

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Antimaláricos potencialmente ativos em resistência: planejamento e síntese de dendrons e dendrímeros dirigidos a eritrócitos infectados

Luccas Missfeldt Sanches

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Antimaláricos potencialmente ativos em resistência: planejamento e síntese de dendrons e dendrímeros dirigidos a eritrócitos infectados

Luccas Missfeldt Sanches

Versão Corrigida

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2023

Luccas Missfeldt Sanches

Antimaláricos potencialmente ativos em resistência: planejamento e síntese de dendrons e dendrímeros dirigidos a eritrócitos infectados

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
Orientadora/Presidente

1o. Examinador

2o. Examinador

3o. Examinador

4o. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2023.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S211a	Sanches, Luccas Missfeldt Antimaláricos potencialmente ativos em resistência: planejamento e síntese de dendrons e dendrimeros dirigidos a eritrócitos infectados / Luccas Missfeldt Sanches. - São Paulo, 2023. 354 p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne 1. Dendrimeros. 2. Malária. 3. Pró-fármacos. 4. Direcionamento de fármacos. I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.
-------	---

RESUMO

SANCHES, L.S. **Antimaláricos potencialmente ativos em resistência: planejamento e síntese de dendrons e dendrímeros dirigidos a eritrócitos infectados**. 2023. 354p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A malária é uma doença potencialmente fatal causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e que atinge eritrócitos. Em diversas regiões do mundo, relata-se o aparecimento de resistência dos parasitas aos principais fármacos utilizados em seu tratamento, o que levou ao aumento na mortalidade da doença. Terapias de combinação de artemisinina (TCAs) possuem forte recomendação pela World Health Organization (WHO) para o tratamento da malária, inclusive em caso de resistência. Heparina e seus derivados podem se ligar a eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*, tornando-os viáveis para o direcionamento de fármacos e consequentemente podendo aumentar a quantidade de um produto terapêutico na região afetada. Nesse sentido, dendrímeros, que são transportadores viáveis de fármacos, ao poderem ultrapassar diferentes barreiras do organismo, são uma plataforma interessante para a construção de estruturas direcionadas por derivados de heparina a eritrócitos infectados e capazes de carregar TCAs. Tais características poderiam aumentar a eficácia terapêutica, seletividade e auxiliar no combate à resistência do *Plasmodium* a fármacos. O presente trabalho relata as etapas sintéticas realizadas para a obtenção destes dendrímeros direcionados, a avaliação de eficácia, toxicidade, solubilidade, permeabilidade e *clearance* de compostos potencialmente ativos ligados a espaçantes, além de uma nova rota sintética para a obtenção de TCAs direcionadas por heparina a eritrócitos infectados. Por fim, também são relatados ensaios computacionais para avaliar se derivados de heparina poderiam ser utilizados no direcionamento a eritrócitos infectados por *P. vivax*.

Palavras-chave: *Plasmodium*, dendrímeros, pró-fármacos, direcionamento de fármacos, heparina.

ABSTRACT

SANCHES, L.S. **Antimalarial potentially active against resistance: design and synthesis of dendrons and dendrimers directed to infected erythrocytes**. 2023. 354p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Malaria is a potentially fatal disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* which affects erythrocytes. In several regions of the world, parasites resistant to the most used drugs are reported, leading to an increase in disease mortality. Artemisinin combination therapies (ACTs) are strongly recommended by the World Health Organization (WHO) for malaria treatment, even in cases of resistance. Heparin and its derivatives can bind to *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes, which make them viable directing groups for drug targeting, a strategy that can increase the quantity of active compounds in the disease affected region. In this context, dendrimers are viable drug carriers that are able to cross different barriers and they are an interesting platform for building structures directed to infected erythrocytes by heparin derivatives and able to carry ACTs. These structures could increase the therapeutic efficacy, selectivity and aid the control of Plasmodium drug resistance. The work presented in this thesis shows synthetic efforts to obtain these directed dendrimers, the evaluation of efficacy, toxicity, solubility, permeability and clearance of potentially active compounds covalently bound to linkers and a new synthetic route for building ACTs directed by heparin derivatives to infected erythrocytes. A computational work is also presented to evaluate if heparin derivatives could be used as directing groups for *P. vivax* infected erythrocytes.

Keywords: *Plasmodium*, dendrimers, prodrugs, drug targeting, heparin.

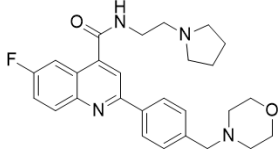
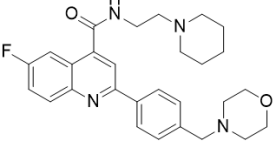
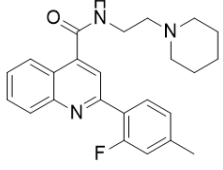
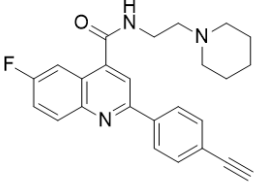
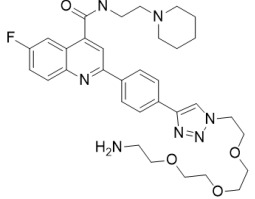
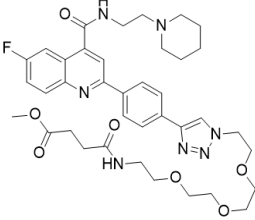
AGRADECIMENTOS

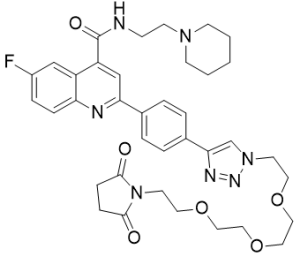
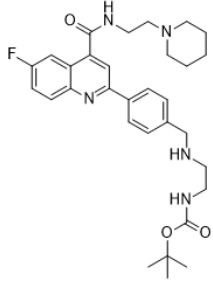
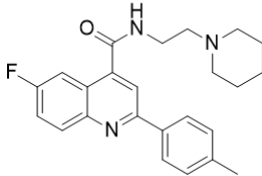
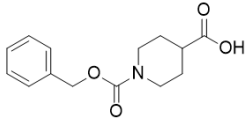
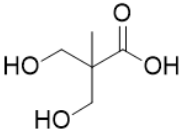
Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e seus funcionários, ao Wellcome Centre for Anti-Infectives Research, à minha orientadora, profa. Elizabeth Igne Ferreira, aos meus colegas de laboratório, à minha família e amigos, à FAPESP e à CAPES. Todos tiveram uma participação essencial nesse projeto e permitiram que eu conduzisse da melhor forma possível e com todo o apoio.

