demonstrado pela **Figura 24**, no modo de ligação de maior pontuação do ligante **iPrAr8** a subunidade ftalimídica participa de três interações hidrofóbicas do tipo π -alquil com átomos da cadeia lateral dos resíduos V146 (4,57 Å) e P271 (4,36 Å e 3,98 Å), e uma hidrofóbica do tipo empilhamento amida- π abrangendo a ligação peptídica entre os resíduos V270 e P271 (4,54 Å). Ademais, o oxigênio do anel ftalimídico interage com o resíduo H181 (3,10 Å), atuando comoceptor de ligação de hidrogênio. A piridina do ligante apresenta uma ligação hidrofóbica do tipo π -alquil com a cadeia lateral do resíduo L282 (4,86 Å), uma ligação π -enxofre com resíduo M295 (4,71 Å) e uma interação do tipo empilhamento-T com resíduo Y279 (4,87 Å). O grupo isopropila participa de duas interações hidrofóbicas, uma do tipo alquil com resíduo I147 (4,56 Å) e outra do tipo π -alquil com F129 (5,00 Å). Por fim, o grupo amina participa de uma ligação de hidrogênio com o resíduo E272 (1,60 Å), atuando como doadora de ligação de hidrogênio.

Tabela 17. Tabela com as interações previstas entre **iPrAr8** e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo do citocromo bc1, bem como as respectivas distâncias de ligação.

Aminoácido	Interação	Distância
H181	Ligação de hidrogênio	3,10 Å
E272	Ligação de hidrogênio	1,30 Å
I147	π -alquil	4,56 Å
M295	π -enxofre	4,71 Å
V146	π -alquil	4,57 Å
F129	π -alquil	5,00 Å
Y279	Empilhamento-T	4,87 Å
P271	Ligação peptídica	4,54 Å
	π -alquil	4,36 Å
	π -alquil	3,98 Å
L282	π -alquil	4,86 Å
V270	Ligação peptídica	4,54 Å

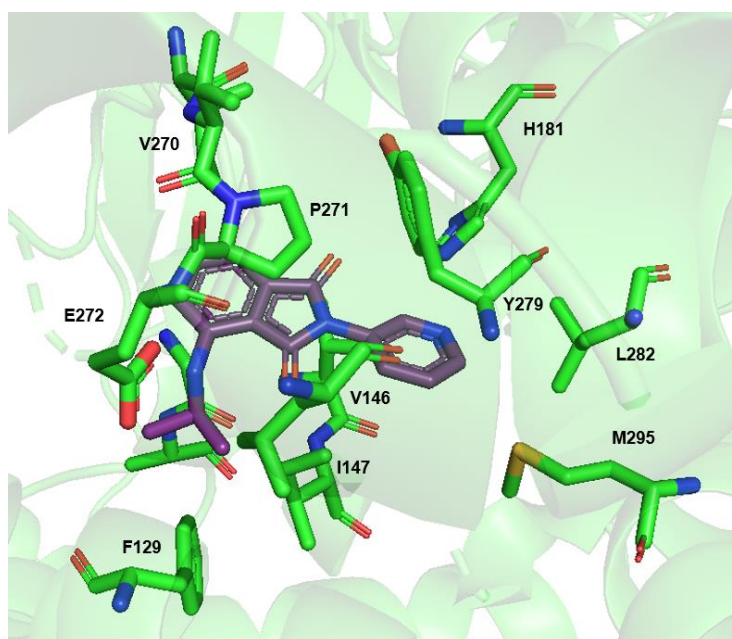


Figura 24 – Interações previstas para o modo de ligação de maior pontuação de **iPrAr8** obtida por meio da função CHEMPLP. Átomos de carbono de **iPrAr8** são representados em roxo. Nos resíduos de aminoácidos: Átomos de carbono em verde, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo. Figura gerada através do software PyMol.

A fim de avaliar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos ligantes, foi utilizada a ferramenta SwissADME (<<http://www.swissadme.ch/>>), buscando verificar parâmetros relevantes para a biodisponibilidade dos mesmos. A partir dos resultados nele obtidos (**Tabela 18**) é possível identificar se alguma molécula viola as regras de Lipinski, também conhecidas como regras dos 5. Elas estabelecem que: a

molécula deve apresentar logP menor ou igual a 5; massa molecular inferior ou igual a 500 daltons; não deve haver mais do que 5 doadores de hidrogênio (HBD); não mais do que 10 aceptores de hidrogênio (HBA).³²

Tabela 18. Parâmetros computacionais de biodisponibilidade obtidos na plataforma SwissADME.

	BzAr8	BzAr9	EtAr7	EtAr9	EtAr10	EtAr11	iPrAr4	iPrAr8
Massa molecular (g mol⁻¹)	329,35	329,35	267,28	267,28	334,29	334,29	310,35	231,31
HBD	1	1	1	1	1	1	1	1
HBA	3	3	3	3	5	5	3	3
LogS	-4,41	-4,41	-3,58	-3,24	-4,99	-4,99	-4,68	-3,68
MlogP	2,82	2,82	1,85	1,85	3,53	3,53	2,44	2,1

De acordo com os dados, é possível perceber que nenhuma das moléculas violou as regras de Lipinski, evidenciando compostos com propriedades desejáveis no que diz respeito à absorção e permeabilidade em membranas biológicas. Entre os compostos, **EtAr10** e **EtAr11** são os mais lipofílicos (3,53), o que pode ser explicado pela presença do grupo trifluorometila, que muitas vezes facilita interações hidrofóbicas com locais de ligação específicos. Conseqüentemente, esses compostos apresentam menor valor de solubilidade aquosa (-4,99), comparado aos demais.

A plataforma também apresentou os resultados na forma do gráfico de Radar de Biodisponibilidade (**Figura 25**), o qual baseia-se nas seguintes propriedades: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, saturação e flexibilidade. A área em rosa delimita o perfil ideal de biodisponibilidade, enquanto a linha vermelha representa o perfil da molécula em questão.³²

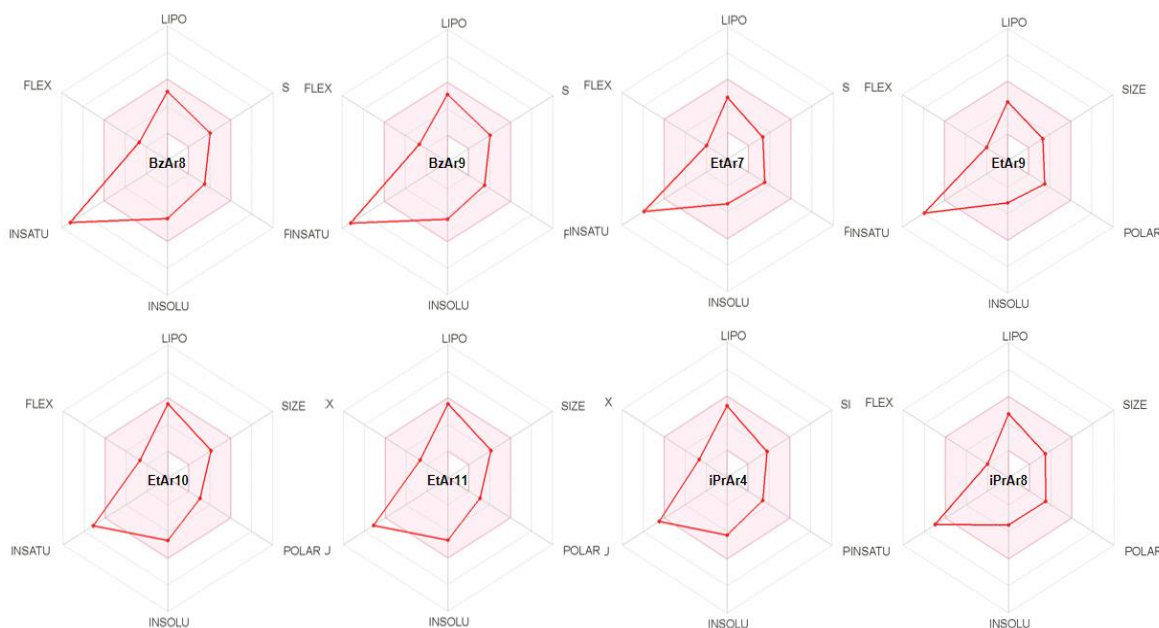


Figura 25 - Radar de biodisponibilidade dos 8 compostos selecionados.

Como pode ser observado, todas as moléculas extrapolaram o parâmetro de insaturação, devido ao grande número de ligações duplas, sendo que **iPrAr4** e **iPrAr8** apresentaram os resultados mais aceitáveis. Esse desvio indica que uma propriedade físico-química dessas moléculas é tida como subótima para biodisponibilidade oral.

5.5 Síntese, Mecanismos e Elucidação Estrutural dos Derivados

A **Figura 26** demonstra as 3 etapas da rota sintética selecionada para obtenção dos 8 derivados ftalimídicos mais promissores, utilizando as anilinas e solventes adequados para cada composto.

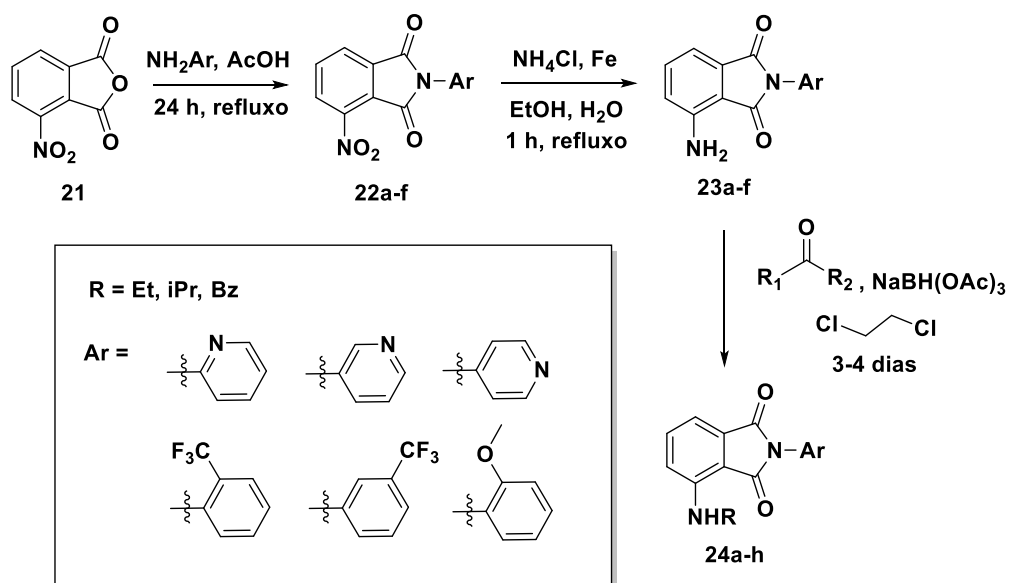


Figura 26 – Rota de síntese para a obtenção dos derivados ftalimídicos.

Inicialmente, o anidrido 3-nitroftálico (**21**) deve ser acoplado com as anilinas funcionalizadas, utilizando ácido acético glacial para preparação dos intermediários **22a-f**.³³ Em seguida, o grupo nitro pode ser reduzido pelo emprego de cloreto de amônio (NH₄Cl) e ferro em etanol/água, formando **23a-f**.³⁴ A última etapa, para obtenção de **24a-h**, consiste na introdução de grupos alquila por meio de aldeído ou cetona correspondente na presença de 1,2-dicloroetano (DCE) e um agente redutor, como por exemplo, triacetoxiborohidreto de sódio.³⁵ De acordo com os substituintes, outras metodologias podem ser necessárias.

5.5.1 Formação da ftalimida

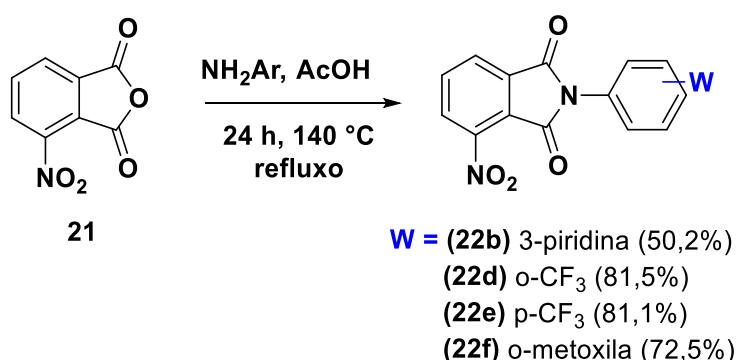


Figura 27 - Reação de obtenção das ftalimidas.

Nesta primeira etapa o par de elétrons livre da amina da anilina realiza um ataque nucleofílico à carbonila do anidrido 3-nitroftálico (**21**), seguido de prototropismo. Também há rompimento de ligação π C-O, para que o par de elétrons da amina realize um novo ataque ao carbono carbonílico. O fechamento do anel provoca a eliminação de uma molécula de água, formando o composto desejado.

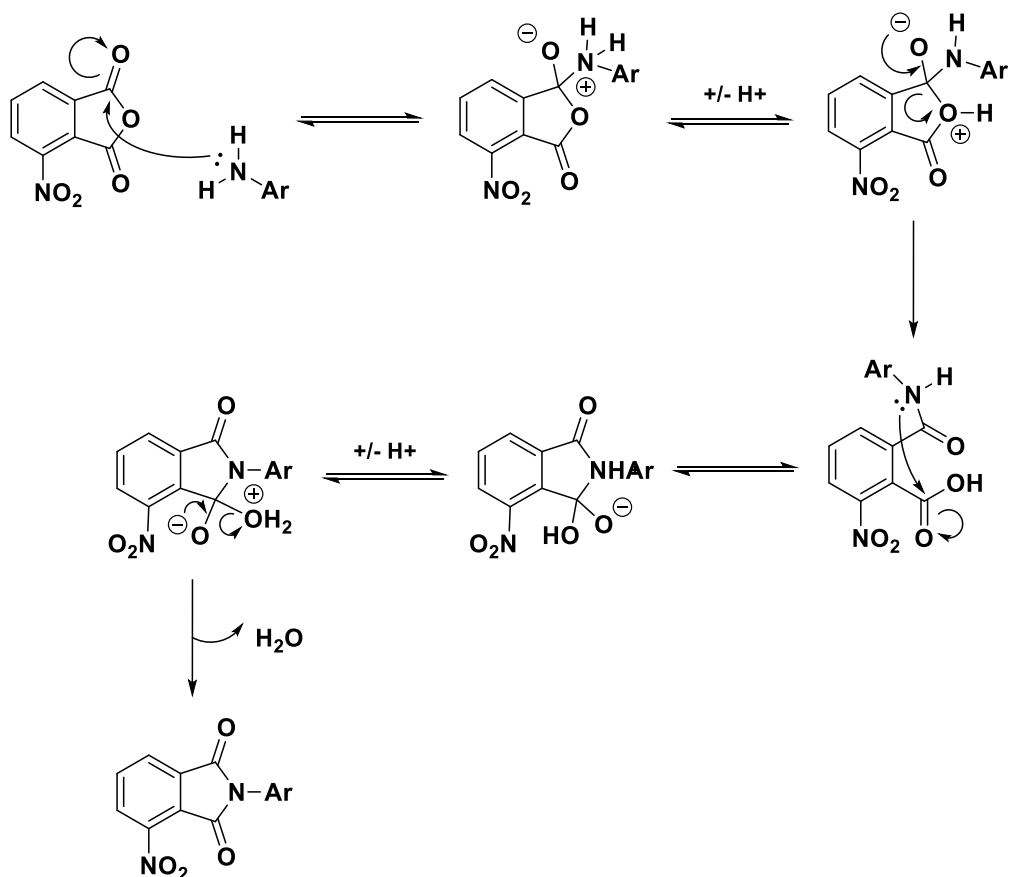


Figura 28 - Mecanismo proposto para primeira etapa de síntese.

Com a obtenção dos espectros de infravermelho (IV), foi possível atribuir os principais modos vibracionais que indicam a formação dos compostos **22b**, **22d**, **22e** e **22f** (Tabela 19). Todos apresentam estiramentos relacionados ao C-H de carbonos aromáticos, carbonila (C=O) e C=C de carbonos aromáticos. Para **22d** e **22e** é notado o estiramento da ligação C-F na região de 1123-1130 cm⁻¹, referente ao grupo funcional CF₃ que está presente nesses compostos. No caso de **22f**, o estiramento C-N está sobreposto por outros, enquanto também é visto estiramentos em 1251 e 1018 cm⁻¹, relacionados à ligação C-O do grupo metoxila.

Tabela 19. Atribuição dos principais modos vibracionais (cm^{-1}), indicativos da formação dos compostos **22b**, **22d**, **22e** e **22f**.

	Grupo funcional						
	C-H aromático	C=O	NO ₂	C=C aromático	C-N	C-F	C-O
22b	3063; 3023	1730	1540; 1380	1429	1358	-	-
22d	3099	1741	1539; 1380	1458	1371	1130	-
22e	3095	1722	1542; 1385	1455	1324	1123	-
22f	3082	1724	1535; 1350	1502	Sobreposto	-	1251; 1018

Para os espectros de RMN de ^1H é possível observar sinais na região entre 7,10 - 8,61 ppm, associados aos prótons diretamente ligados a compostos aromáticos, enquanto no DEPT-Q, na região entre 162,27 - 164,98 ppm, são observados dois sinais, característicos de grupos carbonila. Os intermediários **22d** e **22e** apresentam quartetos em seu espectro de DEPT-Q, relacionados ao acoplamento heteronuclear que ocorre em seus substituintes devido a presença de três átomos de flúor em seus grupos substituintes. Para **22f** é visto um sinal em 3,76 e 55,96 ppm, respectivamente nos espectros de RMN ^1H e DEPT-Q, atribuído ao grupo metoxila que, por ser um carbono saturado, apresenta seus sinais em deslocamentos menores. Para todos os compostos, a soma das integrais dos sinais no RMN ^1H , bem como no de DEPT-Q, correspondeu ao número esperado. A **Tabela 20** mostra as informações aqui descritas.

Tabela 20. Deslocamentos químicos (δ), em ppm, mais relevantes dos compostos **22b**, **22d**, **22e** e **22f**.

	δ Prótons aromáticos	δ C=O	δ CF ₃	δ OCH ₃
22b	7,61 – 8,67	162,42 ; 164,98	-	-
22d	7,80 – 8,41	162,27 ; 164,94	128,01	-
22e	7,80 – 8,36	162,44 ; 164,96	129,68	-
22f	7,10 – 8,37	162,29 ; 164,92	-	3,76 (s, 3H)

A reação de formação da ftalimida para os compostos **22a** e **22c** não foram efetivas. Ao realizar a adição de água destilada gelada não ocorre a precipitação do sólido e, apesar de outras tentativas de separação (como extração líquido-líquido e rota-*evaporação*), não foi possível a obtenção dos mesmos em pureza e quantidade

adequada. Nestes casos, foi feita nova tentativa utilizando a metodologia descrita por Rani e colaboradores³⁶, em que a reação é feita empregando micro-ondas, a 160 °C durante 2-10 minutos (varia de acordo com o solvente e reagente utilizado) e, posteriormente, é realizada a recristalização em etanol absoluto. Entretanto, a formação dos compostos de interesse ocorreu em baixa quantidade, além da geração de outros subprodutos de difícil separação.

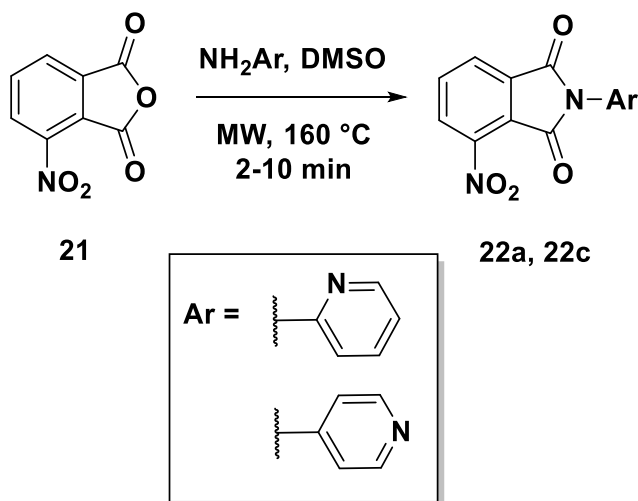


Figura 29 - Síntese por micro-ondas dos compostos **22a** e **22c**.

Uma possível explicação para a reação não ter sido efetiva para tais compostos envolve as estruturas de ressonância. Observando a **Figura 30**, é visto que as três aminopiridinas possuem 5 híbridos de ressonância. Entretanto, para 2- e 4-aminopiridina, um desses híbridos contém o nitrogênio da piridina com carga negativa, o que promove maior estabilização para estrutura. Conseqüentemente, o par de elétrons do nitrogênio da amina fica menos disponível para realizar o ataque nucleofílico.

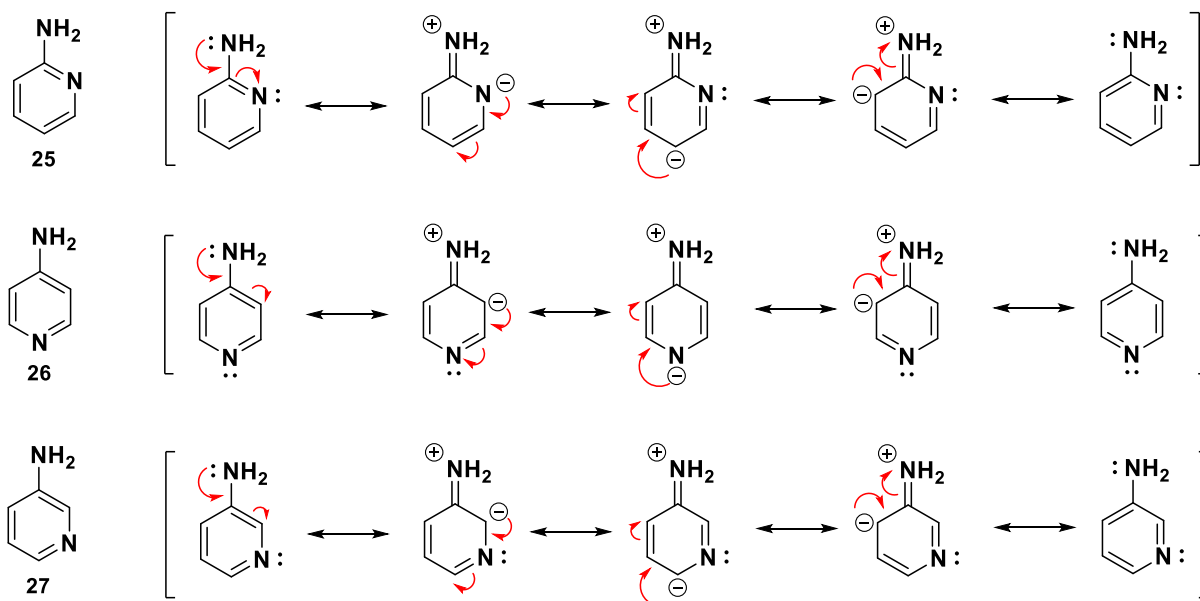


Figura 30 – Estruturas de ressonância para as moléculas 2-aminopiridina (**25**), 4-aminopiridina (**26**) e 3-aminopiridina (**27**).

5.5.2 Redução do Grupo Nitro

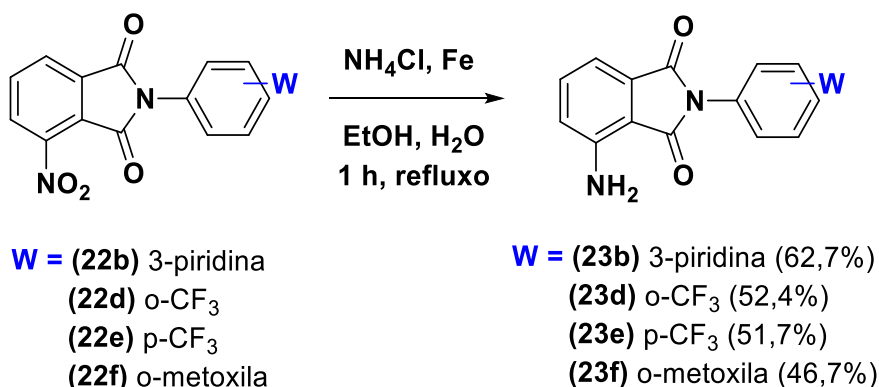


Figura 31 - Reação de redução do grupo nitro.

O mecanismo dessa redução, sugerido por Smith e March, está representado na **Figura 32**. Utiliza-se um metal, no caso ferro zero-valente (Fe⁰), como agente redutor em meio ácido (espécie doadora de prótons). O HCl é usualmente o ácido mais utilizado, porém, quando há presença de grupos mais sensíveis a ácidos, como ligações duplas que podem sofrer reação de hidro-halogenação, recorre-se ao uso de ácidos fracos, caso do NH₄Cl, empregado nessa metodologia.³⁷

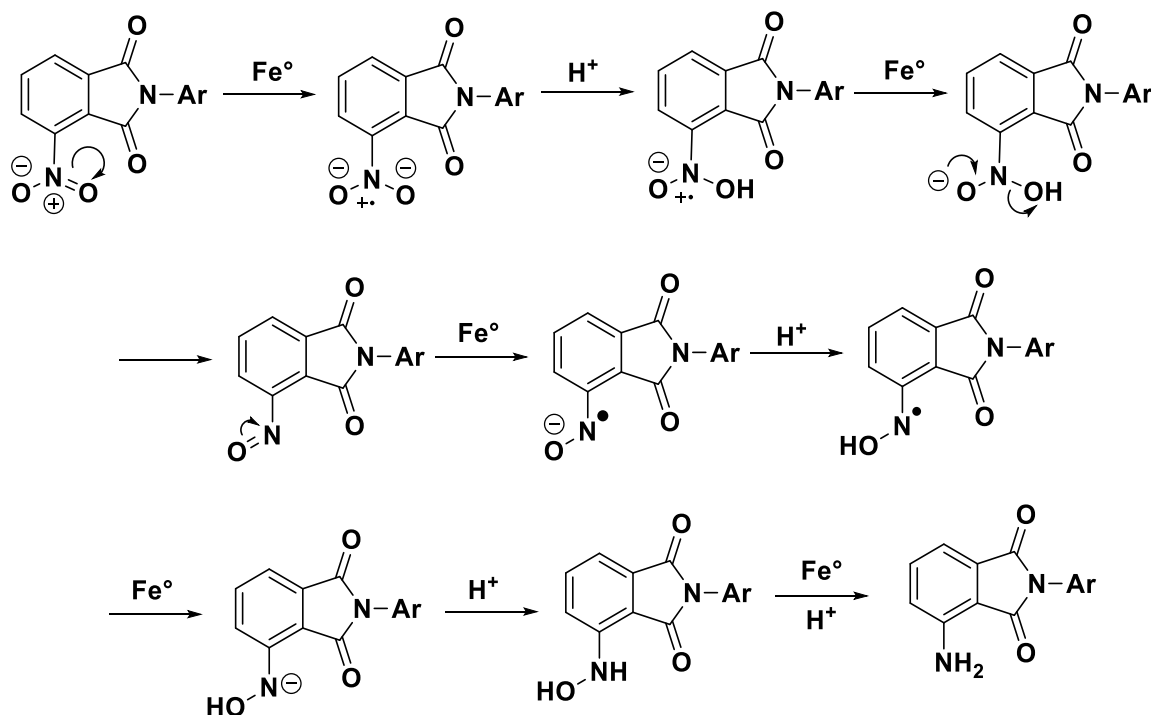


Figura 32 - Proposta do mecanismo da segunda etapa de síntese.

Em análises por CCD, quando reveladas com radiação ultravioleta (UV) em 365 nm, os produtos **23b**, **23d**, **23e** e **23f** apresentaram fluorescência (Figura 33). Tal fato está relacionado com a atuação do NH_2 como um grupo auxocromo, devido aos seus pares de elétrons não-ligantes, capazes de interagirem com os elétrons π do grupo aromático ao qual está ligado. Em outras palavras, ele provoca uma extensão da conjugação por meio de ressonância e, apesar de não conferir cor a substância, ocasiona o deslocamento das bandas para um comprimento de onda (λ_{max}) maior.³⁸

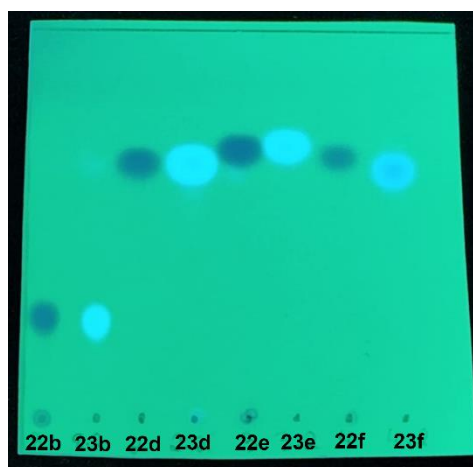


Figura 33 – Fluorescência dos intermediários **23b**, **23d**, **23e** e **23e** observada com a radiação UV em 365 nm.

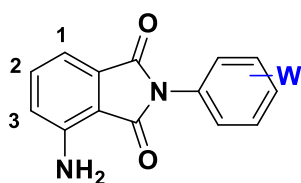
A partir dos espectros de IV obtidos, foi possível verificar a presença de duas bandas, na faixa de 3477-3316 cm^{-1} (**Tabela 21**). Tais bandas são correspondentes a amina primária (NH_2), inserida nas moléculas através da reação de redução do grupo nitro (NO_2). Os demais modos vibracionais, citados anteriormente, se mantiveram presentes em todos os compostos.

