



Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica

Síntese e avaliação da atividade antidengue e antimalárica de amidas
e ésteres derivados do alcaloide indolmonoterpênico Ácido Estrictosidínico
empregando ferramentas da Química Medicinal: um projeto
multidisciplinar

Relatório Final
Pós-doutorado

Aluno: Dr. Marcelo Augusto Pereira Januário
Supervisor: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara/2025

PARTE I

JULHO/2024 -

FEVEREIRO/2025

MÊS/2024	ATIVIDADE
07 a 10	-Coleta do material (em Goiânia-GO), preparação dos extratos e isolamento do composto natural^a -Desenvolvimento de métodos em equipamentos de ^bHPLC e ^cMPLC para análise e isolamento do produto natural -Isolamento/caracterização do produto natural -Planejamento^d/Síntese^e/purificação/caracterização dos análogos estruturais para estudos de SAR -Escrita do review
11 e 12	-Planejamento^d/Síntese^e/purificação/caracterização dos análogos estruturais para estudos de SAR. Foram sintetizados 15 compostos, dentre eles 6 inéditos na literatura. -Escrita do review
12	-Planejamento^d/Síntese^e/purificação/caracterização dos análogos estruturais para estudos de SAR -Escrita do review -Envio das amostras para os ensaios antivirais^f
^a Profa. Dra. Lucília Kato/LabPN-UFG: Possibilitou a coleta; ^b <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> ; ^c <i>Medium Performance Liquid Chromatography</i> ; ^d Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Jr-IQ/UFU e Prof. Dr. Rafael Victório de Carvalho Guido-IF/USP: Discussão dos compostos a serem sintetizados para o SAR; ^e Profa. Dra.Arlene Gonçalves Correa DQ/UFSCar: Discussão quanto a melhores metodologias para obtenção dos produtos de interesse nesta etapa e disponibilização da estrutura do laboratório; ^f Profa. Dra. Jaquelline Germano de Carvalho/Fiocruz-MG: Condução dos ensaios frente aos vírus da dengue, febre amarela, varíola dos macacos, e febre oropouche; Profa. Dra. Rafaela Salgado Ferreira-ICB/UFMG: Condução dos ensaios anti-Zika frente à protease NS2-NS3.	

Lista de abreviações

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BnBr	Brometo de benzila
Boc ₂ O	Dicarbonato de di-terc-butila
Cbz	Cloroformato de benzila
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DMM	Dimetoximetano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MeOH	Metanol
MPLC	<i>Medium Performance Liquid Chromatography</i>
N-BuOH	N-butanol
t.a.	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
TsOH	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DNTs) ameaçam mais de 1,7 bilhões de pessoas que vivem nas comunidades mais pobres e marginalizadas do mundo,¹ e agem de modo a incapacitar as pessoas, tirando suas chances de permanecer na escola, de se sustentar ou mesmo de ser aceito por sua família, ou comunidade.¹ Essas enfermidades também apresentam investimentos reduzidos nas áreas de pesquisa, produção de medicamentos e em seu controle.¹ Exemplos de DNTs são a dengue, zika, febre amarela, malária, a doença de Chagas, cisticercose, leishmaniose e lepra.

1.2. Arboviroses

Os vírus de RNA que infectam insetos picadores e vertebrados são geralmente classificados como arbovírus - vírus transmitidos por artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos.² Hoje são conhecidos mais de 130 arbovírus, dentre eles o vírus da dengue (DENV), da Zika (ZIKV), da febre amarela (YFV), da febre oropouche (OFV), da Chikungunya (CFV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV).²

1.3. Gênero *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus* pertence à família Flaviviridae e inclui mais de 70 tipos de vírus, dentre eles o DENV, ZIKV e CKV. Todos os membros dessa família contêm um genoma de RNA de filamento único que compreende 9000-13000 bases.³ O ácido ribonucleico viral é convertido pela célula hospedeira em uma única poliproteína,⁴ que é anexada à membrana do retículo endoplasmático,⁴ submetendo-se ao processamento pós-translacional por proteases de

1 [a] GOMES, G.R.; RAQUEL, C.; BARBOSA, R.; CARVALHO, A. F. "Correction : Asymptomatic *Plasmodium Vivax* Malaria in the Brazilian Amazon: Submicroscopic Parasitemic Blood Infects *Nyssorhynchus darlingi*." *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **15**(10): 1149, 2023. [b] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <<https://bvsmis.saude.gov.br/agir-agora-agir-juntos-investir-em-dtns-30-01-dia-mundial-das-doencas-tropicais-negligenciadas/>>, acesso em 16/04/2024.

2 DE LA CALLE-PRieto, F.; ARSUAGA, M.; RODRÍGUEZ-SEVILLA, G.; PAIZ, S. N.; DÍAZ-MENÉNDEZ, M. "The current status of arboviruses with major epidemiological significance in Europe. Perspectiva actual de los arbovirus de mayor significación epidemiológica en Europa." *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **42**(9): 516, 2024.

3 ROSS, M. T. "Dengue Virus." *Clin. Lab. Med.*, **30**:149, 2010.

4 KIM, C. Y.; REYES-SANDOVAL, A. "Recent Developments in Vaccines against Flaviviruses and Alphaviruses." *Vaccines (Basel)*, **11**(2):448, 2023.

células hospedeiras e pela protease viral NS2B-NS3 (Figura 1), o que resulta em três proteínas estruturais e múltiplas proteínas não estruturais (NS).⁴

A protease NS2B-NS3 desempenha um papel fundamental no combate aos arbovírus, com especial destaque para DENV, ZIKV e WNV, pois é altamente conservada entre as proteínas virais e tem 65% de identidade de sequência (aproximadamente) entre YFV, WNV, JEV, DENV e ZIKV.⁵

As manifestações clínicas das infecções por flavivírus variam amplamente, desde resultados assintomáticos até resultados graves e fatais. Algumas dessas doenças serão discutidas adiante.

1.3.1. Dengue, Zika, Chikungunya

As arboviroses dengue, Zika e Chikungunya são transmitidas pelos mosquitos do gênero *Aedes*. A dengue é a segunda doença transmitida por mosquito mais comum que afetam aos seres humanos, depois da malária. A dengue é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e causada pelo vírus da dengue, que inclui quatro tipos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, podendo se apresentar de forma branda (assintomática ou sintomas leves, como febre, dor de cabeça) ou grave (dengue hemorrágica, ou manifestações neurológicas da dengue), dependendo de fatores como vírus envolvido, infecção anterior e comorbidades existentes, como doenças crônicas (diabetes, asma brônquica, etc.).³

A Zika é uma doença viral aguda, transmitida principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, caracterizada, dentre outros sintomas, por febre intermitente, artralgia, mialgia e dor de cabeça.⁶ Os casos costumam evoluir de forma benigna e os sintomas geralmente desaparecem espontaneamente após 3-7 dias. Todavia, observa-se a ocorrência de óbitos pelo agravo. A infecção por ZIKV é associada a graves complicações neurológicas e anormalidades congênitas em bebês nascidos de mães e adultos infectados.⁶

Avanços foram feitos na batalha contra as arboviroses. Neste cenário, podem-se citar, por exemplo, as vacinas,⁴ atualmente disponíveis contra DENV, CKV⁷ e YFW.^{7a} No entanto,

5 JOÃO, E.E.; LOPES, J. R.; GUEDES, B, F. R.; SANCHES, P. R. DA S.; CHIN, M. C.; DOS SANTOS, J. L. SCARIM, B. C. “Advances in drug discovery of flavivirus NS2B-NS3pro serine protease inhibitors for the treatment of Dengue, Zika, and West Nile viroses.” *Bioorg. Chem.*, **153**:107914, **2024**.

6 AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. Disponível em <https://agencia.fiocruz.br/zika>, acesso em 20/01/2025.

7 [a] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION,

não existe ainda nenhum medicamento disponível para o tratamento eficaz dessas doenças, apesar do expressivo volume de trabalhos relatando a descoberta de compostos ativos frente aos agentes causativos desses males⁸ A pesquisa científica nesse campo esbarra no desafio de descobrir um fármaco potente contra todos os sorotipos e genótipos circulantes do vírus,⁹ o que aponta para a necessidade de investigações ininterruptas por parte da comunidade científica.

1. 4. Alcaloides indolmonoterpênicos e suas propriedades antivirais

Alcaloides são um amplo grupo de compostos orgânicos que ocorrem naturalmente, formando a maioria do maior grupo de fitoquímicos.¹⁰ O átomo de nitrogênio é uma característica distintiva chave dessa classe de compostos, conferindo propriedades alcalinas e ações medicinais.

Os alcaloides têm sido amplamente investigados para a descoberta de novos medicamentos¹⁰ e, nesta perspectiva, os alcaloides indólicos ocupam papel de destaque.¹¹ Inseridos neste conjunto, estão os alcaloides indolmonoterpênicos (AIMs), que representam o maior número e o mais diversificado subgrupo de alcaloides, com mais de 3.000 estruturas relatadas na literatura.¹² Esses compostos possuem diversos tipos de atividade biológica relatados, incluindo a antiviral.^{11,12}

-
- Disponível em <https://www.cdc.gov/chikungunya/hcp/vaccine/index.html>, acesso em 20/01/2025. [b] INSTITUTO BUTANTAN. Disponível em <https://butantan.gov.br/noticias/vacina-da-chikungunya-mantem-protecao-em-991-dos-vacinados-seis-meses-apos-aplicacao>, acesso em 20/01/2025.
- 8 [a] TAYAL A.; KABRA, S.K.; LODHA, R. “Management of Dengue: An Updated Review.” *Indian J. Pediatr.*, **90**(2):168, 2023. [b] TIMIRI, A.K.; SINHA, B. N.; JAYAPRAKASH, V. “Progress and prospects on DENV protease inhibitors.” *Eur. J. Med. Chem.* 2016, **19**(117):125. [c] MOHSIN, N. U.A.; IRFAN, S. QAMAR. “Current Advancements for New Drug Discovery Against Dengue Virus: A Review (2015 – 2020).” *J. Pharm. Chem.*, **57**(6):932, 2023.
 - 9 DIGHE, N. S.; EKWUDU, O’M.; DUA, K.; CHELLAPPAN, K. D.; KATAVIC, L. P.; COLLET, A. T. “Recent update on anti-dengue drug Discovery.” *Eur. J. Med. Chem.*, **176**:431, 2019.
 - 10 FAISAL, S.; BADSHAH, L. S.; KUBRA, B.; ABDUL-HAMID EMWAS, A-H.; JAREMKO, M. “Alkaloids as potential antivirals. A comprehensive review.” *Nat. Prod. Bioprospect.* **13**:4, 2023.
 - 11 [a] ROSALES, F. P.; BORDIN, S. G.; GOWER, E. A.; MOURA, S. “Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities”. *Fitoterapia*, **143**:104558, 2020. [b] OMAR, F.; TAREQ, M. A.; ALQAHTANI, M. A.; DHAMA, K.; SAYEED, A. M.; EMRAN, B. T.; SIMAL-GANDARA, J. “Plant-Based Indole Alkaloids: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective.” *Molecules*, **26**(8):2297, 2021.
 12. NOGUEIRA, R. S. T.; CURCINO VIEIRA, C. G. M.; ROBAINA, Da S., R. R.; BRAZ-FILHO, R.; GONTIJO, Da C. D.; De OLIVEIRA, B. A.; VIEIRA, C. J. I. “An update review on monoterpene indole alkaloids and biological activities of Tabernaemontana species occurring in Brazil.” *J. Ethnopharmacol.*, **328**:117921, 2024.

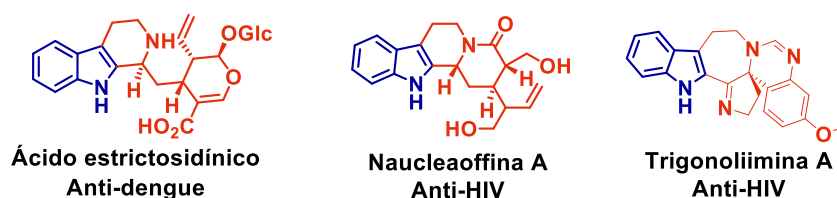


Figura 1. AIMs com atividade antiviral (Anti-dengue: Ácido estrictosidínico;¹³ Anti-HIV: os demais.^{11b}

1. 5. Química Medicinal

A Química Medicinal é uma ciência interdisciplinar que abrange aspectos importantes das ciências farmacêuticas, da medicina, biologia, química, física e da computação, abrangendo descoberta, desenvolvimento, identificação e interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos.¹⁴ Essa ciência estuda as origens moleculares da atividade biológica dos fármacos, determinando os parâmetros que relacionam a estrutura química e a atividade (do inglês, *structure-activity relationships*, ou SAR) e aplicando estes fundamentos no planejamento racional de fármacos.^{14b}

Em geral, o uso de técnicas computacionais no planejamento racional de fármacos permite a seleção e otimização de compostos mais eficientes, reduzindo o tempo e o custo envolvidos no processo de desenvolvimento de fármacos.

Um processo típico de descoberta e desenvolvimento de medicamentos inclui identificação de alvos, geração de hits, otimização de *hit-to-lead* e avaliação pré-clínica/clínica dos candidatos a medicamentos resultantes.¹⁵ A eficiência do processo *hit-to-lead* é particularmente importante para identificar candidatos semelhantes a medicamentos e determinar o sucesso do processo.¹⁵ Durante esta fase, os químicos medicinais sempre tentam melhorar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas indesejáveis do *hit*, otimizando a afinidade de ligação ao alvo e a potência *in vitro*.

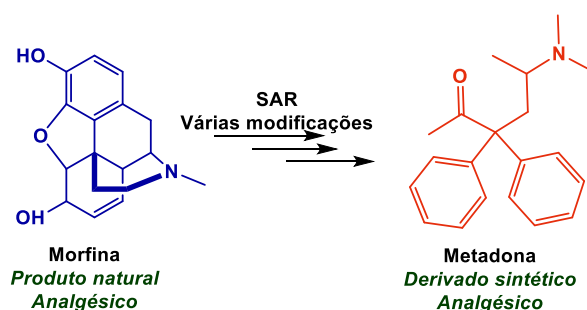
13 COSTA, O. J.; BARBOZA, S. R.A.; VALENTE, M. M. L.; WOLFF, T.; GOMES, M.; GALLO, B.; BERRUETA, A. L.; GUIMARÃES-ANDRADE, P. I.; GAVINO-LEOPOLDINO, D.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I. "One-Step Isolation of Monoterpene Indole Alkaloids from *Psychotria leiocarpa* Leaves and Their Antiviral Activity on Dengue Virus Type-2." *J. Braz. Chem. Soc.*, **31**(10):2104, **2020**.

14 [a] NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. "Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, **33**:13, **2008**. [b] ARAÚJO, M. R. C.; FILHO, L. A. C.; SANTOS, Dos A. L. V.; MAIA, De A. G.; GONSALVES, De A. A. "Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®." *Quím. Nova*, **38**(6): 868, **2015**.

15 WANG, S.; DONG, G.; SHENG C. "Structural simplification: an efficient strategy in lead optimization." *Acta Pharm. Sin. B.*, **9**(5): 880, **2019**.

O bioisosterismo é uma abordagem única usada por químicos medicinais para a modificação racional de *leads* em medicamentos mais seguros, clinicamente eficazes, econômicos e terapeuticamente atraentes.¹⁶ É uma das ferramentas de modificação mais importantes, amplamente aplicada no campo do design racional de fármacos para ampliar a atividade desejada e eliminar propriedades indesejáveis, facilitando assim a otimização do perfil farmacocinético e a obtenção da seletividade do alvo.

Produtos naturais (NPs) são recursos ricos para descoberta e desenvolvimento de fármacos.^{15,17} No entanto, as estruturas químicas complexas dos NPs complicam frequentemente a síntese total e resultam em propriedades físico-químicas e farmacocinéticas indesejáveis.^{15,18} Portanto, simplificar estruturas complexas sem diminuir a atividade biológica desejada é uma estratégia eficaz para acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos.¹⁵ Um exemplo clássico da simplificação estrutural dos NPs é o desenvolvimento de analgésicos simplificados derivados da morfina, como é o caso da metadona (Esquema 1.1).¹⁵



Esquema 1.1. Simplificação estrutural da morfina que originou a metadona.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

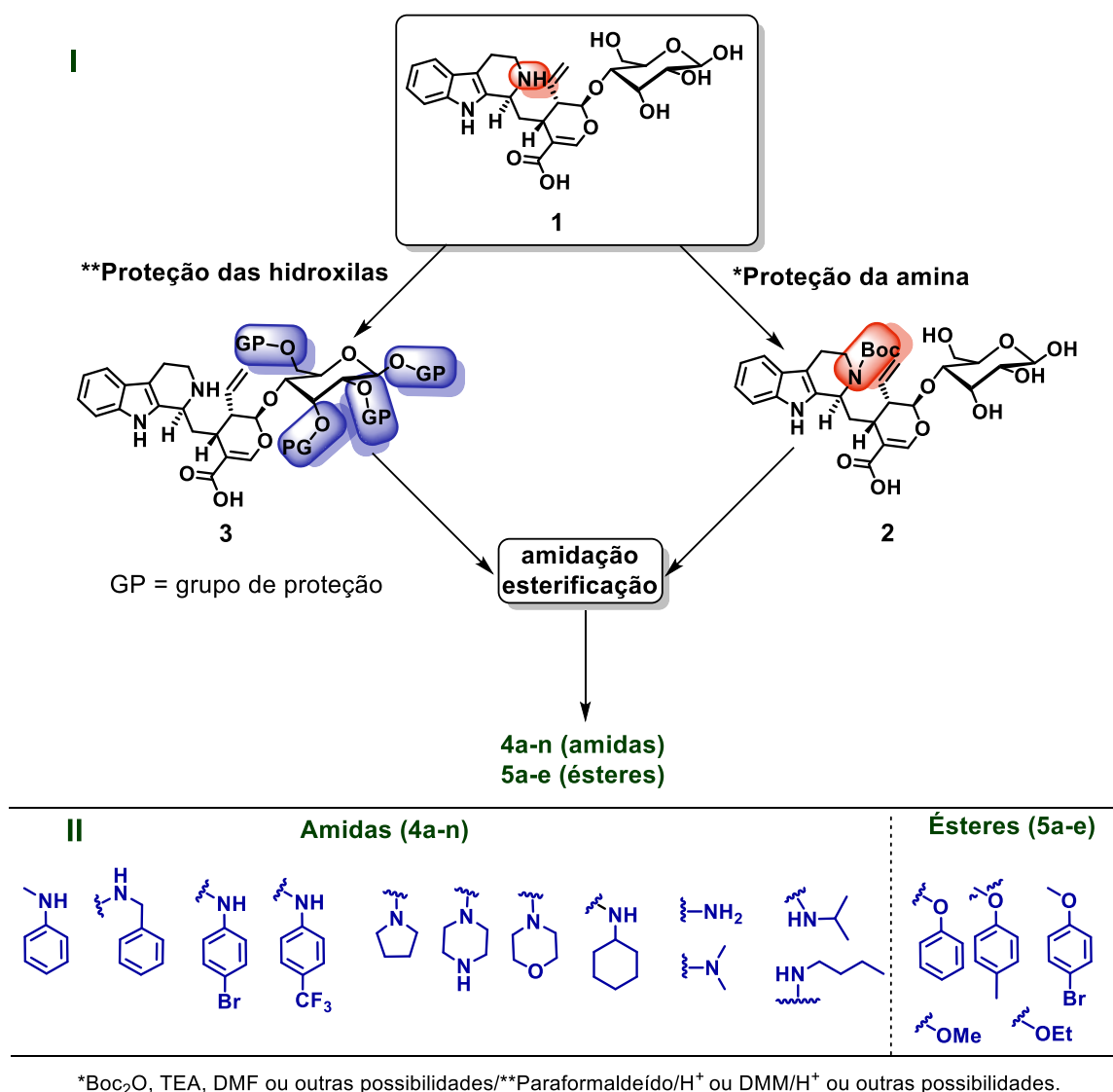
A ideia inicial deste projeto girava em torno do ácido strictosidínico, um AIM) com atividade anti-DENV2 já relatada.^{11b} Recapitulando, o estudo fitoquímico de várias espécies de *Psycotria* e *Palicourea* revelou boas quantidades deste composto, o que serviu de base para a idealização da presente proposta, cuja finalidade era a derivatização do esqueleto de AE em

16 JAYASHREE, B. S.; NIKHIL, S. P.; PAUL, S. "Bioisosterism in Drug Discovery and Development - An Overview." *Med. Chem.*, **18**(9): 915, **2022**.

17 XIAO, Z.; MORRIS-NATSCHKE, L.; KUO-HSIUNG LEE, K-H. "Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates." *Med. Res. Rev.*, **36**(1):32, **2016**.

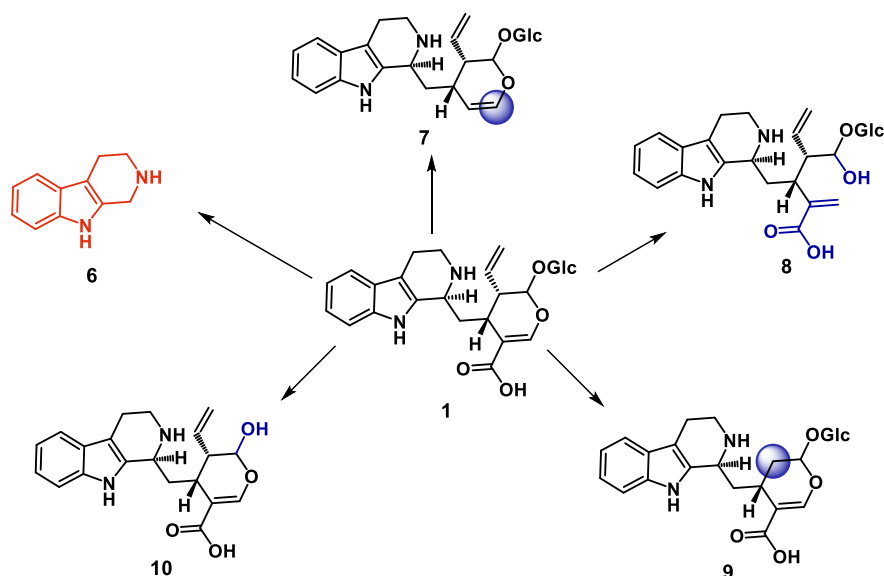
18 RODRIGUES, T.; REKER, D.; SCHNEIDER, P.; SCHNEIDER, G. "Counting on natural products for drug design." *Nat. Chem.*, **8**:531, **2016**.

amidas e ésteres (Esquema 2. 1), visando obter análogos com atividade anti-dengue mais potente.



Esquema 2. 1. Proposta original do projeto submetido.

No entanto, em conversa com colaboradores deste projeto, chegou-se à conclusão que, antes de proceder à síntese dos mencionados derivados, seria mais adequado conduzir um estudo de SAR, a fim de identificar o farmacóforo mínimo e apartir daí, planejar derivados mais potentes. Nesta perspectiva, seria fundamental a obtenção de **6** (núcleo tetrahydro-β-carbolina - THβC isolado), derivados sem o grupo ácido (**7**), com o anel do pirano aberto (**8**), sem a dupla terminal (**9**), e sem a parte glicosídica (**10**). Considerando os desafios sintéticos, apenas os derivados **6** e **10** foram considerados inicialmente para os estudos de SAR.



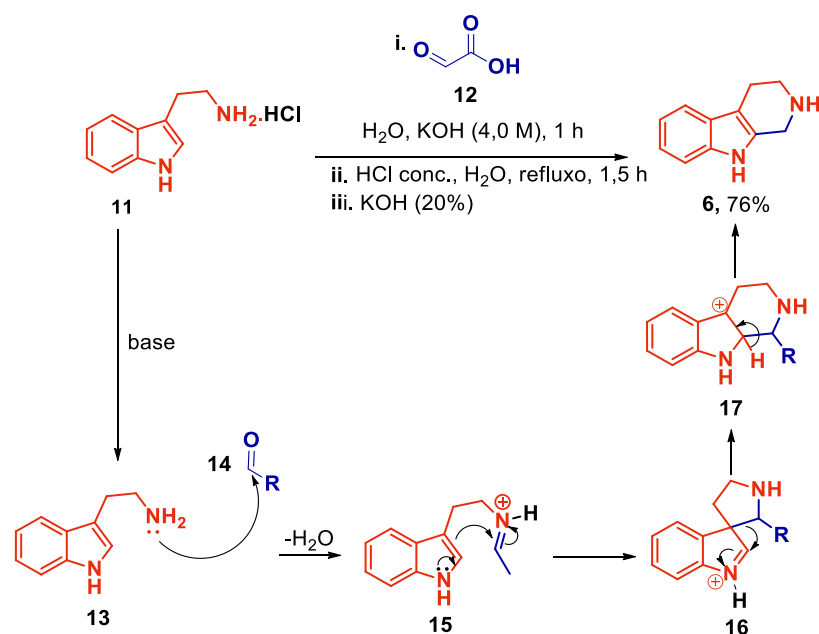
Esquema 2. 2. Proposta de síntese dos derivados (6-10) para estudos de SAR.

Observando os relatos da literatura,¹⁹ e comparando as estruturas dos AIMs ativos frente à dengue, suspeitou-se que o farmacóforo mínimo para a atividade antiviral relatada da molécula de AEs poderia ser a TH β C (6) e, neste aspecto, seria fundamental a síntese do mesmo para avaliação. Por meio do protocolo de Zheng *et al*,²⁶ este esqueleto foi sintetizado, tendo sido obtido com 76% de rendimento (Esquema 2. 3). O protocolo empregado baseia-se na reação de Pictet-Spengler,²⁰ que consiste na condensação da triptamina (13) com um aldeído (14), obtendo-se o intermediário 15. Na sequência, o carbono nucleofílico C-3 em efetua um ataque ao íon imínio (destacado em azul, 15), levando ao espiroindol (16),²¹ que origina 6 após rearranjo migratório do grupo C-CHR em X e consecutiva perda de próton.

19 [a] GARCÍA-ARIZA, L.L.; GONZÁLEZ-RIVILLAS, C. J. DÍAZ-AGUIRRE, C. ROCHA-ROA, L. PADILLA-SANABRIA, J. C. CASTAÑO-OSORIO. *Viruses*, **15**(7), 1563, **2023**. [b] L. M. MONSALVE-ESCUADERO, V. LOAIZA-CANO, M. I. ZAPATA-CARDONA, D. C. QUINTERO-GIL, E. HERNÁNDEZ-MIRA, Y. PÁJARO-GONZÁLEZ, A. F. OLIVEROS-DÍAZ, F. DIAZ-CASTILLO W. QUIÑONES, S. ROBLEDO, M. MARTINEZ-GUTIERREZ. *Plants (Basel)*, **10**(7), 1280, **2021**.

20 CALCATERRA, A.; MANGIARDI, L.; MONACHE, D. G.; QUAGLIO, D.; BALDUCCI, S.; BERARDOZZI, S.; IAZZETTI, A.; FRANZINI, R.; BOTTA, B.; FRANCESCA GHIRGA, F. "The Pictet-Spengler Reaction Updates Its Habits." *Molecules*, **25**(2):414, **2020**.

21 D BAILEY, D. P. "On the stereochemistry of the Pictet-Spengler reaction." *Tetrahedron Letters*, **28**(43): 5181, **1987**.



Esquema 2. 3. Mecanismo para a formação de TH β C (**6**) a partir da reação de Pictet-Spengler.

O espectro de RMN de ^1H para o composto **6** exibe sinais para os hidrogênios aromáticos característicos da unidade tetrahydro- β -carbolínica, consistindo em dois dubletos (δ 7,34, d, $J = 7,6$ Hz, 1H/7,26 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), e dois tripletos (δ 6,99, t, $J = 7,3$ Hz, 1H/6,92, t, $J = 7,3$ Hz, 1H). Além disso, foram identificados três sinais para grupos metilênicos (3,85, s, 2H/2,97, t, $J = 5,5$ Hz, 2H/2,58, t, $J = 5,2$ Hz, 2H). Os demais, inclusive os de RMN ^{13}C estão conforme os dados da literatura²⁶ para este esqueleto.

Como é sabido, os metabólitos secundários de plantas estão sujeitos à sazonalidade, segundo a qual variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias, por exemplo).²² A produção de metabólitos pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivo, podendo, ainda, ser afetada por condições ambientais.²² Este projeto foi idealizado partindo-se da informação de que foram isoladas quantidades apreciáveis de AE das espécies *Psychotria hoffmannseggiana* (Wild. ex Roem. & Schult.) e *Psychotria goyazensis* Müll. Arg. anteriormente estudadas, o que representava uma oportunidade para semissíntese de derivados mais interessantes do ponto de vista da atividade biológica. Todavia, a espécie disponível para coleta no momento de início dos trabalhos era a *Psychotria hoffmannseggiana*, e na esteira da discussão do início deste parágrafo, a quantidade obtida de AE foi bem aquém do que se esperava (apenas 11,9 mg,

22 GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. N. "Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários." *Quim. Nova*, **30**(2): 374, 2007.

partindo-se de 31,5 g de material seco), e isso pode estar relacionado à época de coleta da planta (Nos trabalhos anteriormente discutidos: fevereiro; para execução deste projeto: setembro). Diante disso, a síntese dos derivados **7-10** para estudos de SAR não foi possível.

Para este trabalho, AE (**1**) foi isolado da fração *N*-BuOH das folhas de era a *Psychotria hoffmannseggiana*, apresentando-se como um sólido amarelo amorfo solúvel em MeOH, com coloração azul-escuro em UV (254 nm) e reação positiva para o reagente de Dragendorff. O espectro de RMN do AE ^1H (Figura A.) mostrou os quatro sinais característicos de hidrogênios aromáticos para a unidade tetrahydro- β -carbolínica (δ 7,45, dt, $J = 8,1$ e $0,9$ Hz, 1H e 7,31 dt, $J = 8,1$ e $0,9$ Hz, 1H), e dois duplos duplos dubletos (δ 7,13, ddd, $J = 8,1$, $7,1$ e $0,9$ Hz, 1 H e δ 7,04 (ddd, $J = 8,1$, ddd, $J = 8,1$, $7,1$ e $0,9$ Hz, 1H). Além disso, foram identificados sinais para hidrogênios vinílicos em δ 5,31 (dt, $J = 17,44$ e $1,3$ Hz, 1H, H-18b) e δ 5,20 (dt, $J = 10,6$ e $1,3$ Hz, 1H, H18a), e também olefínico δ 7,55 (s, 1 H), confirmando a presença da unidade secologanina.

Complementarmente, foram assinalados sinais para a unidade glicosídica com a configuração β (δ 4,82, d, $J = 7,9$ Hz axial-axial, 1H, H-1' e demais observados na região entre δ 4,01- 3,00 ppm). A configuração relativa de AE (Figura 2) foi estabelecida com base nas constantes de acoplamento, o que diferencia este composto do seu epímero em C-3.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A. 2) de AE estão presentes sinais para o carbono carboxílico (δ 176,1), para o carbono olefínico α ao heteroátomo na unidade secologanínica (δ 153,4), para os carbonos sp^2 referentes à dupla terminal do mesmo fragmento (δ 136,4 e 119,0), além de uma série de sinais para o anel glicosídico entre δ 78,9 e 63,3.

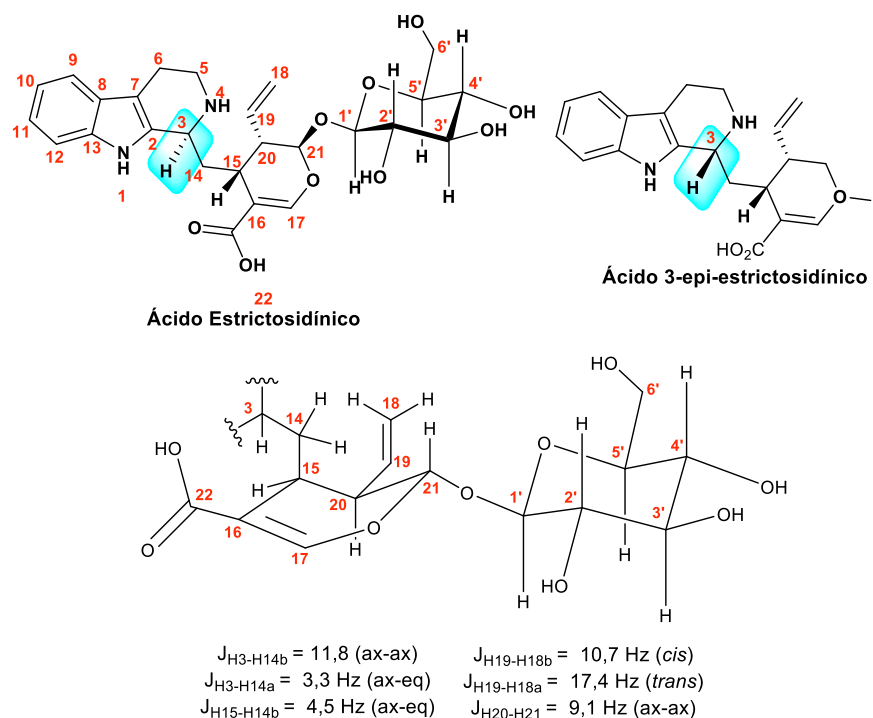


Figura 2. Configuração relativa de A.E.

Os demais dados de RMN 1D e 2D (Figura A. 3 e Figura A. 4) estão em perfeita concordância com os dados da literatura.²³

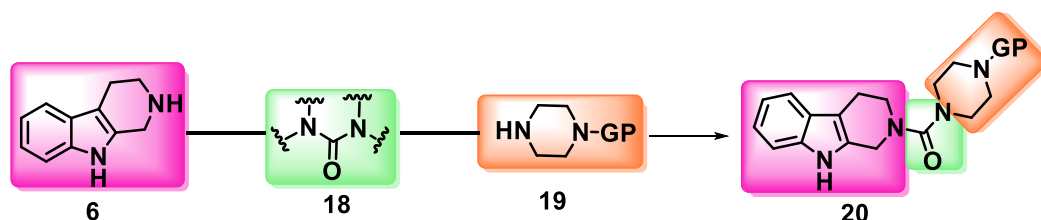
Derivados de TH β C são conhecidos pelo extenso rol de atividades biológicas²⁴ que desempenham, com destaque para o potencial antiviral;^{24b} Entretanto, não foram encontrados trabalhos relatando a avaliação da atividade anti-DENV deste esqueleto, sendo esta, portanto, uma vertente promissora a ser explorada. Neste cenário, derivados piperazínicos ligados a amidas e uréias se mostraram valiosos agentes anti-DENV e anti-ZIKA, como revela o trabalho recente de García-Lozano *et al.*²⁵ Tendo por base tais narrativas, nós idealizamos a construção

23 [a] HAMZAH, A. S.; ARBAIN, D.; MUHYIDDIN; LAJIS, H. N.; SARGENT, M. V. "Alkaloids from *Ophiorrhiza communis* and *Ophiorrhiza tomentosa*." *Pertanika J. Sci. & Technol.*, **2**(1): 33, **1994**. [b] HENRIQUES, A. T.; LOPES, S.; PARANHOS, J. T.; GREGIANINI, T. S.; POSER, G. V.; FETT-NETO, A. G.; SCHRIPEMA, J. "N- β -D-glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from shoots of *Psychotria leiocarpa*." *Phytochemistry*, **65**(4): 449, **2004**. [c] ARBAIN, D.; PUTRA, D. P.; SARGENT, M. V. "The alkaloids of *Ophiorrhiza filistipula*." *Aust. J. Chem.*, **46**(7): 977, **1993**.

24 [a] DAI J.; DAN, W.; ZHANG, Y.; WANG, J. "Recent developments in the Synthesis and Biological Activities of TH β carboline and Its Analogs: Review." *Eur. J. Med. Chem.*, **5**(157):447, **2018**. [b] Wang, J.; Gong F.; Liang, T.; Xie Z.; Yang Y.; Cao, C.; Gao, J.; Lu T.; Chen X. "A review of synthetic bioactive tetrahydro-b-carbolines: A medicinal chemistry perspective." *Eur. J. Med. Chem.*, **5**:225, 113815, **2021**.

25 GARCÍA-LOZANO, R DEL M.; DRAGONI, F.; GALLEGO, P.; MAZZOTTA, S.; LÓPEZ-GÓMEZ, A.; BOCCUTO, A.; MARTÍNEZ-CORTÉS, C.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; VEGA-PÉREZ, M. J.; DEL CAMPO, A. J.; VICENTI, I.; VEGA-HOLM, M.; IGLESIAS-GUERRA, F. "Piperazine-derived small molecules as potential *Flaviviridae* NS3 protease inhibitors. *In vitro* antiviral activity evaluation against Zika and Dengue viroses." *Bioorg. Chem.*, **133**:106408, **2023**.

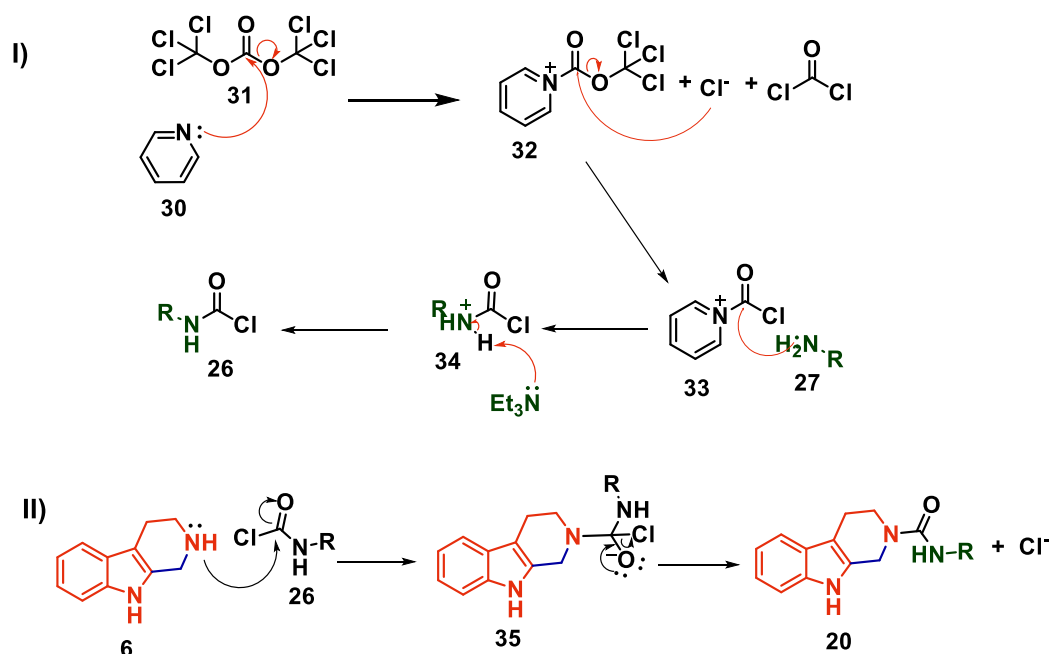
de um esqueleto híbrido baseado nos fragmentos TH β C e piperazina, ligados pela função uréia (Respectivamente destacados em tons de rosa, verde e azul, Esquema 2.4), para obter uma estrutura mista unindo fragmentos reconhecidamente relevantes para diversos tipos de atividade antiviral.



Esquema 2.4. Esqueleto misto TH β C-piperazinil-uréia (**20**) planejado com base em fragmentos.

Ponderando a questão da importância da diversidade estrutural, foram propostas a síntese dos derivados **28** no carbono assimétrico alfa à amina secundária de **6**, bem como as TH β C *N*-protegidas **25** paralelamente à síntese das TH β C **20**. A informação obtida pela avaliação de uma possível atividade antiviral destes derivados seria valiosa para o planejamento de compostos mais promissores.

Os compostos da série **20** (Rota III, Esquema 2.6) foram obtidos via substituição nucleofílica da amina secundária de **6** aos cloretos de carbamoíla (**26**) apropriados. O mecanismo para obtenção de **26** (Esquema 2. 5, I) inicia-se pelo ataque nucleofílico da piridina (**30**) ao trifosgênio (**31**), levando ao intermediário altamente eletrofílico **32** e gás fosgênio. Na sequência, **32** dá origem a **33** via ataque nucleofílico do Cl⁻. Por sua vez, a espécie **34** é obtida pelo ataque da respectiva amina a **33**, gerando o cloreto **26** após abstração de um hidrogênio pela trietilamina (Et₃N). Na segunda etapa, **6** efetua um ataque nucleofílico a **26**, formando **35**, o qual leva ao produto desejado **20** após a saída do cloreto.



Esquema 2. 5. Mecanismo para obtenção dos intermediários **26** e dos produtos de substituição nucleofílica **20**.

No espectro de RMN de ^1H de **20a** (Figura A. 7), encontram-se sinais esperados para a unidade tetrahydro- β -carbolílica anteriormente discutidos, bem como um sinal de hidrogênios de grupos metilênicos compatíveis com o anel piperazínico (δ 3,14 – 3,07, m, 4H). Adicionalmente, estão presentes os três sinais para os grupos metilênicos da TH β C (δ = 4,34, s, 2H/3,46, t, J = 5,5 Hz, 2H) e 2,70, t, J = 5,2 Hz, 2H), além de um singlete intenso integrando para 9 hidrogênios (δ 1,35, s) característico do grupo terc-butil do Boc₂O. Complementarmente, o espectro de ^{13}C mostra sinais para os carbonos carboxílicos da estrutura (δ 163,7 e 154,4), além de um sinal em δ 79,5, compatível com carbono desblindado vizinho a átomo eletronegativo, representativo do carbono quaternário do Boc₂O. O espectro de HRMS deste composto e dos demais inéditos, serão adquiridos futuramente, para caracterização completa das estruturas.