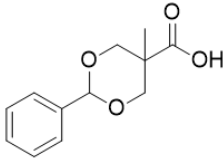
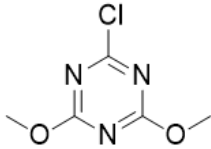
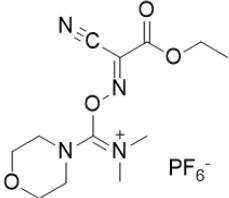
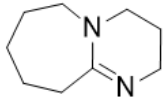
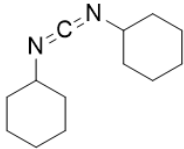
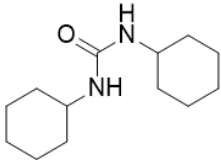
Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP: processo nº 2018/10359-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

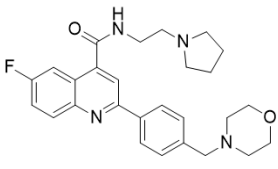
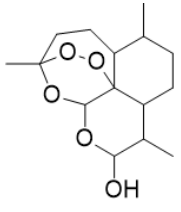
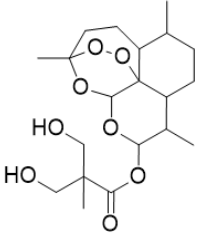
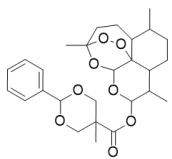
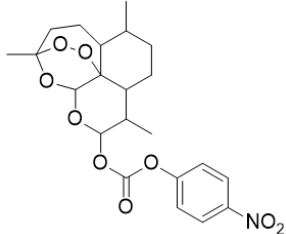
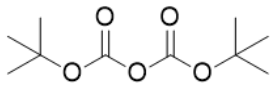
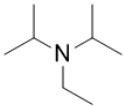
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

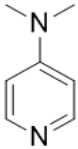
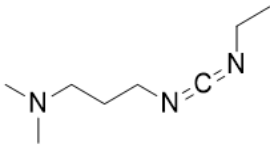
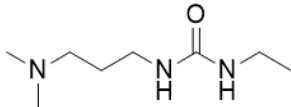
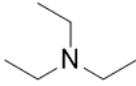
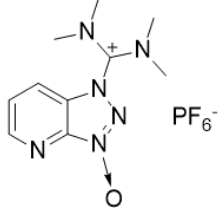
ABREVIATURAS

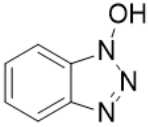
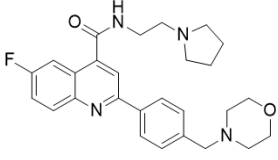
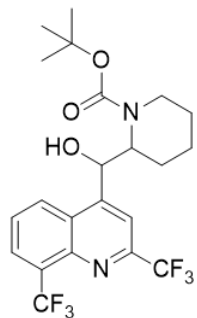
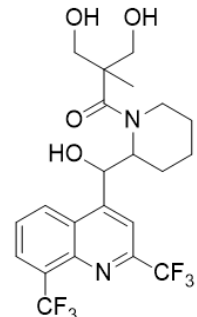
Sigla	Estrutura	Significado
498		6-fluor-2-(4-(morpholinometil)fenil)-N-(2-(pirrolidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
498P		6-fluoro-2-(4-(morpholinometil)fenil)-N-(2-(piperidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
498PFTol		2-(2-fluor-4-metilfenil)-N-(2-(piperidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
498PIno		2-(4-etnilfenil)-6-fluor-N-(2-(piperidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
498PPEG		2-(4-(1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenil)-6-fluor-N-(2-(piperidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
498PPEGMS		1-(4-(4-(6-fluor-4-((2-(piperidin-1-il)etil)carbamoil)quinolin-2-il)phenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxo-12-azahexadecan-16-oato de metila

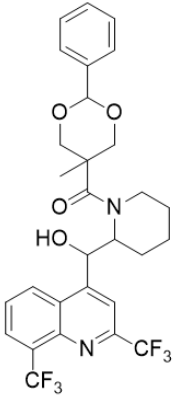
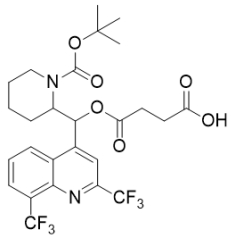
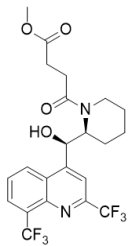
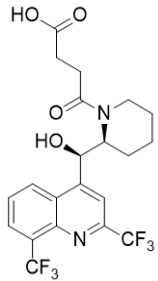
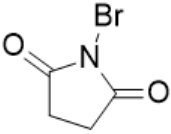
498PPEGS		2-(4-(1-(2-(2-(2-(2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenil)-6-fluor-N-(2-(piperidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
498PTdiA		Carbamato de <i>tert</i> -butil-2-((4-(6-fluor-4-((2-(piperidin-1-il)etil)carbamil)quinolin-2-il)benzil)amino)etila
498PTol		6-fluor-N-(2-(piperidin-1-il)etil)-2-(p-tolil)quinolin-4-carboxamida
Ácido BCP		Ácido 1-((benziloxi)carbonil)piperidin-4-óico
AcOEt	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Acetato de etila
AL	-	Artemeter + lumefantrina
ASAQ	-	Artesunato + amodiaquina
ASMQ	-	Artesunato + Mefloquina
ASSP	-	Artesunato + sulfadoxina + pirimetamina
BisMPA		Ácido 2,2- <i>bis</i> (hidroximetil)propiónico

