

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

JOÃO ANDRADE COSTA

**NOVOS DERIVADOS DA PRIMAQUINA PLANEJADOS
COMO POSSÍVEIS ANTIPLASMÓDICOS**

RIO DE JANEIRO

2025

João Andrade Costa

NOVOS DERIVADOS DA PRIMAQUINA PLANEJADOS COM POSSÍVEIS ANTIPLASMÓDICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadores: Dra. Nubia Boechat

Dr. Rodolfo Rodrigo Florido França

Rio de Janeiro

2025

Costa, João Andrade.

Novos derivados da primaquina planejados como possíveis antiplasmódicos / João Andrade Costa. – 2025.

155 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Farmacologia e Química Medicinal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Rio de Janeiro, 2025.

Orientadores: Núbia Boechat e Rodolfo Rodrigo Florido França.

1. Química Medicinal. 2. Malária. 3. *Plasmodium vivax*. 4. Farmacologia.

I. Boechat, Núbia. II. França, Rodolfo Rodrigo Florido. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. IV. Título.



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde Instituto de Ciências
Biomédicas
Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal

“NOVOS DERIVADOS DA PRIMAQUINA PLANEJADOS COMO
POSSÍVEIS ANTIPLASMÓDICOS”

João Andrade Costa

Orientadora:

Profa. Dra. Nubia Boechat

Coorientador:

Prof. Dr. Rodolfo Rodrigo Florido França

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Aprovada por:

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIS EDUARDO MENEZES QUINTAS
Data: 08/04/2025 21:37:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas – PPGFQM-UFRJ

Documento assinado digitalmente
gov.br NELILMA CORREIA ROMEIRO
Data: 07/04/2025 15:47:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Nelilma Correia Romeiro – UFRJ-Macaé

Documento assinado digitalmente
gov.br AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
Data: 27/03/2025 09:38:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Aurea Echevarria – UFRRJ

Documento assinado digitalmente
gov.br NUBIA BOECHAT ANDRADE
Data: 24/03/2025 14:36:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Nubia Boechat

Documento assinado digitalmente



RODOLFO RODRIGO FLORIDO FRANÇA

Data: 24/03/2025 16:21:47-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodolfo Rodrigo Florido França

Rio de Janeiro

20 de março de 2025

AGRADECIMENTOS

Eu início esses agradecimentos, dizendo que NADA, absolutamente nada na vida se faz sozinho. Digo isso, porque desde o meu processo de ingresso na pós-graduação, até a etapa final, me considero uma pessoa de muita sorte, por ter tido contribuições importantes de pessoas muito generosas e bondosas, que a vida colocou no meu caminho para me impulsionar para algo melhor.

A primeira pessoa que eu gostaria de agradecer é a Dra. Nubia Boechat, que lá no início quando eu estava recém-chegado de São Vicente, mesmo sem me conhecer direito, me deu um voto de confiança e oportunidade de estar em um ambiente de tanta excelência e aprendizado, ao mesmo tempo sem perder o olhar humano para com as outras pessoas. Agradeço imensamente por ter me proporcionado essa experiência de vida e profissional.

Outra pessoa que gostaria de expressar minha mais profunda gratidão, cuja dedicação, personalidade e apoio foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal ao longo desta jornada é o Dr. Rodolfo França. Eu tive a sorte de tê-lo também como orientador. Agradeço por me aceitar como orientando e pela sua paciência em me ensinar do zero, logo que cheguei no laboratório.

Gostaria de agradecer a Paula Miranda, pesquisadora do laboratório de Síntese de Fármacos – LASFAR, de Farmanguinhos, com quem tive o prazer de ter tido excelentes trocas. Devo atribuí-la também a orientação deste processo de dissertação. Agradeço pelas conversas, das mais diversas possíveis, e pelo apoio. Você foi uma pessoa muito importante nesse decorrer do mestrado.

O LASFAR, é um ambiente de muita troca, cooperação, trabalho em equipe, incentivo e amizade, um bom exemplo de como deveria ser todo o ambiente de pesquisa/acadêmico. Quando ingressei nesse laboratório fiquei fascinado com as pessoas de uma forma geral, sempre com uma palavra de incentivo. Dessa forma, vale ressaltar meus agradecimentos a todos que compõem esse espaço, dentre eles: Dr. Frederico, Dr. João Mafra, Dr. Felipe, a Elaine e a nossa querida Lúcia, que hoje já não se encontra entre nós, mas que faz muita falta no laboratório sempre com sua risada única e contagiante.

Nesse meio do caminho encontrei e tive trocas com outros membros do laboratório, transformando o processo da pós-graduação muito mais rico por conta da nossa rede de apoio. Marília Gandi, Leonardo Ferreira e Mayara Kelly, vocês foram muito importantes! Obrigado por todo os desabafos, risadas e conversas.

Eu não posso deixar de agradecer e também dedicar essa dissertação a minha família e amigos que mesmo morando em outra cidade, não deixou de me ajudar e incentivar, então deixo aqui meus mais sinceros agradecimentos. Destaco a importância de Caroline Vaz, Letícia Santana e Izabelle Benfato, companheiras de vida, a família que eu pude escolher.

Gostaria de deixar registrado aqui a importância do meu companheiro, Daniel Macedo, que foi fundamental em todo o processo que vivi nesse período de mestrado. Muito obrigado por ser uma pessoa incrível e muitas vezes jogar luz em momentos não tão luminosos para mim. Obrigado por me ajudar e me incentivar. Obrigado por acreditar em mim. Com certeza, sem você eu não teria ingressado na pós-graduação. Muito obrigado, te amo.

Neste processo fui contemplado com uma bolsa da CAPES. Torna-se, portanto, de grande valia ressaltar a importância do investimento público na formação de iniciantes pesquisadores brasileiros. Acima de tudo, devemos compreender a importância da universidade pública, no caso desta pesquisa à UFRJ, mas também ao trabalho importantíssimo que a FIOCRUZ, local que me acolheu para o desenvolvimento da minha pesquisa, exerce no país. Sigamos lutando por incentivos para a ciência e educação, que outros possam vir a ter acesso e construir através da ciência e da equidade social um Brasil melhor.

Por último, agradeço a espiritualidade por toda ajuda e amparo nesse período. Especialmente por não estar na minha cidade de origem, longe da família e amigos! Obrigado por abrir meus caminhos, possibilitando que as pessoas certas de aproximassem de mim.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa de origem parasitária, provocada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, foram registrados aproximadamente 227 milhões de casos em 85 países onde a malária é endêmica. Dentre as espécies de *Plasmodium* responsáveis por infecções humanas, *Plasmodium vivax* é a mais prevalente no Brasil. O tratamento da malária é específico para cada espécie de *Plasmodium* e geralmente é realizado por meio de terapias combinadas baseadas em derivados da artemisinina e quinolínicos. As terapias combinadas têm o objetivo de minimizar o risco de desenvolvimento de resistência parasitária aos fármacos empregados, embora, já tenham sido identificadas. As substâncias 8-aminoquinolínicas, primaquina (PQ) ou a tafenoquina TQ, juntamente com a CQ, são os únicos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da malária causada por *Plasmodium vivax*. No entanto, indivíduos com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase não devem utilizar a PQ ou a TQ, devido ao risco de desenvolvimento de anemia hemolítica grave, potencialmente fatal. Assim, é necessário buscar novos derivados da PQ com o objetivo de otimizar a atividade antiplasmódica e diminuir a toxicidade. Foram realizadas modificações estruturais na amina terminal da cadeia alquílica da TQ, acrescentando o grupo acetamida ligado a heterociclos azólicos. Quatro novos derivados foram obtidos em rendimentos satisfatórios através de uma rota de síntese simples composta de duas etapas reacionais. Esses derivados foram avaliados em modelo *in vitro* contra cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum*, a qual não demonstraram potência significativa. A citotoxicidade foi avaliada em células de hepatocarcinoma humano e todos os derivados demonstraram baixa toxicidade.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, Primaquina,

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease of parasitic origin caused by protozoa of the *Plasmodium* genus, which are transmitted through the bite of infected female mosquitoes of the *Anopheles* genus. According to data from the World Health Organization (WHO), in 2019, approximately 227 million cases were reported in 85 countries where malaria is endemic. Among the *Plasmodium* species responsible for human infections, *Plasmodium vivax* is the most prevalent in Brazil.

Malaria treatment is specific to each *Plasmodium* species and is generally carried out using combination therapies based on artemisinin and quinoline derivatives. These combination therapies aim to minimize the risk of developing parasitic resistance to the employed drugs, although resistance has already been identified. The 8-aminoquinoline substances, primaquine (PQ) or tafenoquine (TQ), along with chloroquine (CQ), are the only currently available drugs for the treatment of *Plasmodium vivax* malaria. However, individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency should not use PQ or TQ due to the risk of developing severe and potentially fatal hemolytic anemia.

Therefore, it is necessary to search for new derivatives for new PQ derivatives to optimize antiparasitic activity and reduce toxicity. Structural modifications were made to the terminal amine of the alkyl chain of TQ, adding an acetamide group linked to azole heterocycles. Four new derivatives were obtained in satisfactory yields through a simple two-step synthesis route. These derivatives were evaluated in an in vitro model against the *Plasmodium falciparum* 3D7 strain, but they did not demonstrate significant potency. Cytotoxicity was assessed in human hepatocarcinoma cells, and all derivatives exhibited low toxicity.

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, Primaquine, G6PD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência global dos casos de malária entre 2000 e 2022. Fonte: World Malária Report 2023.	20
Figura 2. Número de mortes ocasionadas por malária entre os anos de 2000 e 2019....	20
Figura 3. Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro. Adaptado de Pratt-Riccio et al, 2021).....	23
Figura 4. Fármacos utilizados no tratamento da malária.....	24
Figura 5. ACTs utilizadas no tratamento da malária.	31
Figura 6. Derivados desenvolvidos pelo grupo com atividade anti-Plasmodium.	33
Figura 7. Derivados da PQ desenvolvidos pelo grupo.	34
Figura 8. Estrutura química da PQ e de um dos seus metabólitos, a carboxiprimaquina (8).	35
Figura 9. Estruturas químicas da bulaquina e dos derivados peptídicos que apresentaram atividade contra o <i>Plasmodium</i>	35
Figura 10. Planejamento molecular dos derivados 11a-d.....	38
Figura 11. Espectro de massas com ionização por eletrospray do intermediário 12.....	41
Figura 12. Espectro de massas com ionização por elétrons do intermediário 12.....	42
Figura 13. Espectros de massas com ionização por elétrons dos derivados 11a-d. A) Espectro de massas do derivado 11a; B) Espectro de massas do derivado 11b; C) Espectro de massas do derivado 11c; D) Espectro de massas do derivado 11d.....	45
Figura 14. Espectro de massas de alta resolução do derivado 11a.	46
Figura 15. Numeração adotada para atribuição dos sinais de RMN dos derivados 11a-d.	47
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do derivado 11a. Solvente: DMSO- d_6	48
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H do derivado 11b. Solvente: DMSO- d_6	49
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H do derivado 11c. Solvente: DMSO- d_6	50
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do derivado 11d. Solvente: DMSO- d_6	51
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 11a. Solvente: DMSO- d_6	53
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 11b. Solvente: DMSO- d_6	54
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 11c. Solvente: DMSO- d_6	55
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 11d. Solvente: DMSO- d_6	56
Figura 24. Espectroscopia na região do infravermelho do derivado 11a.	58

Figura 25. Espectroscopia na região do infravermelho do derivado 11b.	59
Figura 26. Cromatogramas em 261 nm dos derivados 11a-d.	62
Figura 27. Espectro de massas por ionização por elétrons do intermediário 12	84
Figura 28. Espectro de massas por ionização por eletrospray do intermediário 12	86
Figura 29. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado 11a	88
Figura 30. Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado 11a	90
Figura 31. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado 11a . Solvente: DMSO- d_6 . ..	92
Figura 32. Espectro ampliado de RMN ^1H (500 MHz) do derivado 11a . Solvente: DMSO- d_6	94
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11a . Solvente: DMSO- d_6 . .	96
Figura 34. Espectro ampliado de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11a . Solvente: DMSO- d_6	98
Figura 35. Espectro na região do infravermelho do derivado 11a	100
Figura 36. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11a . λ = 261 nm.	100
Figura 37. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11a . λ = 361 nm.	101
Figura 38. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11a . λ = 324 nm.	102
Figura 39. Espectro de ultravioleta do derivado 11a	104
Figura 40. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado 11b	106
Figura 41. Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado 11b	108
Figura 42. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado 11b . Solvente: DMSO- d_6 . ..	110
Figura 43. Espectro ampliado de RMN ^1H (400 MHz) do derivado 11b . Solvente: DMSO- d_6	112
Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11b . Solvente: DMSO- d_6 . ..	114
Figura 45. Espectro ampliado de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11b . Solvente: DMSO- d_6	116
Figura 46. Espectro na região do infravermelho do derivado 11b	118
Figura 47. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11b . λ = 261 nm.	118

Figura 48. Espectro de ultravioleta do derivado 11b	119
Figura 49. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado 11c	122
Figura 50. Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado 11c	124
Figura 51. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado 11c . Solvente: DMSO- d_6	126
Figura 52. Espectro ampliado de RMN ^1H (500 MHz) do derivado 11c . Solvente: DMSO- d_6	128
Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11c . Solvente: DMSO- d_6	130
Figura 54. Espectro ampliado de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11c . Solvente: DMSO- d_6	132
Figura 55. Espectro na região do infravermelho do derivado 11c	134
Figura 56. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11c . λ = 261 nm.	134
Figura 57. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11c . λ = 361 nm.	135
Figura 58. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11c . λ = 324 nm.	136
Figura 59. Espectro de ultravioleta do derivado 11c	138
Figura 60. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado 11d	140
Figura 61. Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado 11d	142
Figura 62. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado 11d . Solvente: DMSO- d_6	144
Figura 63. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado 11d . Solvente: DMSO- d_6	146
Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11d . Solvente: DMSO- d_6	148
Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado 11d . Solvente: DMSO- d_6	150
Figura 66. Espectro na região do infravermelho do derivado 11d	152
Figura 67. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11d . λ = 261 nm.	152
Figura 68. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11d . λ = 361 nm.	153
Figura 69. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado 11d . λ = 324 nm.	154
Figura 70. Espectro de ultravioleta do derivado 11d	156

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rota de síntese utilizada para obtenção dos derivados planejados 11a-d...	39
Esquema 2. Obtenção do intermediário 12.....	40
Esquema 3. Proposta de fragmentação para o intermediário 12.....	42
Esquema 4. Obtenção dos derivados planejados 11a-d, tempos reacionais e rendimentos brutos.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Purificação dos derivados 11a-d.....	44
Tabela 2. Dados de espectrometria de massas com ionização por elétrons dos derivados 11a-d.	45
Tabela 3. Dados de espectrometria de massas de alta resolução dos derivados 11a-d...	46
Tabela 4. Dados de RMN ^1H (500 MHz) dos derivados 11a-d. Solvente: DMSO- d_6	51
Tabela 5. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) dos derivados 11a-d. Solvente: DMSO- d_6 . .	56
Tabela 6. Dados de espectroscopia na região do infravermelho dos derivados 11a-d. ..	59
Tabela 7. Dados de cromatografia líquida de alta eficiência dos derivados 11a-d.	62
Tabela 8. Critérios avaliados na Regra dos 5 de Lipinski..	66
Tabela 9. Predição <i>in silico</i> do perfil farmacocinético dos derivados através de suas características físico-químicas.....	64
Tabela 10. Avaliação preliminar <i>in vitro</i> da atividade antiplasmodica contra <i>P. falciparum</i> e da citotoxicidade dos derivados 11a-d.....	66
Tabela 11. Dados dos processos de purificação dos derivados 11a-d.....	74

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AcOEt - Acetato de etila
ACTs - Terapias Combinadas à Base de Artemisinina
AQ - Amodiaquina
ASMQ - Artesunato-mefloquina
ASSP - Artesunato + sulfadoxina-pirimetamina
CC50 - Concentração citotóxica
CCF - Cromatografia em camada fina
CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-EM - Cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas
CPCF - Método de cromatografia preparativa de camada fina
CQ - Cloroquina
CQR - Resistente à cloroquina
d – Duplete
dd – Duplo duplete
DMSO-d6 - Dimetilsulfóxido deuterado
EMAR - Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray
EM-IES - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
ERO - Espécies reativas de oxigênio
G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase
HepG2 - Hepatocarcinoma humano
Hex - Hexano
Hz - Hertz
IC50 - Concentração inibitória para 50% do crescimento do parasito
IS - Índice de seletividade
IV - Espectroscopia na região do infravermelho
LUM - Lumefantrina
Mod - Moderada
N - Não
NADPH - Coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO - Óxido nítrico
OMS - Organização Mundial da Saúde

ppm - Partes por milhão

PPQ - Piperaquina

PQ - Primaquina

QN - Quinina

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMN ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1

S - Sim

s - Simpleto

SFX - Sulfadoxina

Sol - Solúvel

t - Tripleto

TQ - Tafenoquina

UV - Ultravioleta

V/V - Volume a volume

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Epidemiologia da malária na escala mundial	19
1.2	Epidemiologia da malária no Brasil	21
1.3	Ciclo evolutivo do parasito.....	21
1.4	Quimioterapia para o tratamento da malária	23
1.4.1	Terapias combinadas à base de artemisinina - ACT.....	29
1.5	Derivados desenvolvidos pelo nosso grupo com atividade anti- <i>Plasmodium</i>	32
1.6	Modificações moleculares na primaquina	34
2	OBJETIVO	36
2.1	Objetivos específicos	36
3	JUSTIFICATIVA	37
4	PLANEJAMENTO MOLECULAR.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Síntese dos derivados planejados 11a-d	39
5.1.1	Obtenção do intermediário 12.....	39
5.1.2	Obtenção dos derivados finais 11a-d	42
5.1.3	Análise dos derivados finais 11a-d por CLAE-UV	59
5.2	PREDIÇÃO IN SILICO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO	62
5.3	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	65
5.3.1	Atividade antiplasmódica e citotoxicidade	65
6	CONCLUSÃO	67
7	PARTE EXPERIMENTAL	68
7.1	Materiais e Métodos	68

7.2	Obtenção do intermediário 2-cloro- <i>N</i> -(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)acetamida (12)	69
7.3	Obtenção dos derivados 11a-d.....	70
7.3.1	Procedimento geral para obtenção dos derivados 11a-d.....	70
7.4	Processo de purificação dos derivados finais	73
7.5	Avaliação biológica	74
7.5.1	Cultivo <i>in vitro</i> do <i>Plasmodium falciparum</i>	74
7.5.2	Atividade inibitória contra o <i>P. falciparum</i> utilizando o ensaio de SYBR green	74
7.5.3	Citotoxicidade em células de hepatocarcinoma humano (HepG2)	75
	REFERÊNCIAS	76
	CADERNO DE ESPECTROS	80

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária infecciosa provocada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo transmitida pela picada da fêmea de algumas espécies de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles*, contaminadas pelo agente patogênico (ALVEN & ADERIBIGBE, 2019). São reconhecidas cinco espécies de *Plasmodium* capazes de infectar seres humanos: *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*; dentre estas, vale destacar, a *P. falciparum* e a *P. vivax* como as mais nocivas à saúde humana (WHO, 2023).

1.1 Epidemiologia da malária na escala mundial

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), em seu mais recente relatório (WHO, 2023), em 2022 foram registrados cerca de 249 milhões de casos de malária em 85 países, onde a doença é endêmica, alcançando um aumento de 5 milhões de casos em comparação com 2021 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024), demonstrando uma evolução crescente ano após ano. No ano de 2020 foram notificados 241 milhões de casos de malária, significando um aumento expressivo se comparado ao ano de 2019, onde foram registrados 227 milhões de casos. Em apenas 4 anos, entre 2019 e 2022, houve um aumento de 8,83% no número de casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Vale ressaltar que a maior parte dos casos identificados foram notificados no continente africano.

No gráfico mostrado na figura 1, observa-se uma diminuição na incidência de casos de malária, de 81 a cada 1000 habitantes no ano 2000, para 56,8 casos em 2019. Entretanto, no ano de 2020, devido a interrupção de muitos serviços durante o período de pandemia de COVID-19, foi evidenciado um aumento de 3% no número de casos, passando para 59 casos por 1000 habitantes. As taxas de incidência permaneceram estáveis entre 2020 e 2022, registrando, nesse último ano, 58,4 ocorrências por 1000 habitantes (WHO, 2023).

De forma semelhante ao número de casos reportados, houve uma diminuição no número de mortes ocasionadas por malária entre os anos 2000 e 2019 (Figura 2). No ano 2000 foram registradas 864 mil mortes, enquanto em 2019 esse número foi reduzido para

576 mil. Já em 2020, houve um aumento de 55 mil mortes por malária, apresentando uma estimativa de 631 mil. Presume-se que esse aumento significativo de mortes esteja relacionado à interrupção de muitos serviços durante a pandemia de COVID-19. O total de mortes por malária entre crianças menores de 5 anos também diminuiu nos últimos 20 anos, de 87% em 2000 para 76% em 2015 e, desde então, sem mudanças significativas (Figura 2).

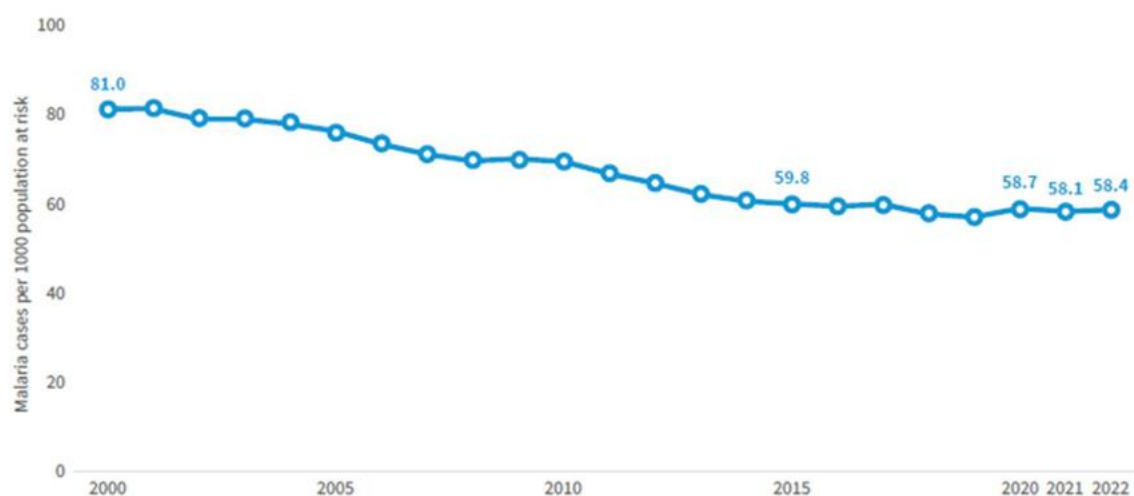


Figura 1. Incidência global dos casos de malária entre 2000 e 2022. Fonte: World Malária Report 2023.

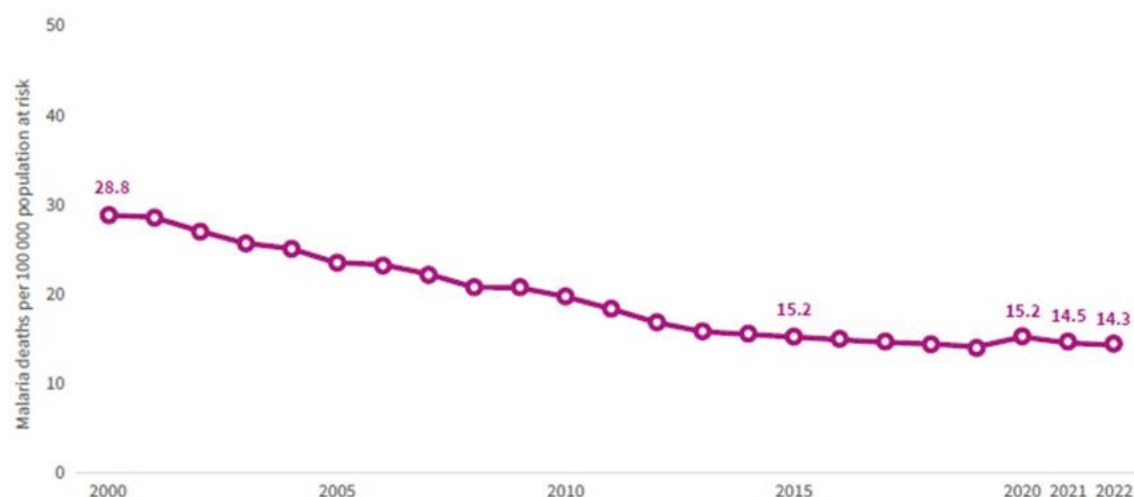


Figura 2. Número de mortes ocasionadas por malária entre os anos de 2000 e 2019.

Na região das Américas, houve uma redução dos casos de malária em 64% entre os anos de 2000 e 2020, de 1,5 milhões para 600 mil, respectivamente. A Venezuela, o Brasil e a Colômbia foram responsáveis por 73% de todos os casos nesta região, sendo a maioria destes causada pelo *P. vivax*, responsável por 72% dos casos de malária nas Américas, em 2022. (LÖDIGE & HIRSCH, 2015; WHO 2023).

1.2 Epidemiologia da malária no Brasil

No Brasil, segundo dados do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente do Ministério da Saúde, em 2022 foram notificados cerca de 131.224 casos de malária, com predominância na região da Amazônia Legal, principalmente no estado do Amazonas. Deste total, 2.256 (1,7%) casos foram importados de outros países da América do Sul. Do total de casos, em 2022, em que a transmissão ocorreu no Brasil, 108.594 (84,2%) foram causados pelo *P. vivax* e 17.981 (13,9%) pelo *P. falciparum*. Estes dados demonstram o quanto é significativa a malária causada pelo *P. vivax*. Conforme os dados preliminares, houve um acréscimo de 8,7% na incidência de casos no primeiro semestre de 2023 em relação ao mesmo período de 2022, com um total registrado de 61.975 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Há diversas medidas de prevenção e controle da malária, buscando reduzir ou eliminar a doença. O diagnóstico precoce e o tratamento imediato e adequado dos casos da doença, especialmente os casos graves, constituem ações de relevância no controle da malária. Além disso, há também estratégias de controle vetorial, como mosquiteiros de longa duração tratados com inseticida, e a importância do investimento em pesquisa, como a busca por vacinas e por quimioterápicos mais eficazes para o tratamento da malária (ASHLEY & PHYO, 2018; RABINOVICH *et al.*, 2017).

1.3 Ciclo evolutivo do parasito

O ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Plasmodium*, caracterizado pela sua complexidade, engloba o vetor (fêmea do mosquito *Anopheles*) e o hospedeiro (ser humano) (Figura 3). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Anopheles*

infectada pelo *Plasmodium* inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Estes esporozoítos infectam as células do fígado e amadurecem em esquizontes, que se rompem e liberam merozoítos. Vale ressaltar que, no caso de *P. vivax* e *P. ovale*, um estágio latente (hipnozoítos) pode permanecer no fígado e, se não for tratado, causa recidiva por invadir a corrente sanguínea semanas, meses ou até mesmo anos depois (referência). Após esta replicação inicial no fígado (estágio exo-eritrocítico - esquizogonia hepatócita), os parasitos sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos (estágio eritrocítico - esquizogonia eritrocitária) e os merozoítos infectam os glóbulos vermelhos. Alguns parasitos se diferenciam em estágios eritrocíticos sexuais (gametócitos). Os gametócitos, machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. A multiplicação dos parasitos no mosquito é conhecida como ciclo esporogônico, onde, no estômago do mosquito, os microgametas penetram nos macrogametas gerando oocinetos que se tornam móveis e alongados e invadem a parede do intestino do mosquito, se transformando em oocistos. Os oocistos crescem, se rompem, e liberam esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida do *Plasmodium*. Ao contrário do hospedeiro humano, o mosquito vetor não sofre com a presença dos parasitos (CDC.GOV, 2019; referência da própria figura).

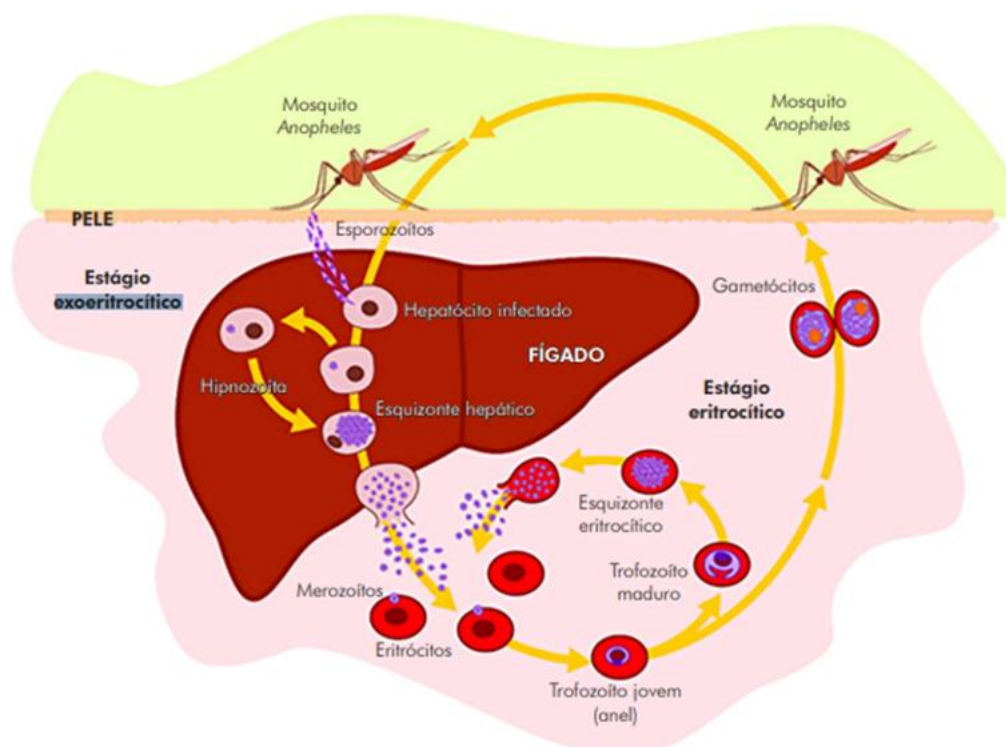


Figura 3. Ciclo evolutivo do *Plasmodium* no hospedeiro. Adaptado de Pratt-Riccio et al, 2021).

1.4 Quimioterapia para o tratamento da malária

Os fármacos utilizados no tratamento da malária são classificados com base em sua estrutura química e no estágio do ciclo de vida do *Plasmodium* em que atuam. Esses fármacos exercem seus efeitos modulando uma ou mais fases do ciclo parasitário, como a eliminação do parasito no estágio sanguíneo e a inibição do desenvolvimento de gametócitos (ALVEN & ADERIBIGBE, 2019; PINHEIRO et al., 2018).

Historicamente, o tratamento da malária foi realizado com produtos naturais extraídos de cascas, raízes e folhas de plantas. A partir da década de 1930, surgiram medicamentos antimaláricos de origem natural, semissintética e sintética. Esses fármacos foram agrupados em três principais classes: derivados quinolínicos, antifolatos e artemisinínicos. No entanto, a eficácia do tratamento é desafiada por fatores como a baixa adesão dos pacientes, o que facilita o surgimento de mecanismos de resistência por parte do *Plasmodium*. A resistência parasitária aos fármacos disponíveis representa um dos maiores obstáculos à quimioterapia antimalárica atualmente (TEIXEIRA et al., 2014; WICHT, 2020).

Os derivados quinolínicos possuem uma importância histórica notável, pois originaram o primeiro fármaco eficaz contra a malária, possibilitando o desenvolvimento de muitos outros fármacos que são usados atualmente. Esses fármacos atuam principalmente no estágio intraeritrocítico do ciclo de vida do *Plasmodium*, embora seu mecanismo de ação não seja completamente elucidado. A teoria mais aceita sugere que eles induzem a liberação do grupo heme ou ferriprotoporfirina IX, que é tóxico para o parasito ao gerar espécies reativas de oxigênio dentro do vacúolo digestivo. Em resposta, o *Plasmodium* neutraliza essa toxicidade convertendo a ferriprotoporfirina IX em hemozoína, um pigmento cristalino insolúvel e não tóxico. Dessa forma, os fármacos quinolínicos inibem a biocristalização da hemozoína, causando a morte do parasito (TEIXEIRA et al., 2014)

O tratamento da malária começou em 1820, com a descoberta da quinina (QN) (Figura 4), um alcaloide extraído da casca da árvore de cinchona. A quinina foi o primeiro antimalárico eficaz e seu uso predominou até a década de 1940, quando começaram a surgir novos análogos. O progresso na síntese de derivados quinolínicos deu origem aos fármacos 4-aminoquinolínicos: cloroquina (CQ), amodiaquina (AQ) e piperaquina (PPQ); os aminoálcoois quinolínicos: mefloquina (MQ); os aminoálcoois não heterocíclicos: lumefantrina (LUM); e às 8-aminoquinolinas: primaquina (PQ) e tafenoquina (TQ) (Figura 4) (PINHEIRO, BISPO, & SOUZA, 2010; WICHT, 2020).

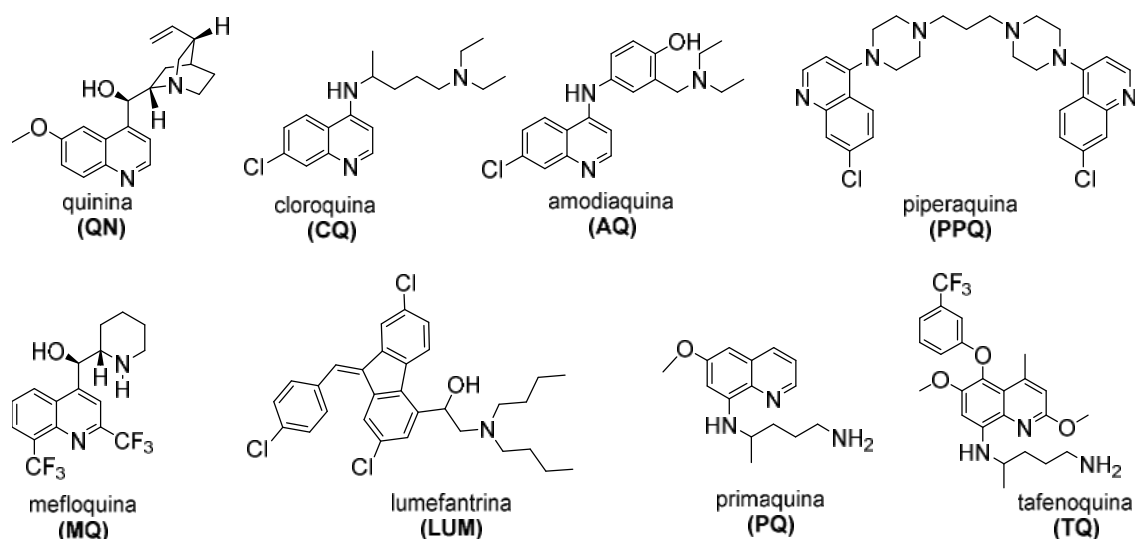


Figura 4. Fármacos utilizados no tratamento da malária.

Nos anos 1950, a CQ tornou-se o principal tratamento contra a malária devido à sua eficácia, ampla disponibilidade, baixa toxicidade e custo acessível. Por décadas, foi amplamente utilizada tanto para quimioprofilaxia quanto para tratar casos não complicados de malária causada pelo *P. falciparum*, pois age eliminando o parasito nas fases sanguíneas. Entretanto, o surgimento de cepas resistentes à CQ atribuída a mutações no gene responsável pela proteína do vacúolo digestivo do *P. falciparum*, limitou o uso da CQ apenas para cepas que permanecem sensíveis (HU et al., 2017; TIBON & CHEONG, 2020).

A AQ (Figura 4), um composto similar à CQ, possui um mecanismo de ação equivalente e é eficaz contra cepas resistentes à CQ. No entanto, seu uso contínuo mostrou estar associado a efeitos adversos graves, como hepatotoxicidade e granulocitopenia, o que levou a diminuição de sua aplicação terapêutica (PARHIZGAR & TAHHIGHI, 2017).

A PPQ (Figura 4), uma bisquinolina desenvolvida nos anos 1960, apresenta uma meia-vida longa e variação significativa no perfil farmacocinético entre diferentes grupos de pacientes. Apesar de sua eficácia contra cepas resistentes à CQ, a resistência do parasito à PPQ já foi relatada em casos de monoterapia, o que justifica sua recomendação apenas em combinação com derivados de artemisinina (KEATING, 2012; PINHEIRO, 2018; WATTANAKUL, 2021).

A MQ (Figura 4) tem sido utilizada na Europa desde 1985 para quimioprofilaxia da malária, e nos Estados Unidos, desde os anos 1990, como tratamento para casos não complicados de infecção por *P. falciparum*. Seu mecanismo de ação envolve a eliminação das formas assexuadas do parasito presentes nos glóbulos vermelhos, impedindo o desenvolvimento dos sintomas iniciais da doença. No entanto, o uso da MQ é frequentemente associado a efeitos adversos como problemas gastrointestinais, complicações neuropsiquiátricas graves e hepatite. Além disso, a resistência do parasito à MQ tem sido um problema recorrente, dificultando a eficácia do tratamento (ALVEN & ADERIBIGBE, 2019; KHIM et al., 2014; MAWSON, 2013).

A LUM (Figura 4) é um antimalárico de ação prolongada, eficaz contra diversas espécies de parasitos causadores da malária em seres humanos. Desde sua introdução na Nigéria em 2005 como tratamento de primeira linha para malária não complicada, a LUM

tem enfrentado desafios relacionados a falhas terapêuticas, especialmente quando combinada com derivados de artemisinina de curta duração. Esses problemas são atribuídos a fatores como baixa absorção gastrointestinal, solubilidade aquosa limitada e um significativo efluxo mediado pela glicoproteína P, que pode levar a concentrações subterapêuticas da LUM no sangue, favorecendo o desenvolvimento de resistência pelo *Plasmodium* (KAUR, 2021; PUTHRAN et al., 2020).

A TQ (Figura 4), uma 8-aminoquinolina semelhante à PQ (Figura 4), destaca-se por sua meia-vida prolongada, o que permite seu uso em dose única, ao contrário da administração diária exigida pela PQ. Essa característica a torna uma opção mais conveniente para o tratamento e a prevenção da malária, pois pode aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento, reduzindo o risco de recidivas. A TQ é eficaz em diferentes estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*, incluindo os estágios hepáticos de *P. falciparum* e *P. vivax*, hipnozoítos latentes, infecções sanguíneas e gametócitos, contribuindo para a redução da transmissão da malária. Além disso, sua capacidade de eliminar hipnozoítos latentes, que podem causar recidivas meses ou até anos após a infecção inicial, é especialmente relevante no tratamento de *P. vivax*, que é notório por esse comportamento.

Apesar de ter sido aprovada em 2018 pelo FDA, pela Therapeutic Goods Administration australiana e pela ANVISA no Brasil, seu uso não é isento de riscos. Assim como a PQ, a TQ pode causar anemia hemolítica grave em pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Esse efeito adverso é causado pela incapacidade dos glóbulos vermelhos de lidar com o estresse oxidativo sem a enzima G6PD, resultando em destruição prematura das hemácias. Como consequência, antes de administrar a TQ, é necessário realizar testes de atividade enzimática para identificar essa deficiência, o que aumenta o custo do tratamento e pode limitar o acesso em áreas de saúde com menos recursos. Ainda assim, a TQ representa um avanço significativo, especialmente por sua administração em dose única, que facilita a adesão e pode diminuir a carga da doença em áreas endêmicas (MMV-SUPPORTED PROJECTS, 2020; WATSON, 2018).

Já a PQ, também uma 8-aminoquinolina, é utilizada desde os anos 1950 para eliminar os hipnozoítos latentes de *P. vivax* e *P. ovale*, além de inibir gametócitos, o que impede a transmissão da malária. A PQ atua interferindo no metabolismo do oxigênio do

parasito, levando-o à morte. Contudo, seu uso é limitado por contraindicações em certos grupos de risco, como grávidas e crianças pequenas, devido à possibilidade de efeitos adversos graves, incluindo danos à medula óssea e destruição de glóbulos vermelhos.

O principal desafio no uso da PQ é o risco de hemólise em indivíduos com deficiência de G6PD. Esse risco é significativo, já que cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam essa deficiência enzimática, que é particularmente comum em regiões onde a malária é endêmica. Apesar desses desafios, a PQ continua sendo uma ferramenta essencial no combate à malária, especialmente em regiões onde *P. vivax* é predominante (ALVEN & ADERIBIGBE, 2019; AVALOS et al., 2018; "FAR.FIOCRUZ", 2021).

O tratamento disponível para a malária causada pelo *P. vivax* consiste na combinação de derivados quinolínicos que agem em diferentes fases da doença para evitar a reincidência devido as formas latentes do parasito. A PQ e a TQ, são, juntamente com a CQ, os únicos fármacos utilizados no tratamento deste tipo de malária. Entretanto, a PQ e a TQ podem induzir a hemólise. Em 2023, a portaria SECTICS/MS n. 27, de 5 de junho, incorpora a TQ ao Sistema Único de Saúde (SUS), e estabelece que os pacientes precisam ser testados para deficiência de G6PD, e somente aqueles com mais de 16 anos e com pelo menos 70% de atividade de G6PD poderão receber o tratamento com base na TQ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Na década de 1950, pesquisadores do Exército dos Estados Unidos fizeram uma descoberta fundamental sobre a relação entre a deficiência de G6PD e a hemólise induzida pela PQ, um antimalárico amplamente utilizado. Através de suas pesquisas, verificou-se que os eritrócitos de indivíduos sensíveis à PQ apresentavam níveis significativamente mais baixos de glutathione, um antioxidante essencial, em comparação com os eritrócitos de indivíduos que não apresentavam essa sensibilidade ao fármaco (BEUTLER, 2007). Este achado sugeriu que a deficiência de glutathione estava ligada a uma falha na via responsável pela sua regeneração, a qual depende da ação da G6PD para manter a glutathione no estado reduzido, capaz de neutralizar os radicais livres.

O processo de metabolismo da glutathione envolve sua oxidação em dissulfeto de glutathione, que posteriormente é regenerada para sua forma reduzida com o auxílio da enzima glutathione redutase e da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

(NADPH). A G6PD é essencial para a regeneração de NADPH, especialmente durante o estresse oxidativo, pois este desempenha um papel crítico na defesa celular contra o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais livres. Em indivíduos com deficiência em G6PD, essa via é severamente comprometida, o que impede a regeneração de forma eficaz da glutathione. Sem glutathione reduzida suficiente, os eritrócitos ficam suscetíveis a danos oxidativos, levando à destruição da hemoglobina, formação de corpos de Heinz, e eventualmente, à hemólise (BEUTLER, 2007; TAYLOR, 2021).