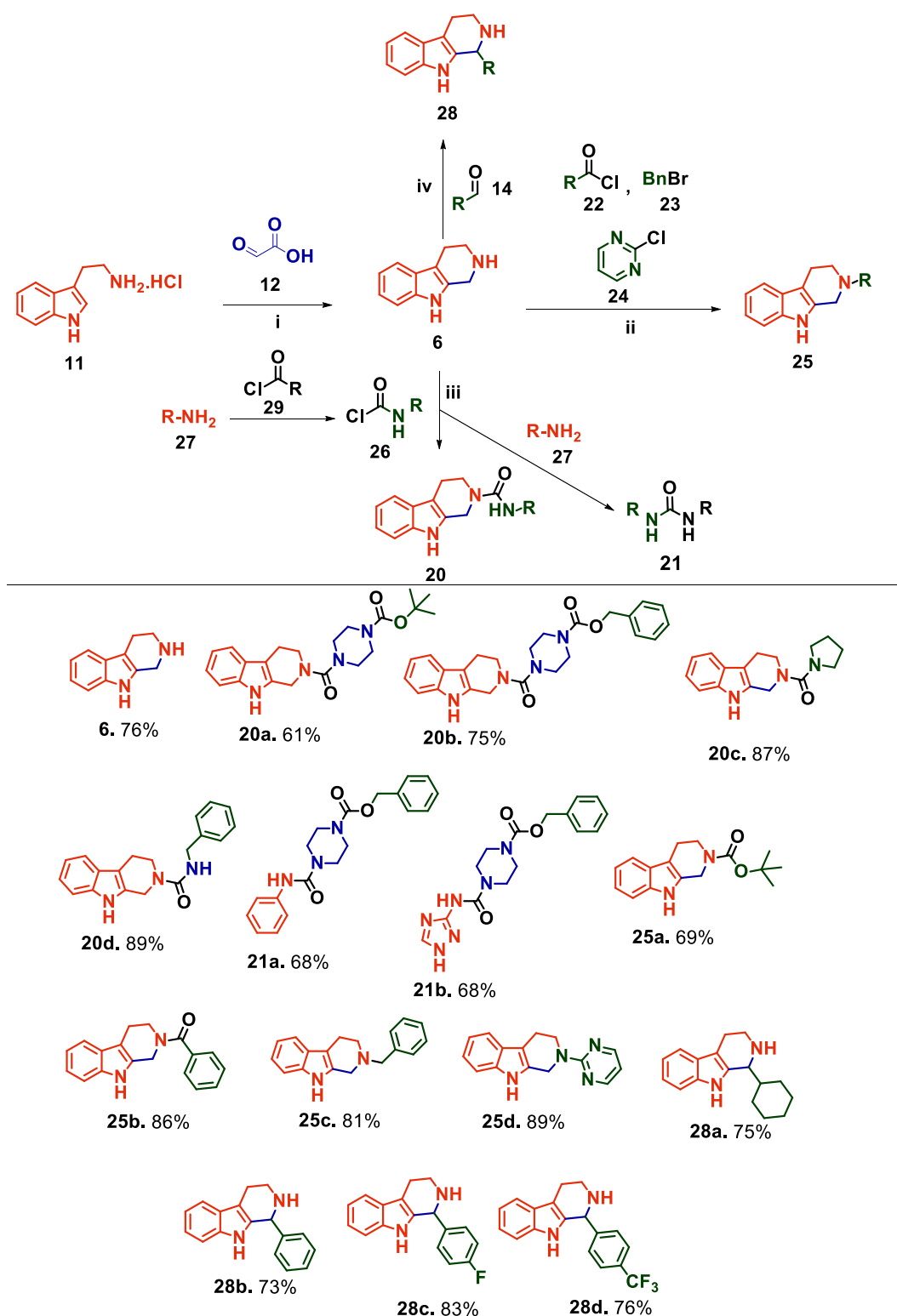
Os derivados *N*-protegidos **25** (Esquema 2.6) foram obtidos a partir da proteção da amina secundária de **6** com os respectivos anidridos ou haletos comerciais (**22-24**). O mecanismo para obtenção dos mesmos envolve as etapas descritas no Esquema 2. 5, II. Todos os compostos desta série são conhecidos e os dados de RMN ^1H e ^{13}C são compatíveis com os da literatura.²⁸ Semelhantemente, os derivados tetrahydro- β -carbolínicos **28** foram preparados conforme a já citada reação de Pictet-Spengler empregando os aldeídos apropriados (Esquema 2.6), sendo o mecanismo aquele já discutido no Esquema 2. 3. Quanto à caracterização estrutural, todos os

compostos já são amplamente descritos na literatura, e os dados de RMN 1D (Figura A. 3 e Figura A. 4) são perfeitamente compatíveis.³¹

Alternativamente, alguns derivados do esqueleto **20** portando outros núcleos ao invés da TH β C (**21a**, com fenil, e **21b** com o anel aminotriazínico, Esquema 2.6, bem como outra amina além da piperazina (**20c**, pirrolidina, Esquema 2.6) foram sintetizados, como forma de avaliar se esses núcleos seriam de fato indispensáveis para a eventual atividade anti-DENV. Os compostos **20c** e **21a** já são conhecidos, porém, o derivado **21b** ainda não foi descrito.

No espectro de RMN ¹H de **21b** (Figura A. 10) revela seis sinais aromáticos (δ 7,38-7,36, m, 3H/7,35-7,33, m, 2H/7,32-7,30, m, 1H) referentes aos anéis aminotriazínico e fenílico, bem como um singlete (δ 5,14, s, 2H) característico de hidrogênios metilênicos enantiotópicos vizinhos a grupo eletronegativo, correspondente à porção benzílica do Cbz. Por outro lado, no espectro de RMN ¹³C são encontrados sinais para as duas carboxilas da estrutura (δ 157,7 e 157,0), além de um singlete em δ 68,7 compatível com o carbono metilênico do grupo Cbz.

Em suma, foram obtidos 15 derivados tetrahydro- β -carbolínicos com modificações em pontos-chave do esqueleto e com boa diversidade estrutural, na busca por um protótipo que apresente atividade antiviral de destaque e possa ser desenvolvido como um agente antiviral.



I) Ácido glioxílico (1,1 eq.), H₂O, KOH (4,0 M), 1 h, então HCl conc., H₂O, refluxo, 1,5 h, seguido de KOH (20%); II) **25a**, Boc₂O, **25b**, Cloreto de benzoíla, **25c**, BnBr. Nos três casos, 1,5 eq., TEA (1 eq.), DCM, 16h, t. a.; **25d**: 2-cloropirimidina (1,5 eq.), DMF, 120 °C, 8h; III) Respectivo cloreto de carbamoíla (RNCOCI, 1,5 eq.), DCM, 0° a t.a., 16 h; IV) Respectivo aldeído (2 eq), TFA (1eq), ACN, 110°C, 6h.

Esquema 2. 6. Rotas sintéticas para os derivados **20**, **21**, **25** e **28**.

3. ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.1. Atividade anti-DENV

Conforme citado, os ensaios anti-DENV2 foram conduzidos via parceria com o grupo da Professora Jaqueline Germano Cruz, da Fiocruz-MG. Infelizmente, nenhum dos compostos sintetizados exibiu atividade frente ao vírus. O relatório completo está no item 7(ANEXOS-PARTE I)

3.2. Atividade anti-ZIKA

O ensaio frente a protease principal do vírus da Zika (NS2-NS3) foi realizado em parceria com o grupo da Professora Rafaela Salgado Ferreira, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Infelizmente, nenhum dos compostos sintetizados exibiu atividade frente ao vírus. O relatório completo com os resultados está anexado ao fim deste relatório. O relatório completo não foi enviado devido à restrição de tamanho máximo para upload deste arquivo.

3.3. Ensaios antiparasitários e antitumorais

Os compostos sintetizados serão avaliados:

I) Quanto à sua atividade frente a *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*, causadores das parasitoses leishmaniose e doença de chagas, respectivamente. Os ensaios serão realizados em parceria com o grupo de pesquisa da Profa Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, da Fiocruz-MG;

II) Quanto à sua atividade frente a linhagens celulares de câncer de próstata e mama, em parceria com o Chemical Discovery Group (CDG)/Instituto de Química-USP, sobre a liderança do Prof. Dr. Andrei Leitão.

4. CONCLUSÃO

Na Parte I deste projeto, foi possível realizar com sucesso o isolamento do ácido strictosidínico, um produto natural estratégico que representa a base molecular para o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos. Em paralelo, foram sintetizados 15 derivados tetrahydro- β -carbólicos, com diferentes modificações estruturais, visando à identificação de compostos com potencial atividade antiviral frente aos vírus da dengue (DENV-2) e da zika (NS2B-NS3Pro). Embora os ensaios conduzidos em parceria com os grupos da Fiocruz-MG e da UFMG não tenham revelado atividade significativa frente a esses alvos virais, os dados gerados foram fundamentais para o refinamento das hipóteses farmacofóricas do projeto.

Atualmente, os compostos estão sendo avaliados quanto à sua atividade citotóxica em quatro linhagens tumorais (duas de mama e duas de próstata), em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Andrei Leitão (Chemical Discovery Group, IQ-USP), cujos resultados poderão revelar novas aplicações terapêuticas desses derivados em oncologia. Simultaneamente, foi estruturada uma nova fase da pesquisa, detalhada na Parte II deste relatório, com foco na síntese racional de novos análogos e na avaliação de sua atividade antiparasitária frente a *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*. Essa segunda etapa expande o escopo da proposta original, incorporando o conceito de bioisosterismo e reforçando o compromisso do projeto com a busca de soluções inovadoras para o combate a doenças tropicais negligenciadas.

5. CRONOGRAMA PARA OS PRÓXIMOS 6 MESES

MÊS/2025	ATIVIDADE
01	-Espera do retorno do resultado dos ensaios antivirais
02 a 07	-Desenvolvimento da Parte II do projeto (descrita abaixo)

6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – PARTE I

6.1. Procedimentos gerais

As folhas de *Psychotria hoffmannseggiana* foram secas em estufa de ventilação forçada e moído em moinho de facas.

Os solventes utilizados nas separações cromatográficas apresentavam grau de pureza P.A ou foram destilados. As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica gel 60 F254 suportada em folhas de alumínio e reveladas sobre luz ultravioleta e/ou coradas em reveladores como vanilina ácida, permanganato de potássio e ninidrina. Os agentes reveladores usados foram ultravioleta -UV- (254 e 365 nm), reagente de Dragendorff (para alcaloides e compostos nitrogenados - reação positiva: coloração laranja), reagente anisaldeído (para esteroides, terpenoides e açúcares-reação positiva: coloração roxa) e solução de ácido sulfúrico/metanol (1:1 v/v), seguido de aquecimento (revelador universal). Todos os reagentes comercialmente disponíveis foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

A análise em CG foi realizada usando um aparelho Shimadzu GCMS-QP2010S, equipado com uma coluna HP5-MS 60m x 1,25µm. Hélio foi usado como gás de arraste. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H) foram registrados nos espectrômetros Bruker ARX 400 MHz ou Bruker Avance HD 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para indicar a multiplicidade dos sinais

utilizou-se a seguinte abreviação: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), t (tripleto), q (quadrupleto), m (multipleto).

A purificação dos produtos foi realizada por coluna cromatográfica ou cromatografia em camada delgada preparativa, em que se utilizou sílica gel 60, 230-400 mesh ASTM Merck e sílica gel 60 A, 70-230 mesh AldrichCo. As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no modo analítico foram realizadas em cromatógrafo HPLC/DAD da Shimadzu® contendo os módulos de bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A, injetor automático SIL-20A e módulo de comunicação CBM-20A. A coluna empregada foi a Phenomenex Luna C18 (100,0 mm x 4,6 mm, 5µm) com pré-coluna C18 (2,0 mm x 7,8 mm). E para as análises em UPLC-QTOF utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 Acquity UPLC® HSS T3 Column (100,0 mm x 2,1 mm; 1,8 µm). O volume de injeção no analítico foi 50 µL (analítico).

6.2. Isolamento do ácido strictosidínico

6.2.1. Preparação dos extratos.

A coleta do material (folhas, galhos e frutos) ocorreu em setembro de 2024 no bosque *St. Hilair* do Campus Samambaia da UFG, Goiânia-GO, sendo a sua identificação realizada pelo Prof. Dr. Piero Giuseppe Delprete, Herbar de Guyane (CAY), UMR AMAP, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Cayenne, Guiana Francesa (França). A exsicata está depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, Unidade de Conservação PRPPG, Campus II, Goiânia,GO, sob o número de registro 12014.

As folhas foram secas a 40°C por 72 h e em seguida moídas, fornecendo 31,5 g. Esse material foi submetido à extração em ultrassom à temperatura ambiente (4x, 15 minutos cada ciclo) com MeOH (4x100 mL), fornecendo 2,05 g de extrato hidrometanólico (EHMF) após evaporação do solvente. EHMF foi solubilizado em HCl 10% (100 mL) e MeOH (100 mL) e deixado sob agitação por 24 h. Após este período, o extrato ácido obtido foi filtrado, todo o metanol evaporado, seguindo-se à extração com DCM (3 x 100 mL) e secagem com Na₂SO₄ anidro, o que levou à fração DCM ácida (FrDCMAc, 0,822 g) após evaporação do solvente. A fase aquosa foi, então, basificada com NH₄OH até PH 10-11, sendo extraída na sequência com AcOEt (3 x 100 mL) e *N*-BuOH (3 x 100 mL), fornecendo as frações AcOEt básica (FrAcOEtBs, 0,105 g) e Fr*N*-BuOHBs, (0,564 g).

A análise em CCD dos extratos básicos foi realizada, permitindo a identificação do alcalóide desejado na fração Fr*N*-BuOHBs como composto majoritário.

6.2.2. Análise de FrN-BuOHBs em HPLC analítico

Uma alíquota de 1 mg de padrão de AEs foi pesada e solubilizada em 1 mL de ACN/H₂O (8:2). A injeção dessa amostra foi feita em HPLC analítico, utilizando um método exploratório, com percentuais de ACN variando de 5-28% em 30 minutos, chegando a 100% em 60 minutos e permanecendo por 12 min, fluxo de 1 mL/min, varredura nos comprimentos de onda $\lambda = 220$ e 254 nm, injeção de 10 μ L de amostra por análise, numa corrida de 60 min. Neste método, AEs apresentou tempo de retenção (t.r) de 30,01 min (Figura 3).

Em seguida, 2,0 mg de FrN-BuOHBs foi pesado em um eppendorf de 1 mL, preparado e injetado nas mesmas condições usadas para o padrão, permitindo identificar AEs (Figura 3) e a escolha deste método como o melhor para separação em MPLC preparativo.

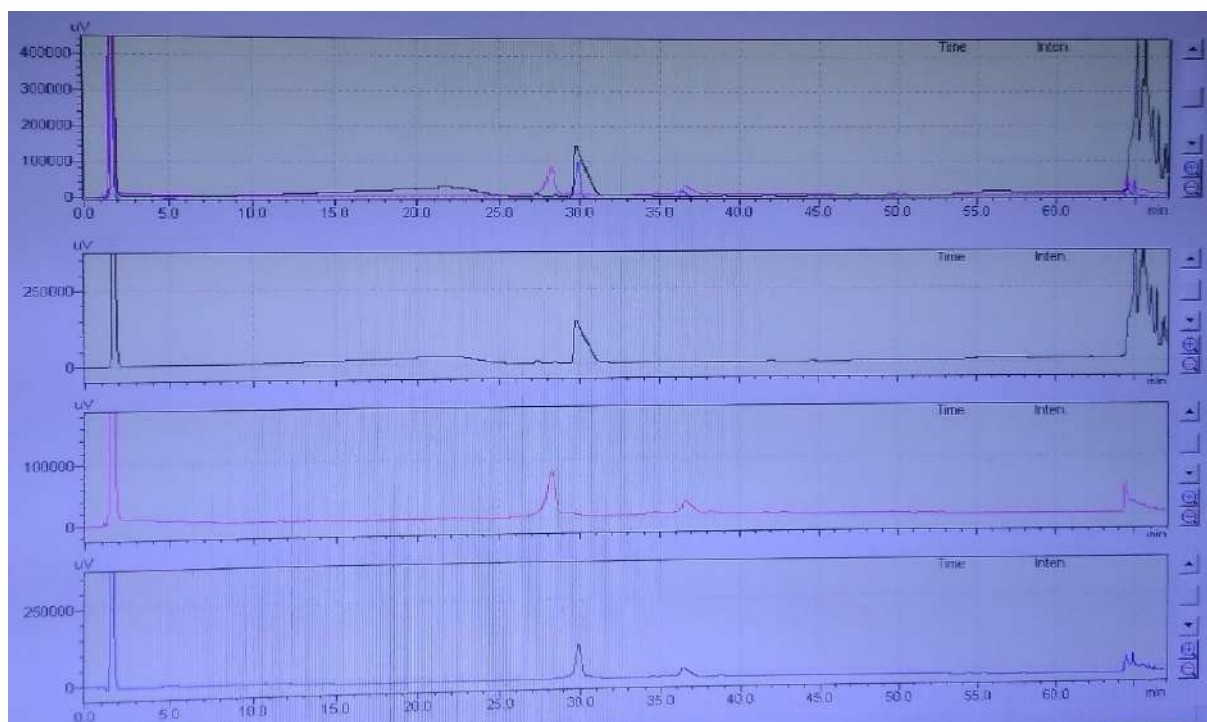


Figura 3. Cromatograma mostrando a identificação de AEs em HPLC analítico na fração FrN-BuOHBs. a) Padrão de AEs junto com a fração FrN-BuOHBs; b) Padrão de AEs; c) Padrão de AEs na mesma fase móvel com 0,1 % de ácido fórmico; d) Fração FrN-BuOHBs.

6.2.3. Isolamento de AEs em MPLC preparativo

Uma vez identificado o composto e, estando otimizada a condição para seu isolamento, amostras de FrN-BuOHBs foram injetadas em equipamento de MPLC. 15 mg desse extrato foram inicialmente pesadas, solubilizado em MeOH e misturado a uma quantidade adequada de sílica preparação da amostra a ser injetada. Essa amostra foi injetada, então utilizando o método otimizado, tendo o composto apresentado t.r de 28 min. Com o objetivo de diminuir o

tempo, na corrida seguinte foi ajustada a quantidade inicial de ACN para 18%, indo até 28% em 30 min, chegando a 100% em 35 e permanecendo por. 2 min. Para este método, o t.r de AEs. foi de 12 min, método que foi escolhido como condição otimizada para isolamento do composto. Desse modo, alíquotas entre 15 e 125 mg de FrN-BuOHBs foram injetadas para purificação do alcalóide, levando a um total de 11,9 mg de composto purificado (Figura 4).

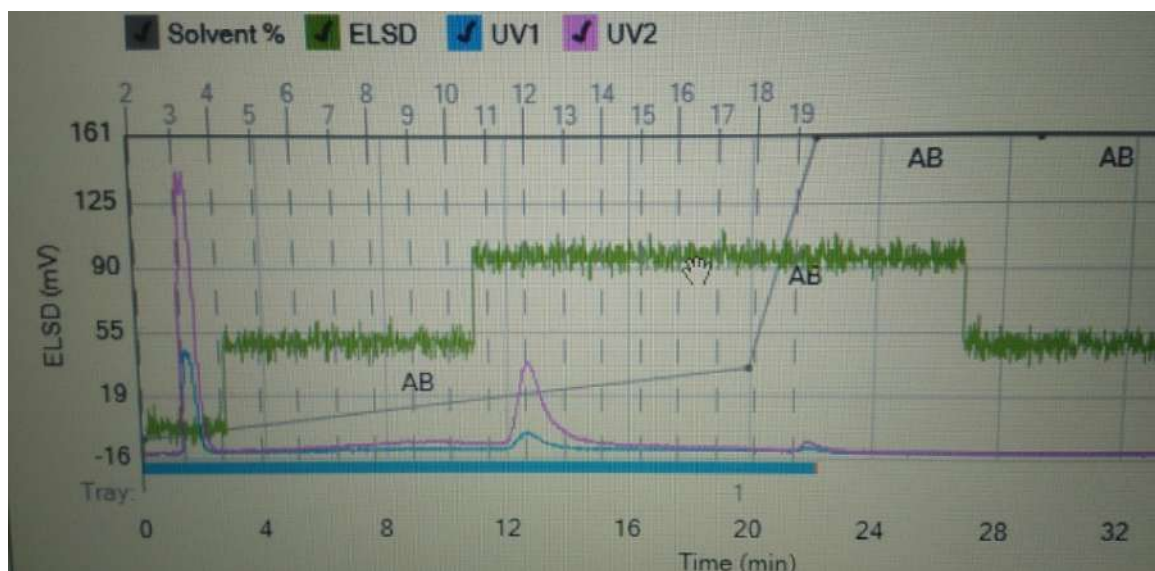
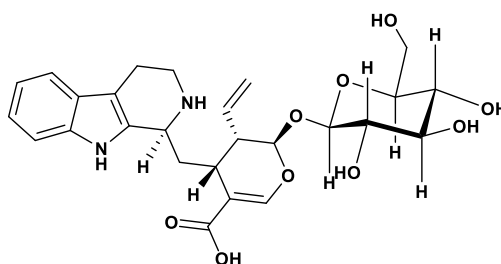


Figura 4. Cromatograma obtido para isolamento de AEs apartir da fração FrN-BuOHBs em MPLC.



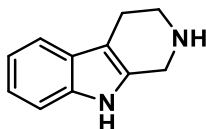
(2R,3S,4R)-4-(((S)-2,3,4,9-tetrahidropirido[3,4-b]indol-1-il)metil)-2-

(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)tetra-hidro-2H-piran-2-il)oxi)-3-vinil-3,4-di-hidro-2H-piran-5-carboxílico ácido (1): RMN de ^1H (600 MHz, $\text{MeOD}-d_4$): δ 7,56 (s, 1H), 7,45 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,13 (ddd, $J = 8,2, 7,1, 1,1$ Hz, 1H), 7,06 – 7,02 (m, 1H), 5,85 (ddd, $J = 17,4, 10,5, 7,6$; Hz, 1H), 5,82 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 5,32 (dt, $J = 17,4, 1,3$ Hz, 1H), 5,21 (dt, $J = 10,6, 1,3$; 1H), 4,83 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 4,44 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 4,02 (dd, $J = 11,8, 2,1$ Hz, 1H), 3,76 – 3,72 (m, 2H), 3,68 (dd, $J = 11,8, 7,1$ Hz, 1H), 3,43 (t, $J = 9,1$ Hz, 1H), 3,41 – 3,38 (m, 1H), 3,28 – 3,21 (m, 4H), 3,09 – 3,03 (m, 1H), 3,01–2,99 (m, 1H), 2,98 (ddd, $J = 13,0, 4,8$ e $4,5$, 1H), 2,73 – 2,68 (m, 1H), 2,37 (td, $J = 14,3, 3,3$ Hz, 1H), 2,11 (ddd, $J = 13,0, 12,3, 4,5$; 1H). RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{MeOD}-d_4$): δ 176,1; 153,4; 138,4; 136,4; 130,7; 127,7; 123,5; 120,7; 119,2; 119,0; 113,8; 112,4; 107,5; 100,5; 96,7;

78,9; 78,1; 74,9; 71,9; 63,3; 52,5; 49,6; 49,4; 49,3; 49,1; 49,0; 48,9; 48,7; 45,9; 43,2; 35,3; 34,2; 19,8.

6.3. Procedimentos de síntese de dos derivados

6.3.1. Síntese da TH β C (6)

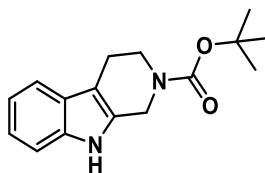


2,3,4,9-tetrahydro-1H-pirido[3,4-b]indol (6)²⁶: Cloridrato de triptamina comercial (2,45 g, 12,3 mmol, 1 eq) e ácido glioilico (1,3 g, 13,7 mmol, 1,1 eq) foram dissolvidos em 39 mL de H₂O e, em seguida, uma solução de KOH (0,69 g, 12,3 mmol, 1 eq) em 3 mL de H₂O foi adicionada gota a gota. A mistura foi agitada por 1h, o precipitado branco formado foi coletado por filtração e em seguida dissolvido em H₂O (39 mL). HCl_{conc.} (3,3 mL) à temperatura ambiente foi adicionado e a mistura reacional foi agitada por uma hora sob refluxo. Após este período, uma nova adição de HCl_{conc.} (3,3 mL) foi efetuada, seguindo-se agitação por mais 0,5 h sob refluxo. Após o resfriamento a r.t., a solução foi basificada em 20% de KOH até pH > 13, fornecendo **6** como um precipitado branco após filtragem e lavagem com água (1,6 g, 73%). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,7 (s, 1H, *NH*), 7,34 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,26 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,99 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,92 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 3,85 (s, 2H), 2,97 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 2,58 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 135,9, 134,7; 127,7; 120,6; 118,5; 117,6; 111,2; 107,4; 43,9; 43,1; 22,7.

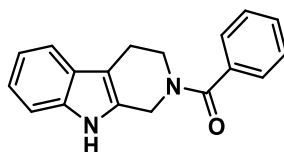
6.3.2. Síntese das TH β Cs *N*-protegidas (25)

A uma solução de **6** (0,1 g, 0,6 mmol) em DCM (2 mL) em TEA (0,63 mL, 0,6 mmol) a 0 °C, adicionou-se lentamente o anidrido ou haleto (0,9 mmol, 1,5 eq.). A mistura de reação foi deixada à t. a. e sob agitação por 16-24 h. Em seguida, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna ou cromatografia preparativa, levando ao produto desejado.

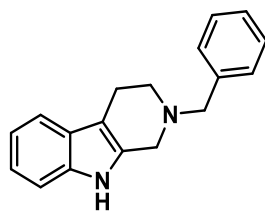
26 ZHENG, H.; LIN LI, L.; SUN, B.; GAO, Y.; SONG, W.; ZHAO, X.; GAO, Y.; XIE, Z.; ZHANG, N.; JI, J.; YUAN, H.; LOU, H. "Design and synthesis of furyl/thineyl pyrroloquinolones based on natural alkaloid peroloryne, lead to the discovery of potent and selective PDE5 inhibitors." *Eur. J. Med. Chem.*, **150**:30-38, **2018**.



1,3,4,9-tetrahydro-2H-pirido[3,4-b]indol-2-carboxilato de *terc*-butilo (25a):²⁶ Sintetizado a partir de Boc₂O (0,19 g), purificado por cromatografia em coluna (Hex:AcOEt 20%) e obtido como um sólido branco com 69% de rendimento (0,19 g). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,49 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,17 – 7,08 (m, 2H), 4,65 (s, 2H), 3,77 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,80 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 1,53 (s, 9H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 155,2; 136,1; 127,0; 121,7; 119,5; 117,9; 110,8; 80,0; 42,2; 28,5; 28,0; 21,6.



Fenil(1,3,4,9-tetrahydro-2H-pirido[3,4-b]indol-2-il)metanona (25b):²⁷ Sintetizado a partir de cloreto de benzoíla (60 μL), purificado por cromatografia em coluna (Hex:AcOEt 50%) e obtido como um sólido amarelo-claro, com 86% de rendimento (0,14 g). RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,9 (s, 1H), 7,50 – 7,48 (m, 6H), 7,41 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H), 6,97 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 4,84 (s, 2H), 3,61 (d, 2H), 2,75 (s, 2H). RMN DEPT135 (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 130,2 (CH), 130,1 (CH), 129,0 (CH), 127,4 (CH); 127,2 (CH), 121,4(CH); 119,0 (CH); 118,0 (CH); 111,5 (CH); 45,9 (CH₂); 40,8 (CH₂); 22,05 (CH₂).

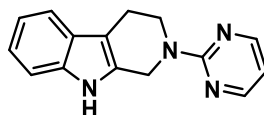


2-benzil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pirido[3,4-b]indol (25c):²⁸ Sintetizado a partir de BnBr (0,11 mL), purificado por cromatografia preparativa (Hex:AcOEt 30%) e obtido como um sólido amarelado com 81% de rendimento (0,12 g). RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 7,77 (s, 1H), 7,46

27 MA, Z.; HUANG, Y.; WAN, K.; ZHU, F.; SHENG, C.; CHEN, S.; LIU, D.; DONG, G. "Structural simplification of evodiamine: Discovery of novel tetrahydro-β-carboline derivatives as potent antitumor agents." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **40**:127954.

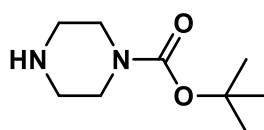
28 YE, J.; WU, J.; LV, T.; WU, G.; GAO, Y.; CHEN, H. "Oxidative Rearrangement Coupling Reaction for the Functionalization of Tetrahydro-β-carbolines with Aromatic Amines." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **56**(47):14968, **2017**.

(d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,41 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,34 (t, $J = 8,0$, 2H), 7,32 – 7,27 (m, 2H), 7,15 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,10 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H), 3,79 (s, 2H), 3,68 (s, 3H), 2,94 (dd, $J = 10,7$, 4,9 Hz, 2H), 2,84 (dd, $J = 7,9$, 3,5 Hz, 2H). RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3): δ 138,2; 136,3; 131,8; 129,4; 128,6; 127,6; 127,5; 121,6; 119,6; 118,2; 110,9; 108,5; 61,9; 50,9; 50,3; 21,2.



2-(pirimidin-2-il)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol (25d):²⁶ Sintetizado apartir de 2-cloropirimidina (0,1 g) com pequena modificação: A mistura reacional em DMF (1 mL) foi deixada sob agitação a 120 °C por 8h. Em seguida, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado via cromatografia preparativa (Hex:AcOEt 30%), levando ao produto desejado...como um sólido amarelo, com 89% (0,13 g). RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10,9 (s, 1H, *NH*), 8,41 (d, $J = 4,9$ Hz, 2H), 7,8 (d, $J = 7,6$ Hz 1H), 7,31 (dt, $J = 4,4$, 3,6 Hz, 1H), 7,05-7,02 (m, 1H), 6,97 – 6,94 (m, 1H), 6,65 (t, $J = 4,9$ Hz, 1 H), 4,92 (s, 2H), 4,14 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,76 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 161,6; 158,0; 135,9; 132,0; 126,7; 120,7; 118,5; 117,5; 111,0; 110,3; 107,0; 42,0; 41,6; 20,4.

6.3.3. Síntese de *N*-piperazina-*N*Boc

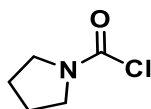


Terc-butil piperazina-1-carboxilato: A uma solução de piperazina (1,0 g; 11,6 mmol) em MeOH (4 mL) a 0 °C foi adicionada uma solução de Boc_2O (2,02 g, 9,3 mmol) diluído em MeOH (2 mL) via funil de adição (gota a gota) e a reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Na sequência, o sólido formado foi retirado por filtração. O solvente foi evaporado e o resíduo extraído com K_2CO_3 sat e DCM (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 , filtrada e concentrada. O produto foi obtido sem purificação cromatográfica como um sólido branco com rendimento de 58% (1,3 g). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , *presença de rotâmeros do Boc*): δ 3,37 (m, 4H), 2,88 – 2,85 (m, 1H), 2,79 – 2,76 (m, 3H), 2,43 – 2,38 (m, 1H), 1,95 (s, 1H), 1,43 (s, 9H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3 , *presença de rotâmeros do Boc*) δ 154,9; 79,6; 51,3; 45,9; 28,4.

6.3.4. Procedimento geral para a síntese dos intermediários cloretos de carbamoila (26)²⁹:

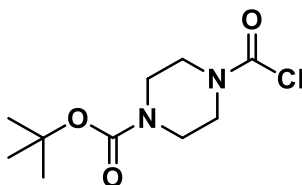
A uma solução da amina apropriada (27, 1 mmol) em DCM (5 mL) previamente preparada em um balão de 25 mL em banho de gelo, piridina destilada (161 µL, 2 mmol) e trifosgênio (0,15 g, 0,5 mmol) foram adicionados consecutivamente e em porções. A mistura reacional foi agitada durante 1 h em banho de gelo, depois deixada à temperatura ambiente e deixada a agitar durante mais 1 h. Após este período, DCM (10 mL) foi adicionado ao frasco, seguido de lavagem com HCl 1 M (3 x 5 mL) e solução saturada de NaCl (3x5 mL) extração da fase aquosa com DCM (2 x 10 mL), secagem da fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtração e concentração em vácuo. O resíduo foi usado na etapa subsequente sem purificação adicional.

Cloreto de *N*-pirrolidinilcarbamoila (26a)²⁹



Sintetizado a partir de pirrolidina comercial (82,1 µL) e obtido como um óleo marrom.

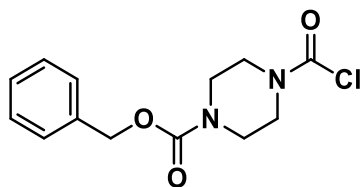
Tert-butil 4-(clorocarbonil)piperazina-1-carboxilato (26b)



Sintetizado a partir de *Tert*-butil carboxilato de piperazina (Ítem 4.3.3, 0,19 g) e obtido como um óleo amarelado.

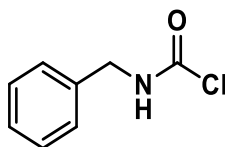
4-(clorocarbonil)piperazina-1-carboxilato de benzila (26c)

29 ZHU, Y.; OLSON, S.H.; GRAHAM, D.; PATEL, G.; HERMANOWSKI-VOSATKA, A.; MUNDT, S.; SHAH, K.; SPRINGER, M.; THIERINGER, R.; WRIGHT, S.; XIAO, J.; ZOKIAN, H.; DRAGOVIC, J.; BALKOVEC, M. J. "Phenylcyclobutyl Triazoles as Selective Inhibitors of 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I." *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **18**(11): 3412, **2008**.



Sintetizado a partir de 1-Zpiperazina comercial (192 μL) e obtido como um óleo amarelado.

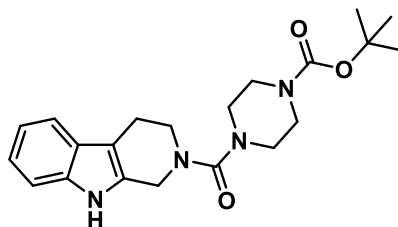
Cloreto benzilcarbâmico (26d)



Sintetizado a partir de benzilamina comercial destilada (100 μL) e obtido como um óleo amarelo claro.

6.3.5. Procedimento geral para síntese dos derivados 20 e

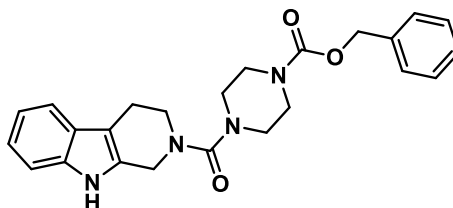
A uma solução de amina (**17**, 0,5 mmol) em DCM ou DMF (1 mL) a 0°C foi adicionado o cloreto de carbamoila (**26**, 0,6 mmol, 1,2 eq) adequado, gota a gota. A mistura reacional foi, então, deixada sob agitação por 16 h, sendo em seguida lavada com $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{sat}}$ e extraída com NaCl sat (3x10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na_2SO_4 , o solvente evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna ou preparativa, de acordo com cada caso.



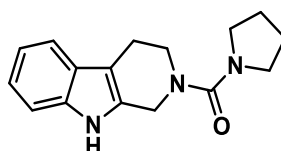
4-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pirido[3,4-b]indol-2-carbonil)piperazina-1-carboxilato de *tert*butila (20a):

Sintetizado a partir de **6** (0,086 g), *Terc*-butil 4-(clorocarbonil)piperazina-1-carboxilato (**26a**, 0,15 g) e DCM, purificado por coluna cromatográfica (Hex:AcOEt 60%) e obtido como um sólido branco com 61% (0,1 g) de rendimento. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,73 (s, 1H), 7,32 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,24 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,00 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,92 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 4,34 (s, 2H), 3,46 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 3,14 – 3,07 (m, 4H), 2,70 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H),

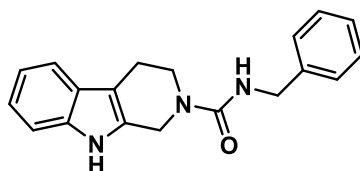
1,35 (s, 9H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6 , *presença de rotâmeros*): δ 163,7; 154,4; 136,4; 132,0; 127,0; 121,2; 118,9; 117,9; 111,5; 107,4; 79,5; 46,8; 45,5; 44,7; 28,5; 21,3.



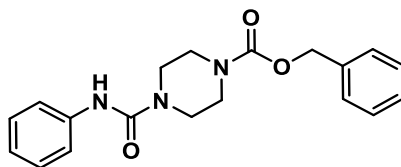
4-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pirido[3,4-b]indol-2-carbonil)piperazina-1-carboxilato de benzila (20b): Sintetizado a partir de **6** (0,086 g) e (4-clorocarbonil)piperazina-1-carboxilato de benzila (**26b**, 0,17 g) DCM, purificado por coluna cromatográfica (Hex:AcOEt 50%) e obtido como um sólido branco com 75% (0,20 g) de rendimento. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , *presença de rotâmeros*) δ 10,80 (s, 1H), 7,39 – 7,36 (m, 5H), 7,30 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,35-7,32 (m, 1H), 7,29 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,05 – 7,01 (m, 1H), 6,99-6,94 (m, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,41 (s, 2H), 3,53 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 3,22-3,20 (m, 4H), 2,76 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6 , *presença de rotâmeros*) δ 163,7; 154,9; 144,9; 137,3; 136,4; 132,0; 28,91, 128,4; 128,0; 127,1; 127,0; 121,2; 118,9; 117,9; 111,5; 107,4; 66,8; 46,7; 46,5; 45,6; 44,8; 43,7; 21,4.



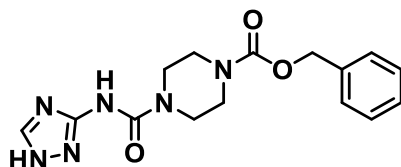
Pirrolidin-1-il(1,3,4,9-tetrahydro-2H-pirido[3,4-b]indol-2-il)metanona (20c): Sintetizado a partir de **6** (0,086 g) e cloreto de *N*-pirrolidinilcarbamoíla (**26a**, 0,16g) DCM, purificado por coluna cromatográfica (Hex:AcOEt 50%) e obtido como um sólido amarelado com 87% (0,23 g) de rendimento. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9,01 (s, 1H, *NH*), 7,47 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,32 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,12-7,07 (m, 2H), 4,55 (s, 2H), 3,62 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 3,51-3,48 (m, 4H), 2,87 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 1,96 – 1,80 (m, 4H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 163,0; 136,3; 131,5; 126,9; 121,3; 119,2; 117,7; 111,0; 108,0; 48,5; 45,4; 44,2; 25,6.



N-benzil-1,3,4,9-tetrahydro-2H-pirido[3,4-b]indole-2-carboxamida (20d):³⁰ Sintetizado a partir de **6** (0,086 g), cloreto benzilcarbâmico (**26d**, 0,1 g) e DCM, purificado por coluna cromatográfica (Hex:AcOEt 50%) e obtido como um sólido branco com 89% (0,11 g) de rendimento. RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,84 (s, 1H, *NH*), 7,39 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,33 – 7,23 (m, 6H), 7,22 – 7,16 (m, 1H), 7,02 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 6,95 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 4,59 (s, 2H), 4,29 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,71 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 2,69 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, *presença de rotâmeros*): δ ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 158,2; 141,5; 136,4; 132,5; 128,7; 128,6; 127,4; 127,1; 127,0; 126,9; 121,0; 118,9; 117,9; 111,4; 107,4; 44,04, 42,4; 42,2; 21,5.



4-(fenilcarbamoil)piperazina-1-carboxilato de benzila (21a): Sintetizado a partir de anilina (46 μL), (4-clorocarbonil)piperazina-1-carboxilato de benzila (**26b**, 0,17 g) e DCM, purificado por coluna cromatográfica (Hex:AcOEt 60%) e obtido como um sólido branco com 68% (0,095 g) de rendimento. RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,58 (s, 1H, *NH*), 7,44-7,43 (m, 1H), 7,43-7,42 (m, 1H), 7,39-7,38 (m, 2H), 7,37-7,36 (m, 2H), 7,34 – 7,30 (m, 1H), 7,24 – 7,21 (m, 2H), 6,93 (tt, *J* = 7,4, 1,1 Hz, 1H), 5,11 (s, 2H), 3,45 (s, 8H). RMN ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆, *presença de rotâmeros*): δ 154,9, 154,5, 140,4, 136,8, 128,5, 128,3, 127,9, 127,6, 121,9, 119,7, 66,4, 43,5.



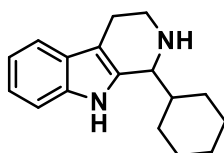
4-((1H-1,2,4-triazol-3-il)carbamoil)piperazina-1-carboxilato de benzila (21b): Sintetizado a partir de 1H-1,2,4-triazol-3-amina (0,042 g), (4-clorocarbonil)piperazina-1-carboxilato de benzila (**26b**, 0,17 g) e DMF, purificado por coluna cromatográfica (Hex:AcOEt 15%) e obtido como um sólido branco com 68% (0,095 g) de rendimento. RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆,

30 GOLDMAN, L.; WILLIAMS, H. J. "Anticonvulsants. Benzyl 4-carbamyl-1-piperazinecarboxylate and related compounds." *J. Org. Chem.*, **18**(7): 815, 1953.

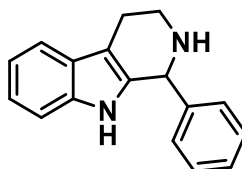
presença de rotâmeros): RMN ^1H (600 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 7,38-7,36 (m, 3H), 7,35-7,33 (m, 2H), 7,32-7,30 (m, 1H), 5,14 (s, 2H), 3,57 (sl, 4H), 3,47 (sl, 4H). RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, *presença de rotâmeros*): δ 157,7; 157,0; 138,0; 129,7; 129,4; 129,2; 68,7; 44,8.

6.3.6. Procedimento geral para das TH β Cs 28³¹

Em um frasco selado foram adicionados triptamina (**13**, 0,1 g, 0,62 mmol), o respectivo aldeído (**14**, 1,24 mmol, 2 equiv.) e DCM (3 mL) e por último, TFA (95,3 μL , 1,24 mmol, 2 equiv.) com agitação. A solução foi aquecida a 110 °C e mantida à temperatura por 6-8 h. Em seguida, a mistura reacional foi deixada atingir a temperatura ambiente, neutralizada com NaOH 1M, e extraída com DCM. Após lavagem com NaCl_{sat} , a fase orgânica foi reunida, seca com Na_2SO_4 anidro, concentrada e o resíduo purificado em coluna cromatográfica (DCM:MeOH 5-10%), levando ao produto desejado.



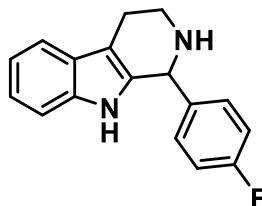
1-ciclohexil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol (28a):³¹ Sintetizado a partir de ciclohexanocarbaldeído (0,015 L) e obtido como um sólido marrom, com 75% (0,12 g) de rendimento. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,62 (s, 1H, *NH*), 7,34 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,00 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 6,92 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 3,91 (s, 1H), 3,20 (dt, $J = 12,1, 4,4$ Hz, 1H), 2,87 – 2,81 (m, 1H), 2,67 – 2,53 (m, 2H), 1,97 (dd, $J = 10,1, 7,3$ Hz, 1H), 1,78 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H), 1,65 (s, 2H), 1,48 – 1,34 (m, 1H), 1,34 – 1,23 (m, 2H), 1,19-1,07 (m, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 136,3; 127,5; 120,7; 118,6; 117,7; 111,3; 108,4; 57,6; 43,0; 41,4; 30,2; 27,2; 26,9; 26,6; 26,6; 22,4.



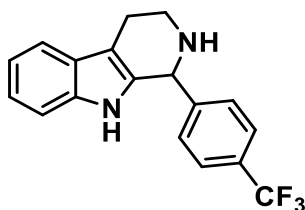
1-fenil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol (28b):³¹ Sintetizado a partir de benzaldeído (0,013 L) e obtido como um sólido marrom claro, com 73% (0,11 g) de rendimento. RMN ^1H

31 EAGON, S.; ANDERSON, O. M. "Microwave-Assisted Synthesis of Tetrahydro- β -carbolines and β -Carbolines." *Eur. J. Org. Chem.*, 8:1653, 2014.

(400 MHz, CDCl₃) δ 7,58 – 7,52 (m, 1H), 7,38 – 7,30 (m, 4H), 7,22 (dd, J = 6,6, 1,9 Hz, 1H), 7,17 – 7,09 (m, 2H), 5,17 (s, 1H), 3,38 (ddd, J = 15,8, 8,4, 5,4 Hz, 1H), 3,18 – 3,10 (m, 1H), 2,94 (dddd, J = 14,3, 8,8, 5,3, 1,9 Hz, 1H), 2,85 – 2,79 (m, 1H). RMN ¹³C: δ 141,7; 135,9; 134,4; 128,9; 128,5; 128,3; 127,4; 121,8; 119,4; 118,3; 110,8; 110,2; 58,1; 42,9; 22,5.



1-(4-(fluorofenil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]Indol (28c):³¹ Sintetizado a partir de 4-fluorbenzaldeído (0,015 L) e obtido como um sólido marrom claro, com 83% (0,14 g) de rendimento. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,41 (s, 1H, *NH*), 7,41 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,35 – 7,28 (m, 2H), 7,22 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,18 – 7,11 (m, 2H), 7,04 – 6,90 (m, 2H), 5,09 (s, 1H), 3,07 – 2,99 (m, 1H), 2,93 (ddd, J = 12,2, 6,7, 5,0 Hz, 1H), 2,78 – 2,61 (m, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163,2; 160,6; 140,0; 136,4; 135,7; 130,8; 130,7; 127,3; 121,0; 118,7; 118,0; 115,3; 115,1; 111,5; 108,8; 56,3; 41,7; 22,6.