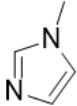
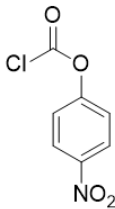
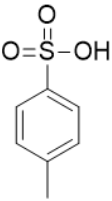
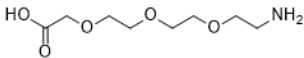
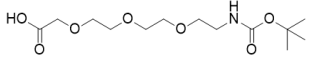
BisMPAP		Ácido 5-metil-2-fenil-1,3-dioxano-5-carboxílico
BLAST	-	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CCD	-	Cromatografia em Camada Delgada
CDMT		2-Cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina
CL	-	<i>Clearance</i>
COMU		Hexafluorofosfato de (1-Ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino- morfolino-carbênio
COSY	-	Espectroscopia de correlação
DBU		1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC		Dicicloexilcarbodiimida
DCM	CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DCU		Dicicloexiluréia

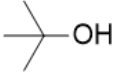
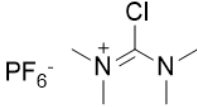

DDD107498		6-fluor-2-(4-(morpholinometil)fenil)-N-(2-(pirrolidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
DHA		Diidroartemisinina
DHAB		3,6,9-trimetildecaidro-12H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-i]isocromen-10-il 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato
DHABP		3,6,9-trimetildecaidro-12H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-i]isocromen-10-il 5-metil-2-fenil-1,3-dioxane-5-carboxilato
DHANPC		4-nitrofenil (3,6,9-trimetilidodecaidro-3,12-metanonafto[8a,1-c][1,2]dioxepin-10-il) carbonato
DHAP	-	Diidroartemisinina + piperaquina
Di-Boc		Dicarbonato de di-terc-butila
DIPEA		N,N-Diisopropiletilamina

DMAP		4-dimetilaminopiridina
DMF	$(\text{CH}_3)_2\text{NCH}$	Dimetilformamida
DMSO	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	Dimetilsulfóxido
DNDi	-	<i>Drugs for Neglected Disease initiative</i>
EC ₅₀	-	Concentração efetiva 50% máxima
EDC		<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDU		1-(3-(dimetilamino)propil)-3-etiluréia
EtOH	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Etanol
Et ₃ N		Trietilamina
FACT	-	Consórcio de Terapias de Dose Fixa de Combinação Baseadas em Artesunato
HATU		Hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinium 3-oxide
Hep-12	-	Dodecâmero de heparina
HIV	-	Vírus da imunodeficiência humana
HMBC	-	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta performance
HSQC	-	Correlação heteronuclear simples quântica

HOBt		Hidroxi-benzotriazol
IC ₅₀	-	Concentração inibitória 50% máxima
IV	-	Infravermelho
J	-	Constante de Acoplamento
LCMS	-	Cromatografia líquida - espectrômetria de massas
LC-MS/MS	-	Cromatografia líquida associada a espectrômetro de massas em tandem
LTD	-	Domínios de ligação do tipo Duffy
M5717		6-fluor-2-(4-(morpholinometil)fenil)-N-(2-(pirrolidin-1-il)etil)quinolin-4-carboxamida
MeCN	CH ₃ CN	Acetonitrila
MeOH	CH ₃ OH	Metanol
MQB		<i>terc</i> -butil 2-((2,8- <i>bis</i> (trifluorometil)quinolin-4-il)(hidroxi)metil)pi peridina-1-carboxilato
MQBis		1-(2-((2,8- <i>bis</i> (trifluorometil)quinolin-4-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)-3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropa n-1-ona

MQBP		2-((2,8- <i>bis</i> (trifluorometil)quinolin-4-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)(5-metil-2-fenil-1,3-dioxan-5-il)metanona
MQBS		Ácido 4-((2,8- <i>bis</i> (trifluorometil)quinolin-4-il)(1-(<i>tert</i> -butoxica rbonil)piperidin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico
MQMS		4-((S)-2-((R)-((2,8- <i>bis</i> (trifluorometil)quinolin-4-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)-4-oxobutanoato de metila
MQSuc		Ácido 4-((S)-2-((R)-((2,8- <i>bis</i> (trifluorometil)quinolin-4-il)(hidroxi)metil)piperidin-1-il)-4-oxobutanóico
NBS		N-bromosuccinimida
NCBI	-	National Center for Biotechnology Information

NMI		N-metilimidazol
<i>p</i> -NPC		4-nitrofenilcloroformato
<i>p</i> -TSA		Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
P.f.	-	Ponto de fusão
PAMAM	-	Dendrímero de oliamidoamina
PDB	-	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	-	Poli(etil)enoglicol
PEG3		Ácido 2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)acético
PEG3-boc		Ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadeca n-16-óico
PfeFF2	-	<i>Plasmodium falciparum elongation factor 2</i>
PfEMP1	-	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
pH	-	Potencial Hidrogeniônico
PNUD	-	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PvTRAg	-	<i>P. vivax tryptophan-rich antigens</i>
R _f	-	Fator de retenção
RIRC	-	Regiões interdomínios ricas em cisteína
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	-	<i>Root mean square deviation</i>

RMSF	-	<i>Root mean square fluctuation</i>
SP	-	Sulfadoxina + pirimetamina
<i>t</i> -BuOH		<i>tert</i> -butanol
T.A.	-	Temperatura Ambiente
TCA	-	Terapia combinada baseada em artemisinina
TCFH		hexafluorofosfato de cloro-N,N,N',N'-tetrametil-formamidínio
TDR	-	Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais
THF		Tetraidrofurano
TM-score	-	<i>Template modeling score</i>
TR	-	Tempo de retenção
trRosetta	-	<i>transform-restrained Rosetta</i>
UHPLC	-	Cromatografia líquida de ultra alta performance
UoD	-	Universidade de Dundee
UPLC-MS/MS	-	Cromatografia líquida de ultra performance associada a um espectrômetro de massas em tandem
UNICEF	-	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UV	-	Ultravioleta
WCAIR	-	<i>Wellcome Centre for Anti-Infectives Research</i>
WHO	-	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Malária e epidemiologia

A malária é uma doença parasitária potencialmente fatal presente em 89 países e causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. O protozoário é transmitido pela picada de fêmeas previamente infectadas do gênero *Anopheles* e estima-se que, em 2018, 228 milhões de pessoas tenham sido infectadas. Também é estimado que 3 bilhões de pessoas estejam sob o risco de infecção. A Figura 1 apresenta os países e o *status* da malária em 2018. Desse número, 405 mil casos foram fatais, resultando em mortalidade de aproximadamente duas pessoas a cada mil infectadas (WHO, 2019; WHO, 2020a; WHO, 2020b).