Essa descoberta foi fundamental para entender como a PQ, e posteriormente outros fármacos antimaláricos, podem desencadear hemólise em indivíduos com deficiência de G6PD. Sem a capacidade de reparar o estresse oxidativo, os eritrócitos danificados não conseguem manter sua integridade estrutural, resultando em sua destruição prematura. Este entendimento foi crucial para o desenvolvimento de testes de G6PD e para a adequação dos tratamentos antimaláricos de modo a evitar complicações graves em pacientes com essa deficiência enzimática.

Além disso, a investigação sobre a relação entre a deficiência de G6PD e hemólise trouxe uma compreensão mais ampla sobre o papel das enzimas antioxidantes no corpo humano e levou ao desenvolvimento de estratégias mais seguras no tratamento da malária, especialmente em áreas endêmicas onde essa deficiência genética é prevalente.

A hemólise em indivíduos com deficiência da G6PD é uma condição genética que afeta a capacidade dos eritrócitos de lidar com o estresse oxidativo. A reação ocorre devido à interação dos fármacos com a oxiemoglobina, gerando superóxido, que por sua vez se decompõe em peróxido de hidrogênio. Em indivíduos sem a atividade normal da G6PD, esses peróxidos não são adequadamente eliminados, resultando na desnaturação da hemoglobina e formação de corpos de Heinz. Quando os eritrócitos passam pelo baço, os corpos de Heinz, junto com partes da membrana celular, são removidos. Com o tempo, a membrana dos eritrócitos enfraquece, levando à destruição dessas células e ao desenvolvimento da hemólise (BEUTLER, 2007).

A hemólise induzida por PQ e TQ é particularmente preocupante em pacientes diagnosticados com malária aguda causada por *P. vivax*. A queda nos níveis de hemoglobina é o principal sinal de hemólise nesses indivíduos. Além disso, os sintomas

clínicos incluem fraqueza, falta de ar, dores nas costas e, em casos mais graves, insuficiência renal, o que pode complicar ainda mais o quadro clínico (TAYLOR, 2021).

Atualmente, existem testes rápidos qualitativos para identificar a deficiência de G6PD, sendo eficazes para detectar indivíduos com menos de 30% da atividade enzimática normal. Esses testes são fundamentais para garantir a segurança no uso de medicamentos como a tafenoquina, reduzindo o risco de hemólise em pacientes com essa deficiência. A OMS recomenda a realização desses testes antes da administração do fármaco, especialmente em regiões onde variantes mais graves da deficiência de G6PD são prevalentes, como no Mediterrâneo, Oriente Médio e Sudeste Asiático, onde o risco de hemólise é maior (WATSON, 2018).

Além disso, a TQ, que é administrada em dose única devido à sua longa meia-vida, também é contraindicada para pacientes com deficiência de G6PD, pois pode levar a episódios graves de hemólise. A necessidade de testar a atividade da G6PD antes da administração da TQ torna esses tratamentos mais caros e menos acessíveis, especialmente em regiões onde a malária é endêmica, onde o teste de G6PD pode não estar amplamente disponível.

1.4.1 Terapias combinadas à base de artemisinina - ACT

Para obter a taxa de cura e retardar o aparecimento da resistência no tratamento contra malária, a OMS recomenda o uso de dois ou mais fármacos com modos de ação e tempo de meia-vida diferentes. (WICHT, 2020). Com isso, foram introduzidos em 2001 as Terapias Combinadas à Base de Artemisinina (ACTs) na linha de tratamento da malária, no entanto a aplicação como política de tratamento de primeira linha da doença, ocorreu somente em 2016 em apenas 80 países. (“WHO | OVERVIEW OF MALARIA TREATMENT,” 2020).

Essa associação de diferentes fármacos é baseada na combinação de um derivado artemisinínico, que possui um tempo de meia-vida curto, combinado com um ou mais fármacos, geralmente derivados quinolínicos, que possuem uma meia-vida mais longa. Essa medida torna-se necessária para que obtenha uma ação mais abrangente sobre os parasitos que não foram eliminados pelo fármaco de meia-vida curta, impedindo o

processo de reincidência da doença, assim como a resistência do parasito ao tratamento (MATHENGE et al., 2020).

Os tratamentos podem ser feitos com o uso dos medicamentos separados ou em formulações que combinam os diferentes fármacos. Para facilitar a adesão dos pacientes ao tratamento criou-se as formulações em doses fixas combinadas (DFC) de dois ou mais fármacos em uma única forma farmacêutica. Entretanto, elas são mais caras que os medicamentos isolados, pois têm um custo mais alto para o seu desenvolvimento (“WHO | OVERVIEW OF MALARIA TREATMENT,” 2020).

Para o combate a malária, causada por *P. falciparum*, a OMS recomenda 5 ACTs em DFC. São elas (Figura 5):

- Diidroartemisinina + piperaquina (Eurartesim®)
- Artemeter + lumefantrina (Coartem®)
- Artesunato + mefloquina (ASMQ)
- Artesunato + amodiaquina (Winthrop® ou Coarsucam™)
- Artesunato + sulfadoxina-pirimetamina (ASSP)
- Pironaridina-artesunato (Pyramax®), em desenvolvimento

No que se refere a infecção causada pelo *P. vivax*, são utilizadas as mesmas terapias combinadas indicadas acima, exceto a ACT de artesunato + sulfadoxina-pirimetamina (ASSP) (“WHO | OVERVIEW OF MALARIA TREATMENT,” 2020; WHO, 2015).

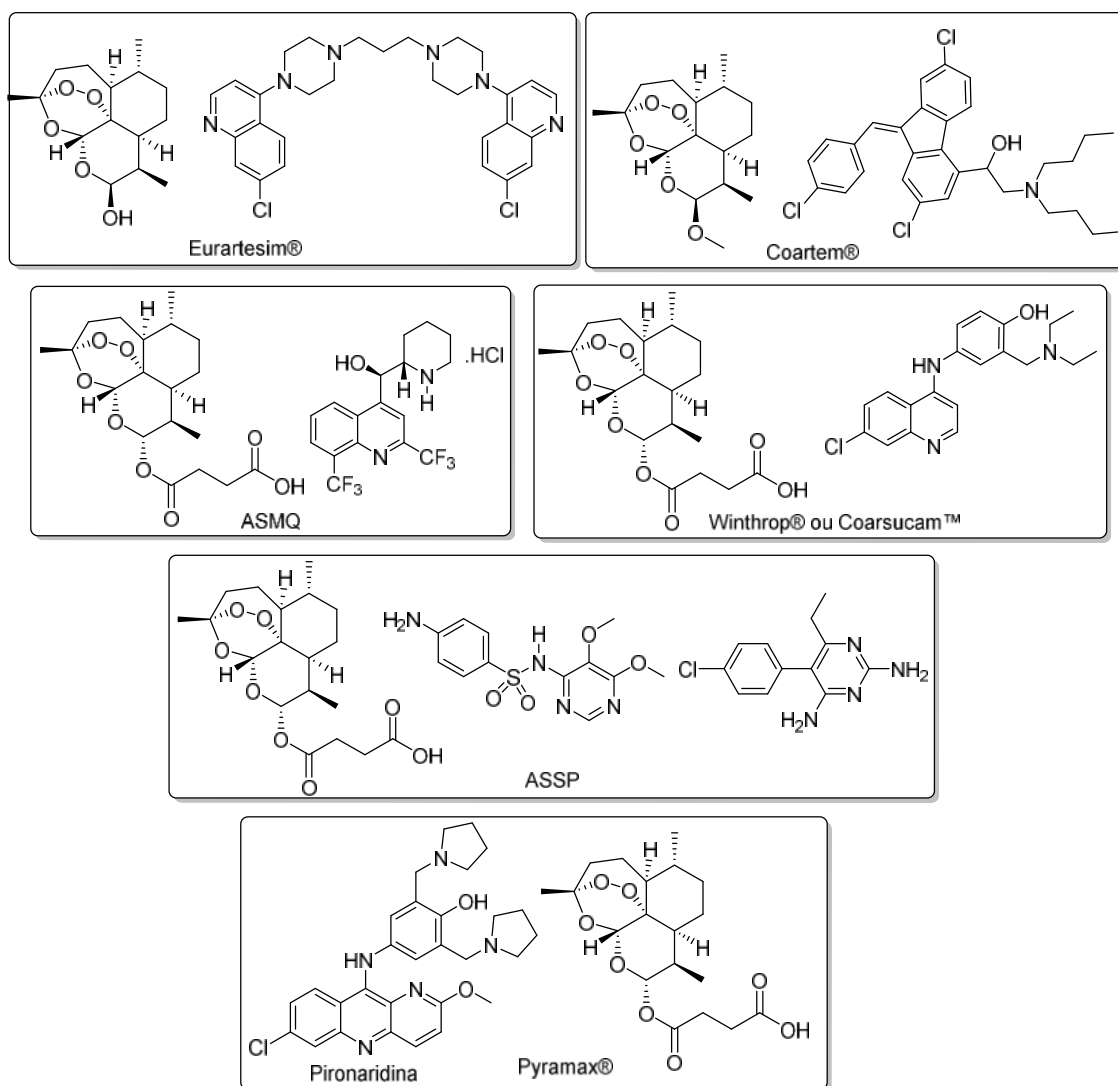


Figura 5. ACTs utilizadas no tratamento da malária.

Das DFC acima, a que possui o melhor efeito de profilaxia pós-tratamento é a da piperaquina associada com diidroartemisinina, devido à meia-vida de eliminação mais longa da piperaquina. Para além das suas características farmacológicas, o Eurartesim®, seu nome comercial, se mostra uma excelente escolha para o tratamento da malária não complicada, devido sua boa adesão com os pacientes e sua fácil administração. Porém, para que haja uma maior segurança em relação ao tratamento com essa associação no que diz respeito à resistência do parasito, é necessário que seja realizado mais estudos confirmatórios sobre sua segurança e eficácia. (WANG, 2020).

As ACTs são combinações eficazes contra todo o tipo de malária, inclusive nas que ocorrem infecção mista, ocasionado pela contaminação por mais de uma espécie de

Plasmodium. As infecções mistas são aquelas em que o paciente foi contaminado por mais de uma espécie de *Plasmodium*, tal como pelo *P. vivax* e pelo *P. falciparum*. (WHO, 2015). Porém no sudeste asiático vem sendo notificado algumas lacunas no tratamento com as ACTs, isso vem ocorrendo devido a modificações no genoma do *P. falciparum*, evidenciando a importância no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da malária. (MATHENGE et al., 2020).

1.5 Derivados desenvolvidos pelo nosso grupo com atividade anti-*Plasmodium*

Nosso grupo possui sólidas linhas de pesquisa na busca por novas moléculas com potencial atividade contra o *Plasmodium* (PINHEIRO, 2019; FEITOSA 2024). Essas linhas exploram diferentes ferramentas da química medicinal, uma delas é a hibridação molecular que consiste na combinação de dois ou mais grupos farmacofóricos em uma mesma molécula, dessa forma proporcionando a possibilidade de o derivado híbrido atuar em mais de um mecanismo de ação. Em trabalho anterior, foi desenvolvida uma série de derivados híbridos combinando o heterociclo quinolina, presente na CQ, e o grupo benzenosulfonamida, presente na sulfadoxina (SFX) (Figura 6) (PINHEIRO et al., 2015). Esses grupos foram conectados através espaçadores contendo carbonos metilênicos. Todos os compostos da série demonstraram atividade *in vitro* contra a cepa W2 CQR de *P. falciparum*. O derivado **1** (Figura 6) se destacou apresentando um IC₅₀ de 0,09 µM *in vitro* e mostrou atividade *in vivo* contra cepa de *P. berghei*, atingindo 49% de inibição da parasitemia no quinto dia após a inoculação, em um regime de dose de 20 mg/kg. Dessa forma tornando-se um potencial protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas (PINHEIRO et al., 2015).

Dando continuidade a este projeto e buscando verificar a importância do núcleo quinolínico para a atividade anti-*Plasmodium*, foram sintetizados derivados não-quinolínicos análogos à série que originou **1**. Esses novos derivados contêm os sistemas pirazolo[3,4-*b*]piridina e pirazolo[3,4-*d*]pirimidina no lugar da quinolina (SILVA, 2016; SILVEIRA, 2018). Os derivados **2** e **3** (Figura 6) demonstraram atividade anti-*P. falciparum* com valores de IC₅₀ de 3,46 µM e 5,13 µM, respectivamente, porém foram menos potentes do que seus respectivos análogos quinolínicos (SILVA, 2016; SILVEIRA, 2018). Adicionalmente, uma série de derivados quinolínicos substituídos na

posição 4 com o heterociclo 1,2,3-triazol com diferentes substituintes foi sintetizada e avaliada contra cepas W2 CQR. O derivado 4 (Figura 6) destacou-se como o mais potente da série, com IC_{50} de 1,4 μ M (BOECHAT, 2014).

Em um outro trabalho do grupo, foram sintetizados derivados trifluorquinolínicos da MQ, preservando-se o núcleo quinolínico e adicionando uma variedade de heterociclos nitrogenados, dentre eles o 1,2,4-triazol. Dentre os compostos desenvolvidos, o derivado 5 (Figura 6) apresentou destaque, mostrando uma IC_{50} de 0,083 μ M contra cepas W2 resistentes à cloroquina, sendo o mais potente da série estudada.

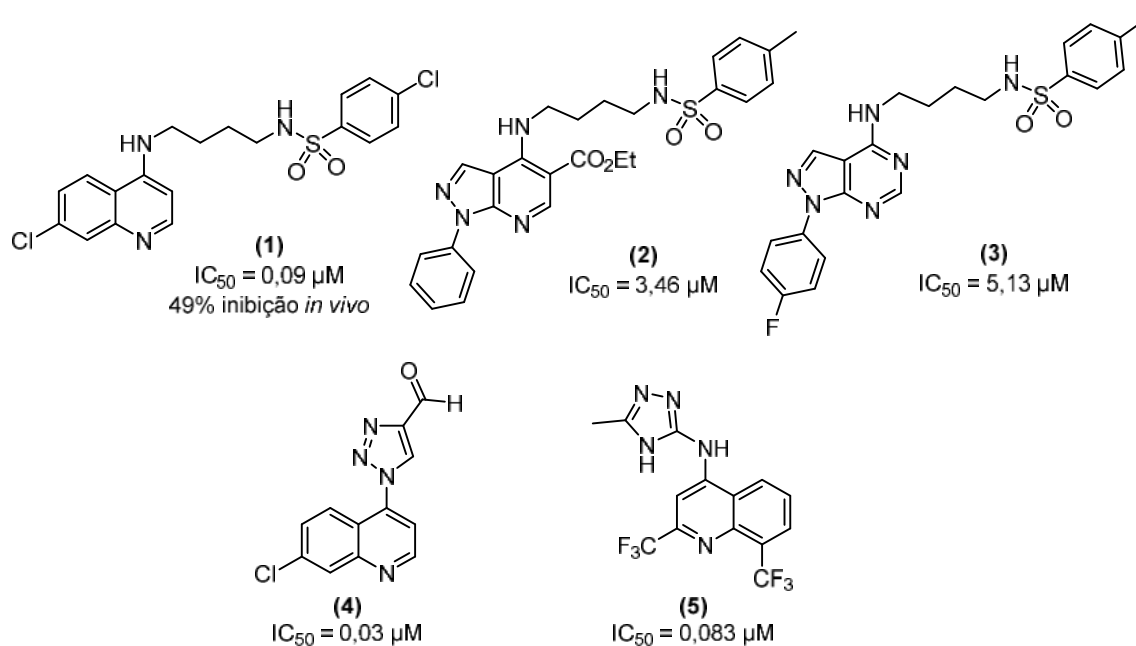


Figura 6. Derivados desenvolvidos pelo grupo com atividade anti-Plasmodium.

Outra importante linha de pesquisa em nosso grupo é o desenvolvimento de derivados da PQ (CARVALHO, 2016). O derivado 6 (Figura 7), um híbrido da PQ com a atorvastatina, demonstrou atividade contra a cepa W2 CQR de *P. falciparum*, apresentando um valor de IC_{50} de 1,41 μ M, de forma equipotente à PQ, que possui um IC_{50} de 1,89 μ M (CARVALHO, 2016). O composto 7 (Figura 7), além de mostrar atividade anti-*P. falciparum in vitro* ($IC_{50} = 8,40 \mu$ M), foi selecionado para ensaios *in vivo* em mosquitos *Aedes fluviatilis*, utilizando um modelo de malária aviária causada por *P. gallinaceum*. Uma das principais estratégias para o controle e a erradicação da malária consiste na interrupção da transmissão dos parasitos para os vetores mosquitos. Esse experimento tem sido utilizado com sucesso na identificação de novos derivados da PQ

com potencial para atuar como bloqueadores da transmissão da malária, visando encontrar moléculas ativas em todos os estágios de desenvolvimento do parasito (BOECHAT, 2020). O derivado **7** apresentou um bloqueio da transmissão da malária de 82% em mosquitos, administrado a uma dose de 50 mg/kg, sendo ativo contra todos os estágios de desenvolvimento do parasito. Adicionalmente, o composto **7** foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico (NO) e inibir a produção de TNF α . Esses resultados evidenciam o êxito no desenvolvimento de novos compostos que atuem como fármacos moduladores da transmissão da malária e no controle do processo inflamatório associado a essa doença. Dessa forma, os derivados **6** e **7** podem ser utilizados como protótipos para o planejamento de novas moléculas com possível atividade contra o *Plasmodium*.

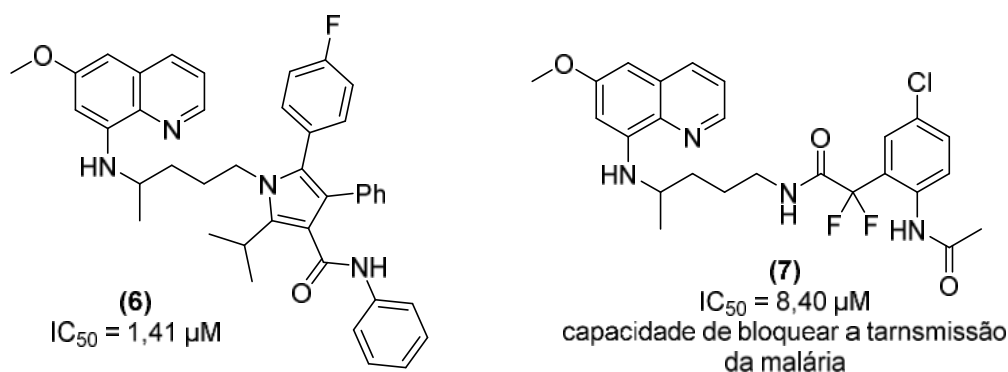


Figura 7. Derivados da PQ desenvolvidos pelo grupo.

1.6 Modificações moleculares na primaquina

A PQ apresenta atividade contra gametócitos de todas as espécies do parasito causador da malária, inclusive cepas de *P. falciparum* resistentes a CQ (RIECHMANN, 1968).

Entretanto, ela é metabolizada à carboxiprimaquina (**8**) que não possui atividade antimalárica (Figura 8) (PETERS, 1984; BROSSI, 1987).

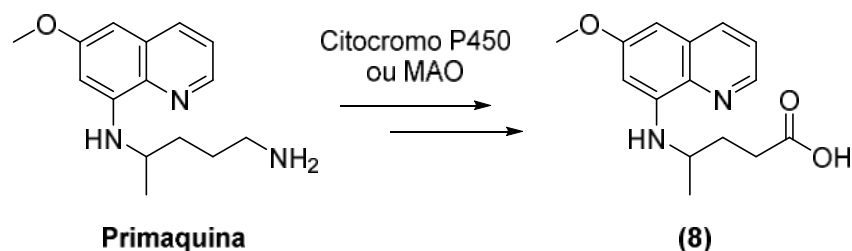


Figura 8. Estrutura química da PQ e de um dos seus metabólitos, a carboxiprimaquina **(8)**.

Uma forma de contornar este problema é a modificação da amina terminal de sua cadeia alquílica. A bulaquina (Figura 9) é um exemplo deste tipo de estratégia, a qual apresenta uma furanona no lugar da amina primária. Essa substância é um pró-fármaco da PQ, cuja clivagem do grupo furanona ocorre rapidamente *in vivo*. Embora haja a liberação da PQ no organismo, a toxicocinética é alterada, de forma que a bulaquina se mostrou mais segura do que seu fármaco de origem, apresentando apenas um terço de suas complicações (MEHROTRA, 2007).

Derivados peptídicos da PQ também são descritos na literatura como uma alternativa para evitar a metabolização à carboxiprimaquina, apresentando atividade contra gametócitos do parasito (PORTELA, 1999). Os derivados **9** e **10** (Figura 9) inibiram o surgimento de oocistos no intestino do vetor em doses de 15 mg/kg (PORTELA, 1999). A estratégia de modificação da amina terminal da PQ se mostra promissora na busca por substâncias ativas e menos tóxicas.

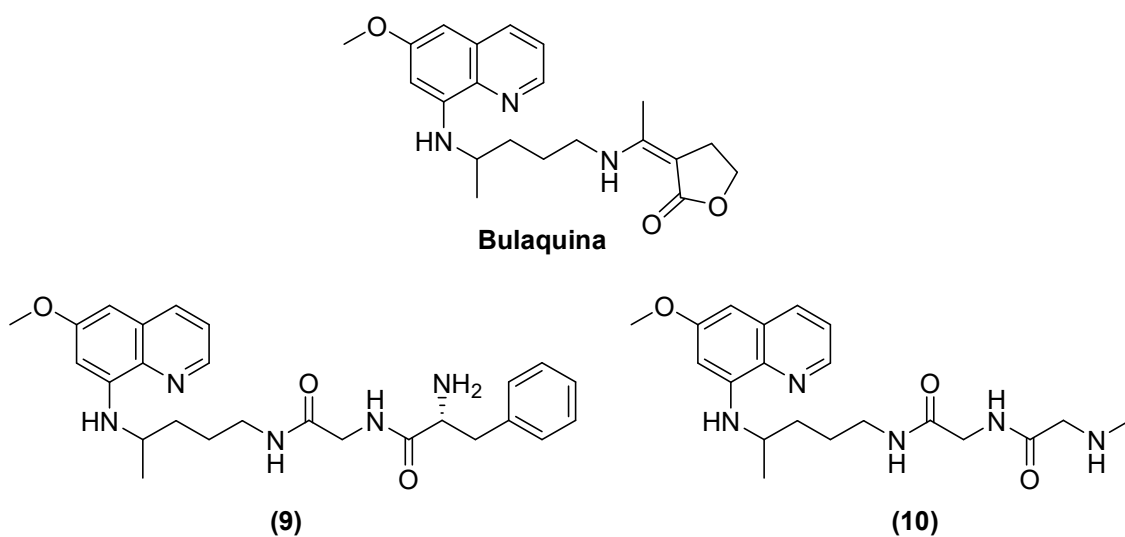


Figura 9. Estruturas químicas da bulaquina e dos derivados peptídicos que apresentaram atividade contra o *Plasmodium*.

2 OBJETIVO

Este projeto tem como objetivo a obtenção e a avaliação biológica de 4 novos derivados da PQ, **11a-d**, buscando a otimização da atividade antiplasmódica e a diminuição da toxicidade apresentada pela PQ por meio da inclusão de heterociclos azólicos ao final de sua cadeia alquílica.

2.1 Objetivos específicos

- Síntese e caracterização dos 4 derivados inéditos propostos **11a-d**.
- Avaliação *in vitro* da atividade antiplasmódica dos derivados propostos, **11a-d**.
- Avaliação da citotoxicidade dos derivados propostos, **11a-d**.

3 JUSTIFICATIVA

A malária ainda é um grande problema de saúde pública global, causando milhares de mortes anualmente. Apesar de existirem opções terapêuticas disponíveis, os fármacos utilizados apresentam efeitos adversos e o surgimento de cepas resistentes a eles e às ACTs preconizadas, dificultam o tratamento. Além disso, apenas a PQ e a TQ, são, juntamente com a CQ, utilizadas no tratamento da malária causada pelo *P. vivax*, que é o responsável por mais de 80% dos casos no Brasil. Entretanto, a PQ e a TQ não podem ser utilizadas por pacientes que apresentam deficiência da enzima G6PD, tornando urgente a descoberta de novas substâncias ativas contra o *P. vivax* e que sejam seguras para pacientes que apresentem deficiência desta enzima. Desta forma, este projeto visa a obtenção de novos derivados da PQ como uma contribuição para a luta contra a malária causada pelo *P. vivax*.

Cabe ressaltar que como não existe modelo experimental para testar o *P. vivax*, os testes são feitos inicialmente com *P. falciparum*, pois a PQ também tem ação sobre esta espécie. Caso as atividades em *P. falciparum* se mostrem promissoras, os derivados de PQ podem ser testados contra formas assexuadas de *P. vivax*, usando o ensaio de maturação de esquizontes (SMA) e a sua capacidade de bloquear a transmissão da malária em mosquitos *Anopheles darlingi* em um ensaio de alimentação por membrana (MFA), usando isolados de campo de *P. vivax*.

4 PLANEJAMENTO MOLECULAR

Dando continuidade as linhas de pesquisa e baseando-se nos resultados promissores obtidos anteriormente pelo nosso grupo, os derivados **11a-d** foram planejados tendo como principal modificação estrutural na PQ a substituição do grupo amino terminal de sua cadeia alquílica. A estrutura base da PQ foi mantida (em azul) e a amina terminal foi substituída por uma acetamida (em rosa) que faz a conexão com os heterociclos azólicos (em verde) (Figura 10). A porção acetamida está presente nas estruturas químicas de **7** e **9** que apresentaram capacidade de bloqueio de transmissão da malária. O heterociclo triazol está presente na estrutura química de **5** e de outras substâncias desenvolvidas pelo grupo que apresentaram atividade antiplasmodica. Já os heterociclos imidazólicos foram selecionados a fim de comparação, e assim, avaliar a influência desses heterociclos na atividade dessas substâncias. Com essas modificações espera-se otimizar a atividade antiplasmodica, impedir a formação do metabólito carboxiprimaquina (**8**) e melhorar o perfil de toxicidade.

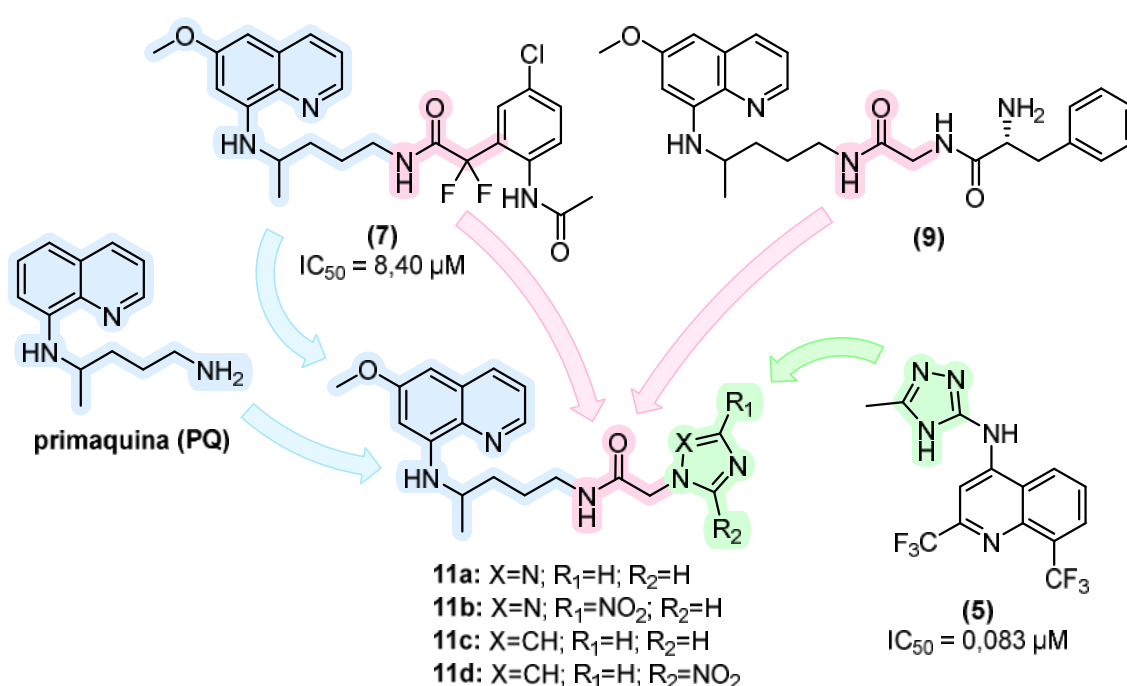
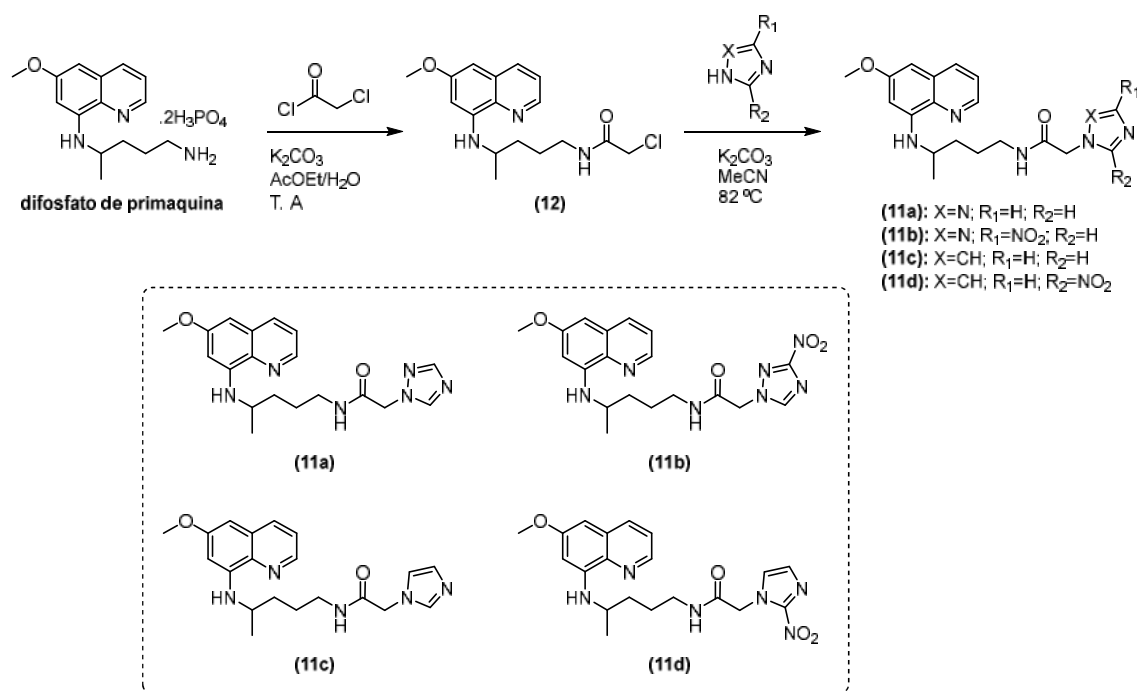


Figura 10. Planejamento molecular dos derivados **11a-d**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos derivados planejados 11a-d

A rota de síntese utilizada para obtenção dos derivados propostos é composta de duas etapas. Na primeira etapa o difosfato de PQ reage com o cloreto de cloroacetila em uma reação de Schotten-Baumann, utilizando carbonato de potássio como base e um sistema bifásico de solventes composto por acetato de etila e água, nas mesmas proporções, dando origem ao intermediário **12**. Em seguida, **12** sofre uma reação de substituição nucleofílica do átomo de cloro pelos heterocíclicos imidazólicos e triazólicos de interesse sob refluxo de acetonitrila, fornecendo os derivados propostos **11a-d** (Esquema 1).

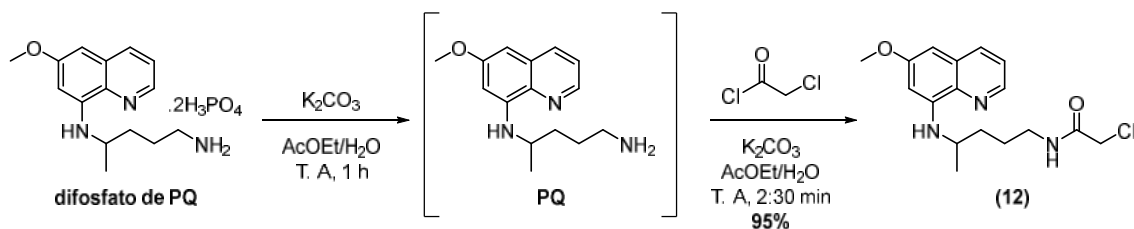


Esquema 1. Rota de síntese utilizada para obtenção dos derivados planejados **11a-d**.

5.1.1 Obtenção do intermediário 12

Inicialmente, o difosfato de PQ foi tratado com carbonato de potássio em meio bifásico de acetato de etila e água, à temperatura ambiente por aproximadamente 1h para liberação da PQ de sua forma difosfato para sua forma de base livre. Em seguida, sem a necessidade de isolamento da PQ, foi realizada uma reação de Schotten-Baumann ao adicionar cloreto de cloroacetila à reação. O meio reacional foi mantido em agitação à

temperatura ambiente por 2h e 30 minutos, dando origem ao intermediário **12** com 95% de rendimento bruto (Esquema 2). Essa metodologia se mostrou bastante satisfatória, visto que não foi necessário a realização de uma etapa anterior para obtenção e isolamento da PQ em sua forma livre.



Esquema 2. Obtenção do intermediário **12**.

5.1.1.1 Caracterização do intermediário **12**

A caracterização do intermediário **12** foi realizada através das técnicas de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (EM-IES) e cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

5.1.1.1.1 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray do intermediário **12**

A análise do intermediário **12** por EM-IES foi realizada em modo positivo. Nesta técnica podem ser observados no espectro os picos referentes a molécula protonada ($[M+H]^+$), referente a massa da molécula mais um próton ou picos referentes a molécula cationizada, que são formados devido a associação com cátions como sódio ($[M+Na]^+$) e potássio ($[M+K]^+$). No espectro do intermediário **12** (Figura 11) foram observados os picos de razão massa carga (m/z) 336 e 358, referentes $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente.

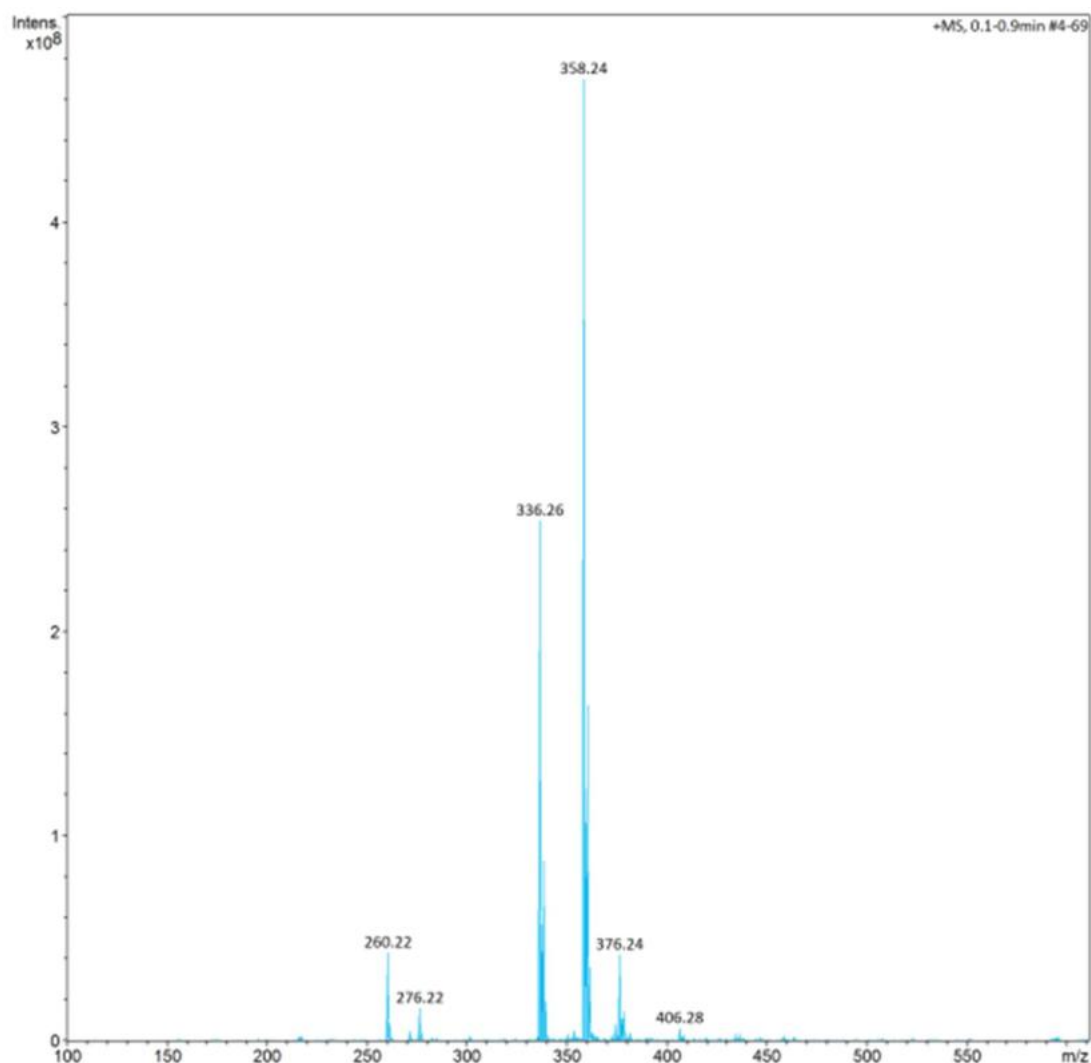


Figura 11. Espectro de massas com ionização por eletrospray do intermediário **12**.

5.1.1.1.2 Espectrometria de massas com ionização por elétrons do intermediário **12**

Na técnica de CG-EM a amostra percorre uma coluna cromatográfica que faz a separação das substâncias voláteis ali presentes. Em seguida, essas substâncias chegam ao espectrômetro de massas, no qual são ionizadas no detector através de um feixe de elétrons de alta energia que remove um elétron da molécula e promove fragmentações na estrutura química. Dessa forma, no espectro de massas por ionização por elétrons podemos observar o pico do íon molecular, referente a massa da substância menos 1 elétron e às fragmentações geradas. No espectro de massas do intermediário **12** (Figura

12) foi possível observar pico referente ao íon molecular de m/z 335 e dos fragmentos com m/z 201,1 e m/z 286,2. O fragmento de m/z 201, é referente a fragmentação da ligação alfa ao carbono quaternário, sendo este fragmento o pico base, que é o pico de maior abundância (100%) (Esquema 3). Já o fragmento de m/z 286,2 é referente a fragmentação da ligação alfa à carbonila da amida (Esquema 3).

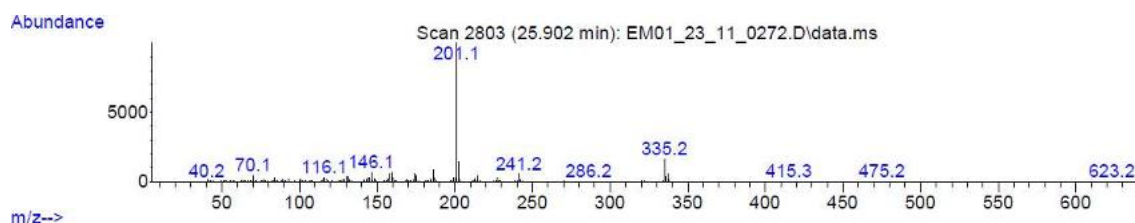
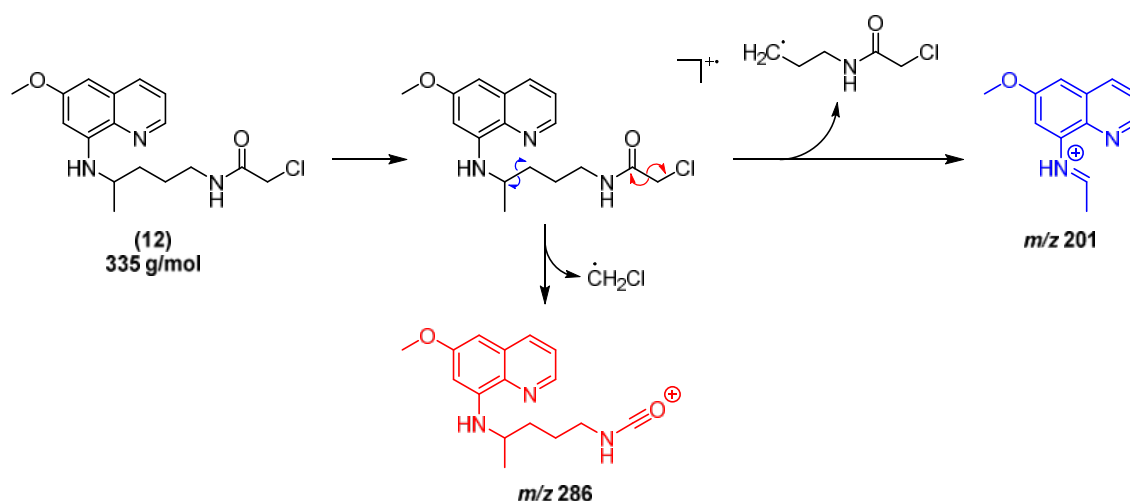


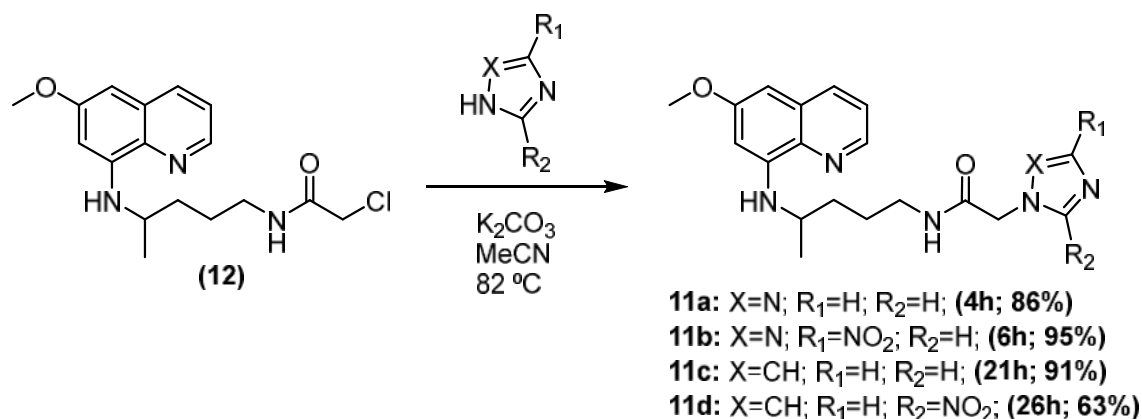
Figura 12. Espectro de massas com ionização por elétrons do intermediário 12.