1-(4-(trifluorometil)fenil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]Indol (28d):³¹ Sintetizado a partir de 4-trifluorometilbenzaldeído (0,017 L) e obtido como um sólido marrom claro, com 76% (0,15 g) de rendimento. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,41 (s, 1H, *NH*), 7,71 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,05 – 7,00 (m, 1H), 7,00 – 6,94 (m, 1H), 5,19 (s, 1H), 3,07-3,02 (m, 1H), 3,00 – 2,93 (m, 1H), 2,77-2,73 (m, 1H), 2,72 – 2,66 (m, 1H). RMN ¹³C (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ : 147,9; 136,0; 134,5; 129,3; 128,2; 127,9; 127,8; 127,6; 127,1; 126,8; 125,3; 125,0; 124,9; 123,5; 121,7; 120,7; 118,3; 117,7; 111,1; 108,6; 56,0; 41,1; 22,3.

7. ANEXOS – PARTE I

7.1. Resultados do ensaio anti-DENV-2

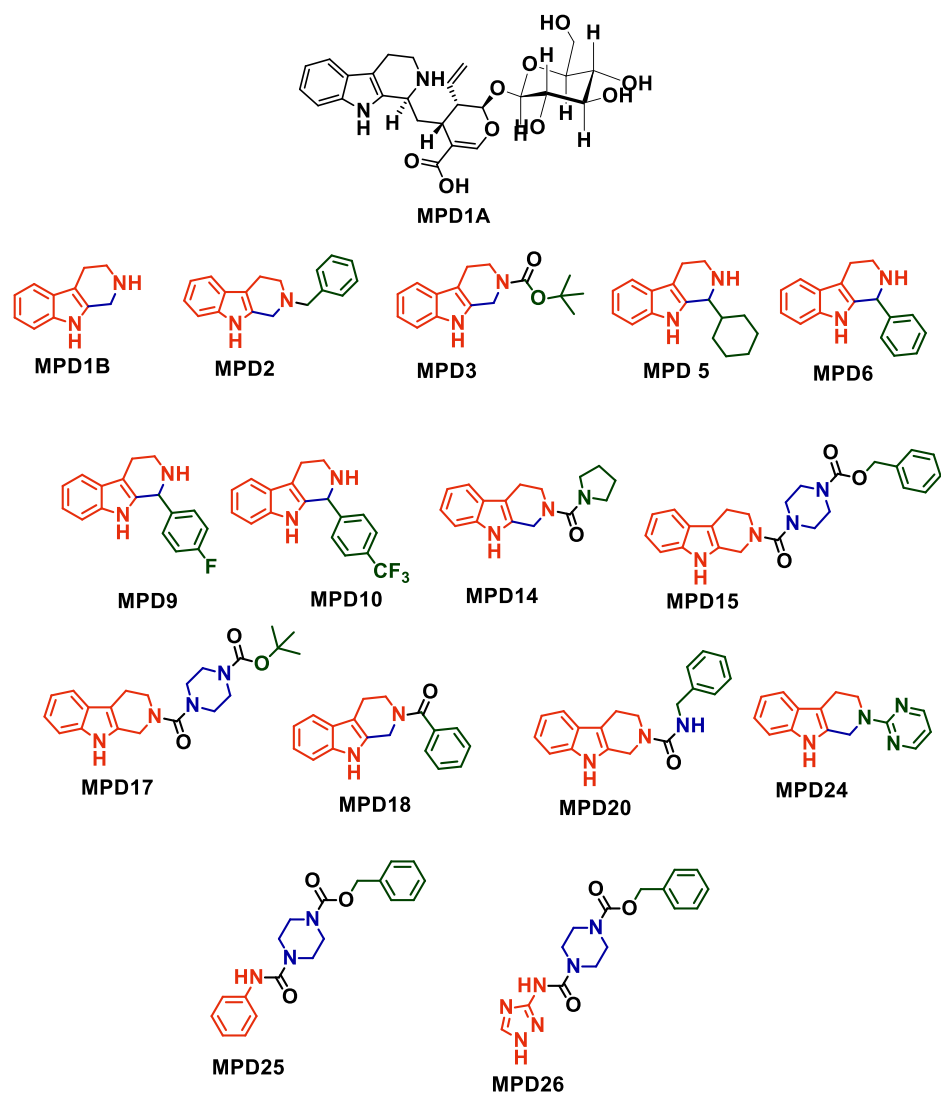


Figura A. 1. Relação dos compostos enviados para o ensaio antiDEV-2

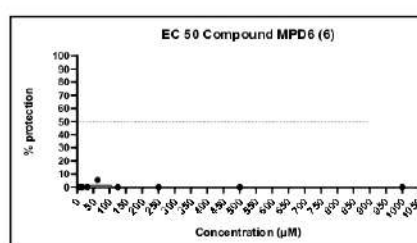
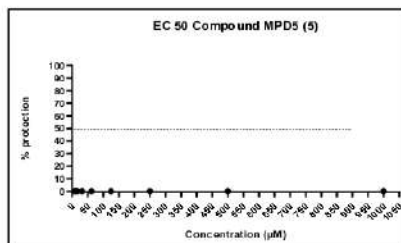
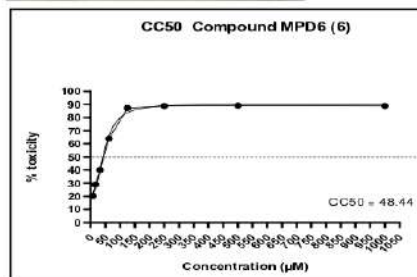
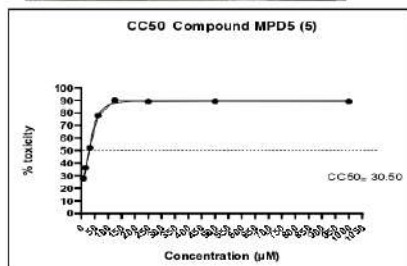
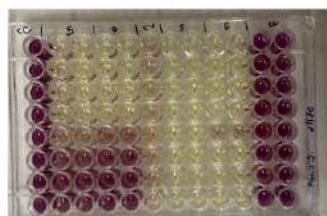
COMPOSTOS 5 e 6:

VALORES BRUTOS (DO 540)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					Legenda:	
	CC	5	6	CV	CC	5	6	CC				
1000 µM	0,0118	0,1007	0,0905	0,1016	0,1665	0,0883	0,0850	0,0891	0,0881	0,8548	0,8455	
500 µM	0,5221	0,0951	0,0951	0,1029	0,0979	0,1668	0,0555	0,0970	0,0943	0,0826	0,8231	
250 µM	0,5227	0,1036	0,0960	0,1033	0,1037	0,1910	0,1009	0,0981	0,0915	0,0849	0,7950	
125 µM	0,5124	0,0916	0,0906	0,1253	0,1136	0,1824	0,0968	0,0852	0,0805	0,0772	0,7976	
62,5 µM	0,8504	0,2005	0,2059	0,3396	0,3248	0,1789	0,0911	0,0918	0,2164	0,2220	0,8086	
31,3 µM	0,8000	0,4457	0,4382	0,5446	0,5594	0,1826	0,0972	0,0947	0,0944	0,0957	0,7811	
15,6 µM	0,5009	0,5902	0,5847	0,5661	0,5431	0,1916	0,1095	0,1112	0,1055	0,1048	0,6450	
7,8 µM	0,9378	0,6623	0,6654	0,7336	0,7305	0,1682	0,1171	0,1168	0,1032	0,0973	0,9343	
Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade (Célula + composto) Valores utilizados para ensaio antiviral (Célula + vírus + composto)												

VALORES EM PERCENTUAL (%)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto						
	CC	5	6	CV		5	6			CC		
1000 µM	0,0	89,1	89,2	88,8	89,0	0,00	0	0	0	0	91	90
500 µM	0,0	89,2	89,2	88,8	89,4	1,12	0	0	0	0	87	77
250 µM	0,0	88,7	89,3	89,1	88,7	1,69	0	0	0	0	83	96
125 µM	0,8	90,0	90,1	86,9	87,6	0,53	0	0	0	0	83	100
62,5 µM	7,3	78,2	77,6	83,4	64,7	0,06	0	0	5,1	5,9	85	95
31,3 µM	2,2	51,6	52,4	40,8	39,2	0,54	0	0	0	0	81	96
15,6 µM	2,1	35,9	36,5	27,6	30,1	0,42	0	0	0	0	63	94
7,8 µM	0,0	28,0	27,7	20,3	20,6	0,00	0	0	0	0	100	100
% DE CITOTOXICIDADE						% DE PROTEÇÃO						

Concentrações

1000 µM
500 µM
250 µM
125 µM
62,5 µM
31,3 µM
15,6 µM
7,8 µM



COMPOSTOS 7 e 8:

VALORES BRUTOS (DO 640)											
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					Legenda:
	CC	7	8	CV	CC	7	8	CV	CC	CC	
1000 µM	0,9738	0,1024	0,0960	0,1017	0,0952	0,1314	0,0998	0,1013	0,1020	0,0483	0,9943
500 µM	0,9255	0,1079	0,1027	0,1017	0,0993	0,1665	0,0938	0,0982	0,0941	0,0933	0,9595
250 µM	0,9231	0,0979	0,0982	0,0925	0,0890	0,1592	0,0910	0,0987	0,0922	0,1059	0,7776
125 µM	0,8893	0,1079	0,1014	0,2530	0,2339	0,1763	0,0913	0,0910	0,0924	0,0934	0,7952
62,5 µM	0,9009	0,3337	0,3347	0,5898	0,5719	0,1329	0,1173	0,1139	0,0990	0,1056	0,8816
31,3 µM	0,9029	0,5950	0,5558	0,6642	0,6422	0,1496	0,1031	0,1040	0,1177	0,1113	0,7973
15,6 µM	0,9042	0,6930	0,6803	0,7315	0,7187	0,1313	0,1168	0,1113	0,1244	0,1286	0,8207
7,8 µM	1,1234	0,8124	0,8307	0,7948	0,8684	0,1575	0,1247	0,1243	0,1273	0,1325	0,9088
											1,0171

Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade (Célula + composto)

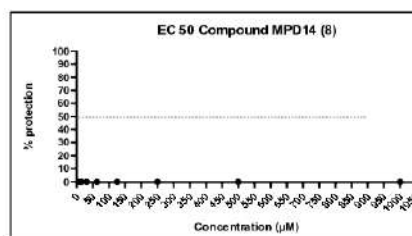
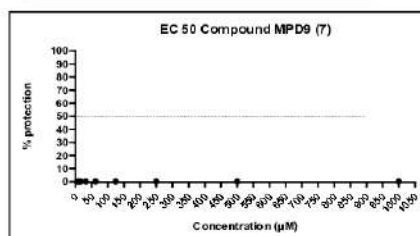
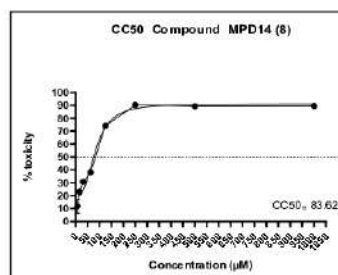
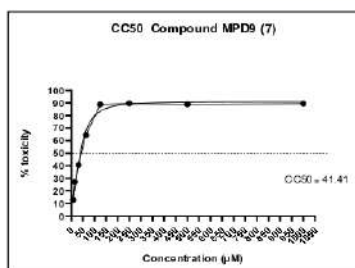
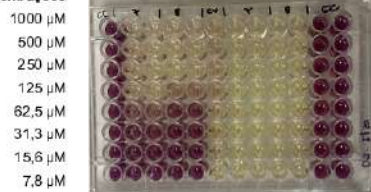
Valores utilizados para ensaio antitumoral (Célula + vírus + composto)

VALORES EM PERCENTUAL (%)											
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					CC
	CC	7	8	CV	CC	7	8	CV	CC	CC	
1000 µM	0,0	89,1	89,8	89,2	89,9	0,00	0	0	0	0	100
500 µM	1,8	88,6	89,1	89,2	89,5	2,31	0	0	0	0	90
250 µM	2,1	89,6	89,6	90,2	90,6	1,40	0	0	0	0	79
125 µM	5,7	88,6	89,2	73,2	75,2	3,55	0	0	0	0	82
62,5 µM	4,5	64,6	64,5	36,8	39,3	0,00	0	0	0	0	80
31,3 µM	4,2	40,0	41,1	29,6	31,9	0,21	0	0	0	0	82
15,6 µM	4,1	26,5	27,8	22,4	23,8	0,00	0	0	0	0	85
7,8 µM	0,0	13,8	11,9	15,7	7,9	0,00	0	0	0	0	96

% DE CITOTOXICIDADE

% DE PROTEÇÃO

Concentrações



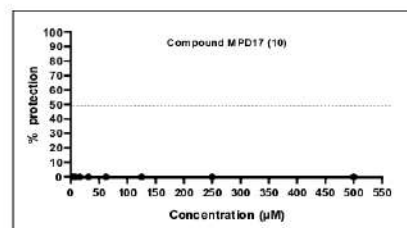
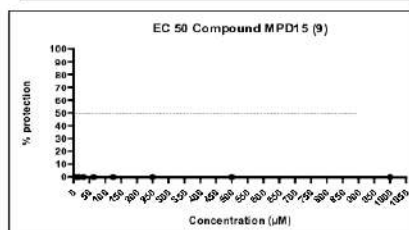
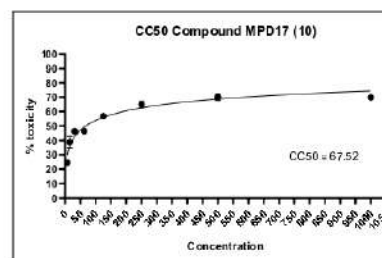
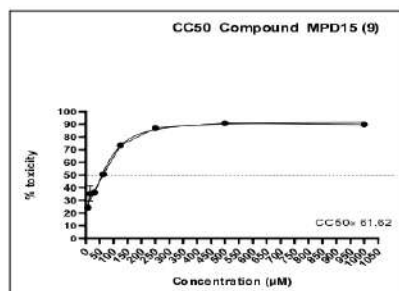
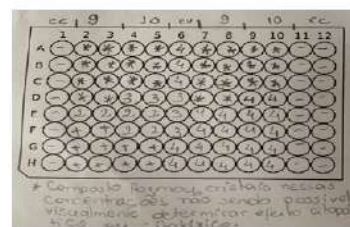
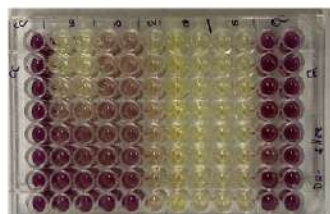
COMPOSTOS 9 e 10:

VALORES BRUTOS (DO 540)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					Legenda: CC celular CV Controle viral	
	CC	9	10	CV		9	10	CC				
1000 µM	1,0468	0,0900	0,1060	0,3020	0,2999	0,1128	0,1258	0,0909	0,1064	0,0910	0,6831	0,8313
500 µM	1,0241	0,0904	0,0936	0,3160	0,2823	0,1976	0,0983	0,0909	0,0984	0,1034	0,8340	0,7958
250 µM	1,0098	0,1347	0,1228	0,3666	0,3345	0,1982	0,0976	0,0935	0,1158	0,1099	0,8089	0,8005
125 µM	1,0305	0,2742	0,2606	0,4191	0,4458	0,2000	0,0904	0,0963	0,1211	0,1040	0,8136	0,8292
62,5 µM	0,9972	0,4901	0,4998	0,5255	0,5469	0,2112	0,0960	0,0987	0,1038	0,0968	0,8307	0,8472
31,3 µM	0,8840	0,6277	0,6455	0,5245	0,5688	0,2064	0,1027	0,0964	0,1208	0,1001	0,5201	0,8027
15,6 µM	0,9363	0,6859	0,6043	0,6434	0,5634	0,1910	0,1217	0,1053	0,1107	0,1104	0,8503	0,8087
7,8 µM	1,0332	0,7895	0,7506	0,7503	0,7897	0,1718	0,1040	0,1011	0,1072	0,1084	0,9134	0,8318
Valores utilizados para o teste de citotoxicidade (Célula + composto)					Valores utilizados para o teste antiviral (Célula + vírus + composto)							

VALORES EM PERCENTUAL (%)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto						
	CC	9	10	CV		9	10	CC			% DE CITOTOXICIDADE	% DE PROTEÇÃO
1000 µM	0,0	90,1	89,5	69,8	70,1	0,00	0	0	0	0		
500 µM	0,0	81,0	90,7	68,4	71,8	0,63	0	0	0	0		
250 µM	0,0	86,6	87,7	63,4	66,8	0,71	0	0	0	0		
125 µM	0,0	72,6	74,0	58,2	55,5	2,16	0	0	0	0		
62,5 µM	0,4	50,9	50,1	47,5	45,4	3,52	0	0	0	0		
31,3 µM	11,7	37,3	35,5	47,6	45,2	2,93	0	0	0	0		
15,6 µM	4,3	31,1	39,7	35,8	41,7	0,00	0	0	0	0		
7,8 µM	0,0	23,2	25,0	25,1	24,1	0,00	0	0	0	0		

Concentrações

1000 µM
500 µM
250 µM
125 µM
62,5 µM
31,3 µM
15,6 µM
7,8 µM



COMPOSTOS 11 e 12:

VALORES BRUTOS (DO 540)											
Concentrações	Nº de identificação do composto				Nº de identificação do composto						
	CC	11	12	CV	11	12	12	CC			
1000 µM	0,9478	0,0801	0,0866	0,0908	0,0915	0,1435	0,0978	0,1038	0,1043	0,1083	0,9474
500 µM	0,7305	0,0829	0,0795	0,0878	0,0886	0,1571	0,0878	0,0984	0,0951	0,0949	0,8733
250 µM	0,7011	0,0783	0,0811	0,2394	0,2327	0,1483	0,0882	0,0955	0,0942	0,0942	0,8489
125 µM	0,7444	0,0700	0,0682	0,4956	0,5499	0,1517	0,0875	0,0856	0,0971	0,0979	0,8575
62,5 µM	0,7354	0,1235	0,1256	0,6448	0,6512	0,1491	0,0840	0,0859	0,1041	0,1090	0,8427
31,3 µM	0,7536	0,3946	0,4194	0,6617	0,6594	0,1476	0,0833	0,0901	0,1293	0,1380	0,8620
15,6 µM	0,6355	0,5575	0,5397	0,6934	0,6960	0,1625	0,0908	0,1071	0,1479	0,1545	0,8574
7,8 µM	0,6735	0,7122	0,7610	0,7619	0,8331	0,1195	0,1017	0,1050	0,1317	0,1368	0,8806

Legenda:
CC celular
CV Controle viral

Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade (Célula + composto)

Valores utilizados para ensaio antitumoral (Célula + vírus + composto)

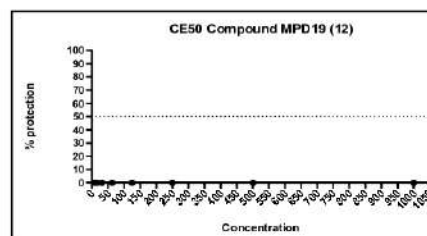
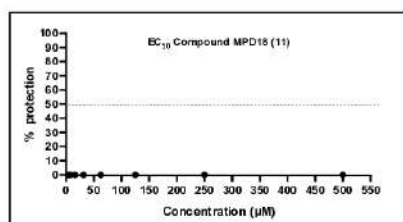
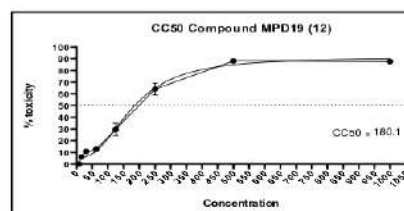
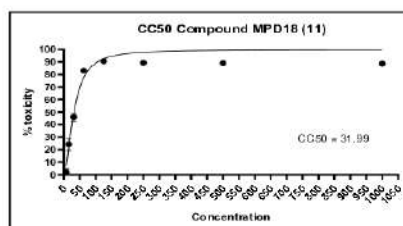
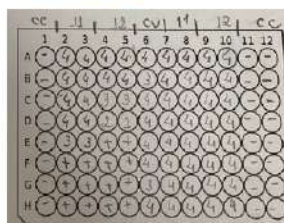
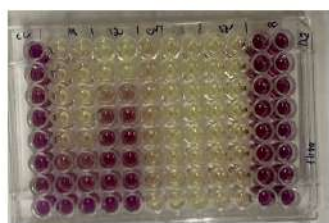
VALORES EM PERCENTUAL (%)											
Concentrações	Nº de identificação do composto				Nº de identificação do composto						
	CC	11	12	CV	11	12	12	CC			
1000 µM	0,0	89,2	88,1	87,6	87,6	0,00	0	0	0	0	100
500 µM	1,5	88,8	89,3	88,2	88,1	1,63	0	0	0	0	100
250 µM	5,4	89,4	89,1	87,7	80,5	0,15	0	0	0	0	100
125 µM	0,0	90,6	90,8	33,2	25,8	0,72	0	0	0	0	100
62,5 µM	0,8	83,3	83,1	13,0	12,2	0,28	0	0	0	0	100
31,3 µM	0,0	48,1	43,6	10,8	11,1	0,03	0	0	0	0	100
15,6 µM	14,3	20,8	27,2	6,5	6,1	2,54	0	0	0,1	1,2	100
7,8 µM	9,2	3,9	0,0	0,0	0,0	0,00	0	0	0	0	100

% DE CITOTOXICIDADE

% DE PROTEÇÃO

Concentrações

1000 µM
500 µM
250 µM
125 µM
62,5 µM
31,3 µM
15,6 µM
7,8 µM



COMPOSTOS 13 e 14:

VALORES BRUTOS (DO 540)											
Concentrações	Nº de identificação do composto				Nº de identificação do composto						
	CC	13	14	CV	13	14	CC				
1000 µM	0,9845	0,1150	0,1197	0,1037	0,1045	0,1572	0,1044	0,1032	0,1128	0,1068	0,9942
500 µM	0,9110	0,1597	0,1546	0,1536	0,1680	0,1223	0,1255	0,0834	0,1053	0,1024	0,9920
250 µM	0,9614	0,1275	0,1271	0,1601	0,1676	0,1652	0,1202	0,1656	0,0932	0,0941	0,9637
125 µM	0,8578	0,1529	0,1521	0,2250	0,2146	0,1646	0,1169	0,1145	0,0949	0,0959	0,8308
62,5 µM	0,9337	0,2004	0,1951	0,2870	0,2629	0,1845	0,1243	0,0858	0,0925	0,0958	0,8356
31,3 µM	0,8703	0,1895	0,1657	0,5230	0,5370	0,1786	0,1053	0,1062	0,0926	0,1005	0,8024
15,6 µM	0,9836	0,3519	0,3405	0,6596	0,7379	0,1950	0,1305	0,1424	0,1064	0,1264	0,8179
7,8 µM	0,9138	0,3771	0,4026	0,7650	0,7660	0,1716	0,1694	0,1650	0,1286	0,1339	1,0446

Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade (Célula + composto)

Valores utilizados para ensaio antiviral (Célula + vírus + composto)

Legenda:
CC - celular
CV - Controle viral

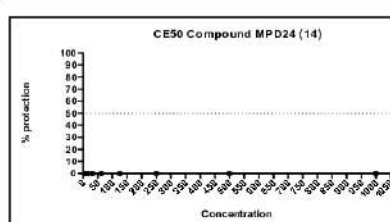
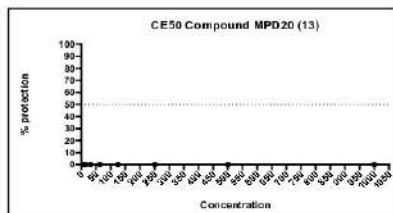
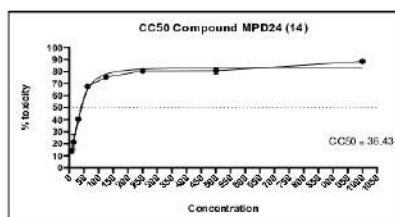
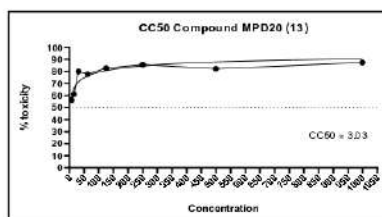
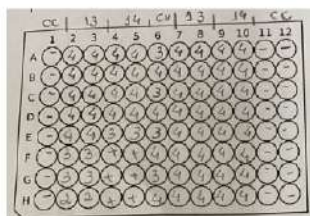
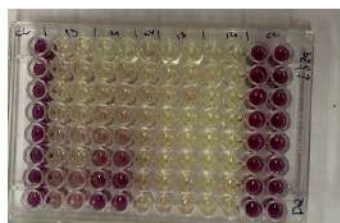
VALORES EM PERCENTUAL (%)											
Concentrações	Nº de identificação do composto				Nº de identificação do composto						
	CC	13	14	CV	13	14	CC				
1000 µM	0,0	87,0	87,6	88,3	88,3	0,00	0	0	0	0	95
500 µM	8,9	82,1	82,6	82,7	78,9	0,00	0	0	0	0	100
250 µM	3,2	85,7	85,7	79,8	81,2	2,18	0	0	0	0	96
125 µM	3,6	82,8	82,9	74,7	75,9	0,00	0	0	0	0	92
62,5 µM	0,0	77,5	78,0	67,7	67,1	2,08	0	0	0	0	98
31,3 µM	2,2	78,7	81,4	41,2	39,6	0,83	0	0	0	0	88
15,6 µM	0,4	60,5	61,7	25,8	17,1	3,54	0	0	0	0	90
7,8 µM	0,0	57,6	54,8	13,9	13,8	0,29	0	0	0	0	100

% DE CITOTOXICIDADE

% DE PROTEÇÃO

Concentrações

1000 µM
500 µM
250 µM
125 µM
62,5 µM
31,3 µM
15,6 µM
7,8 µM



COMPOSTOS 15 e 16:

VALORES BRUTOS (DO 540)													
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto							Legenda:
	CC	15	16	CV	15	16	CC	15	16	CC	celular		
1000 µM	1,0164	0,0996	0,0914	0,0832	0,0944	0,1209	0,0919	0,0906	0,0946	0,0912	0,7253	0,7302	CV Controle viral
500 µM	0,9349	0,0963	0,1139	0,0999	0,1230	0,1602	0,0896	0,0917	0,0865	0,0869	0,8402	0,8368	
250 µM	0,9248	0,1261	0,0915	0,4130	0,4195	0,1675	0,0926	0,0998	0,0923	0,0877	0,8974	0,8237	
125 µM	0,9109	0,2423	0,3542	0,5592	0,5544	0,1574	0,0873	0,0929	0,0909	0,0967	0,8594	0,8056	
62,5 µM	1,0567	0,5653	0,6162	0,7245	0,6489	0,1666	0,0821	0,0807	0,0989	0,1093	0,8065	0,9386	
31,3 µM	0,9559	0,8052	0,7913	0,7231	0,7551	0,1623	0,0829	0,0869	0,1106	0,1183	0,8790	0,9703	
15,6 µM	0,8453	0,7207	0,8125	0,7112	0,7919	0,1487	0,0968	0,1017	0,1385	0,1397	0,9109	0,8633	
7,8 µM	1,0077	0,9072	0,9548	0,8363	0,8937	0,1451	0,1105	0,1007	0,1270	0,1218	0,8676	0,9286	
Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade (Célula + composto)						Valores utilizados para ensaio antiviral (Célula + vírus + composto)							

Legenda:

CC

celular

CV

Controle viral

Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade
(Célula + composto)Valores utilizados para ensaio antiviral
(Célula + vírus + composto)

VALORES EM PERCENTUAL (%)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					CC	
	CC	15	16	CV	15	16	CV	16				
1000 µM	0,0	91,0	90,5	91,3	91,2	0,00	0	0	0	0	71	71
500 µM	2,8	89,8	88,2	89,6	87,2	0,82	0	0	0	0	85	85
250 µM	3,9	86,9	90,5	57,1	56,4	1,72	0	0	0	0	92	83
125 µM	5,3	74,8	63,2	41,9	42,4	0,47	0	0	0	0	87	81
62,5 µM	0,0	41,2	35,9	24,7	32,5	1,61	0	0	0	0	81	97
31,3 µM	0,6	16,3	17,7	24,8	18,4	1,08	0	0	0	0	90	100
15,6 µM	12,1	25,1	15,5	26,1	17,7	0,00	0	0	0	0	94	88
7,8 µM	0,0	5,7	0,7	13,0	7,1	0,00	0	0	0	0	88	96

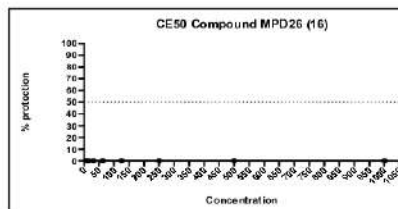
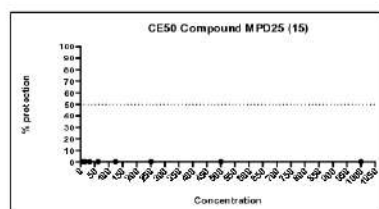
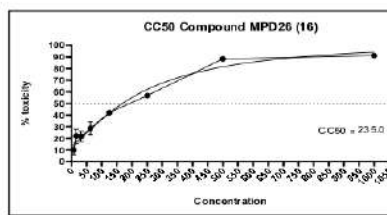
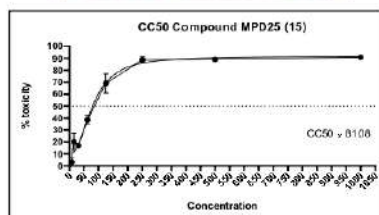
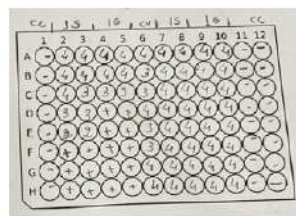
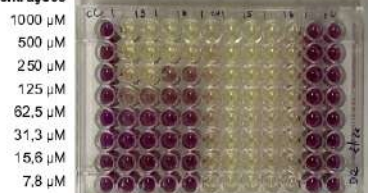
% DE CITOOTOXICIDADE

% DE PROTEÇÃO

% DE CITOTOXICIDADE

% DE PROTEÇÃO

Concentrações



COMPOSTOS 17 e 18:

VALORES BRUTOS (DO 540)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					CC	
	CC	17	18	CV	17	18	CV	17	18	CV		
1000 µM	1.0931	0.1069	0.1123	0.0921	0.0878	0.1598	0.1012	0.0980	0.0753	0.0719	0.9061	0.9947
500 µM	0.9597	0.1580	0.1957	0.0865	0.0872	0.1329	0.1059	0.0921	0.0721	0.0717	0.9193	0.9479
250 µM	1.0014	0.2116	0.2281	0.0867	0.0888	0.1826	0.1005	0.0943	0.0700	0.0708	0.9021	0.9800
125 µM	1.0122	0.2506	0.2645	0.0915	0.0923	0.1818	0.1000	0.0978	0.0781	0.0743	0.9358	0.9778
62.5 µM	1.0103	0.4228	0.4008	0.0592	0.6677	0.1799	0.0967	0.0987	0.0735	0.0756	0.8588	0.9944
31.3 µM	1.0097	0.4508	0.4579	0.0985	0.7098	0.1814	0.0986	0.1005	0.0749	0.0756	0.8677	0.9348
15.6 µM	1.0434	0.5485	0.5078	0.7726	0.7735	0.1803	0.0954	0.1016	0.1045	0.0903	0.8545	0.9537
7.8 µM	1.2821	0.6312	0.6217	0.9416	0.9461	0.1588	0.0993	0.0918	0.1117	0.1064	0.8065	0.9629

Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade
(Célula + composto)

Valores utilizados para ensaio antiviral
(Célula + vírus + composto)

CC

CV

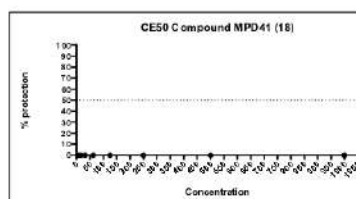
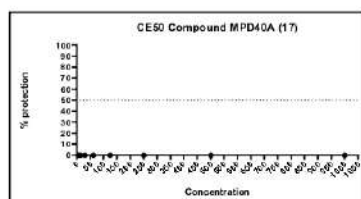
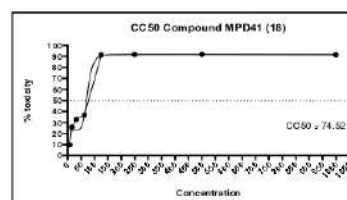
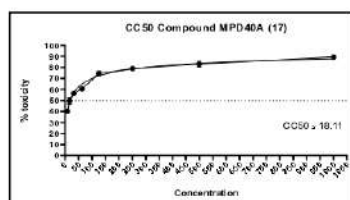
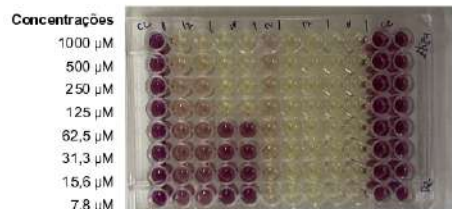
celular

Controle viral

VALORES EM PERCENTUAL (%)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					CC	
	CC	17	18	CV	17	18	CV	17	18			
1000 µM	0,0	89,8	89,3	91,2	91,6	0,00	0	0	0	0	84	94
500 µM	8,3	84,9	81,3	91,7	91,7	1,81	0	0	0	0	85	89
250 µM	4,3	79,8	78,2	91,7	91,5	0,62	0	0	0	0	83	92
125 µM	3,2	76,0	72,8	91,3	91,2	0,53	0	0	0	0	86	92
62,5 µM	3,4	59,8	61,7	37,0	36,2	0,31	0	0	0	0	78	94
31,3 µM	3,5	56,9	56,2	33,4	32,1	0,48	0	0	0	0	79	87
15,6 µM	0,5	47,5	51,5	26,1	26,0	0,36	0	0	0	0	78	89
7,8 µM	0,0	39,7	40,6	10,0	9,5	0,00	0	0	0	0	83	93

% DE CITOTOXICIDADE

% DE PROTEÇÃO



Sumário dos Resultados**1- Atividade citotóxica em células Vero**

Nº de identificação na placa	Código
1	MPD1A
2	MPD1B
3	MPD2
4	MPD3
5	MPD5
6	MPD6
7	MPD9
8	MPD14
9	MPD15
10	MPD17
11	MPD18
12	MPD19
13	MPD20
14	MPD24
15	MPD25
16	MPD26
17	MPD40A
18	MPD41

CC50	
Composto 2	≈ 127 µM
Composto 3	≈ 29 µM
Composto 4	≈ 26 µM
Composto 5	≈ 31 µM
Composto 6	≈ 48 µM
Composto 7	≈ 41 µM
Composto 8	≈ 84 µM
Composto 9	≈ 62 µM
Composto 10	≈ 68 µM
Composto 11	≈ 32 µM
Composto 12	≈ 180 µM
Composto 13	≈ 3 µM
Composto 14	≈ 36 µM
Composto 15	≈ 81 µM
Composto 16	≈ 235 µM
Composto 17	≈ 18 µM
Composto 18	≈ 75µM

O composto 1 não foi tóxico para mais que 50% da células Vero nas concentrações testadas (1.000 a 7,8µM).

2- Atividade antiviral contra DENV-2 em células Vero: Nenhum dos compostos testados apresentou atividade antiviral contra o DENV-2

EC50	
Composto 1	Não detectada
Composto 2	Não detectada
Composto 3	Não detectada
Composto 4	Não detectada
Composto 5	Não detectada
Composto 6	Não detectada
Composto 7	Não detectada
Composto 8	Não detectada
Composto 9	Não detectada
Composto 10	Não detectada
Composto 11	Não detectada
Composto 12	Não detectada
Composto 13	Não detectada
Composto 14	Não detectada
Composto 15	Não detectada
Composto 16	Não detectada
Composto 17	Não detectada
Composto 18	Não detectada

Determinação da Concentração Efetiva 50 (CE₅₀) contra DENGUE-2 e da Concentração Citotóxica 50 (CC₅₀) em células Vero CCL-81

Executado por Eliza Flores

Objetivo: Determinar a Concentração Efetiva 50 (CE₅₀) do Dengue virus 2 e da Concentração Citotóxica 50 (CC₅₀), em células Vero, de compostos enviados pelo Dr Marcelo Januário

Materiais:

Células Vero CCL-81: Células epiteliais renais extraídas de macaco verde africano sendo cultivadas por Carolina Pacca e Eliza Flores.

Vírus: DENV sorotipo 2 - A amostra do DENV-2 utilizada neste estudo foi isolada de paciente com febre do dengue do município de Ribeirão Preto – São Paulo, e desde então, foi multiplicada em cérebro de camundongo neonato e em células C6/36. Essa amostra foi cedida pela Dra. Erna Kroon do Laboratório de Vírus da UFMG.

18 compostos pelo Dr. Marcelo Augusto Pereira Januário – NuBBE/Instituto de Química/Unesp.

Os compostos foram dissolvidos de modo que a solução estoque tivesse a concentração de 100 mM (milimolar).

NuBBE/Instituto de Química/UNESP Araraquara	Molecular Weight (g/mol)	Mass (mg)	Mass (g)	Volume (L) DMSO (100mM)	Volume (µL) DMSO (100mM)	Nº de identificação na placa	Código
MPD1A	516,21	1,03	0,00103	1,99531E-05	20,0	1	MPD1A
MPD1B	172,1	8,15	0,00815	0,000473562	473,6	2	MPD1B
MPD2	262,14	5,14	0,00514	0,000196078	196,1	3	MPD2
MPD3	272,15	5,79	0,00579	0,00021275	212,8	4	MPD3
MPD5	254,17	5,85	0,00585	0,000222292	222,3	5	MPD5
MPD6	248,13	5,34	0,00534	0,00021521	215,2	6	MPD6
MPD9	266,12	3,8	0,0038	0,000142793	142,8	7	MPD9
MPD14	269,15	6,26	0,00626	0,000232564	232,6	8	MPD14
MPD15	418,2	8,89	0,00889	0,000207795	207,8	9	MPD15
MPD17	384,21	5,42	0,00542	0,000141069	141,1	10	MPD17
MPD18	276,12	5,46	0,00546	0,00019774	197,7	11	MPD18
MPD19	308,12	5,07	0,00507	0,000164546	164,5	12	MPD19
MPD20	305,15	8,98	0,00898	0,000294282	294,3	13	MPD20
MPD24	250,13	5,41	0,00541	0,000216288	216,3	14	MPD24
MPD25	339,15	5,05	0,00505	0,000148902	148,9	15	MPD25
MPD26	330,34	9,26	0,00926	0,000290317	290,3	16	MPD26
MPD40A	563,17	4,05	0,00405	7,19143E-05	71,9	17	MPD40A
MPD41	563,17	5	0,005	8,87831E-05	88,8	18	MPD41

Para facilitar, os compostos foram identificados como 1 a 18 como mostrado acima

ESTRATÉGIA DO EXPERIMENTO

Dia 1 – A- Plaqueamento de células Vero em placas de 96 poços

Incubação por 24 horas



Dia 2 – B- Ensaio de citotoxicidade em células Vero: Tratamento com diferentes concentrações dos compostos



Incubação por 7 dias

Dia 2- C- Ensaio antiviral em células Vero: Adição simultânea de DENV-2 e de diferentes concentrações dos compostos



Incubação por 7 dias

Dia final – D- Observação do efeito citopático viral e toxicidade dos compostos (ao microscópio óptico (métodos de cruzes) *)

(-) monocamada mais íntegra (sem efeito citopático); (+) monocamadas com ECP até 25%; (++) monocamadas com ECP entre 26-50%; (+++) monocamadas com ECP entre 51-75 % e (++++) monocamadas com ECP de 76-100 %.
--

E- Ensaio de MTT para determinação da viabilidade celular

Legendas:

CC= controle de células

CV= controle de 'vírus

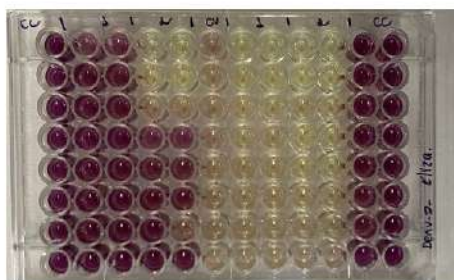
DO= Densidade óptica

Resultados COMPOSTOS 1 e 2

Valores brutos: Leitura DO 540												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					Média CC	Média CV
	CC	1	2	CV		1	2	CC				
1000 µM	1.1157	0.4796	0.5069	0.0907	0.0999	0.2475	0.0999	0.0866	0.0835	0.0819	0.9774	1.0291
500 µM	0.0603	0.7827	0.7088	0.1020	0.1000	0.2011	0.1303	0.1112	0.0712	0.0688	0.8162	0.9767
250 µM	0.9704	0.7472	0.7085	0.1758	0.1909	0.1965	0.1267	0.1295	0.1348	0.1059	0.8060	0.9237
125 µM	0.9530	0.7384	0.7535	0.4988	0.5025	0.1830	0.1184	0.1523	0.0923	0.0977	0.8142	0.9422
62,5 µM	0.9649	0.7405	0.7306	0.6084	0.5935	0.1773	0.1631	0.1474	0.1008	0.1025	0.8008	0.9293
31,3 µM	0.0661	0.7978	0.7469	0.7022	0.6706	0.1891	0.1836	0.1562	0.1250	0.1204	0.6713	0.9218
15,6 µM	0.9642	0.8480	0.7917	0.7698	0.2627	0.1875	0.1713	0.1496	0.1454	0.1265	0.6583	0.9296
7,8 µM	1.1092	0.9840	0.9778	0.8537	0.8457	0.1653	0.1653	0.1612	0.1485	0.1548	0.8710	1.1235
Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade (Célula + composto) Valores utilizados para ensaio antitumoral (Célula + vírus + composto)												
Concentrações	Nº de identificação do composto					Nº de identificação do composto					Média CC	Média CV
	CC	1	2	CV		1	2	CC				
1000 µM	0,0	52,2	43,5	91,0	90,0	0,68	0	0	0	0	97	100
500 µM	4,3	22,0	29,3	89,8	90,0	0,95	0	0	0	0	77	97
250 µM	3,2	25,5	20,4	82,5	81,0	0,38	0	0	0	0	76	90
125 µM	5,0	26,4	24,9	50,3	49,9	0,00	0	0	0	0	77	92
62,5 µM	3,8	26,2	27,2	39,3	40,8	0,00	0	0	0	0	75	91
31,3 µM	3,7	20,5	25,5	30,0	32,2	0,00	0	0	0	0	59	90
15,6 µM	1,9	15,5	21,1	23,2	73,8	0,00	0	0	0	0	57	91
7,8 µM	0,0	1,9	2,5	10,9	15,7	0,00	0	0	0	0	84	100
% DE CITOTOXICIDADE % DE PROTEÇÃO												

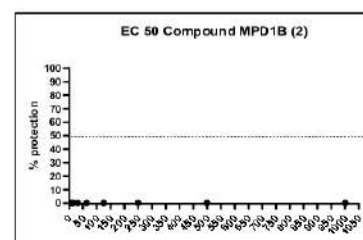
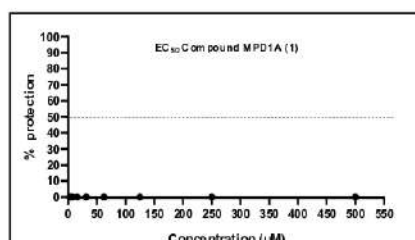
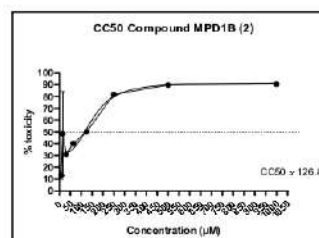
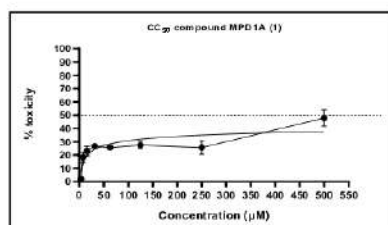
Concentrações

1000 µM
500 µM
250 µM
125 µM
62,5 µM
31,3 µM
15,6 µM
7,8 µM



Composto: vírus - Maranguara

	1	2	CV	1	2	CC
A	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+



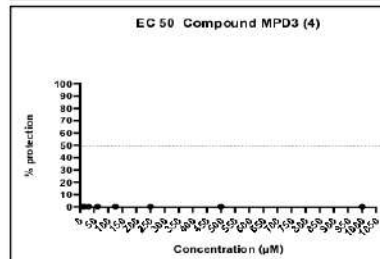
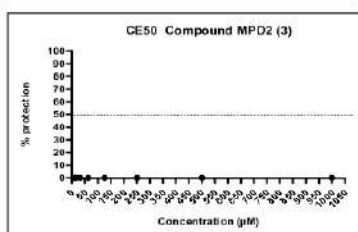
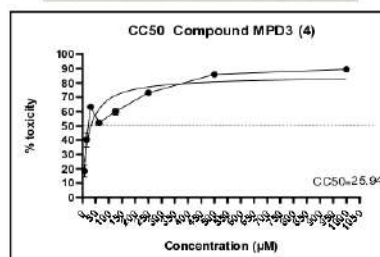
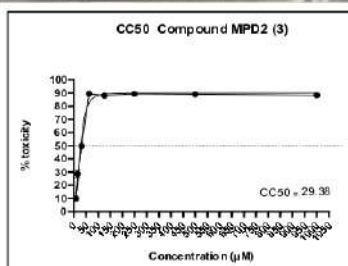
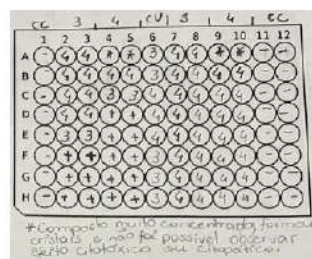
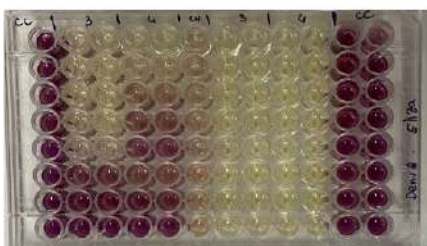
COMPOSTOS 3 e 4:

VALORES BRUTOS (D.O 540)												
Concentrações	Nº de identificação do composto				Nº de identificação do composto				CC	CV		
	3	4	CV	3	4	CC						
1000 µM	1,1168	0,1152	0,1141	0,1032	0,0997	0,1488	0,1087	0,1055	0,1006	0,0921	0,8717	0,4684
500 µM	0,9643	0,1063	0,1094	0,1404	0,1368	0,1718	0,0381	0,0954	0,0946	0,0904	0,8436	0,0288
250 µM	0,9144	0,1036	0,1053	0,2745	0,2519	0,1586	0,1008	0,0873	0,0861	0,0810	0,7836	0,9102
125 µM	0,9112	0,1289	0,1060	0,4081	0,3773	0,1812	0,0876	0,1137	0,0852	0,0818	0,7695	0,9044
62,5 µM	0,9817	0,1056	0,1002	0,4612	0,4753	0,1519	0,0832	0,0752	0,0859	0,0817	0,8302	0,9629
31,3 µM	0,9262	0,4960	0,4845	0,3683	0,3521	0,1724	0,0927	0,1010	0,0888	0,0886	0,7512	0,9330
15,6 µM	0,9513	0,7180	0,6808	0,5198	0,5800	0,1675	0,1161	0,1270	0,0906	0,0903	0,8272	0,9583
7,8 µM	1,0732	0,8887	0,8967	0,8254	0,7678	0,1206	0,1112	0,1214	0,1276	0,1188	0,8974	1,0126
Valores utilizados para ensaio de citotoxicidade (Célula + composto)				Valores utilizados para ensaio antiviral (Célula + vírus + composto)								

VALORES EM PERCENTUAL (%)												
Concentrações	Nº de identificação do composto				Nº de identificação do composto							
	CC	3	4	CV	3	4	CC	3	4	CV		
1000 µM	0,0	89,2	88,4	89,2	89,8	0,00	0	0	0	0	87	4,0
500 µM	1,6	89,2	88,5	85,7	86,0	1,05	0	0	0	0	83	9,4
250 µM	6,7	89,5	89,3	72,0	74,3	0,00	0	0	0	0	76	9,1
125 µM	7,0	86,8	89,2	58,4	61,5	0,00	0	0	0	0	74	9,1
62,5 µM	0,0	89,2	89,8	52,9	51,2	0,00	0	0	0	0	82	9,8
31,3 µM	5,5	49,2	50,8	62,6	64,1	1,15	0	0	0	0	72	9,4
15,6 µM	2,9	26,7	30,5	36,7	43,9	0,55	0	0	0	0	81	9,1
7,8 µM	0,0	9,2	10,5	15,7	21,6	0,93	0	0	0	0	90	10,0

Concentrações

1000 µM
500 µM
250 µM
125 µM
62,5 µM
31,3 µM
15,6 µM
7,8 µM



7.2. Resultados do ensaio anti-ZIKA

Métodos

Ensaaios enzimáticos com ZIKA NS2B-NS3pro

A atividade do ZIKV NS2B-NS3pro foi medida monitorando o sinal de fluorescência resultante da clivagem do substrato fluorogênico Bz-Nle-Lys-Lys-Arg-AMC. A intensidade da fluorescência (Excitação λ : 340 nm; emissão λ : 440 nm) foi monitorada por pelo menos 10 min (Bioteck Synergy 2). Todos os ensaios foram realizados em tampão contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,005% Tween20 e 5% glicerol. A concentração final de proteína foi de 2 nM e a concentração do substrato foi de 35 μ M (K_m = 16 μ M). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes. Os valores relatados referem-se à média e ao desvio padrão. Para a triagem inicial, todos os compostos foram testados com a concentração de 100 μ M.