Tabela 21. Atribuição da banda (cm^{-1}) referente a presença do grupo amina para os compostos **23b**, **23d**, **23e** e **23e**.

	Grupo funcional	
	N-H estiramento	N-H dobramento
23b	3429; 3316	1640
23d	3455; 3330	1634
23e	3477; 3357	1638
23f	3461; 3339	1632

Já nos espectros de RMN de ^1H desses intermediários, foi possível observar o aparecimento de um sinal largo, com deslocamento químico entre 6,51-6,59 ppm, o qual foi atribuído aos dois hidrogênios do grupo amina (NH_2), confirmando a redução do grupo nitro (NO_2) (**Tabela 22**). Ainda, os sinais referentes aos hidrogênios da porção 1,4-naftoquinona apresentaram deslocamentos menores em relação aos observados na etapa de síntese anterior. Tal fato era esperado, visto que o grupo amina promove um efeito de blindagem nos átomos do anel, devido ao seu efeito doador de elétrons por ressonância.

Tabela 22. Deslocamento químico (δ), em ppm, do NH_2 e dos hidrogênios da porção 1,4-naftoquinona dos compostos **23b**, **23d**, **23e** e **23e**.



W = (**23b**) 3-piridina
 (**23d**) o- CF_3
 (**23e**) p- CF_3
 (**23f**) o-metoxila

	δ H1	δ H2	δ H3	δ NH_2
23b	7,08 (m)	7,06 (m)	8,59 (dd)	6,59 (sl)
23d	7,06 (m)	7,85 (m)	7,08 (m)	6,59 (sl)
23e	7,76 (m)	7,51 (dd)	7,06 (m)	6,59 (sl)
23f	7,18 (dd)	7,49 (dd)	7,04 (m)	6,51 (sl)

5.5.3 Aaminação Redutiva

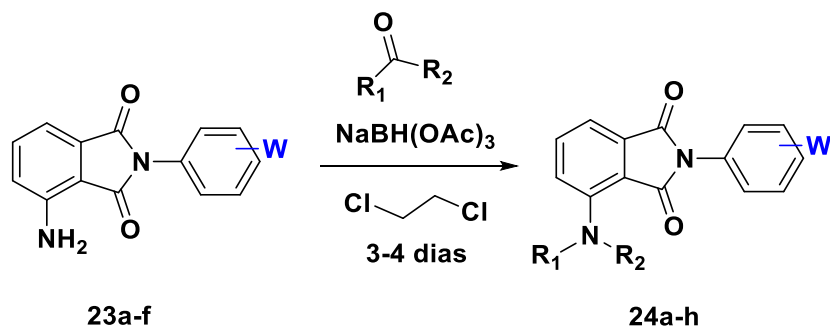


Figura 34 – Reação de aaminação redutiva.

A aaminação redutiva corresponde a introdução de grupos alquílicos a uma amina primária ou secundária, utilizando aldeído ou cetona na presença de um agente redutor, como por exemplo borohidreto de sódio. Neste caso, a amina comporta-se como nucleófilo e os compostos carbonílicos como eletrófilos. Para que não ocorram alquilações múltiplas, aminas primárias devem ser utilizadas em excesso, em meio neutro ou ainda junto a grupos de proteção.³⁹

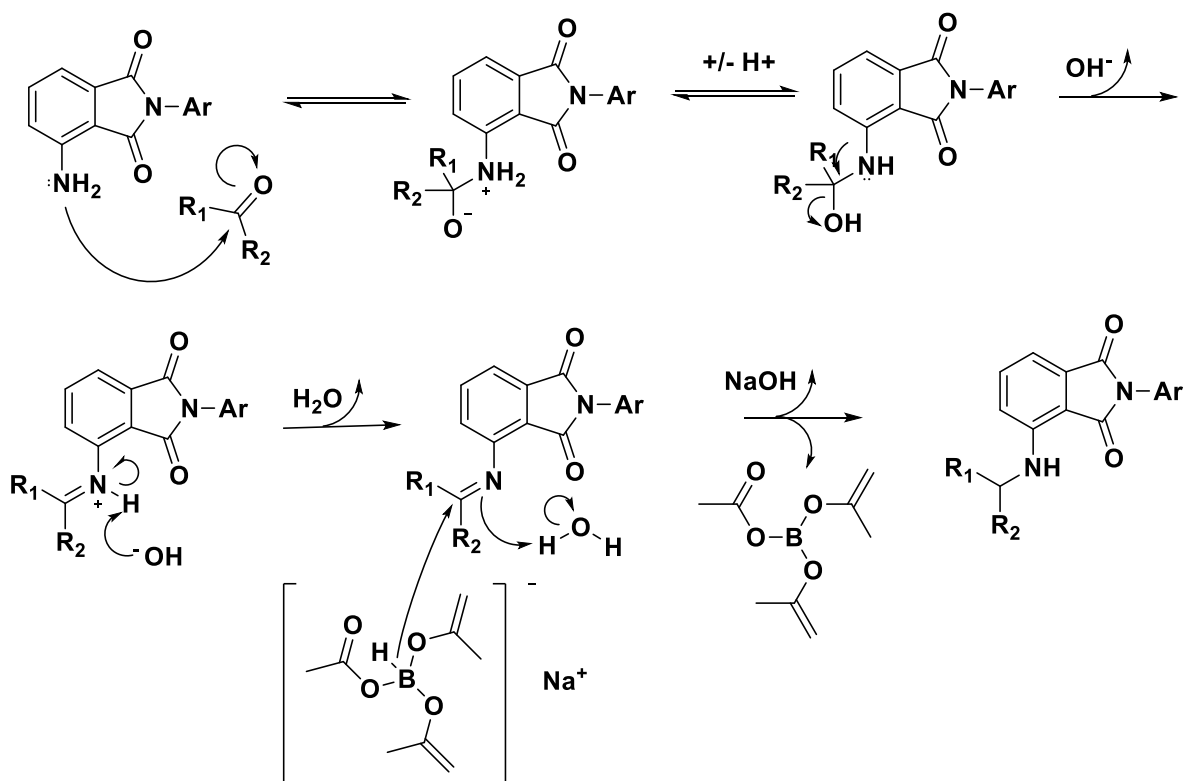


Figura 35 – Mecanismo proposto para terceira etapa de síntese.

A terceira etapa foi realizada com o intermediário **23f**, visando a obtenção do composto iPrAr4 (**24g**). Entretanto, após a realização das análises, foi possível concluir que a reação não ocorreu, visto que deveria haver um aumento no número

de hidrogênios e de carbonos, fato não constatado ao observar os espectros obtidos (Figura 36 e 37). Assim, são necessárias otimizações nesta etapa.

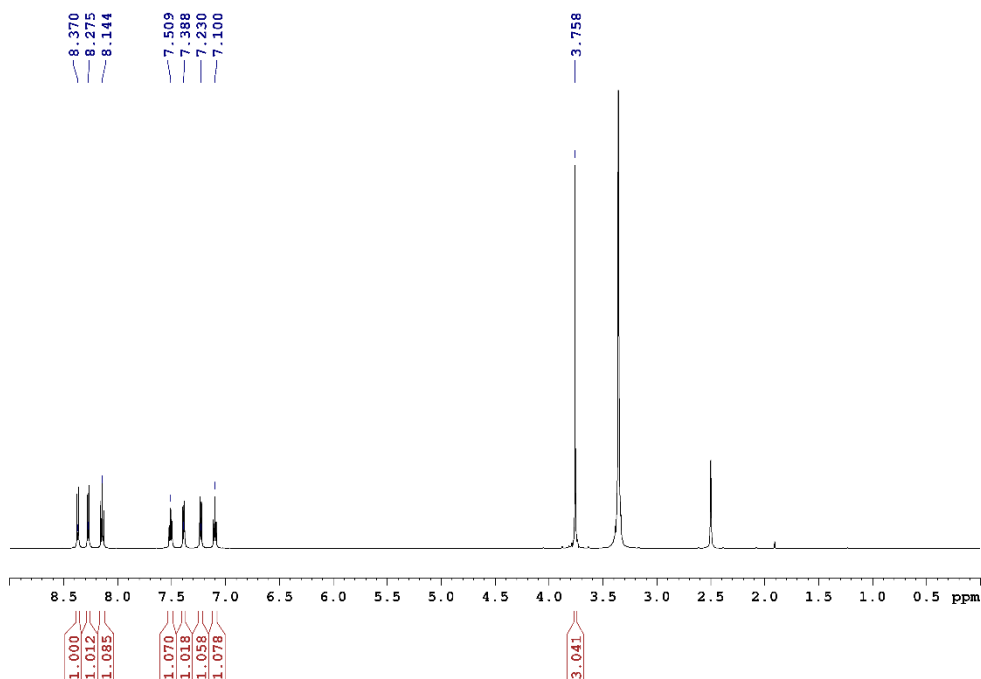


Figura 36 – Espectro de RMN ^1H (150 MHz) iPrAr4.

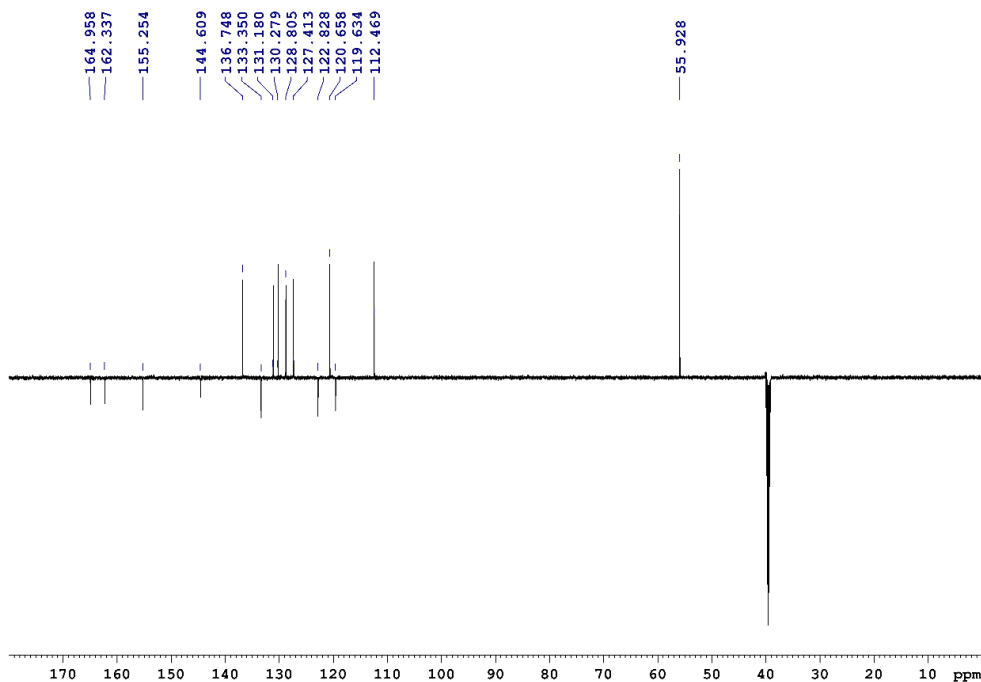


Figura 37 – Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) iPrAr4.

Na Tabela 23 são apresentados o rendimento, ponto de fusão e aspectos físicos observados para os intermediários obtidos. Há um aumento no ponto de fusão de **23b**, **23d**, **23e** e **23f** em relação aos seus precursores (**22b**, **22d**, **22e** e **22f**), além disso,

todos adquiriram coloração amarelada após a realização da segunda etapa de síntese, que consistiu na redução do grupo nitro.

Tabela 23. Valores de pontos de fusão e aspectos físicos dos intermediários obtidos.

	Primeira etapa				Segunda etapa			
	22b	22d	22e	22f	23b	23d	23e	23f
Rendimento (%)	50,2	81,5	81,1	72,5	62,7	52,4	51,7	46,7
P.F (°C)	170,5	180,7	182,9	305,9	198,3	205,7	206,1	346,2
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido amarelo	Sólido amarelo	Sólido amarelo	Sólido amarelo
Solubilidade em água	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
Solubilidade em DCM	Solúvel	Parcial	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Parcial	Solúvel	Parcial

6. CONCLUSÃO

O modelo *in silico* obtido por meio de modelagem molecular utilizando a estrutura cristalográfica do complexo III com citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* como receptor, empregando a função de pontuação CHEMPLP, se mostrou adequado para prever a pose e as interações do ligante co-cristalizado, sendo também aplicado na triagem virtual dos 48 derivados propostos. Esse modelo pode ser utilizado na triagem de novos ligantes que tenham como alvo o citocromo *bc1*, e também auxiliar estudos que visem uma maior compreensão das interações entre ligante-macromolécula.

Para análise dos dados, as interações consideradas como mais importantes são aquelas presentes no sítio de ligação da estigmatelina co-cristalizado (SMA4025). Os 8 derivados ftalimídicos selecionados para síntese interagem com um maior número de resíduos chave, incluindo os resíduos catalíticos H181 e E272. BzAr8 e iPrAr4 interagem com 9 resíduos chave, podendo ser os candidatos mais promissores.

Dentre eles, 4 intermediários foram obtidos até a segunda etapa da rota de síntese, que corresponde a redução do grupo nitro. Os rendimentos globais foram de 62,7%, 52,4%, 51,7% e 46,7% para **23b**, **23d**, **23e** e **23f**, respectivamente.

Como perspectivas, a síntese será finalizada e, sendo obtidos em grau de pureza adequada, os compostos serão enviados para realização dos bioensaios de atividade antimalárica em colaboração com o Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido, da Universidade de São Paulo (USP).

7. Parte Experimental

7.1 Métodos Cromatográficos

O monitoramento das reações é realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de alumínio revestidas com sílica gel, com reveladores sensíveis a radiações de 254 nm e 365 nm, utilizando solução etanólica de ácido fosfomolibdico (PMA) como revelador químico quando necessário.

Ao término de cada reação, quando necessário, o produto obtido é isolado por cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel (Sigma Aldrich, tamanho de partícula 0,040-0,063 mm e diâmetro de poro de 6 nm) e fase móvel com diferentes combinações de solventes orgânicos, descritos nos procedimentos experimentais.

7.2 Análises Espectrométricas

Os espectros de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C RMN) são obtidos no espectrômetro de RMN Bruker Fourier 600, operando com frequência de 600 MHz para os núcleos de hidrogênio (^1H) e 150 MHz para os átomos de carbono (^{13}C). Os espectros de RMN são processados com o software TopSpin 4.0.9, sendo os deslocamentos químicos (δ) expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo solvente deuterado utilizado em cada amostra. Para obtenção dos espectros de transmitância na região do infravermelho (IV), é utilizado o equipamento FT-IV da Vertex-70, com detector DLaTGS, com o modo ATR selecionado. Para o processamento dos dados de infravermelho foi selecionado o software Origin 8, sendo o número de onda expresso em cm^{-1} . A fim de facilitar a discussão dos resultados, os espectros das moléculas apresentam a estrutura numerada.

Espectro de massa (EM), análise elementar e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) serão obtidos para os produtos finais, visando determinar o grau de pureza.

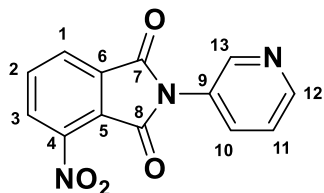
7.3 Procedimentos e Caracterizações

7.3.1 Metodologia para obtenção dos intermediários 22a-f

A primeira etapa de síntese inicia-se com 0,85 mmol de anidrido 3-nitroftálico (**21**) solubilizado em 5,3 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, ocorre a adição de 0,99 mmol da anilina adequada e a mistura é submetida a refluxo por 24 horas sob atmosfera de argônio. Após esse tempo, o sistema é colocado em banho de gelo e adiciona-se em torno de 5 mL de água destilada gelada, provocando a formação de

um sólido branco quando ainda em solução. O sólido formado é filtrado a vácuo e lavado com água gelada para melhor purificação.³³

7.3.1.1 Intermediário 22b



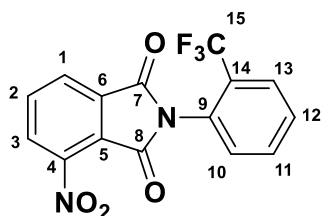
Foi utilizado o reagente 3-aminopiridina para obtenção de **22b**, tendo sido obtido um sólido de coloração branca com fator de retenção (R_f) de 0,19 (AcOEt:Hexano) e rendimento de 50,2%; P.F. = 170,5 °C.

IV (KBr) cm^{-1} : 3086 e 3023 (ν C-H aromático), 1730 (ν C=O), 1540 e 1380 (ν_{as} e ν_s grupo nitro), 1429 (ν C=C aromático), 1358 (ν C-N), 716 (ν C-H).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 8,67 (dd, 1H, $J = 0,64, 2,38$ Hz, H13); 8,65 (dd, 1H, $J = 1,60, 4,83$ Hz, H3); 8,37 (dd, 1H, $J = 0,82, 8,08$ Hz, H1); 8,29 (dd, 1H, $J = 0,82, 7,49$ Hz, H2); 8,14 (dd, 1H, $J = 7,52, 8,05$ Hz, H11); 7,91 (ddd, 1H, $J = 1,60, 2,46, 8,11$ Hz, H12); 7,61 (ddd, 1H, $J = 0,80, 7,84, 8,13$ Hz, H10).

RMN de ^{13}C à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 164,98 (C7); 162,42 (C8); 149,29 (C10); 148,07 (C3); 144,57 (C4); 136,71 (C12); 135,21 (C11); 133,54 (C9); 128,58 (C1); 128,43 (C6); 127,26 (C2); 124,11 (C13); 122,93 (C5).

7.3.1.2 Intermediário 22d



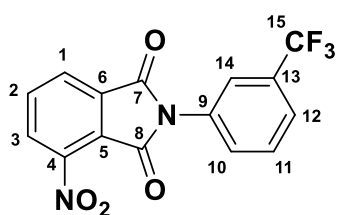
Foi utilizado o reagente 2-(trifluorometil)anilina para obtenção de **22d**, tendo sido obtido um sólido de cor branca em rendimento de 81,5% e $R_f = 0,48$ (AcOEt:Hexano); P.F. = 180,7 °C.

IV (KBr) cm^{-1} : 3099 (ν C-H aromático), 1741 (ν C=O), 1539 e 1317 (ν_{as} e ν_s grupo nitro), 1458 (ν C=C aromático), 1380 (ν C-N), 1130 (ν C-F), 778 (ν C-H).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 8,41 (dd, 1H, $J = 0,78, 8,14$ Hz, H3); 8,33 (dd, 1H, $J = 0,82, 7,51$ Hz, H1); 8,18 (dd, 1H, $J = 7,61, 8,07$ Hz, H2); 7,97 (m, 1H, H13); 7,91 (m, 1H, H10); 7,80 (m, 2H, H12 e H11).

RMN de ^{13}C à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 164,94 (C7); 162,27 (C8); 144,67 (C4); 137,05 (C2); 134,15 (C10); 133,27 (C6); 132,09 (C11 ou C12); 130,92 (C11 ou C12); 129,30 (C9); 129,09 (C3); 128,01 (q, C15, $J = 30,36$); 127,64 (C1); 127,26 (C13); 123,02 (q, C14, $J = 273,81$ Hz); 122,82 (C5).

7.3.1.3 Intermediário 22e



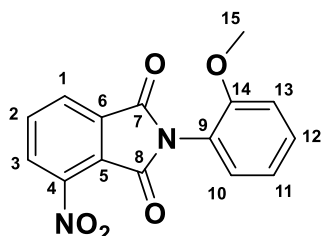
Foi utilizado o reagente 3-(trifluorometil)anilina para obtenção de **22e**, tendo sido obtido um sólido de cor branca em rendimento de 81,1% e $R_f = 0,53$ (AcOEt:Hexano); P.F. = 182,9 °C.

IV (KBr) cm^{-1} : 3095 (ν C-H aromático), 1722 (ν C=O), 1542 e 1324 (ν_{as} e ν_s grupo nitro), 1455 (ν C=C aromático), 1385 (ν C-N), 1123 (ν C-F).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 8,36 (dd, 1H, $J = 0,65, 8,07$ Hz, H3); 8,28 (dd, 1H, $J = 0,70, 7,46$ Hz, H1); 8,14 (m, 1H, H2); 7,86 (m, 2H, H12 e H14); 7,80 (m, 2H, H10 e H11).

RMN de ^{13}C à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 164,96 (C7); 162,44 (C8); 144,59 (C4); 136,61 (C2); 133,52 (C6); 132,30 (C9); 131,71 (C10 ou C11); 130,39 (C10 ou C11); 129,68 (q, C15, $J = 32$ Hz); 128,59 (C3); 127,23 (C1); 125,26 (C14); 124,69 (C13); 124,30 (C12); 122,88 (C5).

7.3.1.4 Intermediário 22f



Foi utilizado o reagente o-anisidina para obtenção de **22f**, tendo sido obtido um sólido de coloração branca com $R_f = 0,4$ (AcOEt:Hexano) e rendimento de 61,05%; PF = 305,9 °C.

IV (KBr) cm^{-1} : 3082 (C-H aromático), 2920 e 2850 (C-H alifático), 1724 e 1704 (ν_{as} e ν_s C=O), 1535 e 1350 (ν_{as} e ν_s grupo nitro), 1502 (ν C=C aromático), 1251 e 1018 (ν_{as} e ν_s C-O), 752 (ν C-H).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 8,37 (dd, 1H, $J = 0,81, 8,10$ Hz, H3); 8,27 (dd, 1H, $J = 0,85, 7,51$ Hz, H1); 8,14 (1H, dd, $J = 7,51, 8,10$ Hz, H2); 7,51 (ddd, 1H, $J = 1,75, 7,56, 8,37$ Hz, H12); 7,39 (dd, 1H, $J = 1,71, 7,74$ Hz, H10); 7,23 (dd, 1H, $J = 1,12, 8,41$ Hz, H13); 7,10 (ddd, 1H, $J = 1,21, 7,60, 8,77$ Hz, H11); 3,76 (s, 3H, H15).

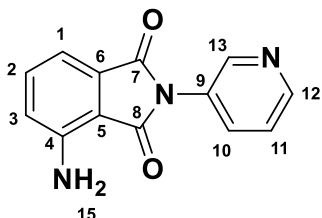
RMN de ^{13}C -DEPTQ à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 164,92 (C7); 162,29 (C8); 155,28 (C14); 144,60 (C4); 136,77 (C2); 133,34 (C6); 131,14 (C12); 130,25 (C10); 128,82 (C3); 127,36 (C1); 122,81 (C5); 120,69 (C11); 119,61 (C9); 112,44 (C13); 55,96 (C15).

7.3.2 Metodologia para obtenção dos intermediários 23a-f

Para a segunda etapa de síntese, adiciona-se em um balão 1g do nitro aromático obtido anteriormente (**22a-f**), 3 equivalentes molares de NH_4Cl , 8 mL de água e 20 mL de etanol. Após agitação vigorosa, 4 equivalentes molares de ferro são acrescentados

lentamente ao sistema, mantendo sob refluxo durante 1 hora. Decorrido o tempo, a mistura é filtrada em celite à vácuo, utilizando metanol como solvente extrator e rota-
evaporador para posterior remoção do mesmo.³⁴

7.3.2.1 Intermediário 23b



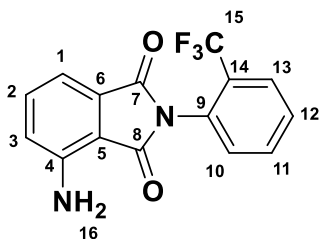
Foi obtido um sólido amarelo em rendimento de 62,7%; PF = 198,3 °C, $R_f = 0,24$ (AcOEt:Hexano).

IV (KBr) cm^{-1} : 3449 e 3313 (ν_{as} e ν_s N-H), 1715 e 1647 (C=O), 1484 (ν C=C aromático), 1430 (ν C=N), 1376 (ν C-N-C).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 8,65 (m, 1H, H13); 8,59 (dd, 1H, $J = 1,58, 4,80$ Hz, H3); 7,88 (ddd, 1H, $J = 1,53, 2,35, 4,04$ Hz, H12); 7,56 (ddd, 1H, $J = 0,60, 4,81, 5,41$ Hz, H10); 7,51 (dd, 1H, $J = 7,10, 8,47$ Hz; H11); 7,08 (m, 1H, H1); 7,06 (m, 1H, H2); 6,59 (s, 2H, H15).

RMN de ^{13}C -DEPTQ à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 168,09 (C7); 166,90 (C8); 148,46 (C3); 147,90 (C10); 147,08 (C4); 135,67 (C12); 134,75 (C11); 132,16 (C9); 129,02 (C6); 123,87 (C13); 121,77 (C2); 111,27 (C1); 108,73 (C5).

7.3.2.2 Intermediário 23d



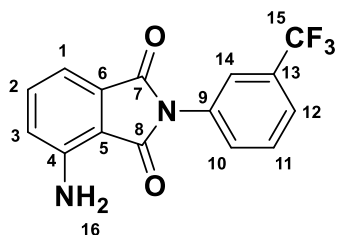
Foi obtido um sólido amarelo em rendimento de 52,4%; PF = 205,7 °C, $R_f = 0,24$ (1 AcOEt: 3 Hexano).

IV (KBr) cm^{-1} : 3454 e 3331 (ν N-H), 1697 (ν C=O), 1635 (ν N-H), 1455 (ν C=C aromático), 1317 (ν C-N-C), 1133 (ν C-F), 744 (ν C-H).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 7,92 (m, 1H, H10); 7,85 (m, 1H, H2); 7,74 (m, 1H, H11); 7,68 (m, 1H, H13); 7,51 (dd, 1H, $J = 7,07, 8,42$ Hz, H12); 7,08 (m, 1H, H3); 7,06 (m, 1H, H1); 6,59 (s, 2H, H16).

RMN de ^{13}C -DEPTQ à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 168,29 (C7); 167,14 (C8); 147,14 (C4); 135,69 (C11); 133,94 (C2); 132,60 (C10); 132,27 (C6); 130,34 (C12); 130,28 (C9); 128,25 (q, C15, $J = 30,44$ Hz); 127,16 (C13); 124,12 (C14); 121,89 (C3); 111,33 (C1); 108,81 (C5).

7.3.2.3 Intermediário 23e



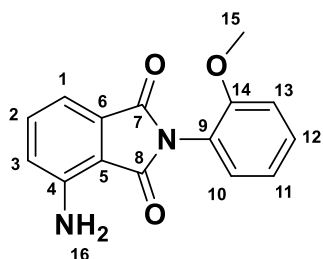
Foi obtido um sólido amarelo em rendimento de 51,7%; PF = 206,1 °C, $R_f = 0,88$ (3 AcOEt: 7 DCM). Para purificação de tal composto, além da metodologia descrita anteriormente, foi necessária a separação por coluna cromatográfica utilizando sílica e AcOEt:DCM (3:7) como eluente.

IV (KBr) cm^{-1} : 3477 e 3357 (ν_{as} e ν_{s} N-H), 1700 (ν C=O), 1638 (ν N-H), 1482 (ν C=C aromático), 1325 (ν C-N-C), 1121 (ν C-F).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 7,85 (m, 1H, H14); 7,76 (m, 3H, H1, H10 e H12); 7,51 (dd, 1H, $J = 7,14, 8,41$ Hz, H2); 7,06 (m, 2H, H3 e H11); 6,59 (s, 2H, H16).

RMN de ^{13}C -DEPTQ à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 168,02 (C7); 166,82 (C8); 147,06 (C4); 135,61 (C2); 132,94 (C9); 132,12 (C6); 131,13 (C1 ou C10); 130,03 (C1 ou C10); 129,51 (q, C15, $J = 32,28$ Hz); 124,22 (C12); 124,00 (q, C13, $J = 271,93$ Hz); 123,82 (C14); 121,71 (C3 ou C11); 111,18 (C3 ou C11); 108,71 (C5).

7.3.2.4 Intermediário 23f



Foi obtido um sólido amarelo em rendimento de 46,7%; PF = 346,2 °C, $R_f = 0,42$ (AcOEt:Hexano).

IV (KBr) cm^{-1} : 3458 e 3335 (ν N-H), 3071 e 3016 (ν_{as} e ν_{s} C-H aromático), 2969 e 2928 (ν_{as} e ν_{s} C-H alifático), 1699 e 1630 (ν_{as} e ν_{s} C=O), 1503 (C=C aromático), 1376 (ν C-N-

C), 745 (ν C-H).

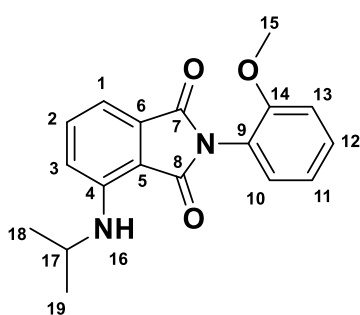
RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 7,49 (dd, 1H, $J = 7,00, 8,40$ Hz, H2); 7,46 (ddd, 1H, $J = 1,75, 7,56, 8,33$ Hz, H12); 7,30 (dd, 1H, $J = 1,75, 7,70$ Hz, H10); 7,18 (dd, 1H, $J = 1,05, 8,40$ Hz, H1); 7,04 (m, H3, H12 e H13); 6,51 (s, 2H, H16); 3,73 (s, 3H, H15).