Esquema 3. Proposta de fragmentação para o intermediário 12.

5.1.2 Obtenção dos derivados finais 11a-d

Os derivados **11a-d** foram obtidos através de uma substituição nucleofílica do tipo S_N2 entre o intermediário **12** e os heterociclos triazólicos e imidazólicos de interesse. Foi utilizado carbonato de potássio como base e acetonitrila como solvente (Esquema 4). O meio reacional foi mantido em agitação à 82 °C e os tempos reacionais variaram entre 4 e 26 horas, fornecendo os derivados de interesse **11a-d** com rendimentos brutos entre 63 e 95% (Esquema 4).



Esquema 4. Obtenção dos derivados planejados **11a-d**, tempos reacionais e rendimentos brutos.

5.1.2.1 Processo de purificação dos derivados 11a-d

A purificação dos derivados **11a-d** foi realizada através de cromatografia em camada fina. Este processo de purificação é semelhante à separação com o uso de placas de cromatografia preparativa, entretanto, são utilizadas cromatofolhas de alumínio. Esse método foi selecionado pois o custo das cromatofolhas é inferior ao das placas preparativas, além disso, a quantidade de solvente utilizado é muito menor do que no método por colunas cromatográficas.

Os derivados **11a-d** foram dissolvidos em diclorometano e aplicados nas cromatofolhas com auxílio de um capilar. Em seguida, as cromatofolhas foram colocadas em uma cuba de eluição contendo o eluente que forneceu melhor separação entre as substâncias de interesse e as impurezas. Após a separação, a área de interesse foi cortada e os derivados extraídos da sílica utilizando acetonitrila, seguido de uma filtração à vácuo e evaporação do solvente utilizando rota-evaporador. O método escolhido se mostrou satisfatório, visto que, todos os derivados foram obtidos com pureza necessária para a realização da avaliação biológica. Os dados referentes ao processo de purificação encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Purificação dos derivados **11a-d**.

Código	Massa aplicada (mg)	Massa recuperada (mg)	Eluente	Solvente de extração
11a	100	77	AcOEt (7) : (3) Hex	Acetonitrila
11b	100	45	AcOEt (7) : (3) Hex	Acetonitrila
11c	110	67	MeCN (2) : (8) AcOEt	Acetonitrila
11d	100	70	AcOEt (7) : (3) Hex	Acetonitrila

AcOEt = acetato de etila; Hex = hexano

5.1.2.2 Caracterização dos derivados **11a-d**

A caracterização dos derivados **11a-d** foi realizada através de espectrometria de massas com ionização por elétrons, espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (EMAR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e espectroscopia na região do infravermelho (IV). Além disso, a pureza cromatográfica dos derivados foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV).

5.1.2.2.1 Espectrometria de massas dos derivados **11a-d**

Nos espectros de massas com ionização por elétrons dos derivados **11a-d** não foram observados os íons moleculares, entretanto, em todos os espectros foi observado o fragmento de m/z 201 (Figura 13). Esse fragmento é referente a quebra da ligação alfa ao carbono quaternário gerando um fragmento bastante estável, sendo o pico base em todos os espectros (Figura 13). Os dados referentes as fragmentações mais abundantes estão apresentados na tabela 2.

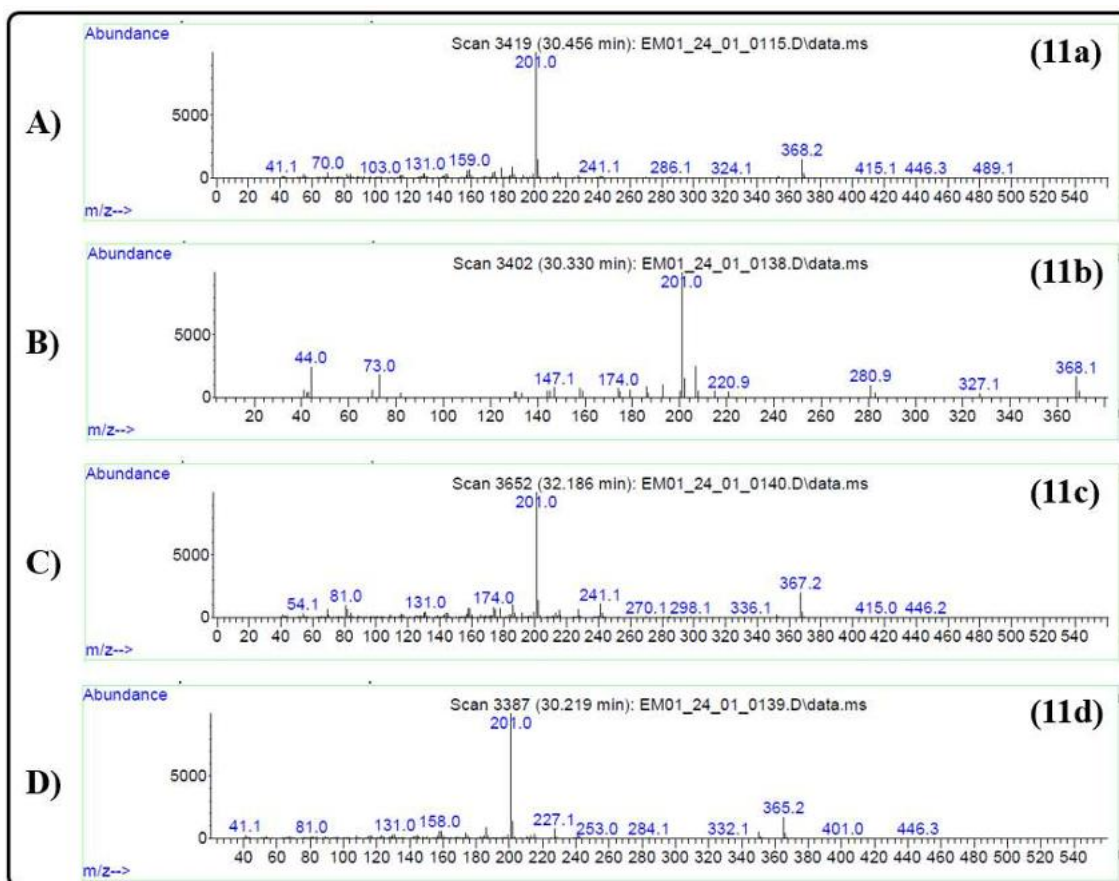


Figura 13. Espectros de massas com ionização por elétrons dos derivados **11a-d**. **A)** Espectro de massas do derivado **11a**; **B)** Espectro de massas do derivado **11b**; **C)** Espectro de massas do derivado **11c**; **D)** Espectro de massas do derivado **11d**.

Tabela 2. Dados de espectrometria de massas com ionização por elétrons dos derivados **11a-d**.

Intermediários	Principais Fragmentações
11a	<i>m/z</i> 201 (100), <i>m/z</i> 368 (15), <i>m/z</i> 202 (14), <i>m/z</i> 186 (8), <i>m/z</i> 179 (8)
11b	<i>m/z</i> 201 (100), <i>m/z</i> 207 (24), <i>m/z</i> 44 (24), <i>m/z</i> 73 (18), <i>m/z</i> 368 (16)
11c	<i>m/z</i> 201 (100), <i>m/z</i> 367 (19), <i>m/z</i> 202 (14), <i>m/z</i> 241 (10), <i>m/z</i> 186 (10)
11d	<i>m/z</i> 201 (100), <i>m/z</i> 365 (17), <i>m/z</i> 202 (14), <i>m/z</i> 186 (8), <i>m/z</i> 227 (8)

As análises de espectrometria de massas de alta resolução com ionização eletrospray foram realizadas em modo positivo. Dessa forma, nos espectros dos derivados **11a-d** foram observados os picos referentes às moléculas protonadas e/ou cationizadas.

No espectro do derivado **11a** (Figura 14), utilizado como exemplo, é possível observar os picos de m/z 369 e m/z 391, referentes a $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente. Na tabela 3 estão apresentados os dados das análises de todos os derivados. Vale ressaltar, que os valores de massas obtidos experimentalmente estão dentro da faixa de erro aceitável, ± 5 ppm.

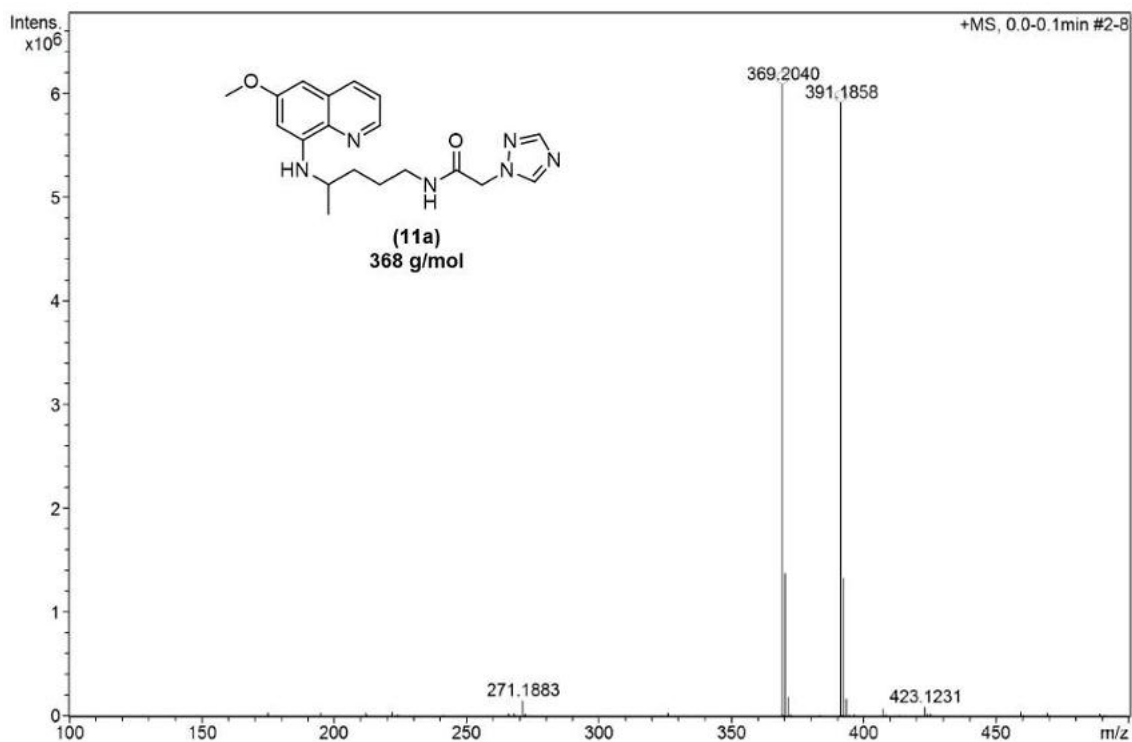


Figura 14. Espectro de massas de alta resolução do derivado **11a**.

Tabela 3. Dados de espectrometria de massas de alta resolução dos derivados **11a-d**.

Derivado	Experimental [M+H] ⁺	Teórico [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Experimental [M+Na] ⁺	Teórico [M+Na] ⁺	Erro (ppm)
11^a	369,2040	369,2033	-1,6	391,1858	-	-
11^b	414,1889	414,1884	-1,1	436,1708	436,1704	-1,1
11^c	368,2087	368,2081	-1,7	390,1906	390,1900	-1,3
11^d	413,1939	413,1932	-1,7	435,1757	435,1751	-1,4

5.1.2.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos derivados 11a-d

Com o objetivo de facilitar a discussão das análises de RMN, os átomos das estruturas químicas dos derivados **11a-d** foram numerados conforme figura 15.

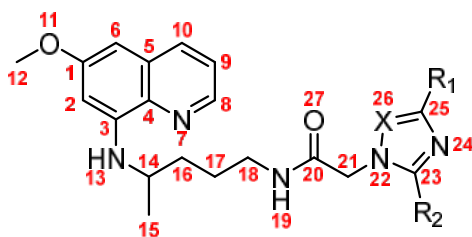


Figura 15. Numeração adotada para atribuição dos sinais de RMN dos derivados **11a-d**.

Devido a semelhança estrutural entre os derivados **11a-d**, o derivado **11a** será utilizado como exemplo para a discussão dos acoplamentos e deslocamentos químicos apresentados nas análises de RMN ^1H . Entretanto, as mudanças significativas apresentadas nos espectros dos demais derivados serão apresentadas e discutidas. Vale ressaltar que todas as análises foram realizadas em aparelho com campo magnético de 500 MHz e utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como solvente. Os dados referentes a todos os derivados estão apresentados na tabela 4.

No espectro do derivado **11a** (Figura 16) foi possível observar os hidrogênios H-15, da metila, que acoplam com H-14 gerando um duplete ($J = 6,2$ Hz) em 1,21 ppm. Os hidrogênios da cadeia alifática H-14, H-16, H-17 e H-18 se mostraram como multipletos. H-14 e H-18, por serem vizinhos dos átomos de nitrogênio da amina e da amida, respectivamente, apresentaram sinais mais desblindados em 3,63 ppm e 3,11 ppm, respectivamente, em relação a H-16 e H-17 que tiveram seus sinais parcialmente sobrepostos em 1,57 ppm. Em 3,82 ppm encontra-se o simpleto referente aos hidrogênios H-12 da metoxila, que são mais desblindados do que H-15 por estarem próximos ao átomo de oxigênio. Os hidrogênios H-21 por serem vizinhos à carbonila apresentaram-se como simpleto em 4,86 ppm. O hidrogênio H-13 da amina acopla com H-14 gerando um duplete ($J = 8,79$ Hz) em 6,13 ppm. H-6 acopla com H-2 formando um duplete ($J = 2,47$ Hz) em 6,27 ppm e H-2 acopla com H-6 formando, também, um duplete ($J = 2,43$ Hz).

em 6,48 ppm. Em 7,43 ppm observa-se o INDIduplete referente à H-9 que faz acoplamento com H-10 ($J = 8,24$ Hz) e H-8 ($J = 4,16$ Hz). H-10 acopla com H-9 ($J = 8,32$ Hz) e H-8 ($J = 1,64$ Hz) gerando um duplo duplete em 8,08 ppm. O hidrogênio da amida, H-19, se mostrou como um triplete ($J = 5,61$ Hz) em 8,24 ppm devido seu acoplamento com H-18. H-8 apareceu como o sinal mais desblindado do espectro em 8,54 ppm na forma de um duplo duplete devido seu acoplamento com H-9 ($J = 4,23$ Hz) e H-10 ($J = 1,63$ Hz). Por fim, os hidrogênios do heterociclo triazólico, H-23 e H-25, se mostraram como simpletos em 8,45 e 7,94 ppm, respectivamente (Figura 16).

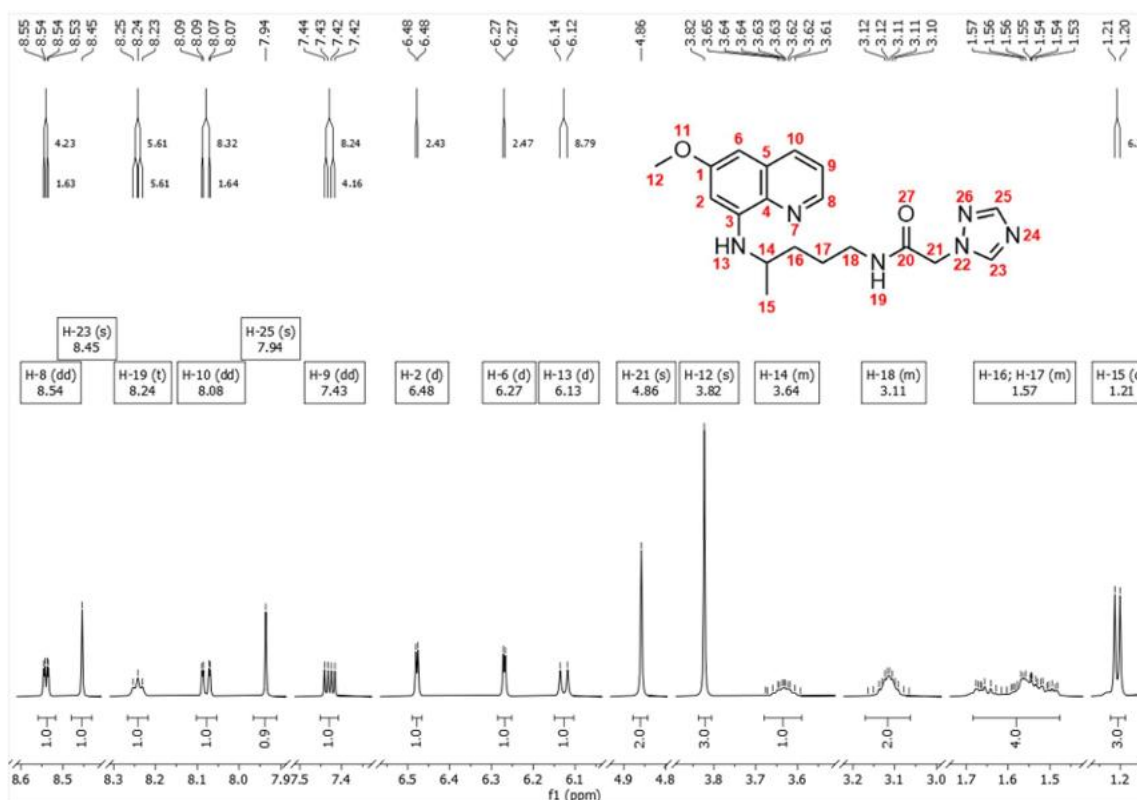


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do derivado **11a**. Solvente: DMSO-d_6 .

Os derivados **11b-d** apresentaram espectros de RMN ^1H semelhantes à **11a**, as diferenças significativas ocorreram em relação aos hidrogênios pertencentes aos heterociclos azólicos (Tabela 4). No espectro do derivado **11b** (Figura 17), foi observado o desaparecimento do sinal referente ao H-25 e um ligeiro aumento no deslocamento químico do sinal referente ao H-23 agora em 8,82 ppm (Figura 17).

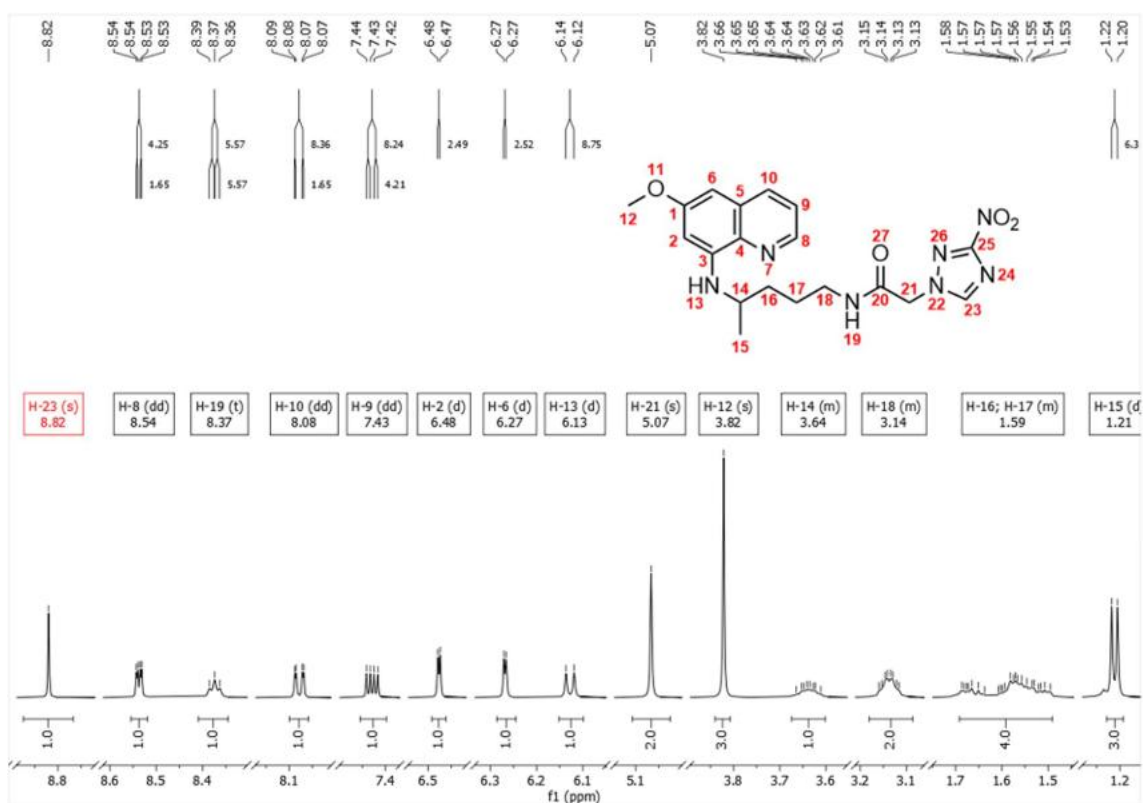


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H do derivado **11b**. Solvente: DMSO-d_6 .

No espectro de **11c** (Figura 18) foi observado o aparecimento do sinal referente ao H-26 como um simpleto em 7,06 ppm, além disso, os sinais referentes aos H-23 e H-25 apresentaram um menor deslocamento químico, 7,57 e 6,86 ppm, respectivamente, devido à ausência do nitrogênio N-26 (Figura 18).

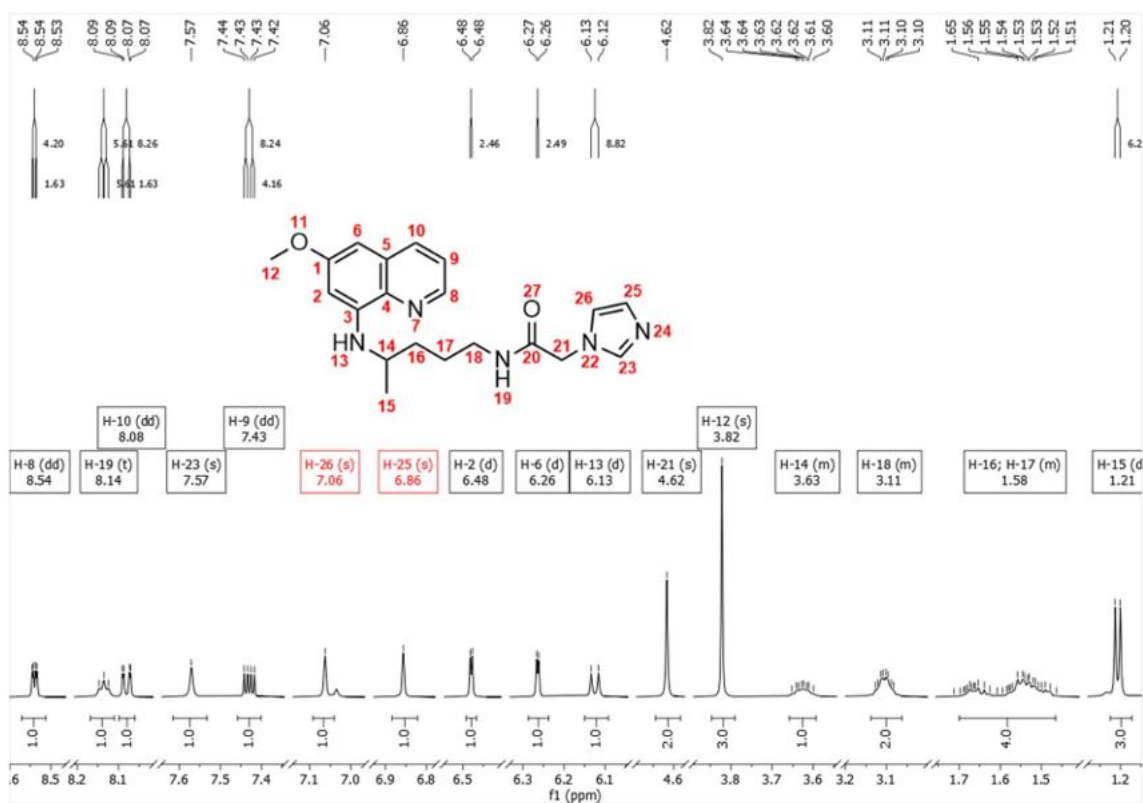


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H do derivado **11c**. Solvente: DMSO-d_6 .

Comparando-se os espectros de **11c** (Figura 18) com **11d** (Figura 19), observa-se o desaparecimento do sinal referente ao H-23 e o aumento do deslocamento químico dos sinais referentes ao H-26 (d, 7,59 ppm) e H-25 (d, 7,17 ppm) devido à presença do grupo nitro no heterociclo (Figura 19).

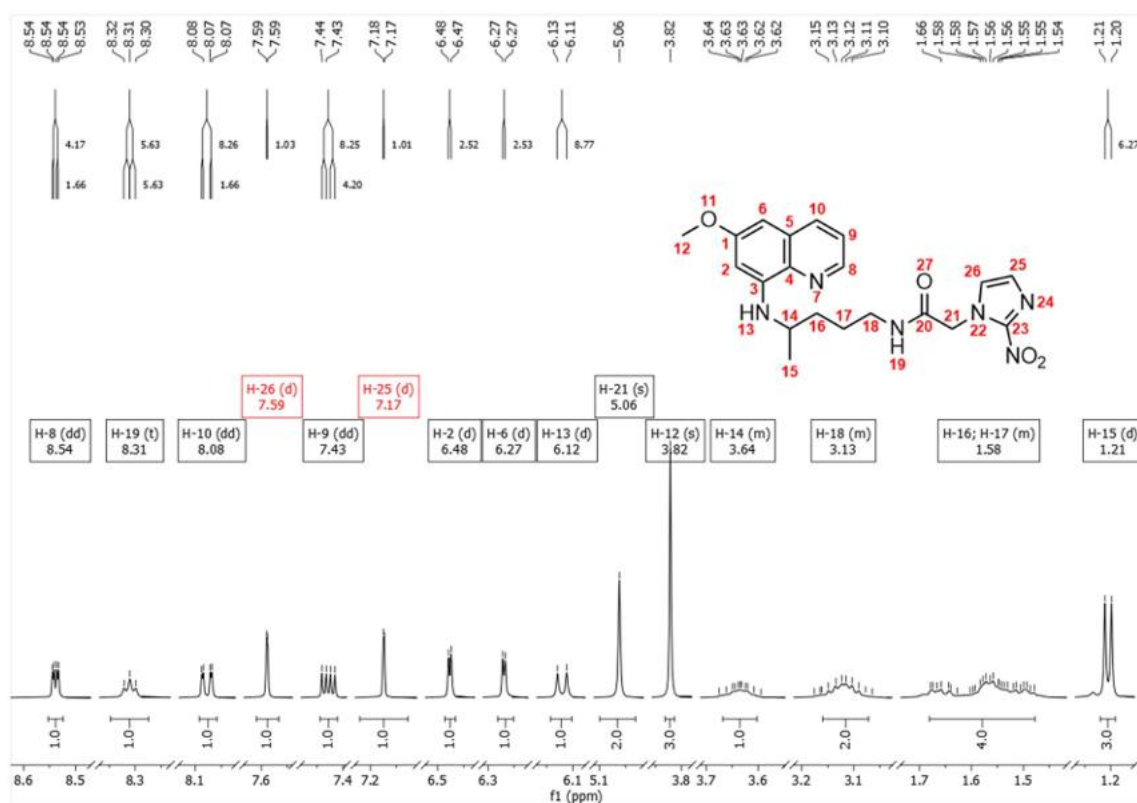


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do derivado **11d**. Solvente: DMSO-d_6 .

Tabela 4. Dados de RMN ^1H (500 MHz) dos derivados **11a-d**. Solvente: DMSO-d_6 .

Hidrogênios	Derivados			
	11a	11b	11c	11d
H-2	6,48 (d, $J = 2,4$ Hz)	6,48 (d, $J = 2,5$ Hz)	6,48 (d, $J = 2,5$ Hz)	6,48 (d, $J = 2,5$ Hz)
H-6	6,27 (d, $J = 2,5$ Hz)	6,27 (d, $J = 2,5$ Hz)	6,26 (d, $J = 2,5$ Hz)	6,27 (d, $J = 2,5$ Hz)
H-8	8,54 (dd, $J = 4,2/1,6$ Hz)	8,54 (dd, $J = 4,2/1,6$ Hz)	8,54 (dd, $J = 4,2/1,6$ Hz)	8,54 (dd, $J = 4,2/1,7$ Hz)
H-9	7,43 (dd, $J = 8,2/4,2$ Hz)	7,43 (dd, $J = 8,2/4,2$ Hz)	7,43 (dd, $J = 8,2/4,2$ Hz)	7,43 (dd, $J = 8,2/4,2$ Hz)
H-10	8,08 (dd, $J = 8,3/1,6$ Hz)	8,08 (dd, $J = 8,4/1,7$ Hz)	8,08 (dd, $J = 8,3/1,6$ Hz)	8,08 (dd, $J = 8,3/1,7$ Hz)
H-12	3,82 (s)	3,82 (s)	3,82 (s)	3,82 (s)

H-13	6,13 (d, $J = 8,8$ Hz)	6,13 (d, $J = 8,8$ Hz)	6,13 (d, $J = 8,8$ Hz)	6,12 (d, $J = 8,8$ Hz)
H-14	3,68 – 3,59 (m)	3,69 – 3,59 (m)	3,67 – 3,58 (m)	3,68 – 3,59 (m)
H-15	1,21 (d, $J = 6,3$ Hz)	1,21 (d, $J = 6,3$ Hz)	1,21 (d, $J = 6,3$ Hz)	1,21 (d, $J = 6,3$ Hz)
H-16	1,71 – 1,44 (m)	1,71 – 1,45 (m)	1,73 – 1,45 (m)	1,71 – 1,45 (m)
H-17	1,71 – 1,44 (m)	1,71 – 1,45 (m)	1,73 – 1,45 (m)	1,71 – 1,45 (m)
H-18	3,18 – 3,05 (m)	3,18 – 3,1 (m)	3,18 – 3,04 (m)	3,19 – 3,05 (m)
H-19	8,24 (t, $J = 5,6$ Hz)	8,37 (t, $J = 5,6$ Hz)	8,14 (t, $J = 5,6$ Hz)	8,31 (t, $J = 5,6$ Hz)
H-21	4,86 (s)	5,07 (s)	4,62 (s)	5,06 (s)
H-23	8,45 (s)	8,82 (s)	7,59 (s)	-
H-25	7,94 (s)	-	6,86 (s)	7,17 (d, $J = 1,0$ Hz)
H-26	-	-	7,06 (s)	7,59 (d, $J = 1,0$ Hz)

5.1.2.2.3 Ressonância magnética nuclear de carbono dos derivados 11a-d

As análises de RMN de ^{13}C dos derivados **11a-d** foram realizadas em aparelho com campo magnético de 125 MHz e utilizando DMSO- d_6 como solvente. Foi utilizada a técnica de desacoplamento de hidrogênios, na qual os sinais referentes aos núcleos de carbono são apresentados na forma de simpletos, a menos que exista na estrutura química núcleos ativos capazes de realizar acoplamento, o que não é o caso dos derivados **11a-d**. De forma semelhante a discussão dos resultados de RMN de ^1H , o espectro de RMN de ^{13}C do derivado **11a** será utilizado como exemplo para a discussão dos sinais (Figura 20). Os dados referentes a todos os derivados estão apresentados na tabela 5.

O carbono C-15, referente a metila, é o mais blindado do espectro com deslocamento químico de 20,13 ppm. Em seguida encontram-se os carbonos da cadeia alifática, C-17, C-16, C-18 e C-14 com deslocamentos químicos de 25,70, 33,29, 38,69 e 46,88 ppm, respectivamente. Entre estes, os carbonos C-14 e C-18 são os mais

desblindados por estarem ligados aos átomos de nitrogênio N-13 e N-19, respectivamente, que por apresentarem diferença de eletronegatividade desblindam esses carbonos. Em 51,08 ppm encontra-se o sinal referente ao C-21. O sinal de C-12 aparece em 54,89 ppm devido ao efeito de desblindagem provocado pelo átomo de oxigênio O-11. Os carbonos referentes ao heterociclo quinolínico são observados entre 91,54 e 158,90 ppm, sendo o carbono C-1 o segundo mais desblindado do espectro. Os carbonos do heterociclo triazólico C-23 e C-25 apresentaram deslocamentos químicos de 145,21 e 151,17, respectivamente. Por fim, o carbono mais desblindado do espectro, C-20, é referente ao carbono carbonílico que apresentou um deslocamento químico de 165,38 ppm (Figura 20).

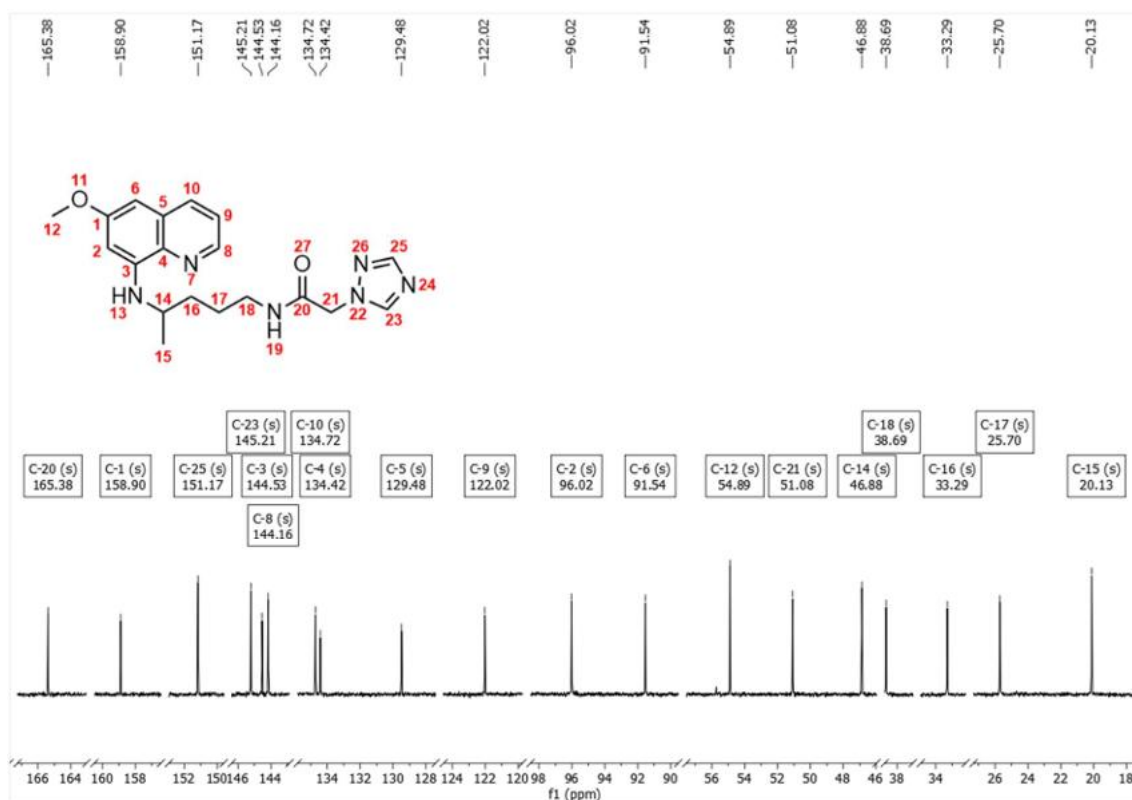


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **11a**. Solvente: DMSO- d_6 .

No espectro do derivado **11b** (Figura 21), observa-se como principal diferença o sinal referente ao C-25 em 161,84 ppm que apresentou maior deslocamento químico devido estar ligado diretamente ao grupamento nitro presente no heterociclo triazólico. Da mesma forma, C-23 se mostrou levemente mais desblindado em 147,99 ppm (Figura

21). Além disso, observou-se o sinal referente ao C-18 um pouco mais desblindado ficando sobreposto ao sinal do solvente em 38,84 ppm (Figura 21).

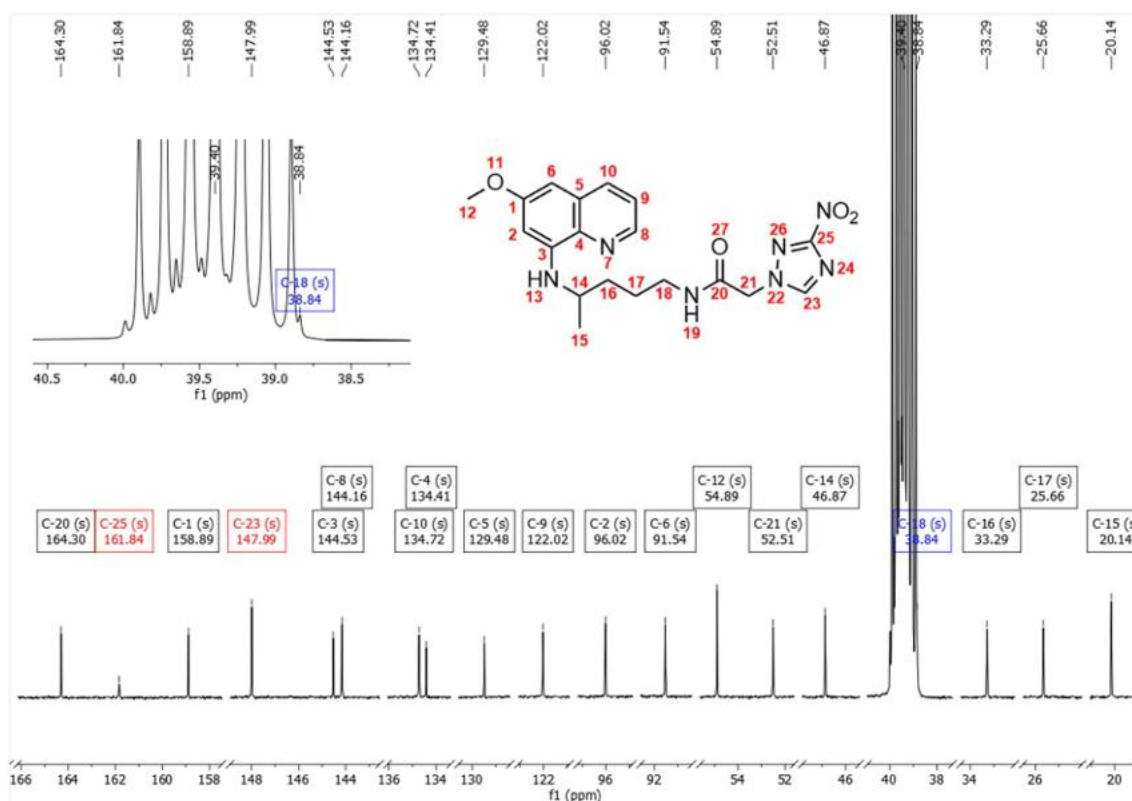


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **11b**. Solvente: DMSO- d_6 .

Já no espectro do derivado imidazólico **11c** (Figura 22), observa-se como principal diferença o aparecimento do sinal referente ao C-26 em 120,34 ppm. Além disso, é observado uma diminuição no valor do deslocamento químico de C-23 e C-25, que apresentaram sinais em 138,02 e 127,74 ppm, respectivamente, devido à ausência do grupo nitro no heterociclo (Figura 22).

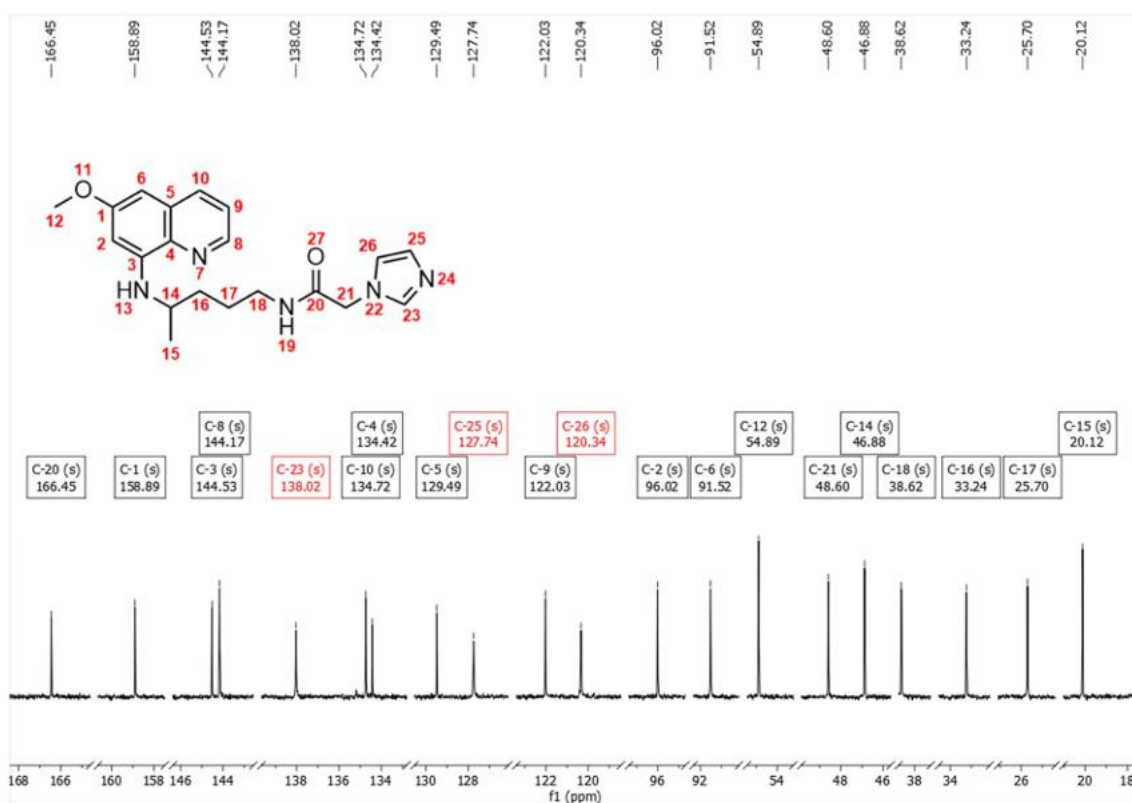


Figura 22. Espectro de RMN de ¹³C do derivado **11c**. Solvente: DMSO-d₆.

Comparando-se o espectro de **11d** (Figura 23) com seu correspondente imidazólico **11c** (Figura 22), observa-se um maior deslocamento químico apresentado por C-23 em 144,84 ppm por estar ligado diretamente ao grupo nitro. Da mesma forma, C-26 também apresentou um aumento no valor de deslocamento químico com seu sinal sendo observado em 128,65 ppm (Figura 23).