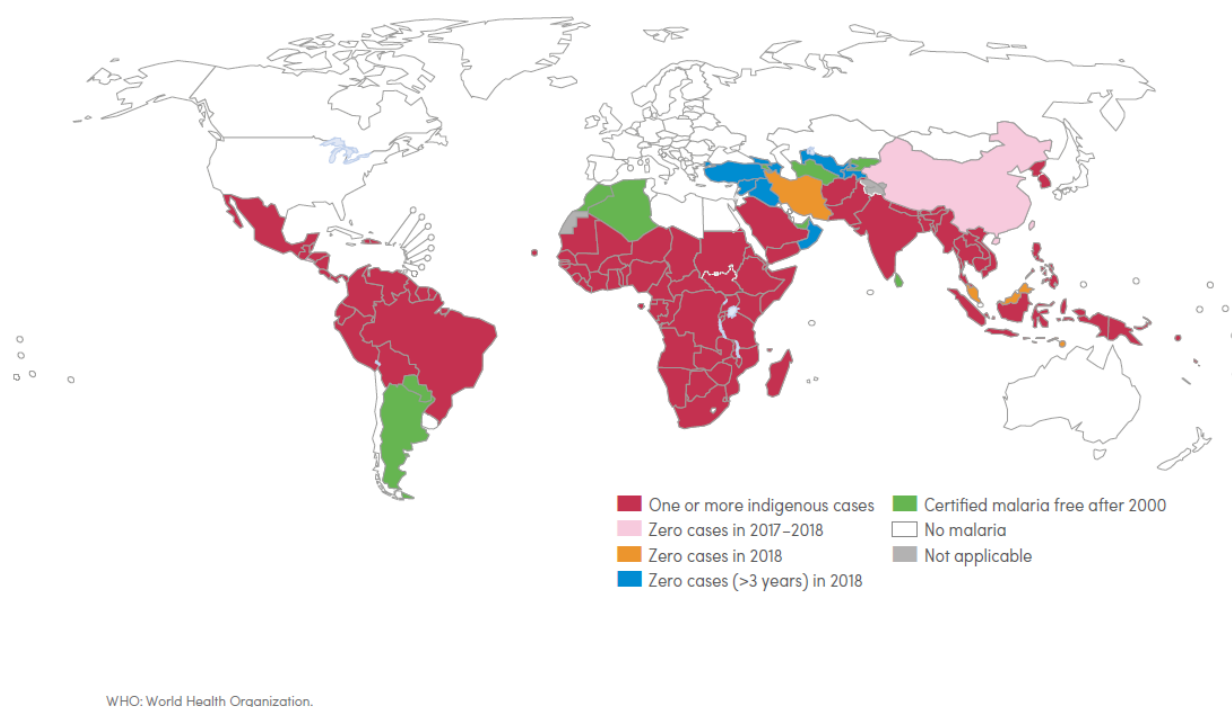


Figura 1: Distribuição da malária e *status* dos países afetados em 2018. Fonte: WHO, 2019.

A malária em humanos é causada por cinco espécies do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. A espécie *P. falciparum* causa a forma mais grave da malária, sendo aquela que apresenta maior mortalidade e virulência. Seu tratamento deve ser iniciado dentro de 24 h do aparecimento de sintomas, sendo que atrasos podem aumentar a mortalidade. As outras espécies levam a quadros de malária com menor mortalidade, porém de morbidade também significativa. Desde 2004, o número de casos de malária grave e mortalidade associados ao *P. vivax* é crescente, sendo que este parasita está presente em países cuja população totaliza 2,8 bilhões de pessoas. O *P. knowlesi* é endêmico de regiões de floresta tropical no sudeste asiático, onde há a presença de macacos das

espécies *Macaca fascicularis* e *Macaca nemestrina*. Sua transmissão é exclusivamente zoonótica. (SNOUNOU et al., 1993; WHO, 2020c; RAHIMI et al., 2014.; WHITE, 2008).

Os parasitas do gênero *Plasmodium* atingem os eritrócitos humanos e podem chegar à contagem total de 10^{13} parasitas na corrente sanguínea, sendo que as infecções sintomáticas costumam apresentar contagens entre 10^7 e 10^{12} . Inicialmente, a picada do mosquito *Anopheles* infectado introduz o *Plasmodium* na corrente sanguínea humana sob a forma de esporozoíta. Os esporozoítas migram para o fígado pela corrente sanguínea e invadem os hepatócitos, se diferenciando em merozoítas e se multiplicando por mitose. No caso de infecção por *P. malariae* ou *P. vivax*, merozoítas podem se diferenciar em hipnozoítas no fígado, como forma latente capaz de causar novos quadros de malária mesmo após a resolução dos sintomas. Em seguida, há a liberação para a corrente sanguínea e a invasão dos eritrócitos. Assim, inicia-se a reprodução assexuada do parasita com a diferenciação dos merozoítas para trofozoítas e, posteriormente, em esquizontes, sendo que a replicação gera novos merozoítas, os quais podem reiniciar o ciclo de infecção dos eritrócitos. O quadro clínico de uma pessoa infectada por malária se dá durante o ciclo assexuado do parasita na corrente sanguínea. O esquema do ciclo encontra-se na Figura 2 (COWMAN, CRABB, 2006; NOSTEN, WHITE, 2007; COWMAN et al., 2016; SICILIANO, ALANO, 2015).