RMN de ^{13}C -DEPTQ à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 168,46 (C7); 167,17 (C8); 155,49 (C14); 146,83 (C4); 135,46 (C2); 132,35 (C6); 130,56 (C10); 130,47 (C12); 121,60 (C3, C11 ou C13); 120,51 (C3, C11 ou C13); 112,25 (C1); 111,03 (C3, C11 ou C13); 109,06 (C9); 59,80 (C5); 55,78 (C15).

7.3.3 Metodologia para obtenção dos intermediários 24a-h

A terceira etapa consiste na adição de 2,5 mmol da substância obtida na etapa anterior, 2,5 mmol da cetona ou aldeído correspondente, 10 mL de 1,2-dicloroetano e 3,5 mmol de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. A reação é realizada em atmosfera inerte e temperatura ambiente, mantendo sob agitação durante 3-4 dias. Para finalização, é adicionada solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, até que o pH atinja 9-10, a fim de não favorecer o produto em sua forma protonada. Em seguida, é realizada extração com 3 x 50 mL de DCM. As fases orgânicas são unidas, secas em sulfato de magnésio anidro e o solvente é evaporado.³⁵

7.3.3.1 iPrAr4 (24g)



Foi obtido um sólido amarelo em rendimento de 72,9%; PF = 334,1 °C, $R_f = 0,42$ (AcOEt:Hexano).

RMN de ^1H à 600 MHz, DMSO (δ , ppm): 8,37 (m, 1H); 8,27 (m, 1H); 8,14 (m, 1H); 7,50 (m, 1H); 7,38 (dd, 1H); 7,23 (m, 1H); 7,10 (ddd, 1H); 3,75 (s, 3H).

RMN de ^{13}C -DEPTQ à 150 MHz, DMSO (δ , ppm): 164,95; 162,33; 155,25; 144,60; 136,74; 133,35; 131,18; 130,27; 128,80; 127,41; 122,82; 120,65; 119,63; 112,46; 55,92.

REFERÊNCIAS

¹ZEKAR, L.; SHARMAN, T. Plasmodium falciparum Malaria. **Int StatPearls**, jan 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555962/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

²WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report 2023**. Geneva: World Health Organization; 2023.

³BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. **Dia da Malária nas Américas - um panorama da malária no Brasil em 2022 e no primeiro semestre de 2023**. Brasília, v. 55, n. 1, jan. 2024.

⁴TALAPKO, J.; *et al.* Malaria: The past and the Present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 179, jun 2019.

⁵WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Estratégia técnica mundial para o paludismo 2016-2030**. Geneva: World Health Organization; 2015.

⁶VARO, R.; CHACCOUR, C.; BASSAT, Q. Update on malaria. **Med Clin**, Barcelona, v. 155, n. 9, p. 395-402, nov 2020.

⁷WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World malaria report 2020**. Geneva: World Health Organization; 2020.

⁸NDUNGE, O. B. A.; KILIAN, N.; SALMAN, M. M. Cerebral Malaria and Neuronal Implications of *Plasmodium Falciparum* Infection: From Mechanisms to Advanced Models. **Adv. Sci.**, v. 9, n. 36, 2202944, out 2022.

⁹LACERDA-QUEIROZ, N.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunopatogênese da malária cerebral. **Rev Bras Neurol**, v. 44, n. 1, p. 13-19, mar 2008.

¹⁰BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2010.

¹¹TEIXEIRA, A. C. L.; *et al.* Malária - uma revisão abrangente sobre o ciclo de vida do parasito e transmissão, diagnóstico, tratamento, prevenção e controle. **BJHR**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 3718-3727, fev 2024.

¹²MBANEFO, A.; KUMAR, N. Evaluation of Malaria Diagnostic Methods as a Key for Successful Control and Elimination Programs. **Trop. Med. Infect. Dis.**, v. 5, n. 2, p. 102, jun 2020.

¹³FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, abr 2008.

¹⁴SKRZYPEK, R.; CALLAGHAN, R. The “pushmi-pullyu” of resistance to chloroquine in malaria. **Essays Biochem.**, v. 61, n. 1, p. 167-175, mar 2017.

¹⁵FRANCISCO, A. I.; VARGAS, M. D. Ferroquina: O antimalárico do futuro. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, n. 2, p. 118-129, out 2010.

¹⁶SIREGAR, J. E.; *et al.* Direct evidence for the atovaquone action on the *Plasmodium* cytochrome *bc1* complex. **Parasitol. Int.**, v. 64, n. 3, p. 295-300, jun 2015.

¹⁷PAINTER, H. J.; *et al.* Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 446, p. 88-91, mar 2007.

¹⁸OSORO, C. B.; *et al.* Policy uptake and implementation of the RTS,S/AS01 malaria vaccine in sub-Saharan African countries: status 2 years following the WHO recommendation. **BMJ Glob Health**, v. 9, n. 4, mar 2024.

¹⁹HANBOONKUNUPAKARN, B.; WHITE, N. J. Advances and roadblocks in the treatment of malaria. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 88, n. 2, p. 374-382, jul 2020.

²⁰BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, 2021.

²¹D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

²²PRADINES, B.; *et al.* La résistance aux antipaludiques Antimalarial drugs resistance. **RFL**, v. 2010, n. 422, p. 51-62, mai 2010.

²³GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **RPQ**, v. 2, n. 4, p. 24-36, jul 2008.

²⁴FERREIRA, L. G.; *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, jul 2015.

²⁵SANTOS, L. H. Docagem molecular: em busca do encaixe perfeito e acessível. **BIOINFO**, v. 1, jul 2021.

²⁶BATISTA, V. S.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Molecular Docking: Considerations of a Low Cost and Suitable Methodology and Some Successful Applications. **Med & Analy Chem Int J**, v. 2, n. 3, out 2018.

²⁷BATISTA, V. S. **Estudos computacionais envolvendo os receptores nicotínicos de acetilcolina dos subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 7$ através da análise comparativa de contatos intermoleculares baseada em ancoragem molecular (dbCICA)**. 2022. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2022.

²⁸OKADA-JUNIOR, C. Y. et al. Phthalimide Derivatives with Bioactivity against *Plasmodium falciparum*: Synthesis, Evaluation, and Computational Studies Involving bc 1 Cytochrome Inhibition. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9424–9430, 31 ago. 2018.

²⁹DE OLIVEIRA, R. F.; et al. Synthesis, *in silico* Study and Antimicrobial Evaluation of New Diesters Derived from Phthaloylglycine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 31, n. 5, p. 953, 2020.

³⁰NIXON, G. G.; et al. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, n. 5, p. 977, maio 2013.

³¹SU, M.; et al. Comparative Assessment of Scoring Functions: The CASF-2016 Update. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 59, n. 2, p. 895, novembro 2018.

³²DAIANA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 42717, 2017.

³³LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. O-Alkylation of Bioactive Phthalimide Derivatives Under Microwave Irradiation in Dry Media. **Synth. Commun.**, v. 30, n. 18, p. 3291-3306, 2000.

³⁴ROMAGNOLI, R. et al. Symmetrical α -bromoacryloylamido diaryldienone derivatives as a novel series of antiproliferative agents. Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorg Med Chem Lett**, 20 (9), 2733-2739, 2010.

³⁵ABDEL-MAGID, A. F. et al. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. **J. Org. Chem.**, v. 61, n. 11, p. 3849-3862, 1996.

³⁶RANI, A. et al. Microwave-Assisted Highly Efficient Route to 4-Aminoquinoline-Phthalimide Conjugates: Synthesis and Anti-Tubercular Evaluation. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 33, p. 10782-10785, 2017.

³⁷SMITH, M. B. E MARCH, J. March's Advanced Organic Chemistry - Reactions, Mechanisms, And Structure, 6^a ed., New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

³⁸GÜRSES, A.; AÇIKYILDIZ, M.; GÜNEŞM, K.; GÜRSES, S. Dyes and Pigments. **SpringerBriefs in Molecular Science**, 2. ed. India: Springer, 2016.

³⁹NIE, H. et al. Synthesis, Crystal Structure, and Properties of a Polyimidazole Diiron (III) Complex. A New Model of the Active Site of Purple Acid Phosphatase. **Inorg. Chem.**, v. 34, n. 9, p. 2382-2388, 1995.

ANEXO A – Estruturas químicas dos ligantes planejados para etapa de modelagem molecular.

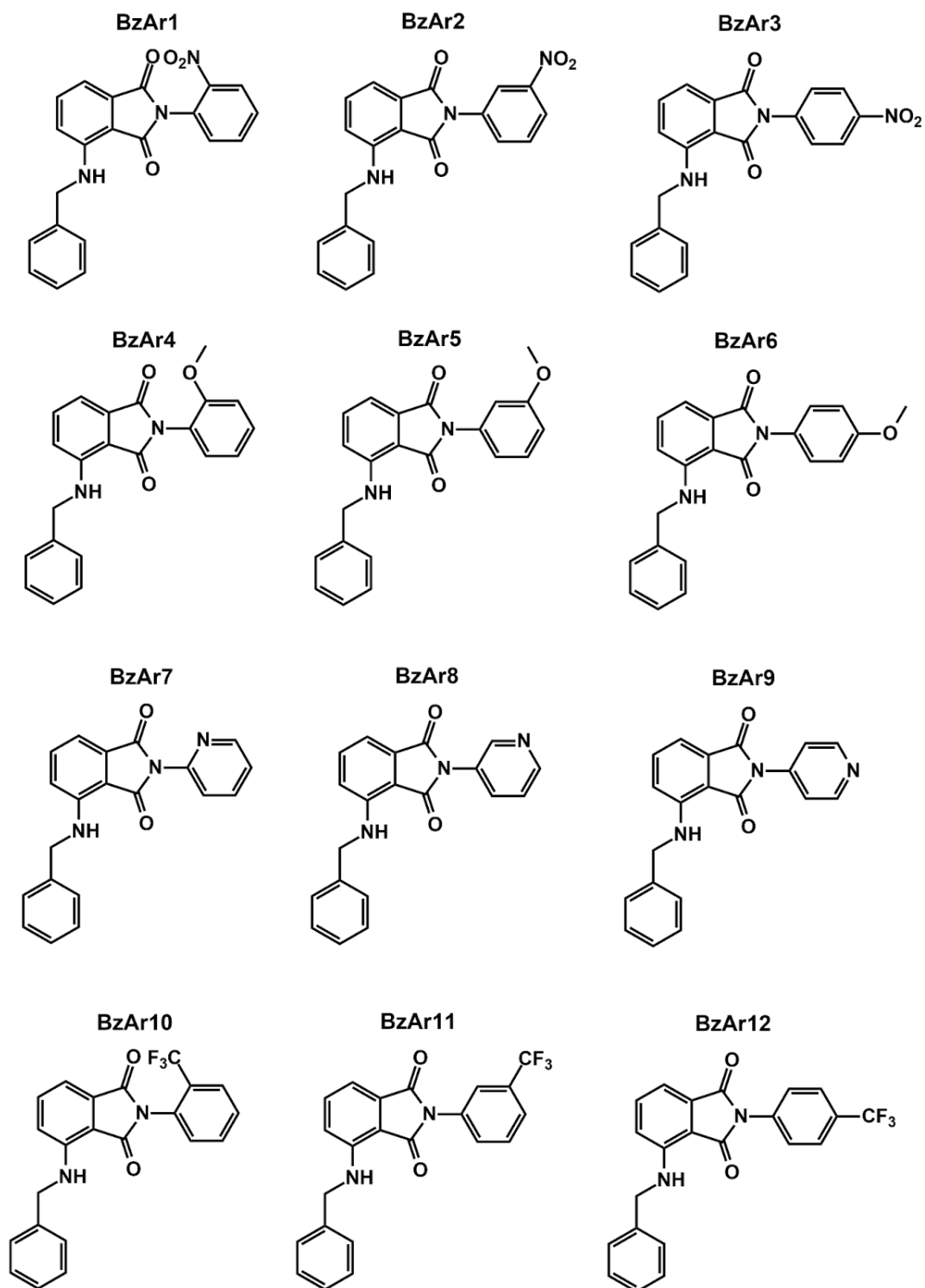


Figura 1: Estruturas químicas dos ligantes que contém a benzila como substituinte em "R".

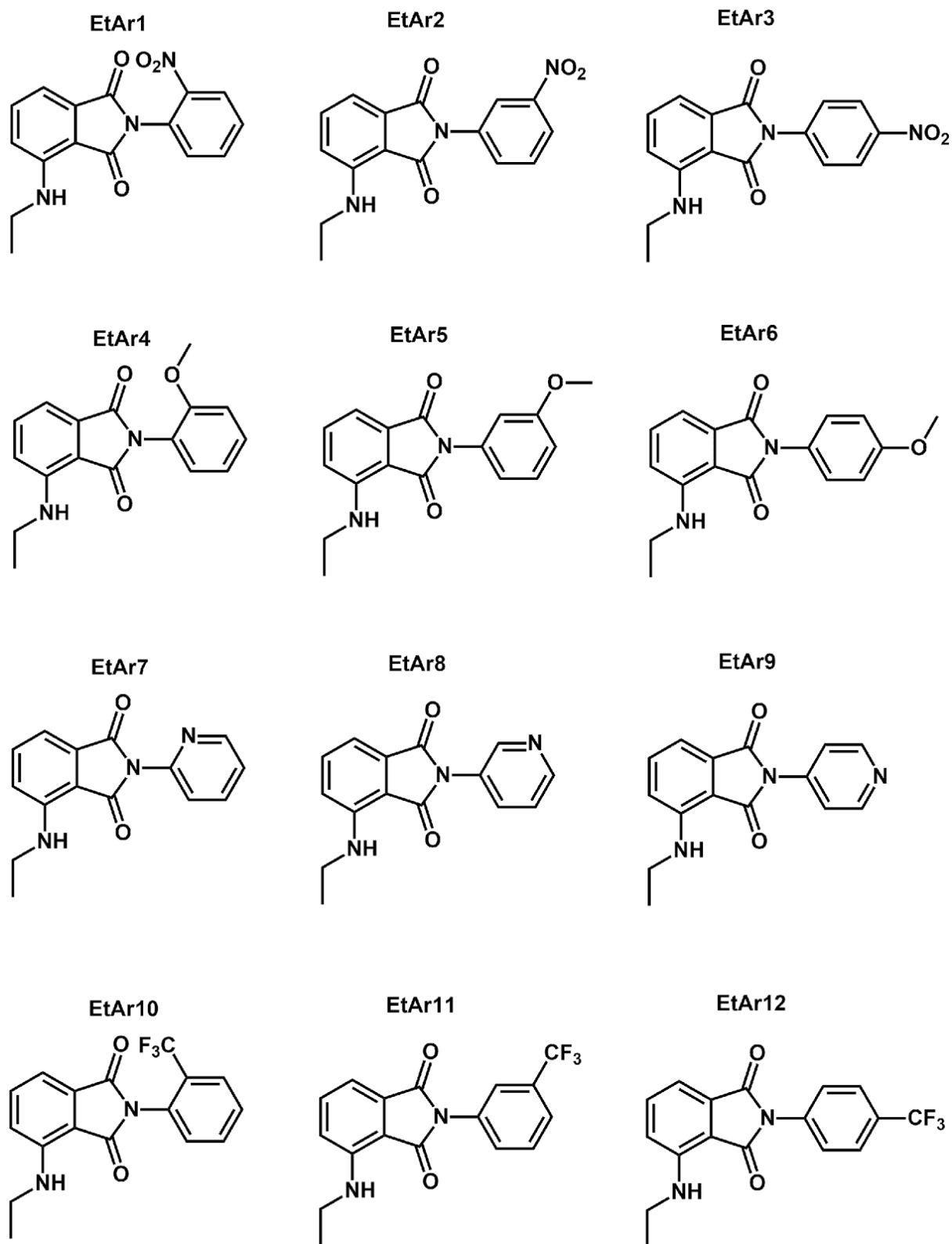


Figura 2: Estruturas químicas dos ligantes que contém o grupo etila como substituinte em "R".

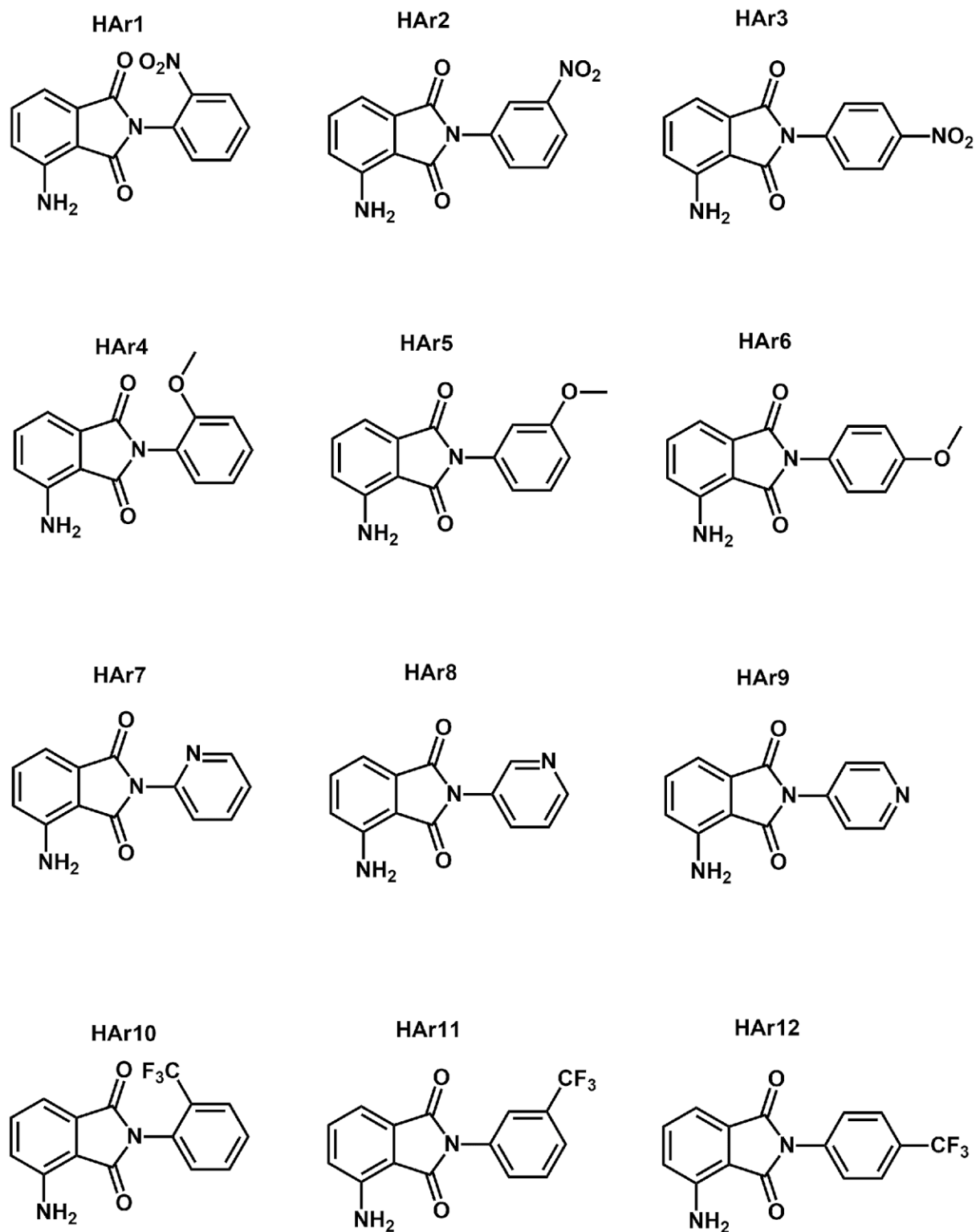


Figura 3: Estruturas químicas dos ligantes que contêm um átomo de hidrogênio como substituinte em “R”.

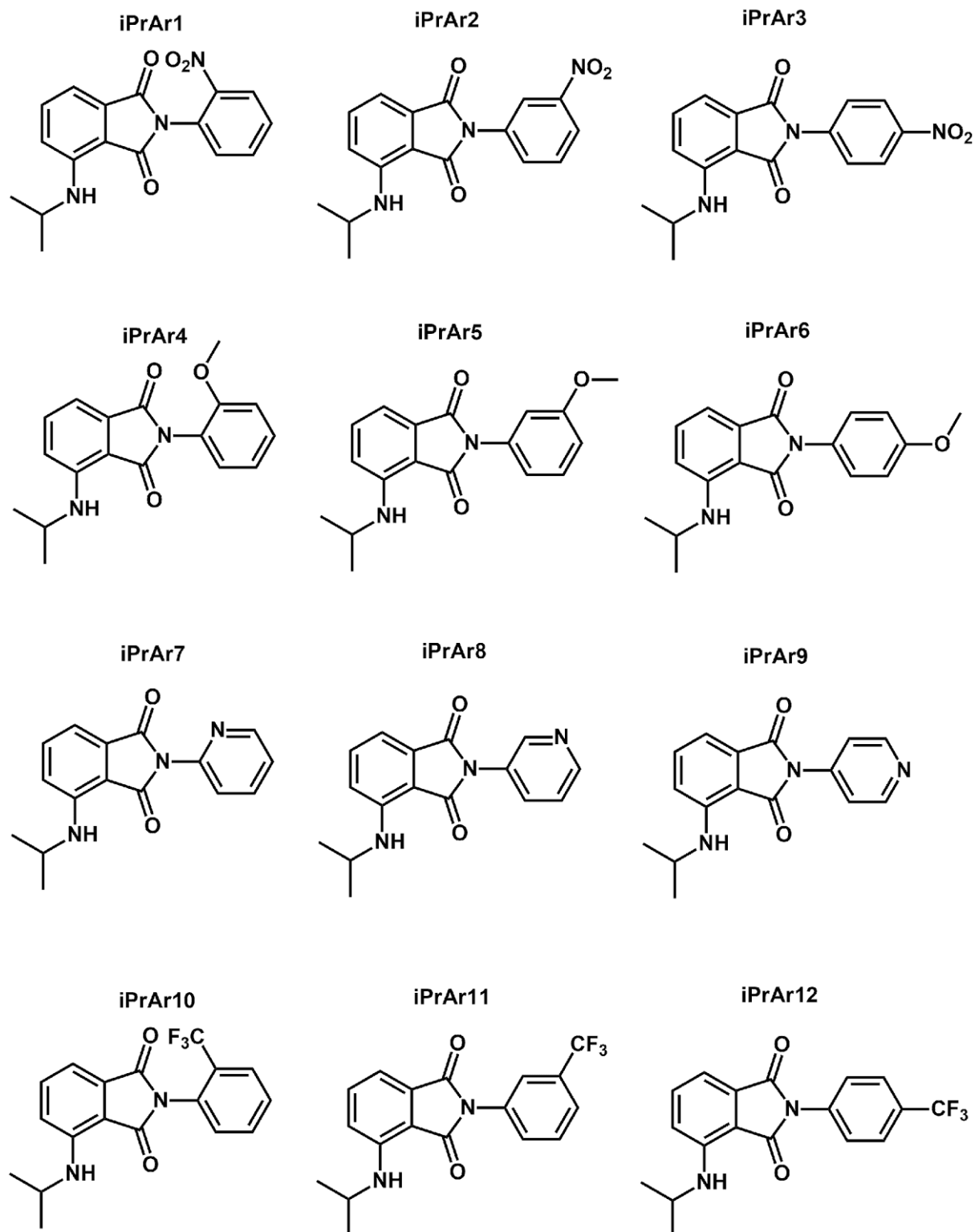


Figura 4: Estruturas químicas dos ligantes que contém a isopropila como substituinte em "R".

ANEXO B – Espectros de Infravermelho (IV)

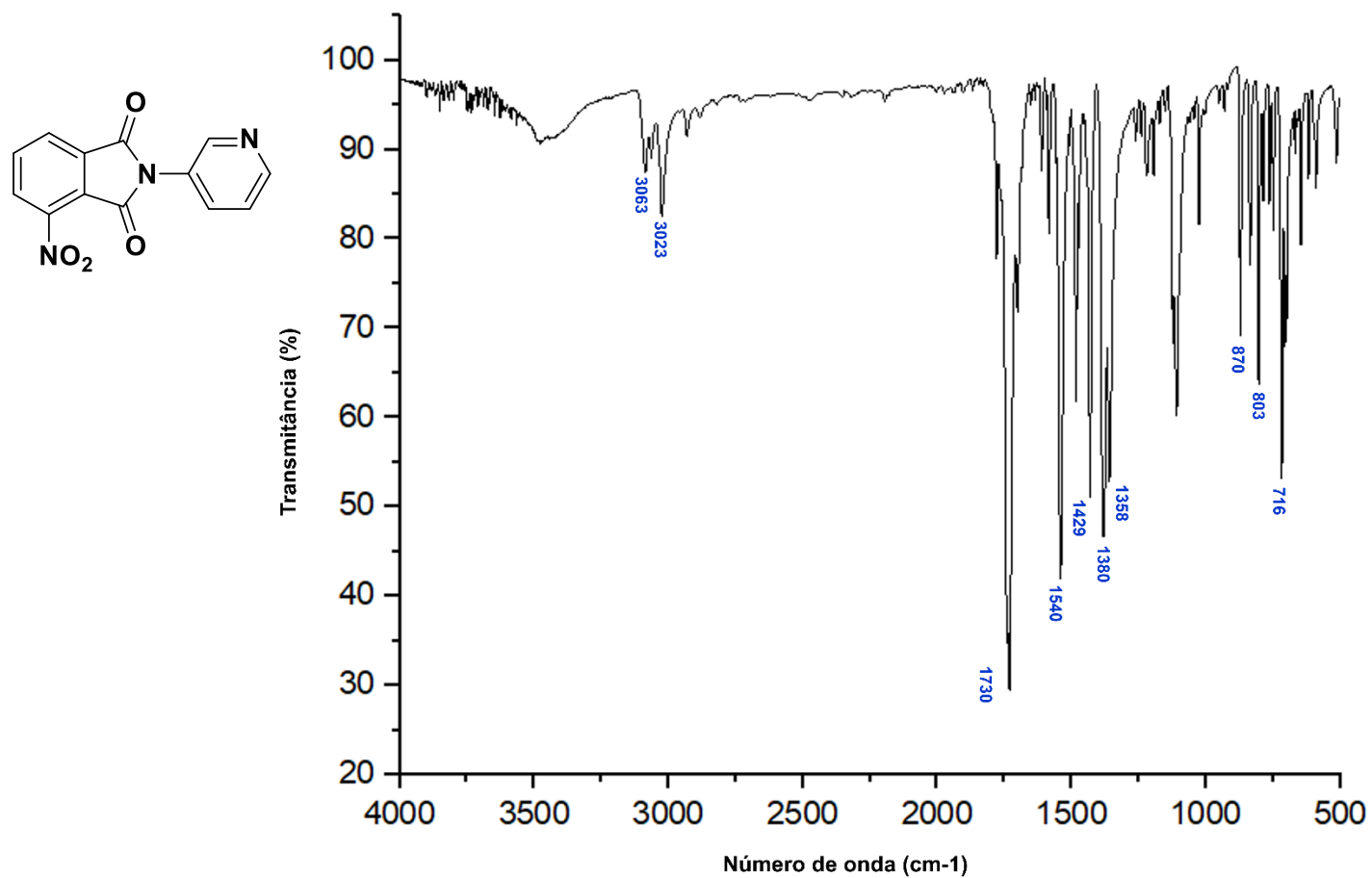


Figura 6: Infravermelho do intermediário 22b.

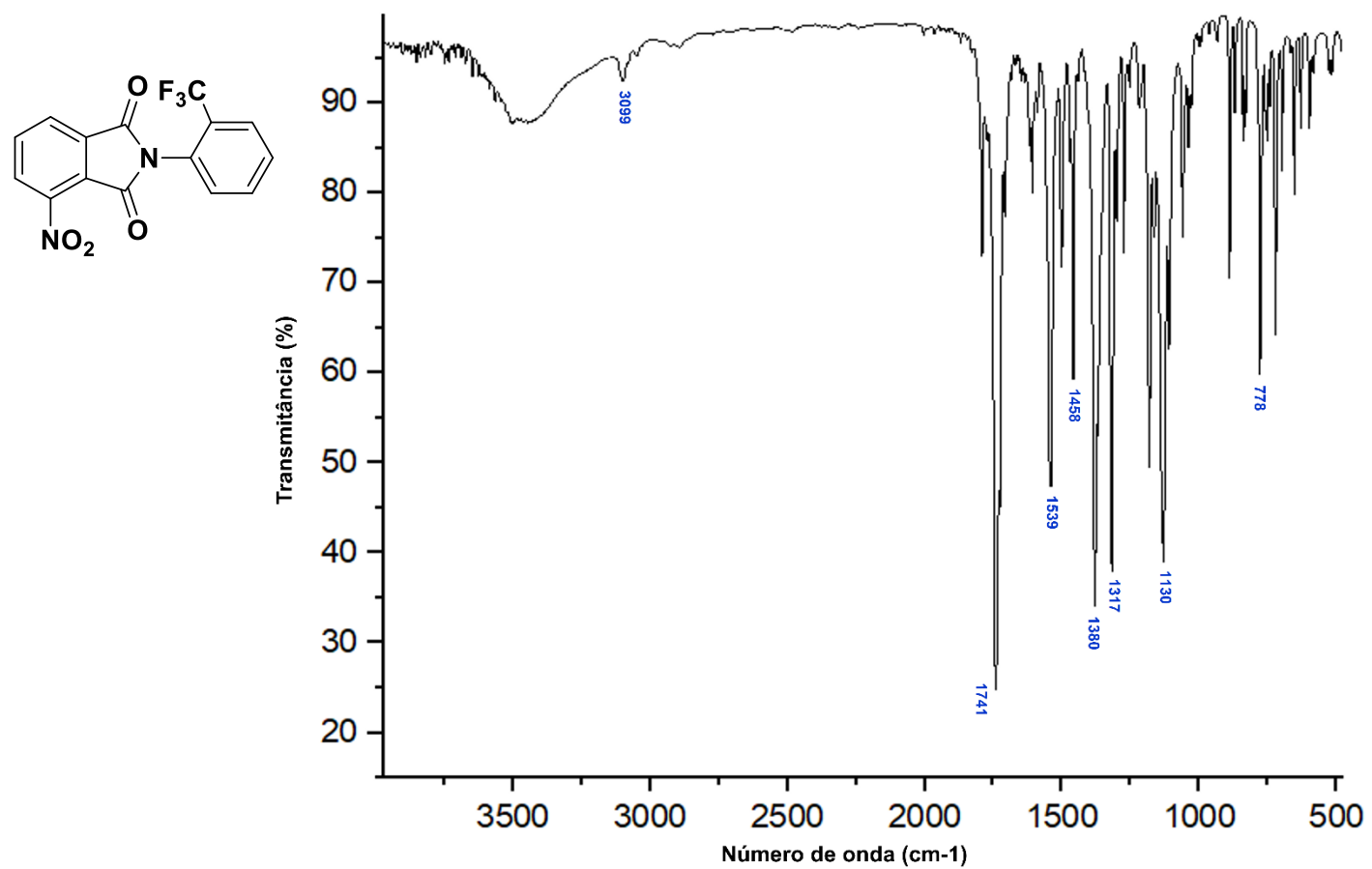


Figura 7: Infravermelho do intermediário 22d.