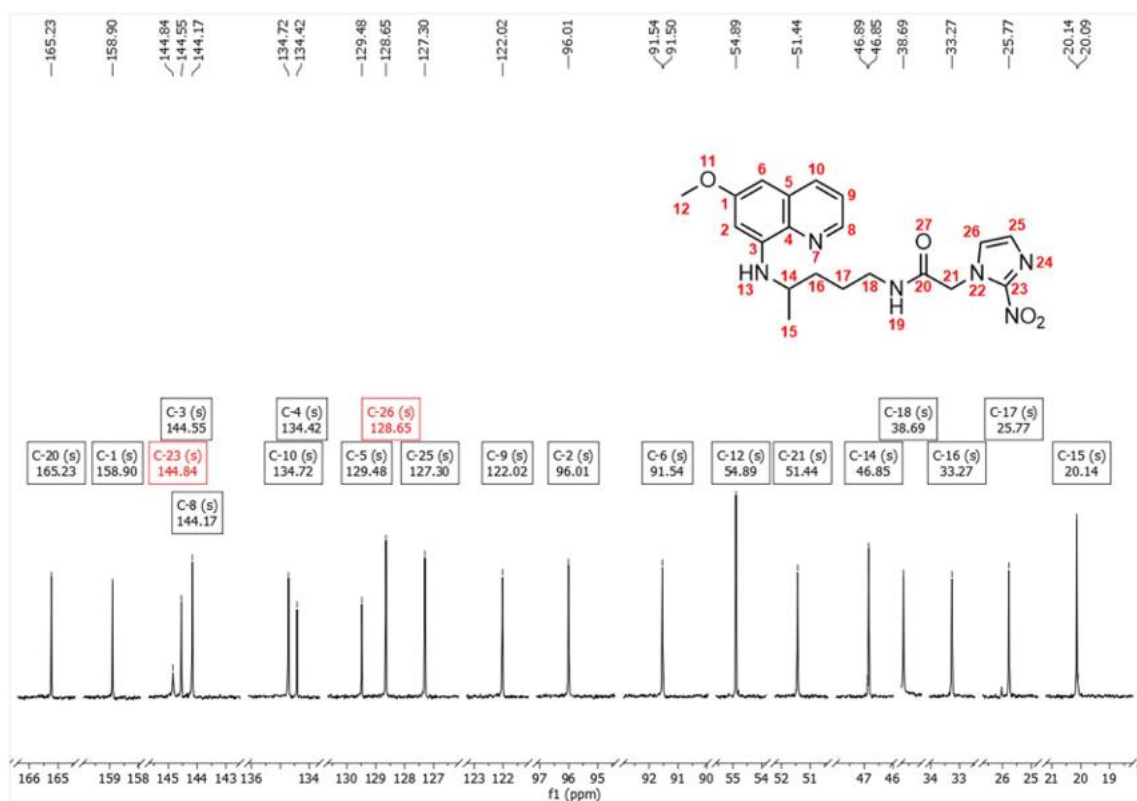


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **11d**. Solvente: DMSO-d_6 .

Tabela 5. Dados de RMN ^{13}C (125 MHz) dos derivados **11a-d**. Solvente: DMSO-d_6 .

Carbonos	Derivados			
	11a	11b	11c	11d
C-1	158,90 (s)	158,89 (s)	158,89 (s)	158,90 (s)
C-2	96,02 (s)	96,02 (s)	96,02 (s)	96,01 (s)
C-3	144,53 (s)	144,53 (s)	144,53 (s)	144,55 (s)
C-4	134,42 (s)	134,41 (s)	134,42 (s)	134,42 (s)
C-5	129,48 (s)	129,48 (s)	129,49 (s)	129,48 (s)
C-6	91,54 (s)	91,54 (s)	91,52 (s)	91,54 (s)
C-8	144,16 (s)	144,16 (s)	144,17 (s)	144,17 (s)
C-9	122,02 (s)	122,02 (s)	122,03 (s)	122,02 (s)

C-10	134,72 (s)	134,72 (s)	134,72 (s)	134,72 (s)
C-12	54,89 (s)	54,89 (s)	54,89 (s)	54,89 (s)
C-14	46,88 (s)	46,87 (s)	46,88 (s)	46,85 (s)
C-15	20,13 (s)	20,14 (s)	20,12 (s)	20,14 (s)
C-16	33,29 (s)	33,29 (s)	33,24 (s)	33,27 (s)
C-17	25,70 (s)	25,66 (s)	25,70 (s)	25,77 (s)
C-18	38,69 (s)	38,84 (s)	38,62 (s)	38,69 (s)
C-20	165,38 (s)	164,30 (s)	166,45 (s)	165,23 (s)
C-21	51,08 (s)	52,51 (s)	48,60 (s)	51,44 (s)
C-23	145,21 (s)	147,99 (s)	138,02 (s)	144,84 (s)
C-25	151,17 (s)	161,84 (s)	127,74 (s)	127,30 (s)
C-26	-	-	120,34 (s)	128,65 (s)

5.1.2.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho dos derivados 11a-d

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é empregada na elucidação estrutural de moléculas orgânicas, principalmente daquelas que contêm grupos funcionais, devido às absorções bastante características que esses grupos apresentam. Dessa forma, as análises dos espectros de IV dos derivados **11a-d** foram realizadas buscando identificar a presença ou ausência das bandas de absorção dos grupos funcionais e ligações químicas característicos de suas estruturas químicas. Os espectros dos derivados **11a** e **11b** serão utilizados como exemplos para discussão e os dados referentes a todos os demais estarão apresentados na tabela 6.

No espectro do derivado **11a** (Figura 24) foi observado uma banda intensa em $1.652,34\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da ligação C=O da carbonila. As carbonilas de amida, apresentam uma absorção menor do que os demais grupos funcionais carbonilados devido ao efeito de ressonância que reduz o caráter de ligação pi, provocando um aumento do comprimento da ligação C-O e consequentemente causando a absorção em comprimentos de ondas menores (Figura 24). As bandas das ligações N-H da amida e da amina secundária se sobrepuseram e foram observadas em $3.412,62\text{ cm}^{-1}$ e $3.360,82\text{ cm}^{-1}$.

¹ referentes ao seu estiramento, assim como, em $1.516,51\text{ cm}^{-1}$ referente aos seus dobramentos (Figura 24).

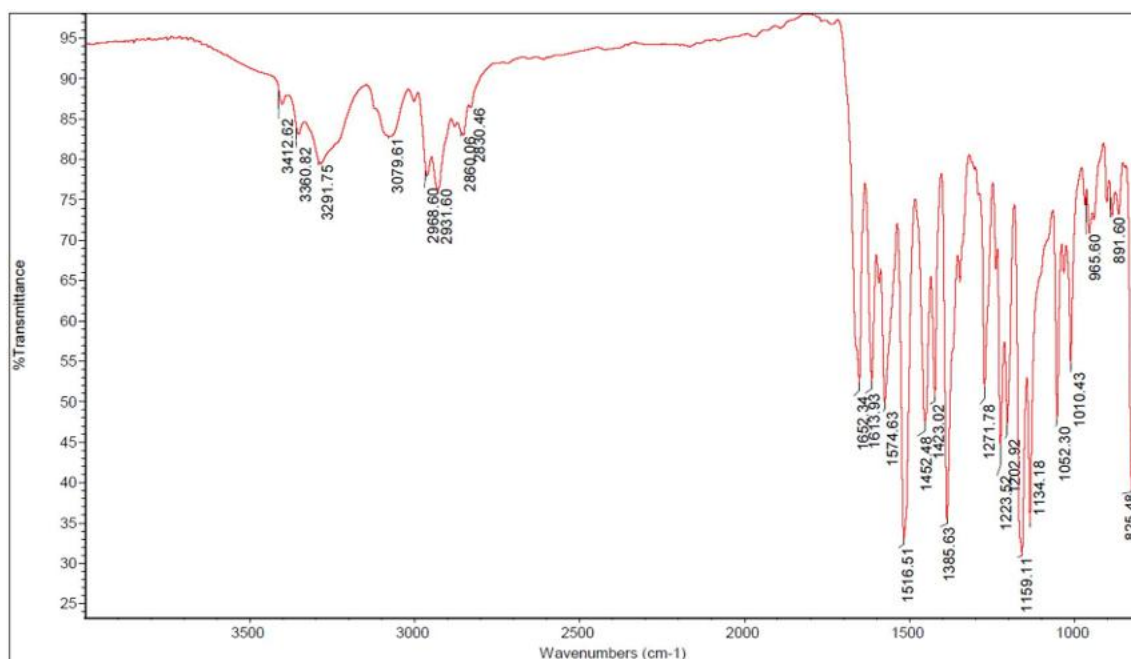


Figura 24. Espectroscopia na região do infravermelho do derivado **11a**.

De forma semelhante ao espectro de **11a** (Figura 24), no espectro do derivado **11b** (Figura 25) foram observadas as bandas referentes a carbonila da amida em $1.652,34\text{ cm}^{-1}$, assim como, as bandas em $3.387,95\text{ cm}^{-1}$ e $3.321,35\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento da ligação N-H da amida e amina e em $1.514,95\text{ cm}^{-1}$ referente ao dobramento destas ligações. Além disso, foram observadas as bandas em $1.550,54\text{ cm}^{-1}$ e $1.307,77\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento das ligações N-O do grupo nitro (Figura 25).

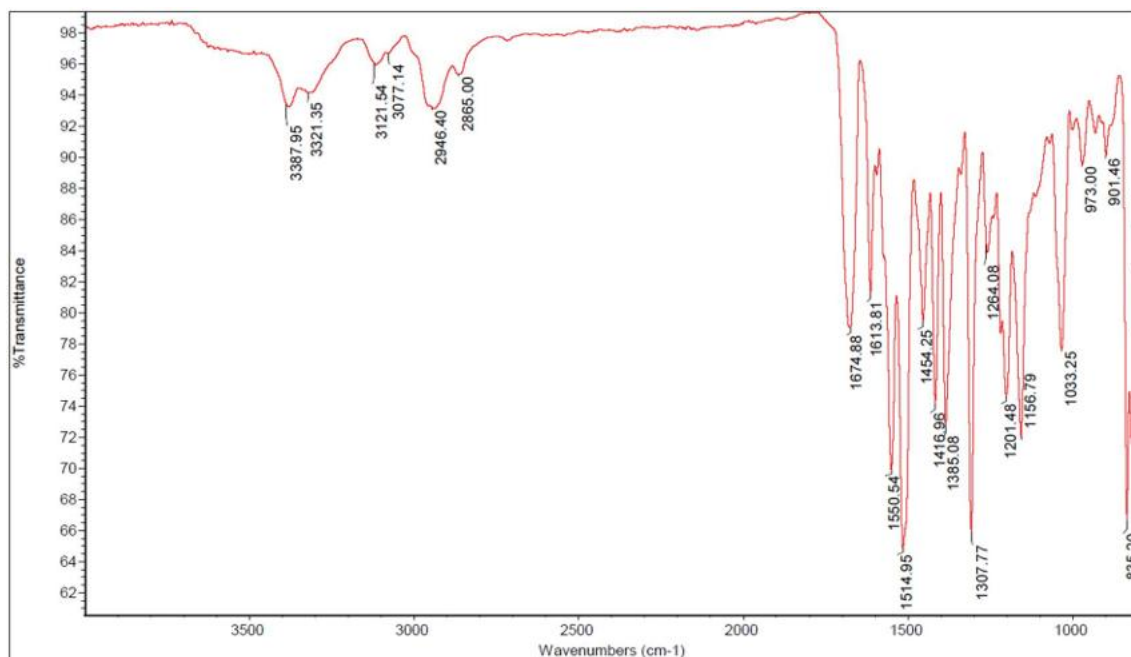


Figura 25. Espectroscopia na região do infravermelho do derivado **11b**.

Tabela 6. Dados de espectroscopia na região do infravermelho dos derivados **11a-d**.

Derivado	λ (cm ⁻¹)			
	N-H (amida)	N-H (amina)	C=O	N-O
11a	3.412,62	3.360,82	1.652,34	-
	1.516,51	1.516,51		
11b	3.387,95	3.321,35	1.652,34	1.550,54
	1.514,95	1.514,95		1.307,77
11c	3.405,22	3.348,48	1.666,32	-
	1.513,17	1.513,17		
11d	3.390,42	3.306,55	1.676,02	1.557,35
	1.516,42	1.516,42		1.361,10

5.1.3 Análise dos derivados finais 11a-d por CLAE-UV

A pureza cromatográfica dos derivados **11a-d** foi determinada por meio de CLAE-UV nos comprimentos de onda de 261, 324 e 361 nm. Para avançarem para as avaliações biológicas, os derivados precisam apresentar pelo menos 95% de pureza. Todos os derivados atenderam ao requisito estando aptos para as avaliações biológicas. Na figura

26 estão apresentados os cromatogramas dos derivados **11a-d** para o comprimento de onda de 261 nm. Todos os dados referentes as análises de CLAE-UV encontram-se na tabela 7.

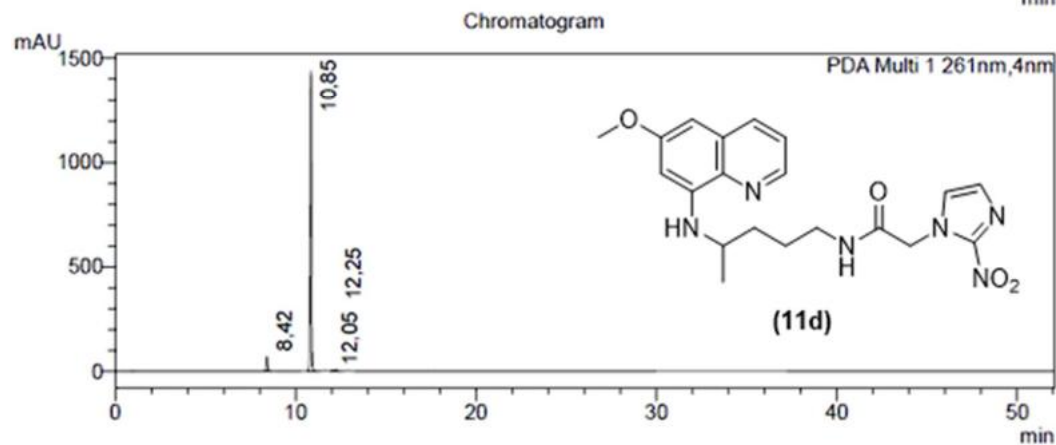
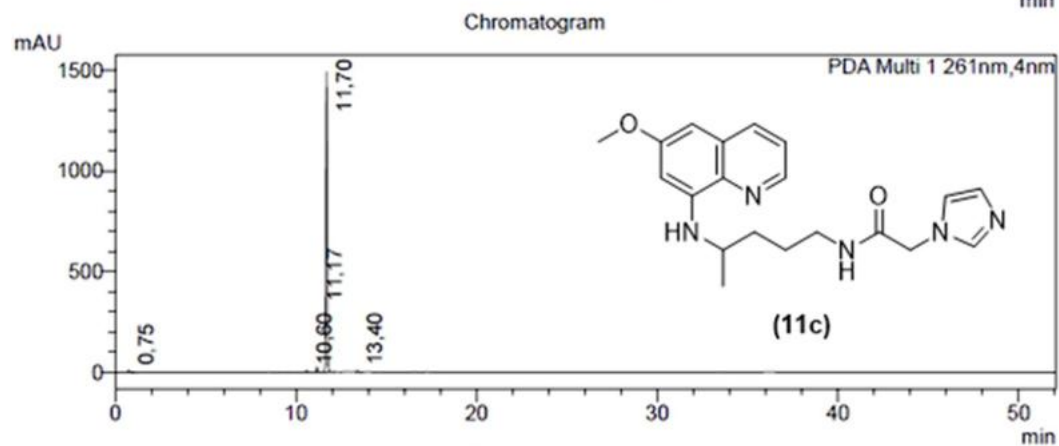
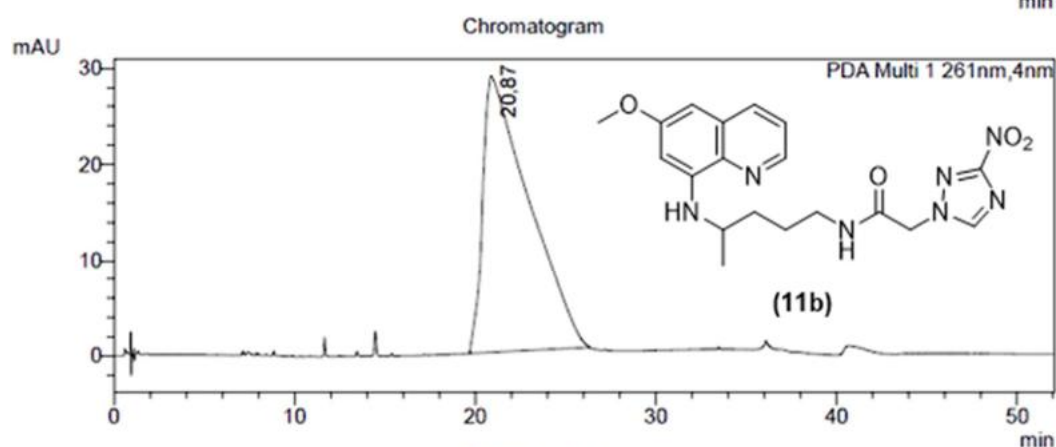
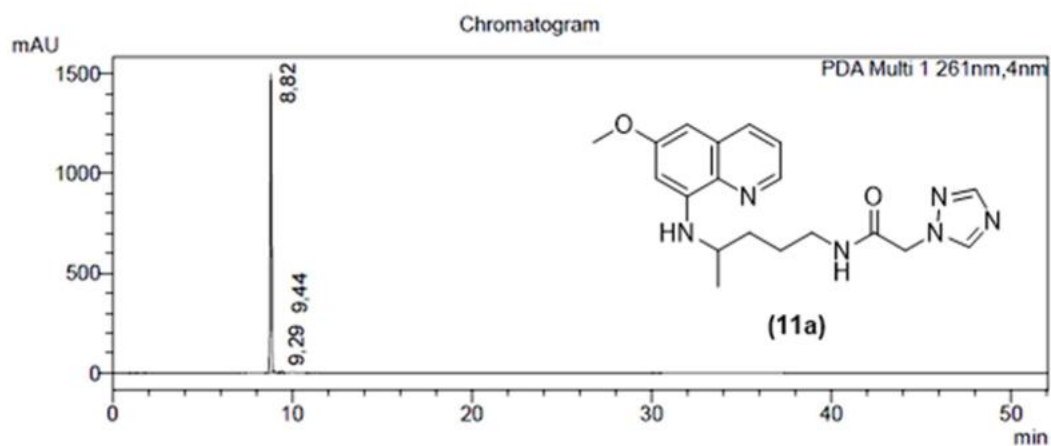


Figura 26. Cromatogramas em 261 nm dos derivados **11a-d**.

Tabela 7. Dados de cromatografia líquida de alta eficiência dos derivados 11a-d.

Derivados	Pureza %		
	$\lambda = 261 \text{ nm}$	$\lambda = 324 \text{ nm}$	$\lambda = 361 \text{ nm}$
10a	99	100	100
10b	100	-	-
10c	97	93	100
10d	95	99	97

5.2 PREDIÇÃO IN SILICO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO

A descoberta de um fármaco é um processo oneroso em relação aos recursos financeiros e tempo, podendo levar em média 10 anos de pesquisa. As principais características que levam a falha no desenvolvimento de um fármaco são as relacionadas à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e a toxicidade (WU et al, 2022).

Considerando o alto custo do processo de descoberta de fármacos, as previsões *in silico* relacionadas às propriedades de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) se destacam como ferramentas úteis na seleção de candidatos a fármacos mais promissores. Essa abordagem pode ser aplicada nos estágios iniciais do desenvolvimento e pode ajudar a diminuir o número de falhas relacionadas a farmacocinética nos ensaios pré-clínicos. (Bakchi et al., 2022; Daiana, Michielin & Zoete, 2017).

Na literatura científica, há vários estudos que buscam prever os parâmetros de ADME com base na estrutura química dos compostos. Um marco importante foi o trabalho de LIPINSKI e colaboradores (2004), que analisou uma ampla biblioteca de fármacos administrados por via oral. O objetivo desse estudo foi identificar propriedades físico-químicas essenciais que favorecem a absorção oral, introduzindo o conceito de “drug-likeness”. O estudo deu origem à Regra dos Cinco de Lipinski (Tabela 8), que oferece uma abordagem contextualizada e relaciona os parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos de candidatos a fármacos. (DAIANA, MICHIELIN & ZOETE, 2017).

Após o planejamento dos novos derivados, **11a-d**, foi feita a predição *in silico* de seus perfis farmacocinéticos. A predição foi realizada utilizando o servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), e dentre os critérios avaliados está a regra dos 5 de Lipinski (Tabela 8), o coeficiente de partição entre n-octanol/água (logP), grupos doadores (HD) e aceptores (HA) de ligações de hidrogênio, peso molecular (PM), absorção gastrointestinal (GI), penetração da barreira hematoencefálica (BHE), potencial para inibir as principais isoformas de CYP que metabolizam fármacos e compostos apresentam alerta para comportamento promíscuos que podem gerar falso positivo e fragmentos estruturais associados à toxicidade ou instabilidade metabólica (PAINS) (CONSERVA, et al., 2021).

Tabela 8. Critérios avaliados na Regra dos 5 de Lipinski.

PROPRIEDADE	REFERÊNCIA
PESO MOLECULAR	< 500 g/mol
Nº DE ÁTOMOS DOADORES DE LIGAÇÃO HIDROGÊNIO	5
Nº DE ÁTOMOS ACEPTORES DE LIGAÇÃO HIDROGÊNIO	10
COEFICIENTE DE PARTIÇÃO OCTANOL-ÁGUA	≤ 5

Os resultados obtidos para os derivados **11a-d** mostraram que nenhum dos derivados apresentou alerta de PAINS, sendo um parâmetro dentro das avaliações para identificar fragmentos potencialmente problemáticos que possam gerar resultados sobre reatividade que sejam inespecíficos e também estruturas mal interpretadas (DAIANA, MICHIELIN & ZOETE, 2017). No caso das nossas predições, apenas o composto **11b** infringiu uma das regras de Lipinski, especificamente a que estabelece o limite de 10 para o número de aceptores de ligação hidrogênio, podendo assim influenciar na absorção, devido uma maior interação com moléculas de água ou biomoléculas, deixando o candidato a fármaco com uma característica mais polar, dificultando sua passagem pelas membranas lipídicas.

Todos os derivados foram preditos com uma alta absorção gastrointestinal, sendo um bom indício para o desenvolvimento de fármacos administrados por via oral. A predição evidencia que nenhum dos compostos seria capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, parâmetro que ajuda a priorizar compostos com alta probabilidade de penetração no sistema nervoso central. Já a glicoproteína P é essencial para avaliar o efluxo ativo através de membranas biológicas, podendo afetar a biodisponibilidade do composto e também a sua resistência. (DAIANA, MICHIELIN & ZOETE. 2017). Todos os derivados foram preditos como substrato da glicoproteína P, que atua como efluxo na absorção de fármacos. A compreensão entre moléculas e citocromos P450 (CYP) é fundamental, pois essas isoenzimas desempenham um papel crucial na biotransformação e eliminação de fármacos.

Na predição de inibição das principais isoformas da CYP (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9; CYP2D6; CYP3A4) responsáveis pelo metabolismo, os derivados **11a** e **11c** foram preditos como inibidores para todas as isoformas. Já os derivados **11b** e **11d**, ambos com o grupamento nitro, tiveram uma resposta diferente com as isoformas CYP1A2 e CYP2D6. O composto **11b** não inibiria CYP1A2 e CYP2D6, enquanto o composto **11d** não inibiria somente a CYP1A2.

Tabela 9. Predição in silico do perfil farmacocinético dos derivados através de suas características físico-químicas [servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch>)].

Abreviaturas: Mod - moderada; Sol - solúvel; S - sim; N - não

Derivado	Ha	Hd	LogP	Solub. H ₂ O	Abs. TGI	Perm. BHE	Subst. gpP	CYP 1A2	CYP 2C19	CYP 2C9	CYP 2D6	CYP 3A4
11a	5	2	2.76	Mod	Alta	N	S	S	S	S	S	S
11b	7	2	2.57	Mod	Alta	N	S	N	S	S	N	S
11c	4	2	2.99	Sol	Alta	N	S	S	S	S	S	S
11d	6	2	2.58	Mod	Alta	N	S	N	S	S	S	S

Em linhas gerais, os estudos detalhados apresentam um perfil promissor, com boa absorção no trato gastrointestinal e permeabilidade à barreira hematoencefálica. As diferenças na solubilidade e no número de ligações de hidrogênio podem influenciar a biodisponibilidade, sendo aspectos a serem considerados em projetos futuros.

Os resultados apresentados a respeito das enzimas CYP e glicoproteína P evidenciam a necessidade de estudos adicionais para compreender de forma mais clara o

metabolismo. Assim, apesar das boas características preditas, testes experimentais são fundamentais para validar essas observações.

5.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

5.3.1 Atividade antiplasmodica e citotoxicidade

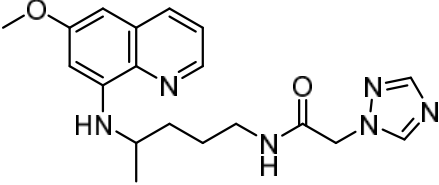
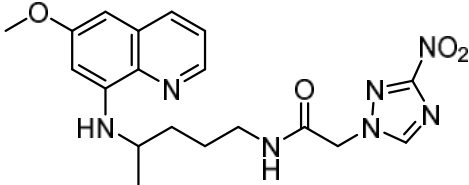
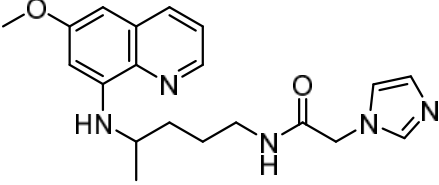
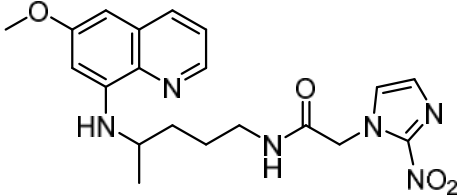
A avaliação *in vitro* da atividade antiplasmodica dos derivados **11a-d** foi realizada contra a cepa 3D7 de *P. falciparum*, sensível a CQ, por meio do ensaio de inibição de crescimento utilizando SYBR Green I. Neste ensaio, o meio de cultura contendo os parasitos e os derivados avaliados foram incubados por 72 horas à temperatura de 37 °C. Após a incubação, o meio de cultura é removido e as hemácias ressuspensas em tampão PBS e lisadas em tampão de lise com SYBR green. Em seguida, uma nova incubação de 30 minutos é realizada e, por fim, a fluorescência correspondente a parasitemia é lida no espectrofotômetro. O ensaio foi realizado pelo grupo do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, do Instituto de Física de São Carlos – USP.

Os derivados **11a-d** foram avaliados nas concentrações de 0,04 a 50 µM em dois experimentos independentes. Como controle positivo foi utilizado o antimalárico artesunato ($IC_{50} = 0,020 \mu M$). Foram considerados ativos os derivados que apresentem potência com valor de IC_{50} menor do que 10 µM. Os derivados **11a-d** não demonstraram potência significativa contra o parasito nas condições testadas, apresentando valores de IC_{50} maiores do que 45 µM. Os dados referentes à essa avaliação estão apresentados na tabela 10.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). A citotoxicidade foi mensurada por meio da viabilidade celular utilizando a resazurina, que é um indicador de oxirredução. A resazurina é adicionada em cada poço e as placas são incubadas por 4 horas à 37 °C. Em seguida, é feita a leitura da fluorescência com o auxílio de um espectrofotômetro. A concentração inibitória 50% (CC_{50}^{HepG2}) foi determinada por regressão não-linear da curva concentração-resposta utilizando o programa GraphPad Prism 8. Este ensaio também foi realizado pelo grupo do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, do Instituto de Física de São Carlos – USP.

Todos os derivados não demonstraram toxicidade às células avaliadas, apresentando valores de CC_{50}^{HepG2} maiores do que 100 μM (Tabela 10). Esses resultados podem indicar que as modificações estruturais realizadas foram efetivas para diminuir a toxicidade à essas células apresentada pela PQ.

Tabela 10. Avaliação preliminar *in vitro* da atividade antiplasmódica contra *P. falciparum* e da citotoxicidade dos derivados **11a-d**.

Derivado	Estrutura química	IC ₅₀ ^{3D7} (μM) Média ± DP	CC ₅₀ ^{HepG2} (μM) Média ± DP	IS
11a		> 50	> 100	> 2
11b		48 ± 3	> 100	> 2
11c		45 ± 7	> 100	> 2
11d		49 ± 2	> 100	> 2
Artesunato	-	0,020 ± 0,002	nd	nd

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram planejados e sintetizados novos derivados da PQ com potencial atividade antiplasmodica e baixa toxicidade. Foram obtidos 4 derivados inéditos da PQ **11a-d**, através de uma rota de síntese com apenas duas etapas reacionais com rendimentos brutos satisfatórios, variando de 63% a 95%.

O método de purificação escolhido se mostrou eficaz, visto que, todos os derivados apresentaram pureza cromatográfica suficiente para serem avaliados biologicamente.

Na avaliação contra o *P. falciparum*, os derivados **11a-d** apresentaram valores de IC₅₀ superiores a 45 µM, acima de 10 µM, que é o estabelecido como critério para serem considerados ativos. Dessa forma não demonstraram atividade antiplasmodica significativa contra a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Sendo assim, eles não foram testados contra formas assexuadas de *P. vivax*, usando o ensaio de maturação de esquizontes (SMA) e a sua capacidade de bloquear a transmissão da malária em mosquitos *Anopheles darlingi*, em um ensaio de alimentação por membrana (MFA), usando isolados de campo de *P. vivax*.

Com relação à citotoxicidade, todos os derivados apresentaram valores acima de 100 µM, evidenciando que as modificações realizadas na cadeia lateral da PQ não promoveram toxicidade contra as células avaliadas.

Como perspectiva almeja-se a continuidade das investigações, no que se refere às modificações realizadas na cadeia lateral da PQ através do planejamento e síntese de outros derivados.

Ressalta-se que resultados negativos também fazem parte da construção científica, que podem levar à descoberta de uma nova opção terapêutica, pois contribuem para a construção de dados para relação estrutura-atividade (SAR).

7 PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Materiais e Métodos

Os solventes e reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich®, Biograde® e Neon®.

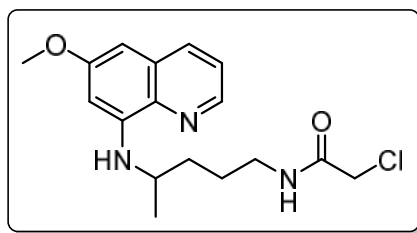
O processo para monitoramento das reações foi realizado através de cromatografia em camada fina (CCF) utilizando cromatofolhas Kieseigel 60 F-254 com espessura de 0,25 mm com gel de sílica em alumínio e indicador para UV (254 nm), da marca Merck®. Os eluentes foram preparados volume a volume (V/V) e a visualização das substâncias em CCF foi realizada em lâmpada de luz ultravioleta de ondas curtas e longas (254-366 nm).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em aparelho Bruker Avance equipado com uma criosonda de 5 mm, operando a uma frequência de 500,00 MHz para ^1H , 125,00 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Nos espectros de ^1H e ^{13}C foi utilizado o trimetilsilano como referência em 0 ppm. O solvente utilizado para diluição das amostras foi dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6). As análises foram realizadas à temperatura ambiente e os resultados foram editados utilizando o *software* MestReNova® versão 14.0.0-23239 (© 2019 Mestrelab Research S. L.).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada utilizando o cromatógrafo Agilent® modelo 6890N com o módulo de massas Agilent® modelo 5973 à 70 eV, com coluna Agilent® 122-5532 DB-5MS (5% difenil : 95% dimetilpolisiloxano).

As análises de espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray foram realizadas em aparelho LC-MS-Bruker Daltonics MicroTOF.

7.2 Obtenção do intermediário 2-cloro-*N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)acetamida (12)



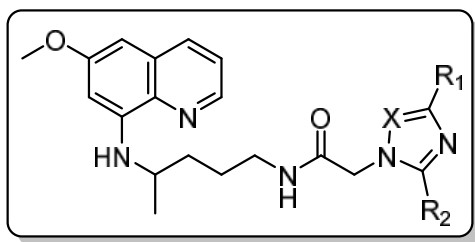
Em um balão com 1,3 g (0,00286 mol) de difosfato de PQ foram adicionados 5 mL de acetato de etila e 5 mL de água. A mistura foi mantida em agitação até completa solubilização. Em seguida, foi adicionado 1,58 g (0,01145 mol) de carbonato de potássio. Ao adicionar o carbonato, o meio reacional teve a coloração alterada de laranja para verde musgo. O meio foi mantido em agitação por 15 minutos para que houvesse a liberação da primaquina em sua forma de base livre. Em seguida, foi adicionado, lentamente, 640 mg (0,00571 mol) de cloreto de cloroacetila, sendo observado novamente uma mudança na coloração do meio reacional que assumiu uma cor amarelada. A mistura foi mantida em agitação à temperatura ambiente por 4 horas. O isolamento foi feito através de uma extração líquido-líquido utilizando diclorometano e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada com auxílio do rotaevaporador, obtendo-se o produto na forma de um óleo castanho.

Rendimento bruto: 94%

CG-EM: m/z 201,10 (100,00), m/z 335,20 (16,17), m/z 202,10 (14,11), m/z 186,10 (8,56), m/z 146,05 (6,46)

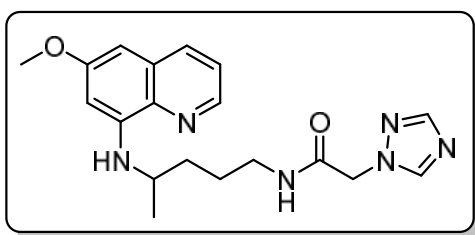
7.3 Obtenção dos derivados 11a-d

7.3.1 Procedimento geral para obtenção dos derivados 11a-d



Em um balão foi adicionado 200 mg (0,000597 mol) do intermediário clorado (**12**) e colocado para solubilizar, sob agitação em 5 mL de acetonitrila. Após completa solubilização, foram adicionados 0,000597 mol dos heterociclos azólicos correspondentes e 0,001194 mol de carbonato de potássio. Em seguida, foram adicionadas 5 gotas de brometo de tetra-n-butilamônio. O meio reacional foi mantido em agitação à 82° C de 4 a 26 h. No isolamento, a acetonitrila foi evaporada com o auxílio do rotaevaporador, seguido de uma extração líquido-líquido utilizando diclorometano e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada no rotaevaporador, fornecendo os produtos de interesse na forma de um óleo castanho.

7.3.1.1 Obtenção do derivado *N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)acetamida (**11a**)



Tempo reacional: 4 h

Rendimento bruto: 86,14 %

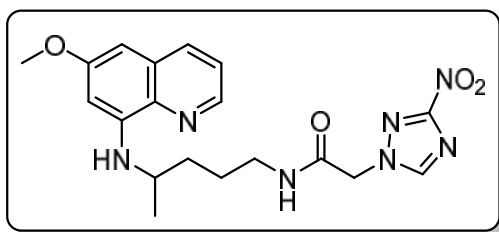
CG-EM: *m/z* 201,00 (100), *m/z* 368,20 (14,73), *m/z* 202,00 (14,26), *m/z* 186,00 (8,42), *m/z* 179,00 (7,69)

RMN 1H (500 MHz DMSO-d₆) δ 8,54 (dd, *J* = 4,23; 1,63 Hz, 1H), 8,24 (t, *J* = 5,61; 5,61 Hz, 1H), 8,08 (s, 1,64 Hz, 1H), 7,43 (dd, *J* = 8,24; 4,16 Hz, 1H), 6,48 (d, *J* =

2,43 Hz, 1H), 6,27 (d, J = 2,47 Hz, 1H), 6,13 (d, J = 8,79 Hz, 1H), 1,21 (d, J = 6,20 Hz, 3H).

RMN ¹³C (125 MHz DMSO-d₆) δ 165,38 (C20), 158,90 (C1), 151,17(C5), 145,21 (C23), 144,53 (C3), 144,16 (C8), 134,72 (C10), 134,42 (C4), 129,48 (C5), 122,02 (C9), 96,02 (C2), 91,54 (C6), 54,89 (C12), 51,08 (C21), 46,88 (C14), 38,69 (C18), 33,29 (C16), 25,70 (C17), 20,13 (C15).

7.3.1.2 Obtenção do derivado *N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)-2-(3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol-1-il)acetamida (11b)



Tempo reacional: 6 h

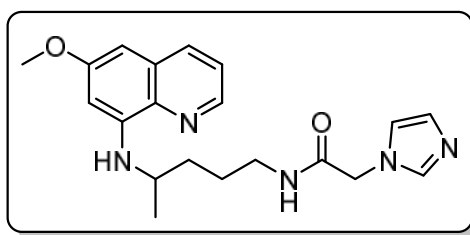
Rendimento bruto: 90,83%

CG-EM: *m/z* 201,00 (100), *m/z* 207,00 (24,33), *m/z* 44,00 (23,97), *m/z* 73,00 (17,76), *m/z* 368,10 (16,37)

RMN ¹H: (500 MHz DMSO-d₆) δ 8,54 (dd, J = 4,25; 1,65 Hz, 1H), 8,37 (t, J = 5,57; 5,57 Hz, 1H), 8,08 (dd, J = 8,36; 1,65 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 8,24; 4,21 Hz, 1H), 6,48 (d, J = 2,49 Hz, 1H) 6,13 (d, J = 8,75 Hz, 1H), 1,21 (d, J = 6,3 Hz, 1H)

RMN ¹³C: (125 MHz DMSO-d₆) δ 164,30 (C20), 161,84 (C25), 158,89 (C1), 147,99 (C3), 144,53 (C3), 144,16 (C8), 134,72 (C10), 134,41 (C4), 129,48 (C5), 122,02 (C9), 96,02 (C2), 91,94 (C6), 54,89 (C12), 52,51 (C21), 46,87 (C14), 38,84 (C18), 33,29 (C16), 25,66 (C17), 20,14 (C15)

7.3.1.3 Obtenção do derivado 2-(1*H*-imidazol-1-il)-*N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)acetamida (11c)



Tempo reacional: 21 h

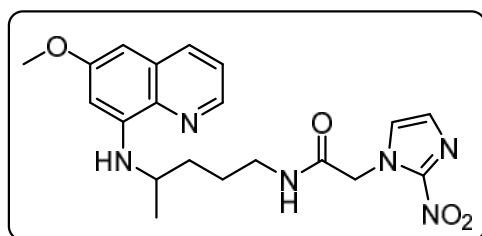
Rendimento bruto: 95 %

CG-EM: m/z 201,00 (100), m/z 367,20 (19,41), m/z 202,00 (14,00), m/z 241,10 (10,42), m/z 186,00 (10,15)

RMN ¹H (500 MHz DMSO-*d*₆) δ 8,54 (dd, J = 4,20; 1,63 Hz, 1H), 8,14 (t, J = 5,61; 5,61 Hz, 1H), 8,08 (dd, J = 8,26; 1,63 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 8,24; 4,16 Hz, 1H) 6,48 (d, J = 2,46 Hz, 1H) 6,26 (d, J = 2,49 Hz, 1H), 6,13 (d, J = 8,82 Hz, 1H), 1,21 (d, J = 6,2 Hz, 3,0)

RMN ¹³C (125 MHz DMSO-*d*₆) δ 166,45 (C20), 158,89 (C1), 144,43 (C3), 144,17 (C8), 138,02 (C23), 134,72 (C10), 134,42 (C4), 129,49 (C5), 127,74 (C25), 122,03 (C9), 120,34 (C26), 96,02 (C2), 91,52 (C6), 54,89 (C12), 48,60 (C21), 46,88 (C14), 38,62 (C18), 33,24 (C16), 25,70 (C17), 20,12 (C15)

7.3.1.4 Obtenção do derivado *N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (11d)



Tempo reacional: 26 h

Rendimento bruto: 63,65%;

CG-EM: m/z 201,00 (100), m/z 365,20 (16,71), m/z 202,00 (13,86), m/z 186,00 (8,47), m/z 227,10 (7,66)

RMN ¹H: (500 MHz DMSO-d₆) δ 8,54 (dd, J = 4,17; 1,66 Hz, 1H), 8,31 (t, J = 5,63; 5,63 Hz, 1H), 8,08 (dd, J = 8,26; 1,66 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 1,03 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 8,25; 4,20 Hz, 1H) 7,17 (d, J = 1,01 Hz), 6,48 (d, J = 2,52 Hz, 1H), 6,27 (d, J = 2,53 Hz, 1H), 6,12 (d, J = 8,77 Hz, 1H), 1,21 (d, J = 6,27 Hz, 3H)

RMN ¹³C: (125 MHz DMSO-d₆) δ 165,23 (C20), 158,90 (C1), 144,64 (C23), 144,55 (C3), 144,17 (C8), 134,72 (C10), 134,42 (C4), 129,48 (C5), 128,65 (C26), 127,30 (C25), 122,02 (C9), 96,01 (C2), 91,54 (C6), 54,89 (C12), 51,44 (C21), 46,85 (C14), 38,69 (C18), 33,27 (C16), 25,77(C17), 20,14 (C15)

7.4 Processo de purificação dos derivados finais

Os derivados **11a-d** foram purificados através do método de cromatografia preparativa de camada fina (CPCF), utilizando cromatofolhas comercialmente disponíveis. Esse método de purificação foi escolhido devido a menor quantidade de solvente utilizada no processo, se comparado a uma coluna cromatográfica, e por apresentar um bom resultado na separação das substâncias, levando em consideração que os coeficientes de retenção dos derivados e das impurezas são próximos.

Os derivados **11a-d** foram dissolvidos em diclorometano ou clorofórmio, e após completa solubilização foram aplicados na placa cromatográfica com auxílio de um capilar. A quantidade máxima de produto aplicado na placa foi da substância **11c**, 130 mg. Em seguida, as placas foram colocadas em uma cuba cromatográfica contendo os eluentes selecionados. Após a separação dos produtos, a área de interesse foi marcada, recortada e mantida em agitação em um béquer com acetonitrila. Em seguida, é feita uma filtração a vácuo e o solvente é retirado com um rotaevaporador. Vale ressaltar que a substância **11c** teve que passar por uma segunda tentativa de purificação. Os dados referentes ao processo de purificação dos derivados **11a-d** encontram-se na tabela 11.