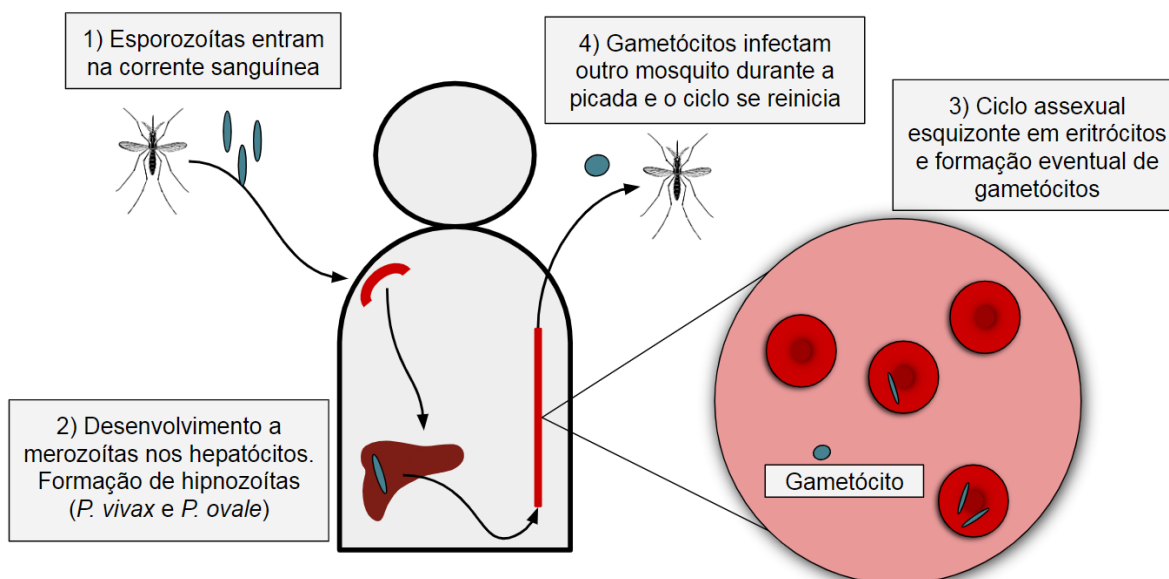


Figura 2: Ciclo biológico simplificado da malária.

1.2. Quimioterapia da malária

O primeiro fármaco utilizado para o tratamento de malária foi a quinina, que era extraída da casca da planta *Cinchona calisaya*. Durante as tentativas de síntese da quinina em laboratório, chegou-se ao corante azul de metileno, utilizado na indústria têxtil e com potencial antimalárico, o que levou ao desenvolvimento das 4-aminoquinolinas e das 8-aminoquinolinas,

que foram importantes fármacos para o tratamento da malária. Dentre as 4-aminoquinolinas, temos a cloroquina (principal fármaco da classe), amodiaquina e piperaquina. A classe das 8-aminoquinolonas é representada pela primaquina e pela tafenoquina, recentemente aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FRAMPTON, 2018). Outros fármacos derivados da quinina incluem a mefloquina, a halofantrina e a lumefantrina. Outra opção de tratamento para a malária são os antifolatos, como a combinação sulfadoxina-pirimetamina (SP). Esse tipo de fármaco foi menos empregado em função da alta eficácia dos derivados de quinina à época (MEDICINES FOR MALARIA VENTURE, 2017; HOBBS e DUFFY, 2011; CHEN 2014). A estrutura dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária encontra-se na Figura 3.

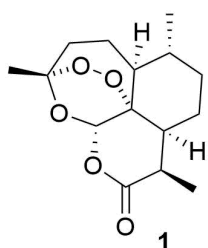
A artemisinina foi extraída de ervas medicinais chinesas e isolada pela primeira vez em 1972, por uma colaboração multicêntrica na China. Ela e seus derivados são fármacos antimaláricos capazes de reduzir significativamente e rapidamente a parasitemia (redução de até 10^4 vezes na contagem de parasitas em cada ciclo de reprodução assexuada), levando à supressão dos sintomas. Seu tempo de ação é reduzido, com meia-vida de aproximadamente 1 h, o que leva ao seu emprego com outros fármacos de maior tempo de ação, eliminando os parasitas restantes e diminuindo a ocorrência de resistência à artemisinina. Esse tipo de intervenção é denominado terapia combinada baseada em artemisinina (TCA) (GOGTAY et al., 2013; NOSTEN, WHITE, 2007; WHO, 2015; MEDICINES FOR MALARIA VENTURE, 2017; WHITE, HIEN, NOSTEN, 2015; LI, 2012).

Em função de sua maior potência, a diidroartemisinina e seus derivados vêm sendo usados em substituição à artemisinina. Os derivados artemeter, arteeter (artemotil) e artesunato são todos convertidos *in vivo* a diidroartemisinina (DHA). Esses fármacos possuem alta eficácia contra todas as espécies de *Plasmodium* e demonstraram redução da mortalidade em casos de malária grave (NOSTEN, WHITE, 2007).

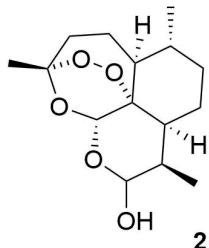
O mecanismo de ação da artemisinina e seus derivados envolve o endoperóxido presente na molécula. No parasita, a ligação entre os oxigênios é quebrada principalmente por ferro em grupos heme oriundos do catabolismo de hemoglobina. Formam-se, então, radicais livres que são capazes de alquilar diversas proteínas e, conseqüentemente, induzem a morte do *Plasmodium*. Ainda não há consenso sobre o exato radical formado e os principais alvos de alquilação responsáveis pela morte celular (O'NEILL, BARTON, WARD, 2010; WANG et al. 2015; ISMAIL et al., 2016; WANG et al., 2019).