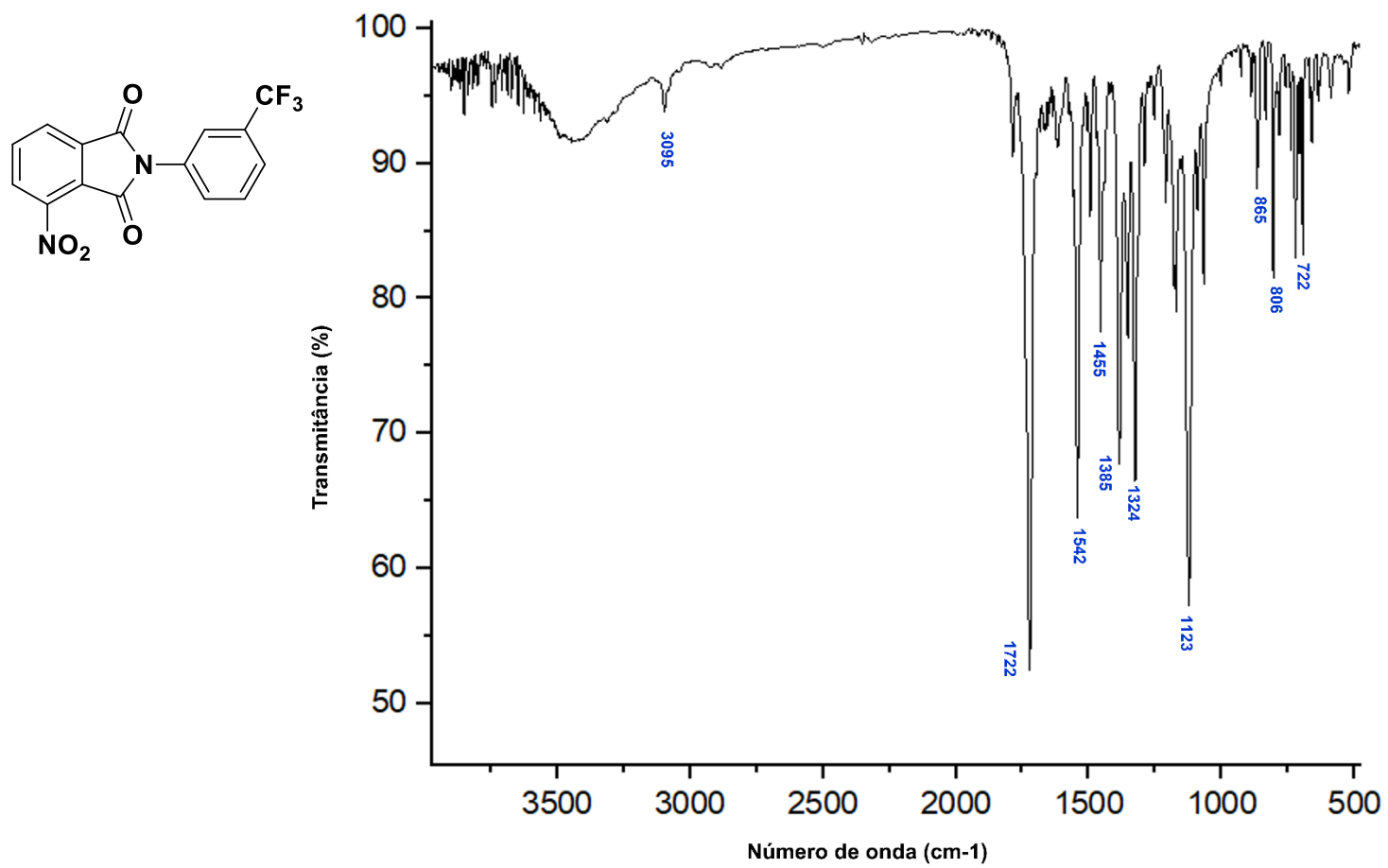


Figura 8: Infravermelho do intermediário 22e.

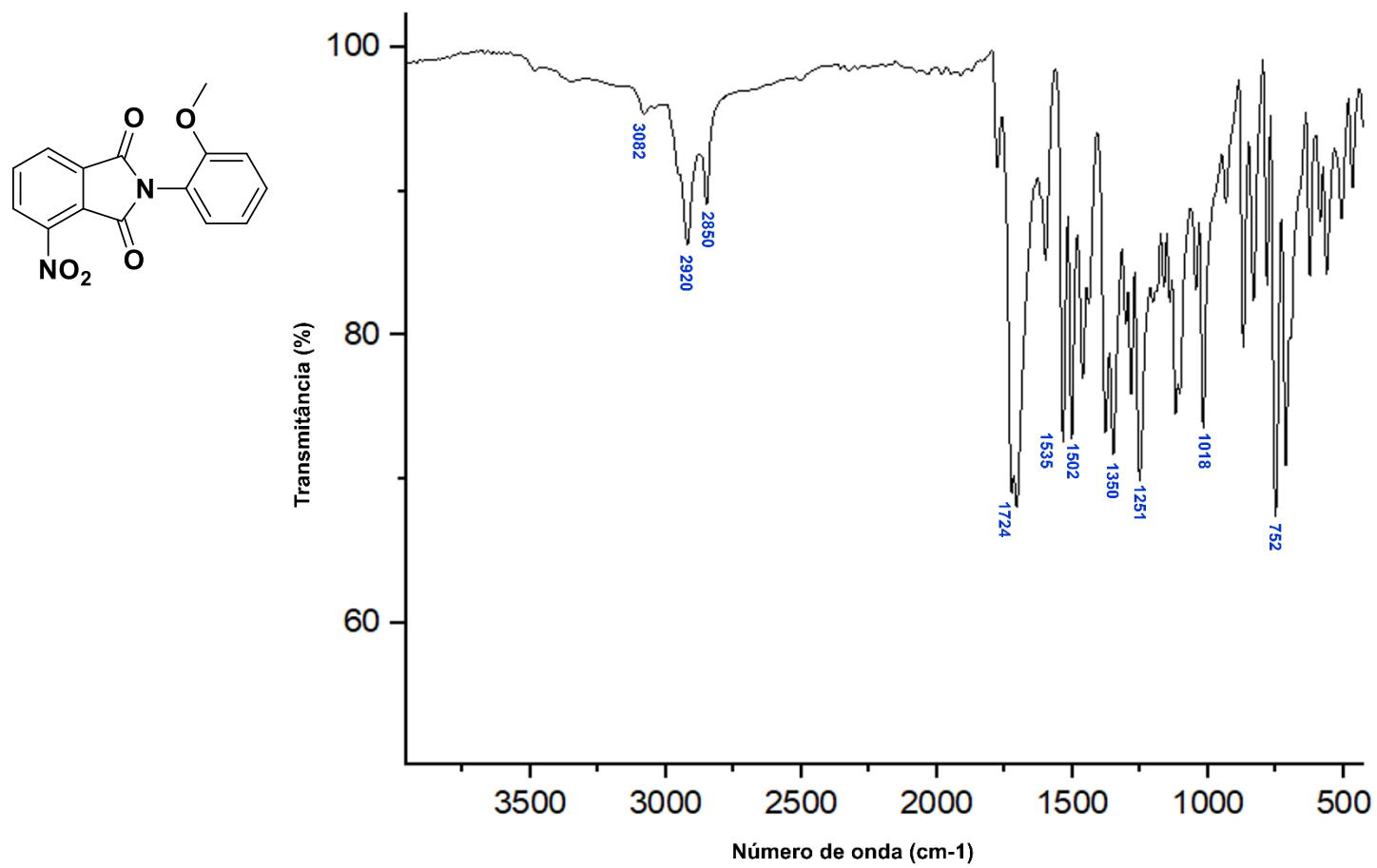


Figura 9: Infravermelho do intermediário 22f.

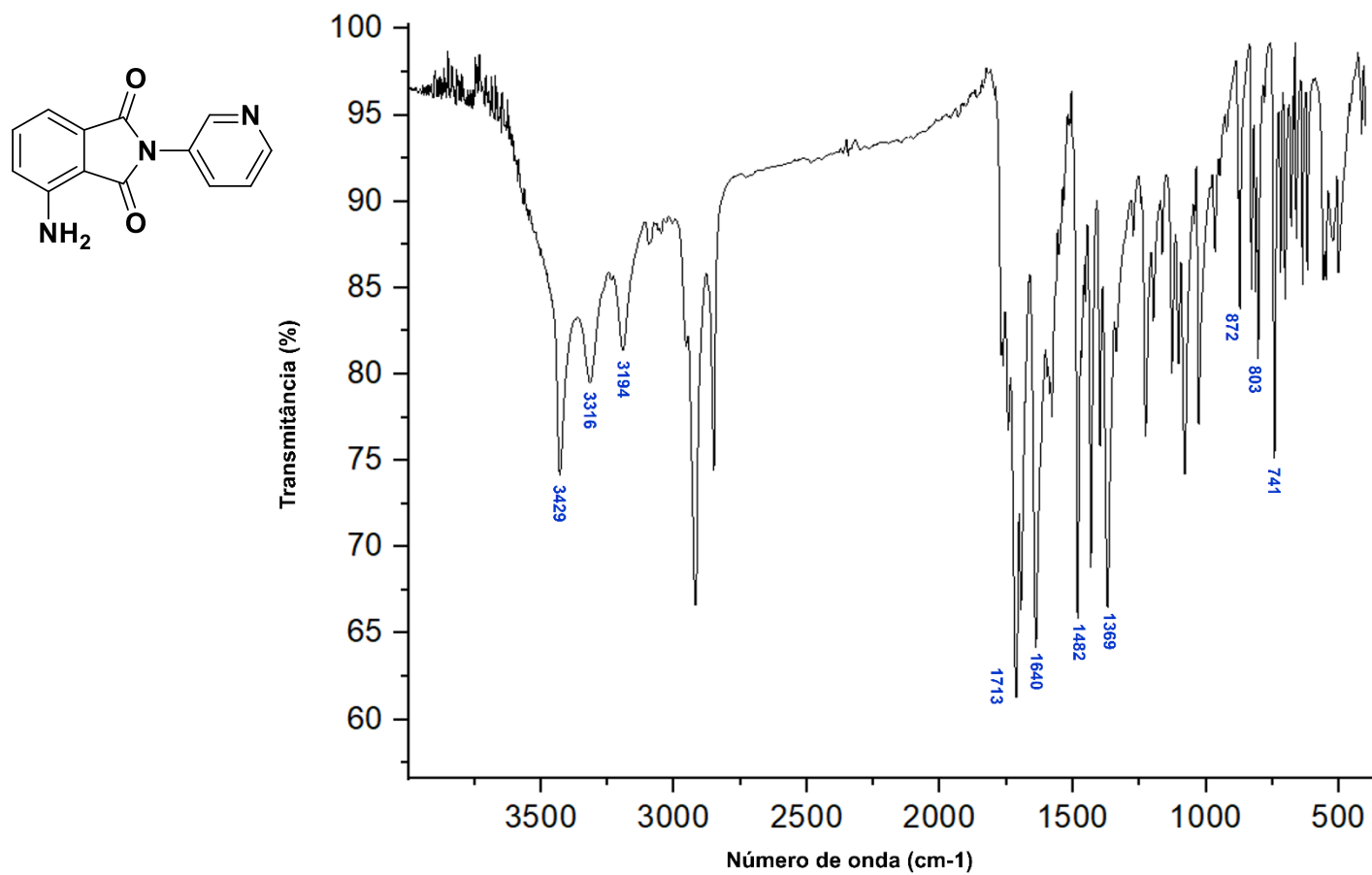


Figura 10: Infravermelho do intermediário **23b**.

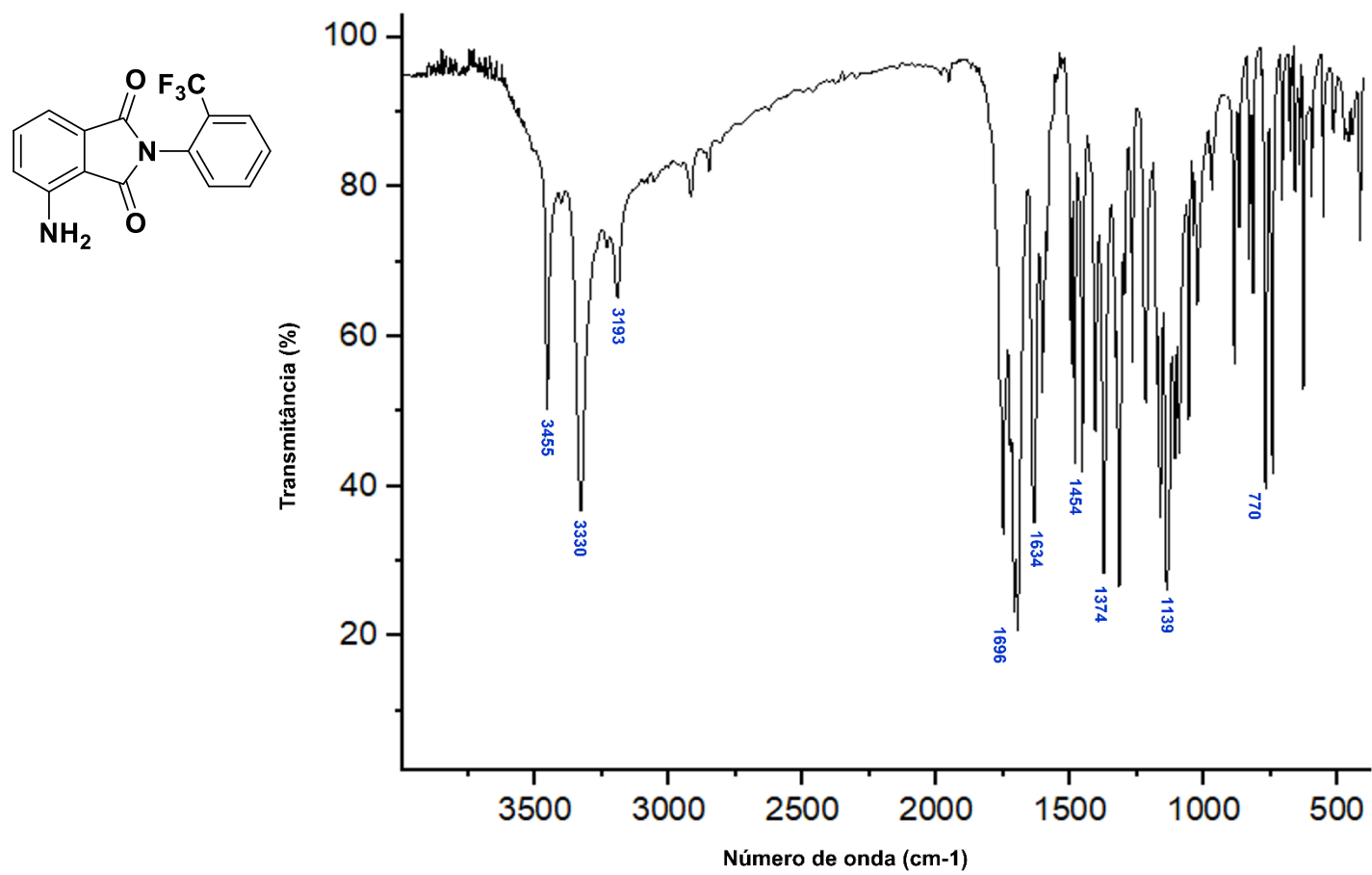


Figura 11: Infravermelho do intermediário **23d**.

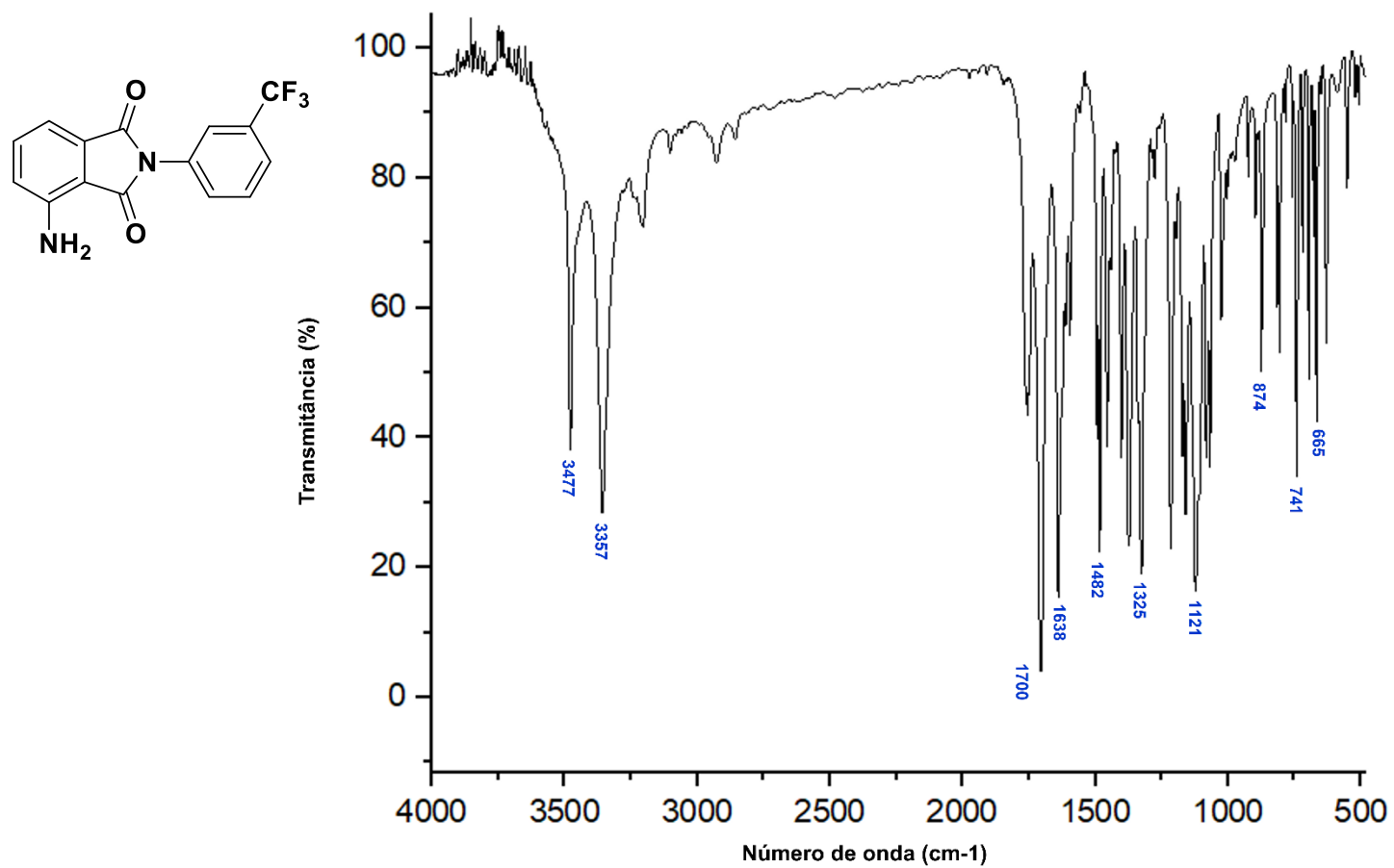


Figura 12: Infravermelho do intermediário **23e**.

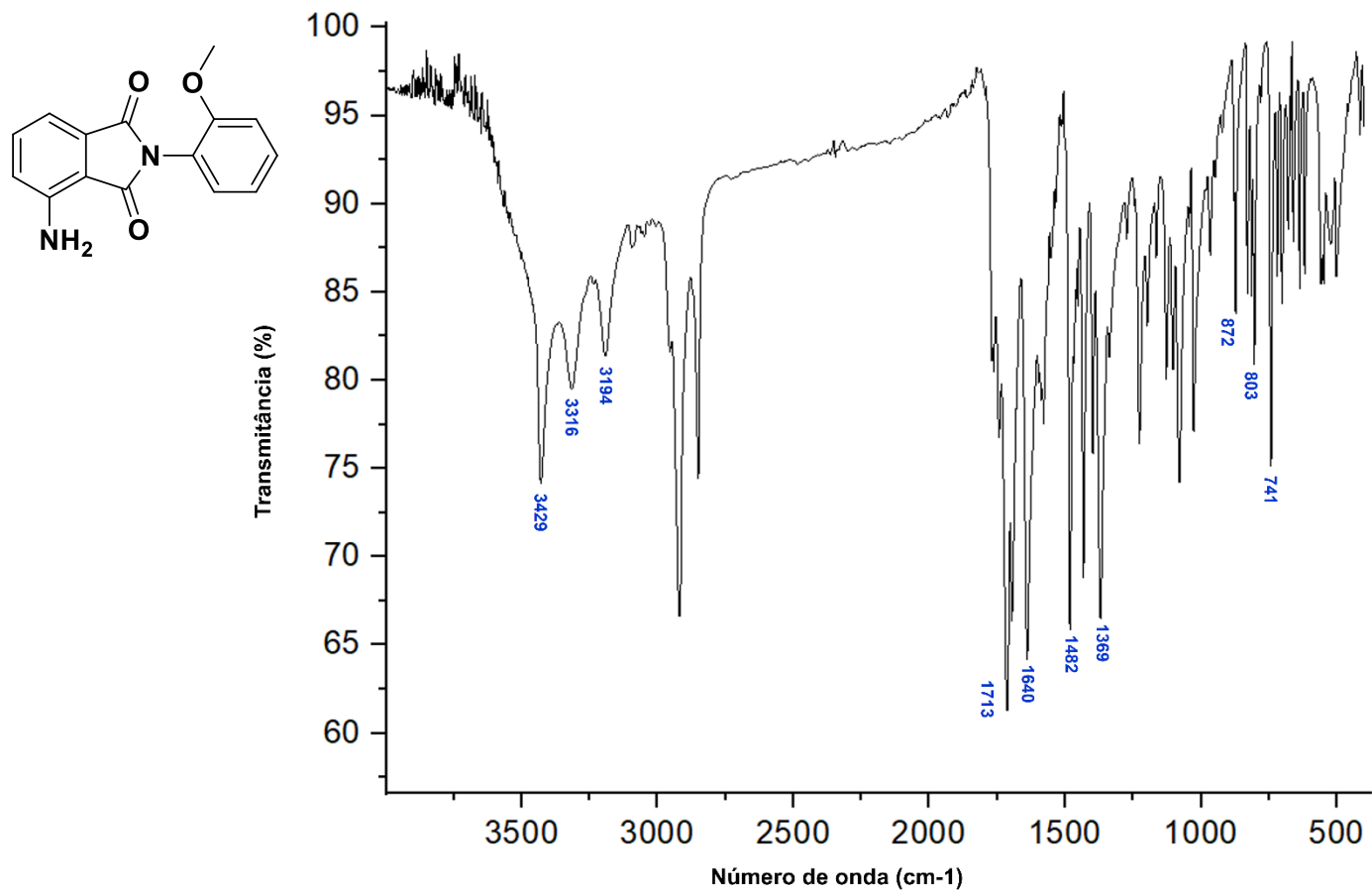
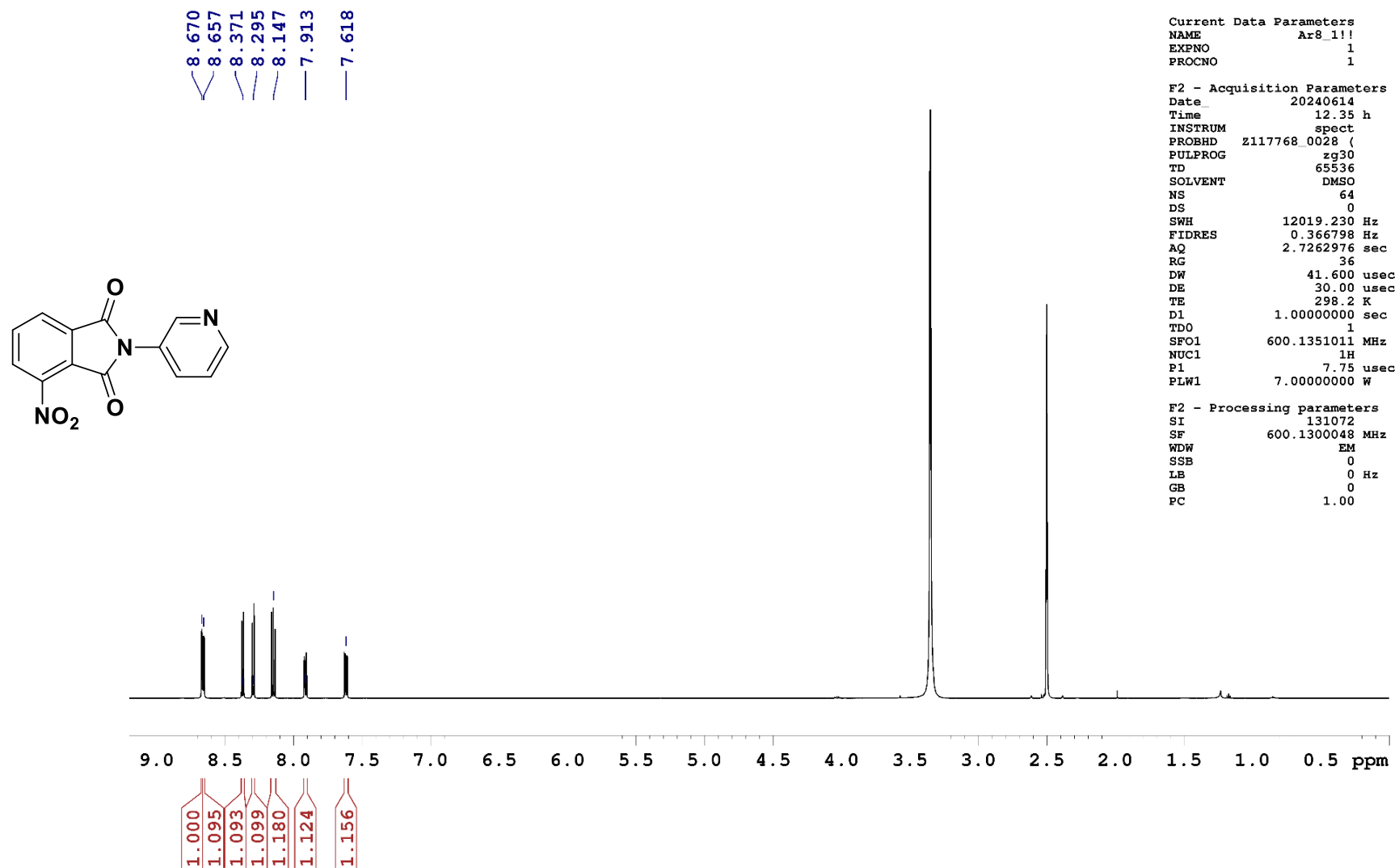


Figura 13: Infravermelho do intermediário **23f**.

ANEXO C – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Figura 14: Espectro de RMN ¹H (600 MHz) Intermediário **22b**.