Tabela 11. Dados dos processos de purificação dos derivados **11a-d**.

Derivado	Solvente Dissolvido	Massa aplicada (mg)	Massa Obtida (mg)	Eluente	Eluente de extração
11a	CH ₂ Cl ₂	100	77	AcOEt (7) : (3) Hex	Acetonitrila
11b	CH ₂ Cl ₂	110	45	AcOEt (7) : (3) Hex	Acetonitrila
11c	CH ₂ Cl ₂	131	67	MeCN (2) : (8) AcOEt	Acetonitrila
11d	CH ₂ Cl ₂	100	70	AcOEt (7) : (3) Hept	Acetonitrila

7.5 Avaliação biológica

7.5.1 Cultivo *in vitro* do *Plasmodium falciparum*

O *P. falciparum* (cepa 3D7) foi mantido em cultura contínua conforme os protocolos estabelecidos por Trager e Jensen (1976), sob condições controladas de atmosfera com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, a uma temperatura de 37° C. O meio de cultura utilizado consistiu em RPMI 1640, complementado com 25 mM de HEPES (pH 7,4), 24 mM de NaHCO₃, 11 mM de glicose, 3,67 mM de hipoxantina e 0,05 g/L de gentamicina, sendo suplementado com 0,5% de Albumax II. A parasitemia foi monitorada diariamente por meio de esfregaços sanguíneos corados de acordo com o método panótipo rápido.

7.5.2 Atividade inibitória contra o *P. falciparum* utilizando o ensaio de SYBR green

Os parasitos foram sincronizados na fase de anel por meio de tratamento com 5% de sorbitol (peso/volume), conforme descrito por LAMBROS E VANDERBERG (1979). Após a sincronização, a cultura, com parasitemia de 0,5% e hematócrito de 2,5%, foi distribuída em placas de 96 poços e incubada com os compostos nas concentrações variando de 50 a 0,04 µM, obtidas por meio de 11 diluições seriadas com fator de 2. Em cada placa, foram incluídos poços de controle negativo, com hemácias não parasitadas, e controle positivo de inibição, com hemácias parasitadas sem a adição de compostos. A concentração de DMSO foi mantida abaixo de 0,1%.

As placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C em estufa umidificada, com atmosfera composta por 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e as hemácias ressuspensas em 100 µL de tampão PBS (116 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄), sendo posteriormente lisadas com

100 µL de tampão de lise (20 mM Tris-Base, 5 mM EDTA, 0,0008% Triton X-100 (v/v), 0,008% saponina (m/v), pH 8,0) adicionado de 0,002% SYBR Green I (v/v). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e a fluorescência, correspondente à densidade parasitária, foi quantificada em leitor de placas SpectraMAX Gemini EM (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm). A concentração inibitória de 50% (IC_{50}^{3D7}) foi calculada por análise de regressão não-linear da curva concentração-resposta utilizando o software GraphPad Prism 8.

7.5.3 Citotoxicidade em células de hepatocarcinoma humano (HepG2)

Células de hepatocarcinoma (HepG2) foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (v/v), 24 mmol/L de bicarbonato de sódio, 40 mg/mL de gentamicina e 10 mmol/L de HEPES, com pH ajustado para 7,4. Para a avaliação da citotoxicidade, as células foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/mL em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período, os compostos foram adicionados aos poços nas concentrações variando de 100 a 1,5 µM, obtidas por meio de 7 diluições seriadas com fator de 2, e as células foram incubadas por 72 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Células não tratadas foram mantidas como controle, sob as mesmas condições.

A citotoxicidade dos compostos foi determinada por meio da avaliação da viabilidade celular utilizando o indicador de oxirredução resazurina. Para isso, foram adicionados 40 µL de resazurina (0,15 mg/mL) em cada poço, e as placas foram incubadas por 4 horas a 37 °C. A fluorescência foi então medida em um leitor de placas SpectraMAX Gemini EM, com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. A concentração inibitória de 50% (CC₅₀ HepG2) foi calculada por meio da análise de regressão não-linear da curva concentração-resposta utilizando o software GraphPad Prism 8.

REFERÊNCIAS

- Alven, S., and Aderibigbe, B. (2019). Combination Therapy Strategies for the Treatment of Malaria. *Molecules*, 24(19), 3601. <https://doi.org/10.3390/molecules24193601>
- Ashley, E. A., and Phyo, A. P. (2018). Drugs in Development for Malaria. *Drugs*, 78(9), 861–879. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0911-9>
- Avalos, S., Mejia, R. E., Banegas, E., Salinas, C., Gutierrez, L., Fajardo, M., Galo, S., Pinto, A., Mejia, A., and Fontecha, G. (2018). G6PD deficiency, primaquine treatment, and risk of haemolysis in malaria-infected patients. *Malaria Journal*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2564-2>
- BAKCHI, B. Et al. (2022) Uma visão geral das aplicações da ferramenta web swissadme no projeto e desenvolvimento de agentes anticancerígenos, antituberculares e antimicrobianos: a perspectiva de um químico medicinal. *Journal of Molecular Structure*, v. 1259, p. 132712.
- Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):16-24. doi: 10.1182/blood-2007-04-077412. PMID: 18156501.
- Boechat, N.; Souza, M. V. N.; Valverde, A. L.; Krettli, A. U. (2014) US Patent 8802701B2.
- Boechat, N; Carvalho, RCC; Ferreira, MLG; Coutinho, JP; Sa, PM; Seito, LN; Rosas, EC; Krettli, AU; Bastos, MM; Pinheiro, LCS *Bioorg. Med. Chem.* 2020, 18, 115832.
- Boechat, N; Carvalho, RCC; Ferreira, MLG; Coutinho, JP; Sa, PM; Seito, LN; Rosas, EC; Krettli, AU; Bastos, MM; Pinheiro, LCS *Bioorg. Med. Chem.* 2020, 18, 115832.
- Brossi, A.; Millet, P.; Landau, I.; Bembenek, M. E.; Abell, C. W. *FEBS Letters*, 1987, 214:291-294.
- Carvalho, RCC; Martins, WA; Silva, TP, Kaiser, CR; Bastos, MM; Pinheiro, LCS; Krettli, AU; Boechat, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016, 26, 1881-1884.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC.GOV). (2024, August 10). Retrieved August 10, 2024, from CDC - Malaria - About Malaria - Biology website: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
- DAIANA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. (2017) swissadme: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Nature: Scientific Reports*, v. 7, p. 7.
- FAR.FIOCRUZ. (2020). Retrieved December 13, 2021, from Farmanguinhos-Instituto de tecnologia em fármacos website: <https://www.far.fiocruz.br/?S=primaquina>
- Feitosa, L.M.; França, R.R.F.; Ferreira, M.L.G.; Aguiar, A.C.C.; de Souza, G.E.; Maluf, S.E.C.; de Souza, J.O.; Zapata, L.; Duarte, D.; Moraes, I.; Nogueira, F.; Nonato, M.C.; Pinheiro, L.C.S.; Guido, R.V.C.; Boechat, N. *Eur. J. Med. Chem.* 2024, 267, 116163.

Hu, Y.-Q., Gao, C., Zhang, S., Xu, L., Xu, Z., Feng, L.-S., Wu, X., and Zhao, F. (2017). Quinoline hybrids and their antiplasmodial and antimalarial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 22–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.061>

Kaur, R., Gorki, V., Katare, O. P., Dhingra, N., Chauhan, M., Kaur, R., Nirmalan, N. Singh, B. (2021): Improved biopharmaceutical attributes of lumefantrine using choline mimicking drug delivery system: preclinical investigation on NK-65 P.berghei murine model, *Expert Opinion on Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1946512>

Keating, G. M. (2012). Dihydroartemisinin/Piperaquine: A Review of its Use in the Treatment of Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *Drugs*, 72(7), 937–961. <https://doi.org/10.2165/11203910-000000000-00000>

Khim, N., Andrianaranjaka, V., Popovici, J., Kim, S., Ratsimbaoa, A., Benedet, C., Barnadas, C., Durand, R., Thellier, M., Legrand, E., Musset, L., Menegon, M., Severini, C., Nour, B. Y. M., Tichit, M., Bouchier, C., Mercereau-Puijalon, O., and Ménard, D. (2014). Effects of Mefloquine Use on Plasmodium vivax Multidrug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1629–1636. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140411>

Lödige, M., and Hiersch, L. (2015). Design and Synthesis of Novel Hybrid Molecules against Malaria. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2015/458319>

Mathenge, P. G., Low, S. K., Vuong, N. L., Mohamed, M. Y. F., Faraj, H. A., Alieldin, G. I., Al khudari, R., Yahia, N. A., Khan, A., Diab, O. M., Mohamed, Y. M., Zayan, A. H., Tawfik, G. M., Huy, N. T., and Hirayama, K. (2020). Efficacy and resistance of different artemisinin-based combination therapies: a systematic review and network meta-analysis. *Parasitology International*, 74, 101919. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.04.016>

Mawson, A. (2013). Mefloquine use, psychosis, and violence: A retinoid toxicity hypothesis. *Medical Science Monitor*, 19, 579–583. <https://doi.org/10.12659/MSM.889033>

Mehrotra, N; Lal, J; Puri, S. K.; Madhusudanan, K. P.; Gupta, R. C. *Biopharmaceutics & Drug Disposion*. 2007, v. 28, n. 5 p. 209-27, 2007.

Ministério da saúde. (2024). Boletim epidemiológico (p. 2). Retrieved from Secretaria de Vigilância em saúde website: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/abril/26/boletim_epidemiologico_svs_dia-mundial-da-malaria.pdf

Parhizgar, A. R., and Tahghighi, A. (2017). Introducing New Antimalarial Analogues of Chloroquine and Amodiaquine: A Narrative Review. 42(2), 14.

Peters, W.; Robinson, B. L. John Wiley, Chichester, 1984, pp 93-101.

Pinheiro, A. C., Bispo, M. L. F., and Souza, M. V. N. (2010). A Importância do Núcleo Quinolínico e seus Derivados no Desenvolvimento de Fármacos. *Estado Da Arte / State of the Art*, 05, 53–63.

Pinheiro, L. C. S., Feitosa, L. M., Silveira, F. F., and Boechat, N. (2018). Current antimalarial therapies and advances in the development of semi-synthetic artemisinin derivatives. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(1), 1251–1271. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170830>

Pinheiro, L. C. S., Feitosa, L. M., Silveira, F. F., and Boechat, N. (2018). Current antimalarial therapies and advances in the development of semi-synthetic artemisinin derivatives. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(1), 1251–1271. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170830>

Pinheiro, LCS; Boechat, N; Ferreira MLG, Junior, CCS; Jesus, AML; Leite, MMM; Souza, N; Krettli, AU *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 5979-5984

Portela, M. J.; Moreira, R.; Valente, E.; Constantino, L.; Iley, J.; Pintro, J.; Rosa, R.; Cravo, P.; Rosário, V. E. *Pharmaceutical Research*, 1999, 16, 6.

Puthran, D., Poojary, B., Nayak, S. G., Purushotham, N., Rasheed, M. S., and Hegde, H. (2020). Design, synthesis, molecular docking, and biological evaluation of novel selenium containing lumefantrine analogues. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, jhet.3868. <https://doi.org/10.1002/jhet.3868>

Rieckmann, K. H.; McNamara, J. V.; Frischer, H.; Stockert, T. A.; Carson, P. E.; Powell, R. D. *Bull. WHO*, 1968, 38:625-632.

Silva, TB; Bernardino, AMR; Ferreira, MLG; Rogerio, KR; Carvalho, LJM; Boechat, N; Pinheiro, LCS *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 4492-4498.

Silveira, FF; Feitosa, LM; Mafrá, JCM; Ferreira, MLG; Rogerio, KR; Carvalho, LJM; Boechat, N; Pinheiro, LCS *Med. Chem. Res.* 2018, 27, 1876-1884.

Taylor, W.R.J., Kim, S., Kheng, S., Muth, S., Tor, P., Christophe, I. E., et al. (2021) Dynamics of G6PD activity in patients receiving weekly primaquine for therapy of *Plasmodium vivax* malaria. *Plos Negl Trop Dis* 15(9): e0009690. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009690>

Teixeira, C., Vale, N., Pérez, B., Gomes, A., Gomes, J. R. B., and Gomes, P. (2014). “Recycling” Classical Drugs for Malaria. *Chemical Reviews*, 114(22), 11164–11220. <https://doi.org/10.1021/cr500123g>

Wang, Q., Zou, Y., Pan, Z., Zhang, H., Deng, C., Yuan, Y., Guo, J., Tang, Y., Julie, N., Wu, W., Li, G., Li, M., Tan, R., Huang, X., Guo, W., Li, C., Xu, Q., Song, J. (2020). Efficacy and Safety of Artemisinin-Piperaquine for the Treatment of Uncomplicated Malaria: A Systematic Review. *Front. Pharmacol.* 11:562363. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.562363>

Watson, J., Taylor, W.R.J., Bancone, G., Chu, C.S., Jittamala, P., White, N.J. (2018) Implications of current therapeutic restrictions for primaquine and tafenoquine in the radical cure of vivax malaria. *Plos Negl Trop Dis* 12(4): e0006440. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006440>

Wattanakul, T., Baker, M., Mohrle, J., mcwhinney, B., Hoglund, R. M., mccarthy, J. S., Tarning, J. (2021). Semimechanistic pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of piperazine in a volunteer infection study with *Plasmodium falciparum* blood-stage malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e01583-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01583-20>.

WHO | Overview of malaria treatment. (2020). Retrieved July 15, 2024, from WHO website: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en>

WHO. (2015). World Malaria Report 2015 (p. 316). Retrieved from World Health Organization website: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>

WHO. (2015). World Malaria Report 2015 (p. 316). Retrieved from World Health Organization website: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>

WHO. (2023). World Malaria Report 2021 (p. 17). Retrieved from World Health Organization website: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>

Wicht, K. J., Mok, S., Fidock, D. A. (2020). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Annu Rev Microbiol.*, 74, 431-454. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115546>

CADERNO DE ESPECTROS

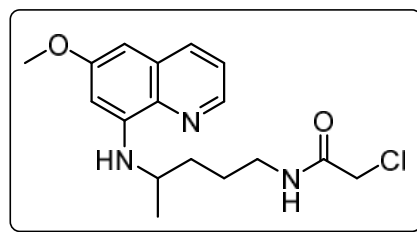
**NOVOS DERIVADOS DA PRIMAQUINA PLANEJADOS COM POSSÍVEIS
ANTIPLASMÓDICOS**

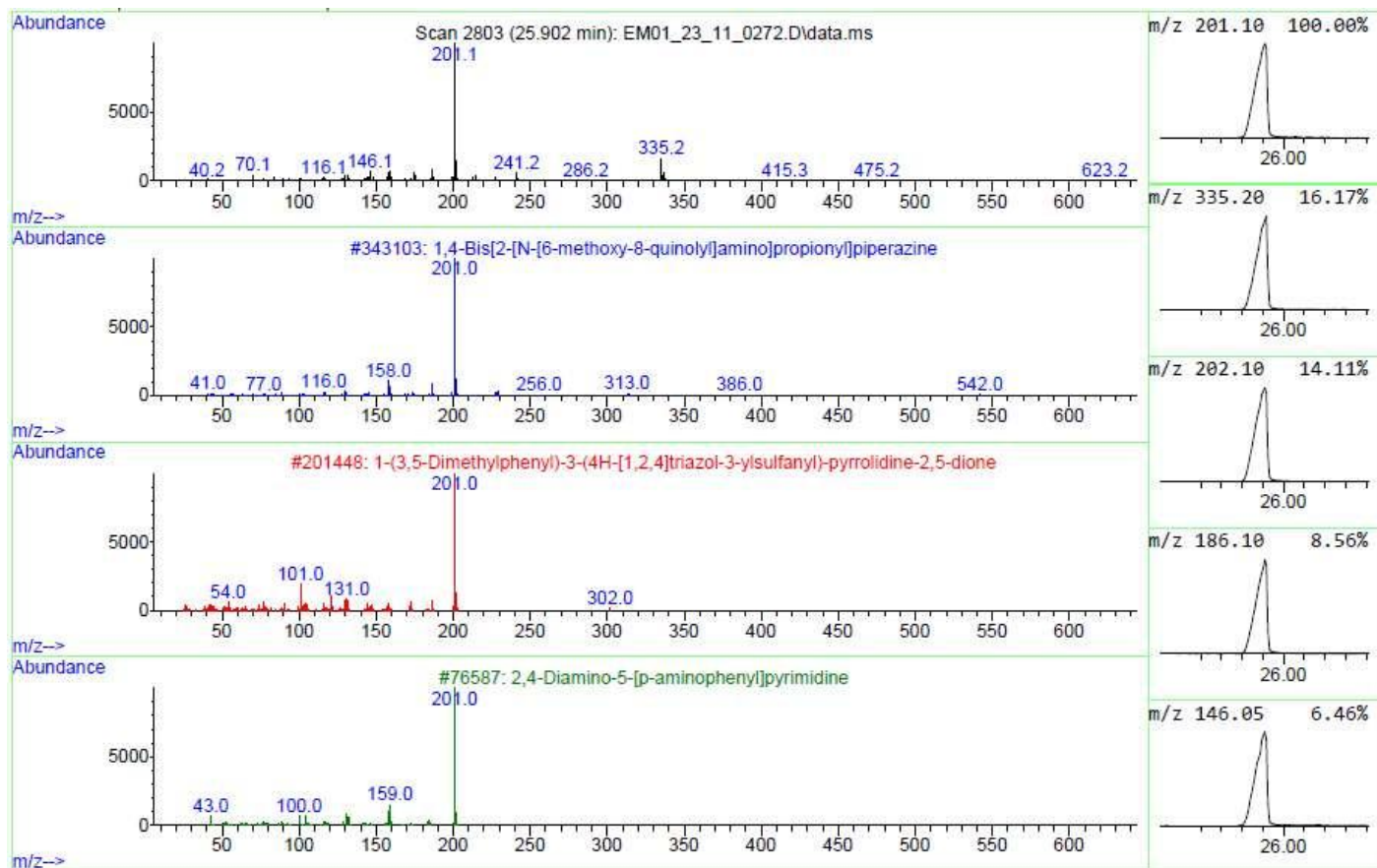
João Andrade Costa

Rio de Janeiro

2025

2-cloro-*N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)acetamida (12)





Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\11_NOVEMBRO_2023\EM01_23_11_0272.D
Sample : PJPT046

Peak Number: 1 at 25.904 min Area: 818060895 Area % 100.00

The 3 best hits from each library.		Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L				
1	1,4-Bis[2-[N-[6-methoxy-8-quinol...	343103	050823-62-6	58
2	1-(3,5-Dimethylphenyl)-3-(4H-[1,...	201448	1000310-56-7	53
3	2,4-Diamino-5-[p-aminophenyl]pyr...	76587	071552-29-9	53

Figura 27. Espectro de massas por ionização por elétrons do intermediário **12**.

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	UltraScan	Scan Begin	100 m/z	Scan End	2200 m/z
Accumulation Time	24 μ s	RF Level	32 %	Trap Drive	38.9
SPS Target Mass	100 m/z	Averages	10 Spectra	n/a	n/a

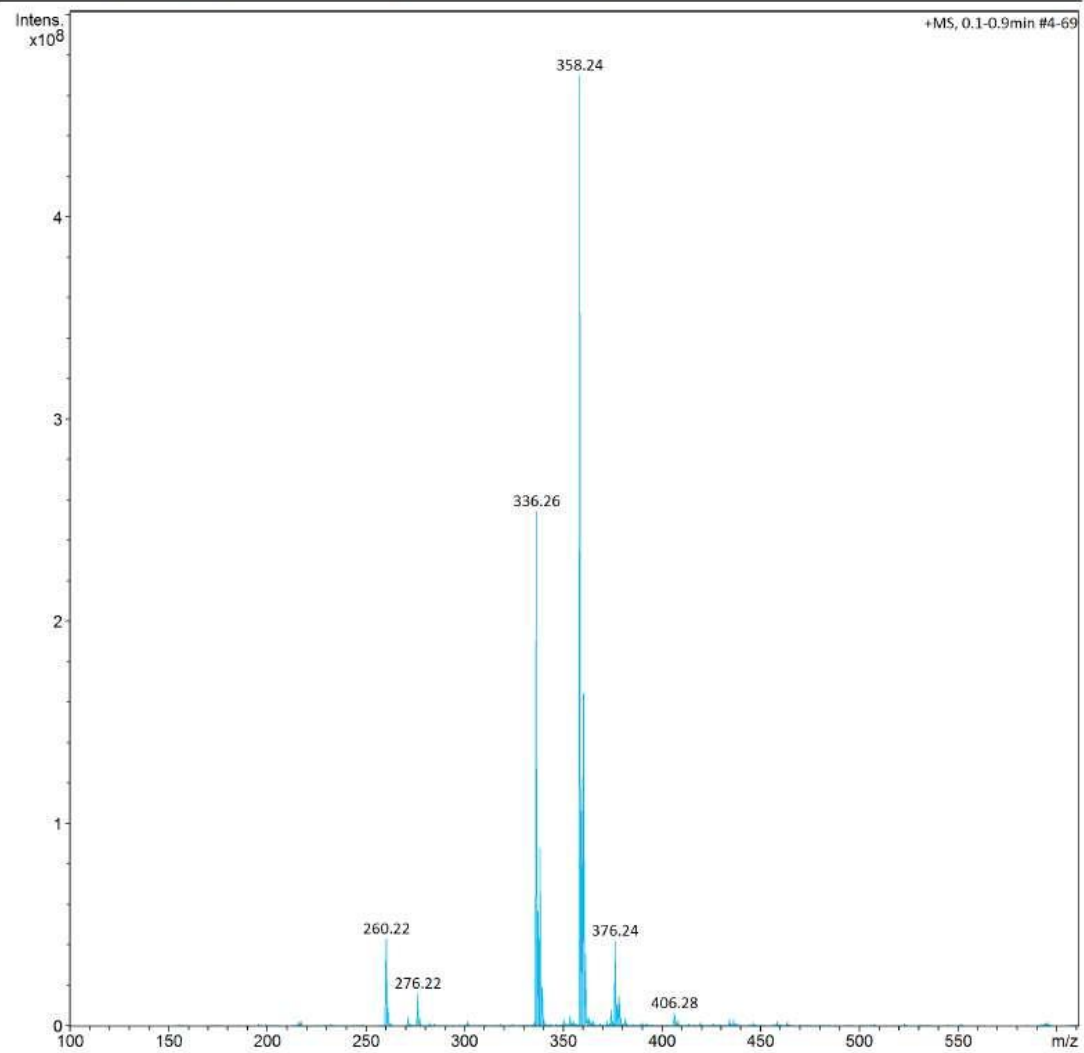
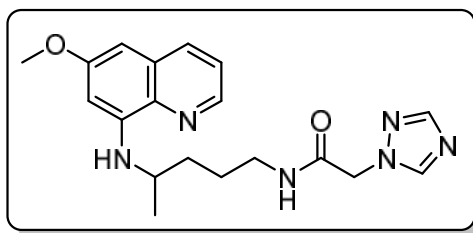
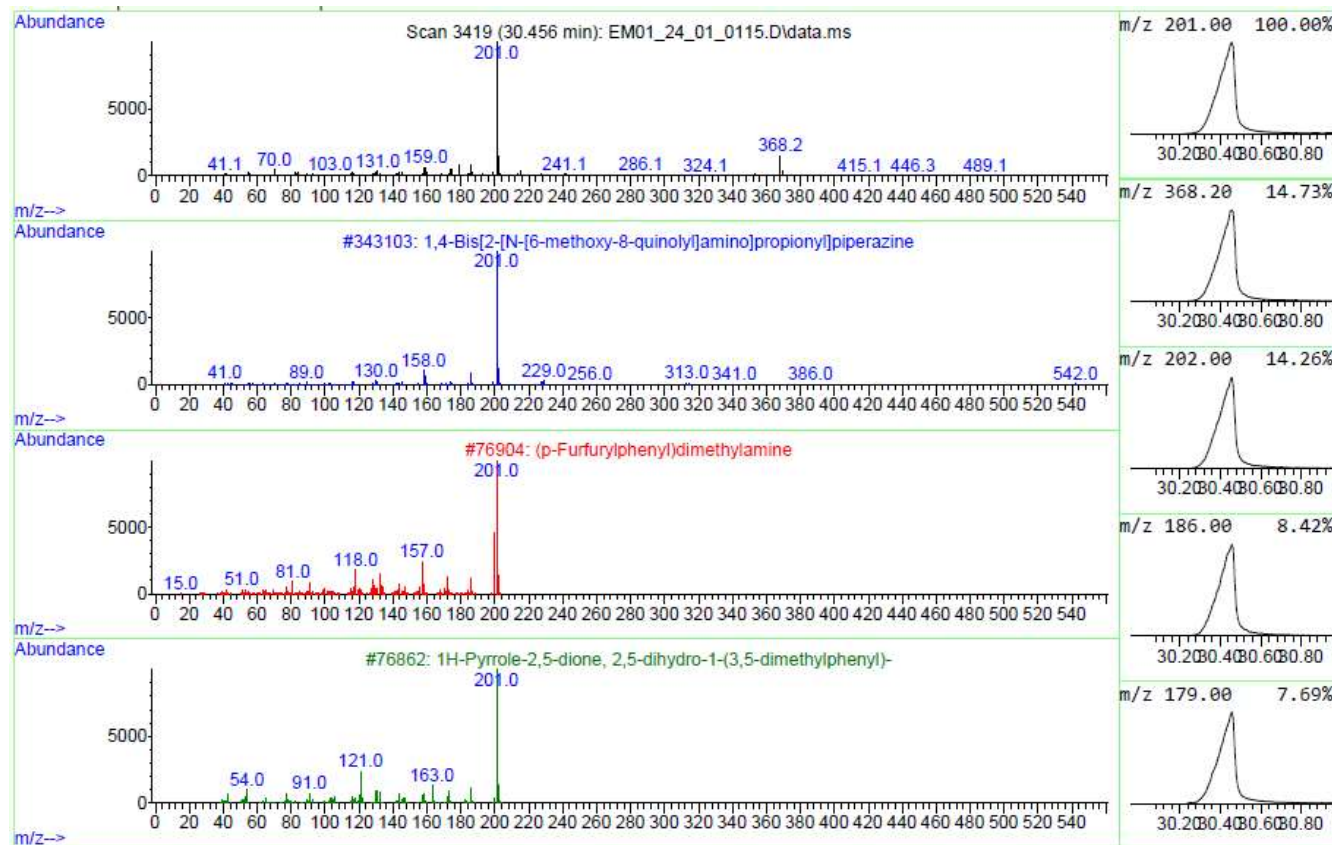


Figura 28. Espectro de massas por ionização por eletrospray do intermediário **12**.

Obtenção do derivado *N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)acetamida (**11a**)





Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2024\01_JANEIRO_2024\EM01_24_01_0115.D

Sample : PJPT044

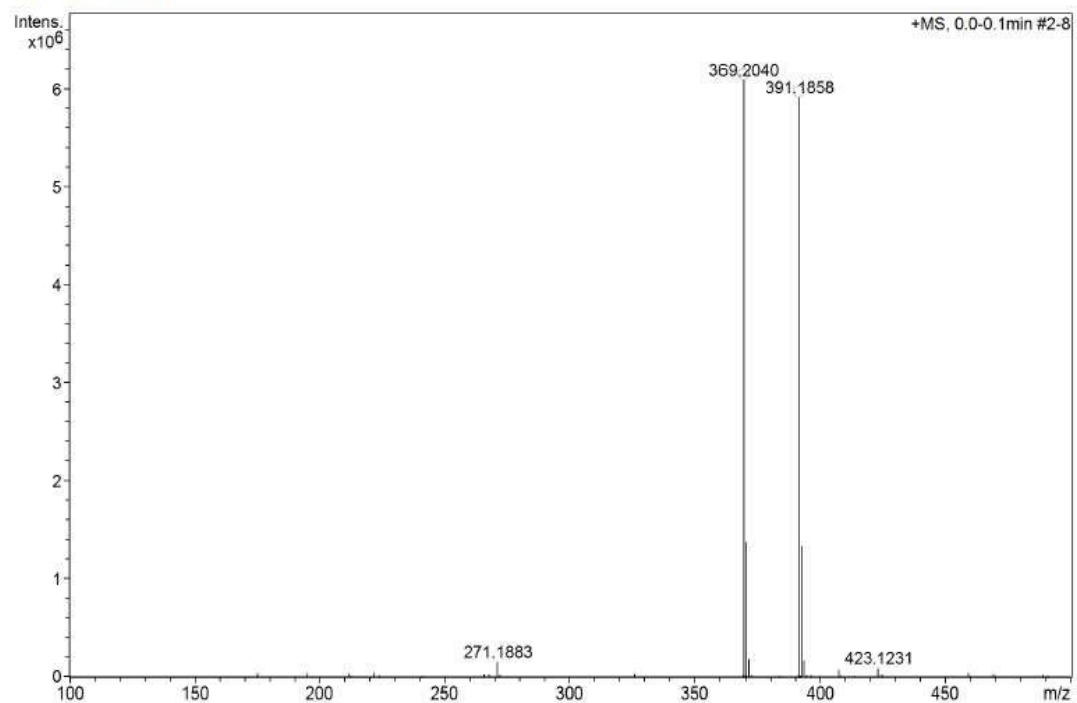
Peak Number: 3 at 30.457 min Area: 154995741 Area % 97.18

The 3 best hits from each library.	Ref\#	CAS\#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST0.L			
1 1,4-Bis[2-[N-[6-methoxy-8-quinol...	343103	050823-62-6	64
2 (p-Furfurylphenyl)dimethylamine	76904	100371-88-8	59
3 1H-Pyrrole-2,5-dione, 2,5-dihydr...	76862	065833-09-2	53

Figura 29. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado **11a**.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

+MS, 0.0-0.1min #2-8

Meas. m/z # Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigm a	Std I	Std Mean m/z	Std VarNo	Std I m	Std m/z	Std Comb Diff	Std Dev
369.203955 1 C ₁₉ H ₂₅ N ₆ O ₂	369.203350	-1.6	-2.4	10.5	ok	even	2.5	3.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
1 C ₂₁ H ₃₀ NaO ₄	369.203630	-0.9	-0.7	6.5	ok	even	3.9	7.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C ₂₂ H ₂₆ N ₄ Na	369.204968	2.7	2.6	11.5	ok	even	16.7	26.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
391.185816 1 C ₁₇ H ₁₉ N ₁₂	391.185015	-2.0	-3.5	14.5	ok	even	2.6	3.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C ₂₀ H ₂₇ N ₂ O ₆	391.186363	1.4	1.3	8.5	ok	even	5.6	10.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Figura 30.Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado **11a**.

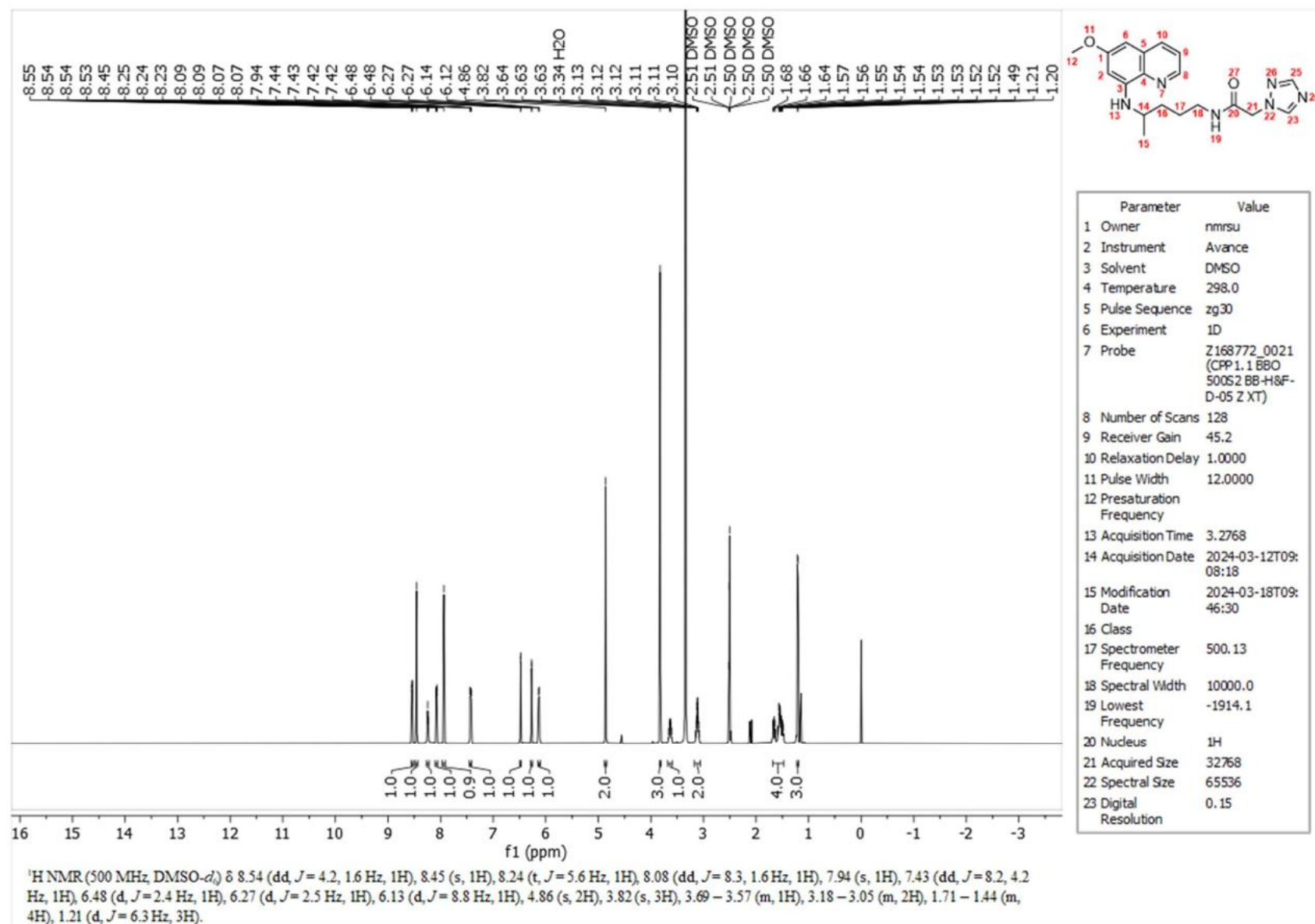


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado **11a**. Solvente: DMSO- d_6 .

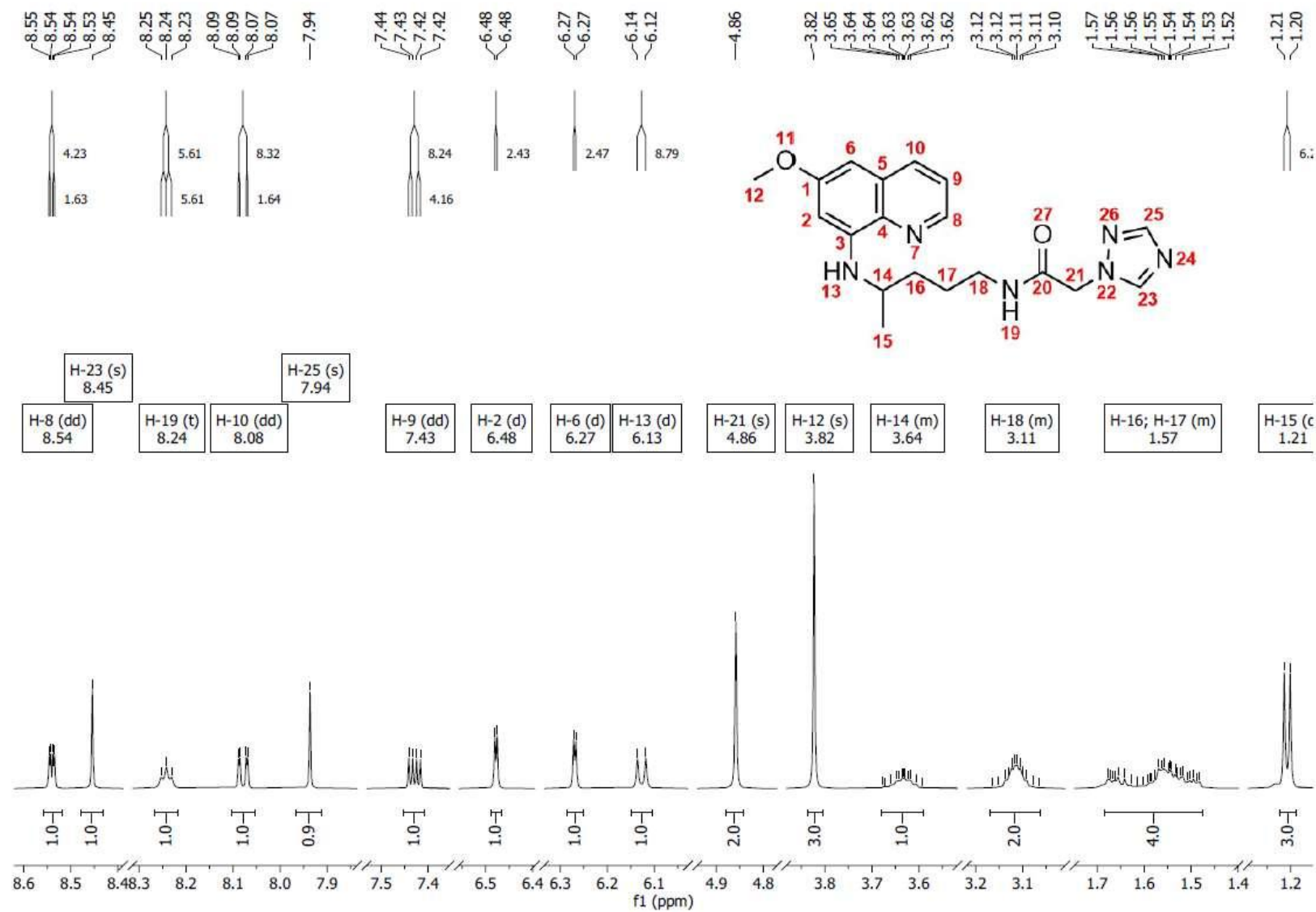


Figura 32. Espectro ampliado de RMN ^1H (500 MHz) do derivado **11a**. Solvente: DMSO- d_6 .

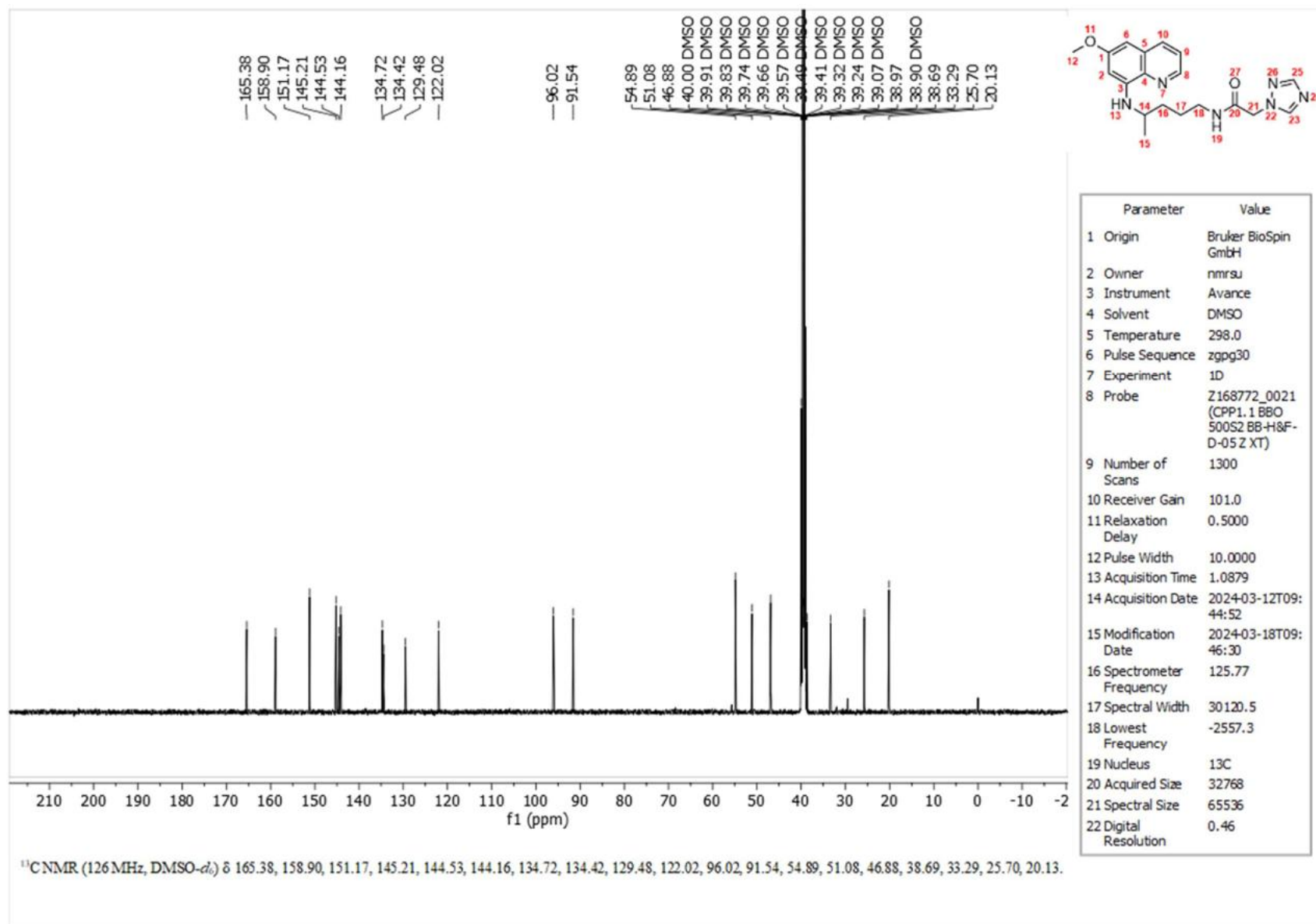


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11a**. Solvente: DMSO- d_6 .