Resultados

Na triagem inicial, todos os compostos foram testados na concentração de 100 μ M. Os compostos não inibiram o ZIKV NS2B-NS3pro, com porcentagens de inibição iguais ou inferiores a 14%. Portanto, nenhum experimento adicional foi conduzido.

Tabela 1. Determinação da triagem inicial contra ZIKV NS2B-NS3pro	
Código do composto	% de inibição da enzima NS2B-NS2pro do Vírus da Zika a 100 μM
MPD1A	14 $\pm$ 6
MPD2	3 $\pm$ 4
MPD3	3 $\pm$ 5
MPD5	3 $\pm$ 5
MPD6	1 $\pm$ 1
MPD9	0
MPD10	1 $\pm$ 2
MPD14	5 $\pm$ 5
MPD15	0 $\pm$ 1
MPD20	1 $\pm$ 2
MPD25	2 $\pm$ 2
MPD26	1 $\pm$ 2

7.3. Espectros de RMN

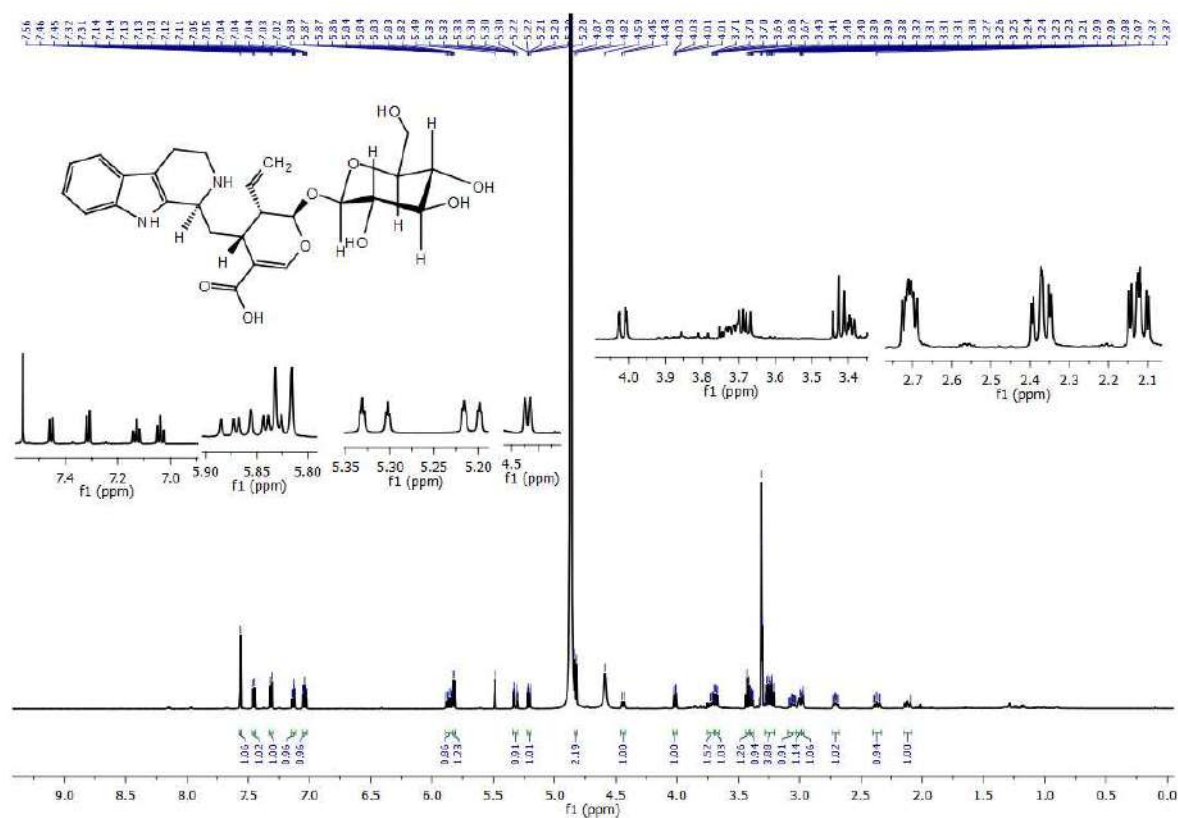


Figura A. 1. RMN ¹H do composto 1 em MeOD-*d*₄, a 600 MHz.

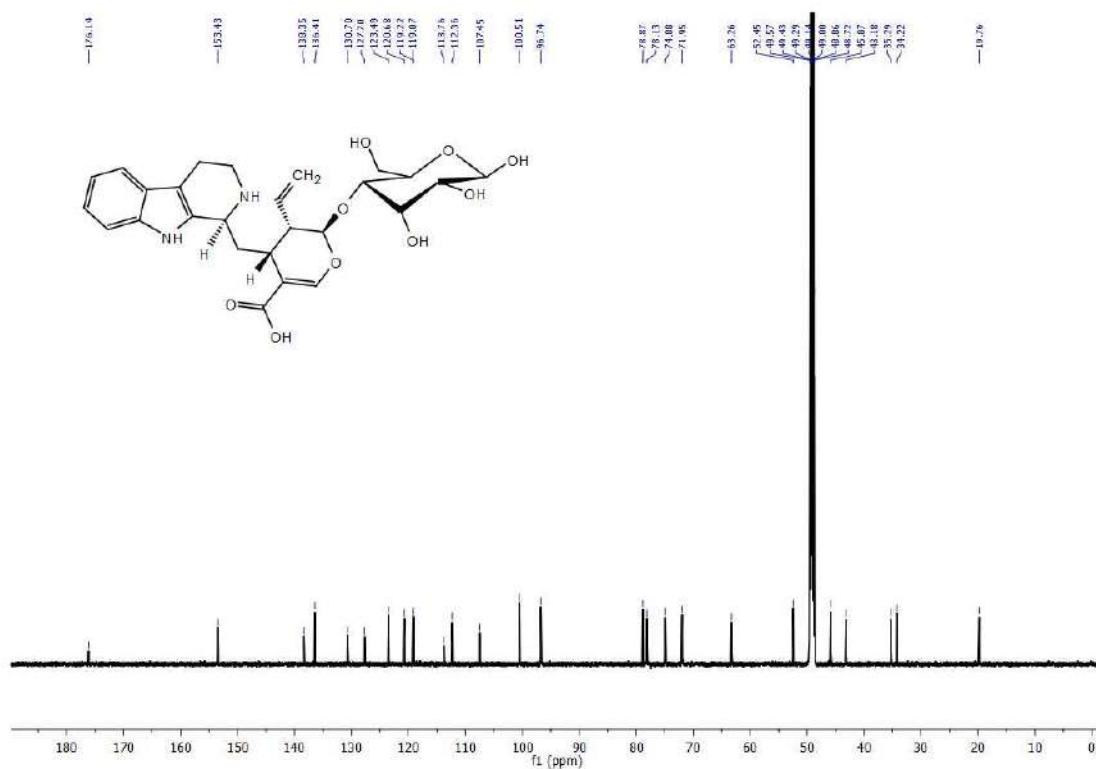


Figura A. 2. RMN ¹³C de do composto 1 em MeOD-*d*₄, a 151 MHz.

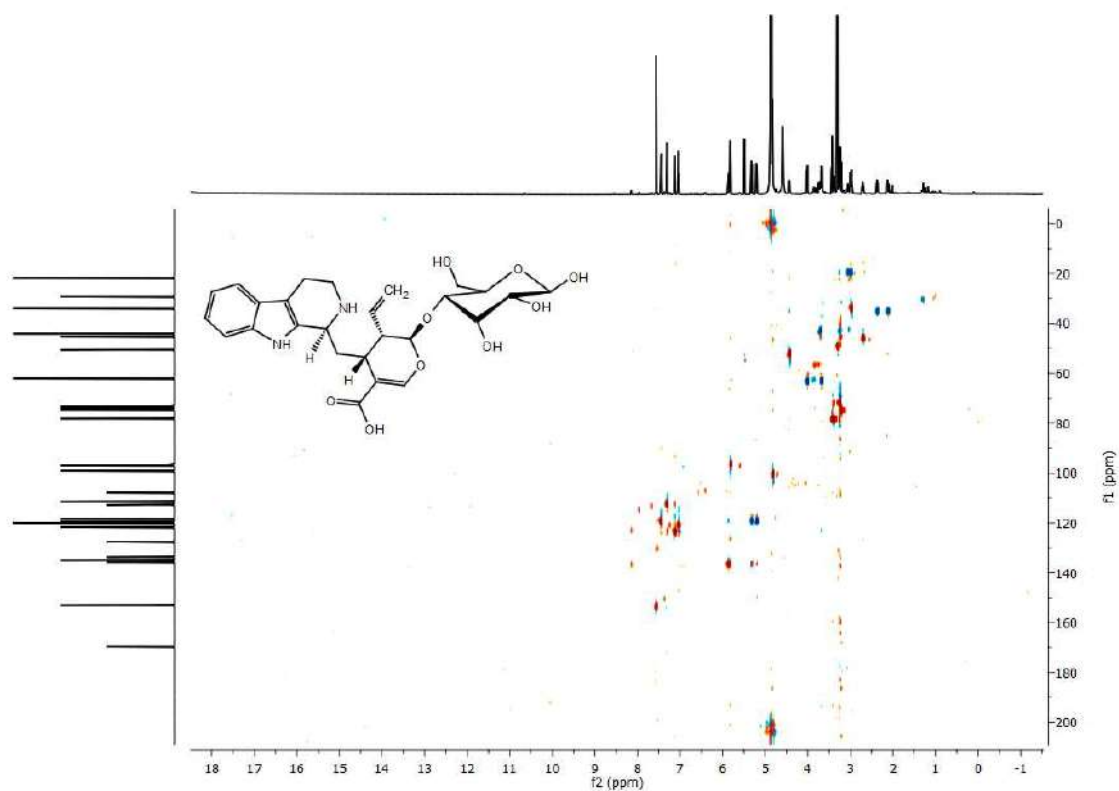


Figura A. 3. Mapa de contornos de HSQC (H^1 , 600 MHz, ^{13}C 151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) para o composto **1** (AE).

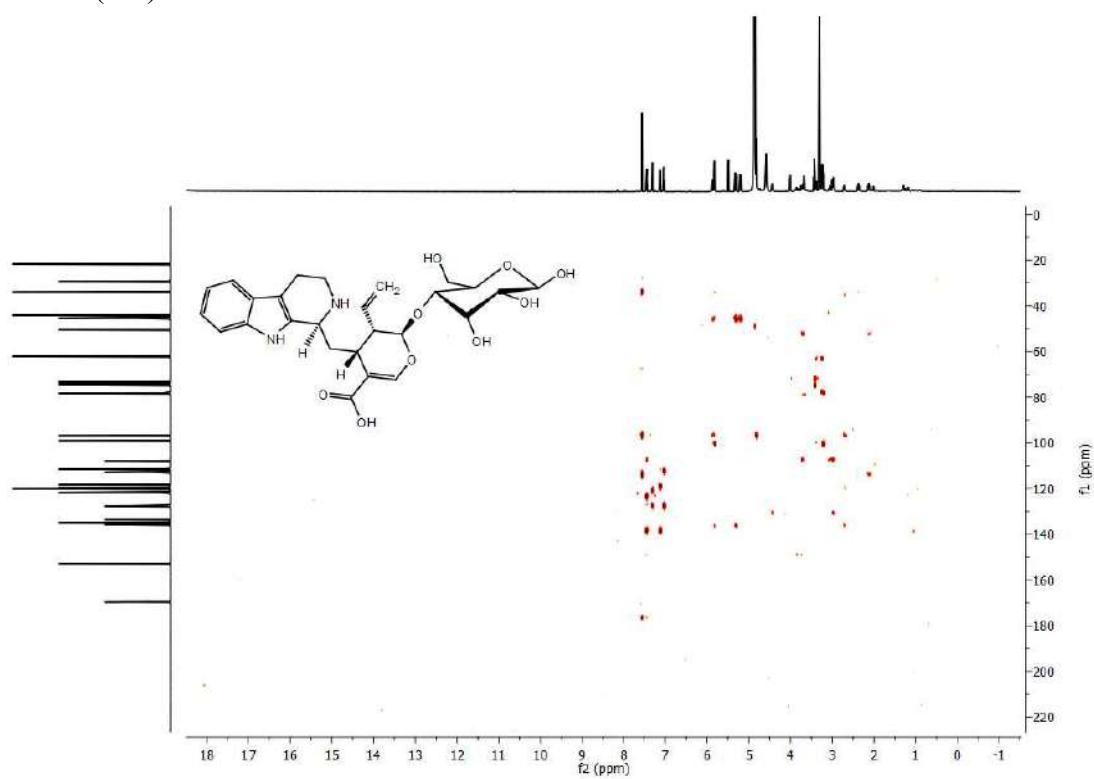


Figura A. 4. Mapa de contornos de HMQC (H^1 , 600 MHz, ^{13}C 151 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) para o composto **1** (AE).

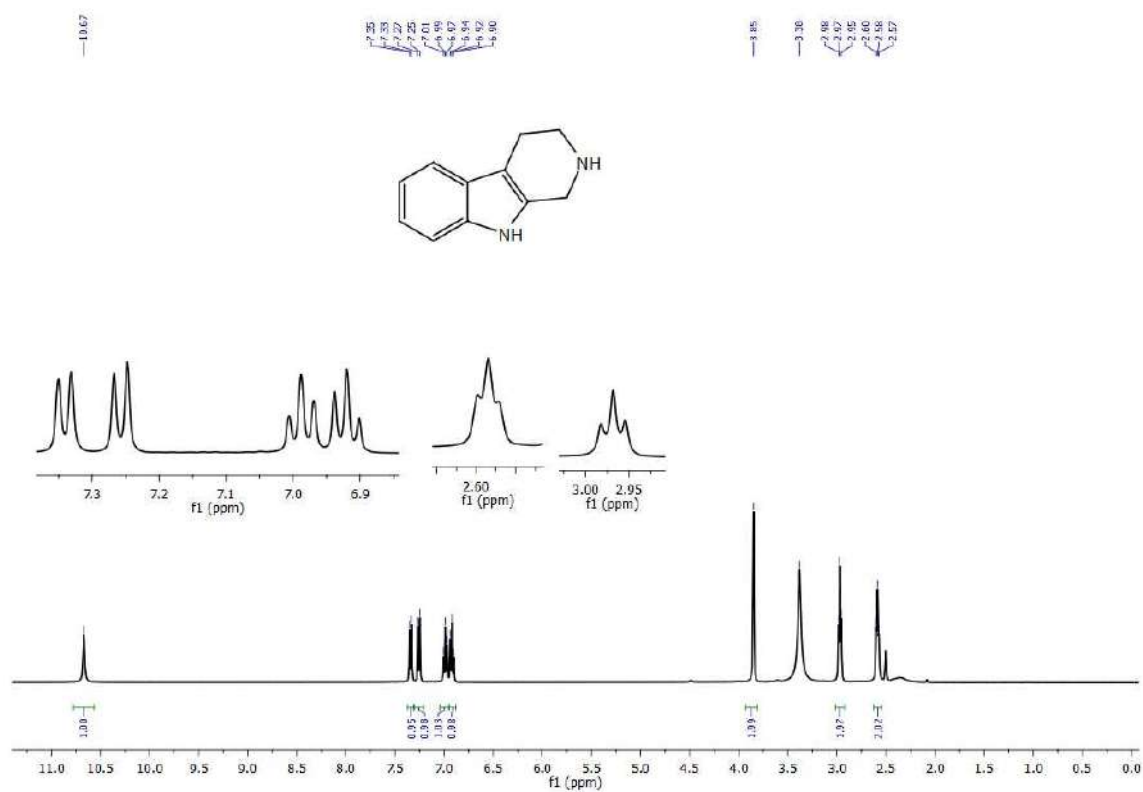


Figura A. 5. RMN ^1H do composto **6** em CDCl_3 , a 400 MHz.

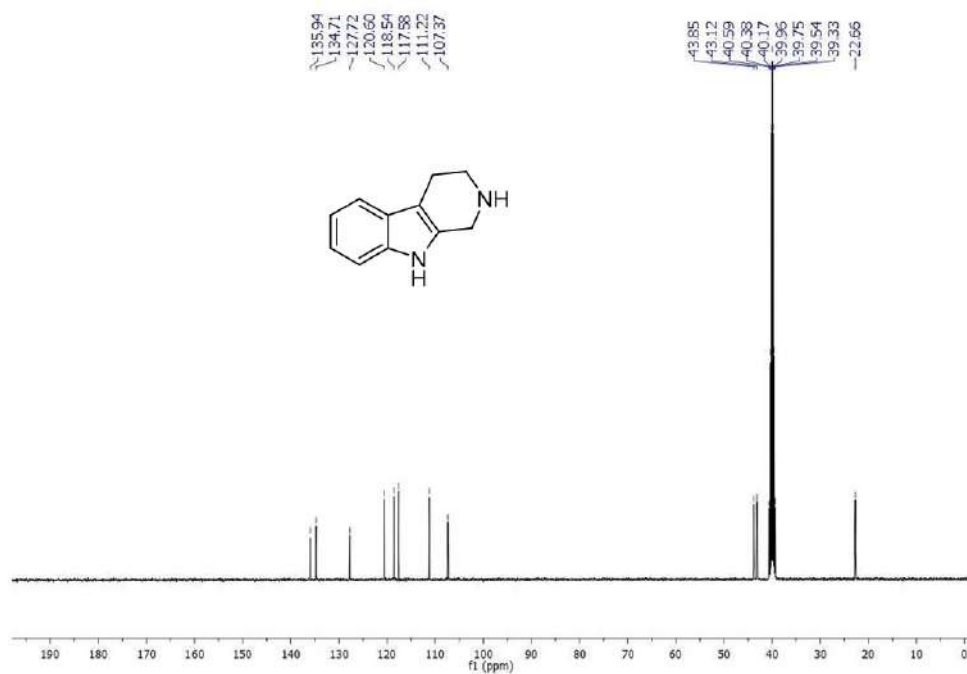


Figura A. 6. RMN ^{13}C do composto **6** em CDCl_3 , a 100 MHz.

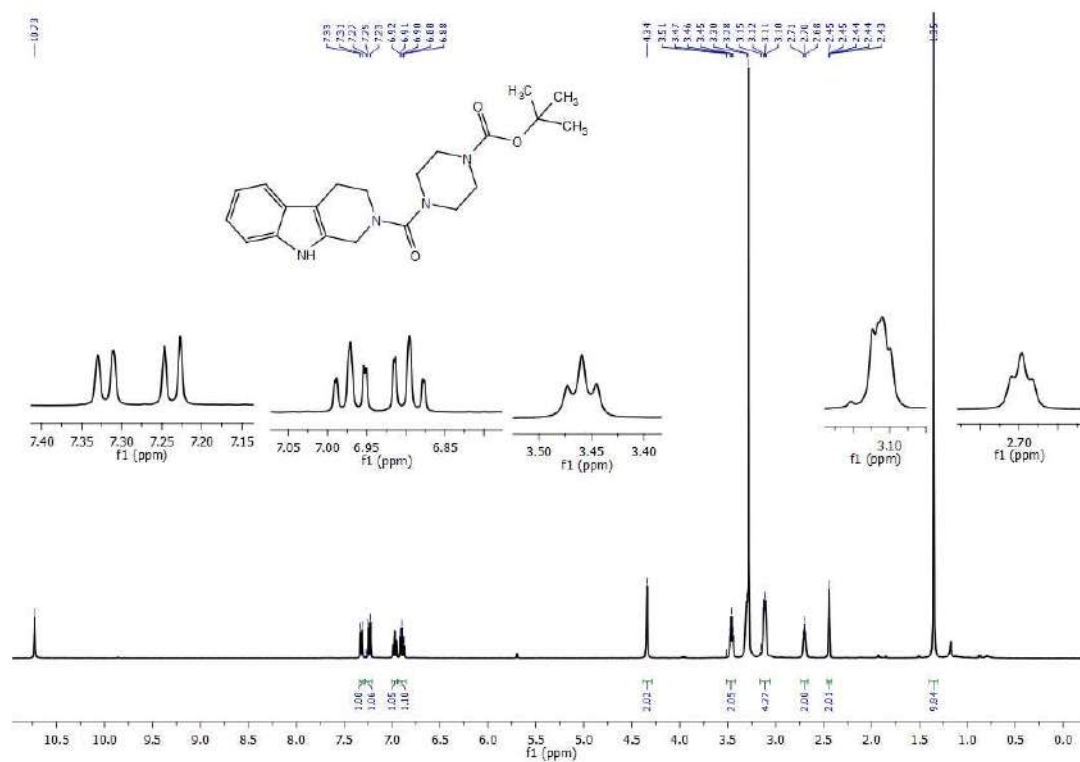


Figura A. 7. RMN ¹H do composto **20a** em DMSO-*d*₆, a 400 MHz.

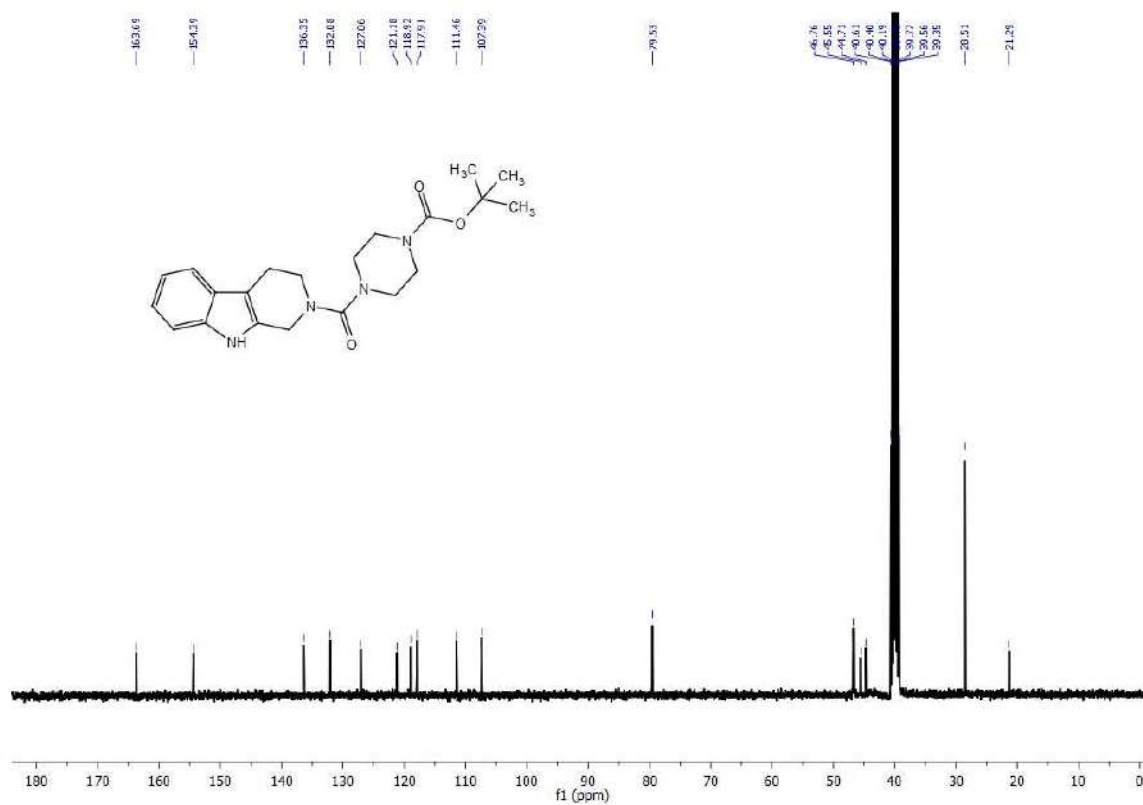


Figura A. 8. RMN ¹³C do composto **20a** em DMSO-*d*₆, a 100 MHz.

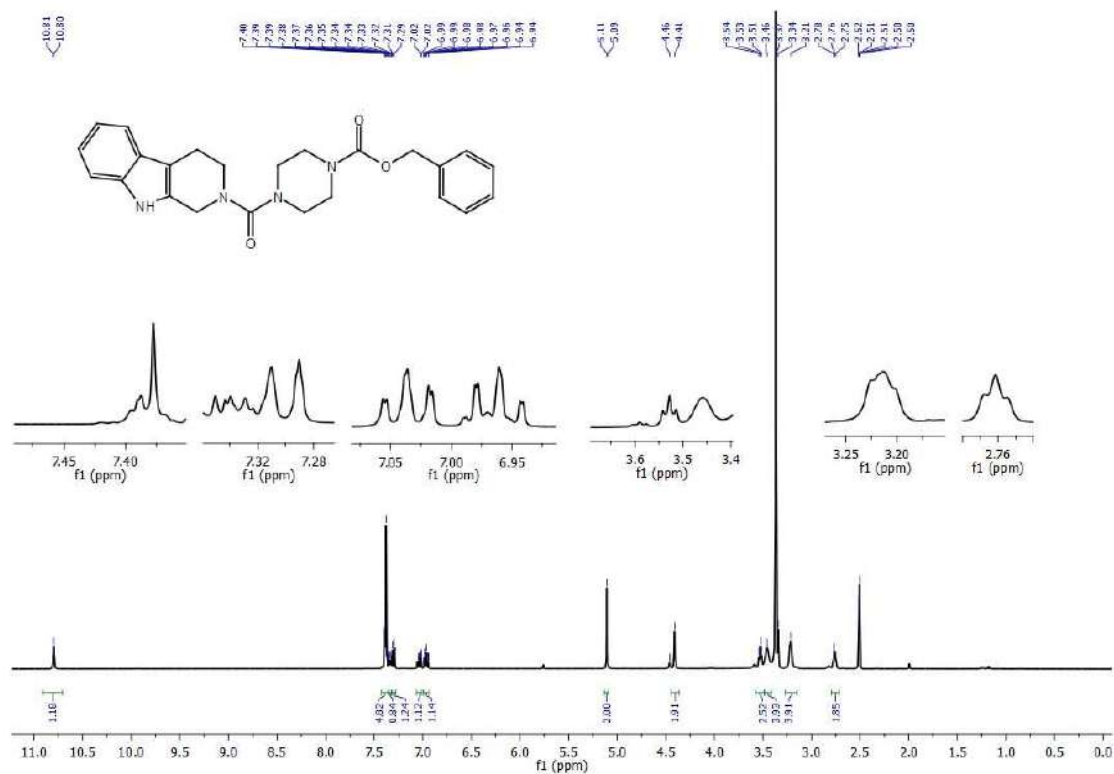


Figura A. 9. RMN ¹H do composto **20b** em DMSO-*d*₆, a 400 MHz.

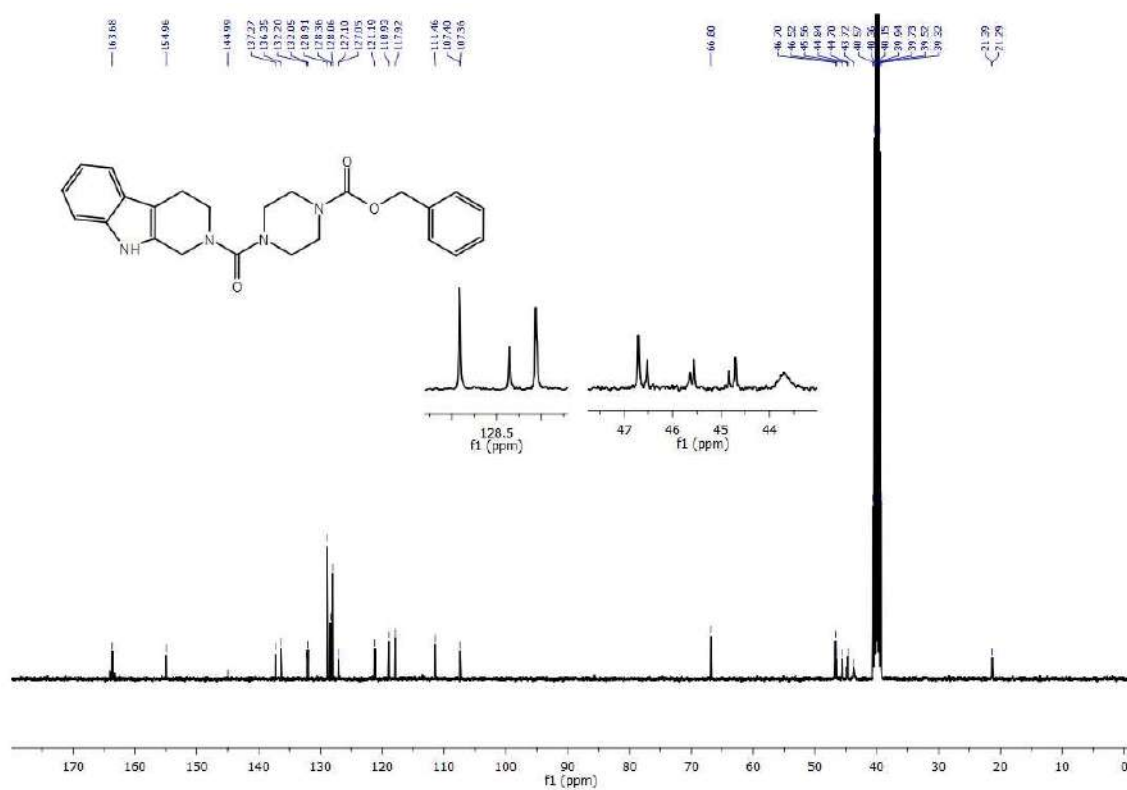


Figura A. 10. RMN ¹³C do composto **20b** em DMSO-*d*₆, a 100 MHz.

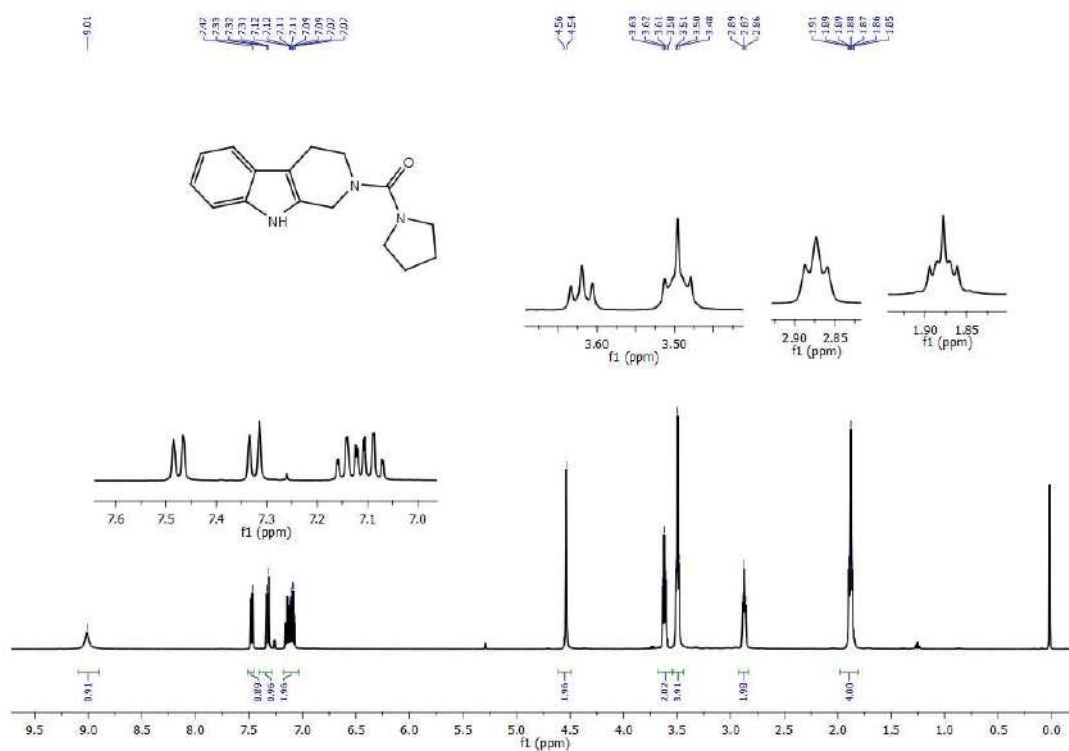


Figura A. 11. RMN ¹H do composto **20c** em CDCl₃, a 400 MHz.

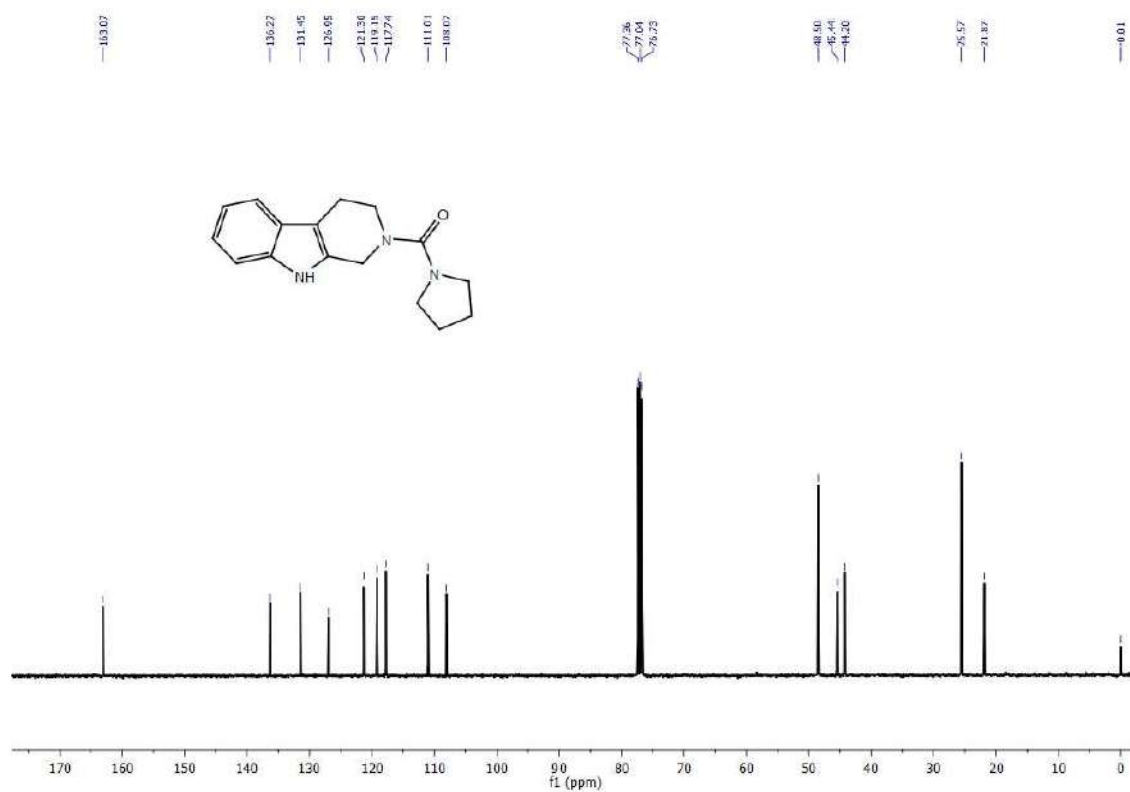


Figura A. 12. RMN ¹³C do composto **20c** em CDCl₃, a 100 MHz.

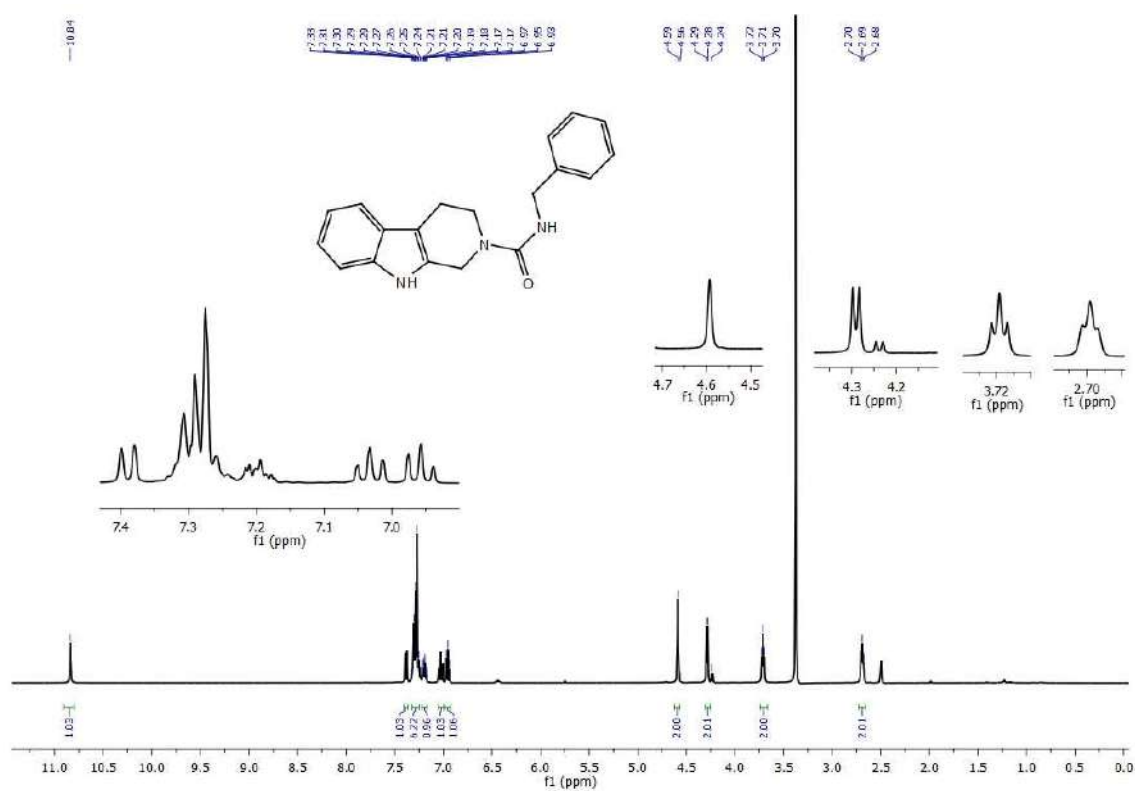


Figura A. 13. RMN ^1H do composto **20d** em $\text{DMSO}-d_6$, a 400 MHz.