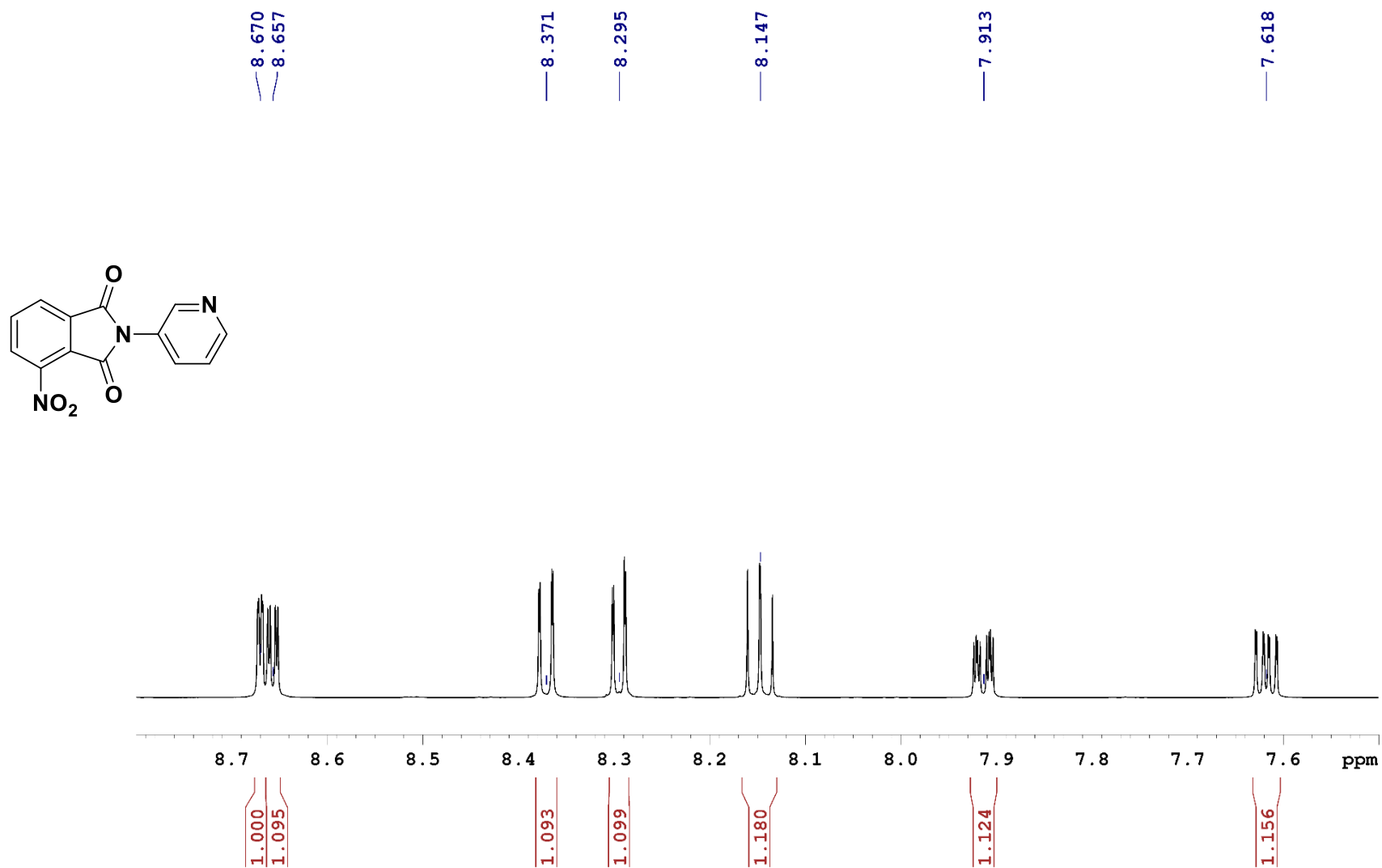


Figura 15: Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz) Intermediário 22b.

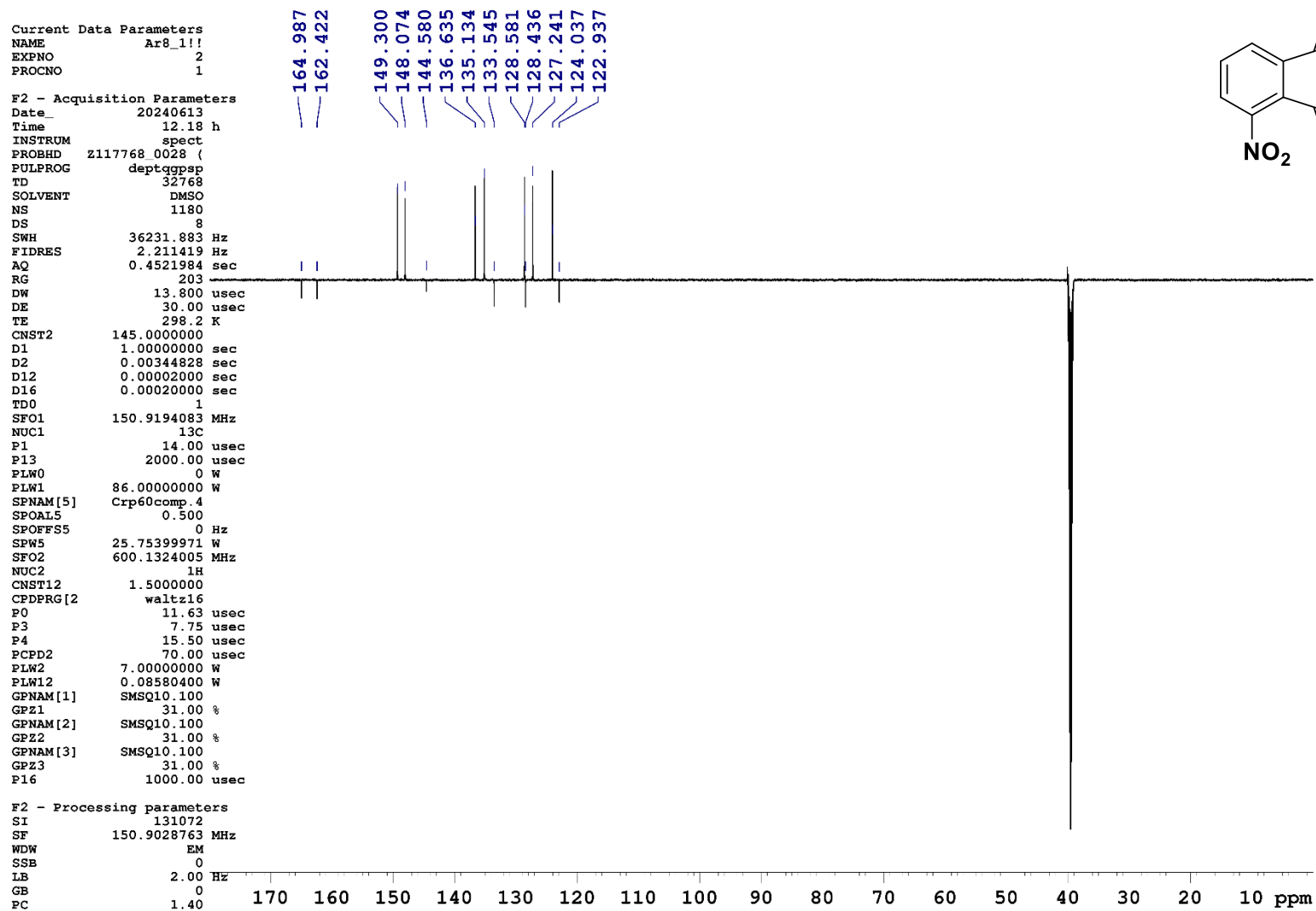


Figura 16: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário 22b.

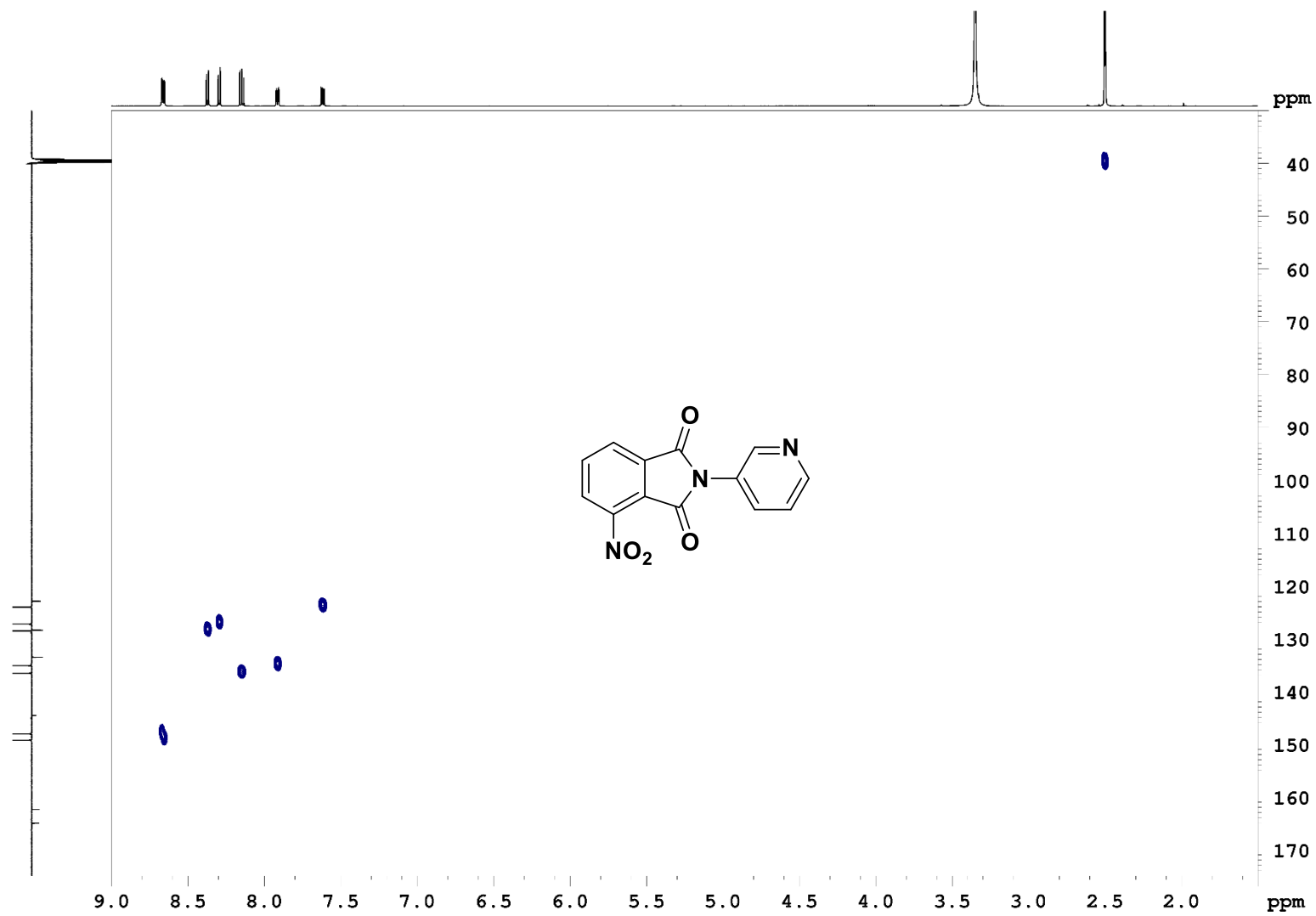


Figura 17: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário 22b.

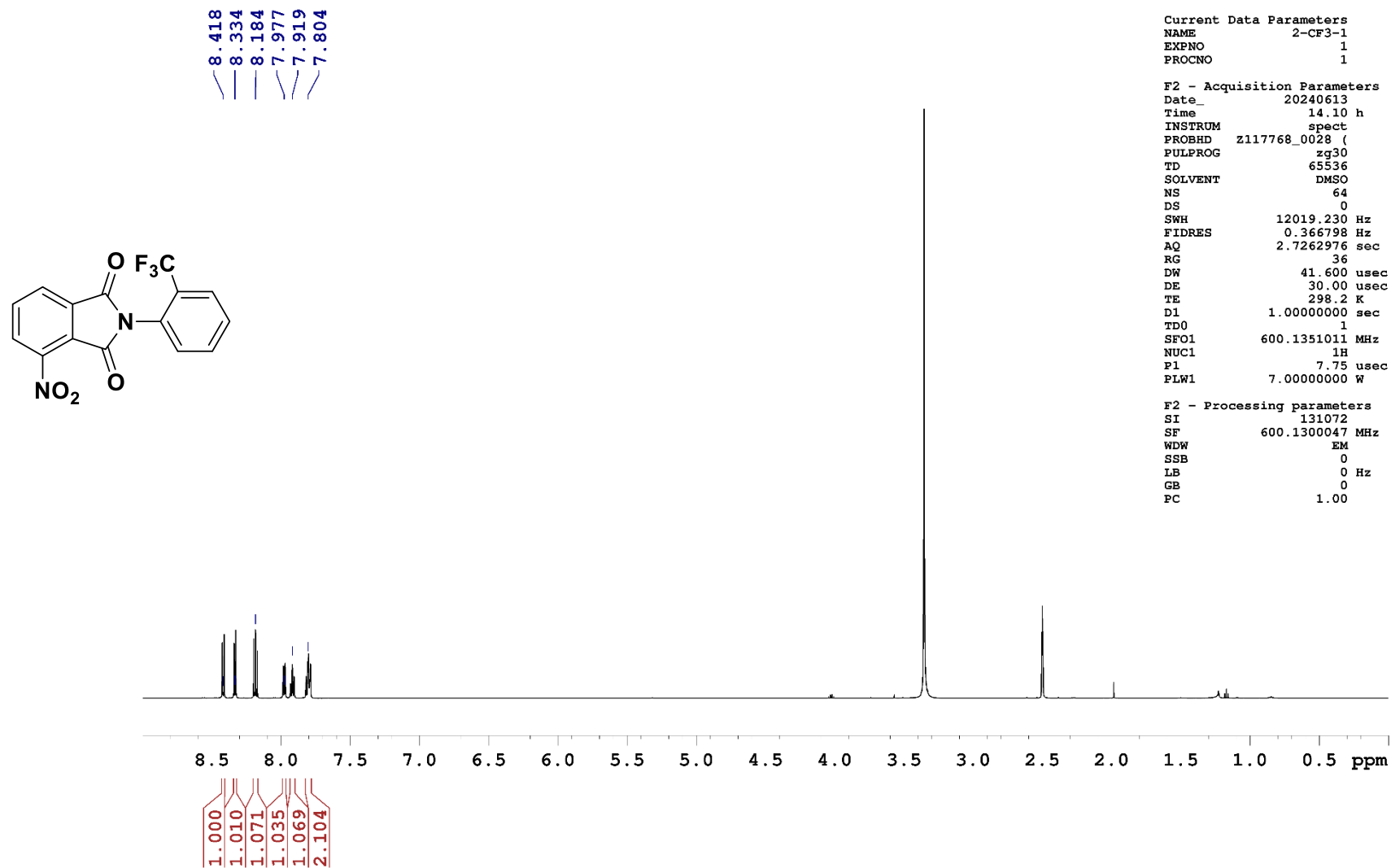


Figura 18: Espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário 22d.

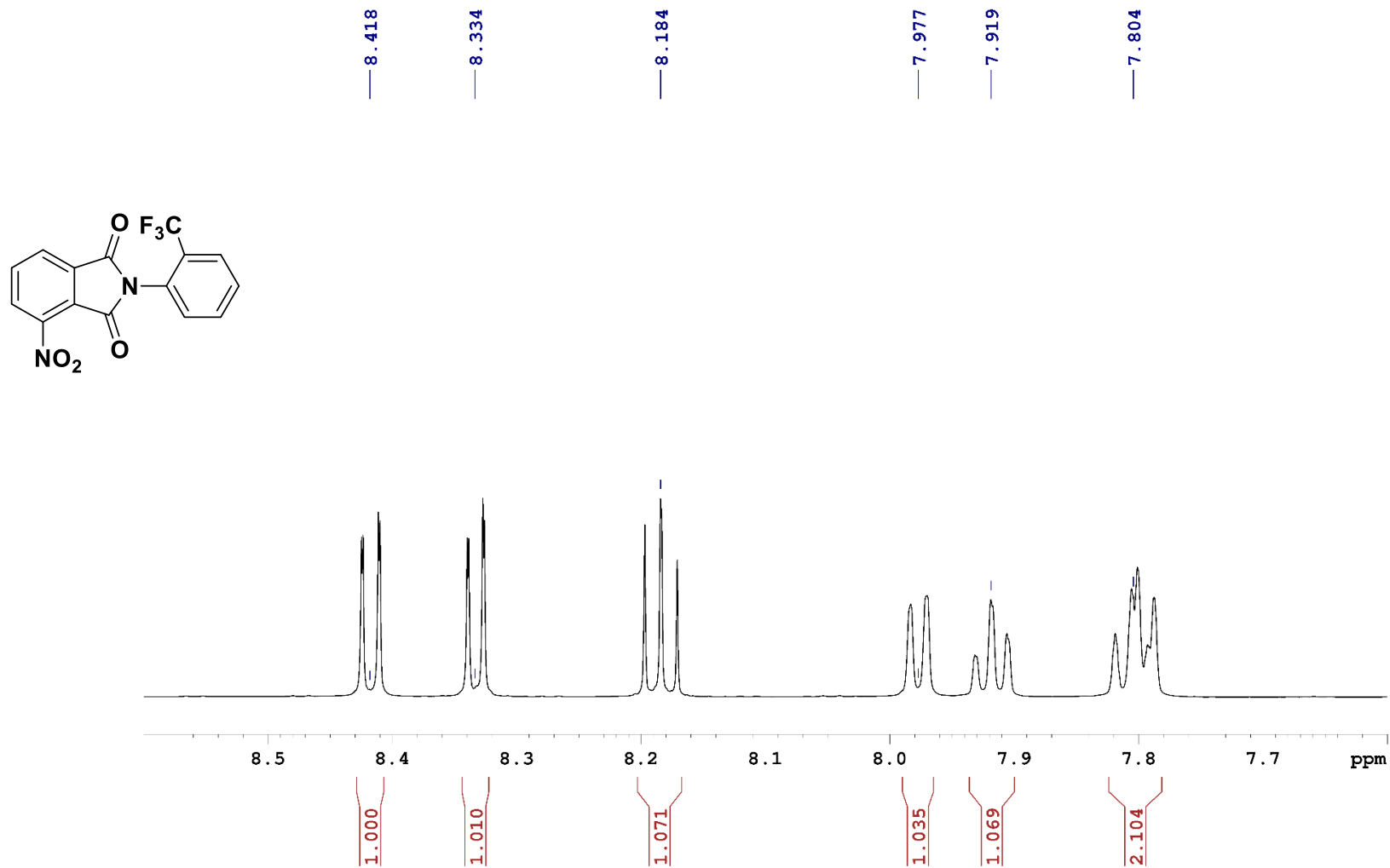


Figura 19: Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz) Intermediário 22d.

```

Current Data Parameters
NAME          2-CF3-1
EXPNO         2
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20240613
Time          15.42 h
INSTRUM       spect
PROBHD        z117768_0028 (
PULPROG       deptqgpsp
TD            32768
SOLVENT       DMSO
NS            2360
DS            8
SWH           36231.883 Hz
FIDRES        2.211419 Hz
AQ            0.4521984 sec
RG            203
DW            13.800 usec
DE            30.00 usec
TE            298.1 K
CNST2         145.0000000
D1            1.0000000 sec
D2            0.00344828 sec
D12           0.00002000 sec
D16           0.00020000 sec
TD0           1
SFO1          150.9194083 MHz
NUC1          13C
P1            14.00 usec
P13           2000.00 usec
PLW0          0 W
PLW1          86.00000000 W
SPNAM[5]      Crp60comp.4
SPOALS5       0.500
SPOFFS5       0 Hz
SPW5          25.75399971 W
SFO2          600.1324005 MHz
NUC2          1H
CNST12        1.5000000
CPDPRG[2]     waltz16
P0            11.63 usec
P3            7.75 usec
P4            15.50 usec
PCPD2         70.00 usec
PLW2          7.00000000 W
PLW12         0.08580400 W
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1          31.00 %
GPNAM[2]      SMSQ10.100
GPZ2          31.00 %
GPNAM[3]      SMSQ10.100
GPZ3          31.00 %
P16           1000.00 usec

F2 - Processing parameters
SI            131072
SF            150.9028755 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            2.00 Hz
GB            0
PC            1.40

```

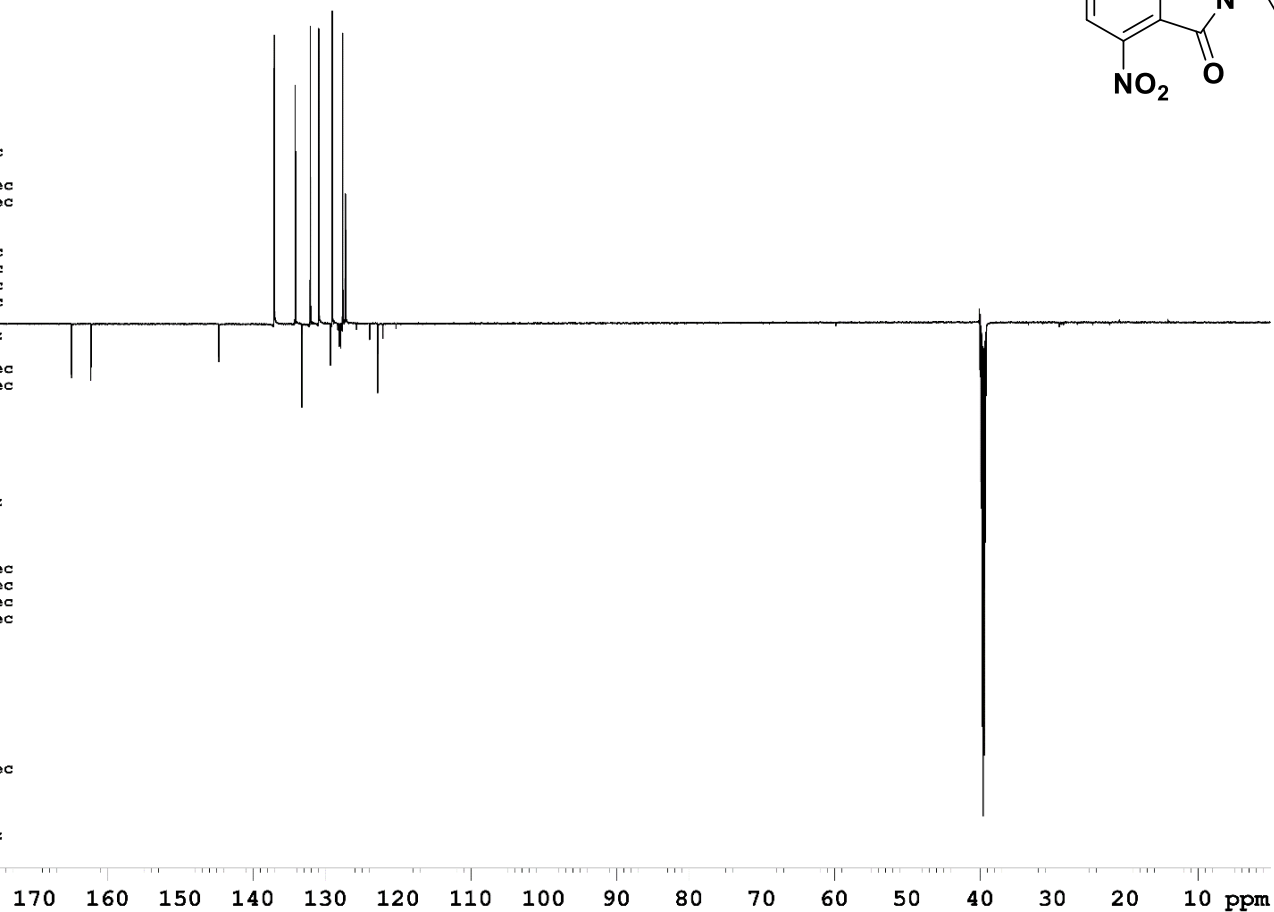


Figura 20: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário 22d.

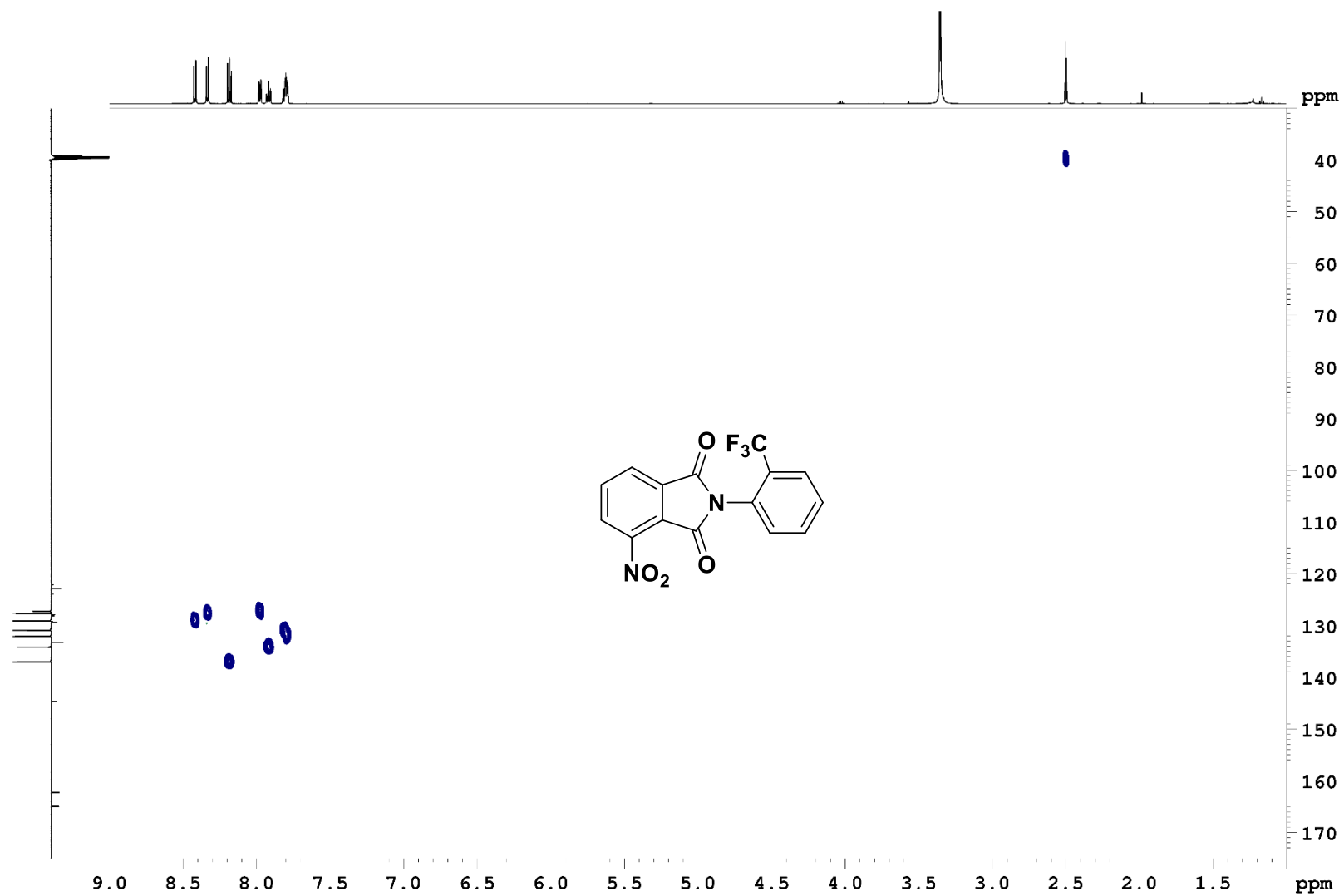


Figura 21: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário **22d**.

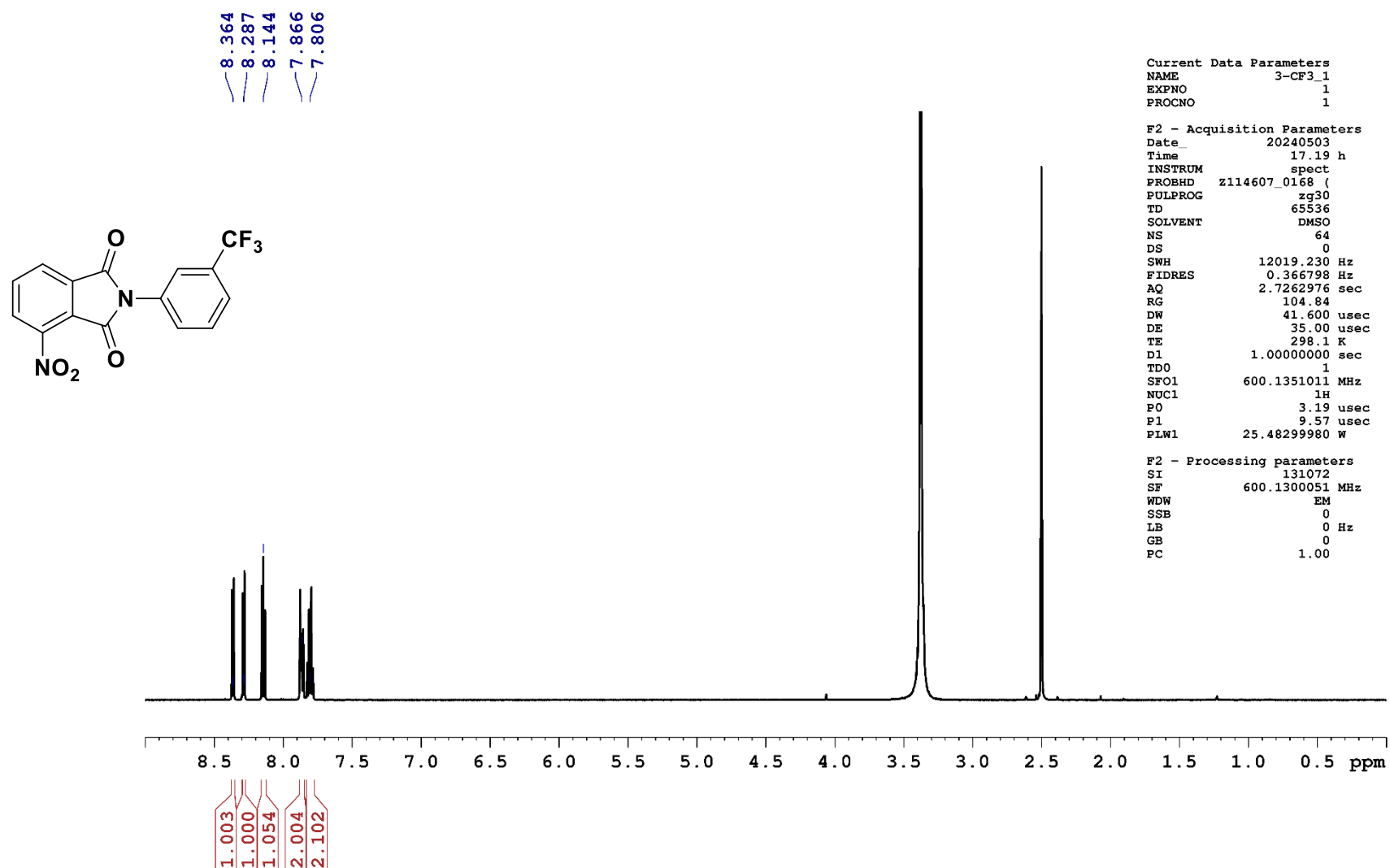


Figura 22: Espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário **22e**.