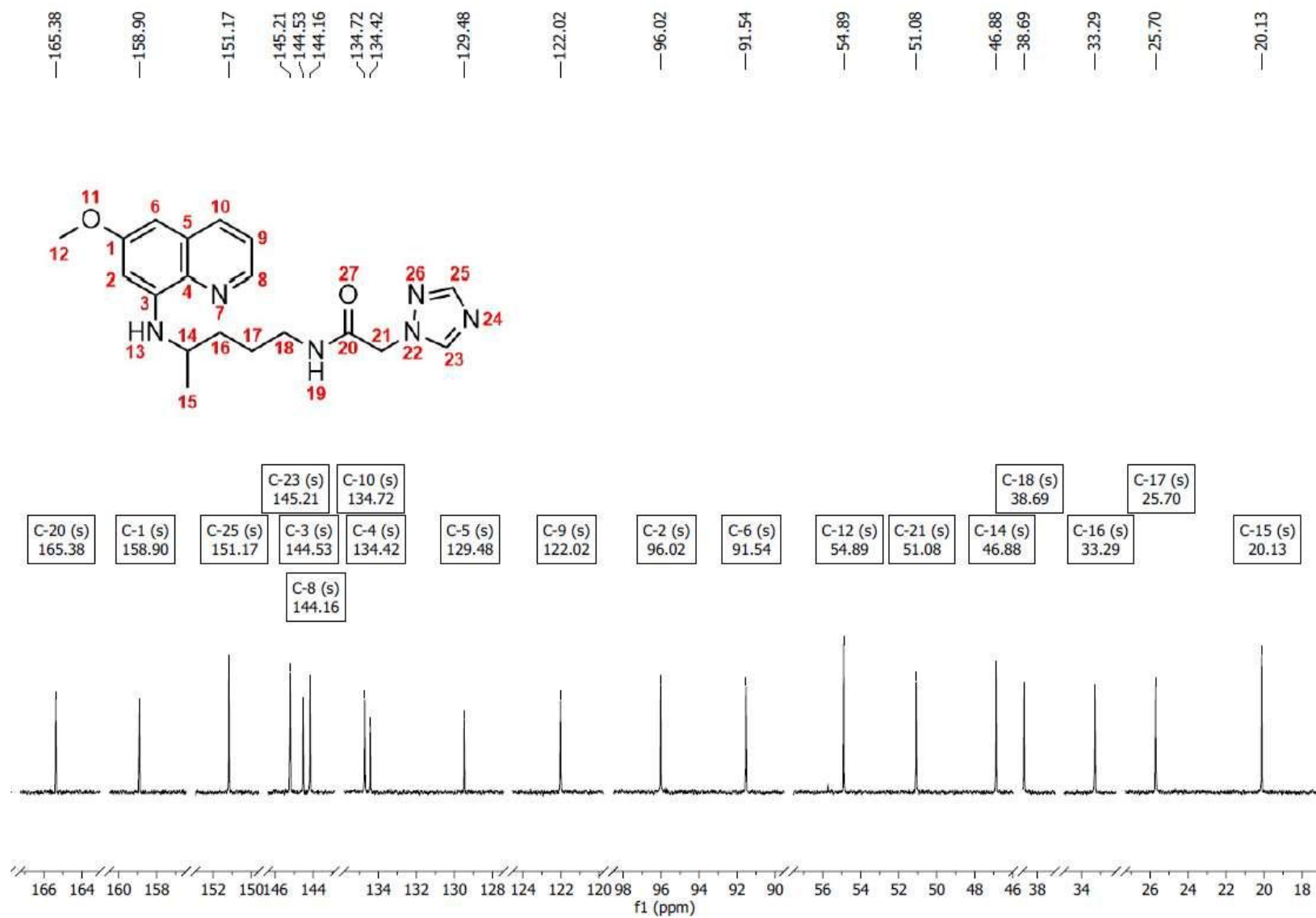


Figura 34. Espectro ampliado de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11a**. Solvente: DMSO- d_6 .

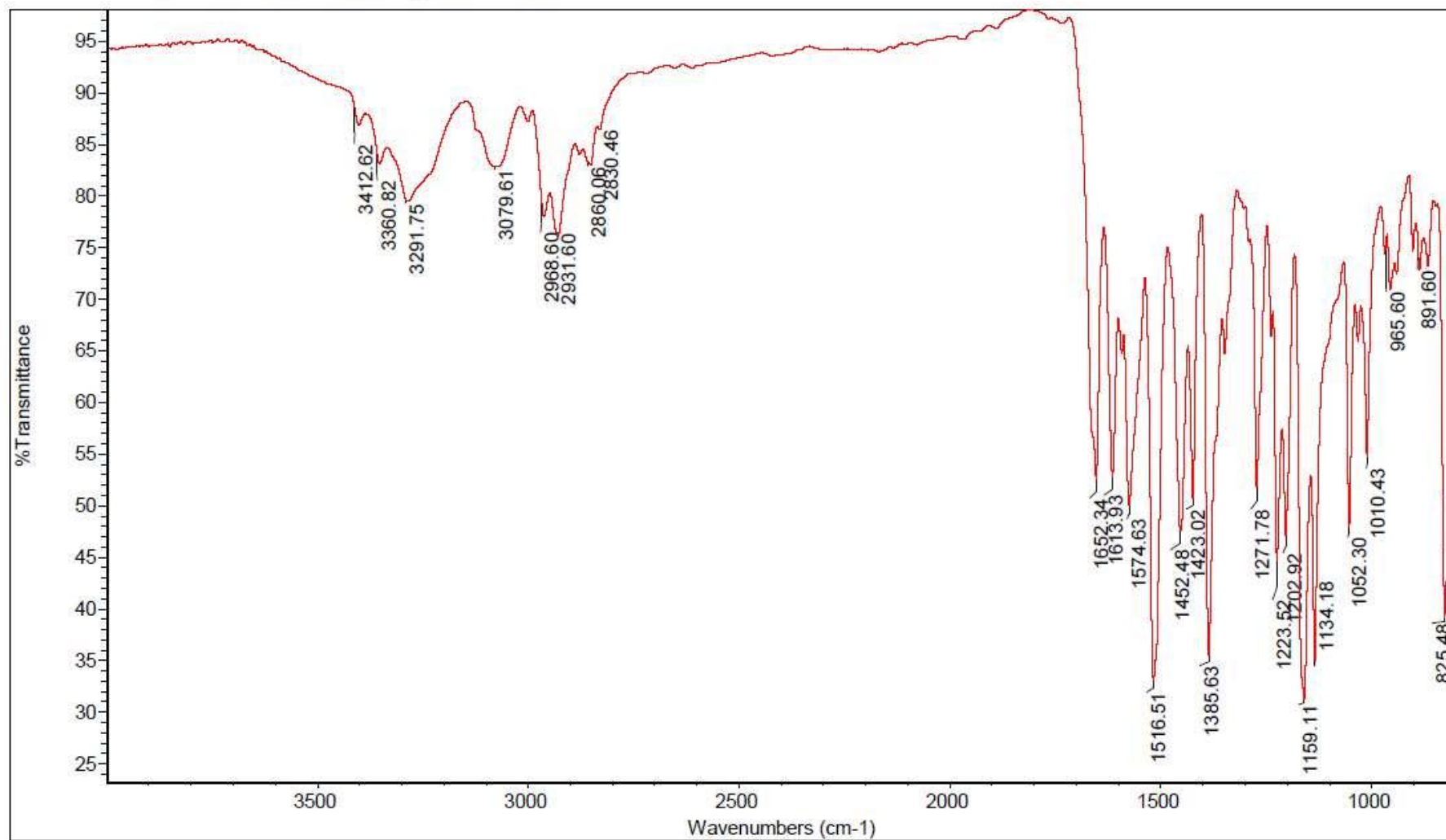
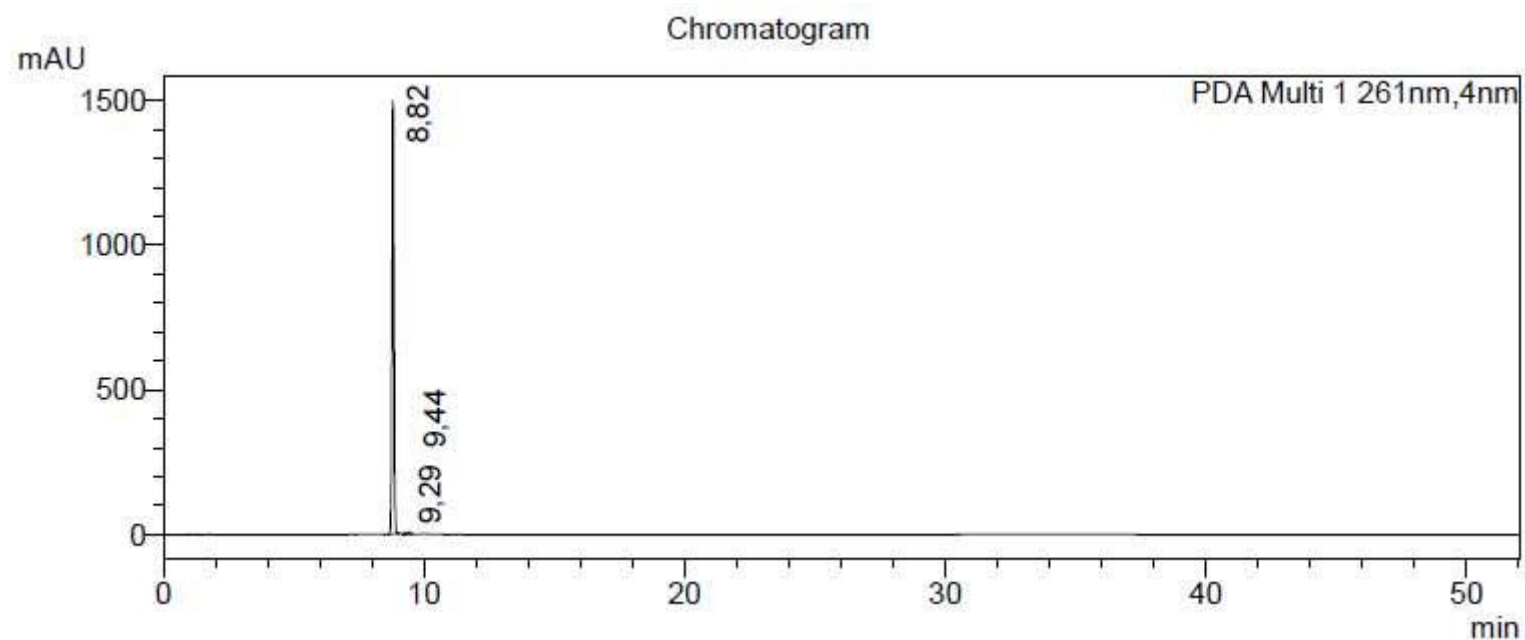
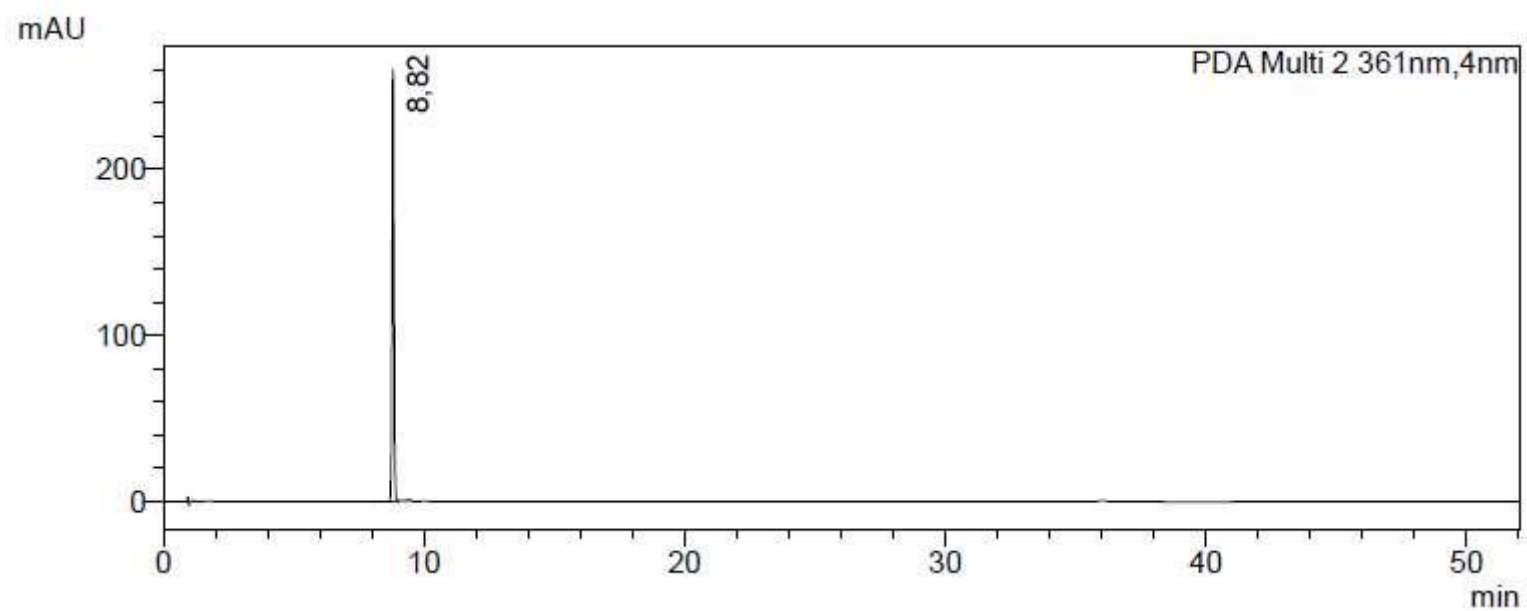


Figura 35. Espectro na região do infravermelho do derivado **11a**.



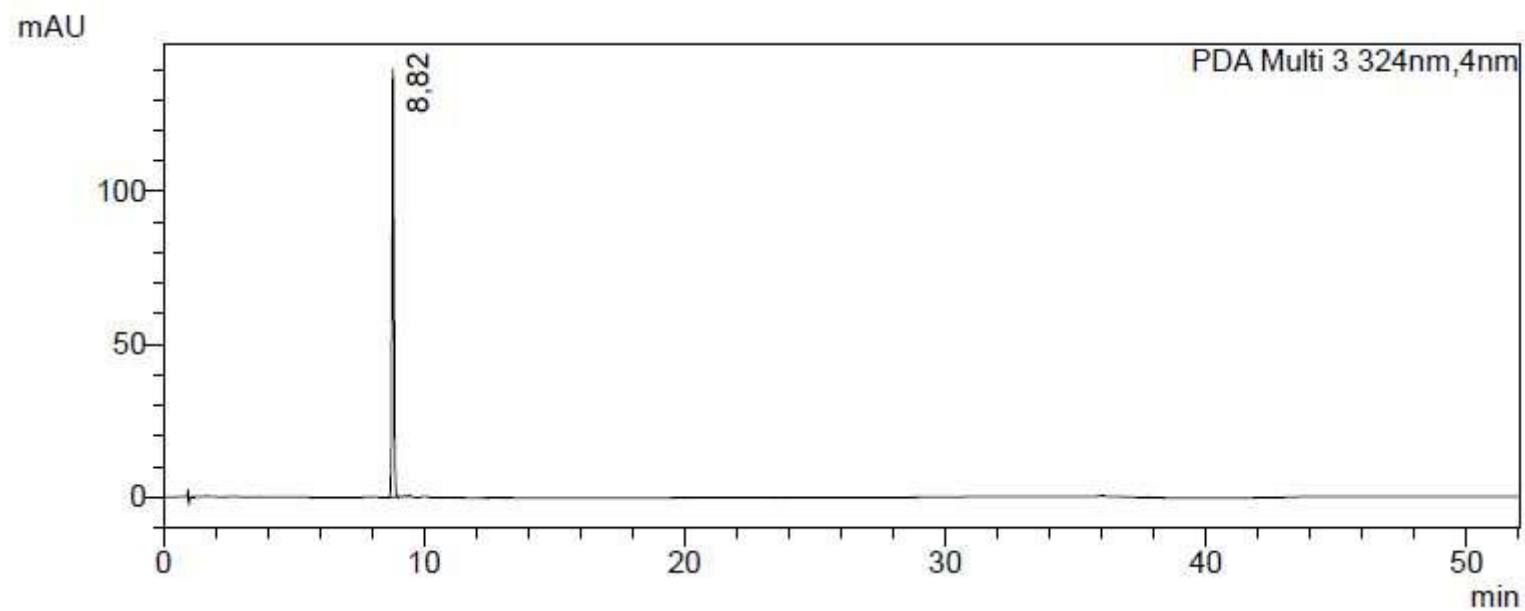
PDA Ch1 261nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	8,82		8031305	99,3	337185	1,010	--	--
2	9,29		25165	0,3	446741	0,915	3,143	0,054
3	9,44		34575	0,4	501269	1,185	1,112	0,071
Total			8091046	100,0				

Figura 36. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11a**. $\lambda = 261$ nm.



PDA Ch2 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	8,82		1356579	100,0	341393	1,015	-	-
Total			1356579	100,0				

Figura 37. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11a**. $\lambda = 361$ nm.



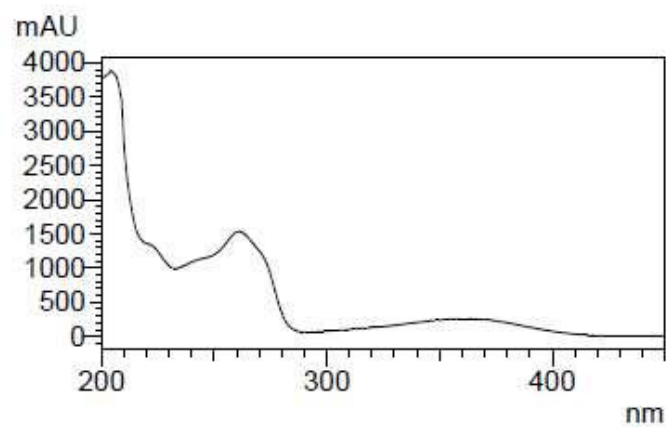
PDA Ch3 324nm

Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	8,82		736916	100,0	348348	1,014	-	-
Total			736916	100,0				

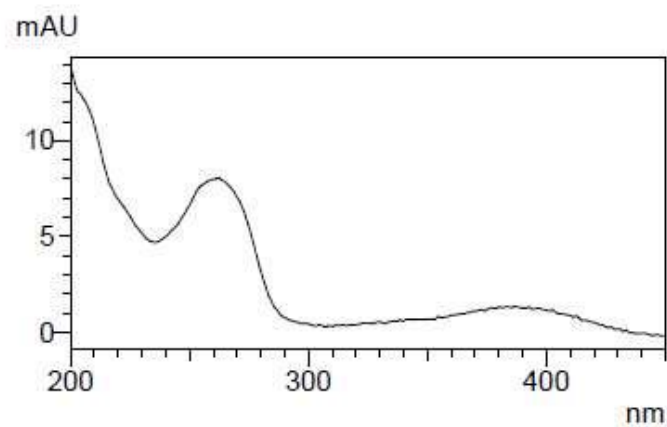
Figura 38. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11a**. $\lambda = 324$ nm.

UV Spectrum

Retention time: 8,816 min
Lambda max: 204/261/361/493/668 nm



Retention time: 9,288 min
Lambda max: 262/387/486/727 nm



Retention time: 9,444 min
Lambda max: 262/387/658/486/727 nm

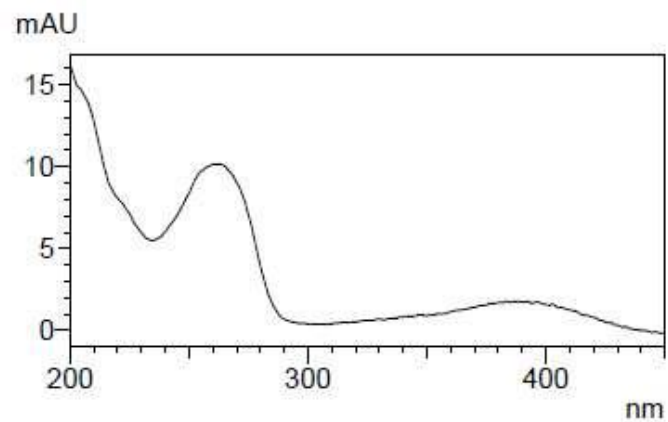
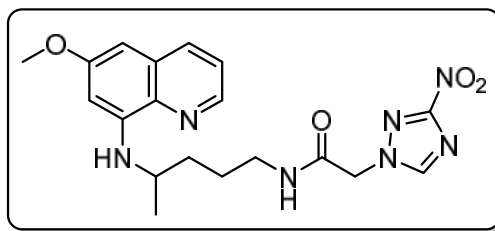
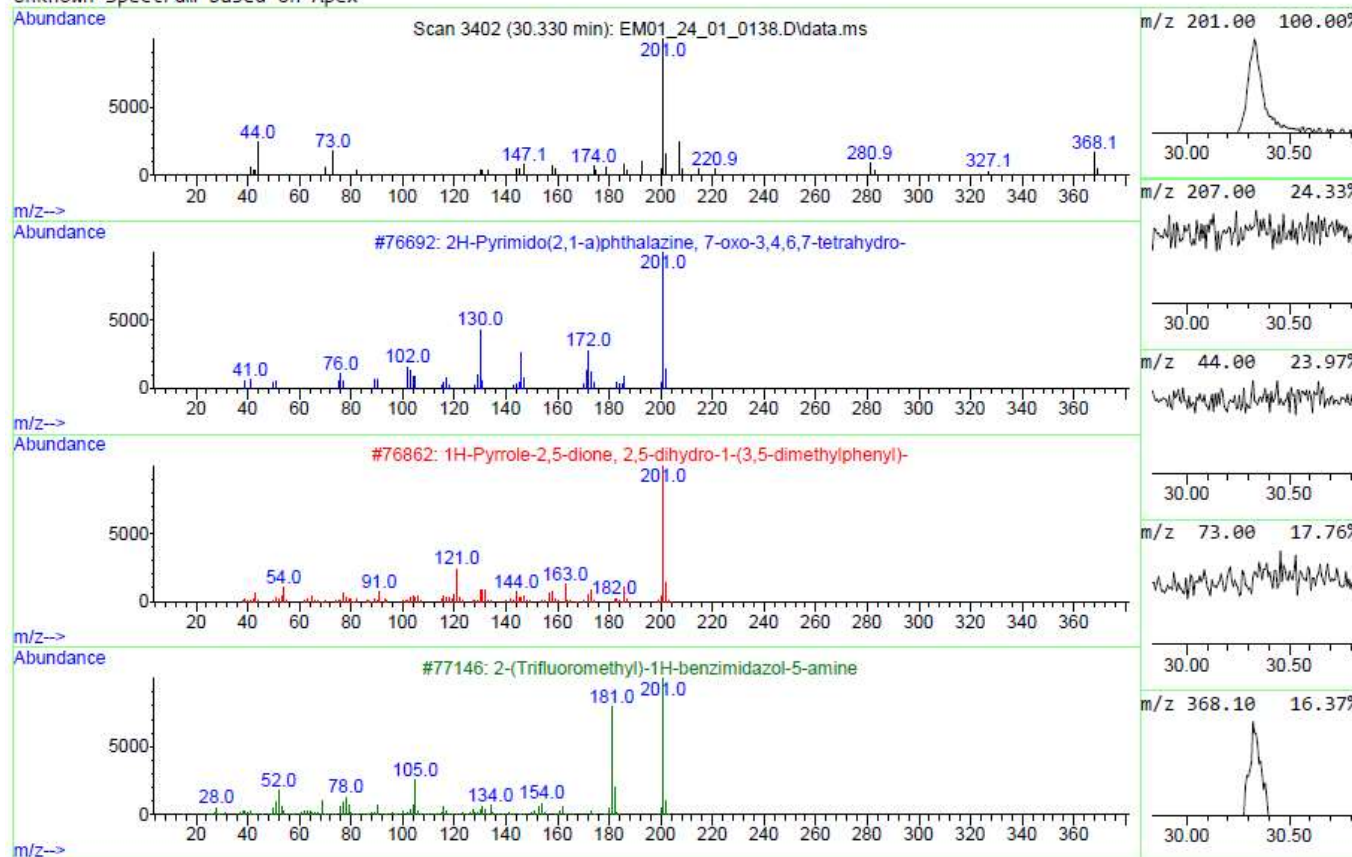


Figura 39. Espectro de ultravioleta do derivado **11a**.

N-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)-2-(3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol-1-il)acetamida (**11b**)



Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2024\01_JANEIRO_2024\EM01_24_01_0138.D

Sample : PJPT53

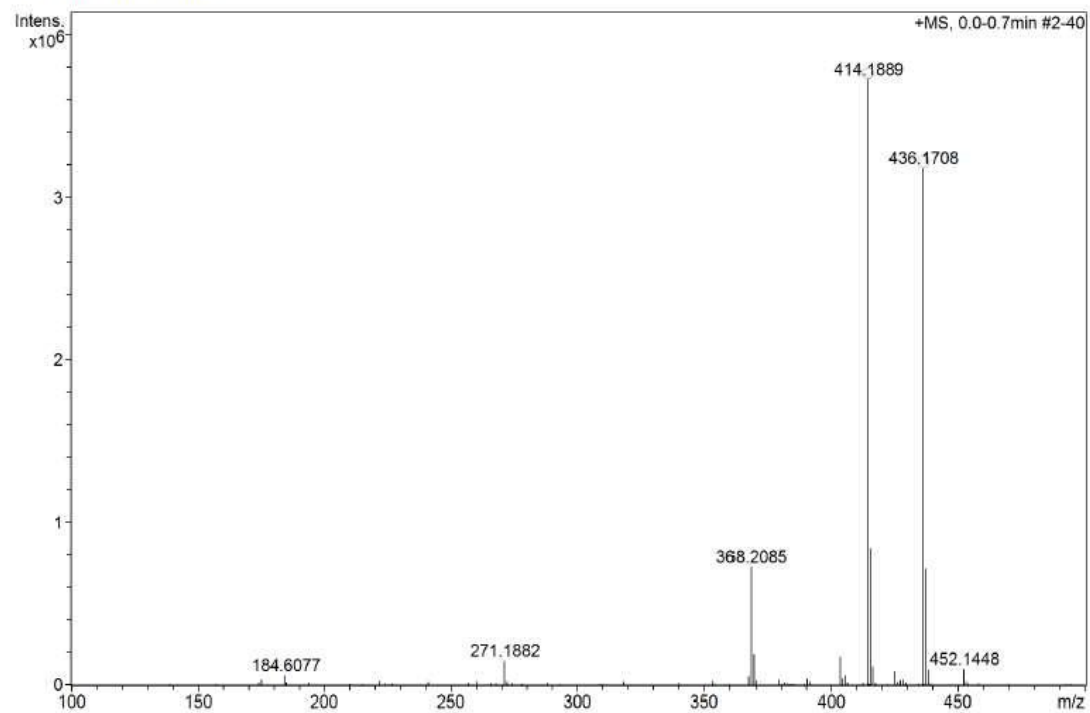
Peak Number: 6 at 30.332 min Area: 568093 Area % 7.87

The 3 best hits from each library.	Ref\#	CAS\#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST0.L			
1 2H-Pyrimido(2,1-a)phthalazine, 7...	76692	061632-64-2	43
2 1H-Pyrrole-2,5-dione, 2,5-dihydr...	76862	065833-09-2	43
3 2-(Trifluoromethyl)-1H-benzimida...	77146	003671-66-7	43

Figura 40. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado **11b**.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

+MS, 0.0-0.7min #2-40

Meas. m/z # Ion	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I a	Std Mean m/z	Std VarNo	Std m/z	Std Comb
414.188893	1 C ₁₉ H ₂₄ N ₇ O ₄	414.188429	-1.1	-1.4	11.5		ok even	5.8	10.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2 C ₂₀ H ₂₀ N ₁₁	414.189766	2.1	1.5	16.5		ok even	18.9	29.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
436.170840	1 C ₁₉ H ₂₃ N ₇ NaO ₄	436.170373	-1.1	-1.3	11.5		ok even	6.3	11.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2 C ₂₀ H ₁₉ N ₁₁ Na	436.171710	2.0	1.4	16.5		ok even	19.2	30.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Figura 41. Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado **11b**.

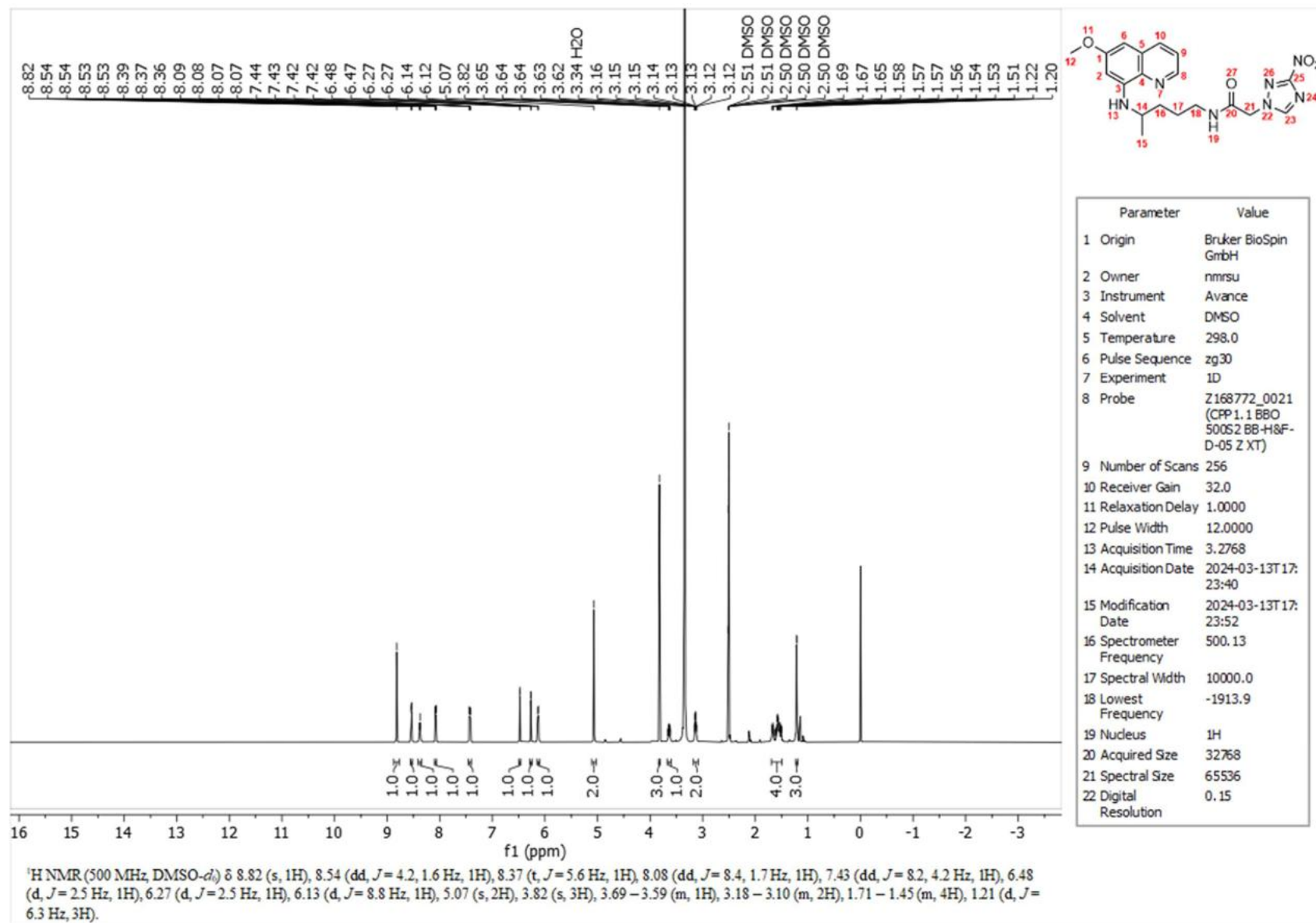


Figura 42. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado **11b**. Solvente: DMSO- d_6 .

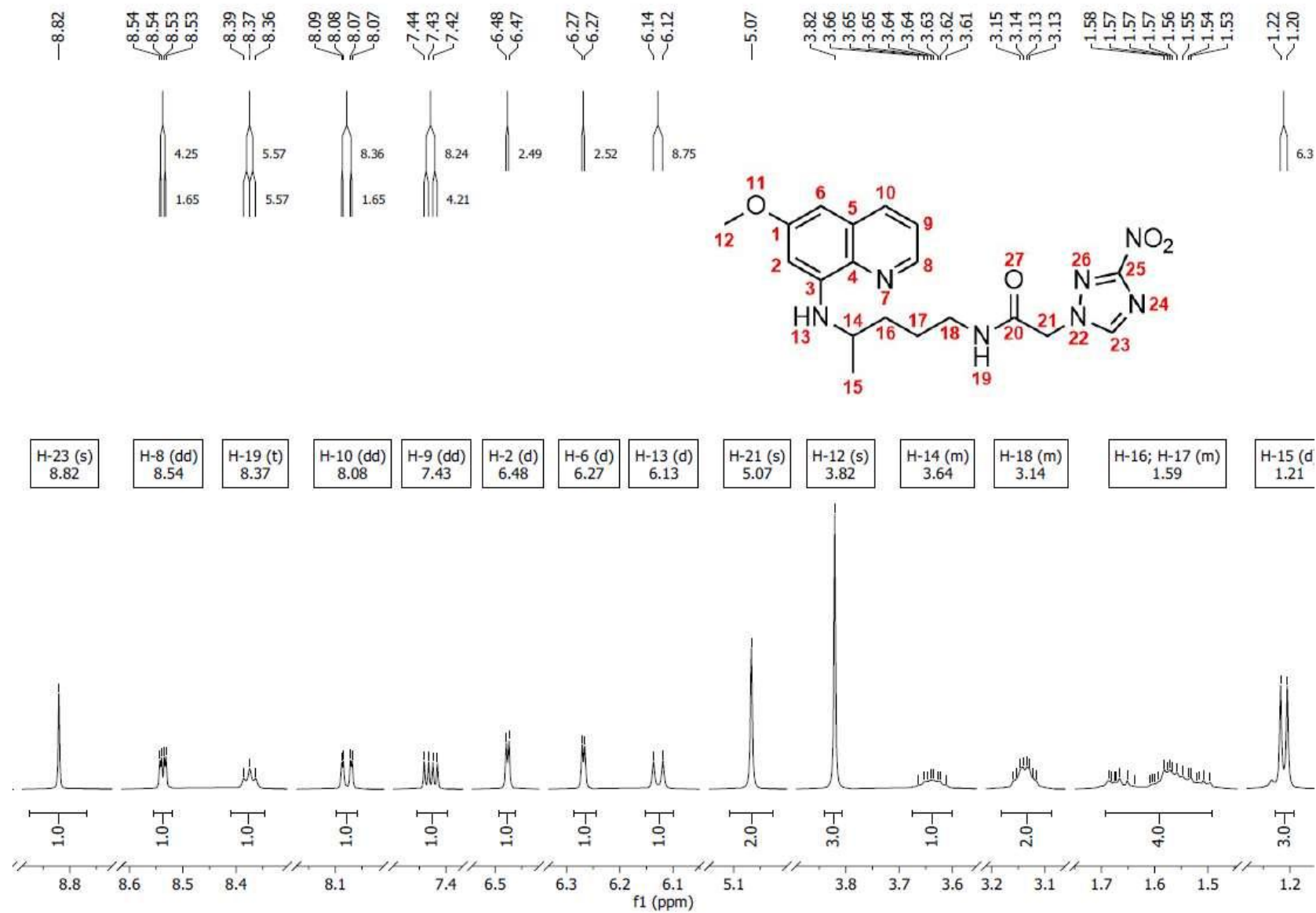


Figura 43. Espectro ampliado de RMN ^1H (400 MHz) do derivado **11b**. Solvente: DMSO- d_6 .

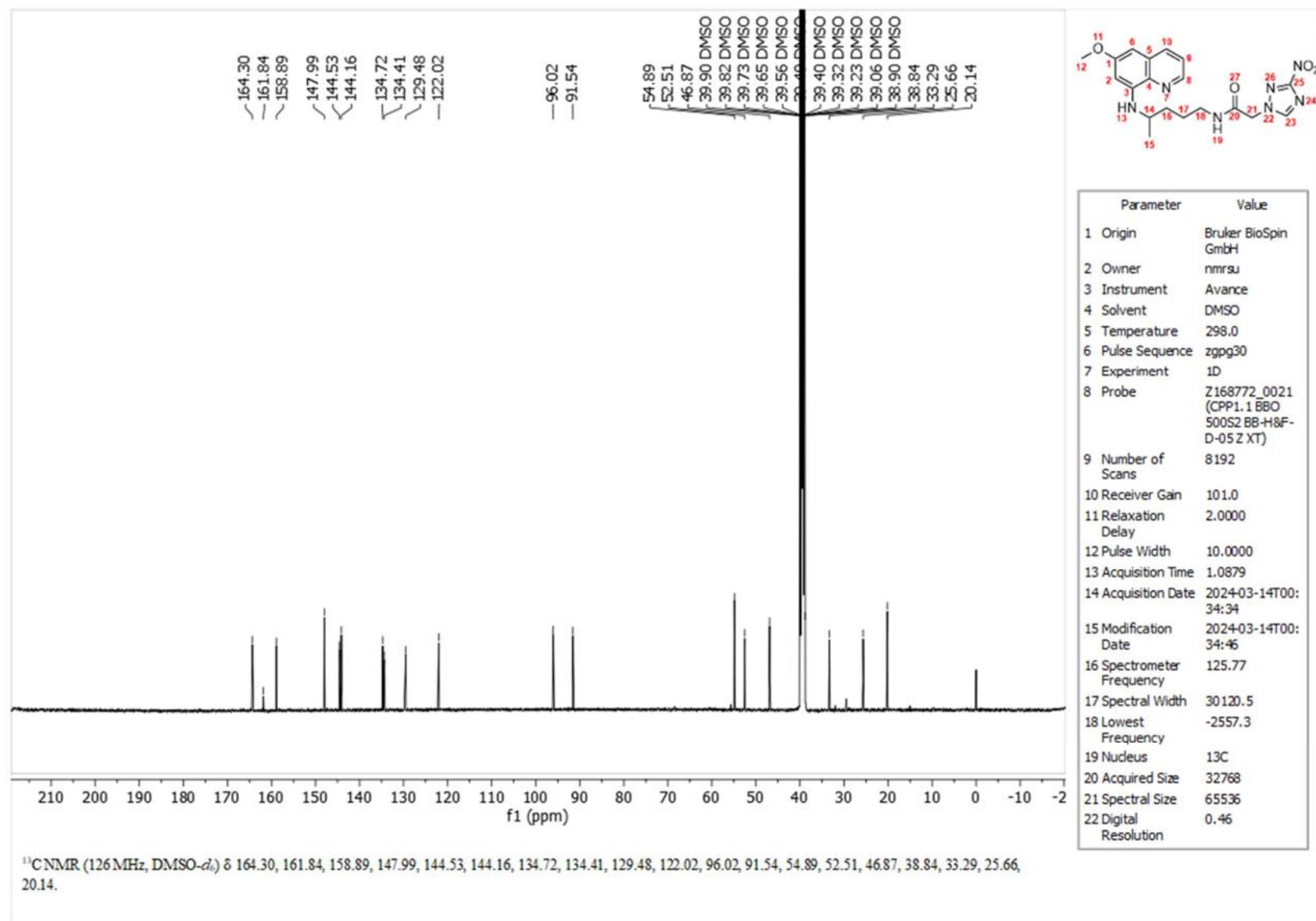


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11b**. Solvente: DMSO- d_6 .

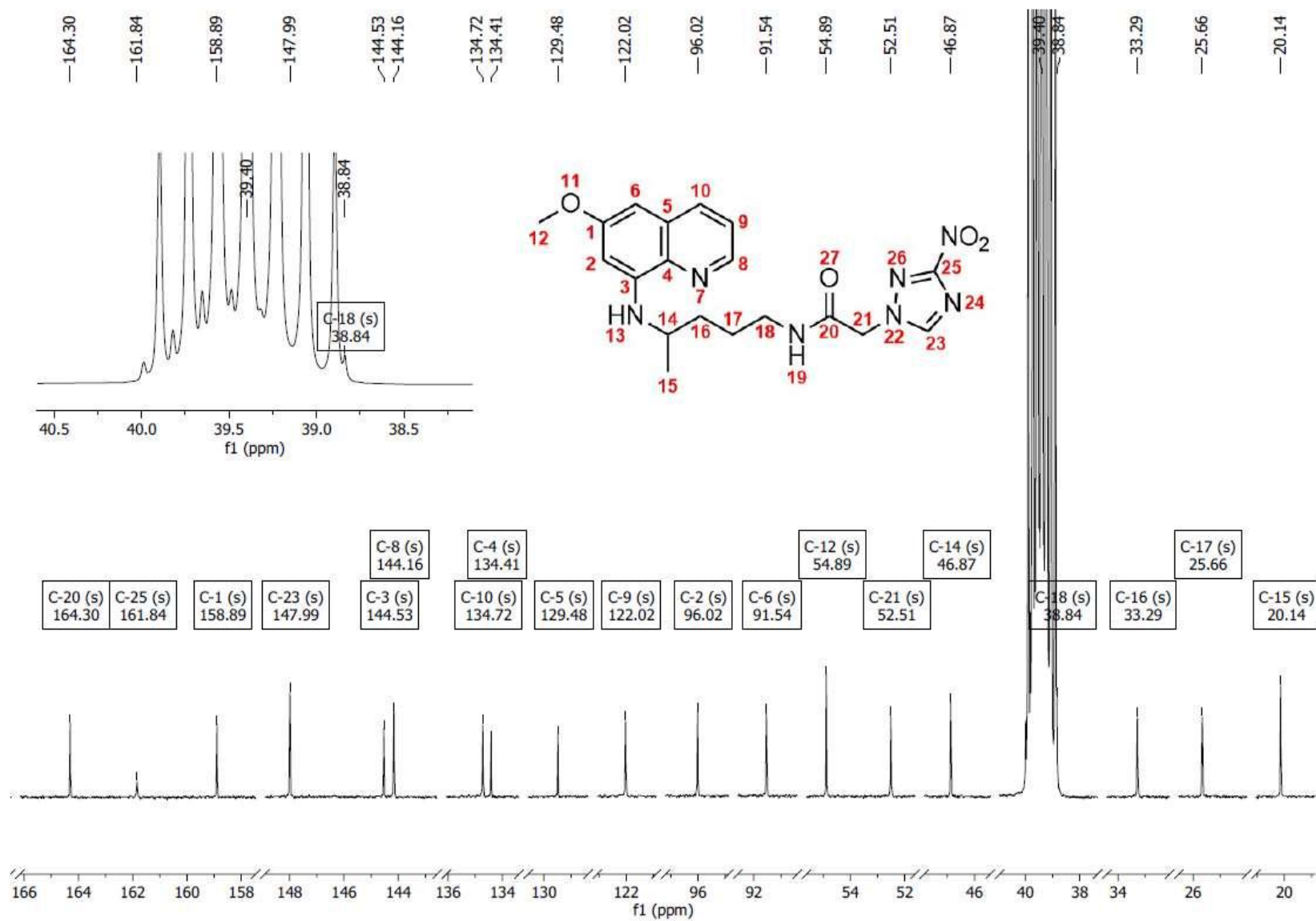


Figura 45. Espectro ampliado de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11b**. Solvente: DMSO- d_6 .