As 4-aminoquinolinas, por sua vez, impedem a polimerização de hematina a hemozoína no parasita, levando ao seu acúmulo intracelular. A hematina é originada no processo de digestão celular da hemoglobina, sendo uma molécula reativa com um grupo heme livre e capaz de inibir enzimas e distorcer a membrana do parasita (CORTOPASSI et al., 2011; AGUIAR et al., 2012). As 8-aminoquinolinas são ativas contra formas hepáticas do *Plasmodium*, inclusive hipnozoítas. A atividade da primaquina é dependente de sua hidroxilação no fígado, levando à formação de espécies tóxicas ao parasita. No caso da tafenoquina, a metabolização talvez não seja relevante para a atividade hepática. Além disso, 8-aminoquinolinas apresentam reduzida atividade em formas eritrocíticas da malária, sendo

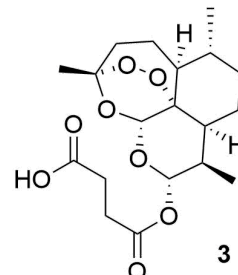
que o mecanismo de ação não é bem estabelecido (DOW, SMITH, 2017; MCQUEEN et al., 2017; PYBUS et al., 2013; ST JEAN et al., 2016). Por fim, sulfadoxina e pirimetamina são moléculas que interrompem o metabolismo de folato no parasita pela inibição das enzimas diidropteroato sintase e diidrofolato redutase, respectivamente, o que ocasiona morte celular (YUTHAVONG, 2002; GREGSON, PLOWE, 2005).



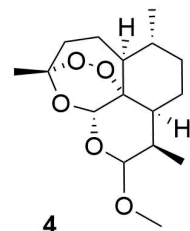
Artemisinina



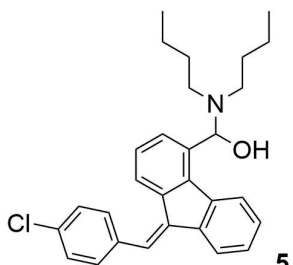
Diidroartemisinina



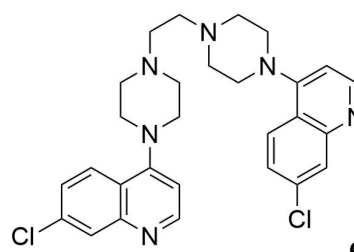
Artesunato



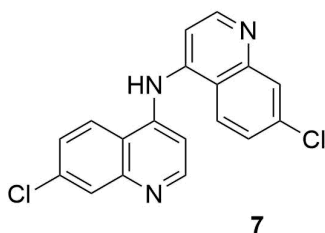
Artemeter



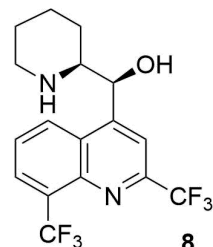
Lumefantrina



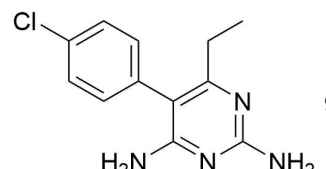
Piperaquina



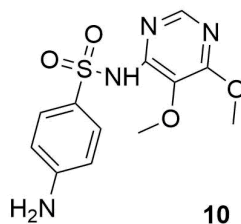
Amodiaquina



Mefloquina



Pirimetamina



Sulfadoxina

Figura 3: Principais fármacos utilizados no tratamento da malária como componentes de TCAs (terapias combinadas de artemisinina).

1.2.1. Terapias combinadas de artemisinina e novas terapias combinadas

As combinações recomendadas pela WHO se mostram altamente eficazes e seguras para o tratamento da malária. A eficácia das TCAs é determinada pelos fármacos administrados em conjunto com o derivado de artemisinina. Atualmente, as TCAs recomendadas pela WHO incluem artesunato + mefloquina (ASMQ), artemeter + lumefantrina (AL), diidroartemisinina + piperquina (DHAP), artesunato + SP (ASSP) e artesunato + amodiaquina (ASAQ). Cabe ressaltar que ASSP e ASAQ são excluídas de algumas localidades, devido ao surgimento de parasitas resistentes ao fármaco de combinação. (GOGTAY et al., 2013; NOSTEN, WHITE, 2007; WHO, 2015).

Para *P. falciparum*, TCAs são aceitas como os melhores tratamentos em função de sua velocidade e eficiência. Em relação a *P. vivax*, a WHO também recomenda o uso de TCAs, assim como monoterapia de cloroquina em regiões em que o parasita ainda é suscetível. Entretanto, comparando-se TCA em relação à monoterapia de cloroquina, observa-se maior velocidade de eliminação do parasita no sangue periférico e a mesma eficácia ao evitar parasitemias recorrentes. A TCA não possui efeito sobre os hipnozoítas formados durante o ciclo deste parasita, o que explica a mesma eficácia desse tipo de terapia, quando comparada às terapias pré-existentes quanto à proteção a parasitemias recorrentes. Para a eliminação de hipnozoítas, recomenda-se o uso de uma 8-aminoquinolina, como tafenoquina ou primaquina, associada ao uso de uma TCA. (GOGTAY et al., 2013; NOSTEN, WHITE, 2007; WHO, 2015; ASHLEY, RECHT, WHITE, 2014; HOUNKPATIN, KREIDENWEISS, HELD, 2019)

ASMQ na forma de dose fixa foi desenvolvida, em 2002, pelo Consórcio de Terapias de Dose Fixa de Combinação Baseadas em Artesunato (sigla em inglês: FACT), o qual foi criado pelo *Drugs for Neglected Disease initiative* (DNDi) e o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR). O DNDi é um consórcio formado por 5 instituições do setor público - Fundação Oswaldo Cruz, Conselho Indiano para Pesquisa Médica, Instituto de Pesquisa Médica do Quênia, Ministério da Saúde da Malásia e o Instituto Pasteur da França -, a organização humanitária Medicina Sem Fronteiras e o TDR, parceria entre o Banco Mundial, a WHO, o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) (VSANTELL et al., 2012; DNDi, 2019).

Sua produção foi inicialmente conduzida pela Farmanguinhos/Fiocruz. Combinações em dose fixa possuem a vantagem de reduzir o uso potencial de monoterapias, além de envolver menor número de comprimidos a serem ingeridos, o que aumenta a aderência ao tratamento. ASMQ em dose fixa se mostrou altamente eficaz em regiões da Índia com *Plasmodium* resistente à cloroquina. Além disso, um estudo no Brasil trouxe evidências para o lançamento de ASMQ em dose fixa em escala nacional (VSANTELL et al., 2012; VALECHA et al., 2013).