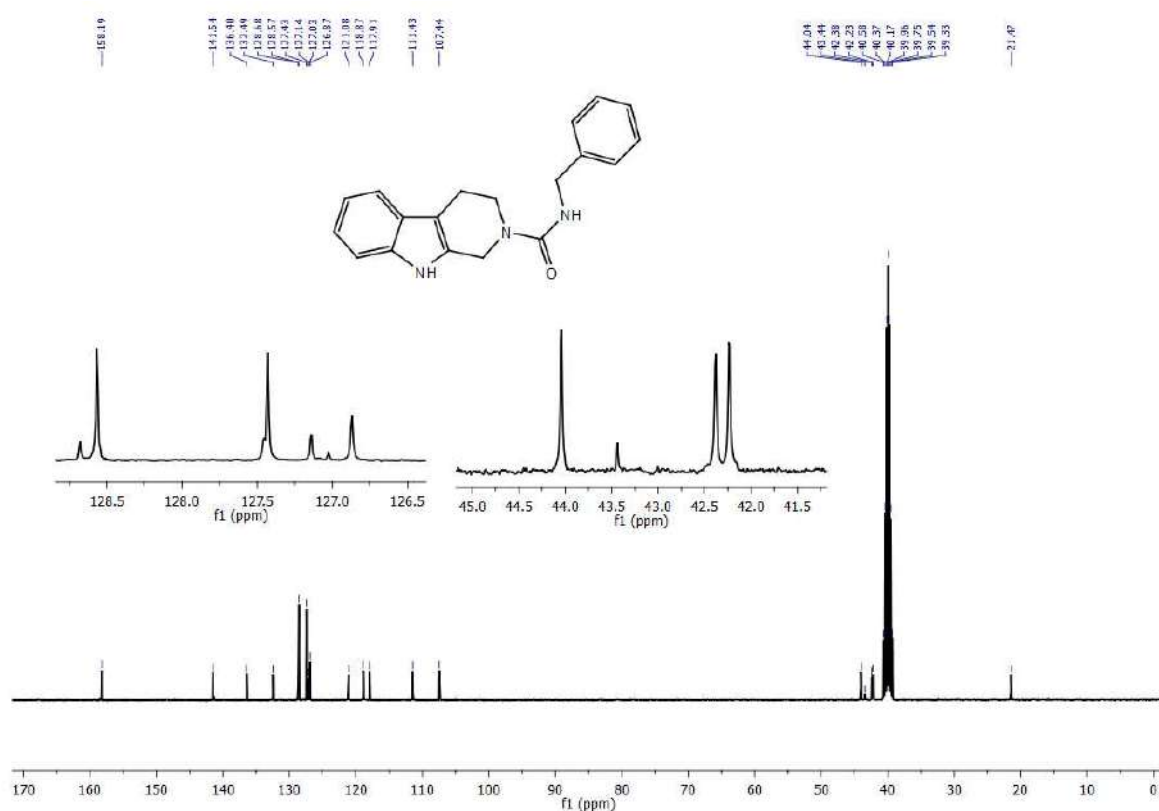
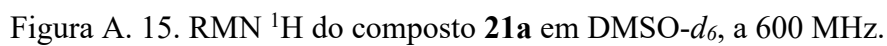


Figura A. 14. RMN ^{13}C do composto **20d** em $\text{DMSO}-d_6$, a 100 MHz.



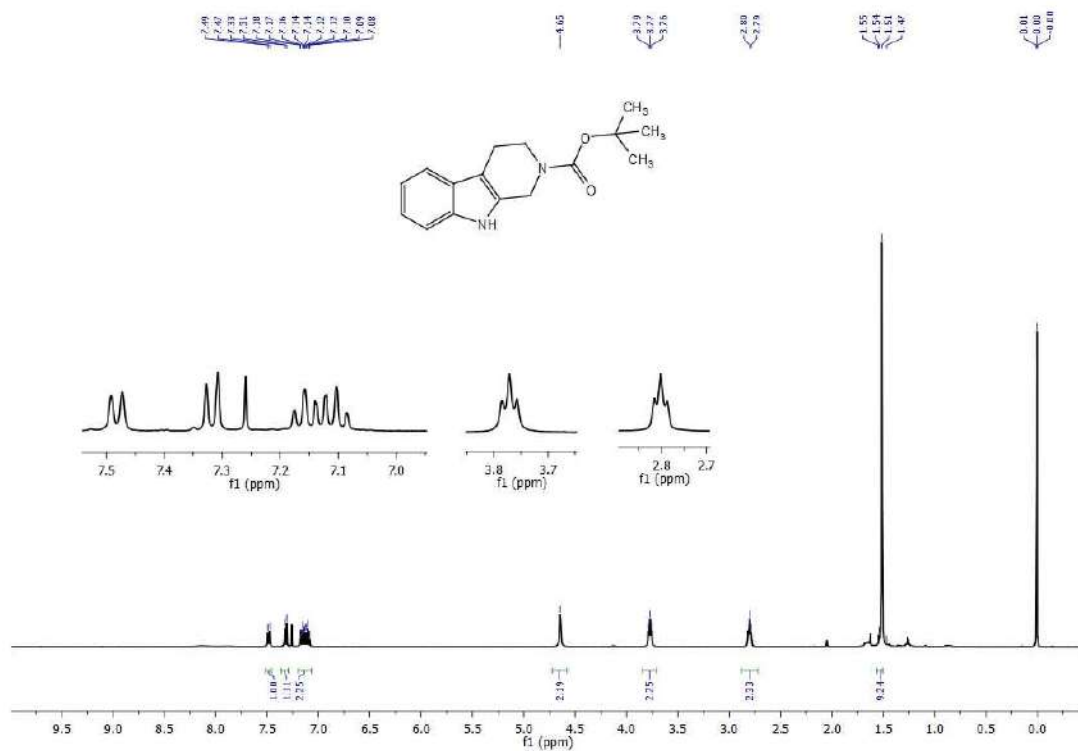


Figura A. 19. RMN ¹H do composto **25a** em CDCl₃, a 400 MHz.

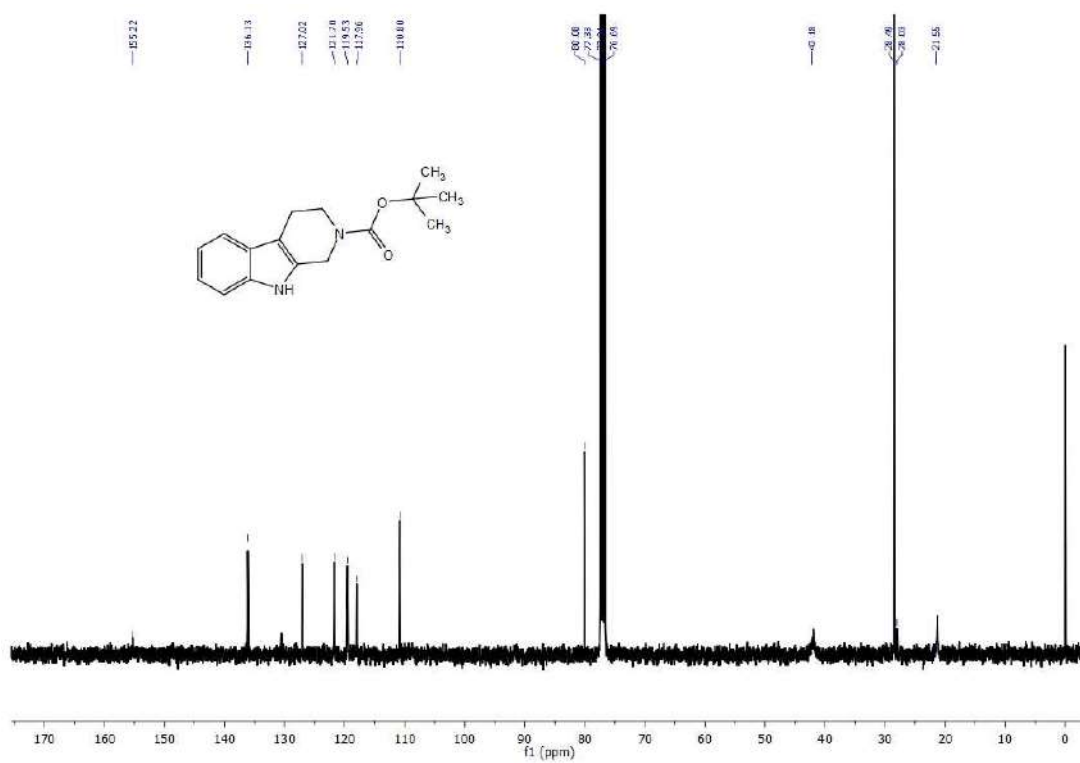


Figura A. 20. RMN ¹³C do composto **25a** em CDCl₃, a 100 MHz.

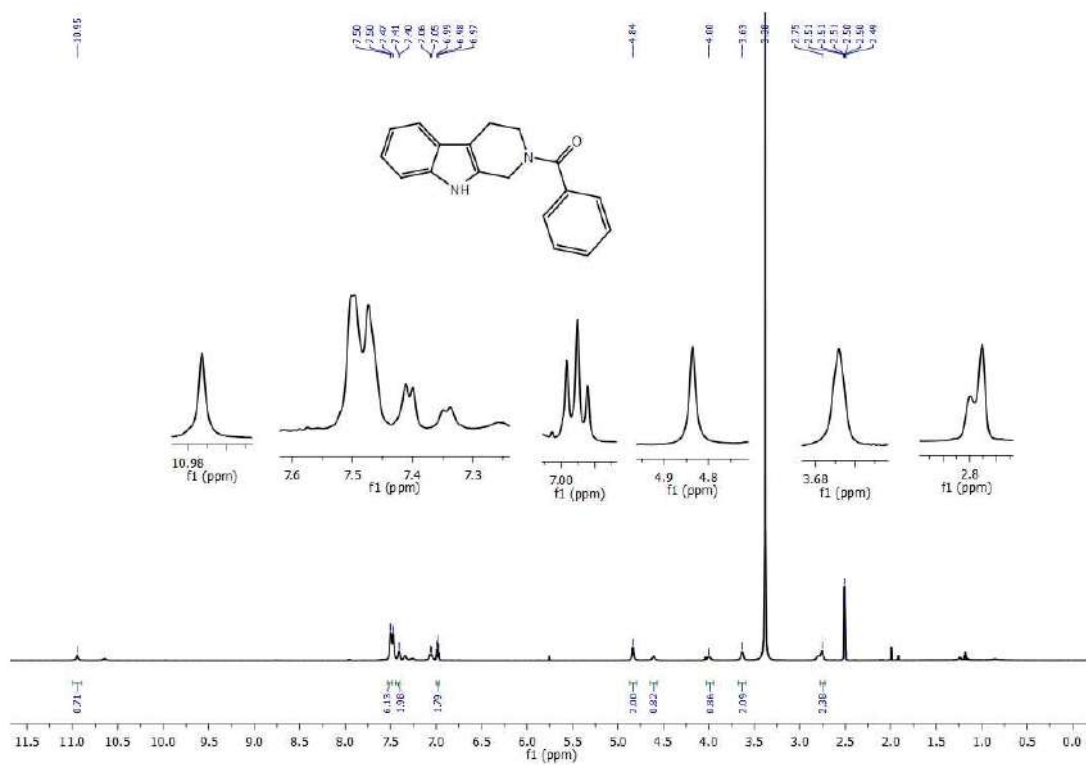


Figura A. 21. RMN ¹H do composto **25b** em DMSO-*d*₆, a 600 MHz.

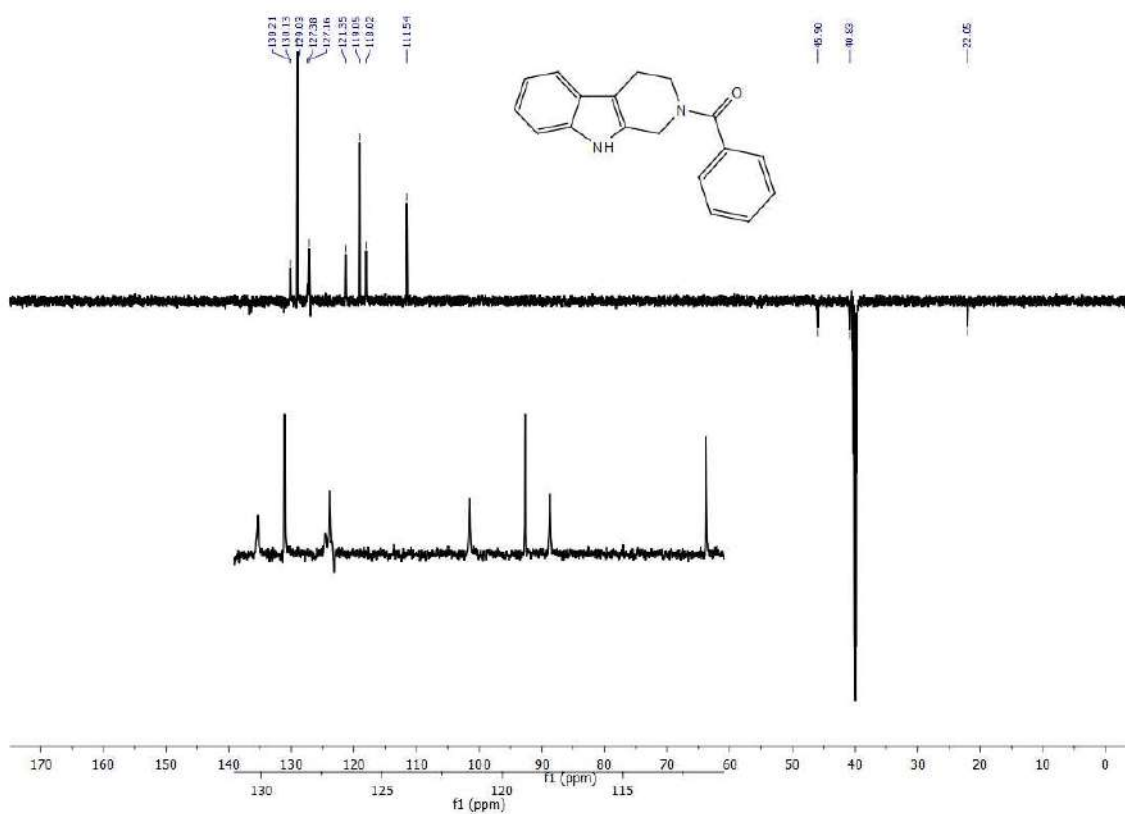


Figura A. 22. RMN ¹³C do composto **25b** em DMSO-*d*₆, a 600 MHz.

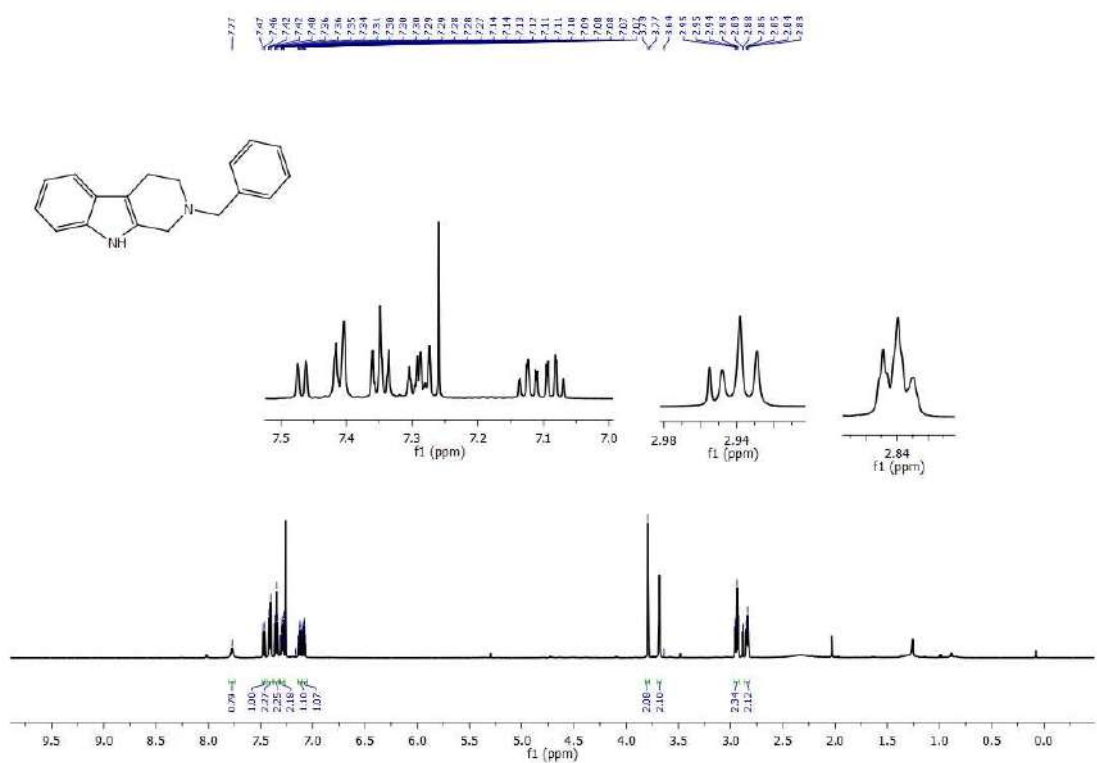


Figura A. 23. RMN ¹H do composto **25c** em CDCl₃, a 600 MHz.

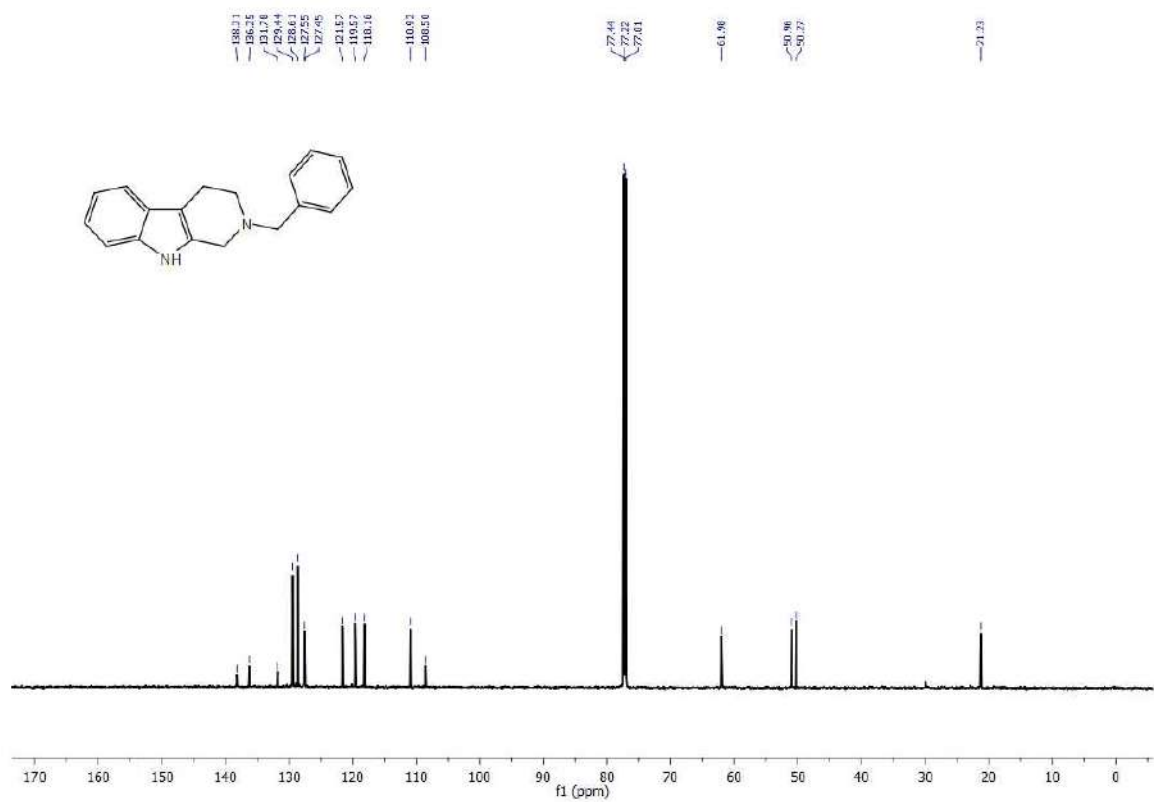


Figura A. 24. RMN ¹³C do composto **25c** em CDCl₃, a 151 MHz.

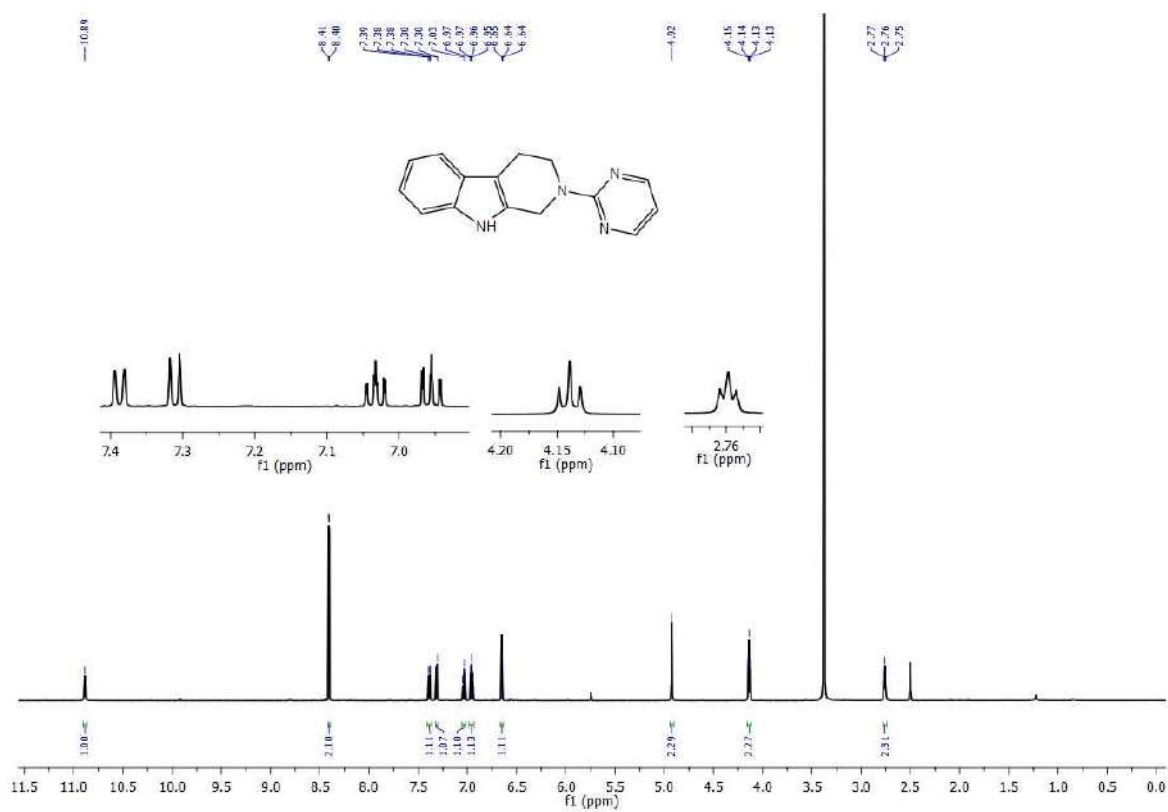


Figura A. 25. RMN ¹H do composto **25d** em DMSO-*d*₆, a 600 MHz.

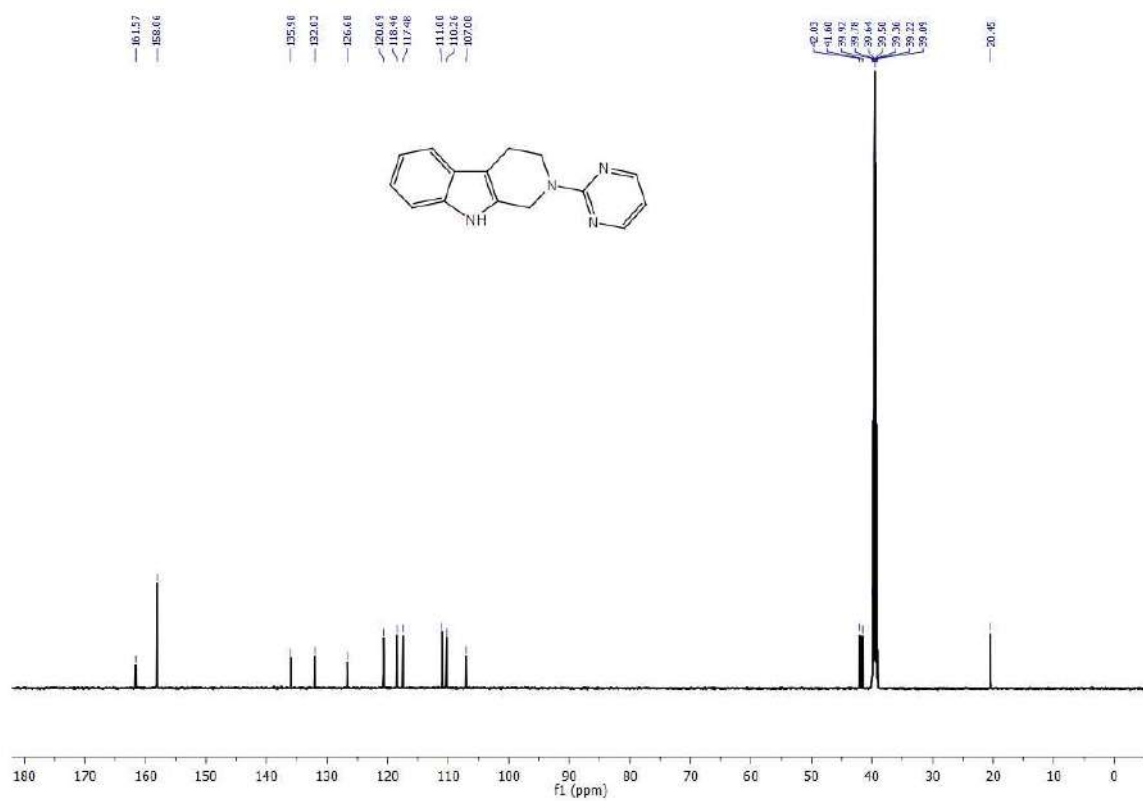


Figura A. 26. RMN ¹³C do composto **25d** em DMSO-*d*₆, a 151 MHz.

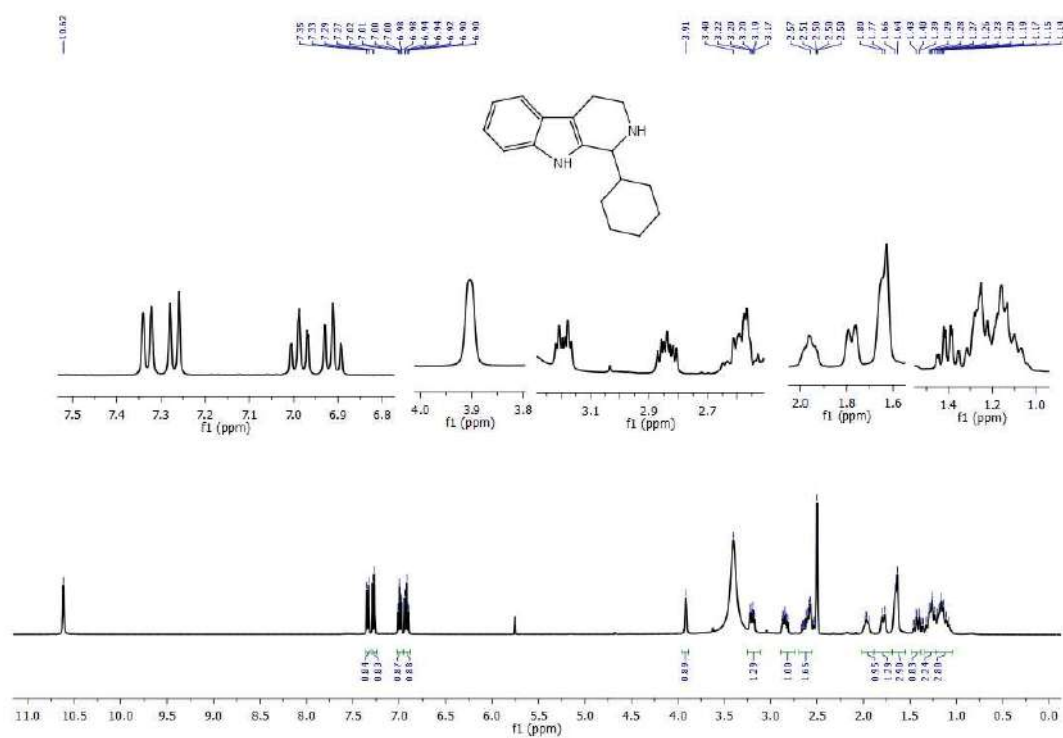


Figura A. 27. RMN ¹H do composto **28a** em DMSO-*d*₆, a 400 MHz.

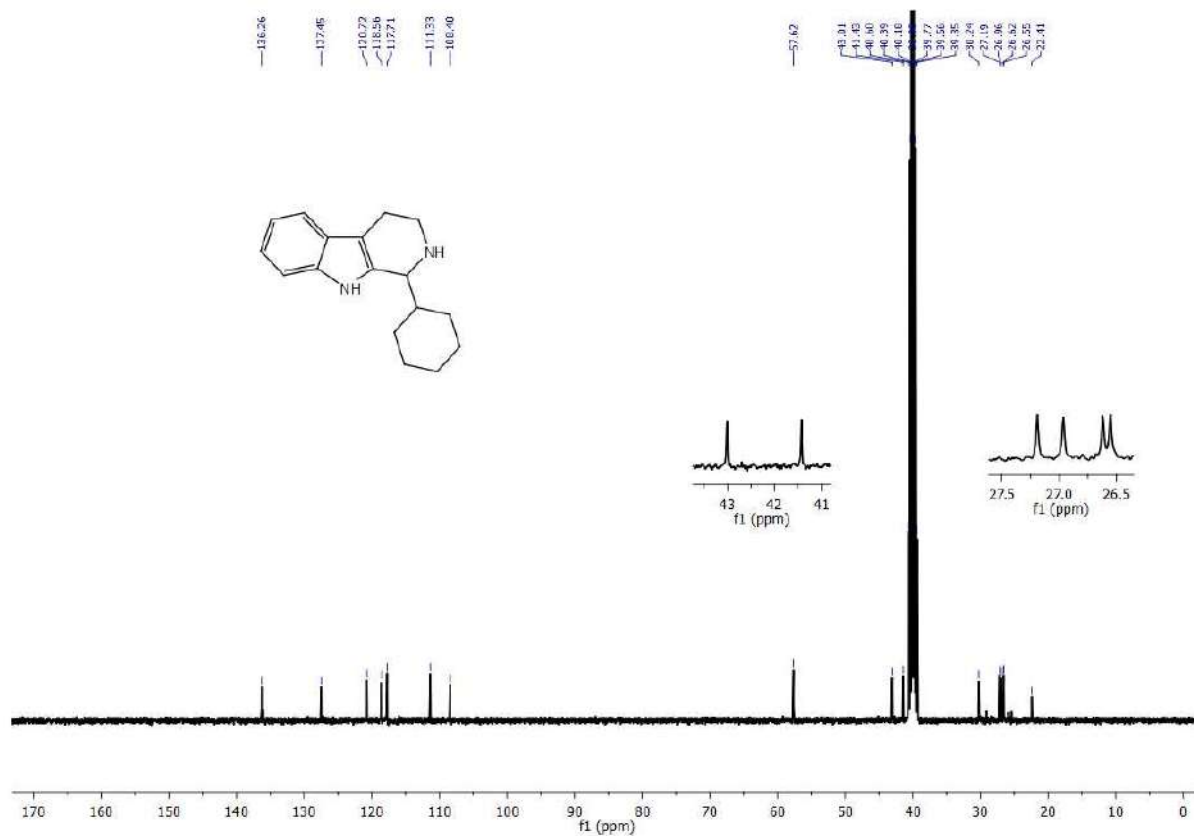


Figura A. 28. RMN ¹³C do composto **28a** em DMSO-*d*₆, a 100 MHz.

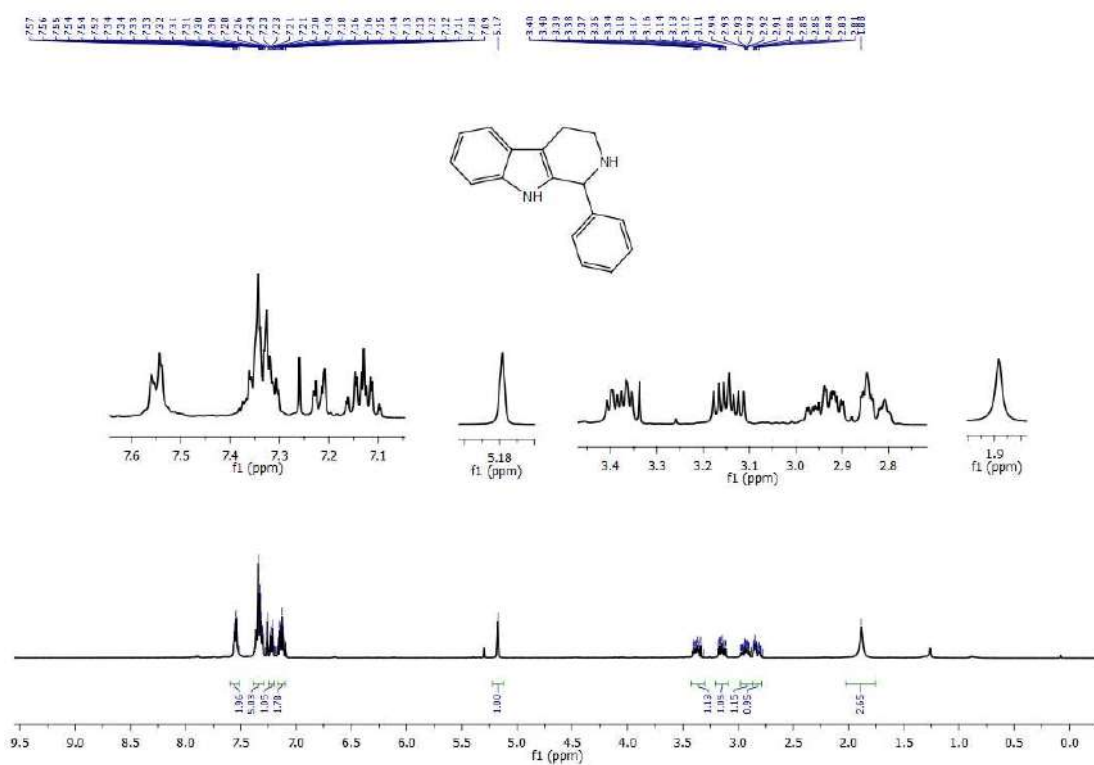


Figura A. 29. RMN ¹H do composto **28b** em DMSO-*d*₆, a 400 MHz.

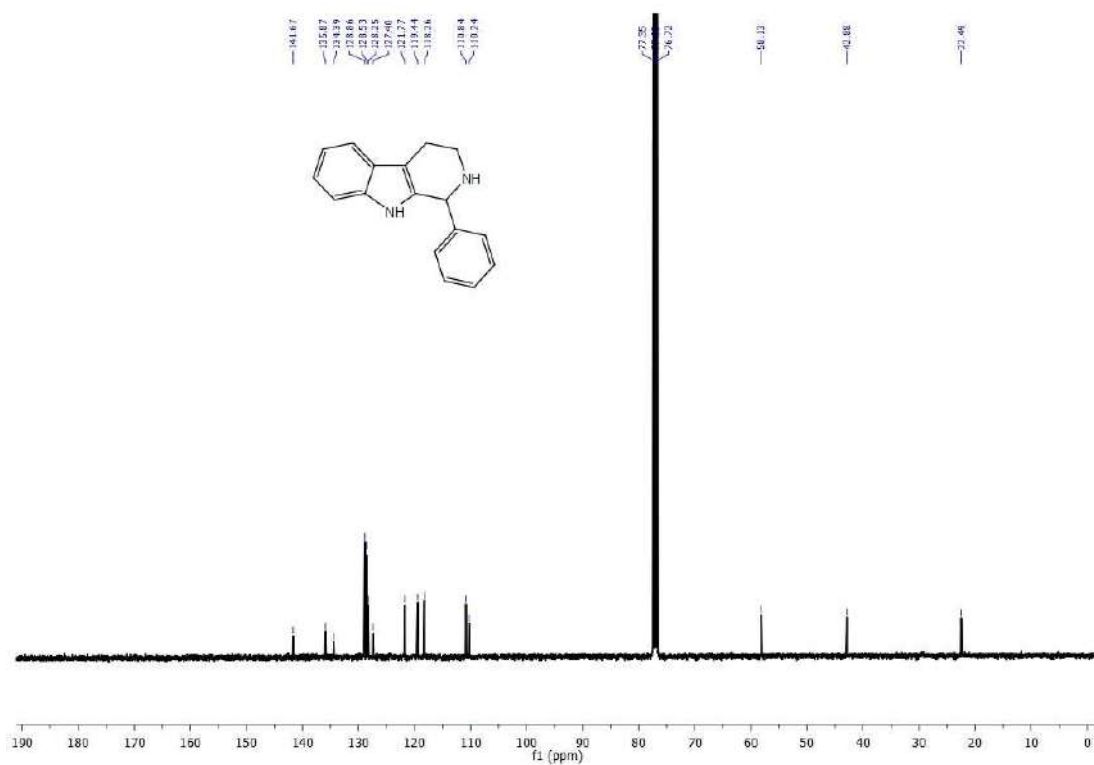


Figura A. 30. RMN ¹³C do composto **28b** em DMSO-*d*₆, a 100 MHz.

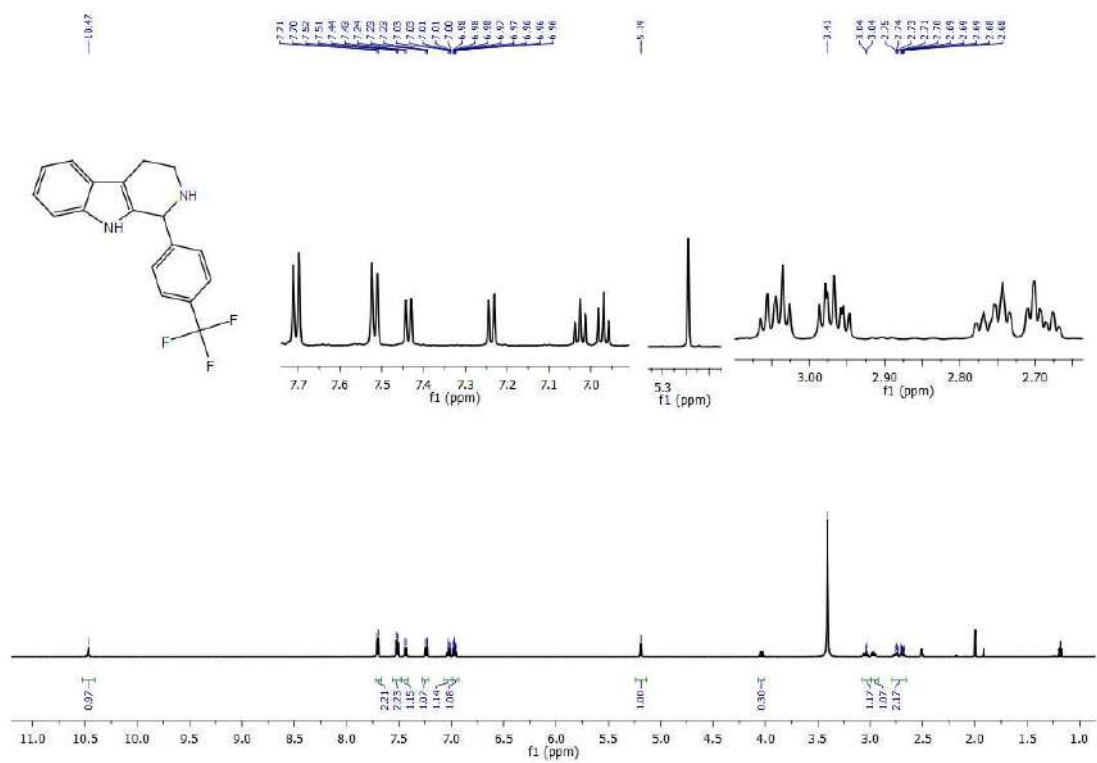


Figura A. 33. RMN ¹H do composto **28d** em DMSO-*d*₆, a 400 MHz.

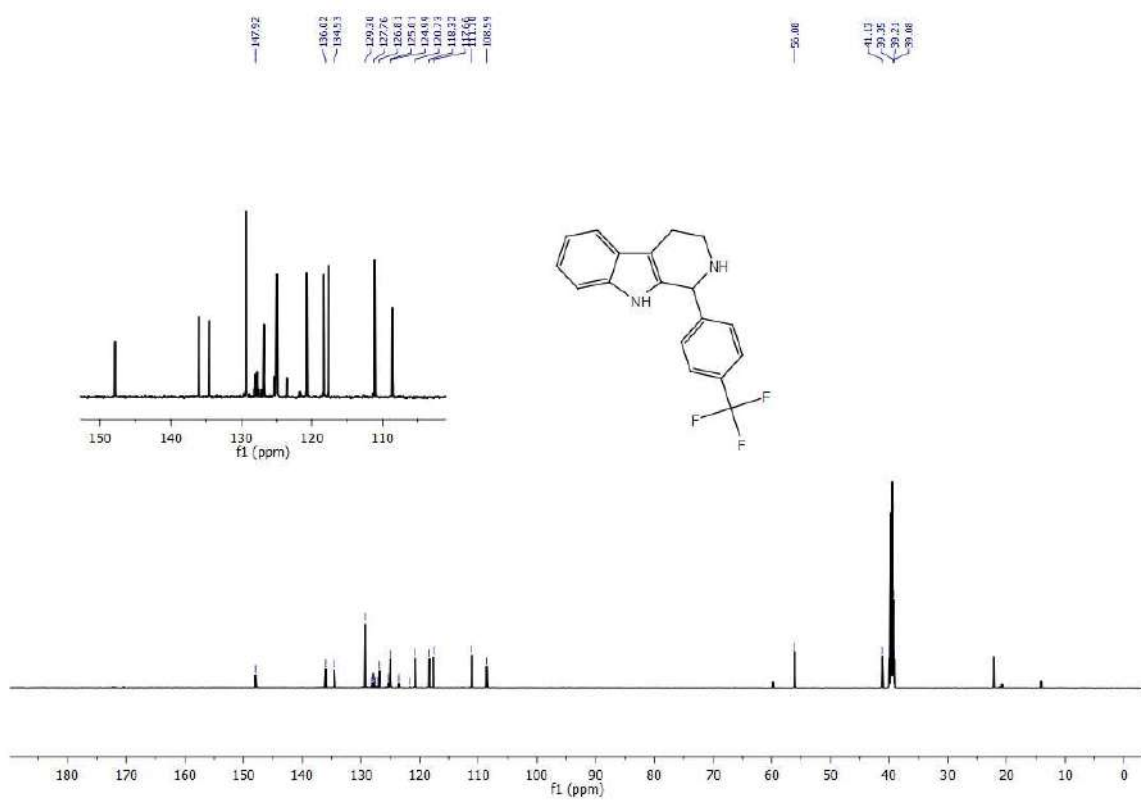


Figura A. 34. RMN ¹³C do composto **28d** em DMSO-*d*₆, a 100 MHz.

PARTE II

FEVEREIRO DE 2025 ATÉ O
MOMENTO

1. CONTEXTO DA NOVA PROPOSTA DO PROJETO

Conforme já discutido, em razão de os compostos sintetizados não terem apresentado potencial antiviral, novas alternativas foram exploradas envolvendo outras doenças negligenciadas, com destaque para leishmaniose, doença de Chagas e malária. A leishmaniose é uma infecção parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* (*L.*),³² e transmitida aos humanos pela picada da fêmea do mosquito-palha.³³ A doença afeta principalmente países pobres na África, Ásia e América Latina, e está associada à desnutrição, moradia precária, e falta de recursos.³² A enfermidade se manifesta de várias formas, incluindo leishmaniose visceral, mucosa, cutânea e mucocutânea (LV, LM, LC e LMC), com gravidade influenciada pela cepa *Leishmania* e pela resposta imune do hospedeiro.³³ No continente americano, *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) causa LV, a forma mais grave da moléstia,³³ que se manifesta em lesões em órgãos internos, aumento do volume abdominal, febre, apatia, falta de apetite e³⁴ diarreia, além de inchaço nos linfonodos.³⁵ Quando não tratada, a LV pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos.³⁶ Por sua vez, a LC leva a úlceras de pele, as quais podem cicatrizar desfigurantes para o resto da vida, causando um sério estigma social, principalmente em mulheres e crianças.³⁷

As opções de tratamento para leishmaniose são baseadas no uso de antimoniais pentavalentes (Ex: antimoniato de meglumina e o estibogluconato, Figura 1. 1) ou diaminas

32 [b] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Disponível em https://www.who.int/westernpacific/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1, acesso em 01/02/2025.