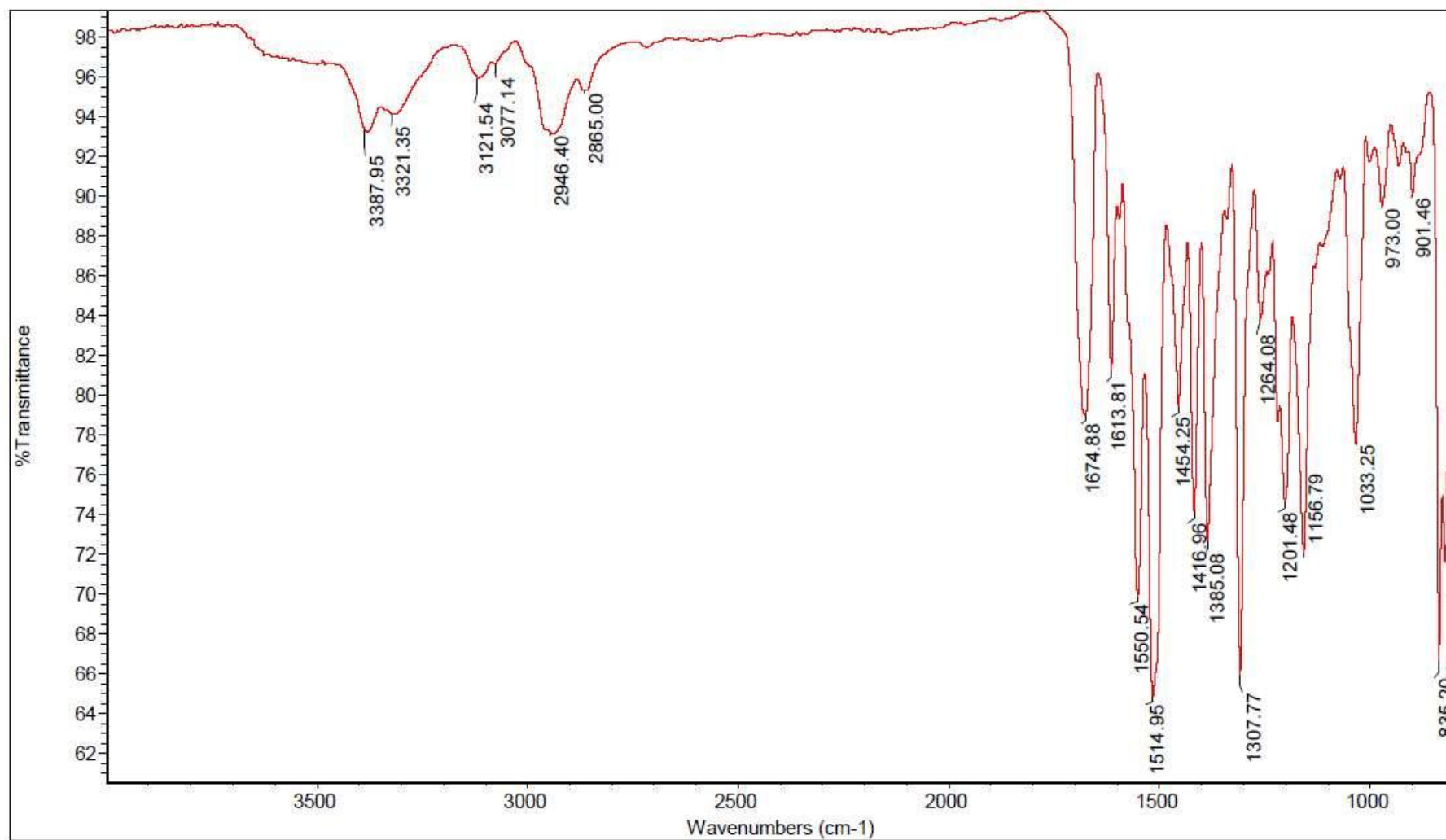
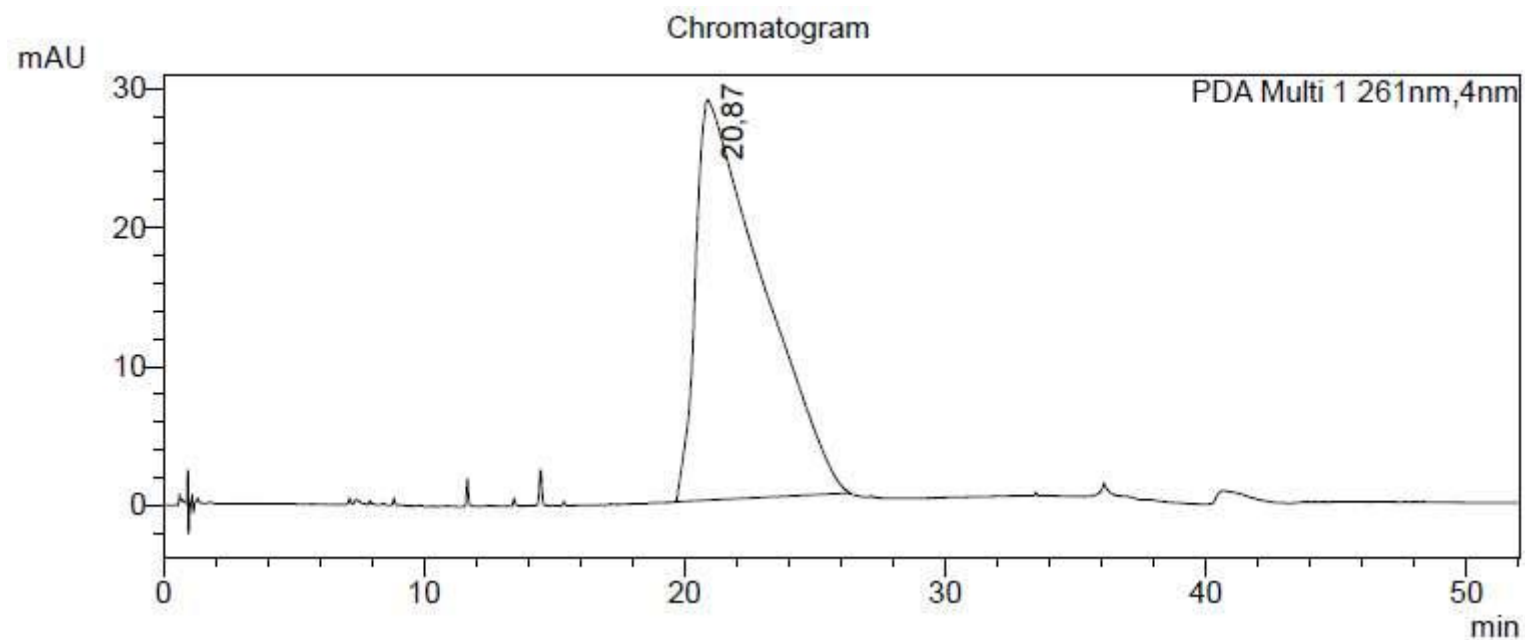


Figura 46. Espectro na região do infravermelho do derivado **11b**.



PDA Ch1 261nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	20,87		5114708	100,0	1641	2,764	-	-
Total			5114708	100,0				

Figura 47. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11b**. $\lambda = 261$ nm.

UV Spectrum

Retention time: 20,872 min

Lambda max: 206/265/363/466/474 nm

mAU

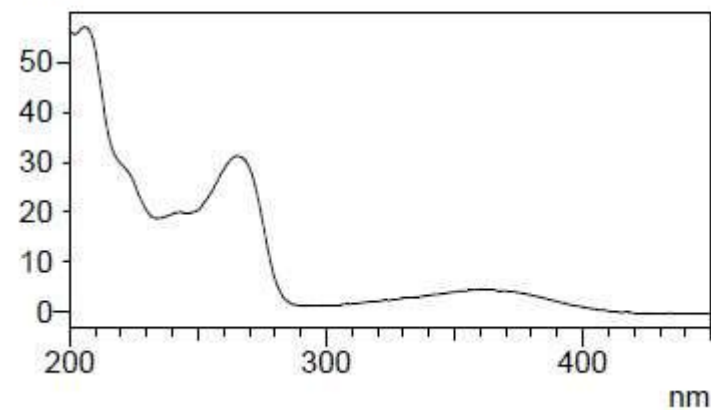
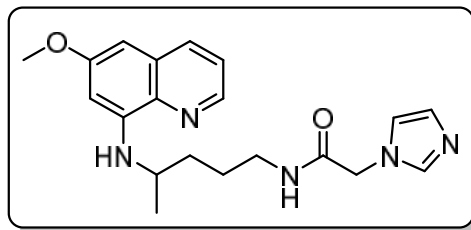
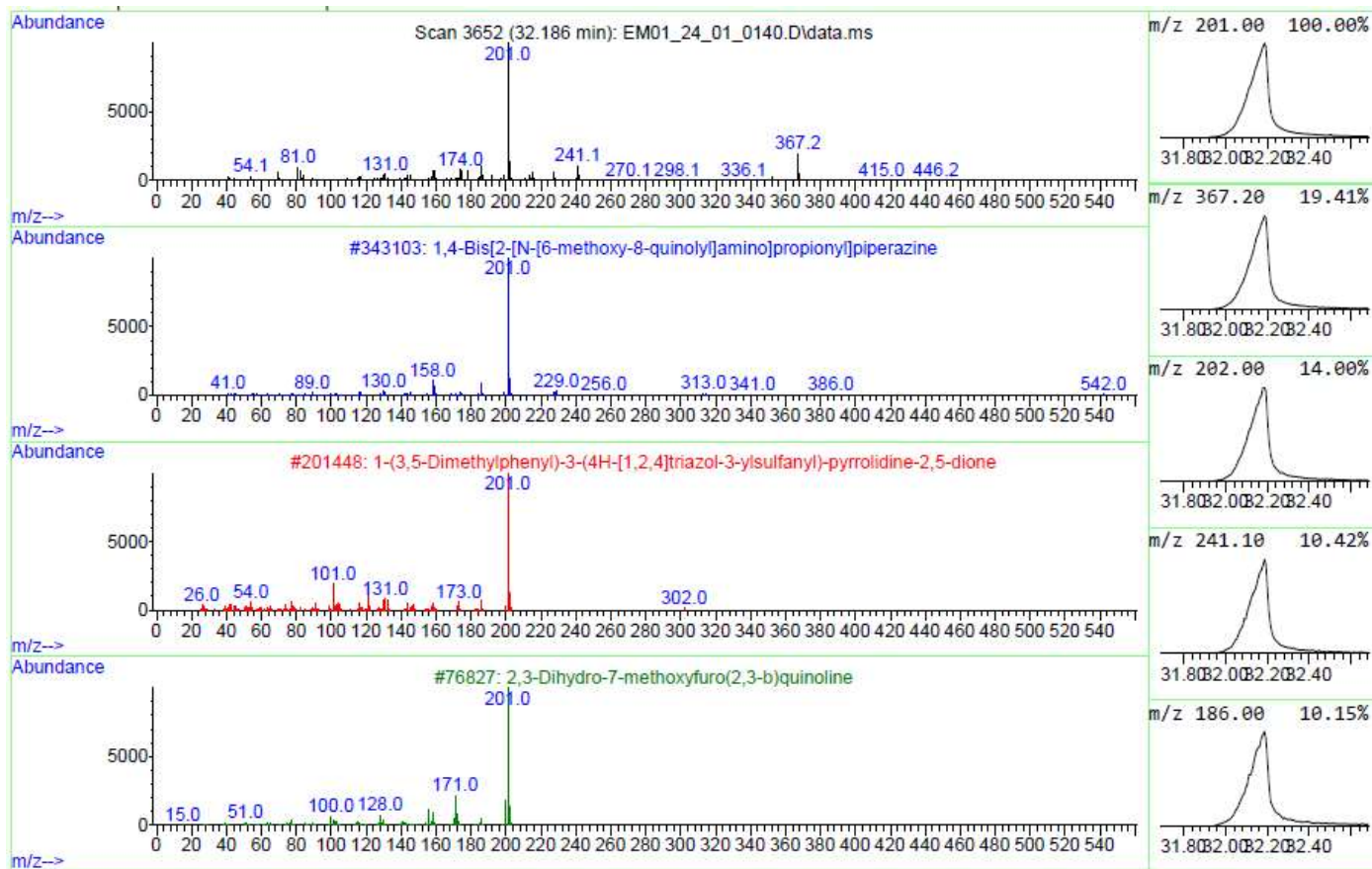


Figura 48. Espectro de ultravioleta do derivado **11b**.

2-(1*H*-imidazol-1-il)-*N*-(4-((6-metoxiquinolin-8-il)amino)pentil)acetamida (11c)





Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2024\01_JANEIRO_2024\EM01_24_01_0140.D
Sample : PJPT045

Peak Number: 5 at 32.187 min Area: 102625506 Area % 95.20

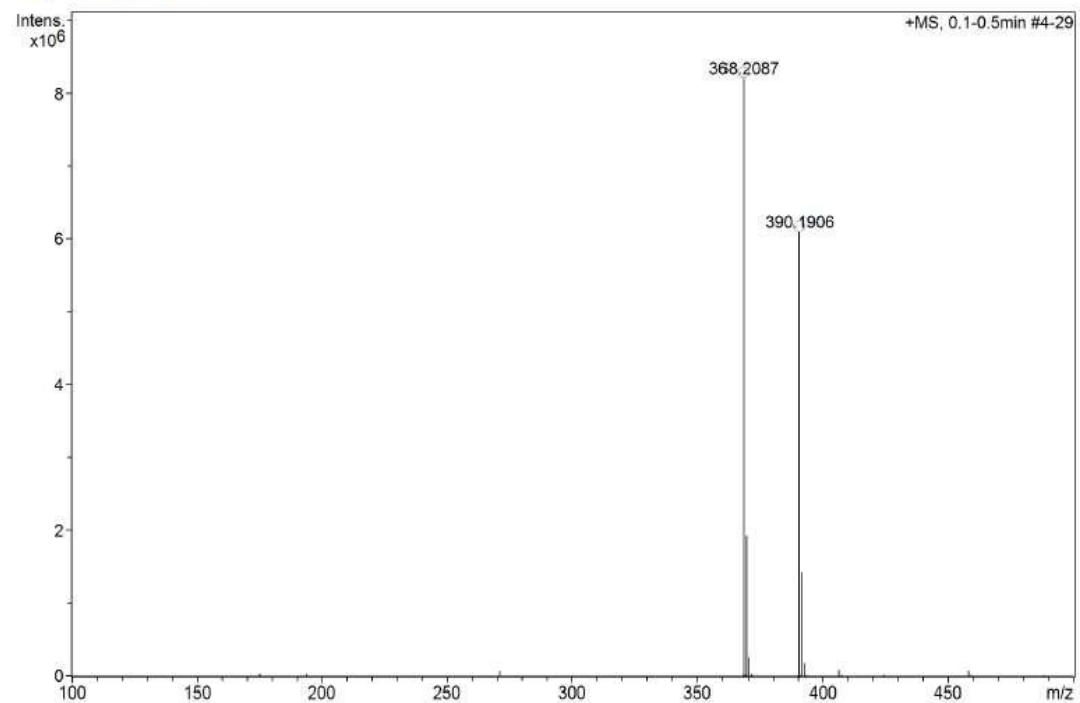
The 3 best hits from each library.			Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L					
1	1,4-Bis[2-[N-[6-methoxy-8-quinol...		343103	050823-62-6	50
2	1-(3,5-Dimethylphenyl)-3-(4H-[1,...		201448	1000310-56-7	50
3	2,3-Dihydro-7-methoxyfuro(2,3-b)...		76827	073863-58-8	49

Figura 49. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado **11c**.

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

+MS, 0.1-0.5min #4-29



Meas. m/z #	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I a	Std Mean m/z	Std VarNo	Std I rm	Std m/z	Std Comb Diff	Std Dev
368.208717	1 C ₂₀ H ₂₆ N ₅ O ₂	368.208102	-1.7	-2.5	10.5		ok even	1.4	2.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	1 C ₂₃ H ₂₇ N ₃ Na	368.209719	2.7	2.4	11.5		ok even	15.5	23.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
390.190555	1 C ₁₈ H ₂₀ N ₁₁	390.189766	-2.0	-3.2	14.5		ok even	2.5	3.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2 C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₆	390.191114	1.4	1.5	8.5		ok even	5.3	9.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	1 C ₂₀ H ₂₅ N ₅ NaO ₂	390.190046	-1.3	-1.6	10.5		ok even	2.5	4.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Figura 50. Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado **11c**.

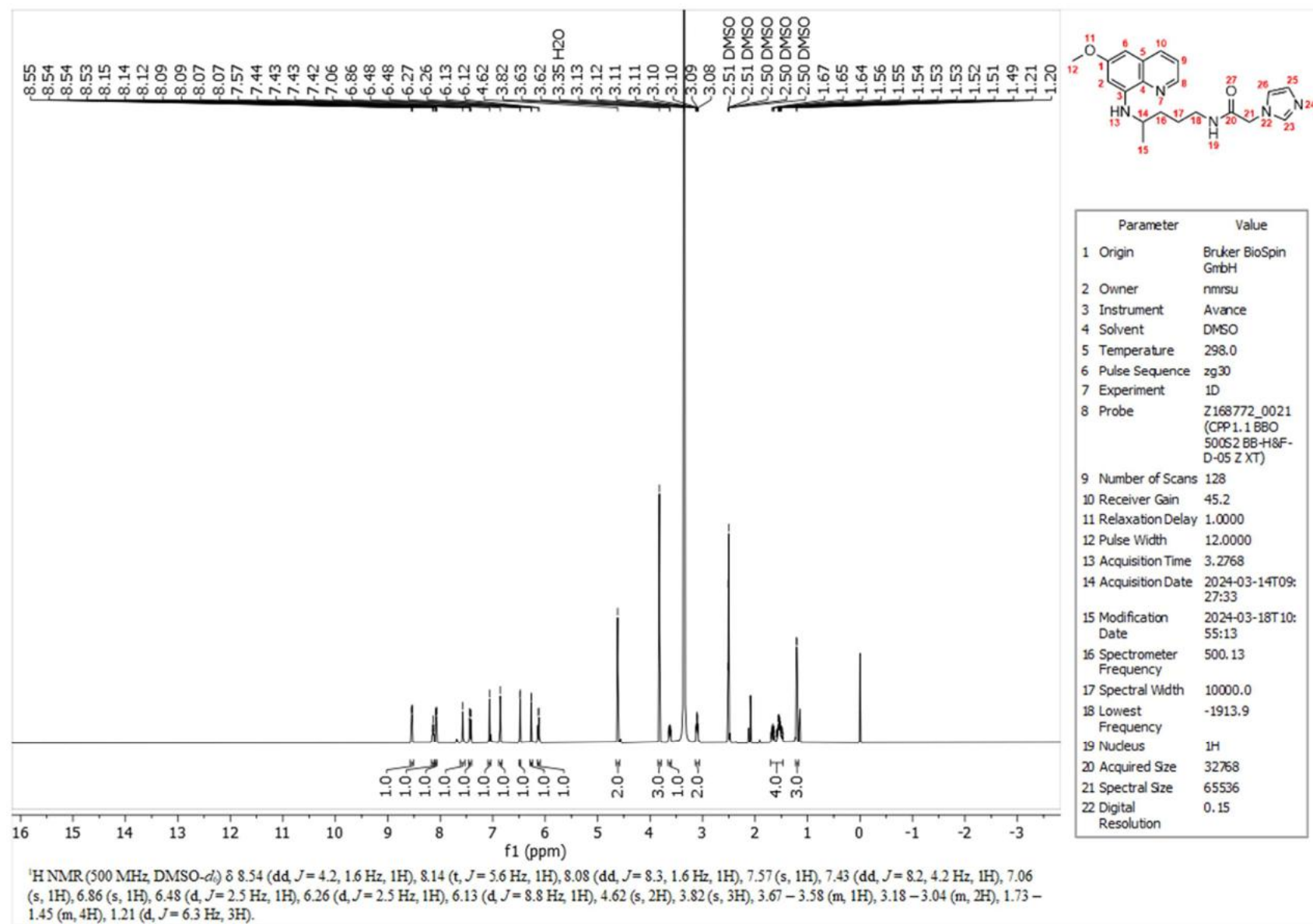


Figura 51. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado **11c**. Solvente: DMSO- d_6 .

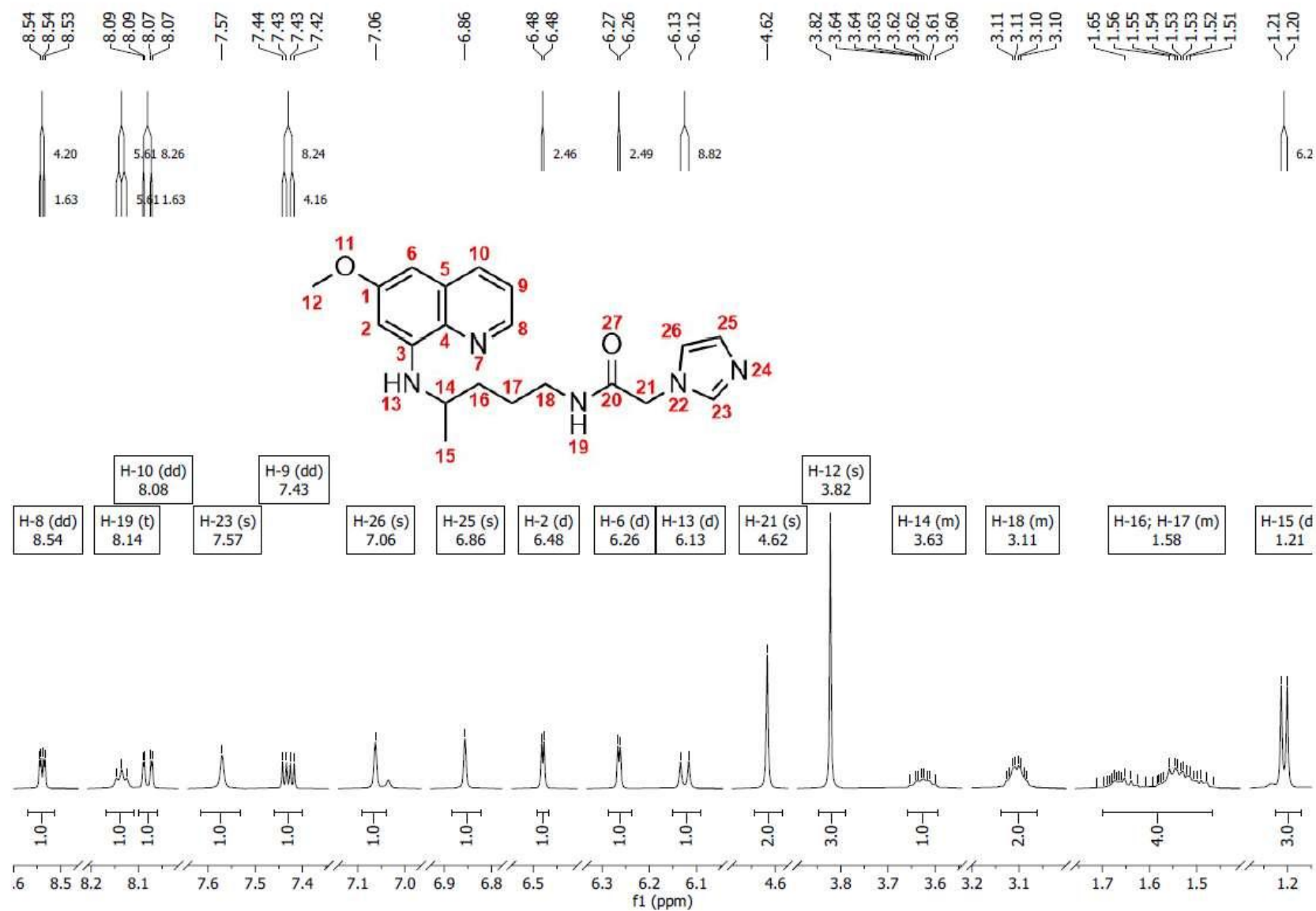


Figura 52. Espectro ampliado de RMN ^1H (500 MHz) do derivado **11c**. Solvente: DMSO- d_6 .

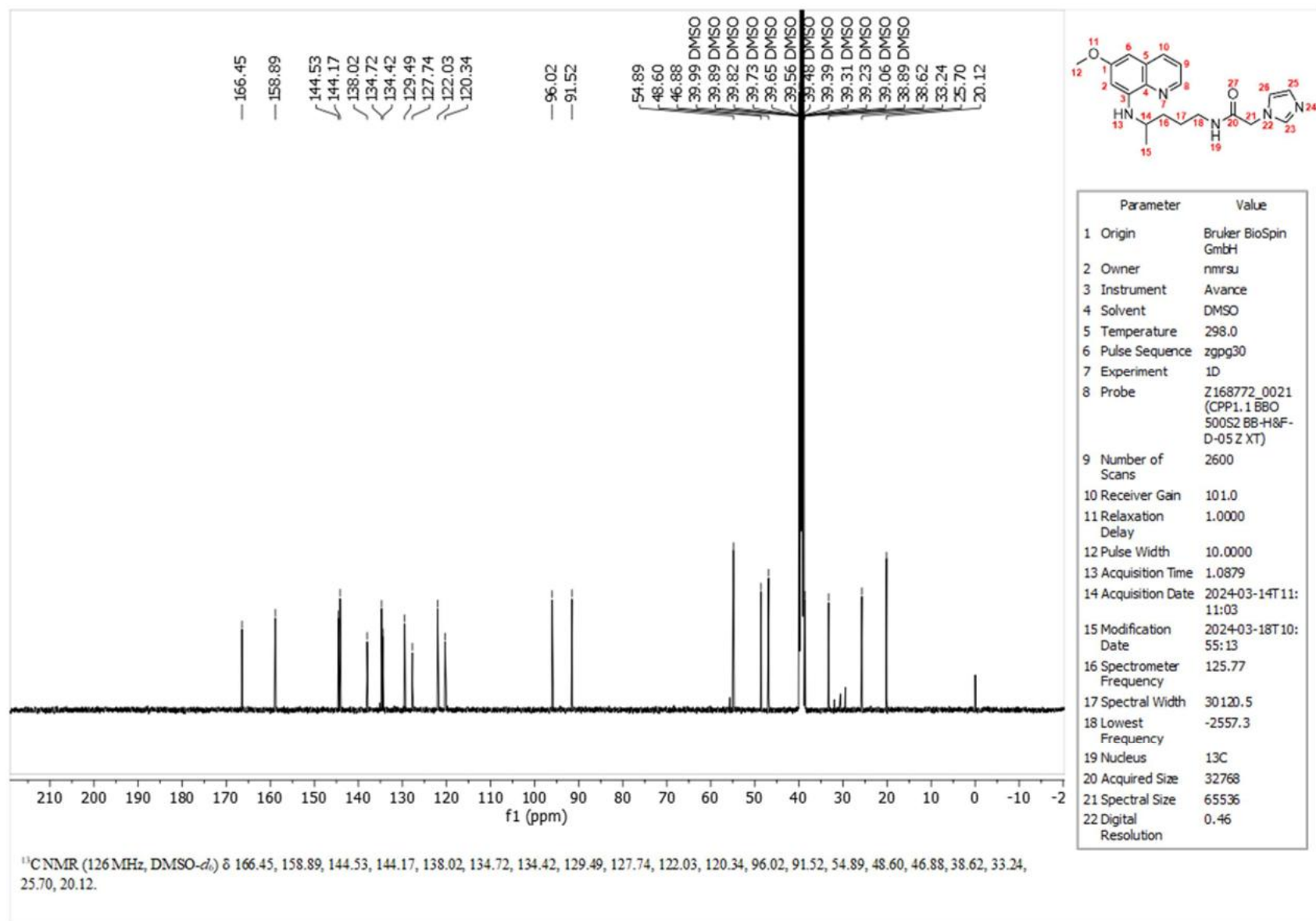


Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11c**. Solvente: DMSO- d_6 .

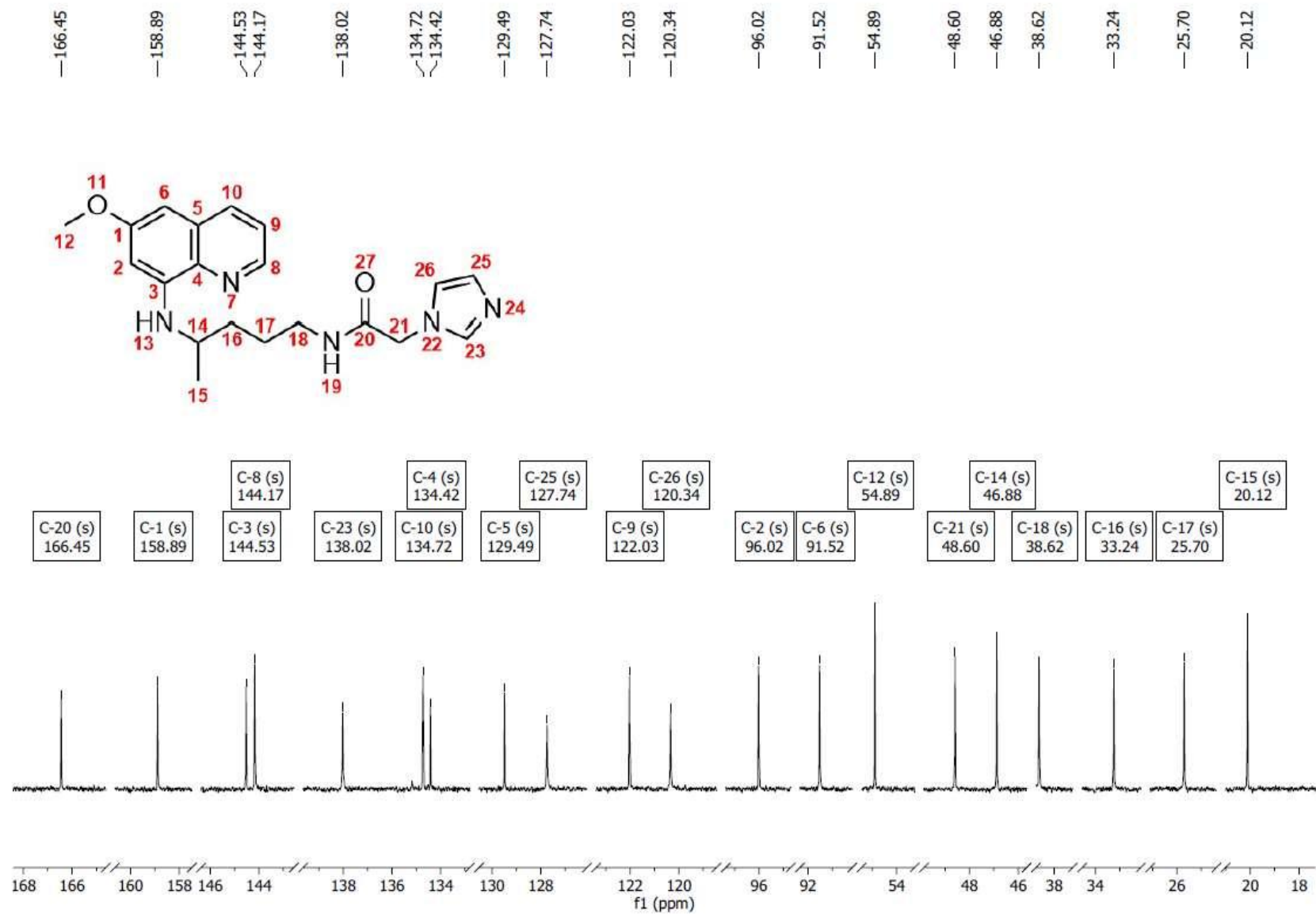


Figura 54. Espectro ampliado de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11c**. Solvente: DMSO- d_6 .

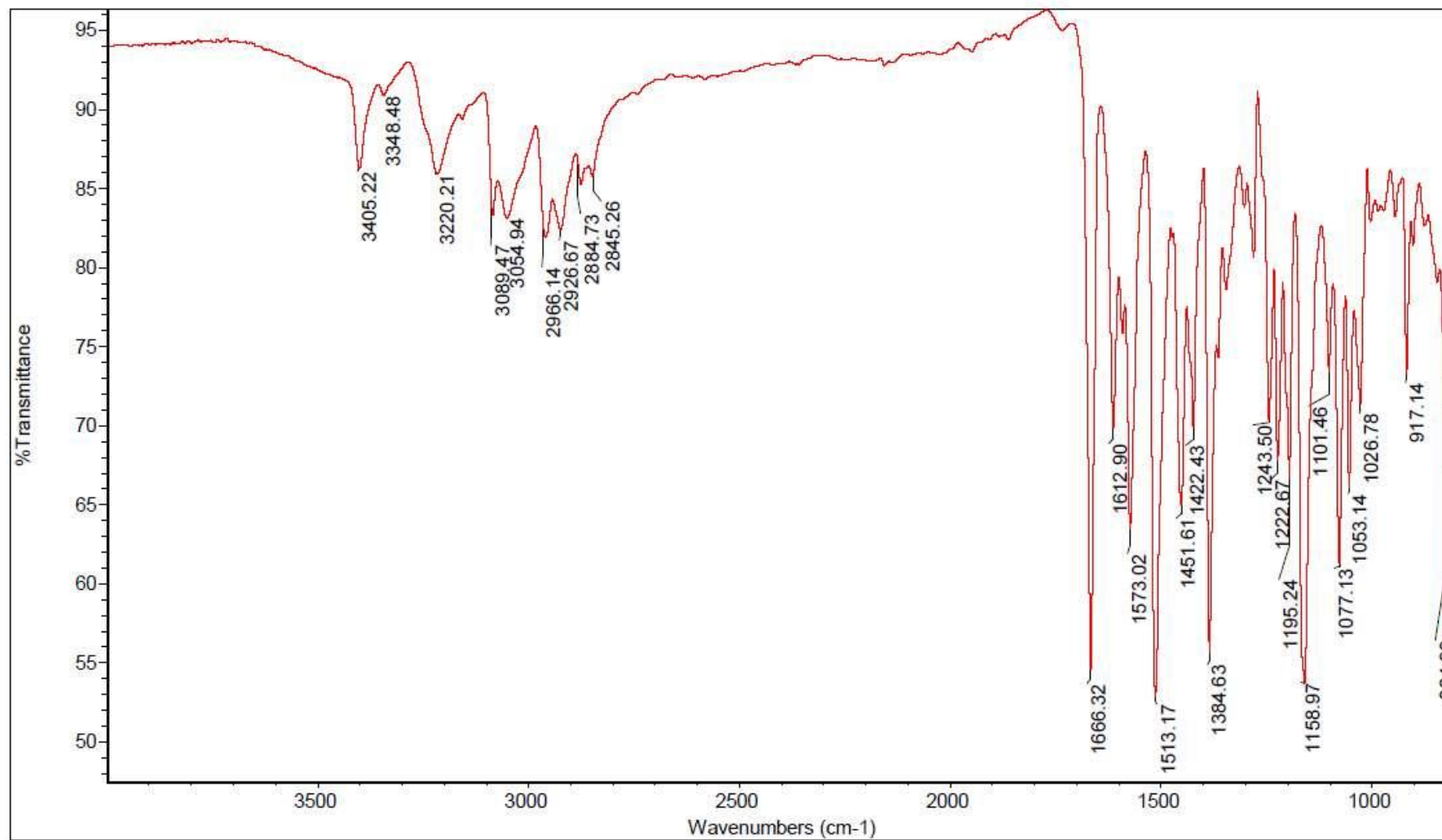
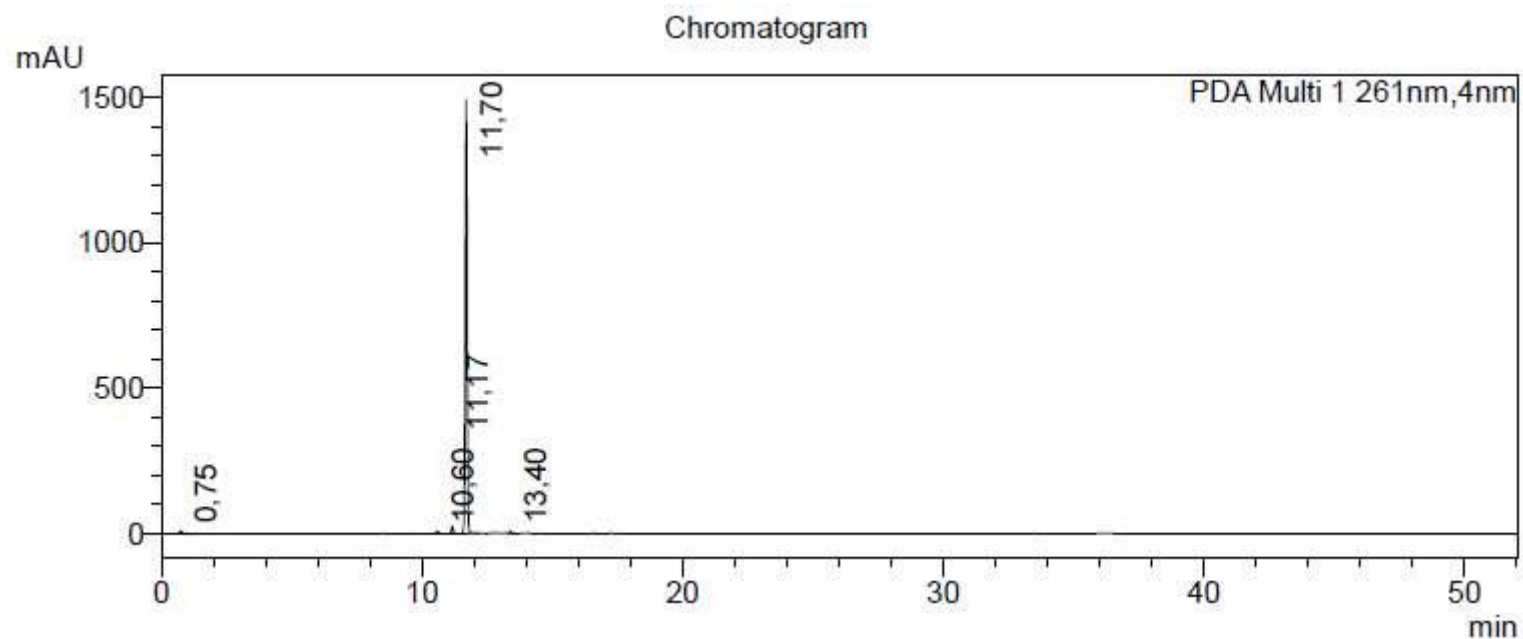
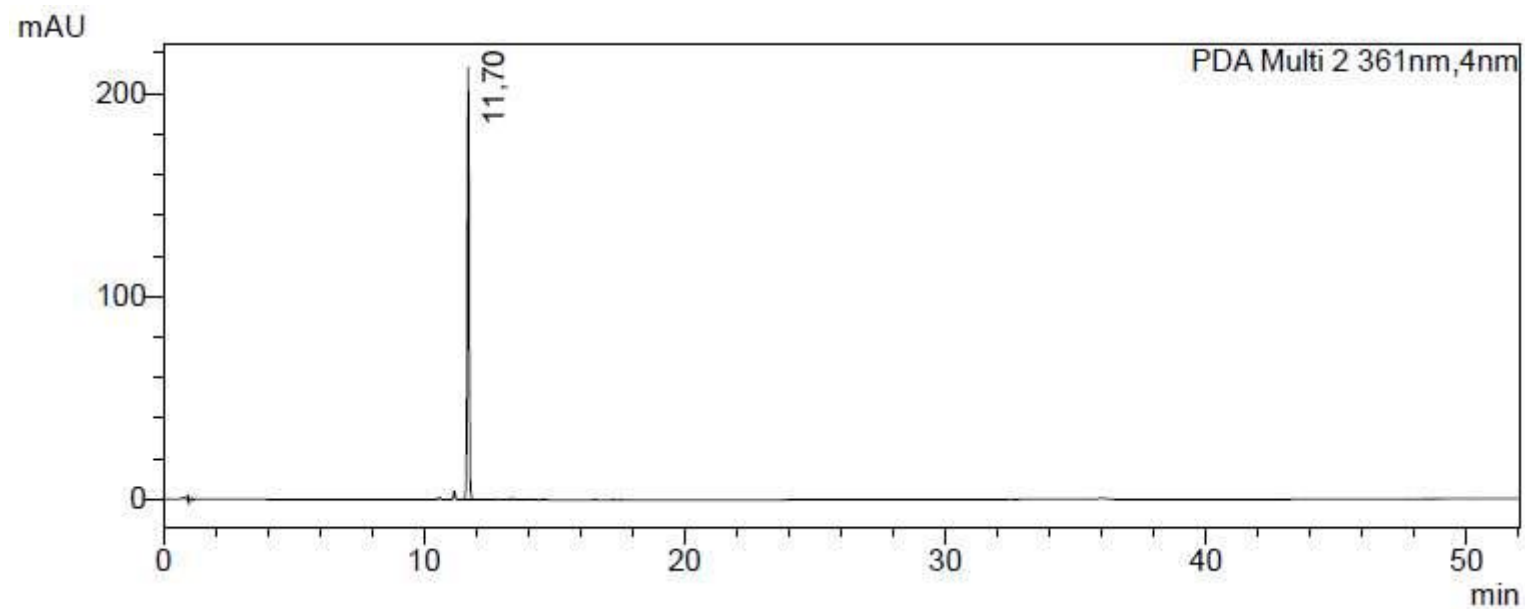


Figura 55. Espectro na região do infravermelho do derivado **11c**.