ASMQ em dose fixa possui duas apresentações, ambas na forma de comprimido, porém variando-se a dose administrada. O comprimido de baixa dose é composto por 25 mg de artesunato e 55 mg de cloridrato de mefloquina, o que corresponde a uma dose de 50 mg de mefloquina básica. A posologia do medicamento consiste em um a dois comprimidos ingeridos uma vez por dia por um período de três dias consecutivos. O medicamento pode ser usado em crianças de até 6 meses de idade, quando utilizado um comprimido na apresentação de menor dose. Assim, o medicamento atende às necessidades de crianças, que são as principais afetadas pela malária (VSANTELL et al., 2012).

Outra combinação em dose fixa desenvolvida pelo DNDi é a de artesunato e amodiaquina (ASAQ). Ambos os fármacos foram escolhidos em função da eficácia apresentada em relação à monoterapia de amodiaquina, quando utilizados em *blisters* contendo um comprimido de cada. O comprimido de dose fixa foi desenvolvido com o intuito de evitar que os fármacos no *blister* fossem tomados na forma de monoterapia por erros na administração. Assim, em parceria com a empresa farmacêutica Sanofi, os comprimidos passaram a ser produzidos utilizando-se uma proporção de artesunato:amodiaquina de 1:2,7, sendo essa proporção bem aceita à época do desenvolvimento. A dose é estratificada por peso e idade (NDIAYE et al., 2009).

Um ensaio clínico multicêntrico, randomizado e cego para os investigadores determinou a eficácia de ASAQ em dose fixa, quando comparado à combinação de artemeter e lumefantrina, também utilizados na forma de dose fixa, para o tratamento de malária causada por *P. falciparum* e sem complicações. A formulação nova, utilizando-se a posologia de uma dose ao dia durante três dias, apresentou eficácia comparável à antiga, além de ser bem tolerada. Assim, o estudo concluiu que a combinação ASAQ em dose fixa é uma alternativa eficaz e segura para o tratamento de malária por *P. falciparum* (NDIAYE et al., 2009).

As duas combinações apresentadas são as mais recentes desenvolvidas pelo DNDi (Portfolio DNDi, 2019).

Além das TCAs tradicionalmente utilizadas, novos fármacos também estão sendo desenvolvidos para o tratamento da malária, como o M5717 (DDD107498 - referenciado como 498 para esta tese), que consiste em uma 4-carboxamidoquinolina desenvolvida na *Drug Discovery Unit* (DDU) da Universidade de Dundee - UoD (Reino Unido) (BARAGAÑA et al, 2015; BARAGAÑA et al, 2016). A molécula possui eficácia contra diferentes estágios do parasita e perfil de seletividade, de farmacocinética e de segurança favoráveis, com potencial para ser usada em um esquema de dose única contra malária. Seu efeito se deve pelo bloqueio da síntese proteica do parasita através da inibição do fator de alongação 2 do *P. falciparum* (PfeEF2) (BARAGAÑA et al, 2016) e ensaios clínicos preliminares mostraram a eficácia contra diferentes espécies do parasita e tolerabilidade do composto, que se mostrou promissor (MCCARTHY et al., 2021). Além disso, foi sugerido seu uso em combinação com o fármaco pironaridina, para uma diminuição mais rápida da parasitemia (MCCARTHY et al., 2021). Assim, evidencia-se uma nova possível opção terapêutica para o tratamento da malária,

sendo que a combinação em questão encontra-se listada no *pipeline* do instituto *Medicines for Malaria Venture*.

1.2.2. Resistência aos antimaláricos

A resistência de *P. falciparum* aos principais fármacos historicamente utilizados no seu tratamento (cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina) está presente na maioria dos países tropicais em que a doença ocorre e levou ao reaparecimento da malária em países onde ela havia sido erradicada, além do aumento na mortalidade da doença. Relatos de *P. vivax* resistente à cloroquina, primaquina, mefloquina e SP também já foram feitos em diversas regiões. Movimentações populacionais também são responsáveis pela dispersão de variantes resistentes por diversas regiões do mundo. Assim, a resistência dos parasitas aos fármacos empregados atualmente ameaça a possibilidade de contenção da doença, além de aumentar a sua mortalidade. A movimentação de parasitas resistentes é ilustrada na Figura 4 (NOSTEN, WHITE, 2007; ANTONY, PARIJA, 2016; BLOLAND, 2001).