33 ZHANG, H.; YAN, R.; YAHUI LIU, Y.; YU, M.; HE, Z.; XIAO, J.; LI, K.; LIU, G.; NING, Q.; LI, Y. "Progress in antileishmanial drugs: Mechanisms, challenges, and prospects." *PLoS Neglected Trop. Dis.*, **19**(1): e0012735, **2025**.

34 DE LIMA, F.; H. G.; CRUZ, L. DE M.; F. G M.; MARTINHO, C. C. A.; REZENDE, DE MELO, D., NASCIMENTO, F. D.; MACRUZ, D. P.; PILAU, J. E.; MURTA, F. M. S.; JÚNIOR, R DE O, C. "Optimization of benzenesulfonyl derivatives as anti-Trypanosomatidae agents: Structural design, synthesis, and pharmacological assessment against Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum." *Bioorg. Med. Chem.*, **105**:117736, **2024**.

35 SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DA BAHIA. Disponível em <https://www.saude.ba.gov.br/temasdesaude/sinais-e-sintomas-no-homem-leishmaniose-visceral/>, acesso em 03/02/2025.

36 NINA, DA S. N. L.; CALDAS, M. DE J. A.; SOEIRO, DA S. M. V.; FERREIRA, F. T.; SILVA, C. T.; RABELO, C. P. P. "Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020." *Rev. Panam. Salud. Publica*, **47**:e160, **2023**.

37 DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Disponível em <https://dndial.org/doencas/leishmaniose-cutanea/>, acesso em 03/02/2025.

como a pentamidina. No entanto, a sua administração parenteral em esquemas longos e vários efeitos colaterais ainda representam grandes desvantagens que afetam o sucesso e a conclusão dos tratamentos.^{38, 39} Para agravar o cenário, os protozoários estão a adquirir resistência generalizada a esses tratamentos,^{40,41} um obstáculo difícil de ser superado.

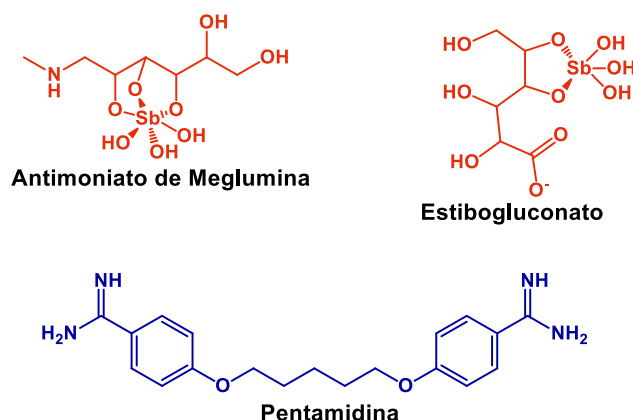


Figura 1. 1. Medicamentos atualmente em uso para tratar leishmaniose.

A doença de chagas (DC) é causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*, que por sua vez é transmitido por insetos hematófagos, também conhecidos como 'barbeiros', endêmicos na América Latina.⁴² A doença expandiu-se para países não endêmicos, atingindo a Europa, a Ásia, a Austrália e a América do Norte.⁴² Na fase aguda da doença, após a picada do inseto, a pessoa pode apresentar quadro de dor de cabeça, fraqueza, febre persistente superior a

38 ROSA, B. L.; AIRES, L. R.; OLIVEIRA, S. L.; FONTES, V. J.; MIGUEL, C.; D.; ABBEHAUSEN, C. "A "Golden Age" for the discovery of new antileishmanial agents: Current status of leishmanicidal gold complexes and prospective targets beyond the trypanothione system." *Chem. Med. Chem.*, **16**(11):1681, **2021**.

39 NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE.

Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581524/>, acesso em 01/02/2025.

40 CAPELA, R.; MOREIRA, R.; LOPES, F. "An Overview of Drug Resistance in Protozoal Diseases." *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(22):5748, **2019**.

41 MONCADA-DIAZ, J. M.; RODRÍGUEZ-ALMONACID, C. C.; QUICENO-GIRALDO, E.; KHUONG, H. T. F.; MUSKUS, C.; KARAMYSHEVA, N. Z. "Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Leishmania* spp." *Pathogens*, **13**(10):835, **2024**.

42 ESPINOZA-CHÁVEZ, R. M.; JÚNIOR, C DE O. R.; DE SOUZA, M. L.; PAULI, I.; VALLI, M.; FERREIRA, G L. L.; CHELUCCI, C. R. MICHELAN-DUARTE, S.; KROGH, R.; DA SILVA, R. B. F.; CRUZ, C. F.; DE OLIVEIRA, S. A.; ANDRICOPULO, D. A.; DIAS, C. L. "Structure-activity relationships of novel *N*-imidazolylpiperazines with potent anti- *Trypanosoma cruzi* activity." *Future Med. Chem.*, **16**(3):253, **2024**.

uma semana, ferida na região da picada, inchaço no rosto e nas pernas.⁴³ Já na crônica pode ocorrer insuficiência cardíaca, dilatação do esôfago e intestino.⁴³

Atualmente, apenas dois medicamentos estão disponíveis comercialmente contra a DC e são considerados eficazes para a fase aguda da doença: benznidazol (BZN) e nifurtimox.⁴² No entanto, sua eficácia na fase crônica é uma questão de debate, e eles causam efeitos colaterais que muitas vezes levam os pacientes a interromper o tratamento precocemente.⁴² Dado que a fase aguda é majoritariamente assintomática, é crucial descobrir novos fármacos eficazes que possam abordar a fase crônica, caracterizada por manifestações clínicas a longo prazo e envolvimento de órgãos.⁴²

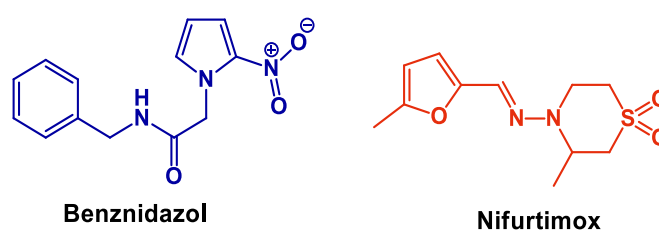


Figura 1.1. Medicamentos atualmente em uso contra doença de Chagas.

A malária é uma doença infecciosa parasitária que conduz a um quadro agudo com risco de vida, representando grave ameaça à saúde global.⁴⁴ É causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada da fêmea infectada de mosquitos do gênero *Anopheles*,⁴⁴ e seus sintomas típicos são febre alta acompanhada de calafrios, sudorese intensa e cefaleia, podendo, inclusive, evoluir para manifestações mais graves, como malária pulmonar, anemia grave e malária cerebral.⁴⁵ Na África - continente mais afetado pela doença - a enfermidade atinge majoritariamente crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas.⁴⁶

43 CUCUNUBÁ, M. Z.; GUTIÉRREZ-ROMERO, A. S.; RAMÍREZ, J-D.; VELÁSQUEZ-ORTIZ, N.; CECCARELLI, S.; PARRA-HENAO, G.; HENAO-MARTÍNEZ, F. A.; RABINOVICH, J.; BASÁÑEZ, M-G.; NOUVELLET, P.; ABAD-FRANCH, F. "The epidemiology of Chagas disease in the Americas." *Lancet Reg. Health - Am. The*, **37**:100881, **2024**.

44 GOMES, G.R.; RAQUEL, C.; BARBOSA, R.; CARVALHO, A. F. "Correction : Asymptomatic *Plasmodium Vivax* Malaria in the Brazilian Amazon : Submicroscopic Parasitemic Blood Infects *Nyssorhynchus darlingi*." *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **15**(10): 1149, **2023**.

45 ORNELLAS-GARCIA, U.; CUERVO, P. "Malaria and Leishmaniasis: Updates on Co-Infection". *Front. Immunol.*, **14**(1122411):1, **2023**.

46 WORLD MALARIA REPORT, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2023. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>, acesso em 16/01/2024.

A malária humana é causada principalmente por cinco espécies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri*, as quais apresentam diferenças em sua distribuição geográfica, gravidade patológica e biologia.⁴⁵

O controle da malária inclui o tratamento medicamentoso dos casos e medidas de proteção contra os vetores para prevenir e/ou limitar os contatos com hospedeiros humanos durante os quais ocorre a transmissão.⁴⁷ Na Figura 1.3, são mostradas as estruturas químicas de alguns agentes antimaláricos atualmente em uso contra a malária.

Até hoje não foi identificado ou fabricado um único fármaco que possa eliminar todas as cepas de *Plasmodium*. Assim, o tratamento é realizado via terapias combinadas à base de derivados da artemisinina (ACT). Uma grande adversidade associada a esses tratamentos é a resistência dos protozoários aos agentes antimaláricos disponíveis, em especial a cloroquina, de modo que no atual cenário, *P. falciparum* atualmente é resistente a quase todos os medicamentos antimaláricos.^{48,49,50}

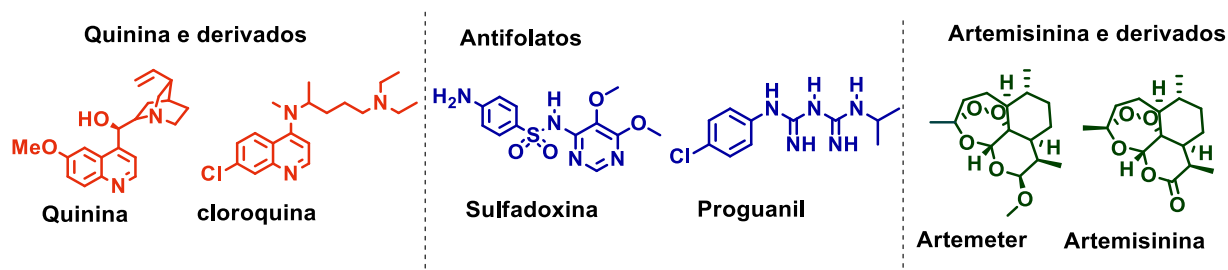


Figura 1. 3. Compostos representantes dos 3 grupos de antimaláricos atualmente em uso.

As doenças negligenciadas representam um desafio significativo para a saúde pública; nessa conjuntura, onde as opções de tratamento são pouco eficientes e caras, somando-se a isso a resistência dos agentes causadores, o advento de novas opções terapêuticas é imperativo.

47 SUH, P.F.; NDILLE, E.E.; TCHOUAKUI, M.; SANDEU, M.M.; TAGNE, D.; WONDJI, C.; NDO, C. "Impact of Insecticide Resistance on Malaria Vector Competence: A Literature Review." *Malar. J.* **22**(1):19, **2023**.

48 IMRAT, K.; VERMA, A.; RANI M. P. "Recent Advances in Antimalarial Drug Discovery: Challenges and Opportunities"[Internet]. *Plasmodium Species and Drug Resistance.* *IntechOpen*; **2021**. Disponível em <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97401>, acesso em **05/01/2024**.

49 CONRAD, M.D.; ASUA, V.; GARG, S.; GIESBRECHT, D.; NIARÉ, K.; SMITH, S.; NAMUGANGA, J.F.; KATAIRO, T.; LEGAC, J.; CRUDALE, R.M. "Evolution of Partial Resistance to Artemisinins in Malaria Parasites in Uganda." *N. Engl. J. Med.*, **389**:722, **2023**.

50 CHINNAPPANNA, N.K.R.; YENNAM, G.; CHAITANYA, C.B.H.N.V.; POTTATHIL, S.; BORAH, P.; VENUGOPALA, K.N.; DEB, P.K.; MAILAVARAM, R.P. "Recent Approaches in the Drug Research and Development of Novel Antimalarial Drugs with New Targets." *Acta Pharm.*, **73**(1): 1, **2023**.

É amplamente reconhecido que os derivados de tetraidro- β -carbolina (TH β C)⁵¹ assim como as arilpiperazinas^{34,51,52} apresentam atividade significativa contra diversas doenças negligenciadas, incluindo leishmaniose, doença de Chagas e malária. Esses dois fragmentos moleculares compartilham uma relação bioisostérica, ainda pouco explorada na literatura. Existem apenas alguns relatos, como o estudo de Kikuchi *et al.*,⁵³ no qual essa relação foi investigada com o objetivo de desenvolver ligantes mais seletivos para os receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT).

Neste contexto, a proposta desta segunda etapa do projeto consiste na síntese inicial de oito novos derivados tetraidro- β -carbolínicos, obtidos por meio da substituição bioisostérica do núcleo arilpiperazina por TH β C. O objetivo é investigar como essa modificação estrutural afeta a potência e outras propriedades farmacológicas relevantes, tais como índice de seletividade, solubilidade aquosa, permeabilidade, meia-vida metabólica e logD, em comparação aos derivados arilpiperazínicos já descritos na literatura, os quais apresentam promissores perfis antileishmaniose,⁵² antitripanossoma⁵⁴ (Esquema 1.1) e antimalárico⁵⁵ (Esquema 1.2). Este estudo tem o potencial de gerar compostos mais eficazes e seletivos, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento científico na área de descoberta de fármacos voltados ao tratamento de doenças tropicais negligenciadas.

51 [a] BANOTH, K. K.; FAHEEM, CHANDRASEKHAR, G. V. K.; ADINARAYANA, N.; MURUGESAN, S. "Recent evolution on synthesis strategies and anti-leishmanial activity of β -carboline derivatives – An update." *Heliyon*, **6**(9):e04916, **2020**. [b] REHMAN, U. M.; ZUO, Y.; GUO, J. N. T.; LIU, Z.; CAO, S.; LONG, S. "Diverse pharmacological activities of β -carbolines: Substitution patterns, SARs and mechanisms of action". *Eur. J. Med. Chem.*, **287**:117350, **2025**.

52 LAPIERRE, D. J. W. J. T.; CRUZ, L. DE M., F. G. M.; BRITO, F. P. N.; RESENDE, DE M. D.; SOUZA, O. F.; PILAU, J. E.; NEVES, J. B. DA S. B. M.; MURTA, F. M. S.; JÚNIOR, R. DE O, C. "Hit-to-lead optimization of a pyrazinylpiperazine series against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*." *Eur. J. Med. Chem.*, **256**:115445, **2023**.

53 KIKUCHI, C.; ANDO T. WATANABE, T.; NAGASO, H.; OKUNO, M.; HIRANUMA, T.; KOYAMA, M. "2a-[4-(Tetrahydropyridoindol-2-yl)butyl]tetrahydrobenzindole Derivatives: New Selective Antagonists of the 5-Hydroxytryptamine₇ Receptor." *J. Med. Chem.*, **45**(11):2197, **2002**.

54 HERCOS, De L. F. G.; CRUZ, L. De M. F. G. M.; MARTINHO, C. C. A.; RESENDE, De M. R.; NASCIMENTO, F. D.; MACRUZ, D. P.; PILAU, J. E.; MURTA, F. M. S.; JÚNIOR, R. De O. C. "Optimization of benzenesulfonyl derivatives as anti-*Trypanosomatidae* agents: Structural design, synthesis, and pharmacological assessment against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*." *Bioorg. Med. Chem.*, **105**:117736, **2024**.

55 OLIVEIRA, Da S. D. D.; PAZ, F.; BRITO, F. P. N.; KRÜGER, A.; MARTINHO, C. C. A.; LAPIERRE, D. J. W. J. T.; SOUZA, De O. F.; MALTAROLLO, G. V.; KRONENBERGER, T.; MENDES, S. M.; NONATO, C. M.; PILAU, J. E.; WRENGER, C.; WUNDERLICH, G.; JÚNIOR, De O. C. "Synthesis, design, and optimization of a potent and selective series of pyridylpiperazines as promising antimalarial agents." *Eur. J. Med. Chem.*, **275**:116621, **2024**.

2. OBJETIVOS DA PARTE II DO PROJETO

O objetivo geral deste projeto é avançar o conhecimento científico na área de descoberta de fármacos contra a leishmaniose, doença de Chagas e malária por meio do estudo do bioisosterismo entre os fragmentos tetrahydrobetacarbolina e a piperazina.

As metas específicas são:

1. Sintetizar os compostos almejados em quantidades adequadas e com alta pureza para testes biológicos *in vitro* de efetividade contra *L. infantum*, *T. cruzi* e *P. falciparum*
2. Identificar compostos com atividade biológica significativa ($IC_{50} < 0,1 \mu M$), alto índice de seletividade (> 100) e propriedades farmacocinéticas adequadas (solubilidade aquosa $> 10 \mu g/mL$, permeabilidade $> 1,6 \times 10^{-6} cm/s$, meia-vida metabólica $> 3 h$ e $\log D$ entre 1-3).
3. Elucidar os mecanismos de ação dos compostos.

3. METODOLOGIA

3.1. Avaliação biológica *in vitro*

Os compostos sintetizados serão avaliados *in vitro* quanto à sua atividade contra a forma amastigota de *L. infantum* e *T. cruzi*, bem como quanto à sua atividade frente a *P. falciparum*, além de sua citotoxicidade em células hospedeiras (THP-1). A determinação dos valores de IC_{50} e CC_{50} permitirá o estudo SAR e a identificação de compostos com maior atividade e seletividade. Essas avaliações biológicas serão realizadas em colaboração com a Profa. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau da Universidade de Brasília.

3.2. Estudos parasitológicos secundários e mecanismo de ação

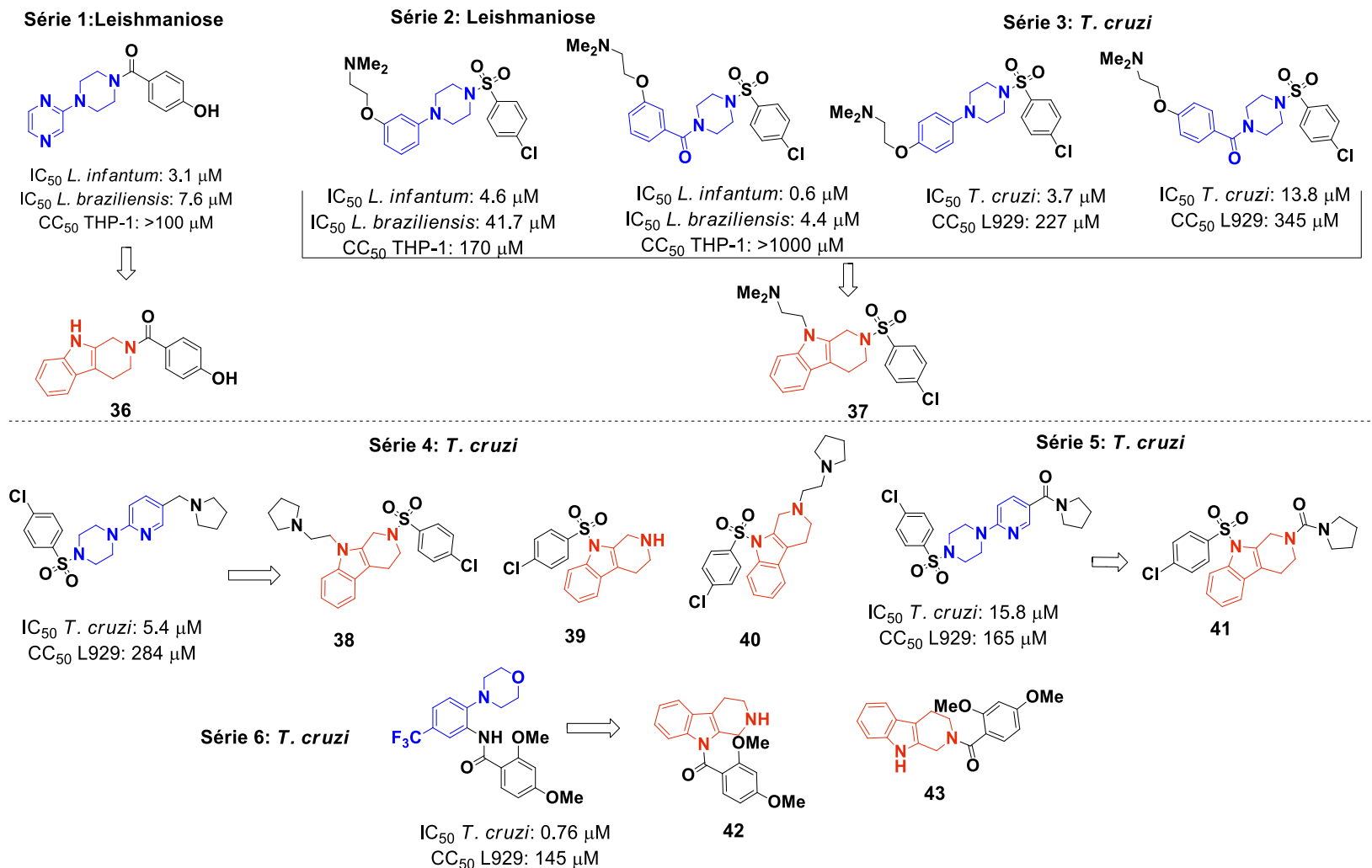
Os compostos selecionados na etapa anterior serão avaliados em estudos parasitológicos secundários, com objetivo de elucidar seus mecanismos de ação através de estudos de microscopia de transmissão e varredura. Esses estudos serão realizados em colaboração com as Profas. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau e Sônia Bao da Universidade de Brasília.

3.3. Ensaios antitripanossoma

Esses ensaios serão realizados em parceria com a Profa Dra Silvane Maria Fonseca Murta, também da FioCruz -MG.

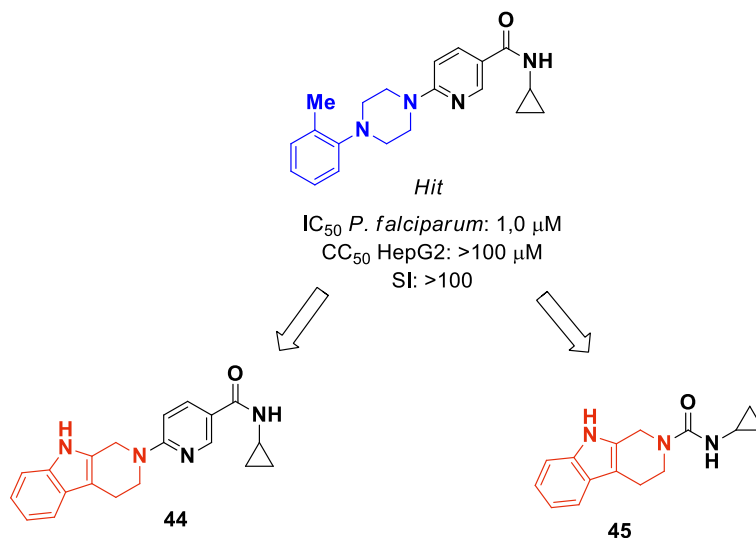
3.4. Ensaios antimaláricos

Esses ensaios serão realizados em parceria com a Prof. Dr. Rafael Victorio de Carvalho Guido, do Instituto de Física da USP/São Carlos.



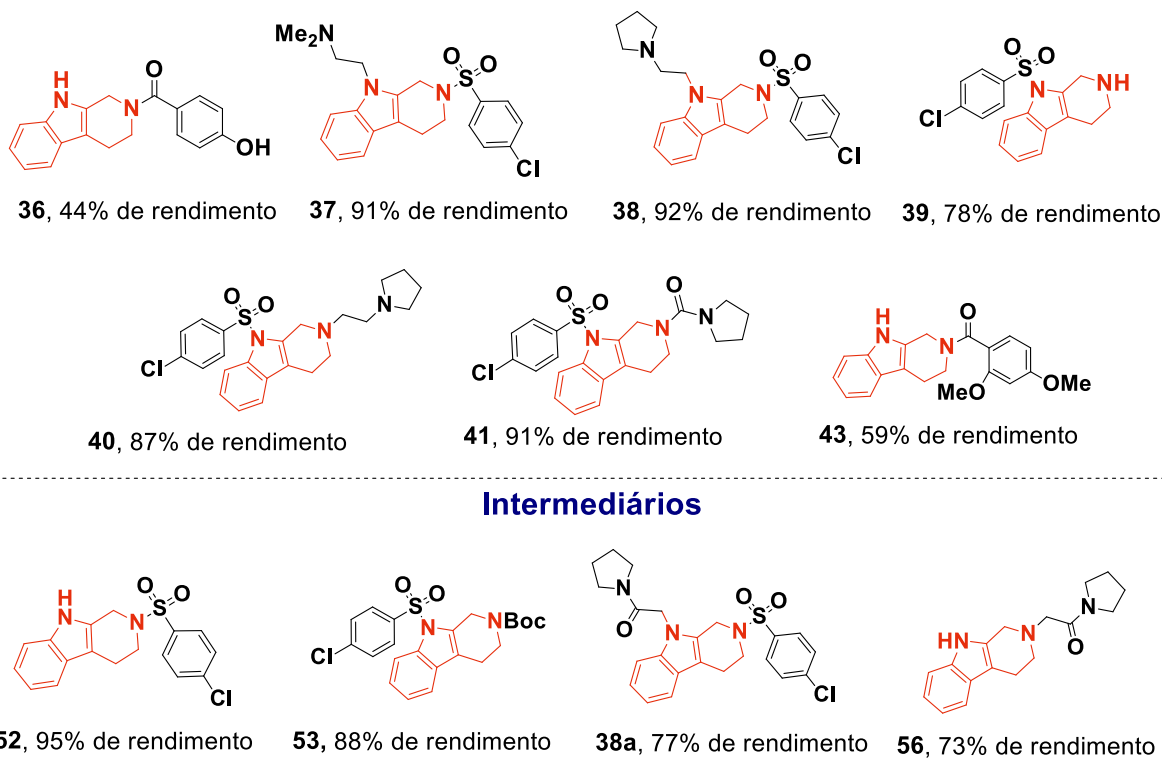
Esquema 1.1. Derivados de THβC (em laranja) planejados para investigação da relação bioisotérica desse esqueleto com o fragmento aril-piperazina ou aril-morfolina (em azul) em compostos bioativos frente a doença de Chagas e leishmaniasis. CC_{THP}: Concentração citotóxica em linhagem de células de leucemia humana; CC_{L929}: linhagem celular de fibroblastos murinos. A numeração dos compostos dará continuidade à sequência iniciada na Parte I, para fins de facilitação.

Série 7: Malária



Esquema 1.2. Derivados de THβC (em laranja) planejados para investigação da relação bioisostérica desse esqueleto com o fragmento aril-piperazina (em azul) em compostos bioativos frente à malária. CC_{THP}: Concentração citotóxica em linhagem de células tumorais hepáticas humanas; SI: Índice de seletividade.

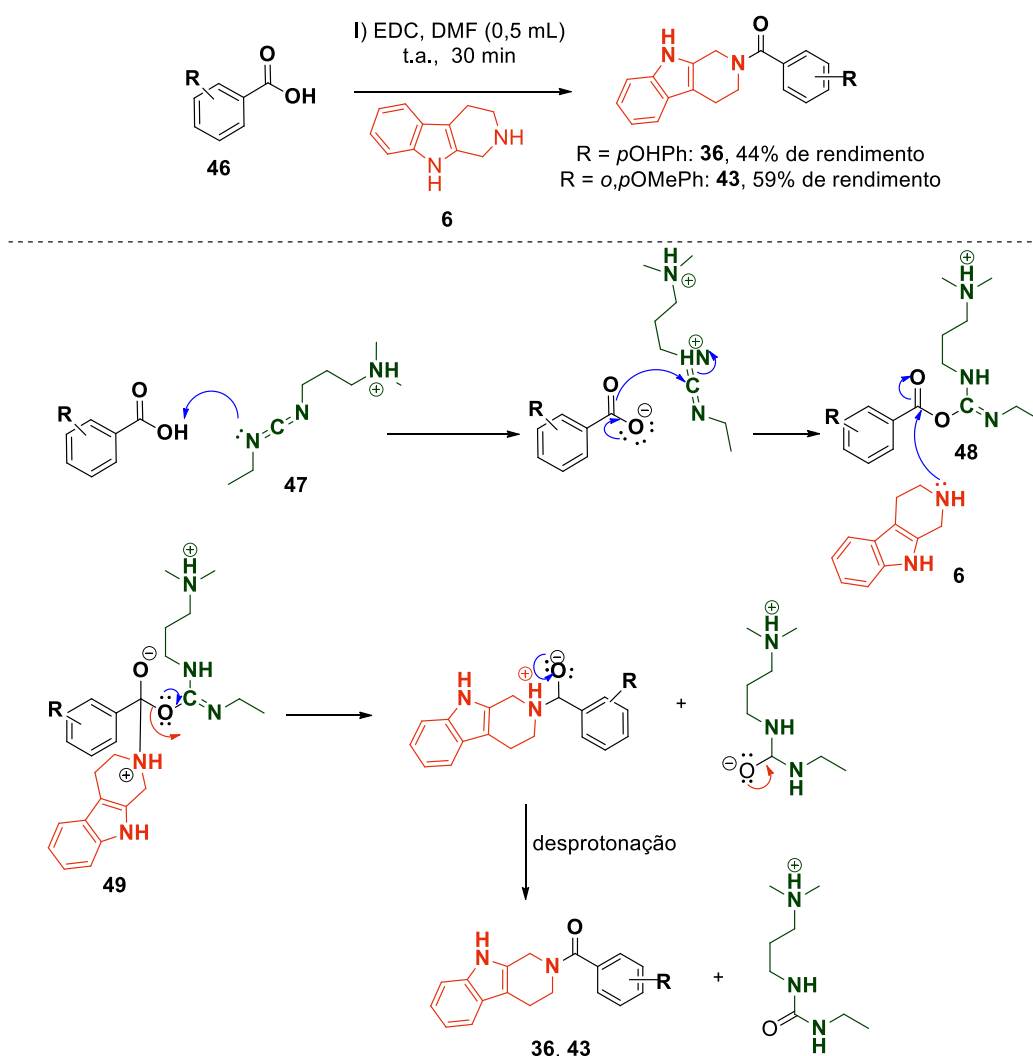
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Esquema 1.3. Compostos almeçados na Parte II já obtidos até o momento.

4.1. Síntese dos compostos 36 e 43

Os compostos **36** e **43** foram sintetizados via emprego de EDC como reagente de acoplamento, cuja reatividade é bem estabelecida. Em linhas gerais, o EDC, da classe das carbodiimidas, ativa eficientemente o grupo carboxila do ácido, criando um intermediário com um excelente grupo de saída (**48**, Esquema 1.4). Nessas condições a amina (**6**) ataca mais eficazmente o centro eletrofílico desse intermediário, levando à amida de interesse e à formação de uréia como subproduto.



Esquema 1.4. Proposta mecanística para obtenção de amidas via reagentes de acoplamento derivados de carbodiimidas.

No espectro de RMN de **36** (Figura A2. 1) é possível observar um singlete desblindado em δ 9,90 compatível com H de hidroxila, além de dois dubletos em δ 7,32 ($J = 8,1$ Hz, 2H) e 6,83 ($J = 8,5$ Hz, 2H), sugestivos de anel aromático *p*-substituído. Por sua vez, a presença da

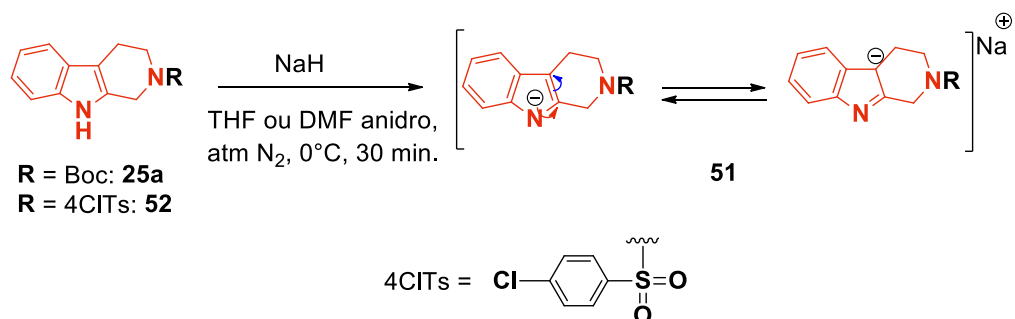
unidade TH β C pode ser inferida pelos três sinais para hidrogênios metilênicos entre δ 4,72 e 2,76. Complementarmente, no espectro de RMN de ^{13}C (

Figura A2. 2) são encontrados sinais para a carboxila da amida em δ 170,3 e para o carbono hidroxilado em δ 158,9, além de sinais correspondentes aos carbonos aromáticos e alifáticos referentes ao anel tetrahydrobetacarbolínico.

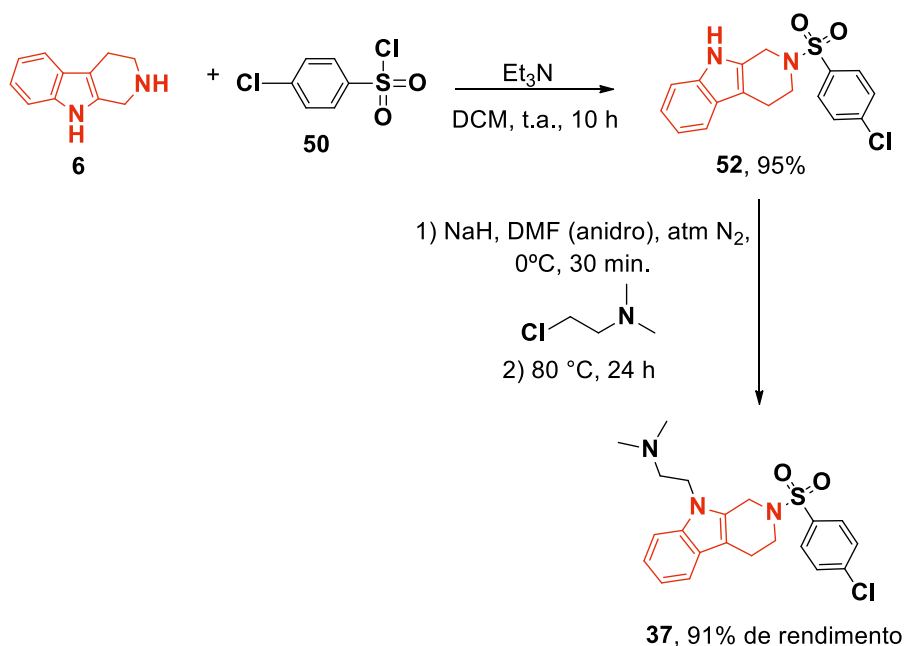
A caracterização estrutural do composto **43** está sendo concluída.

4.2. Síntese dos compostos **37** e **38**

A rota sintética para obtenção dos compostos **37** e **38** passa pela preparação do produto *N*-tosilado **52** via substituição nucleofílica de **6** ao haleto **50** (Esquema 1.6), o qual é desprotonado por ação de base forte levando à espécie nucleofílica (**51**, Esquema 1.5), que efetua o ataque no sítio eletrofílico do haleto específico em cada caso, levando aos produtos alquilados **37** e **38**.



Esquema 1.5. Desprotonação da TH β C promovida por NaH em condições anidras.



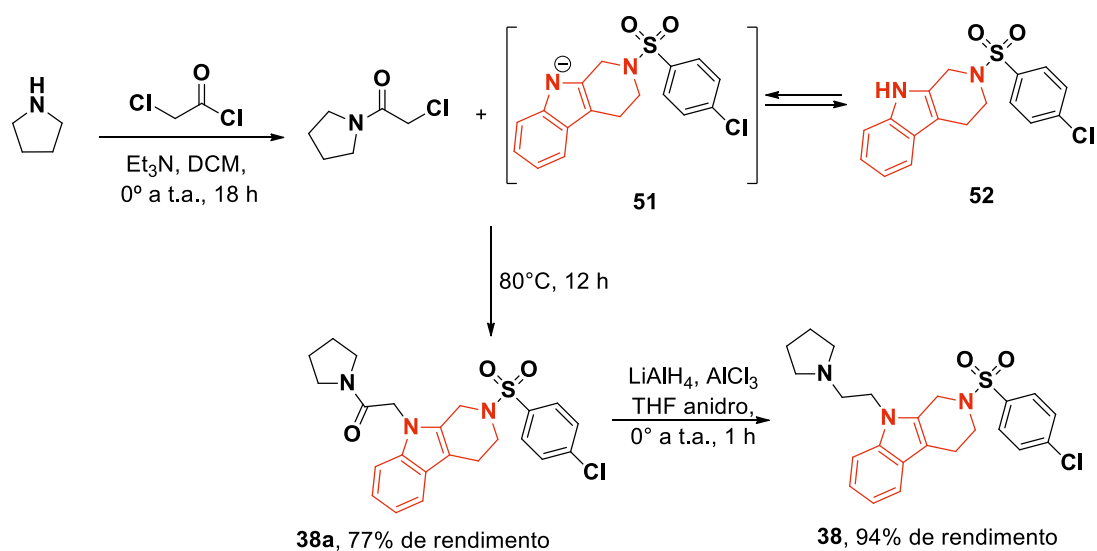
Esquema 1.6. Rota sintética para a preparação do derivado **37**.

O composto **37** foi preparado a partir do cloridrato de 2-cloro-*N,N*-dimetil-etilamina comercial.

No espectro de RMN de **37** (Figura A2. 5), encontram-se sinais característicos de anel aromático *para*-substituído em δ 7,90 – 7,87 (m, 2H) e 7,67 – 7,64 (m, 2H), além dos quatro sinais correspondentes à TH β C (δ 7,36 d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,09 (ddd, J = 8,2, 7,1, 1,2 Hz, 1H), 6,98 (ddd, J = 7,9, 7,1, 0,9 Hz, 1H), confirmando a presença do fragmento tetrahydrobetacarbolínico *N*-substituído. Já na região de alifáticos, foram identificados cinco sinais compatíveis com grupos metilênicos, correspondentes ao anel tetrahydrobetacarbolínico e à cadeia alquílica da porção amina. Por fim, um singlete integrando para 6 hidrogênios em δ 2,15 ratifica a presença dos grupos metílicos, e, por consequência, da amina terciária. Complementarmente, o espectro de RMN de ^{13}C (Figura A2. 6) mostra os sinais aromáticos e alifáticos esperados para o esqueleto, bem como a presença de um carbono vizinho a grupo eletronegativo em δ 58,9, que pode ser atribuído ao metileno alfa-amino.

Por outro lado, o haleto necessário para síntese de **38** foi obtido via substituição nucleofílica da pirrolidina ao cloreto de cloroacetila (Esquema 1.7). Na sequência, o intermediário **51** efetua um ataque ao centro eletrofílico ativado da 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona, levando à amida **38a**, que leva ao produto (**38**) após redução com LiAlH_4 em condições anidras.

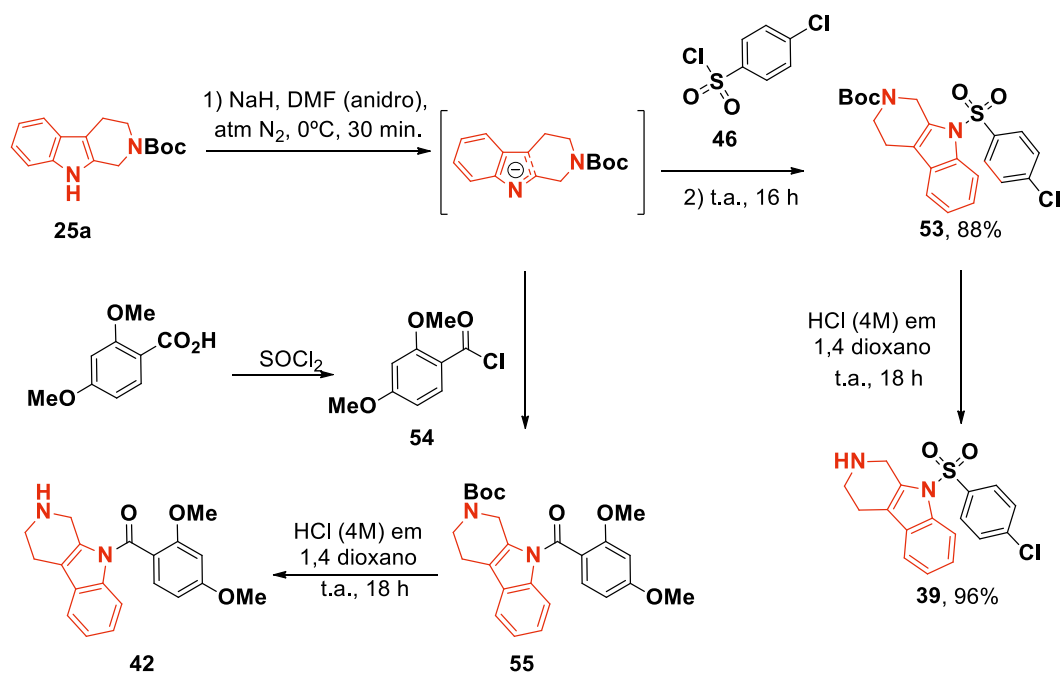
No espectro de RMN ^1H de **38** (Figura A2. 11), identificam-se os sinais já discutidos para a unidade tetrahydrobetacarbolínica *N*-substituída, além de sinais para oito grupos metilênicos entre δ 4,69 e 1,87, correspondentes ao anel tetrahydro e ao fragmento etil-pirrolidina (um dos metilenos possivelmente está sobreposto ao sinal residual da água do solvente). Por sua vez, no espectro de RMN ^{13}C de **38** (Figura A2. 12) são visualizados os sinais esperados para o esqueleto, com destaque para os carbonos alifáticos entre δ 43 e 56, compatíveis com os grupos vizinhos aos átomos de nitrogênio.



Esquema 1.7. Preparação do composto **38**.

4.3. Síntese dos compostos **39** e **42**

Os derivados **39** e **42** podem ser preparados utilizando a TH β C **25a** por uma sequência de desprotonação em condições anidras, substituição do nucleófilo gerado (**51**, Esquema 1.5) ao haleto apropriado e finalmente a desproteção (Esquema 1.8).

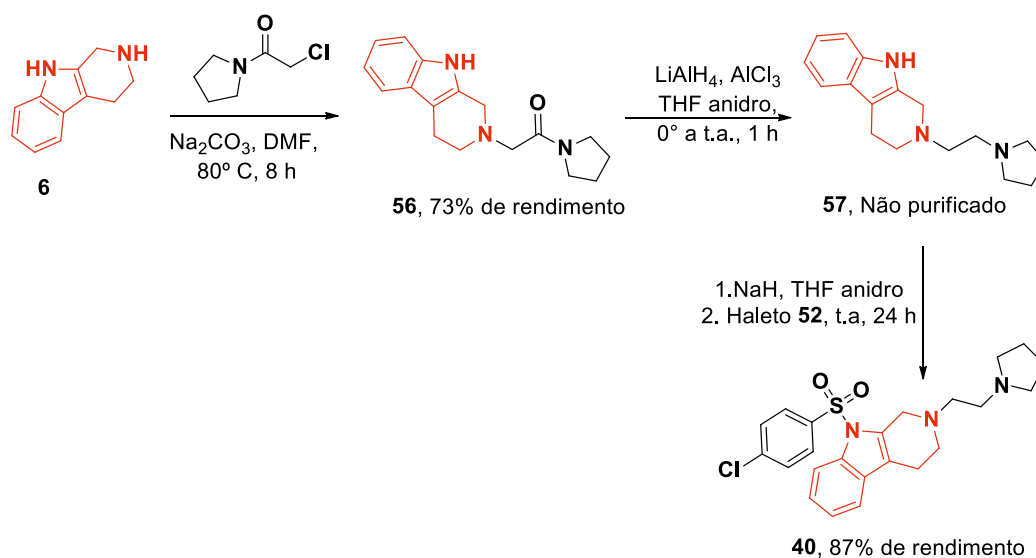


Esquema 1.8. Preparação dos compostos **39** e **42**.