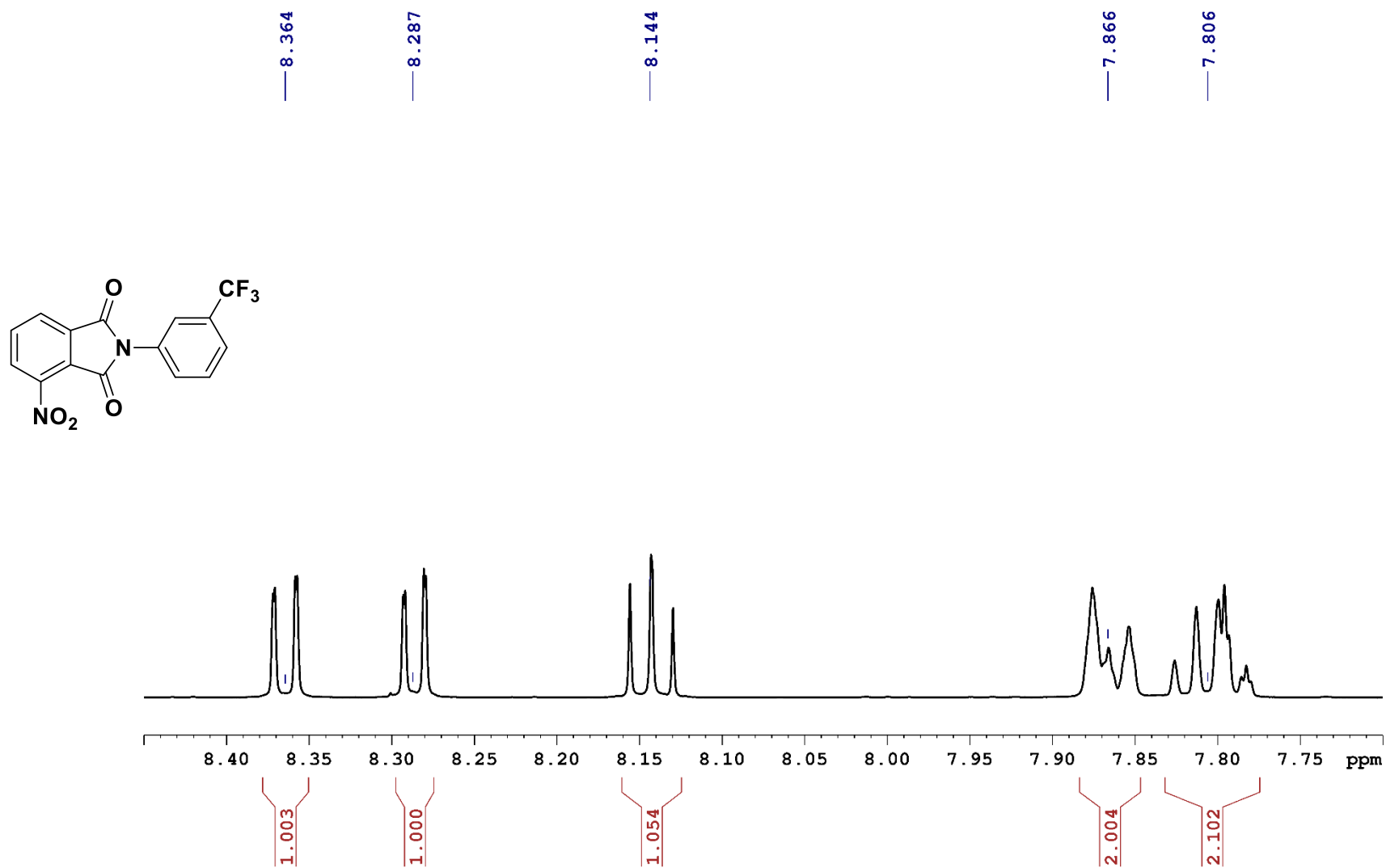


Figura 23: Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz) Intermediário **22e**.

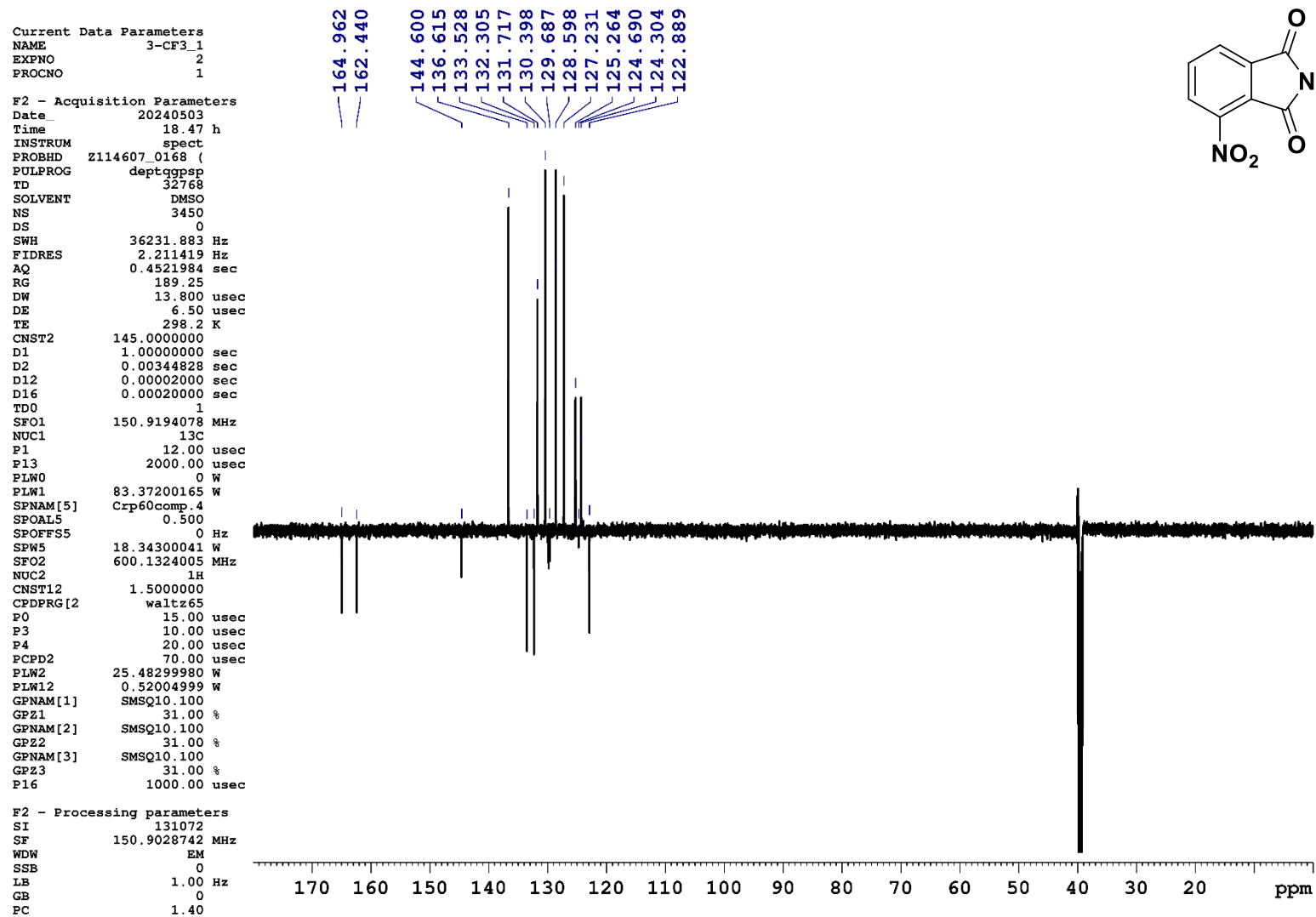


Figura 24: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário **22e**.

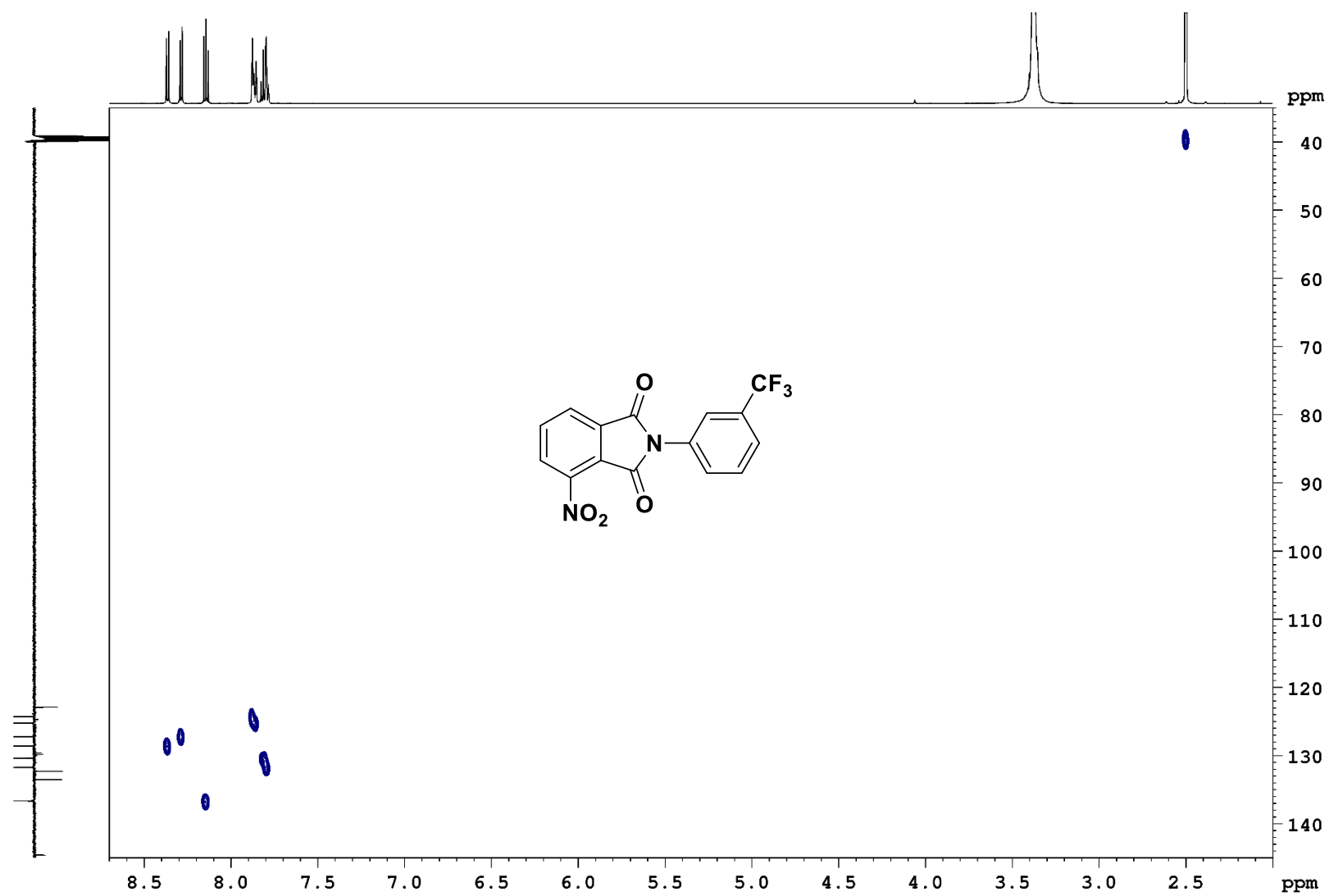


Figura 25: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário **22e**.

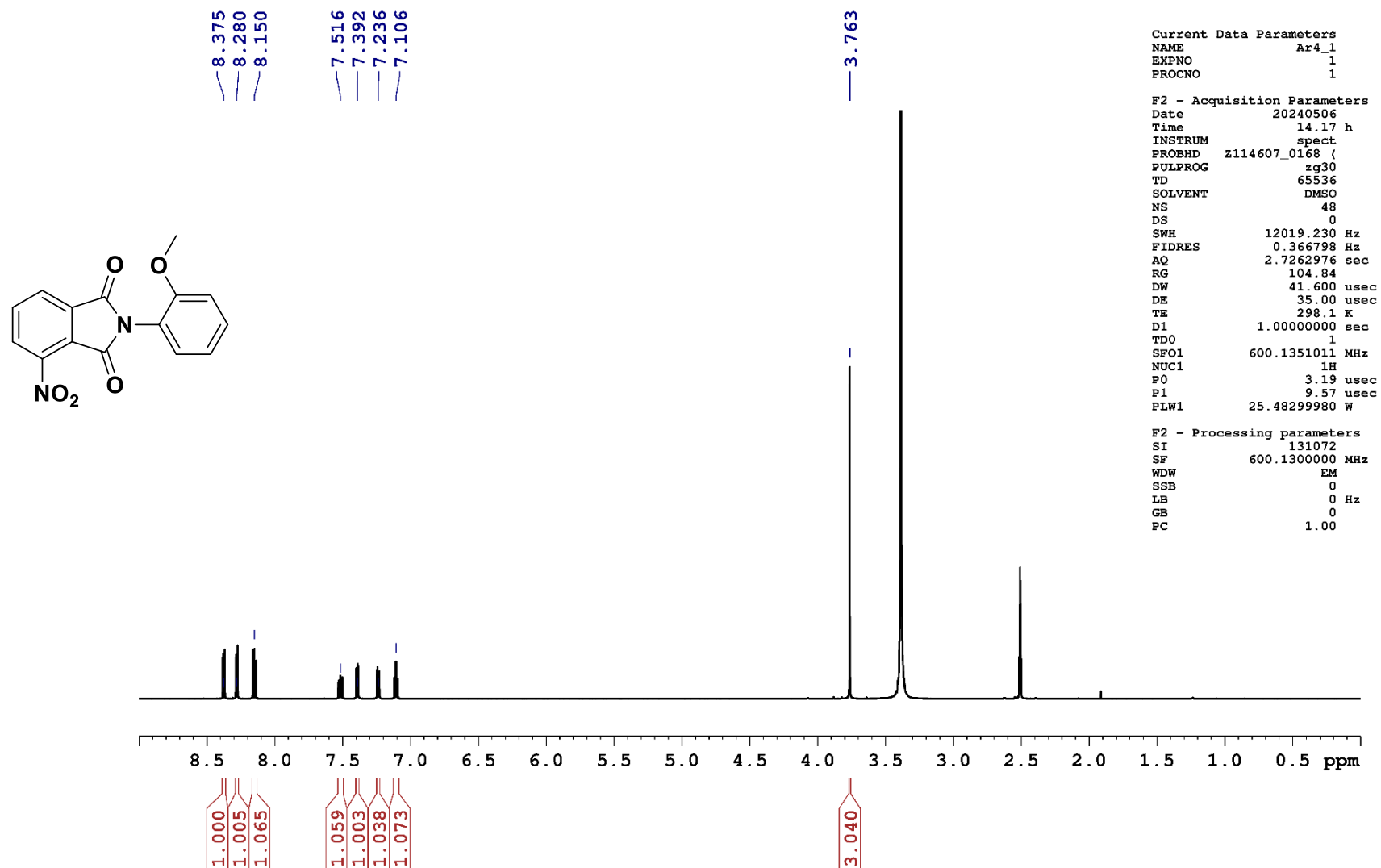


Figura 26: Espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário 22f.

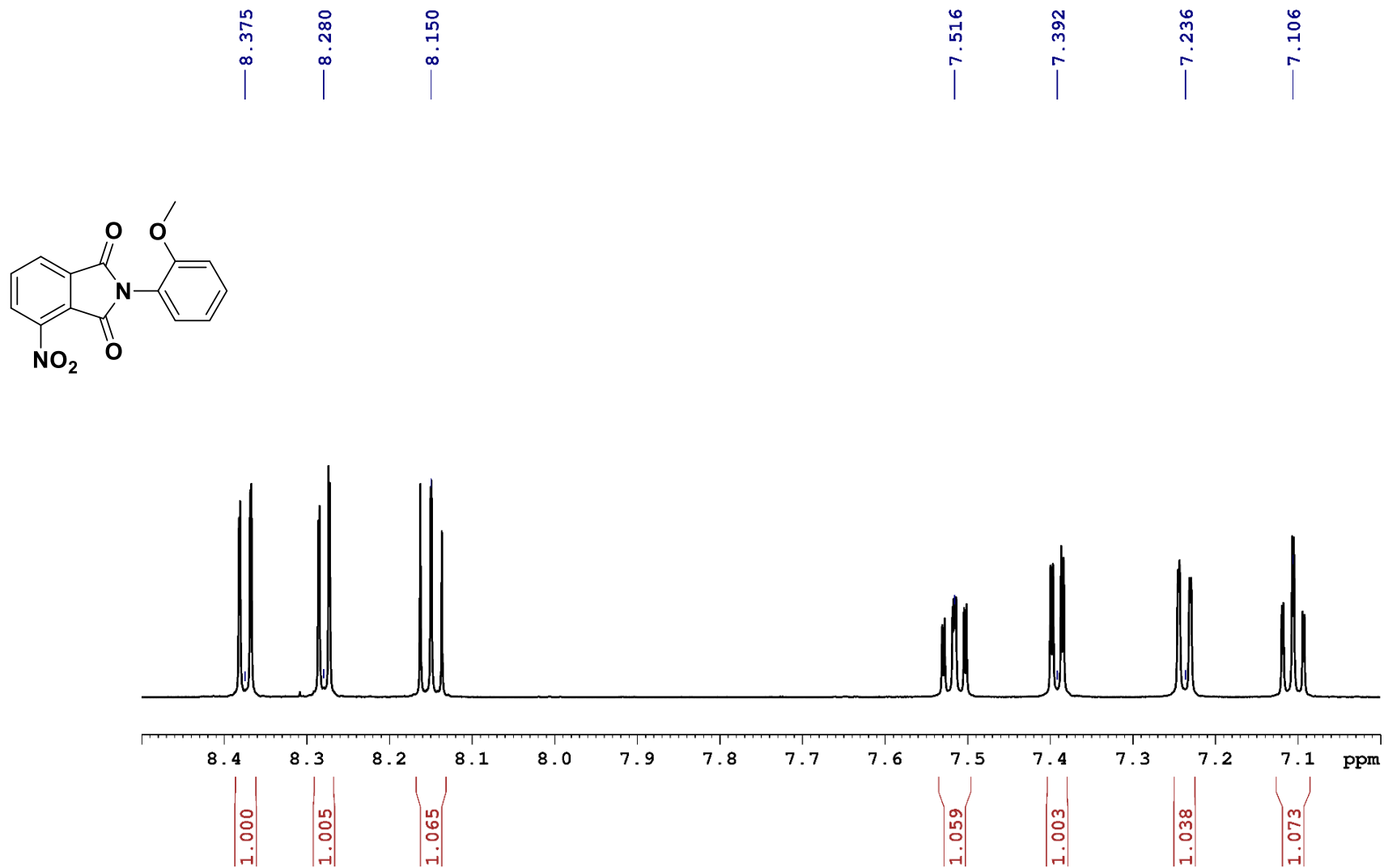


Figura 27: Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário **22f**.

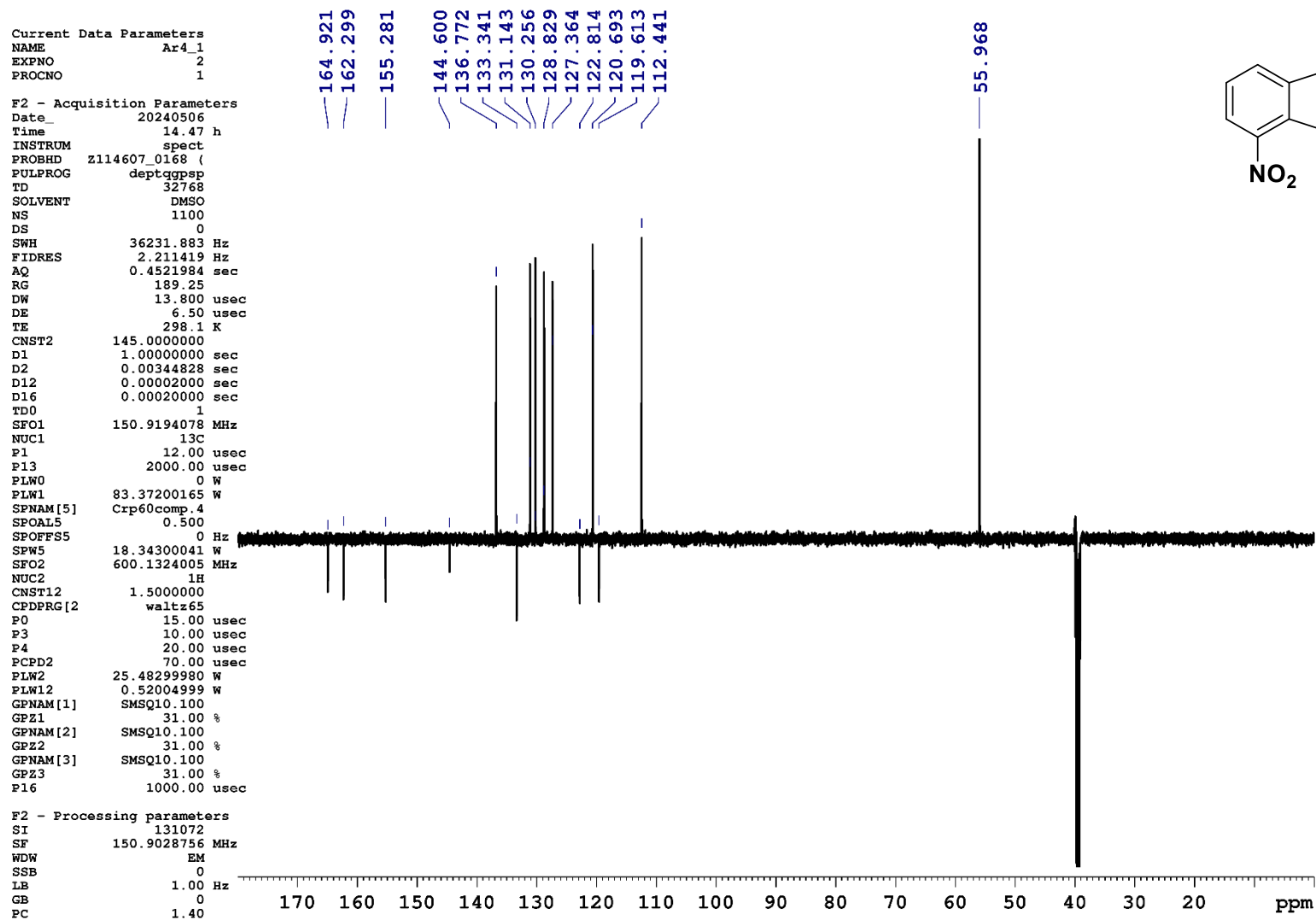


Figura 28: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário 22f.

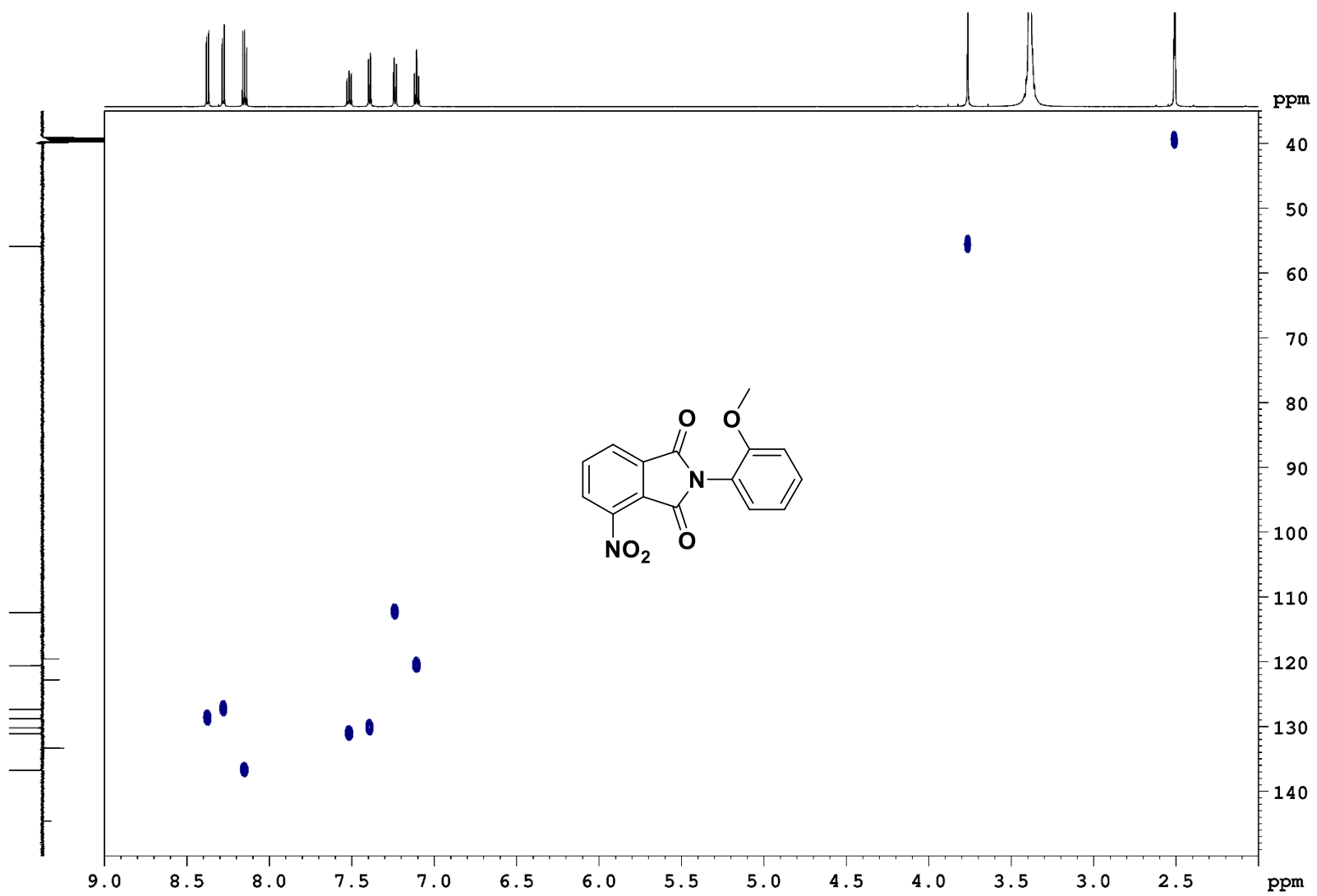


Figura 29: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário 22f.