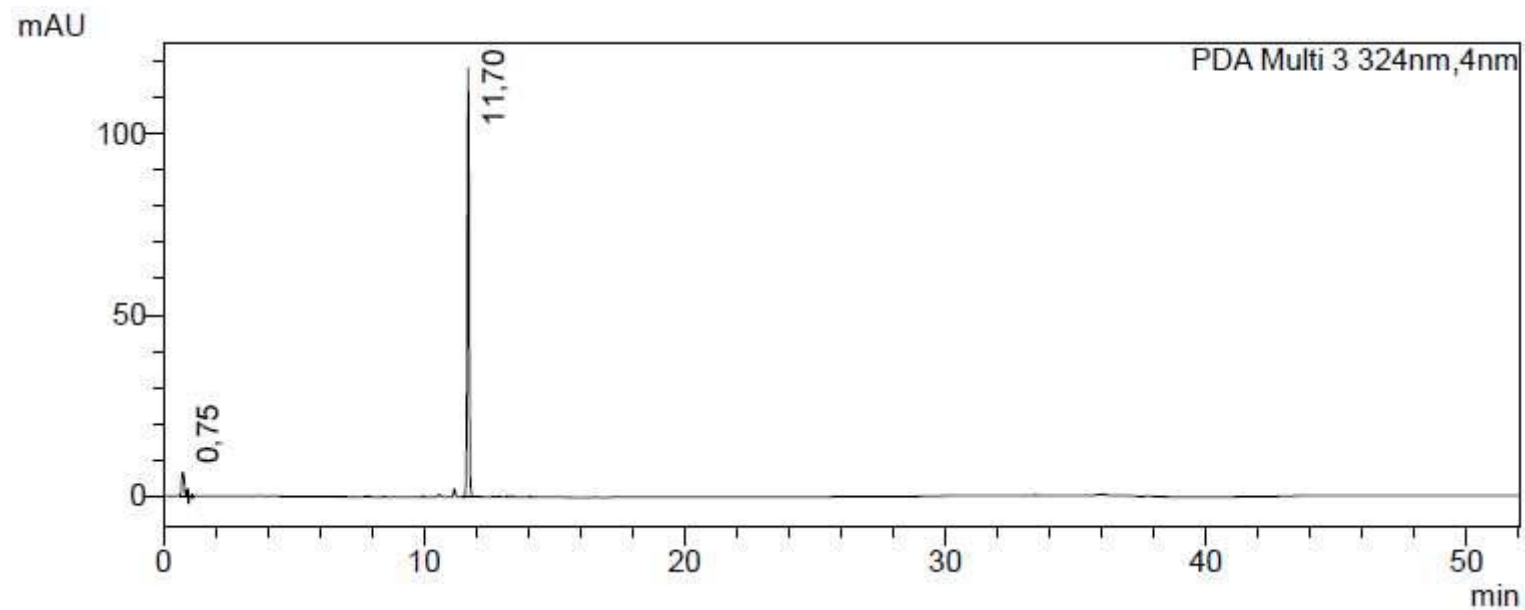
PDA Ch1 261nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	0,75		48481	0,6	1823	1,112	—	—
2	10,60		41536	0,5	356380	0,946	53,962	13,116
3	11,17		123372	1,6	582753	1,012	3,416	13,877
4	11,70		7676540	96,9	594366	1,033	3,452	14,585
5	13,40		29002	0,4	847788	1,303	11,072	16,849
Total			7918932	100,0				

Figura 56. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11c**. $\lambda = 261$ nm.



PDA Ch2 361nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	11,70		1067956	100,0	618213	1,035	--	--
Total			1067956	100,0				

Figura 57. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11c**. $\lambda = 361$ nm.

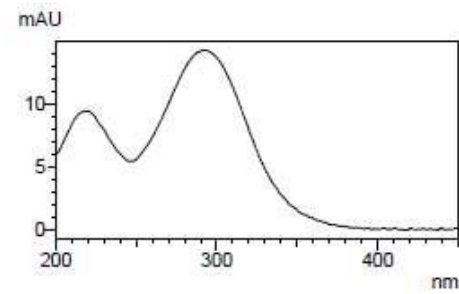


PDA Ch3 324nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	0,75		43370	6,8	1785	1,106	—	—
2	11,70		598694	93,2	610359	1,035	64,712	14,569
Total			642064	100,0				

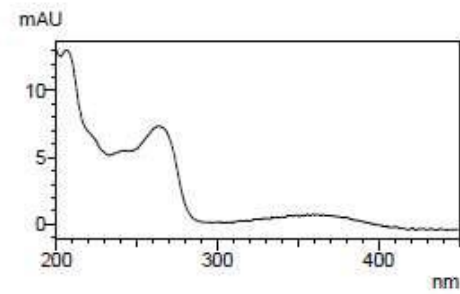
Figura 58. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11c**. $\lambda = 324$ nm.

UV Spectrum

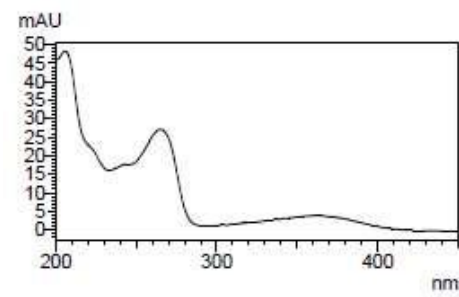
Retention time: 0,751 min
 Lambda max: 292/219/411/531/661 nm



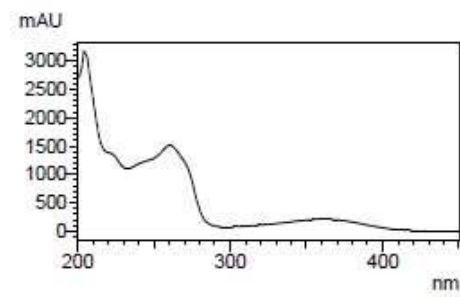
Retention time: 10,596 min
 Lambda max: 206/263/359 nm



Retention time: 11,167 min
 Lambda max: 206/265/360/582/481 nm



Retention time: 11,698 min
 Lambda max: 205/261/361/621 nm



Retention time: 13,398 min
 Lambda max: 260/387/329/545/638 nm

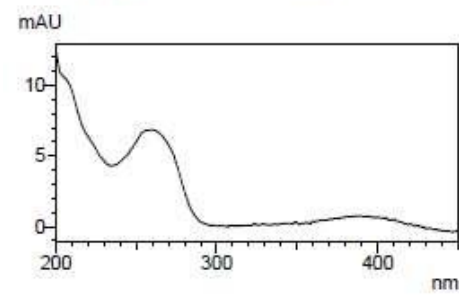
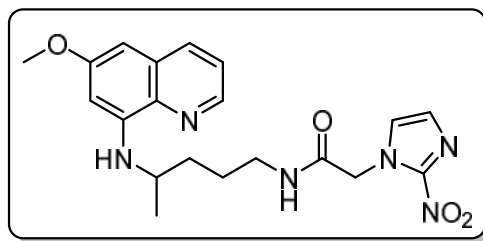
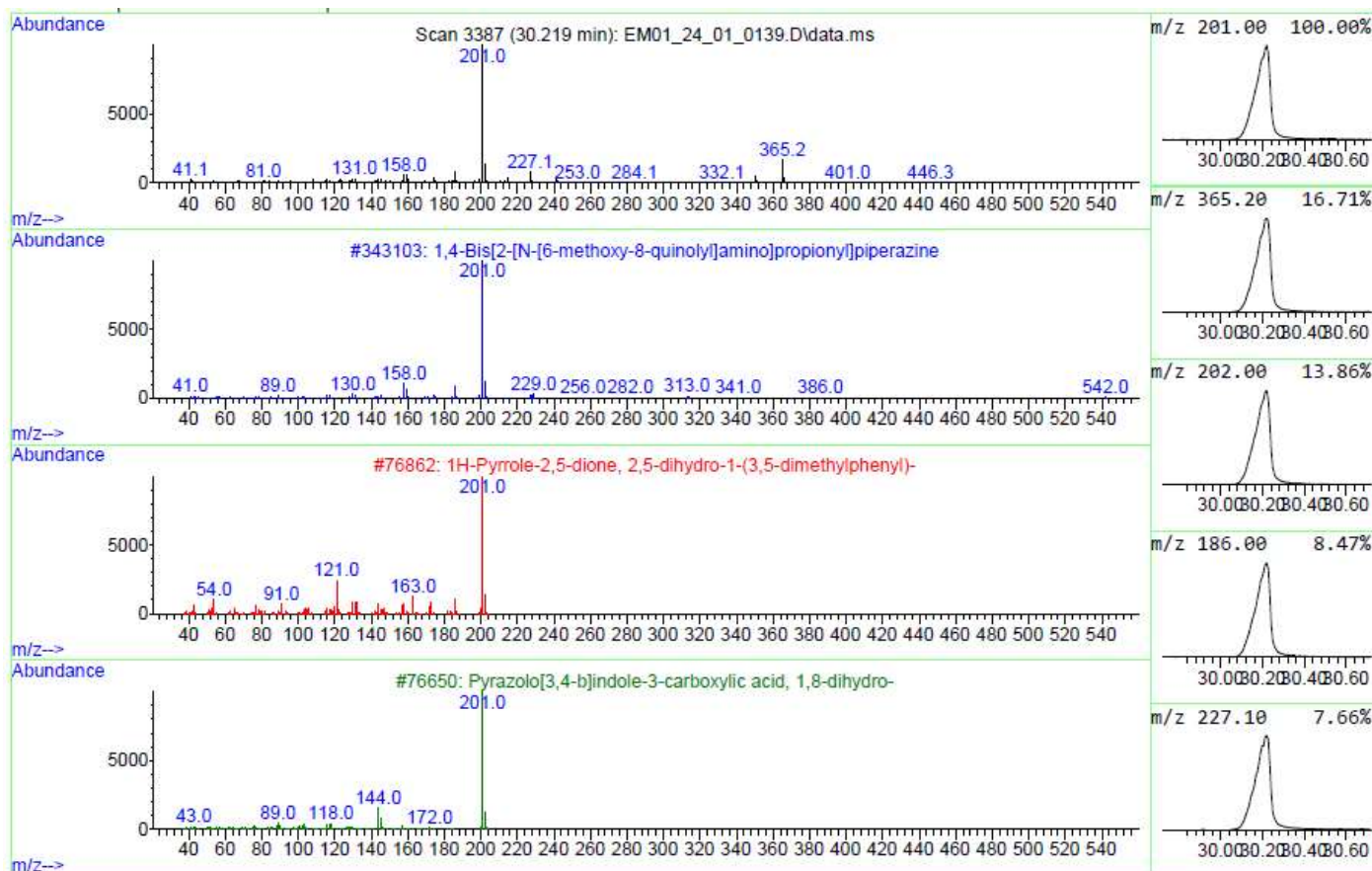


Figura 59. Espectro de ultravioleta do derivado **11c**.

N-(4-((6-metoxyquinolin-8-il)amino)pentil)-2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetamida (**11d**)





Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2024\01_JANEIRO_2024\EM01_24_01_0139.D
Sample : PJPT54

Peak Number: 5 at 30.220 min Area: 166298610 Area % 79.25

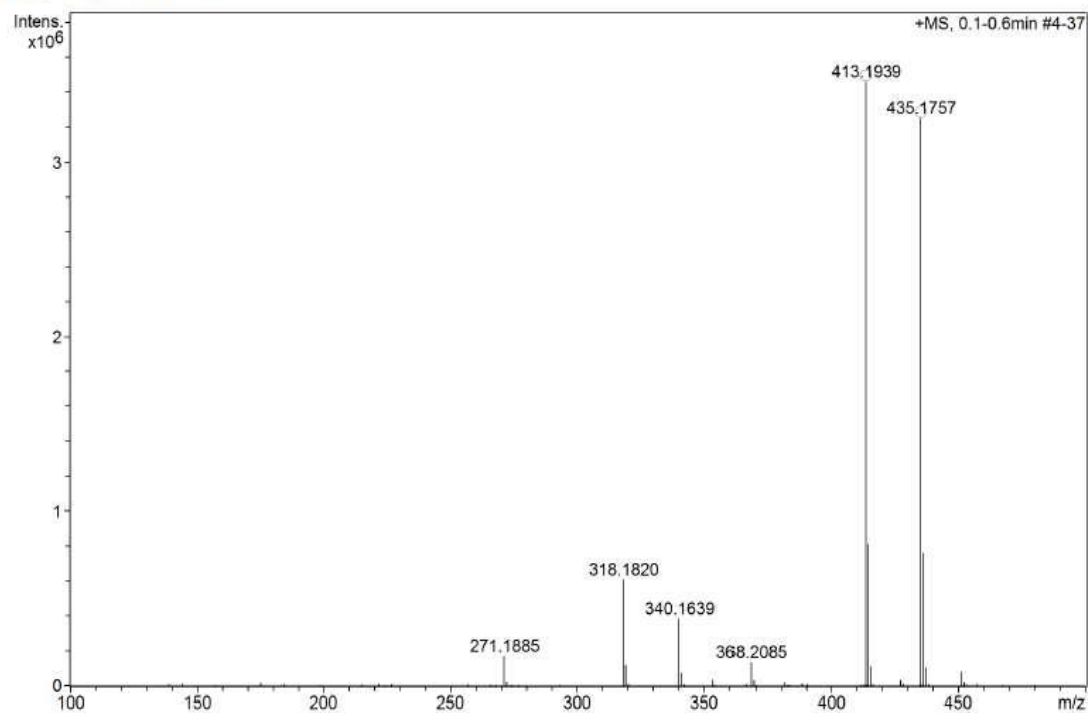
The 3 best hits from each library.	Ref\#	CAS\#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1 1,4-Bis[2-[N-[6-methoxy-8-quinol...	343103	050823-62-6	64
2 1H-Pyrrole-2,5-dione, 2,5-dihydr...	76862	065833-09-2	53
3 Pyrazolo[3,4-b]indole-3-carboxyl...	76650	1000337-92-2	50

Figura 60. Espectro de massas por ionização por elétrons do derivado **11d**.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

+MS, 0.1-0.6min #4-37



Meas. m/z # Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule e ⁻ Conf	mSigm a	Std I	Std Mean m/z	Std VarNo	Std m/z	Std Comb
413.193862 1 C20H25N6O4	413.193180	-1.7	-1.7	11.5	ok even	4.6	8.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C21H21N10	413.194517	1.6	1.2	16.5	ok even	17.7	27.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
435.175728 1 C20H24N6NaO4	435.175124	-1.4	-1.6	11.5	ok even	4.8	8.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 C21H20N10Na	435.176461	1.7	1.2	16.5	ok even	17.9	27.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Figura 61. Espectro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray do derivado **11d**.

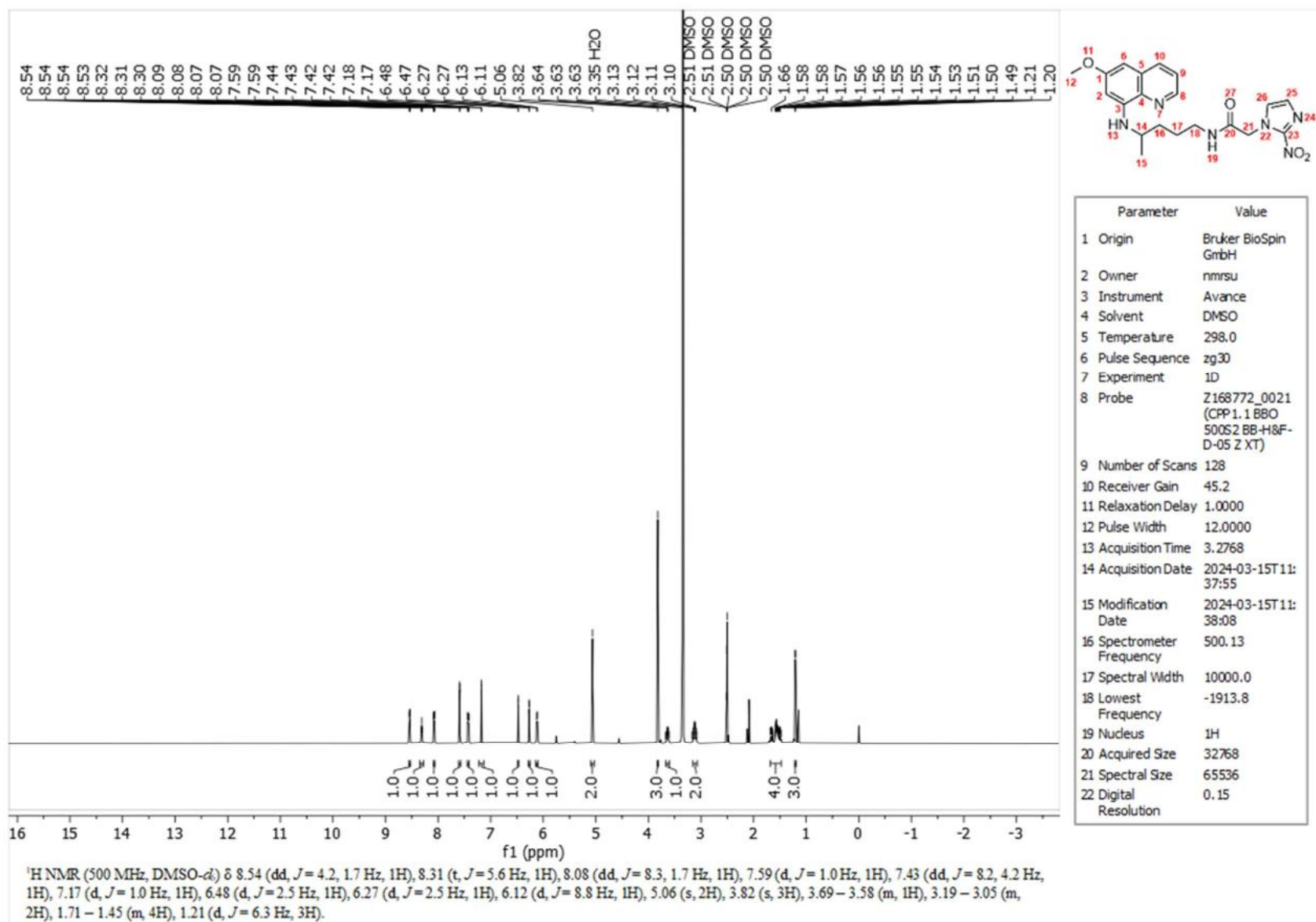


Figura 62. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado **11d**. Solvente: DMSO- d_6 .

Figura 63. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do derivado **11d**. Solvente: DMSO- d_6 .

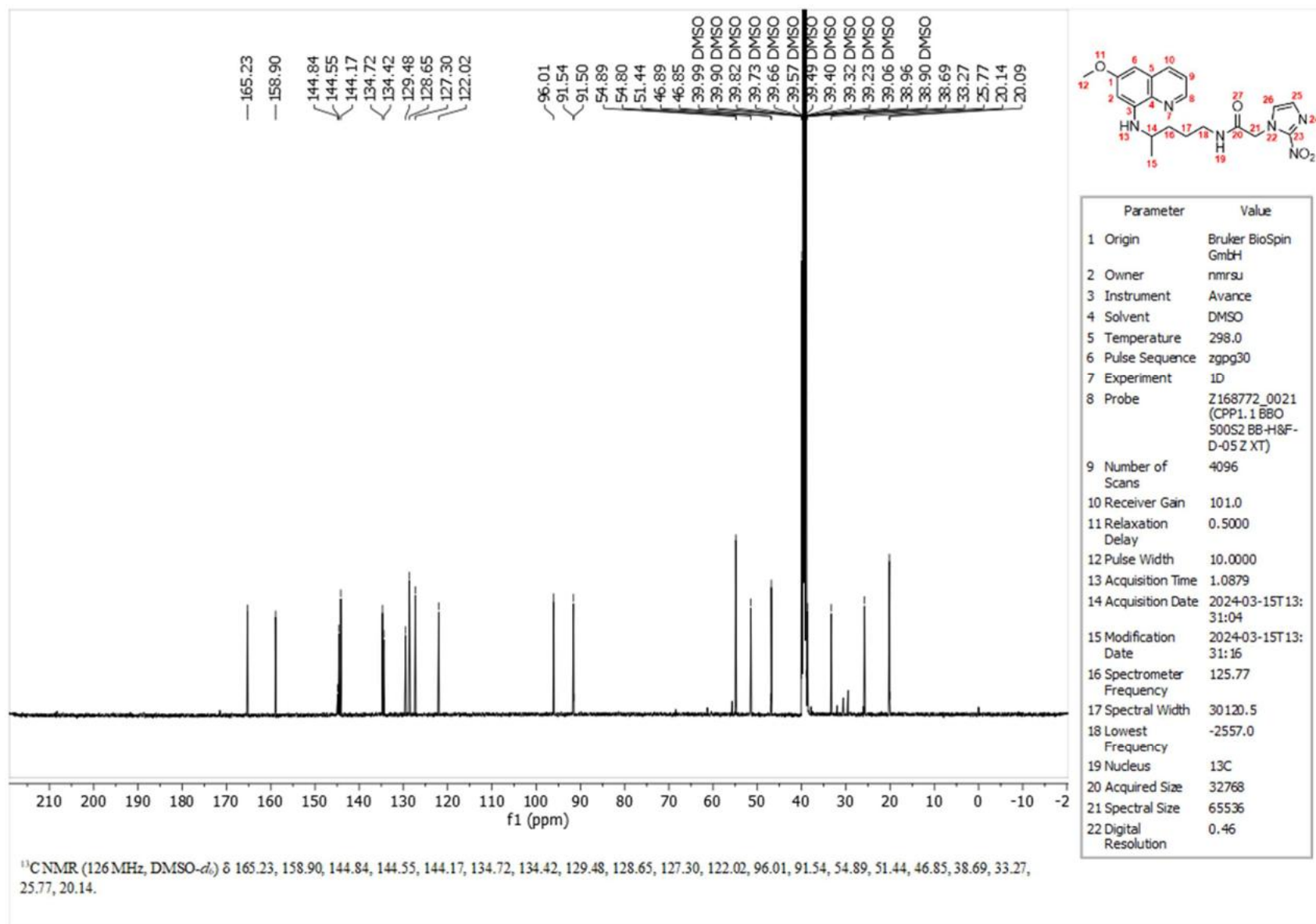


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11d**. Solvente: DMSO- d_6 .

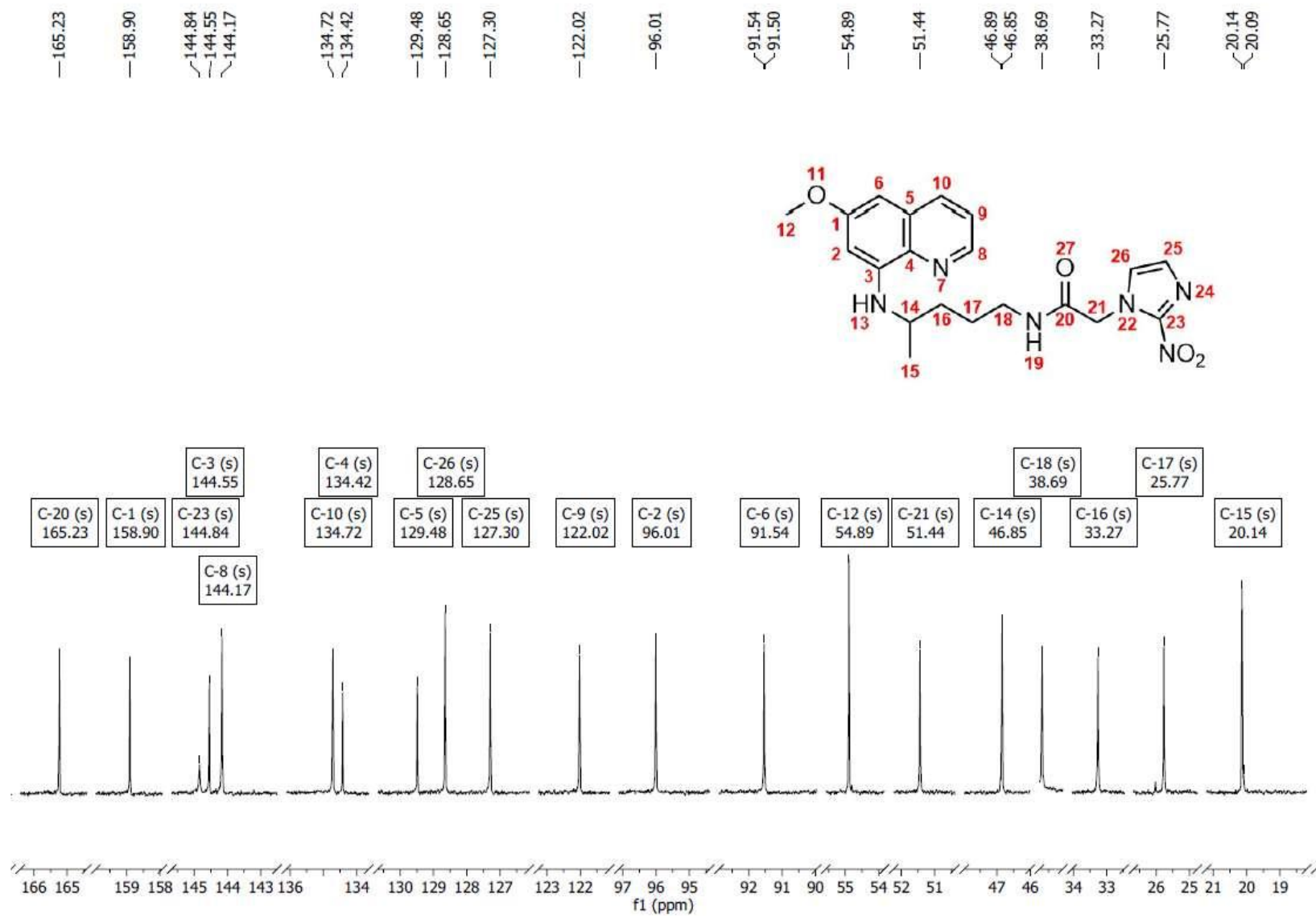


Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz) do derivado **11d**. Solvente: DMSO- d_6 .

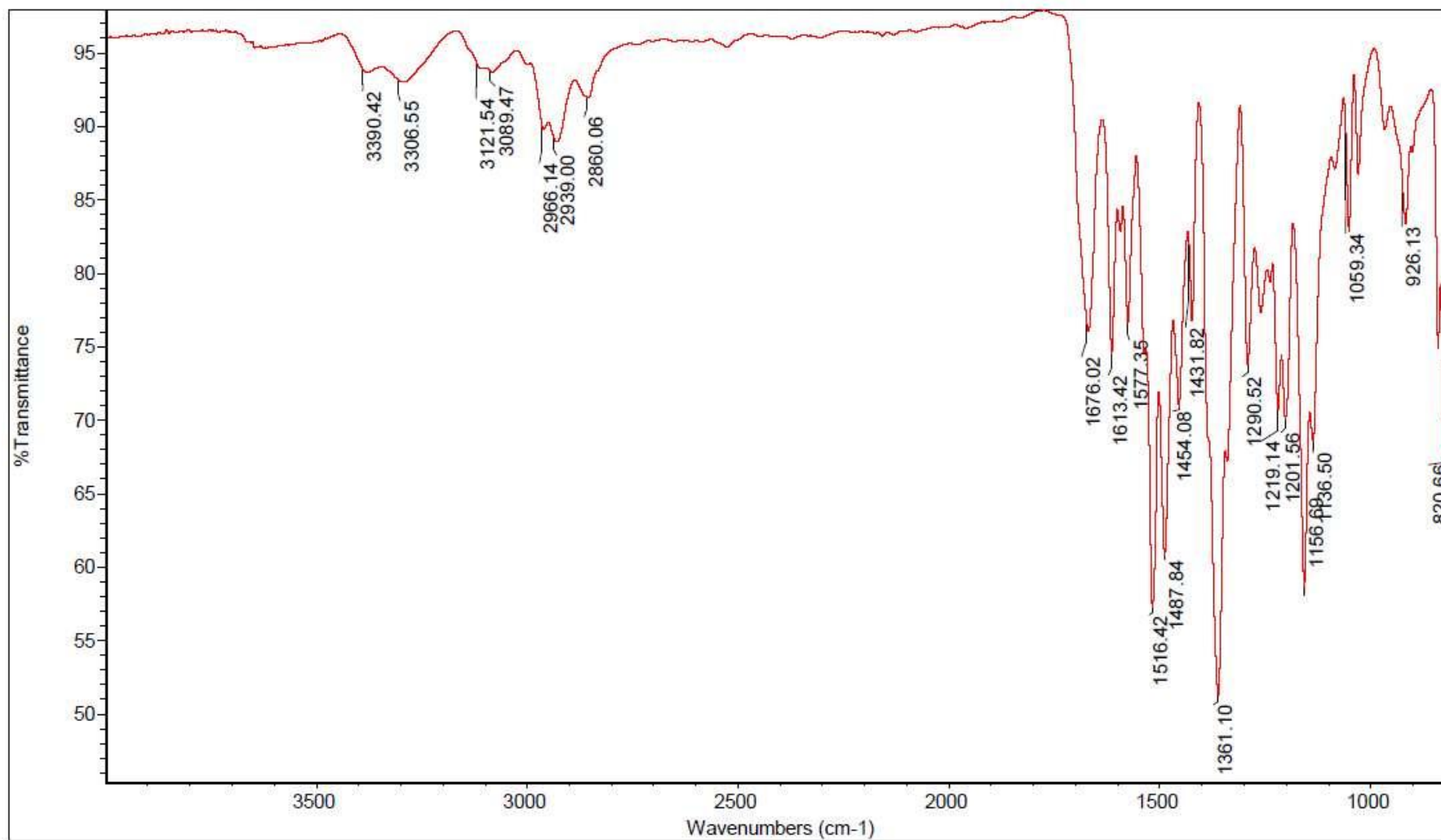
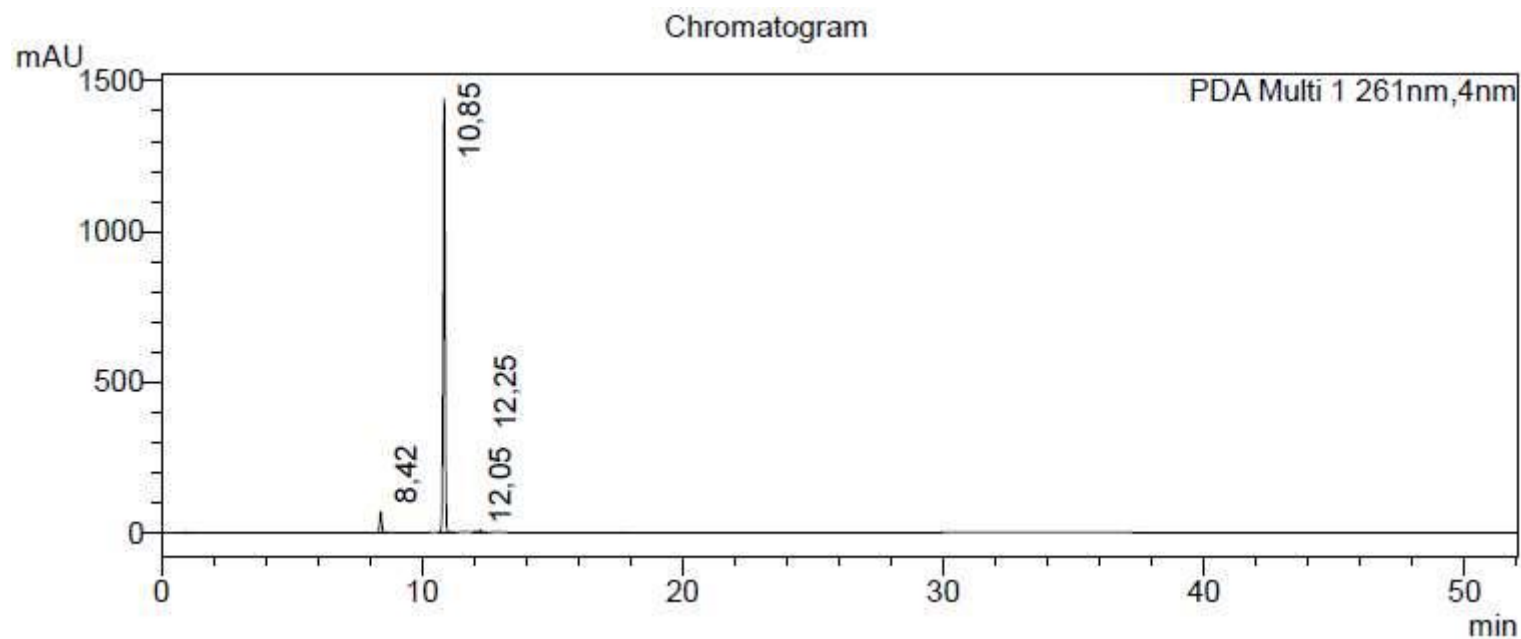
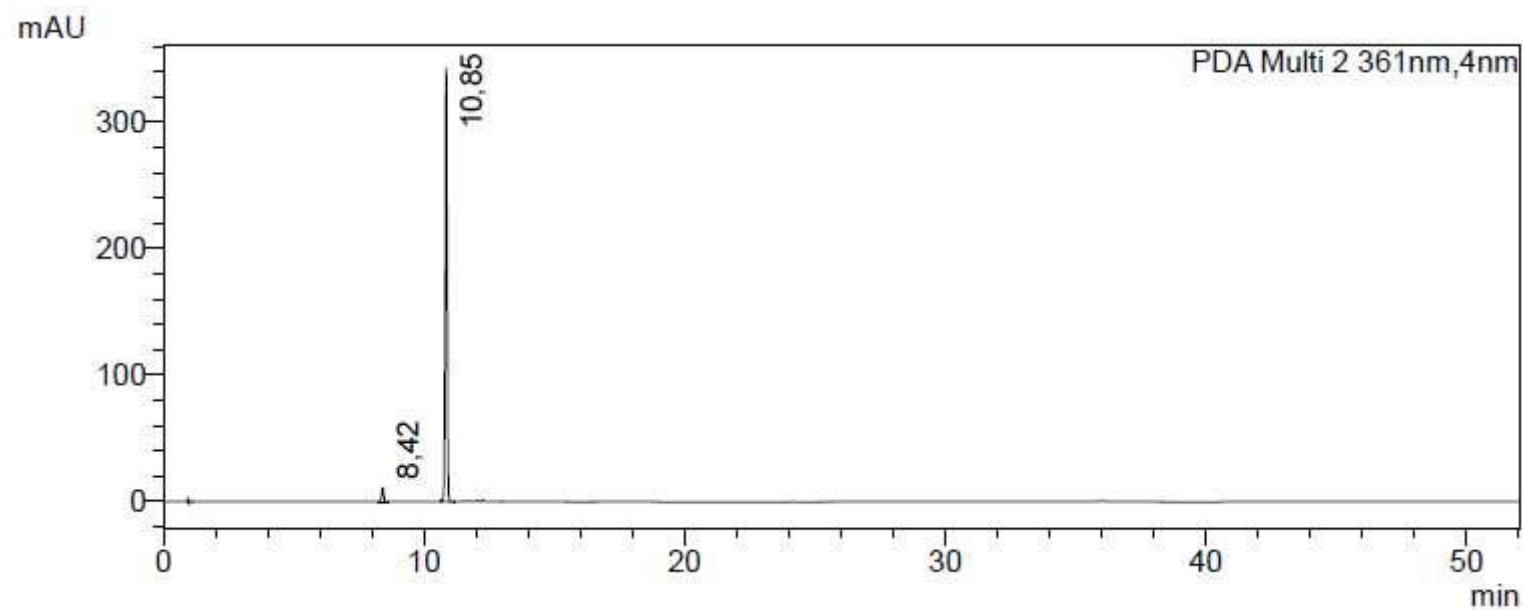


Figura 66. Espectro na região do infravermelho do derivado **11d**.



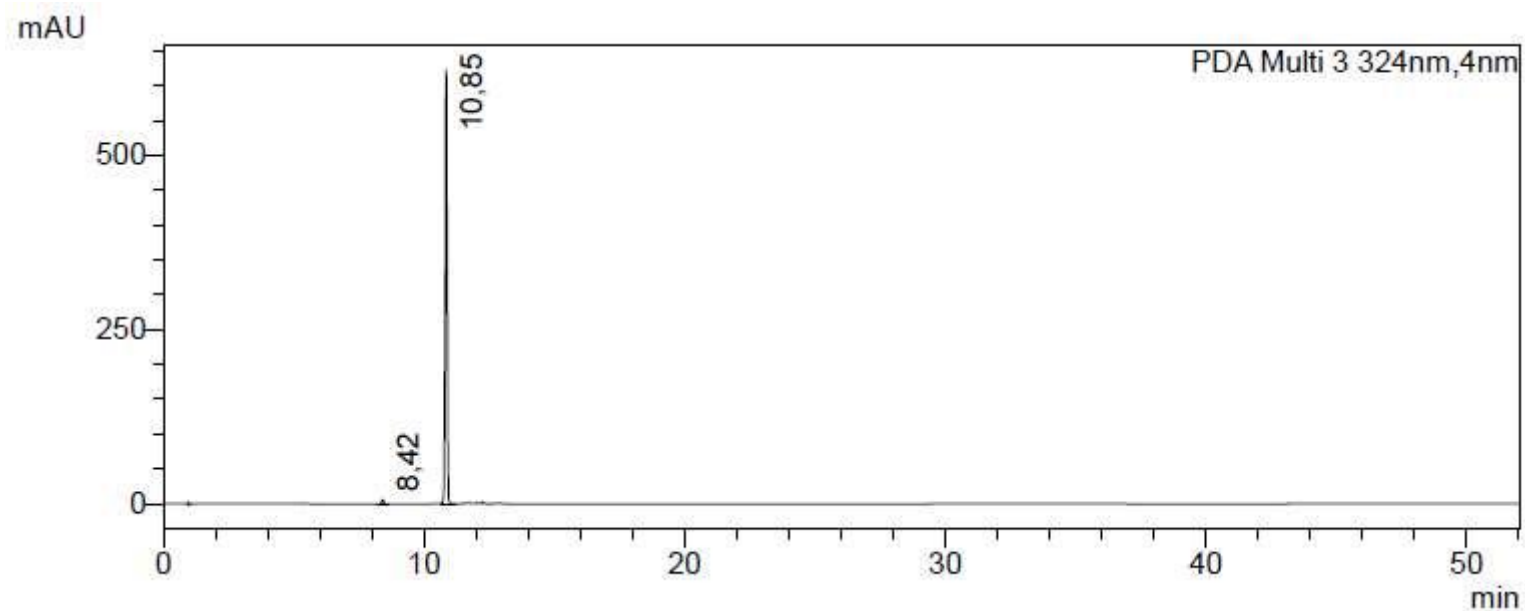
PDA Ch1 261nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	8,42		370246	4,7	309246	1,068		
2	10,85		7389432	94,6	528252	1,016	15,643	0,288
3	12,05		21304	0,3	669567	0,975	7,855	0,431
4	12,25		33890	0,4	767495	1,114	1,299	0,454
Total			7814873	100,0				

Figura 67. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11d**. $\lambda = 261$ nm.



PDA Ch2 361nm							
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)
1	8,42		58740	3,3	311265	1,065	--
2	10,85		1735407	96,7	540714	1,019	15,757
Total			1794147	100,0			

Figura 68. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11d**. $\lambda = 361$ nm.

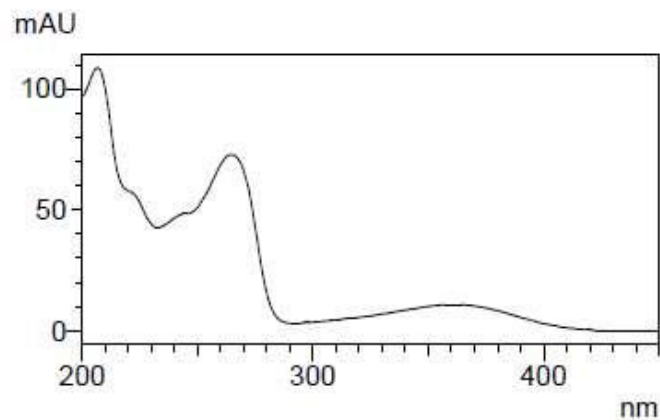


PDA Ch3 324nm								
Peak#	Ret. Time	Name	Area	Area%	Theoretical Plates/meter(USP)	Tailing Factor	Resolution(USP)	Capacity Factor(k')
1	8,42		33248	1,0	309266	1,063	—	—
2	10,85		3151613	99,0	540579	1,019	15,731	0,288
Total			3184860	100,0				

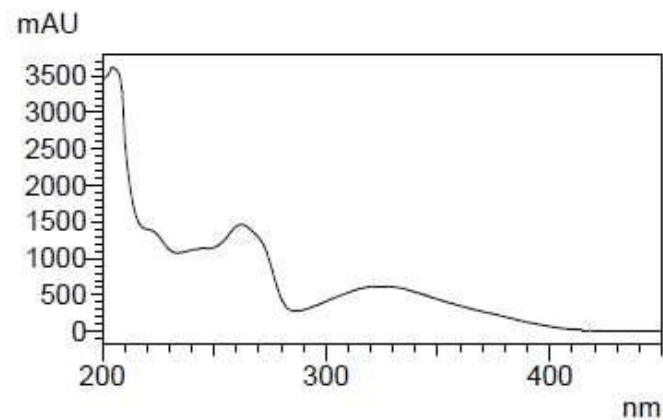
Figura 69. Cromatograma de cromatografia líquida de alta eficiência do derivado **11d**. $\lambda = 324$ nm.

UV Spectrum

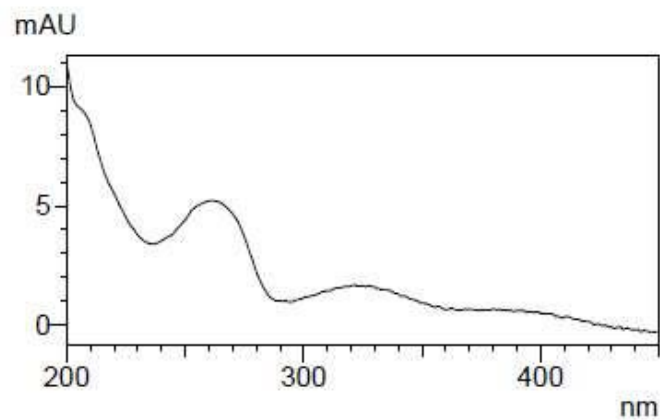
Retention time: 8,422 min
Lambda max: 207/265/360/654/728 nm



Retention time: 10,852 min
Lambda max: 205/262/324/658/727 nm



Retention time: 12,055 min
Lambda max: 261/321/383/727 nm



Retention time: 12,247 min
Lambda max: 261/323/383/727 nm

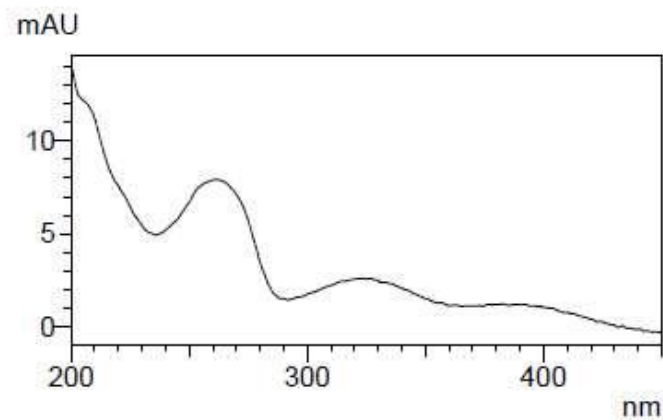


Figura 70. Espectro de ultravioleta do derivado **11d**.