O composto **39** foi preparado com bom rendimento. Os dados de RMN de ^1H (Figura A2. 15) e ^{13}C (Figura A2. 16) estão dentro do esperado para a estrutura proposta.

4.4. Síntese do composto 40

A síntese de **40** passa pela alquilação de **6** com o cloreto ativado (Esquema 1.9), levando à amida **56**, que fornece o produto de interesse após redução com LiAlH_4 em condições anidras.

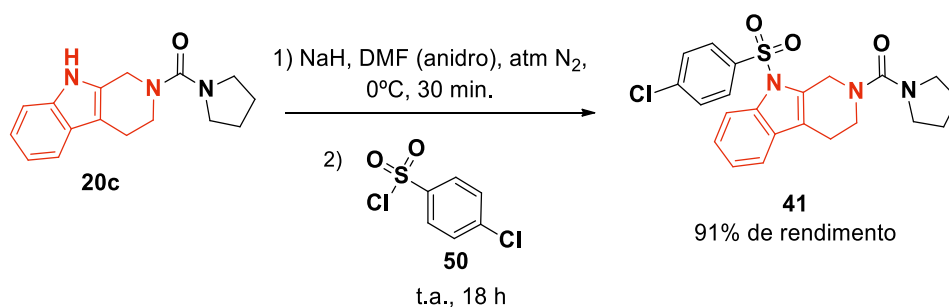


Esquema 1.9. Síntese do derivado tetrahidrobetacarbolínico **40**.

No espectro de RMN ^1H de **56** (Figura A2. 17) é identificado um singlete δ 8, 23 (1H) compatível com sinal de hidrogênio do grupo NH da unidade pirrólica, além dos quatro sinais de aromáticos (δ 7,46 d, $J = 7,7$ Hz, 1H/7,30 (t, $J = 7,9$, 0,8 Hz, 1H)/7,13 – 7,10 (m, 1H)/7,09 – 7,05 (m, 1H) esperados para o fragmento TH β C. Na região de alifáticos estão presentes sinais para grupos metilênicos correspondentes aos anéis alifáticos, inclusive um singlete em δ 3,86 (2H), característico de CH_2 alfa à grupo eletronegativo. Por sua vez, no espectro de ^{13}C (Figura A2. 16) está presente um sinal em δ 168,7, referente ao carbono carboxílico da amida, além dos demais sinais esperados para o esqueleto.

4.5. Síntese do composto 41

A TH β C **41** foi obtida a partir do híbrido **20c** (preparado na primeira parte do projeto) via desprotonação em condições anidras e posterior substituição nucleofílica da espécie gerada *in situ* ao haleto **50**. (Esquema 1.10).



Esquema 1.10. Preparação do composto **41**.

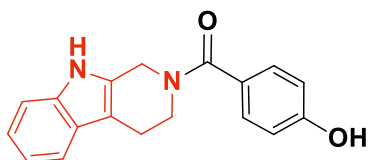
No espectro de RMN ¹H de **41** (Figura A2. 21) são observados sinais já discutidos para a unidade tetrahidrobetacarbolínica-clorosulfonilindólica, além de sinais para grupos metilênicos compatíveis com o anel da pirrolidina na região entre δ4,66-1,89. Complementarmente, no espectro de RMN ¹³C (Figura A2. 22) está presente um sinal para a carboxila da uréia (δ 161,8), além dos demais, compatíveis com a estrutura de **41**.

Devido ao encerramento da bolsa, não houve tempo hábil para conclusão da síntese dos compostos **42** a **45**. A caracterização estrutural dos compostos inéditos sintetizados tanto na primeira como na segunda parte deste trabalho será concluída via determinação da massa exata (HRMS).

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL – PARTE II

5.1. Síntese dos compostos **36** e **43**⁵²

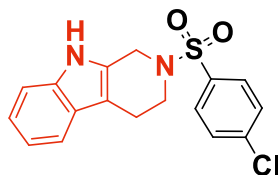
A uma solução do ácido carboxílico adequado (0,17 mmol) em DMF (0,5 mL), adicionou-se EDC (0,2 mmol, 0,036 g, 1,2 eq.). A mistura reacional foi deixada à t. a. e sob agitação por 30 minutos, sendo a THβC (**6**, 0,3 eq, 0,051 g) adicionada em seguida. Após 16-24 h, o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna ou cromatografia preparativa, levando ao produto desejado.



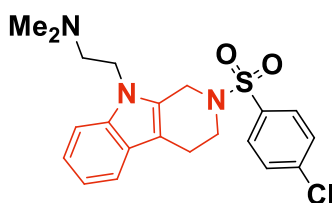
(3,4-di-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)(4-hidroxifenil)metanona (36): Sintetizado a partir de ácido 4-hidroxibenzóico (0,023 g) e obtido como um sólido branco, com 44% (0,022 g) de rendimento. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,90 (s, 1H), 7,39 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,29 (s, 1H), 7,03 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,95 (s, 1H), 6,83 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 4,72 (s, 2H), 3,72 (s, 2H), 2,76 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H). RMN ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,3;

158,9; 135,9; 131,0; 129,7; 129,1; 126,6; 126,5; 120,89; 118,6; 117,6; 115,0; 111,0; 106,9; 45,7; 40,6; 22,1.

5.2. Síntese do intermediário 52 e dos compostos 37 e 38



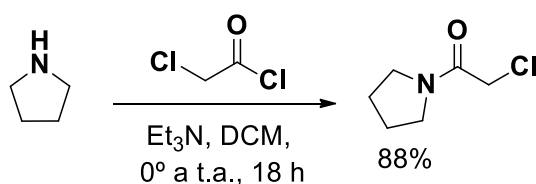
2-((4-clorofenil)sulfonil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol (52):²⁶ A uma solução de **6** (0,085 g, 0,5 mmol) em DCM (1 mL) em TEA (1 mmol) a 0 °C, adicionou-se lentamente o haleto **50** (0,13 mmol, 1,2 eq.). A mistura de reação foi deixada à t. a. e sob agitação por 16 h. Em seguida, adicionou-se solução de HCl (10 mL) ao bruto, que foi extraído com AcOEt (3x10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, filtradas e o solvente evaporado sob vácuo, levando ao produto *N*-tosilado **52** como um sólido branco com 95% de rendimento (0,16 g) sem a necessidade de purificação adicional. RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,8 (s, 1H, *NH*), 7,86 – 7,83 (m, 2H), 7,70 – 7,66 (m, 2H), 7,35 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,29 (dt, *J* = 8,1, 0,8 Hz, 1H), 7,04 (ddd, *J* = 8,1, 5,2, 1,2 Hz, 1H), 6,94 (ddd, *J* = 7,9, 7,0, 1,0 Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 3,45 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,72 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H). RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 138,6; 136,4; 136,2; 130,0; 129,6; 126,7; 121,5; 119,0; 118,1; 111,6; 106,6; 44,4; 43,8; 21,3.



2-(2-((4-clorofenil)sulfonil)-3,4-di-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol-9(2H)-il)-N,N-dimetiletanamina (37): A uma solução da THβC **52** (0,051 g, 0,2 mmol) em DMF anidro (1 mL) preparada em um balão de 10 mL (duas vias), previamente colocado em banho de gelo e equipado com condensador de refluxo, e sob atmosfera de Ar, foi adicionado NaH (0,022 g, 0,9 mmol, 3 eq.). A mistura reacional foi colocada sob agitação a 0°C por 0,5 h. Em seguida, adicionou-se cloridrato de 2-cloro-*N,N*-dimetil-etilamina (0,052 g, 0,3 mmol, 1,2 eq.) comercial ainda a 0°C. A mistura foi então aquecida a 80°C por 24 h, em atmosfera de Ar. Após esse período, o bruto reacional foi resfriado à temperatura ambiente e o solvente eliminado sob vácuo. Em seguida, foram adicionados acetato de etila (15 mL) e H₂O (20 mL). A fase aquosa foi então extraída com acetato de etila (2 × 15 mL), a fase orgânica combinada foi seca com

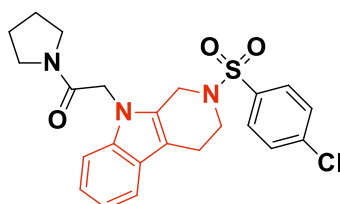
Mg₂SO₄ e filtrada. Os solventes foram evaporados sob vácuo, o resíduo bruto purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica (Hex:AcOEt 60%), levando ao composto de interesse como um sólido branco, com 91% de rendimento (0,071 g). RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,90 – 7,87 (m, 2H), 7,67 – 7,64 (m, 2H), 7,36 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,09 (ddd, *J* = 8,2, 7,1, 1,2 Hz, 1H), 6,98 (ddd, *J* = 7,9, 7,1, 0,9 Hz, 1H), 4,50 (s, 2H), 4,13 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 3,46 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,68 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,44 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,15 (s, 6H). RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 138,0; 136,0; 135,9; 130,5; 129,5; 129,2; 125,9; 121,0; 118,8; 117,8; 109,4; 105,8; 58,9; 45,6; 43,8; 42,7; 41,1; 20,6.

2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona⁵⁶



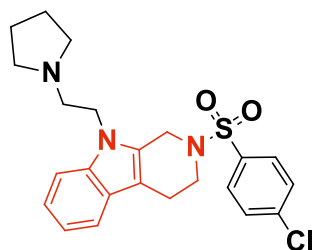
À uma solução de pirrolidina (0,42 L, 5 mmol) em DCM (2 mL) a 0°C foi adicionado cloreto de cloroacetila (0,56 L, 6 mmol, 1.2 eq.) gota a gota. A mistura reacional foi deixada sob agitação à t.a. por 18 h. Após esse período, água (20 mL) e acetato de etila (15 mL). A fase aquosa foi então extraída com acetato de etila (2 × 15 mL), a fase orgânica combinada foi seca com MgSO₄ e filtrada. Os solventes foram evaporados sob vácuo, o resíduo bruto purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica (Hex:AcOEt 60%), levando ao cloreto desejado como um sólido branco com 88% (0,7 g) de rendimento. RMN ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4,01 (s, 2H), 3,49 (dt, *J* = 16,3, 7,0 Hz, 4H), 1,98 (p, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,87 (p, *J* = 6,9 Hz, 2H).

Síntese da amida 38a



56 SHARMA, P.; REDDY, S. T.; THUMMURI, D.; SENWAR, R. K.; KUMAR, P. N.; NAIDU, V.G.M. BHARGAVA, K. S.; SHANKARAIAH, N. "Synthesis and biological evaluation of new benzimidazole-thiazolidinedione hybrids as potential cytotoxic and apoptosis inducing agents." *Eur. J. Med. Chem.*, **124**:608-621, **2016**.

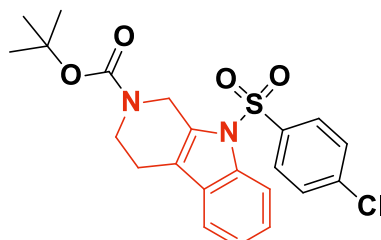
1-(2-((4-clorofenil)sulfonil)-3,4-di-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol-9(2H)-il)-2-(pirrolidin-1-il)etanona (38a): A uma solução da TH β C **52** (0,051 g, 0,2 mmol) em DMF anidro (1 mL) preparada em um balão de 10 mL (duas vias), previamente colocado em banho de gelo e equipado com condensador de refluxo, e sob atmosfera de Ar, foi adicionado NaH (0,022 g, 0,9 mmol, 3 eq.). A mistura reacional foi colocada sob agitação a 0°C por 0,5 h. A mistura reacional foi colocada sob agitação a 0°C por 0,5 h. Em seguida, adicionou-se 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona (0,044 g, 0,3 mmol, 1,2 eq.) ainda a 0°C. A mistura foi então aquecida a 80°C e agitação por 12 h, em atmosfera de Ar. Após esse período, o bruto reacional foi resfriado à temperatura ambiente e o solvente eliminado sob vácuo. Em seguida, foram adicionados acetato de etila (15 mL) e H₂O (20 mL). A fase aquosa foi então extraída com acetato de etila (2 $\times$ 15 mL), a fase orgânica combinada foi seca com Mg₂SO₄ e filtrada. Os solventes foram evaporados sob vácuo, o resíduo bruto purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica (Hex:AcOEt 50%), levando ao composto de interesse como um sólido levemente amarelado, com 77% de rendimento (0,07 g). RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 7,81 – 7,78 (m, 2H), 7,47 – 7,44 (m, 2H), 7,42 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,19 – 7,14 (m, 2H), 7,08 (ddd, J = 7,9, 6,2, 1,8 Hz, 1H), 4,69 (s, 2H), 4,46 (s, 2H), 3,55 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 3,50 (dd, J = 12,8, 6,5 Hz, 4H), 2,80 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 2,08-2,04 (m, 2H), 1,92-1,87 (m, 2H). RMN de ¹³C (151 MHz, CDCl₃) δ 165,5; 139,6; 137,3; 136,6; 130,6; 129,7; 129,0; 126,8; 122,1; 119,9; 118,6; 108,6; 108,1; 46,6; 45,7; 44,1; 43,0; 29,9; 26,6; 24,2; 21,4.



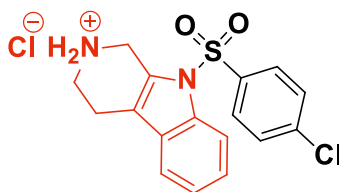
2-((4-clorofenil)sulfonil)-9-(2-(pirrolidin-1-il)etil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol (38): A uma solução da amida **38a** (0,044 g, 0,1 mmol) em THF anidro a 0°C em atmosfera de Ar, foi adicionado AlCl₃ (0,04 g, 3 eq) e LiAlH₄ (0,012 g, 3 eq.) em porções, seguido de agitação por 1 h. Após esse período, foi adicionado solução de NH₄Cl saturada, e a mistura foi filtrada em celite, e o filtrado foi extraído com AcOEt (3x10 mL), seco em Na₂SO₄ anidro e concentrado em vácuo, levando a **38**, com 92% de rendimento (0,040 g) sem a necessidade de purificação adicional. RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,90 – 7,86 (m, 2H), 7,68 – 7,64 (m, 2H), 7,39-7,35 (m, 2H), 7,11-7,07 (m, 1H), 6,99-6,06 (m, 1H), 4,49 (s, 2H), 4,16 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 3,45 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 2,68 (dt, J = 11,8, 5,7 Hz, 4H), 2,44 (sl,

4H), 1,62 (sl, 4H). RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 138,0; 135,9; 135,9; 130,6; 129,5; 129,2; 127,2; 126,0; 121,1; 118,9; 117,9; 109,4; 105,9; 55,3; 54,01; 43,9; 42,7; 42,2; 23,0; 20,7.

5.3. Síntese do intermediário 53 e do composto 39



Terc-butil 9-((4-clorofenil)sulfonyl)-3,4-di-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-carboxilato (53):⁵⁷ A uma solução da TH β C **25** (0,055 g, 0,2 mmol) em DMF anidro (1 mL) preparada em um balão de 10 mL (duas vias), previamente colocado em banho de gelo e sob atmosfera de Ar, foi adicionado NaH (0,005 g, 0,24 mmol, 1,2 eq.). A mistura reacional foi colocada sob agitação a 0°C por 0,5 h. Em seguida, adicionou-se o haleto **50** (0,050 g, 0,24 mmol, 1,2 eq.) ainda a 0°C. A mistura foi deixada sob agitação por 24 h, em atmosfera de Ar. Em seguida, adicionou-se água destilada (10 mL) ao bruto reacional, que foi extraído com AcOEt (3x10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, filtradas e o solvente evaporado sob vácuo, levando ao composto **53** como um sólido branco, após coluna cromatográfica (Hex:AcOEt 15-30%), com 88% de rendimento (0,078). RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, *presença de rotâmeros do Boc*) δ 8,00 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,90 (s, 2H), 7,65 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H), 7,48 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,36 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,29 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 4,85 (s, 2H), 3,66 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 2,66 (s, 2H), 1,46 (s, 9H). RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, *presença de rotâmeros do Boc*) δ 154,5; 153,8; 139,8; 135,6; 135,08; 131,6; 130,1; 129,3; 128,3; 125,0; 124,0; 119,0; 118,2; 113,8; 79,6; 42,3; 41,0; 29,0; 20,9.

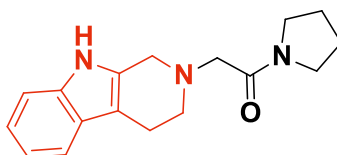


57 MASSON-MAKDISSI, J.; LALISSE, F. R.; YUAN, M.; DHERANGE, D. B.; GUTIERREZ, O.; LEVIN, D. M. "Evidence for Dearomatizing Spirocyclization and Dynamic Effects in the Quasi-stereospecific Nitrogen Deletion of Tetrahydroisoquinolines." *J. Am. Chem. Soc.*, 146(26):17719, 2024.

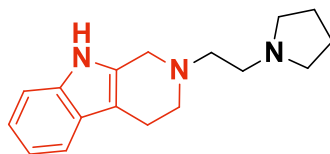
Cloridrato de 9-((4-clorofenil)sulfonil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]2-indol (39):

Uma mistura contendo **53** (0,044 g, 0,1 mmol) e solução de HCl 4M em 1,4 dioxano (0,5 mL) foi mantida sob agitação e em t.a. por 18 h. Após esse período, o bruto reacional foi deixado em repouso sob t.a. por 24 h e o cloridrato **39** precipitou-se, foi coletado e lavado com hex (5 mL). Sólido branco, com 78% de rendimento (0,027 g). RMN de ^1H (600 MHz, MeOD- d_4): δ 8,06 – 8,03 (m, 1H), 7,91 – 7,88 (m, 2H), 7,55 – 7,51 (m, 3H), 7,0 (ddd, J = 8,4, 7,4, 1,2 Hz, 1H), 7,34 – 7,30 (m, 1H), 4,75 (s, 2H), 3,61 (dd, J = 8,0, 4,1 Hz, 2H), 3,04 (ddd, J = 6,1, 4,4, 1,8 Hz, 2H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6): δ 140,7; 136,0; 135,8; 129,6; 128,7; 128,2; 125,9; 125,6; 124,2; 118,9; 117,2; 113,9; 48,0; 40,8; 17,9.

5.4. Síntese do composto 40

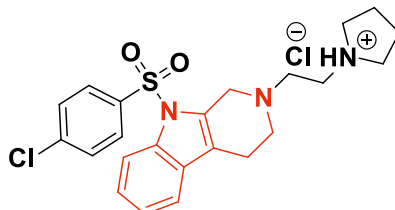


2-(3,4-di-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)-1-(pirrolidin-1-il)etanona (56): Uma suspensão de **6** (0,051 g, 0,3 mmol), **2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona** (0,066 g, 0,45 mmol, 1,5 eq.) e Na_2CO_3 (0,064 g, 0,6 mmol, 2 eq.) em DMF foi aquecida a 80°C por 8 h. Em seguida, água e AcOEt (20 mL) foram adicionados à mistura reacional, que foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica combinada foi seca com Mg_2SO_4 e filtrada. O solvente foi evaporado sob vácuo, o resíduo bruto purificado por cromatografia em coluna em gel de sílica (AcOEt:MeOH 20%), à amida de interesse como um sólido amarelo, com 73% de rendimento (0,062 g). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ 8,23 (s, 1H), 7,46 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,30 (t, J = 7,9, 0,8 Hz, 1H), 7,13 – 7,10 (m, 1H), 7,09 – 7,05 (m, 1H), 3,86 (s, 2H), 3,50 (dt, J = 10,4, 5,2 Hz, 4H), 3,39 (s, 2H), 2,99 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,83 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 1,92 – 1,90 (m, 2H), 1,86 – 1,81 (m, 2H). RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) δ 168,7; 136,3; 131,9; 127,4; 121,4; 119,5; 119,4; 118,1; 118,0; 111,0; 107,9; 60,5; 51,6; 50,3; 46,5; 46,2; 26,4; 24,3; 21,2.



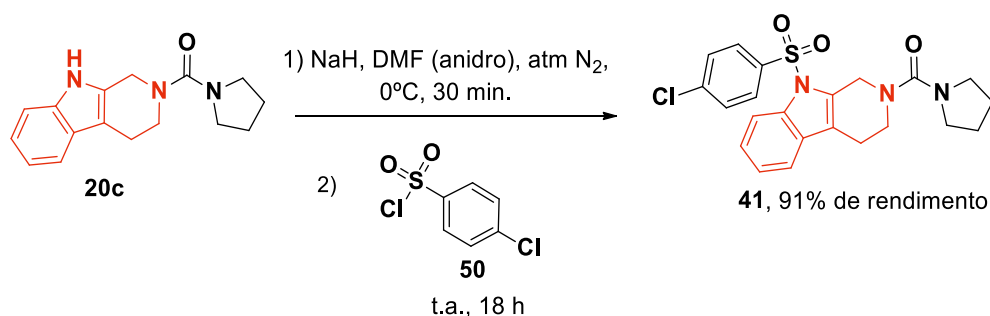
2-(2-(pirrolidin-1-il)etil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol (59): A uma solução da amida **56** (0,057 g, 0,2 mmol) em THF anidro a 0°C em atmosfera de Ar, foi adicionado AlCl_3 (0,04 g, 3 eq) e LiAlH_4 (0,012 g, 3 eq.) em porções, seguido de agitação por 1 h. Após esse

período, foi adicionado solução de NH_4Cl saturada, e a mistura foi filtrada em celite, o filtrado foi extraído com AcOEt (3x10 mL), seco em Na_2SO_4 anidro e concentrado em vácuo, levando à amina **59**, que foi usada na próxima etapa sem purificação adicional.



9-((4-clorofenil)sulfonil)-2-(2-(pirrolidin-1-il)etil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol (40**):** Mesmo procedimento descrito no **item 5.3**, com as seguintes modificações: Emprego da TH β C **59** (0,053 g, 0,2 mmol). Após extração, foi adicionada solução de HCl 4M (0,5 mL), seguido de agitação por 1 hora. A mistura foi deixada em repouso à t.a. por 36 h, e o cloridrato precipitado foi lavado com AcOEt (4x5mL), seco também à t.a., fornecendo o derivado **40** como um sólido levemente amarelo, com 87% de rendimento (0,077 g). RMN ^1H (600 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 8,02 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,92 – 7,87 (m, 2H), 7,56 – 7,51 (m, 2H), 7,48 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,37 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,29 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 3,76 – 3,66 (sl, 2H), 3,63 – 3,41 (sl, 7H), 2,98 (sl, 2H), 2,14 (s, 5H). RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 142,1; 137,7; 137,2; 131,1; 130,4; 129,9; 126,9; 125,7; 120,4; 119,4; 115,6; 55,8; 52,8; 52,2; 51,1; 50,9; 24,2; 20,4.

5.5. Síntese do composto **41**



(9-((4-clorofenil)sulfonil)-3,4-di-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol-2(9H)-il)(pirrolidin-1-il)metanona (41**):** A síntese de **41** foi realizada de acordo com o procedimento descrito no **item 5.3**, empregando **20c** (0,054 g, 0,2 mmol), e o haleto **50** (0,063 g, 0,3 mmol, 1,5 eq.), tendo sido obtido como um sólido branco, com 91% de rendimento (0,08 g). O procedimento sintético para a preparação de **20c** está descrita no **item 6.3.5 (Parte I)**. RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 7,97 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,91 – 7,88 (m, 2H), 7,65 – 7,61 (m, 2H), 7,47 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,35 – 7,2 (m, 1H), 7,31 – 7,25 (m, 1H), 4,66 (s, 2H), 3,51 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 2,69 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H), 1,82 – 1,76 (m, 4H). RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ 161,8; 139,7; 135,8; 135,0; 132,3; 130,0; 129,4; 128,3; 124,8; 123,9; 118,9; 118,2; 113,7; 47,9; 44,6; 42,9; 25,1; 20,8.

6. ANEXOS – PARTE II

6. 1. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

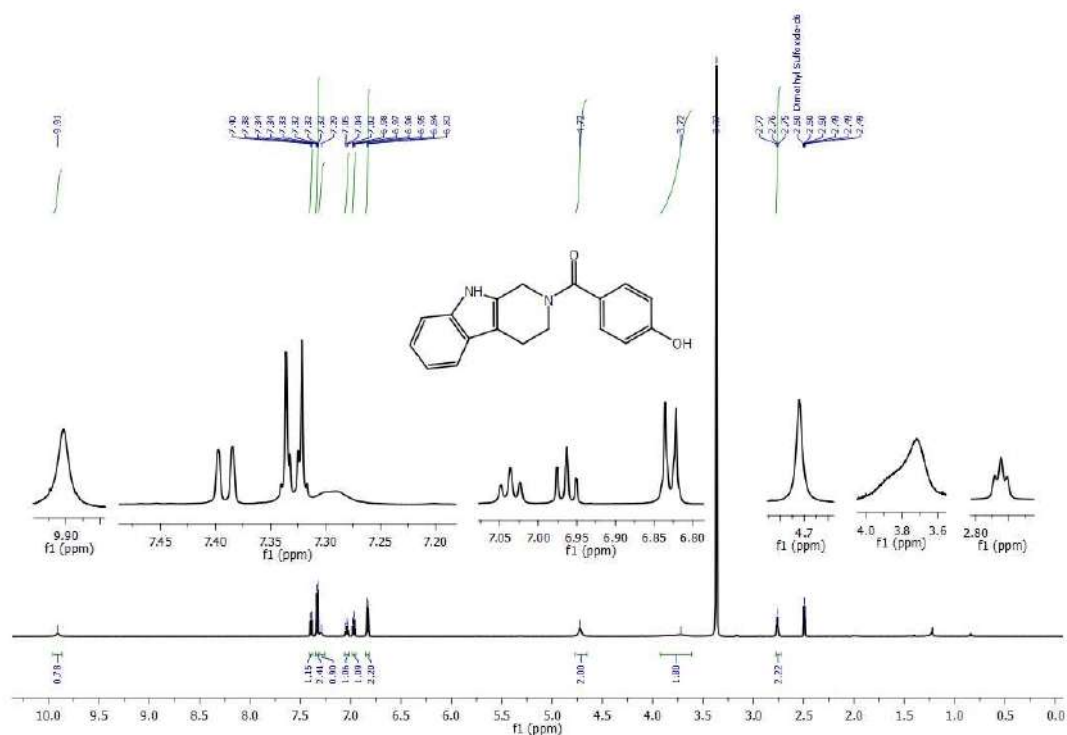


Figura A2. 1. RMN ^1H do composto **36** em $\text{DMSO-}d_6$, a 600 MHz.

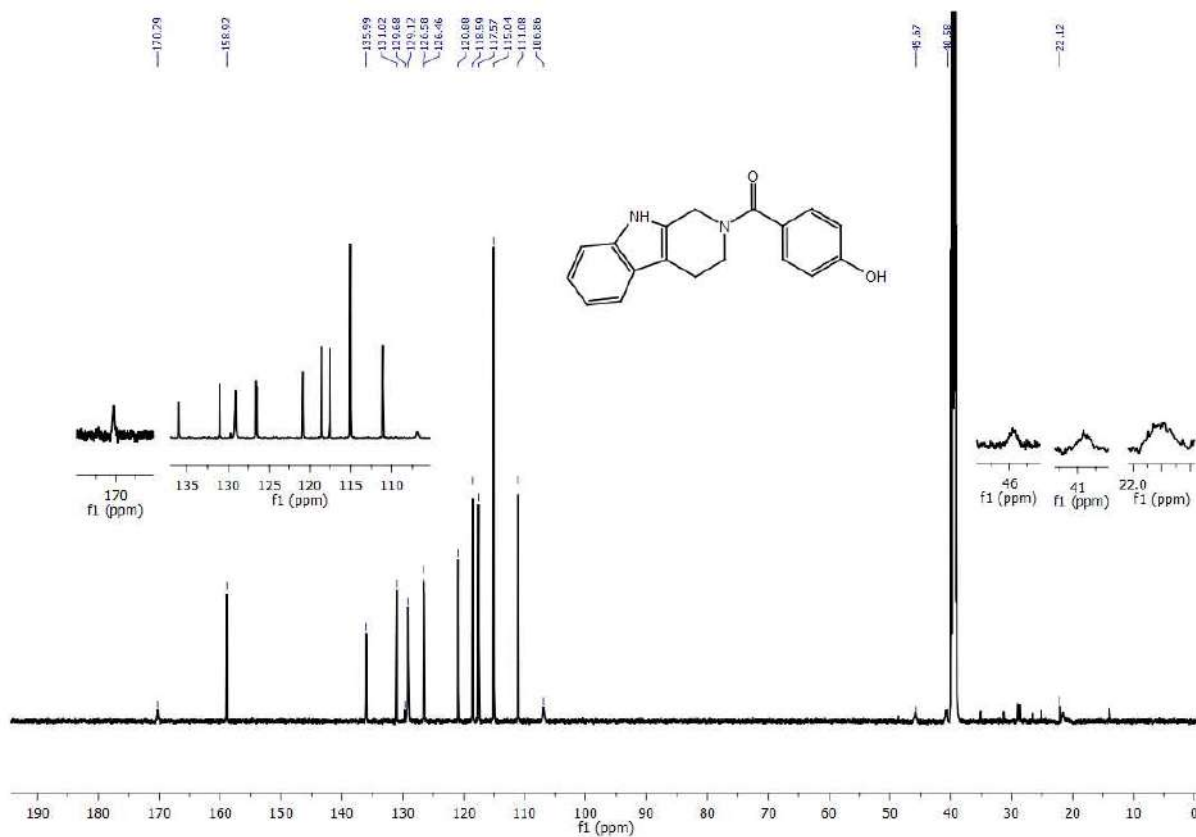
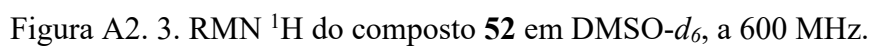


Figura A2. 2. RMN ^{13}C do composto **36** em $\text{DMSO-}d_6$, a 151 MHz.



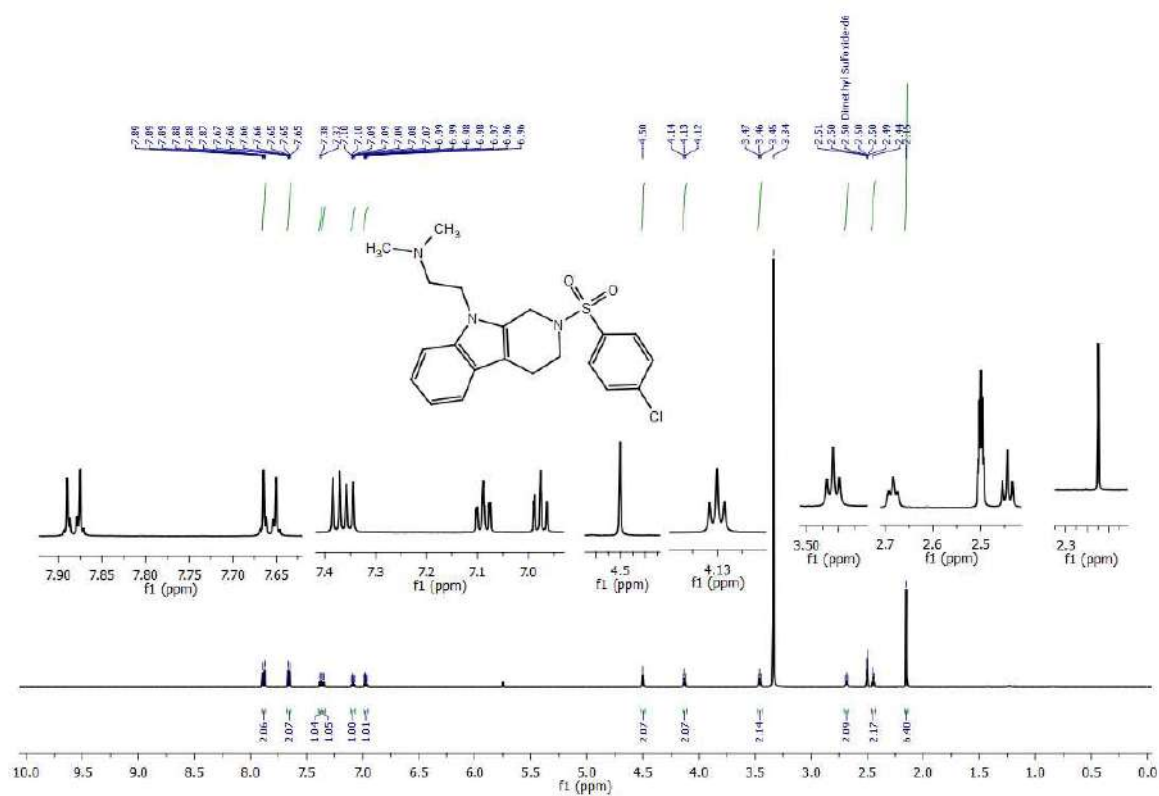


Figura A2. 5. RMN ¹H do composto **37** em DMSO-*d*₆, a 600 MHz.

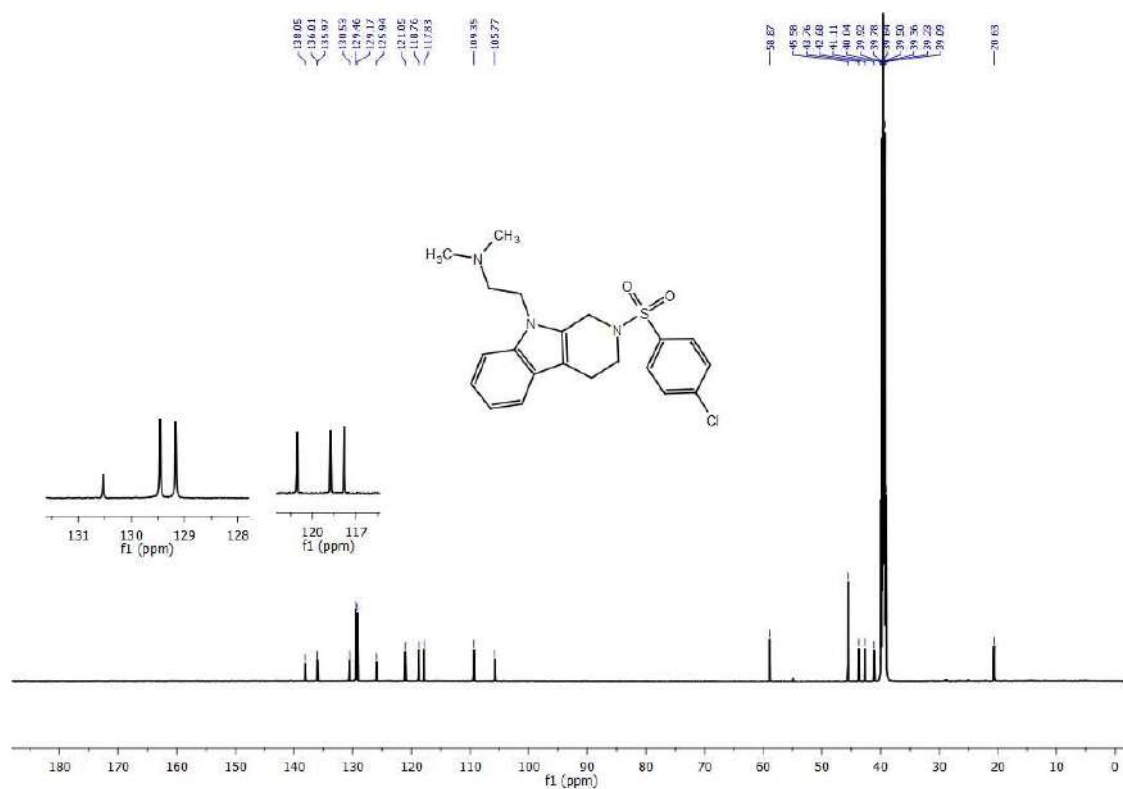


Figura A2. 6. RMN ¹³C do composto **37** em DMSO-*d*₆, a 151 MHz.

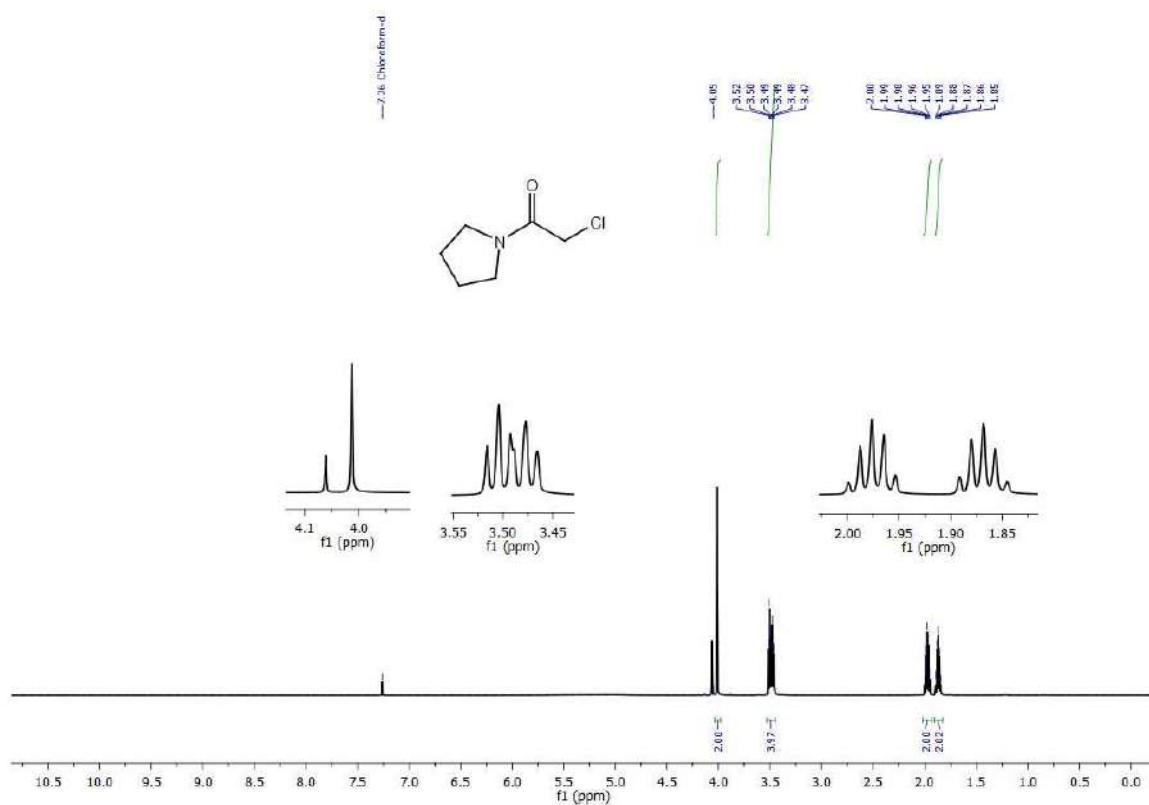


Figura A2. 7. RMN ¹H de 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona em CDCl₃, a 600 MHz.

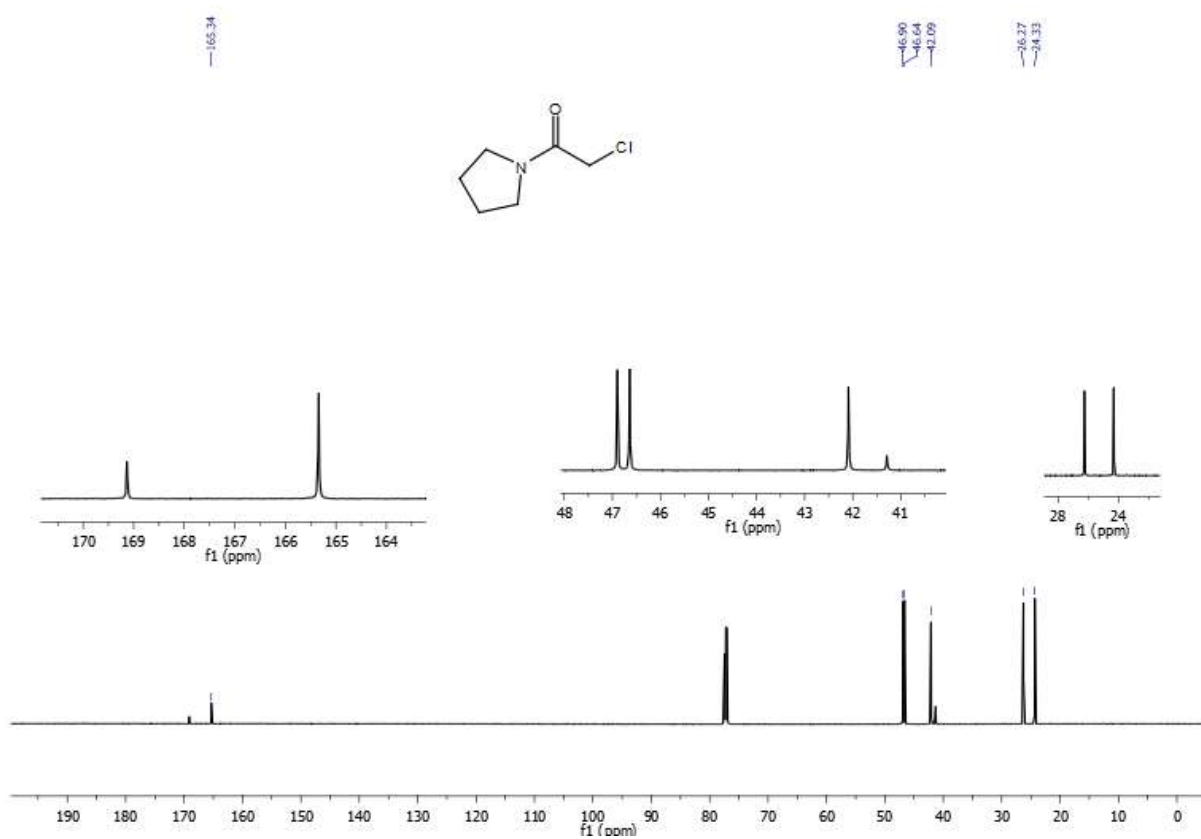


Figura A2. 8. RMN ¹³C de 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etanona em CDCl₃, a 151 MHz.

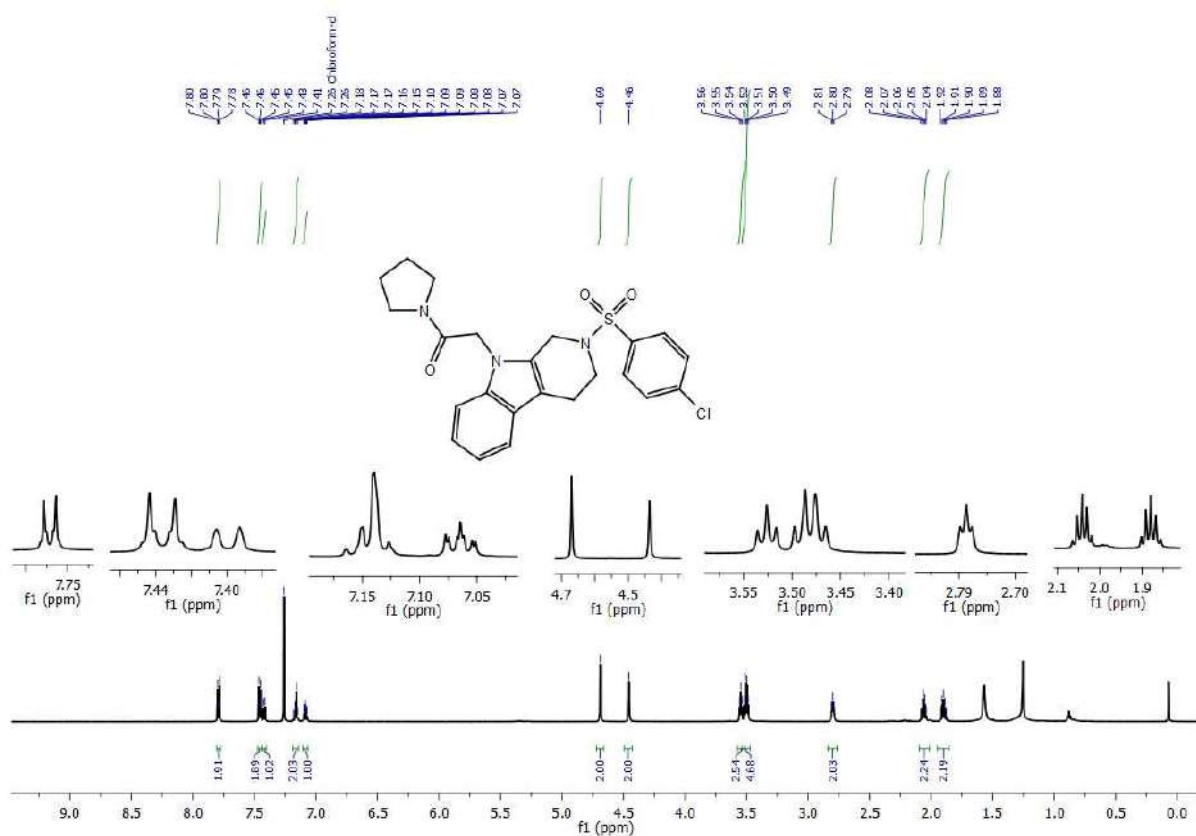


Figura A2. 9. RMN ^1H do composto **38a** CDCl_3 , a 600 MHz.