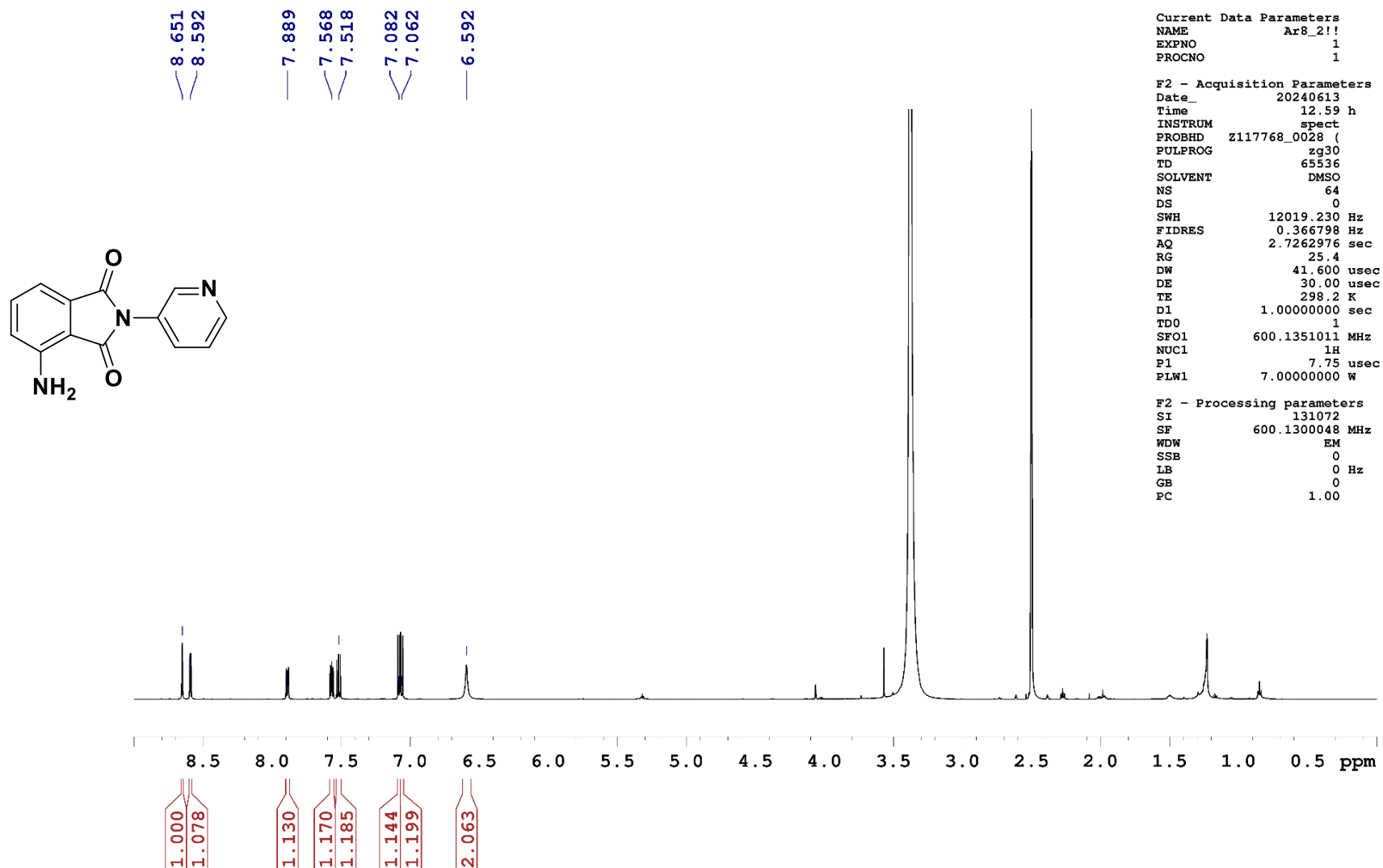


Figura 30: Espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário 23b.

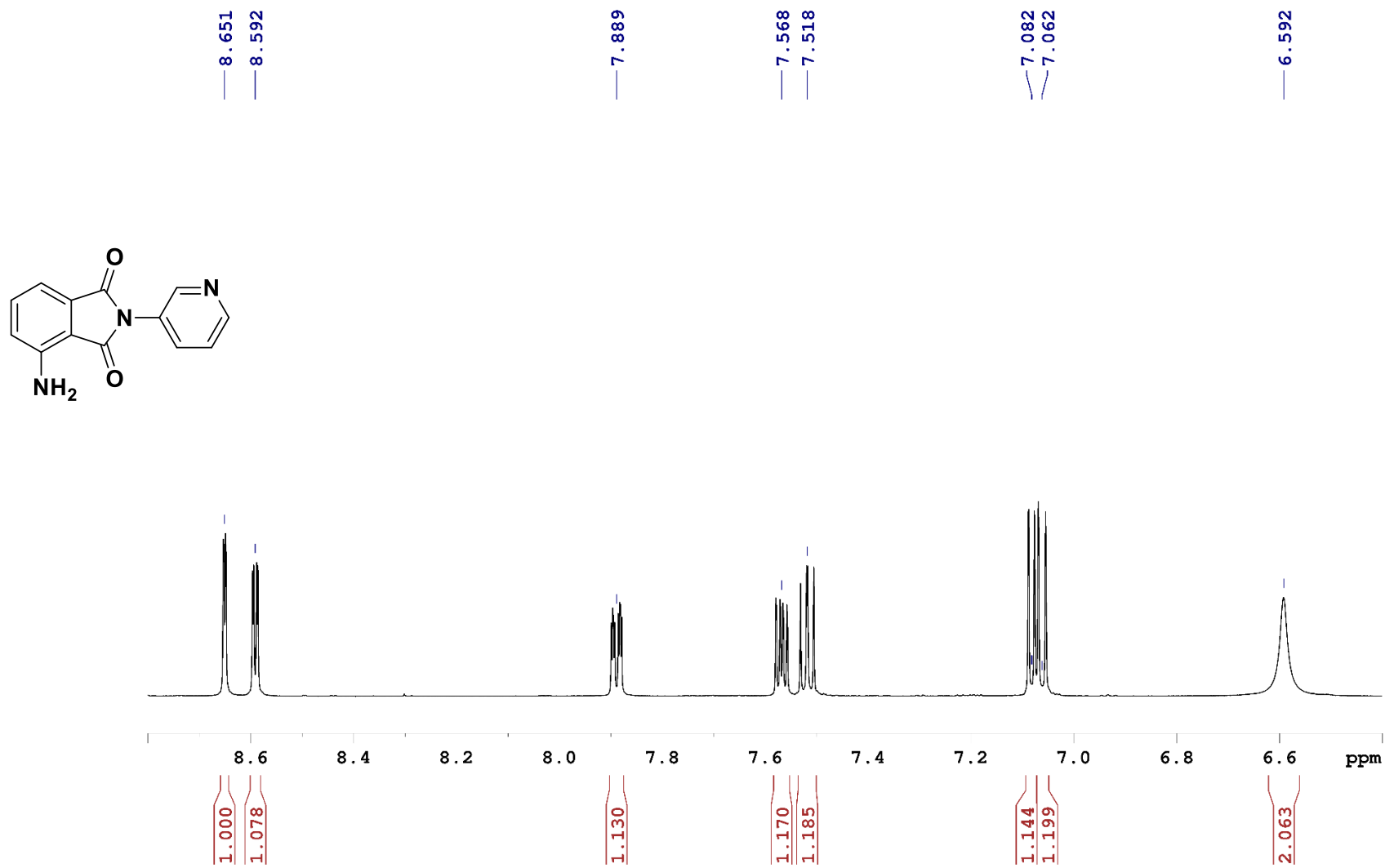


Figura 31: Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz) Intermediário 23b.

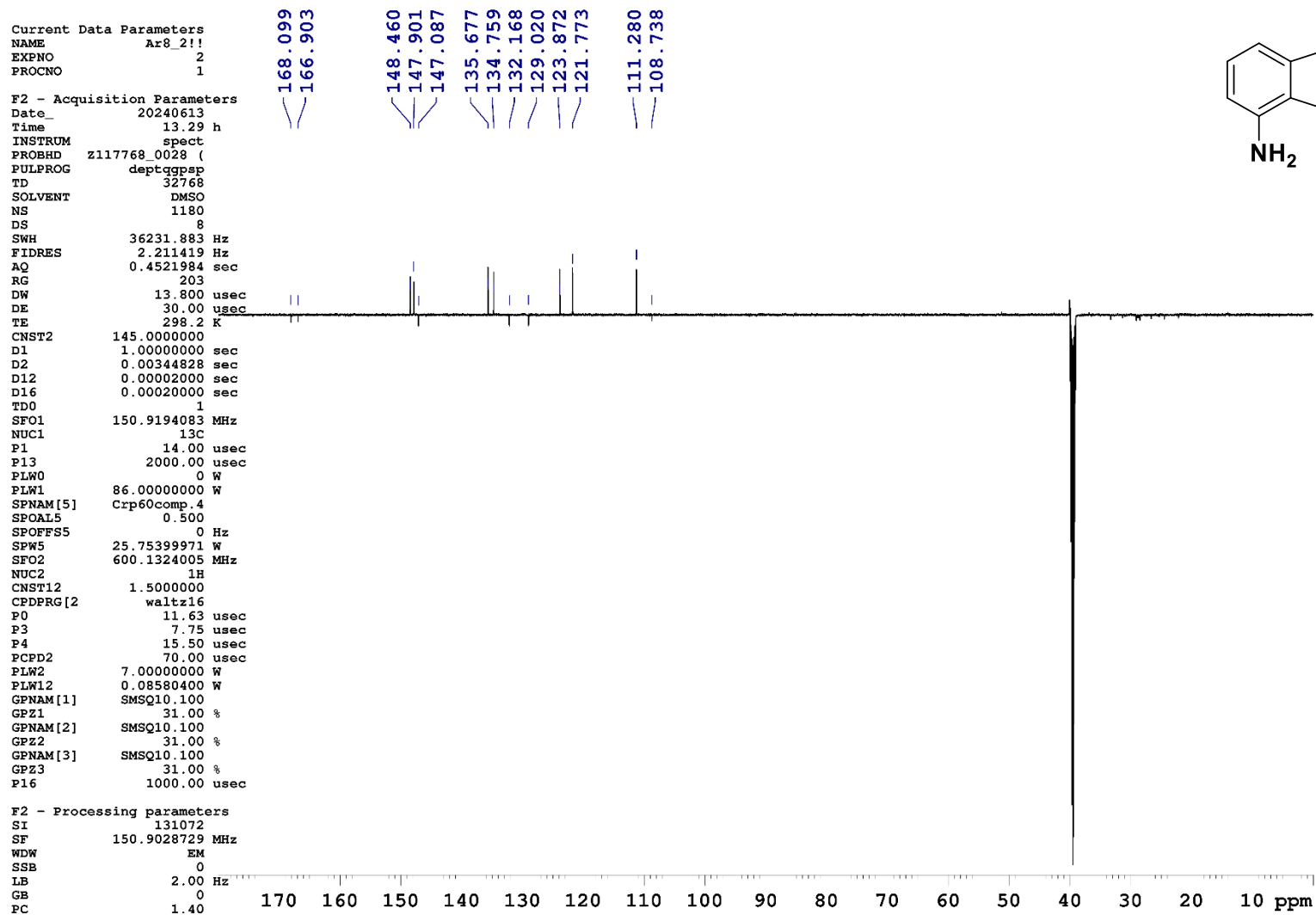


Figura 32: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário 23b.

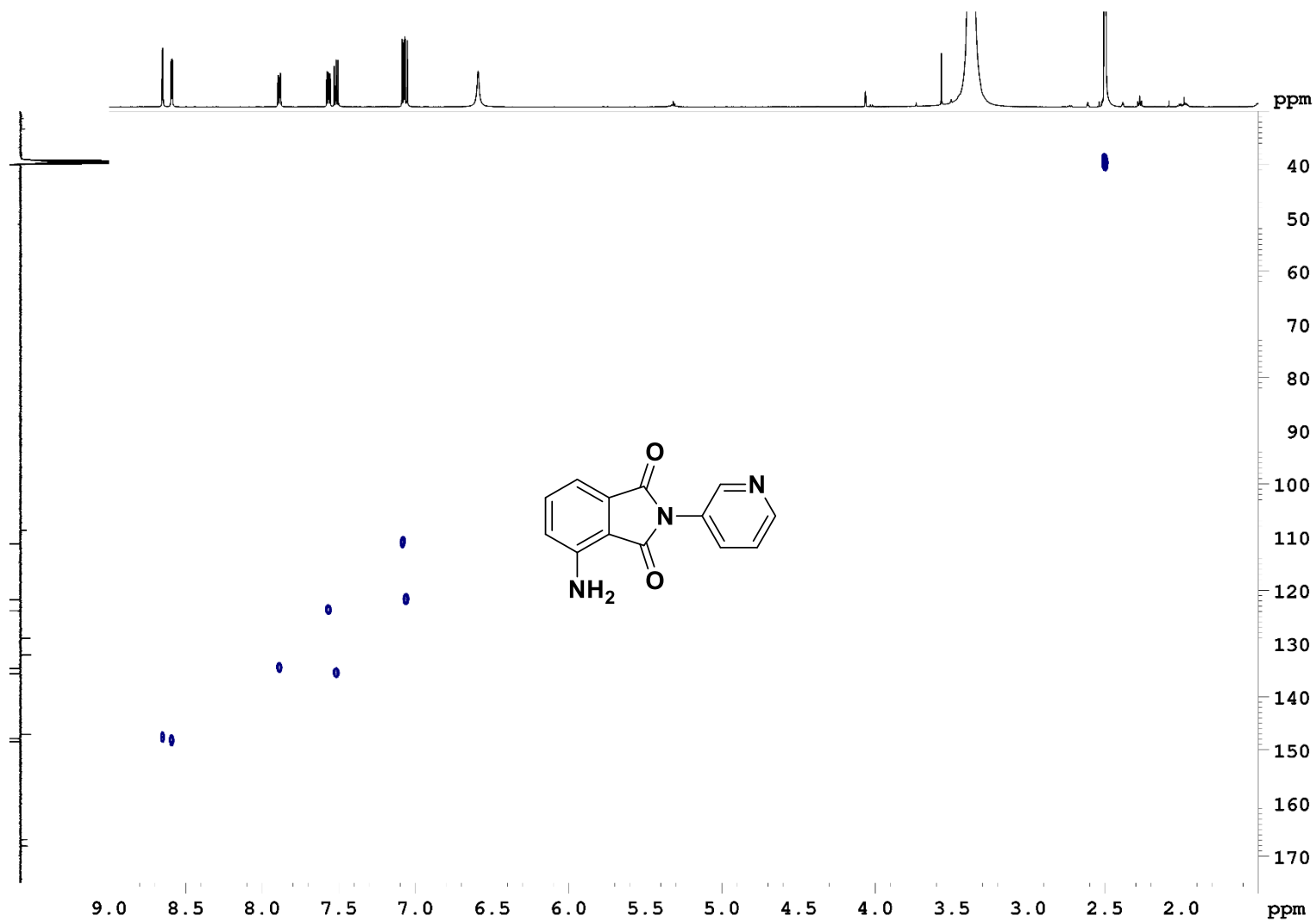


Figura 33: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário 23b.

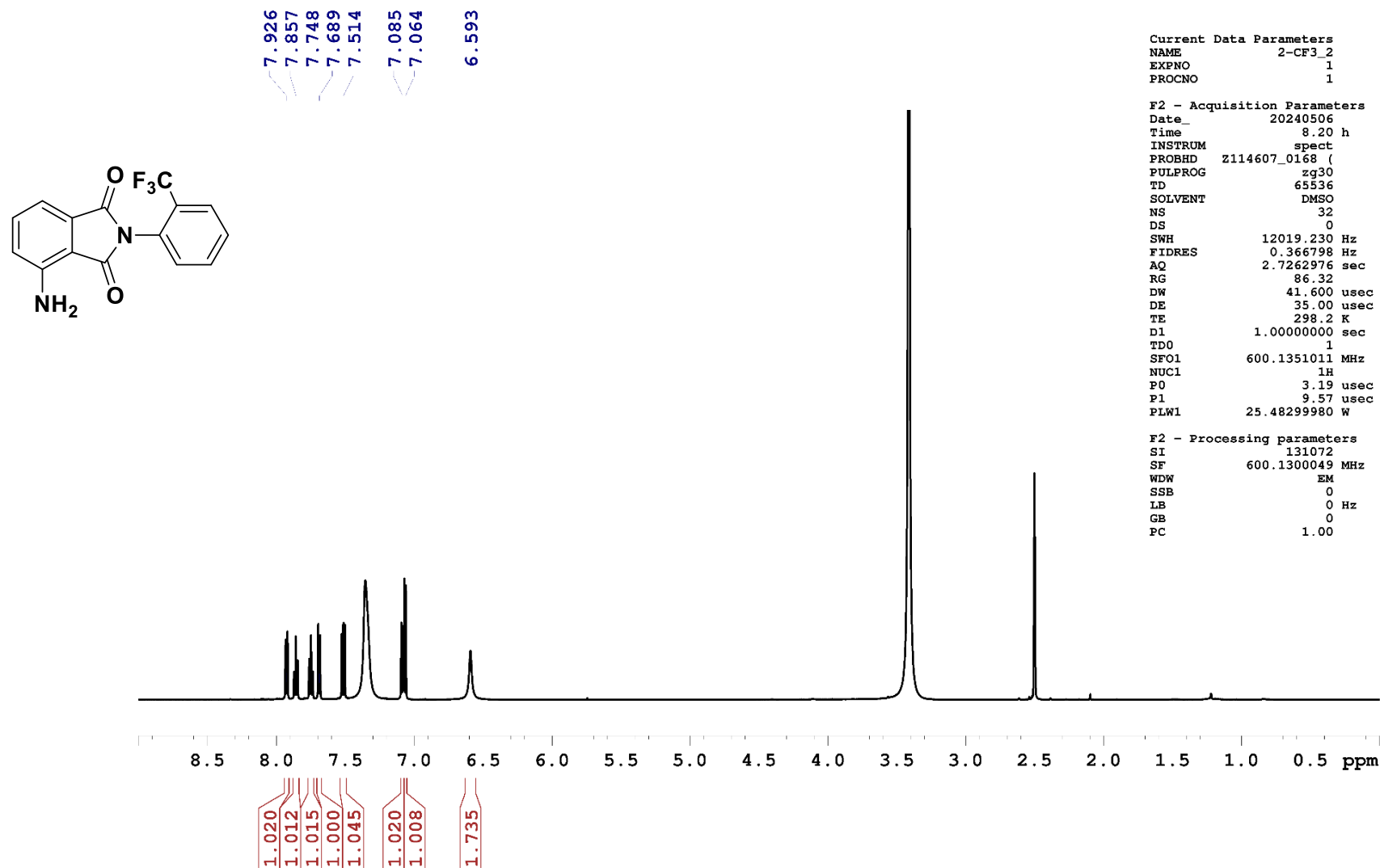


Figura 34: Espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário 23d.

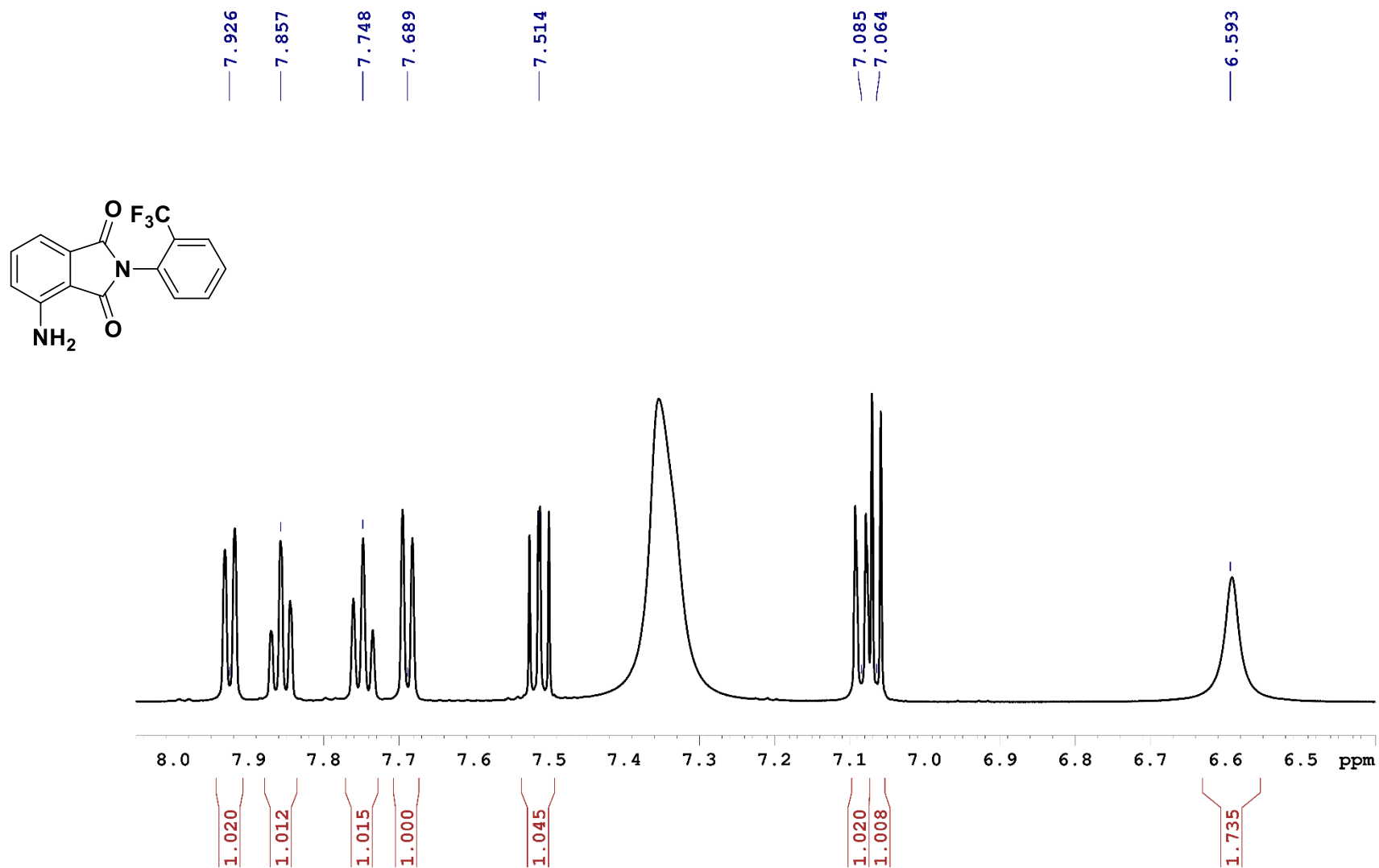


Figura 35: Ampliação do espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário 23d.

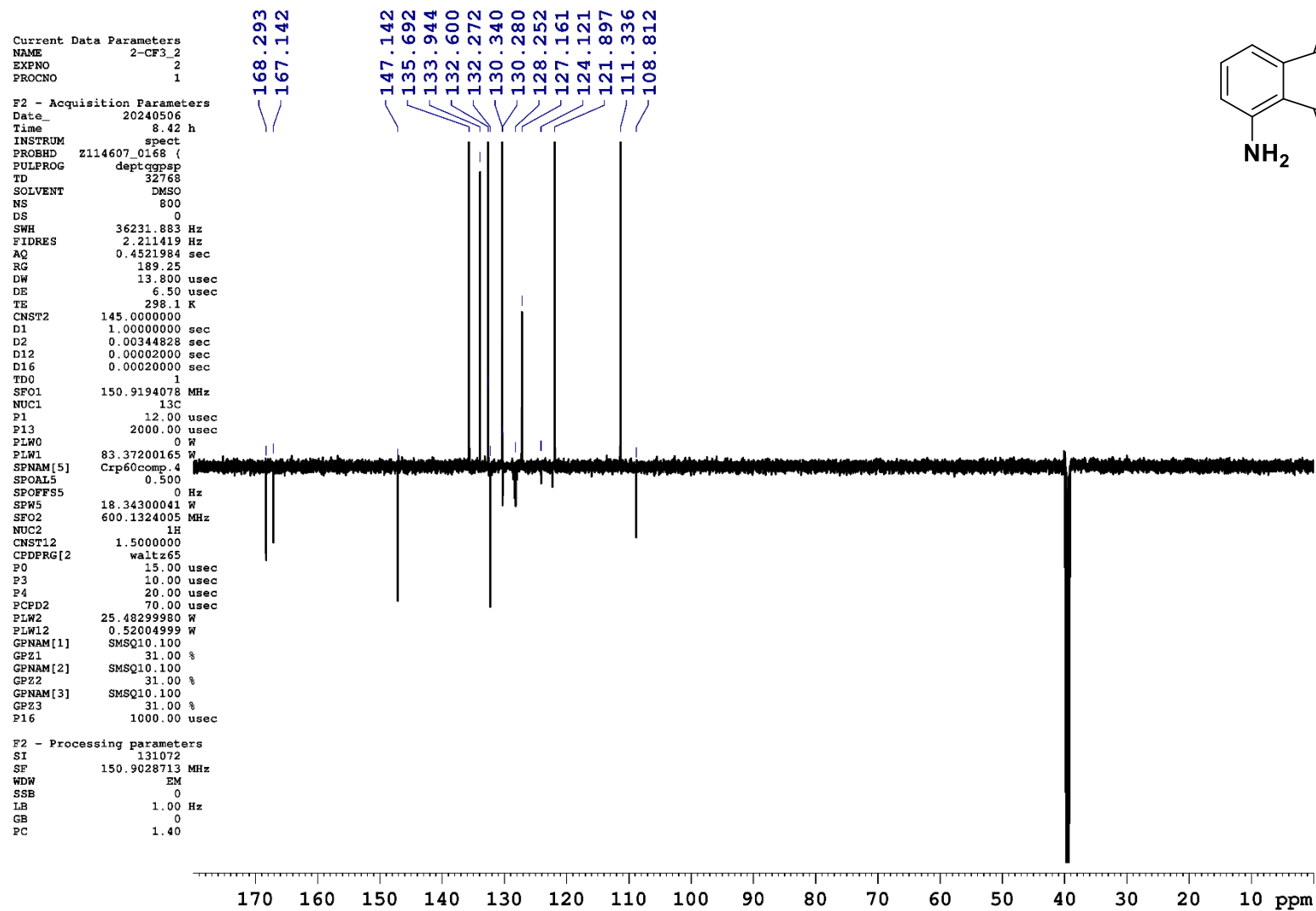


Figura 36: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário 23d.

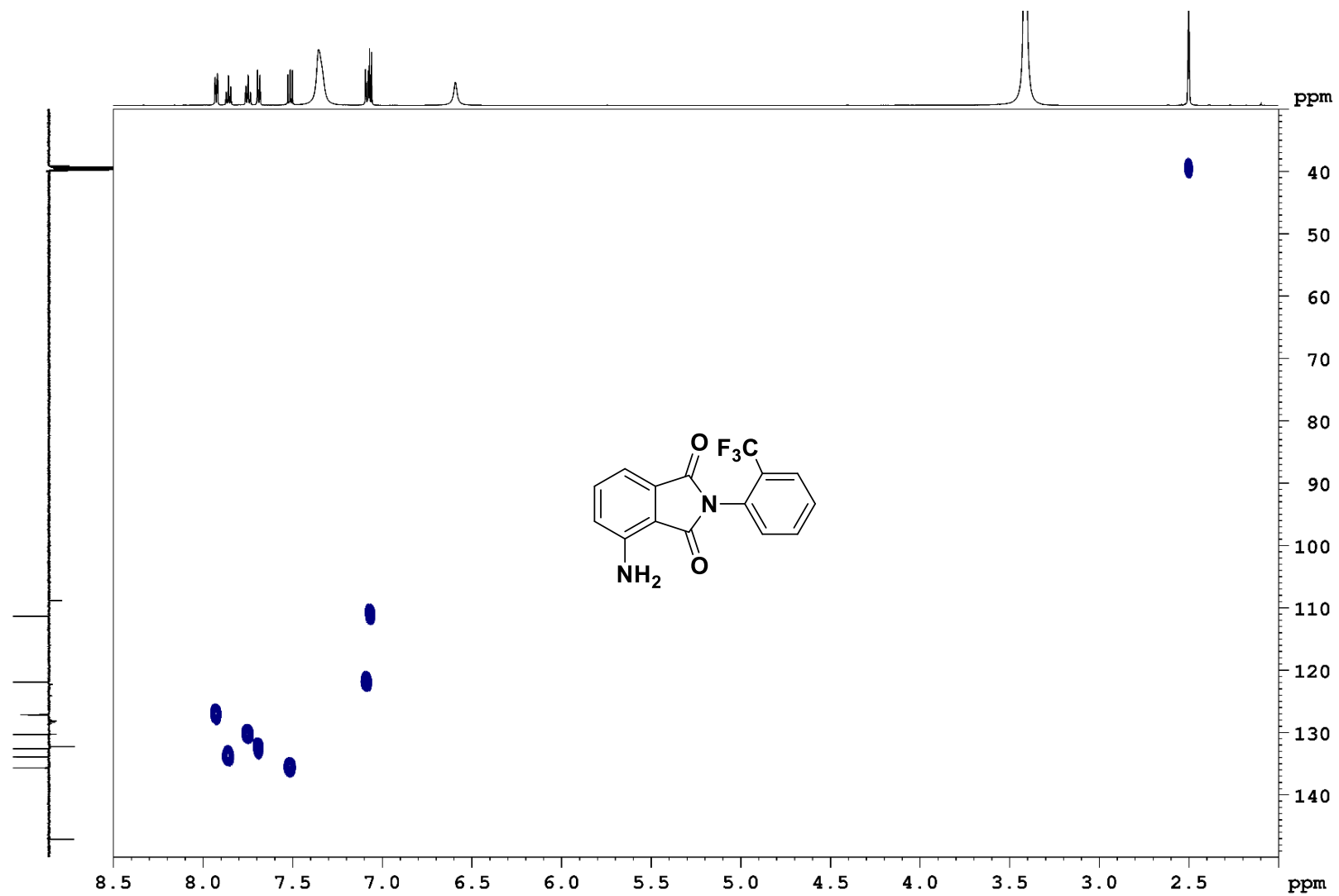


Figura 37: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário 23d.

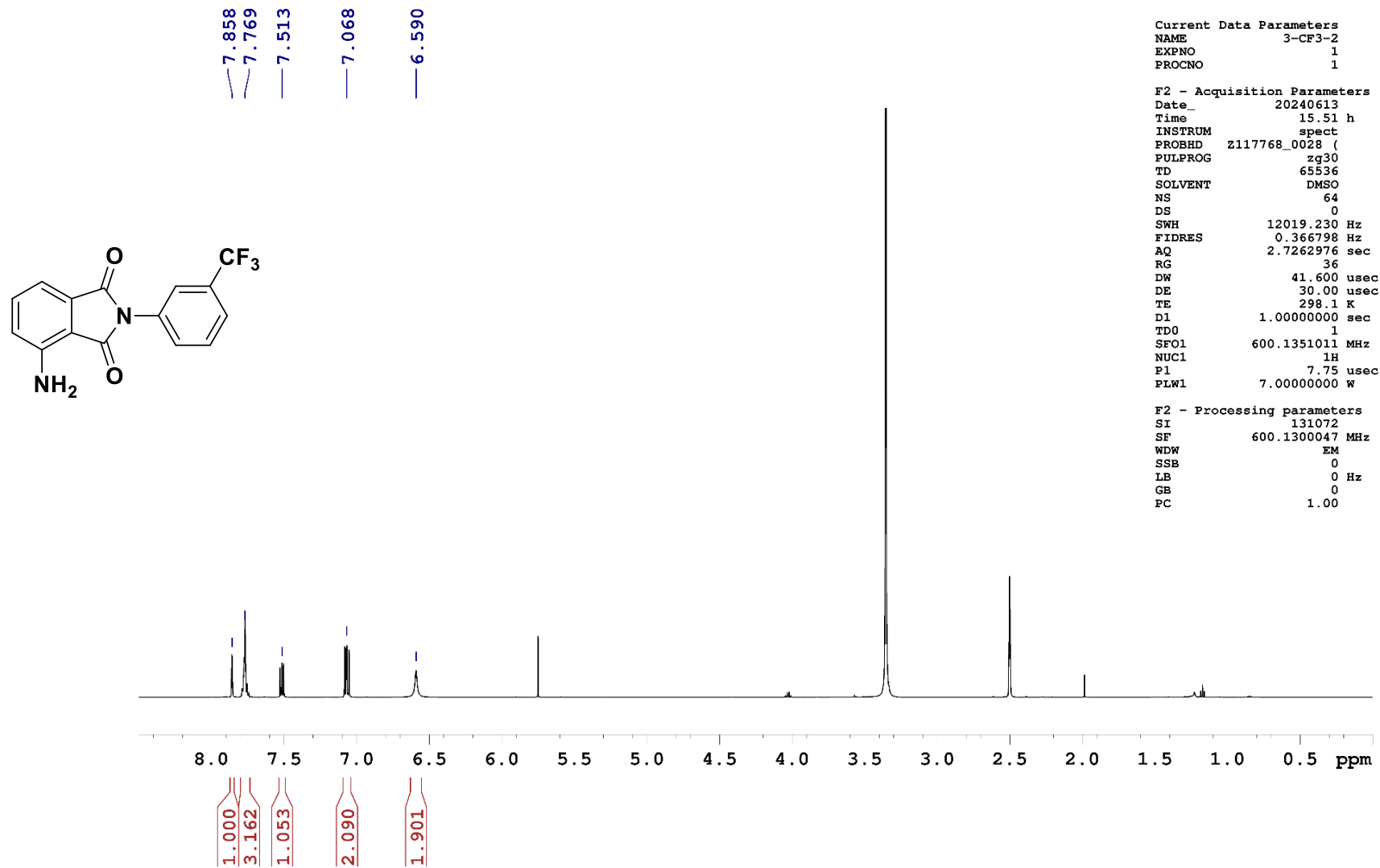


Figura 38: Espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário 23e.

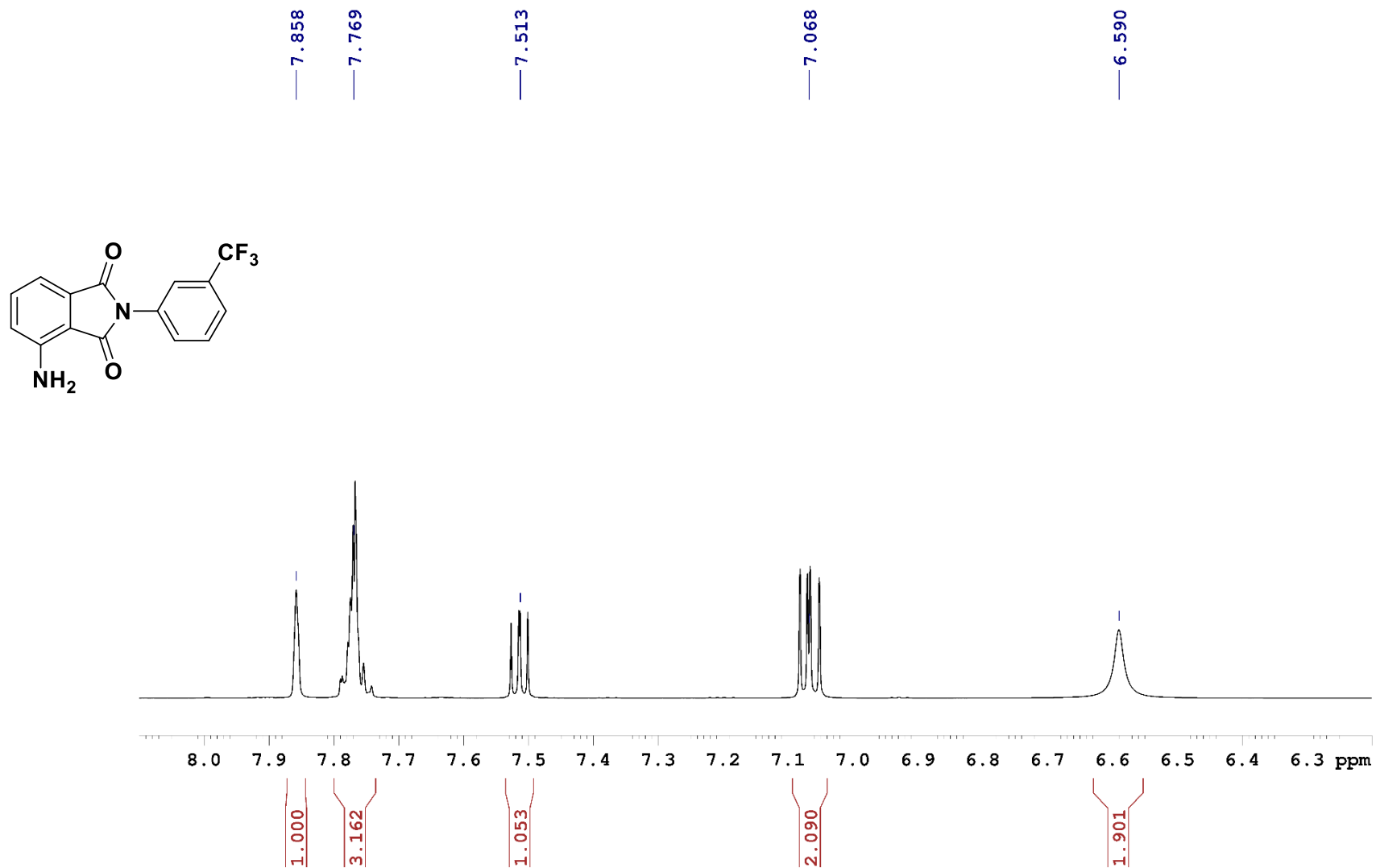


Figura 39: Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz) Intermediário 23e.

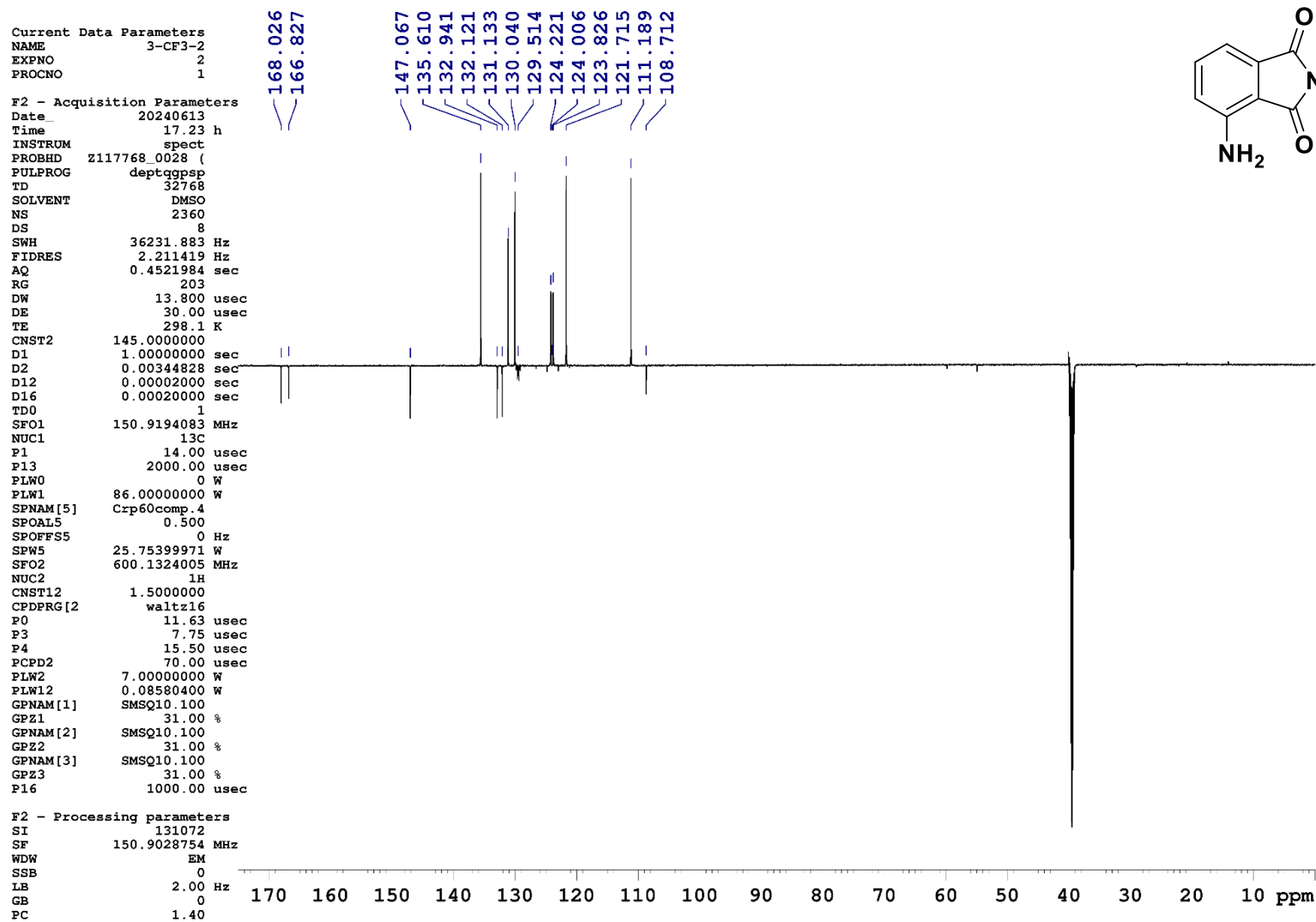


Figura 40: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário 23e.

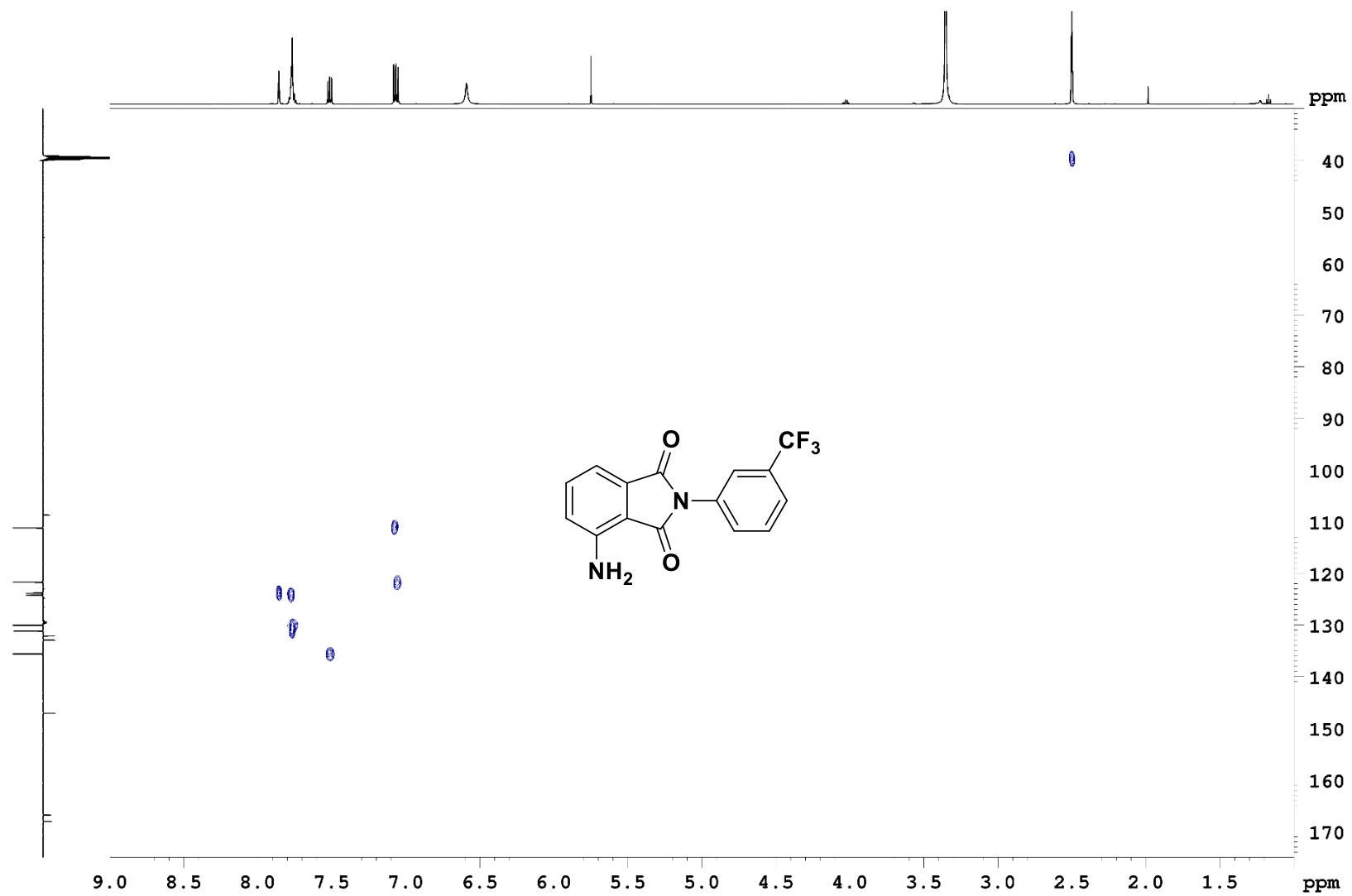


Figura 41: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário **23e**.

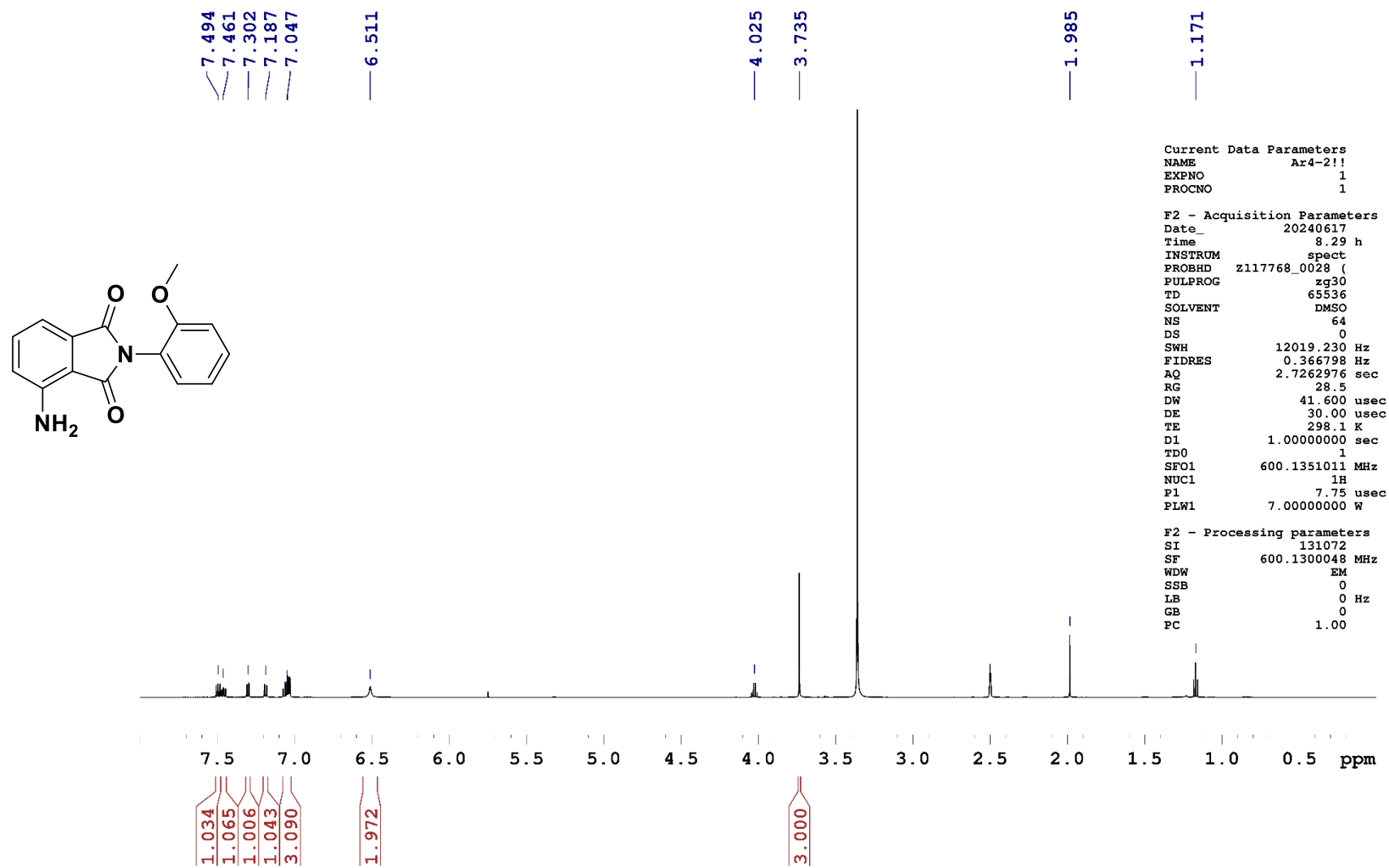


Figura 42: Espectro de RMN ^1H (600 MHz) Intermediário 23f.

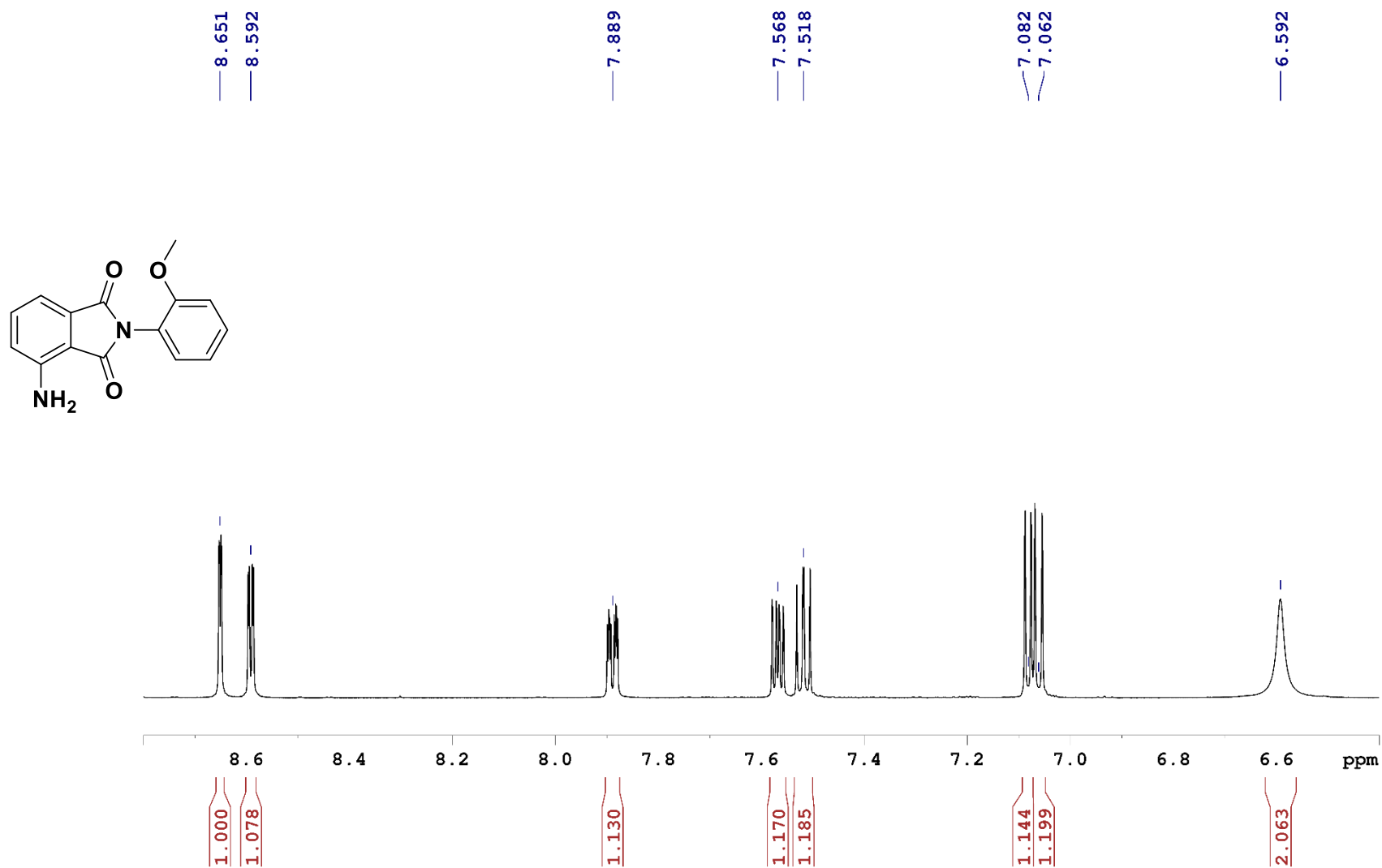


Figura 43: Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz) Intermediário 23f.

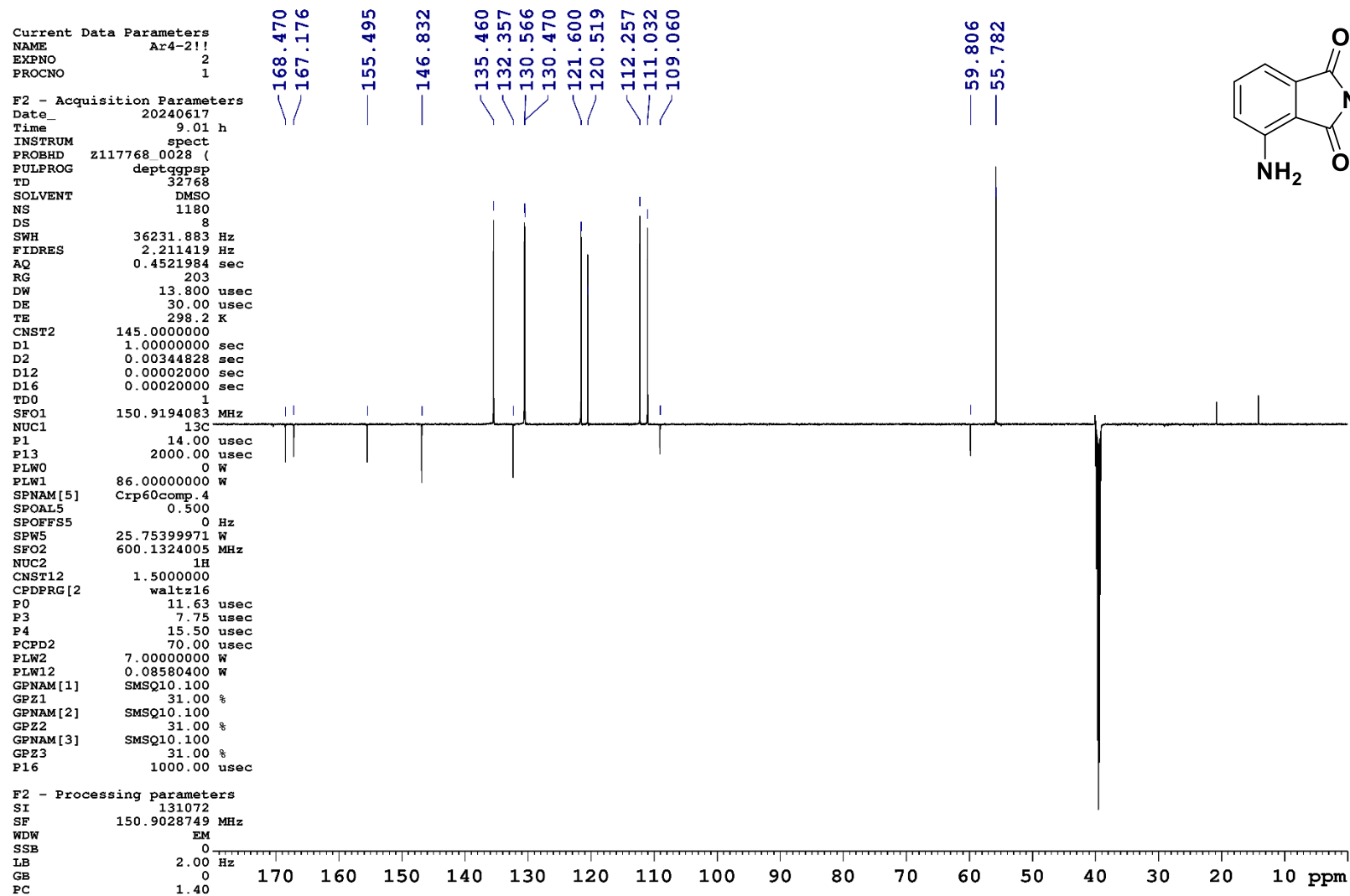


Figura 44: Espectro de RMN DEPT-Q (150 MHz) Intermediário 23f.

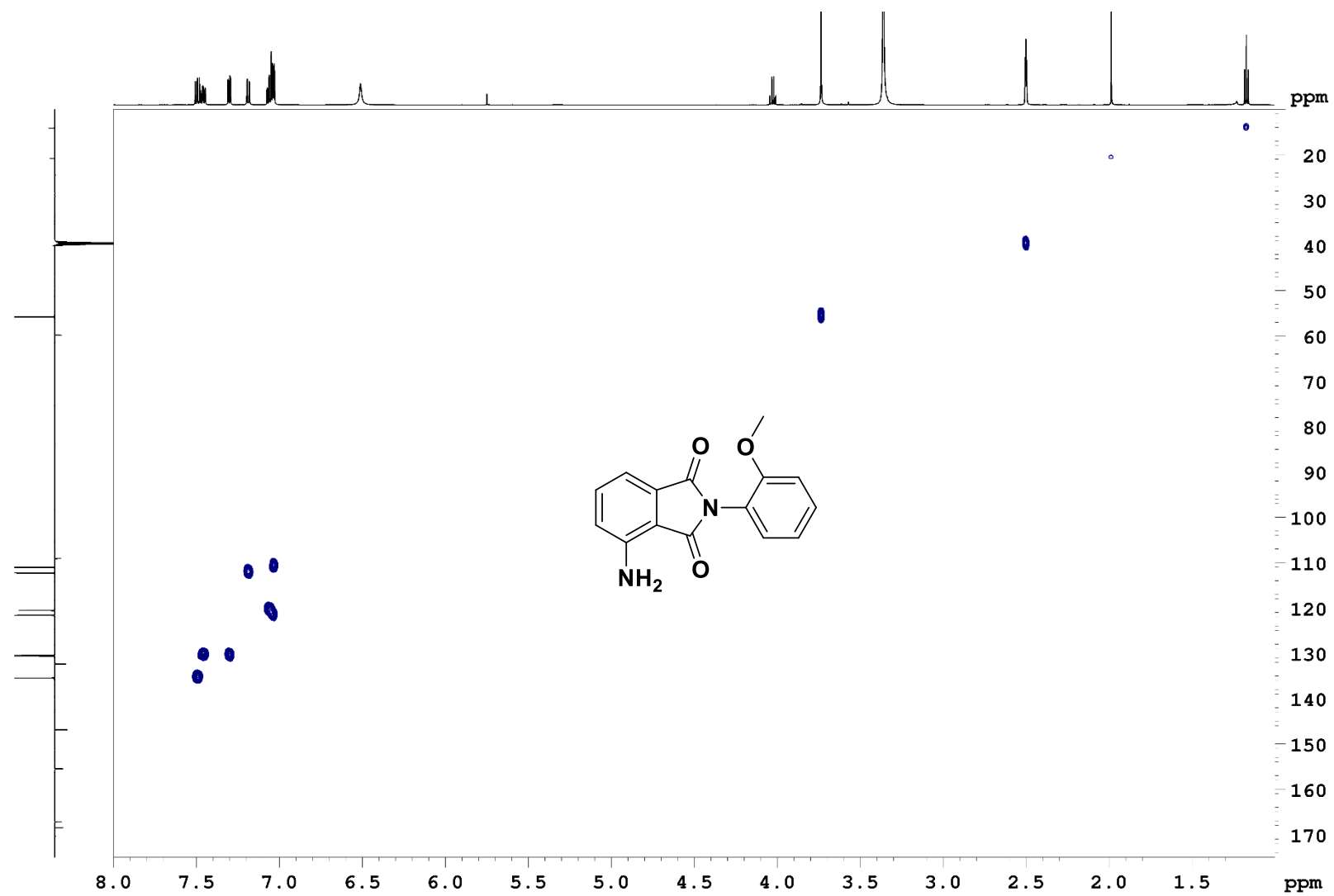


Figura 45: Espectro de RMN HSQC (600 MHz) Intermediário 23f.