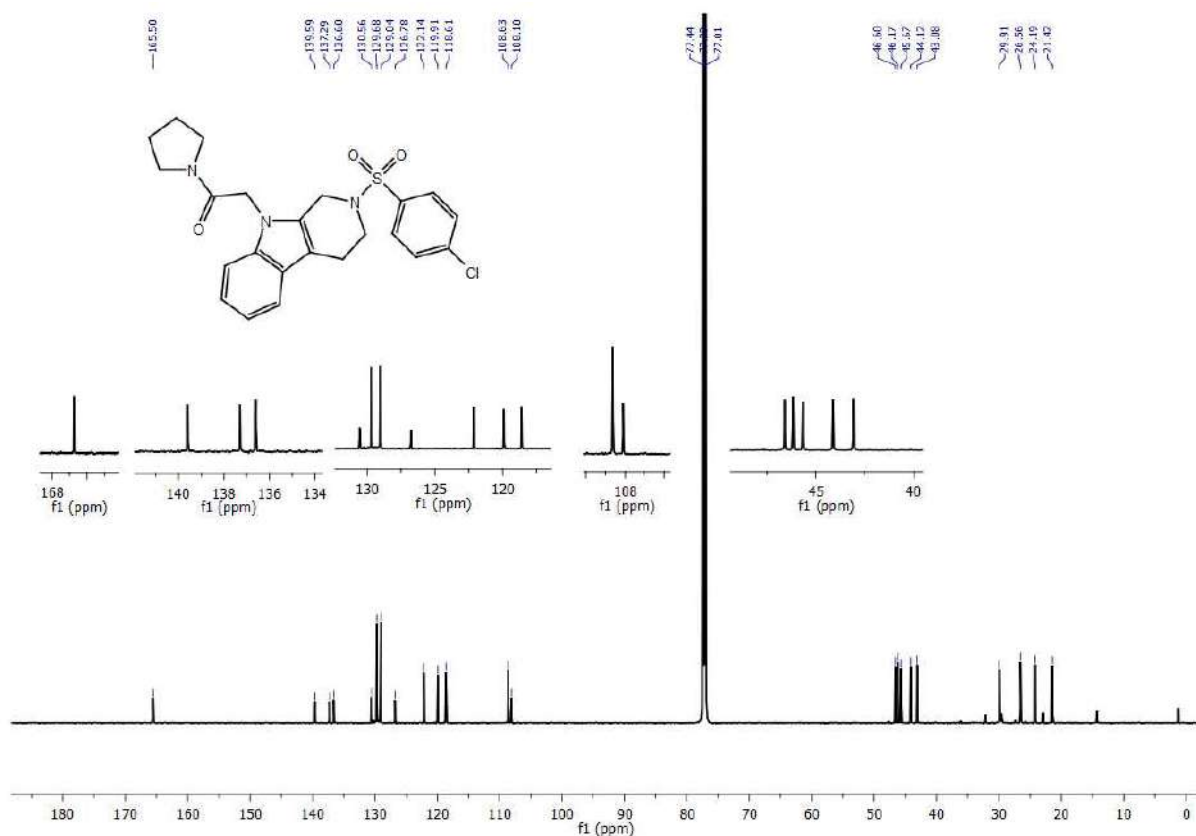


Figura A2. 10. RMN ^{13}C do composto **38a** em $\text{DMSO}-d_6$, a 151 MHz.

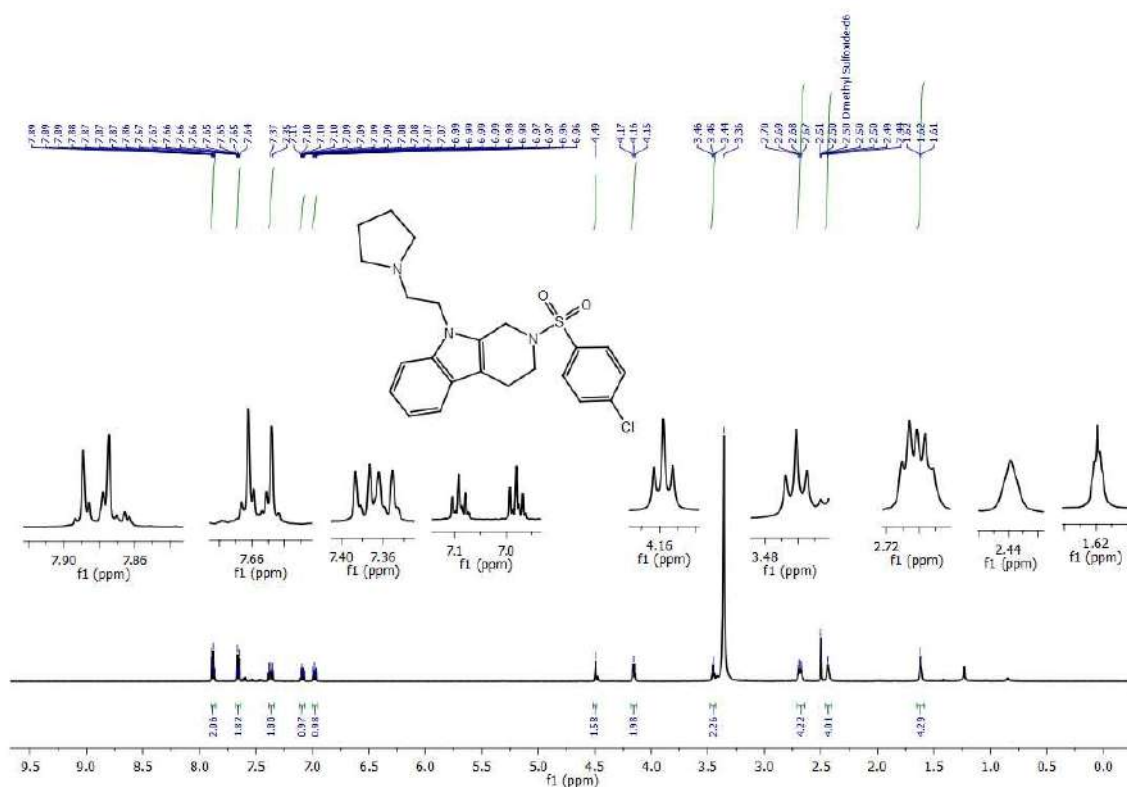


Figura A2. 11. RMN ¹H do composto **38** em DMSO-*d*₆, a 600 MHz.

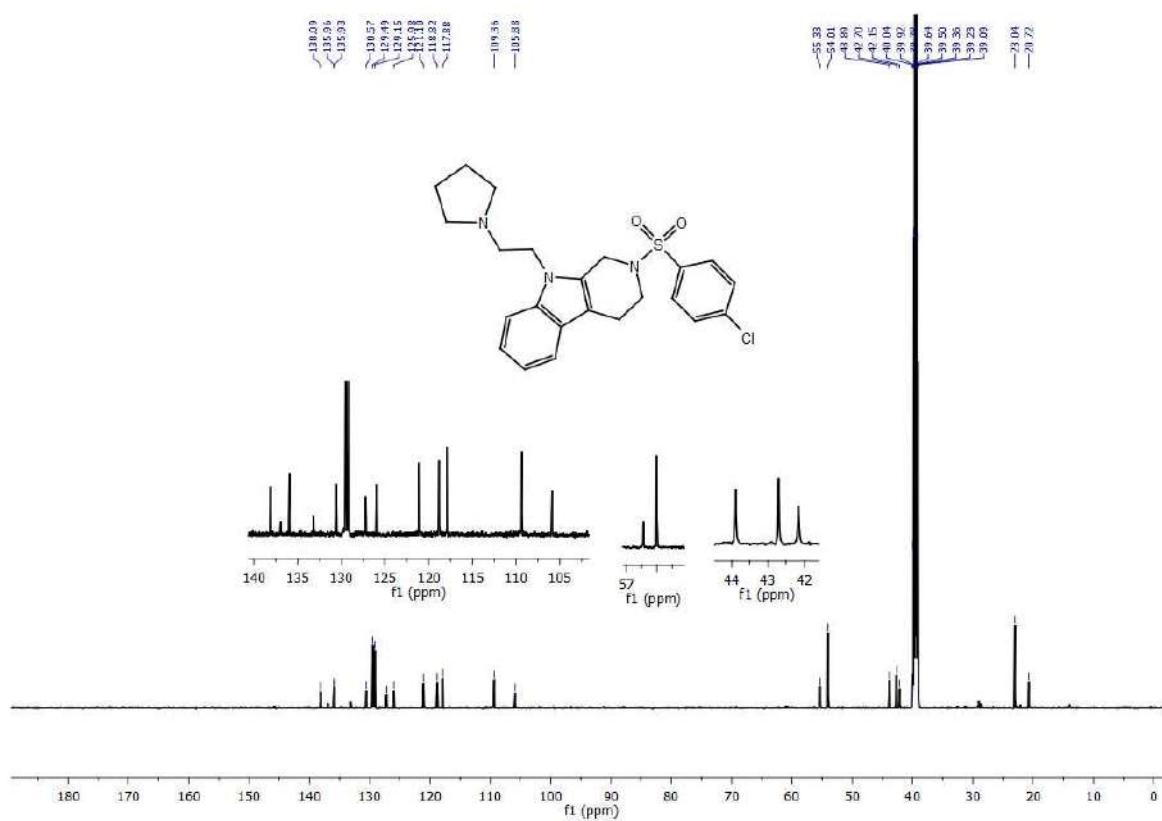


Figura A2. 12. RMN ¹³C do composto **38** em DMSO-*d*₆, a 151 MHz.

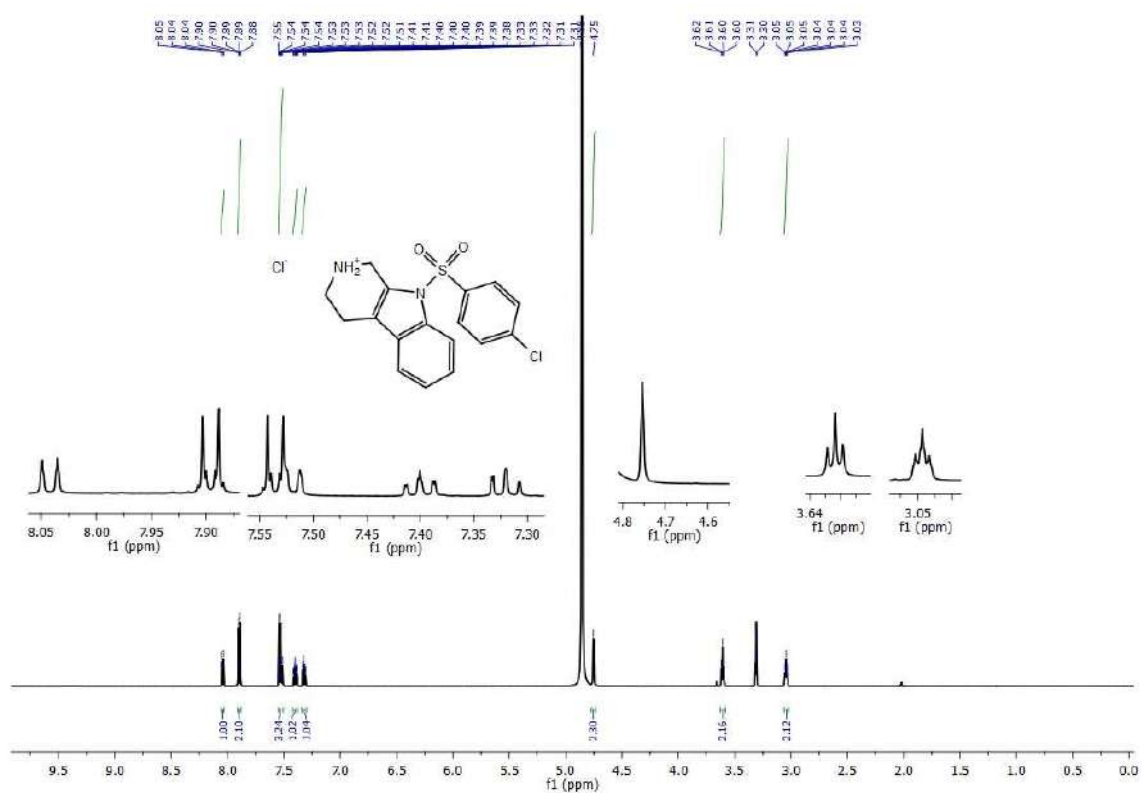


Figura A2. 15. RMN ¹H de do composto **39** em MeOD-*d*₄, a 600 MHz.

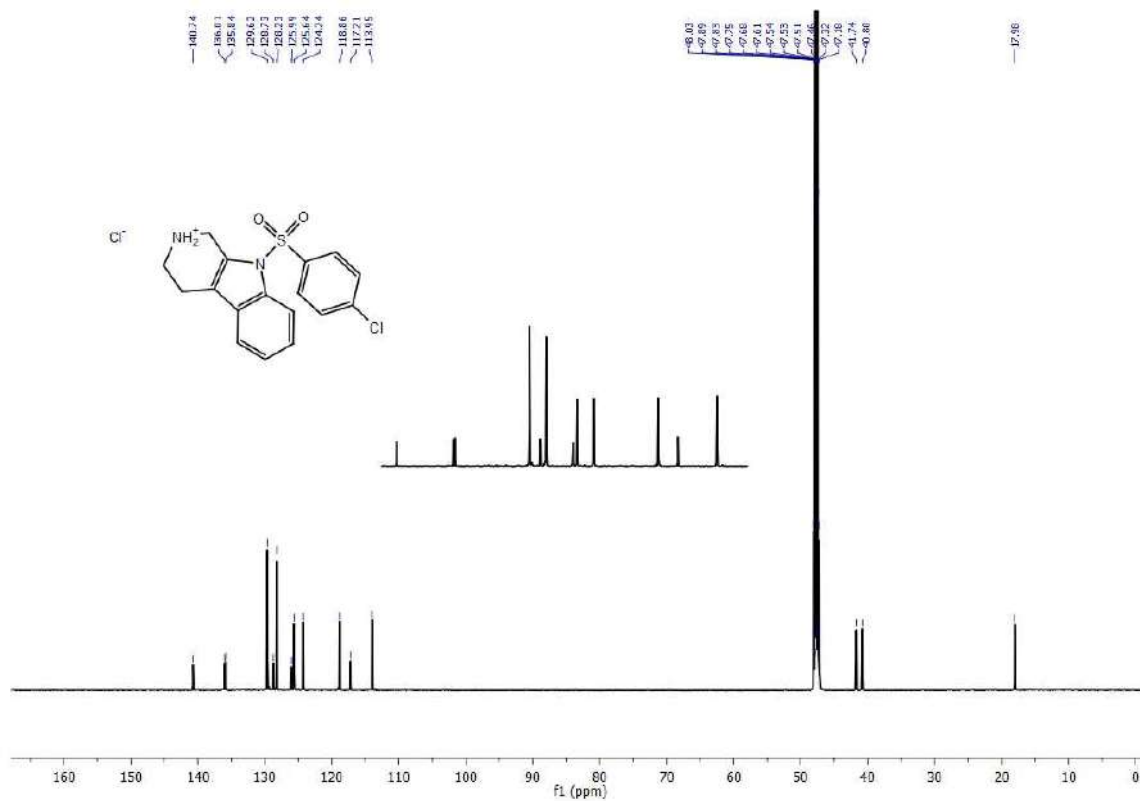


Figura A2. 16. RMN ¹³C de do composto **39** em MeOD-*d*₄, a 151 MHz.

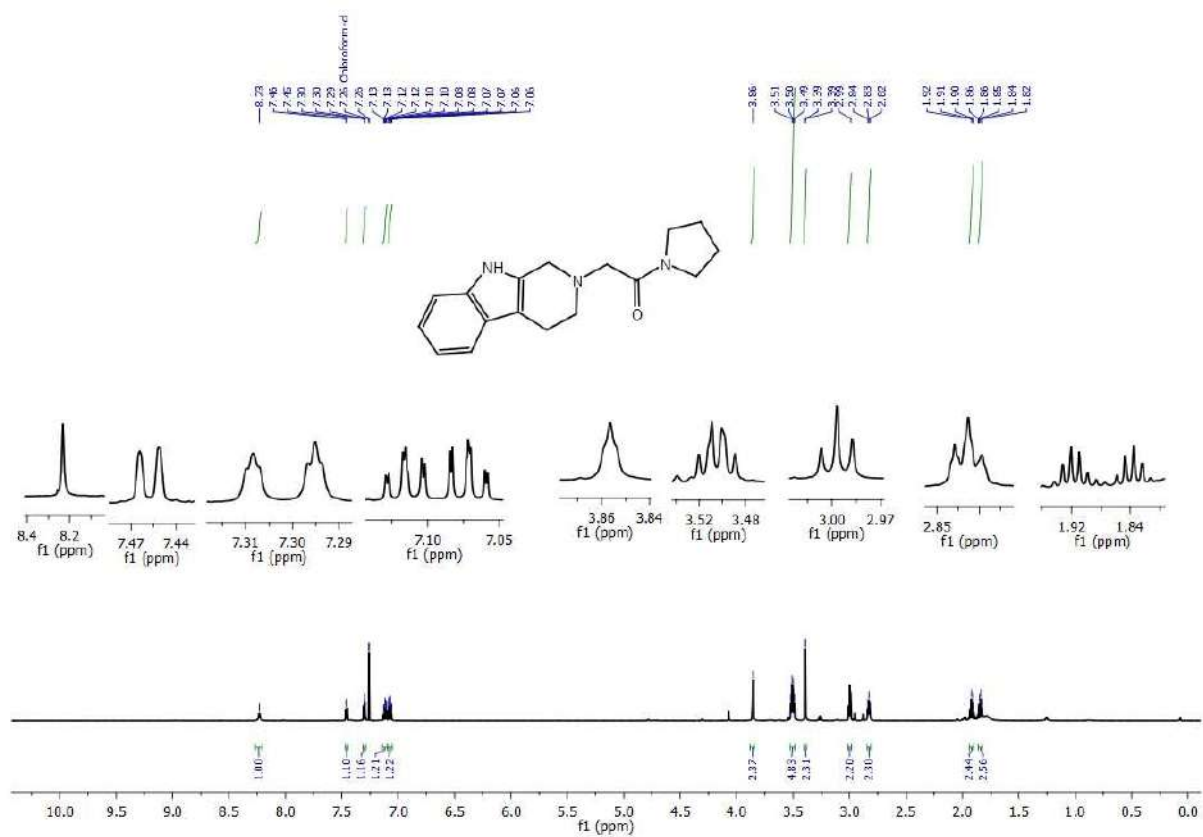


Figura A2. 17. RMN ¹H de do composto **56** em CDCl₃, a 600 MHz.

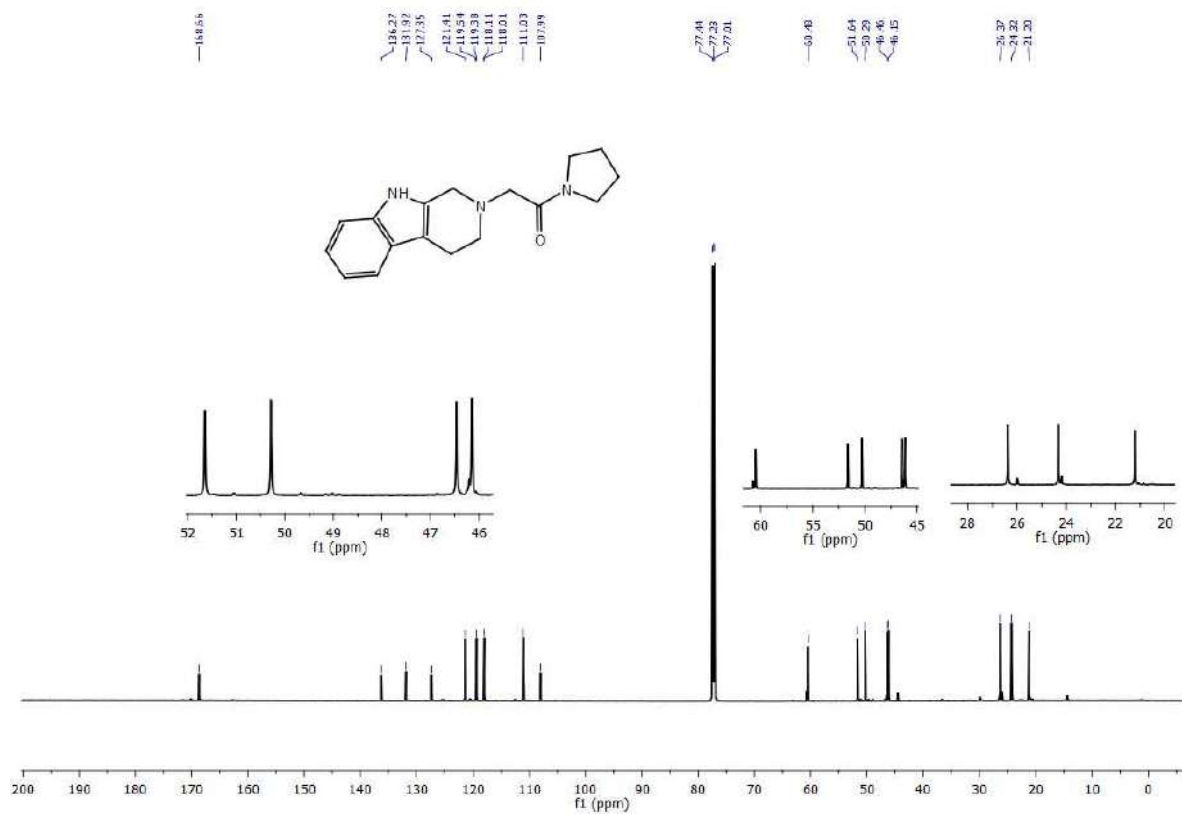


Figura A2. 18. RMN ¹³C de do composto **56** em CDCl₃, a 151 MHz.

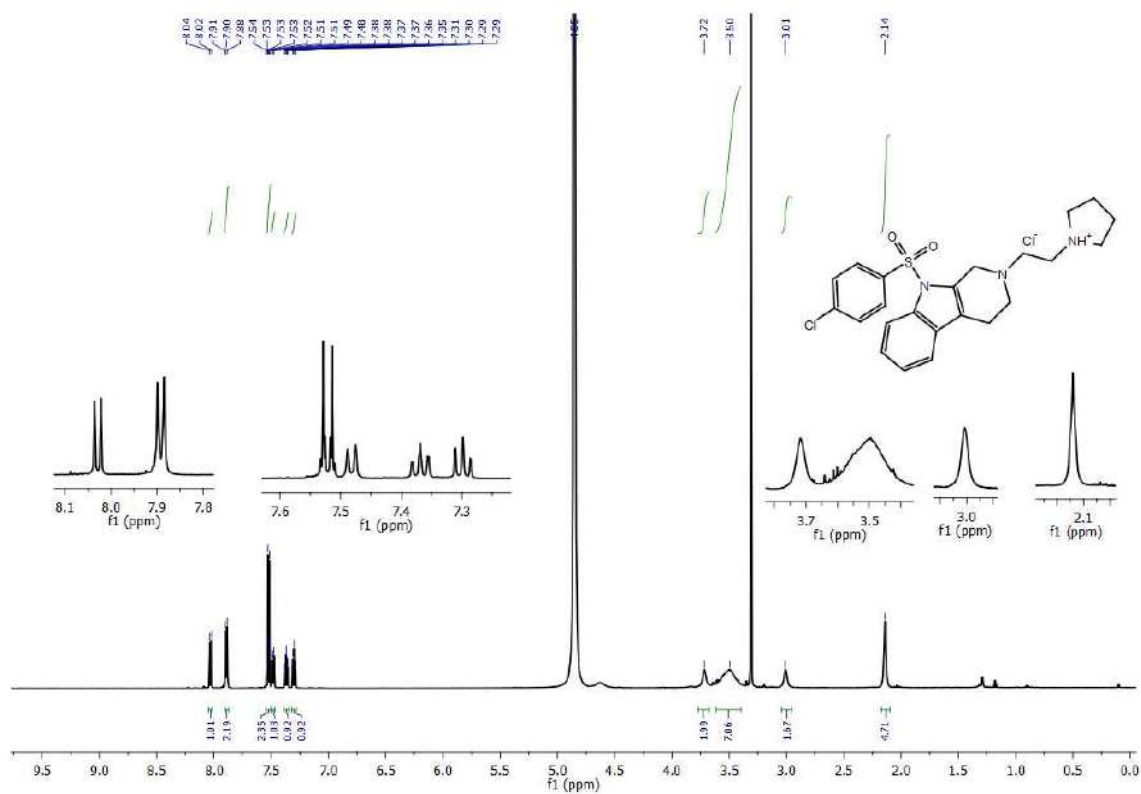


Figura A2. 19. RMN ¹H de do composto **40** em MeOD-*d*₄, a 600 MHz.

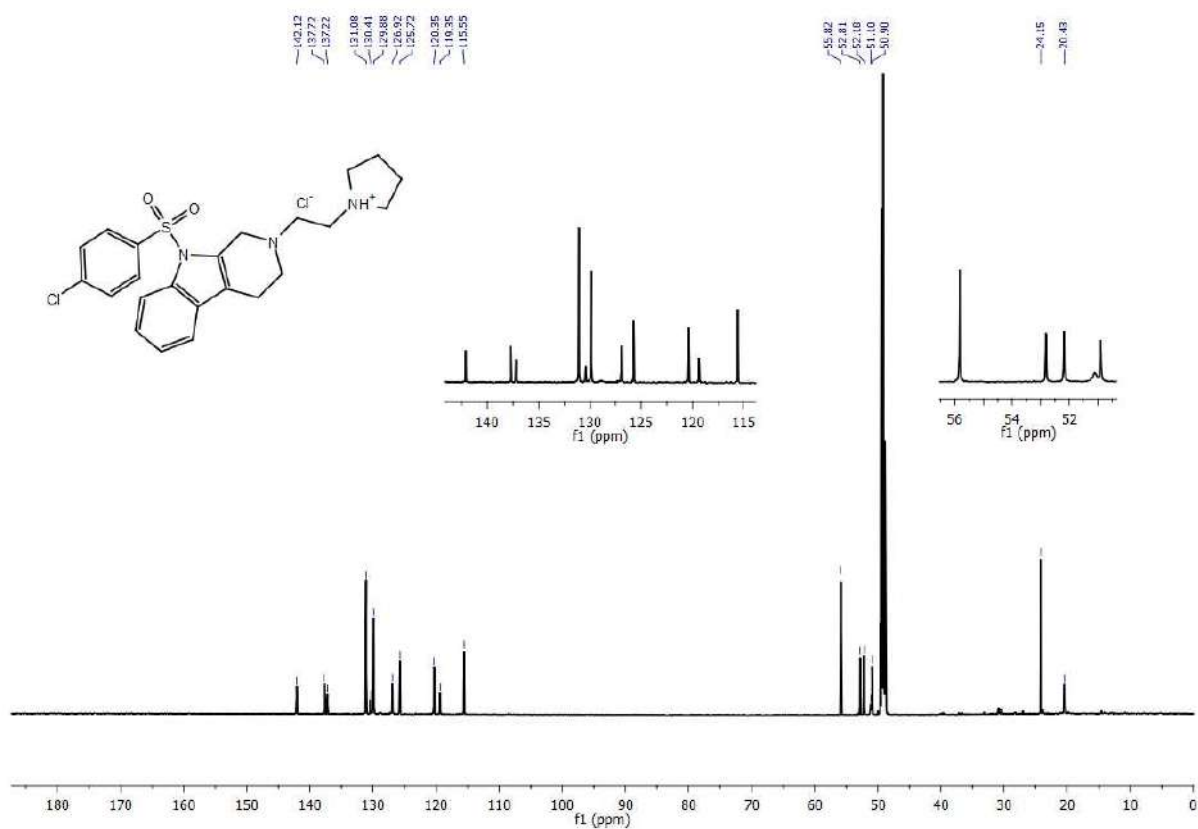


Figura A2. 20. RMN ¹³C de do composto **40** em MeOD-*d*₄, a 151 MHz.

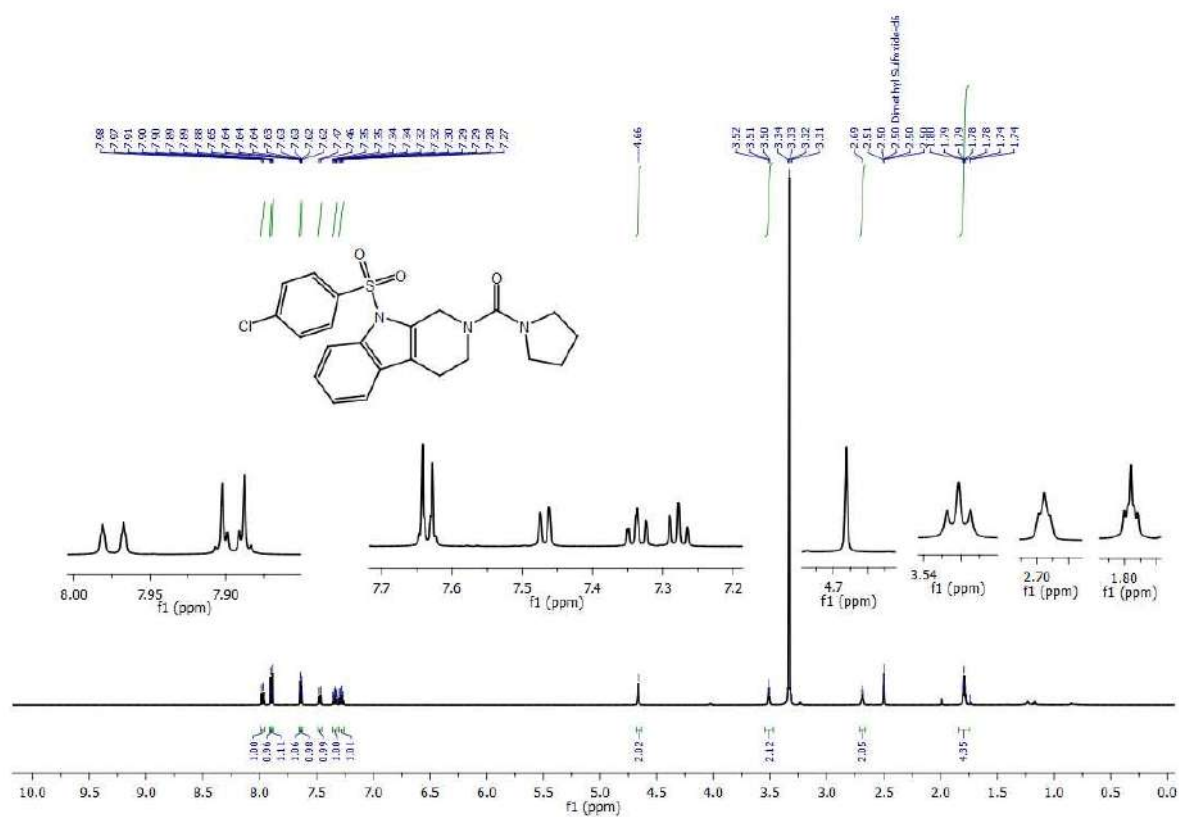


Figura A2. 21. RMN ¹H de do composto **41** em DMSO-*d*₆, a 600 MHz.

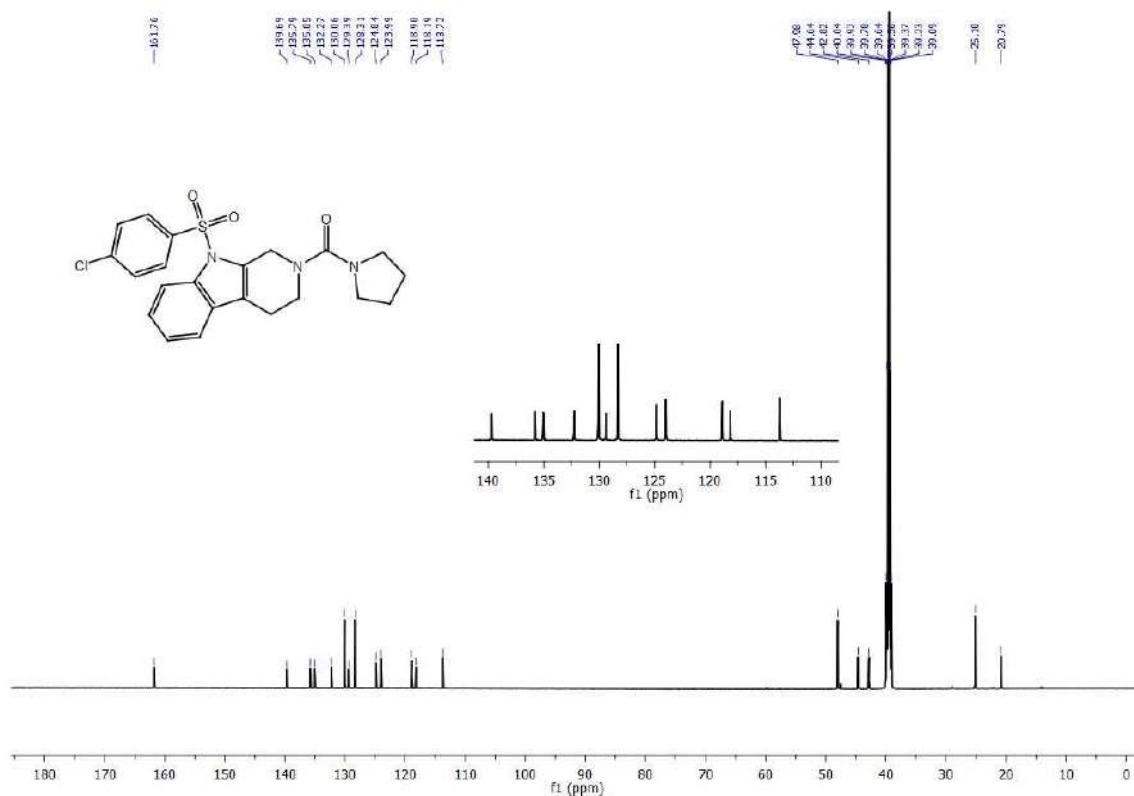


Figura A2. 22. RMN ¹³C de do composto **41** em DMSO-*d*₆, a 151 MHz.

7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente projeto representou uma contribuição concreta e qualificada ao avanço da Química Medicinal orientada ao combate de doenças tropicais negligenciadas, combinando a riqueza da biodiversidade brasileira com metodologias modernas de síntese e caracterização de compostos bioativos.

Na primeira etapa da pesquisa, foi realizado o isolamento do ácido strictosidínico — um alcaloide de reconhecida importância farmacológica — e a subsequente síntese de uma série de derivados tetrahydro- β -carbolínicos, dos quais parte é inédita na literatura científica. Embora esses compostos não tenham apresentado atividade significativa frente aos vírus da dengue (DENV-2) e da Zika (NS2B-NS3Pro), os dados obtidos forneceram subsídios críticos para a reformulação de hipóteses farmacofóricas e abriram novas perspectivas terapêuticas. Atualmente, esses derivados estão sendo avaliados frente a linhagens celulares de câncer, o que poderá revelar propriedades antitumorais não previstas inicialmente.

Na segunda fase do projeto, foram sintetizados novos derivados tetrahydro- β -carbolínicos com o objetivo de explorar o bioisosterismo entre aril-piperazinas e aril-morfolinas e tetrahydro- β -carbolinas, com foco em doenças parasitárias como a leishmaniose visceral e doença de Chagas. Além de seu mérito científico intrínseco, esta etapa também se destaca pela sua aderência aos princípios da Agenda 2030 das Nações Unidas, em especial aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3 (Saúde e Bem-Estar) e 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura). Ao propor estratégias inovadoras para o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos acessíveis e eficazes, o projeto se alinha com o esforço global de erradicar enfermidades que acometem majoritariamente populações vulneráveis e negligenciadas pela indústria farmacêutica tradicional.

Neste cenário, ganhou centralidade a colaboração internacional estabelecida com os grupos da Profa. Dra. Maria Eugenia Monge (CIBION-CONICET, Argentina) e da Profa. Dra. Mónica Cala Molina (UNIANDES, Colômbia). Esses parceiros atuarão na caracterização avançada dos compostos por meio de abordagens metabolômicas e genômicas, permitindo não apenas compreender os mecanismos moleculares de ação frente aos patógenos-alvo, mas também identificar vias metabólicas críticas e possíveis biomarcadores de eficácia. Esta integração internacional fortalece a robustez dos dados gerados, promove a circulação de saberes e tecnologias no eixo sul-sul, e reforça o protagonismo científico regional em temas de interesse humanitário global.

Os compostos sintetizados foram encaminhados para os respectivos ensaios biológicos, e os resultados são aguardados, para publicação de um artigo científico e conclusão do projeto.

À luz dos avanços já alcançados e das perspectivas científicas delineadas, a renovação da bolsa de pós-doutorado revela-se não apenas recomendável, mas essencial à continuidade e consolidação das frentes de pesquisa em desenvolvimento. A permanência do bolsista permitirá concluir etapas metodológicas cruciais, expandir os estudos de bioatividade com base nos resultados já obtidos e aprofundar a investigação de hipóteses emergentes, muitas das quais apontam para novas abordagens terapêuticas no tratamento de doenças tropicais negligenciadas. Trata-se de um momento de inflexão científica no qual a manutenção do capital humano altamente qualificado representa um diferencial estratégico para a geração de conhecimento inovador com potencial translacional.

Além disso, a proposta prevê a futura inserção de um(a) estudante de iniciação científica, cuja participação será integrada de forma orgânica às atividades experimentais, favorecendo a formação de um(a) jovem pesquisador(a) em um ambiente dinâmico, multidisciplinar e internacionalmente conectado. Tal inserção propiciará experiências formativas de elevado valor acadêmico, envolvendo desde a síntese e caracterização de compostos bioativos até o contato direto com técnicas avançadas de planejamento molecular, análise estrutural e avaliação biológica. Essa vivência promoverá não apenas a qualificação técnica do discente, mas também sua inserção precoce em redes colaborativas de pesquisa, contribuindo para o fortalecimento da base científica e tecnológica do país.

Em sua totalidade, o projeto articula com excelência os pilares de uma ciência contemporânea de impacto: rigor metodológico, inovação tecnológica, internacionalização da pesquisa e formação de recursos humanos, enquanto responde de maneira concreta a desafios globais alinhados aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, com especial ênfase no ODS 3 (Saúde e Bem-Estar) e ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura).

PARECER DA ATUAÇÃO DO DR. MARCELO AUGUSTO PEREIRA JANUÁRIO

[01-07-2024 -- 01-07-2025]

A análise do relatório final apresentado pelo Dr. Marcelo Augusto Pereira Januário revela uma atuação excepcional durante sua etapa de pós-doutorado no Instituto de Química da UNESP. O documento evidencia não apenas um domínio técnico-científico sólido, mas também rigor metodológico, além de uma capacidade de articulação interdisciplinar e colaboração em rede.

A proposta de pesquisa, centrada na síntese e avaliação de derivados do alcaloide indolmonoterpênico ácido strictosidínico com potenciais atividades antidengue e antimalárica, foi conduzida com extrema competência e dedicação. O pesquisador demonstrou profundidade teórica ao contextualizar a importância das doenças tropicais negligenciadas e a relevância farmacológica dos alcaloides indólicos, embasando de forma sólida sua estratégia científica.

Do ponto de vista experimental, a execução foi exemplar; realizou o isolamento do composto natural, desenvolveu métodos cromatográficos otimizados, conduziu sínteses sofisticadas baseadas em estratégias contemporâneas de química medicinal e obteve 15 derivados inéditos, demonstrando refinamento sintético e criteriosa caracterização espectroscópica dos produtos. Sua atuação ultrapassou a expectativa originalmente prevista, incorporando conceitos como SAR, bioisosterismo e planejamento racional de fármacos, sempre com precisão e criatividade.

Destaca-se, ainda, a sólida rede de colaborações científicas estabelecida com grupos da UFMG, Fiocruz-MG, IQ-USP e UFSCar, que ampliou a abrangência do projeto. Em especial, merece ênfase o esforço de internacionalização evidenciado no relatório. O projeto contou com o apoio do Prof. Dr. Piero Giuseppe Delprete (IRD/Guiana Francesa) para a identificação taxonômica da espécie vegetal estudada, e estabeleceu diálogo científico com a Profa. Mónica Cala Molina,

coordenadora do MetCore, a primeira plataforma de metabolômica da Colômbia, sediada na Universidad de los Andes (UNIANDES), em Bogotá. Essa articulação reforça o caráter internacional da proposta e amplia as perspectivas futuras de colaboração em metabolômica e bioprospecção na América Latina.

Ainda que os primeiros resultados biológicos não tenham identificado atividade antiviral promissora, os compostos sintetizados permanecem em avaliação para outras aplicações terapêuticas, o que confirma o caráter estratégico da proposta.

Por fim, cabe destacar o elevado nível de redação, clareza e organização do relatório, que alia riqueza de detalhes à sofisticação técnica. A atuação do Dr. Marcelo Januário ao longo deste período reflete não apenas maturidade científica, mas também grande potencial para liderar projetos inovadores na interface entre produtos naturais e química medicinal.

Como resultado direto das atividades desenvolvidas durante o período de vigência da bolsa, foi publicada a revisão intitulada “Indole Derivatives as Promising Anti-Dengue Agents: A Review of Recent Advances” na revista *Chemistry and Biodiversity* ([DOI: 10.1002/cbdv.202402517](https://doi.org/10.1002/cbdv.202402517)), com autoria de Januário, P.M.A., de Oliveira, R.J.C.O. e Castro-Gamboa, I. Além dessa contribuição relevante à área, encontram-se em fase avançada de elaboração outros manuscritos científicos derivados dos resultados obtidos no projeto, os quais também se vinculam diretamente ao financiamento concedido pela UNESP. Esses desdobramentos demonstram o impacto concreto e duradouro da pesquisa realizada, bem como o compromisso do bolsista com a divulgação qualificada de seus achados.

Diante de todo o exposto, é possível afirmar que o Dr. Marcelo Augusto Pereira Januário conduziu sua etapa de pós-doutorado com excelência, comprometimento e elevado rigor científico. Sua atuação revela não apenas competência técnica, mas também espírito colaborativo, capacidade de inovação e uma postura acadêmica exemplar. O conjunto das atividades desenvolvidas faz jus ao investimento realizado pela UNESP, demonstrando retorno científico, institucional e formativo de relevância. Por essas razões, aprovo na íntegra o relatório final apresentado, destacando a qualidade da pesquisa desenvolvida no âmbito da Universidade.

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Supervisor