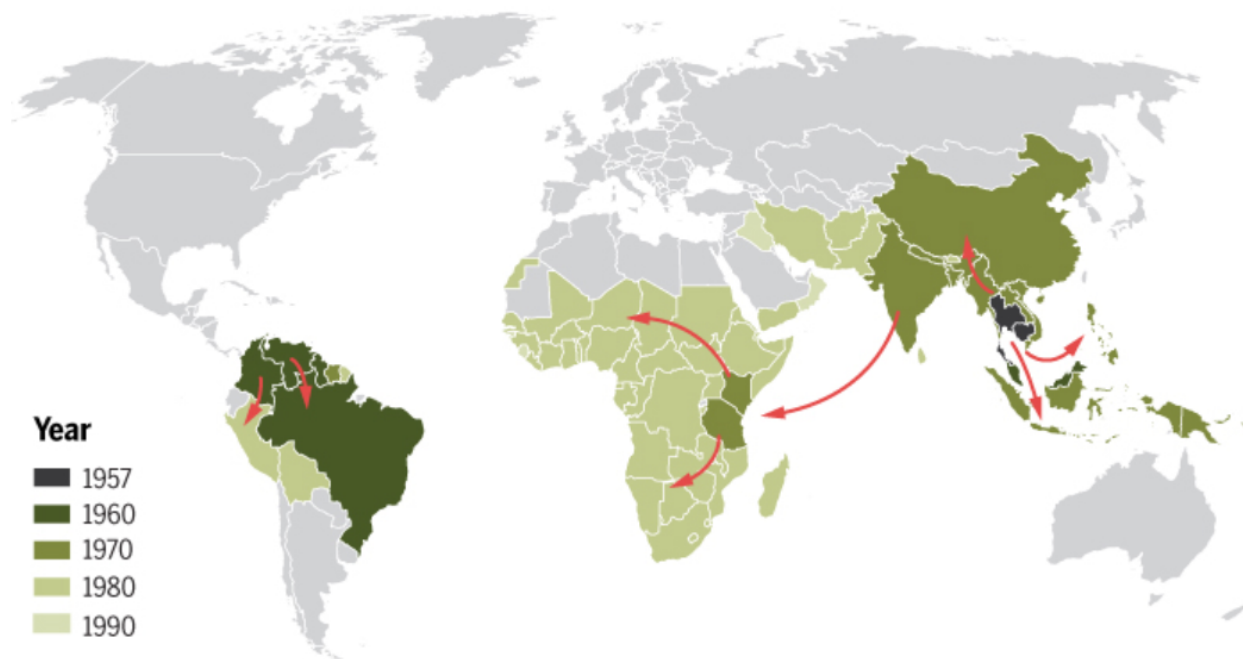


Figura 4: Mapa da época de aparição e movimentação de parasitas resistentes à cloroquina. Fonte: ROBERTS, 2016.

Utilizando-se por base os princípios da combinação de fármacos para outras doenças como tuberculose, HIV e certos tipos de câncer, é possível constatar a vantagem de se usar combinações de fármacos com mecanismos de ação distintos para o combate à resistência. Assim, assumindo-se mecanismos de resistência distintos para cada fármaco, constata-se que a probabilidade de um parasita desenvolver resistência a ambos os fármacos durante a mitose é igual ao produto da probabilidade de ser desenvolvida resistência a um deles. Utilizando-se o valor de 1 a cada 10^{12} parasitas para a probabilidade de se desenvolver resistência a um

fármaco (maior probabilidade já registrada), tem-se que 1 a cada 10^{24} parasitas desenvolveriam resistência para a combinação. Utilizando-se uma parasitemia de 10^{13} (parasitemia máxima) por pessoa infectada e $2,28 \cdot 10^8$ pessoas infectadas por ano, o número total de parasitas ao longo de um ano é inferior a 10^{22} e, portanto, inferior ao número estimado de parasitas necessários para o aparecimento de uma célula com resistência aos dois fármacos na combinação (NOSTEN, WHITE, 2007).

Dessa forma, o uso de TCAs é uma importante ferramenta para evitar o aparecimento de parasitas resistentes, sendo que o uso da artemisinina em combinação com outro fármaco auxilia a impedir que a resistência fármaco seja selecionada. Entretanto, em regiões do sudeste asiático, relatos de *P. falciparum* resistentes a derivados de artemisinina já foram feitos. Isso foi notado após aumentos no tempo de eliminação dos parasitas na corrente sanguínea e no número de falhas do tratamento com TCAs. A WHO estabelece um critério temporal entre o tratamento e o reaparecimento de malária para definir falhas de TCA. Se o reaparecimento ocorrer dentro de 28 dias, a combinação utilizada deve ser considerada ineficiente e substituída por uma segunda linha de tratamento e idealmente composta por outra TCA. Caso o reaparecimento ocorra após 28 dias, deve-se considerar o parasita como advindo de uma nova infecção e a terapia utilizada inicialmente pode ser utilizada novamente (WHO, 2015; WOODROW, WHITE, 2017; NOSTEN, WHITE, 2007).

O surgimento de resistência aos antimaláricos aumenta a pressão para estratégias de se combater a dispersão desses parasitas a outras regiões e desenvolver fármacos que possam ser efetivos (NOSTEN, WHITE, 2007; BLOLAND, 2001; THU et al., 2017; ANTONY, PARIJA, 2016; WOODROW, WHITE, 2017).

1.3. Alvos moleculares em eritrócitos infectados

Eritrócitos infectados por *P. falciparum* são capazes de se ligar a células endoteliais e em vênulas pós-capilares, além de eritrócitos não infectados, formando rosetas, e podem se ligar a outros eritrócitos infectados por intermédio de plaquetas. Essa aderência se dá pela proteína *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1), a qual se liga a diferentes proteínas e glicosaminoglicanos. Essa ligação pode ser usada como base para o direcionamento de fármacos a eritrócitos infectados (VALLE-DELGADO, URBÁN, FERNÁNDEZ- BUSQUETS, 2013).

Um ligante a eritrócitos infectados consiste na heparina, sendo que estudos de microscopia de fluorescência demonstraram a interação entre esses dois componentes. A interação da heparina se dá com a região *N*-terminal da PfEMP1, a qual é rica em resíduos de lisina. A força de ligação da heparina aos eritrócitos infectados foi determinada como tendo entre 28 e 46 pN, o que se aproxima de interações anticorpo-antígeno (40 a 250 pN) e sugere que baixas concentrações de heparina seriam suficientes para o direcionamento. Além disso, a heparina é um composto barato e de baixa imunogenicidade, o que poderia incentivar seu uso, tendo-se em vista o fato de que a malária é endêmica de regiões com baixo desenvolvimento socioeconômico. O efeito anticoagulante da heparina, que pode resultar em eventos adversos

graves, levou à descontinuação do seu uso na terapia de malária grave. No entanto, heparina despolimerizada, a qual não possui uma atividade anticoagulante, também é capaz de inibir a citoaderência de eritrócitos infectados. Portanto, não há a necessidade de se preservar o efeito anticoagulante para o uso da heparina como grupo diretor. Além da despolimerização, uma forma de reduzir a atividade anticoagulante do fármaco é sua imobilização por ligação covalente em um substrato como sefarose (VALLE-DELGADO, URBÁN, FERNÁNDEZ-BUSQUETS, 2013; VOGT et al., 2006; MIURA et al., 1980).

A PfEMP1 (ilustrada na Figura 5) é uma proteína produzida intracelularmente pelo *P. falciparum* e exportada para a superfície do eritrócito infectado por um mecanismo não completamente elucidado (CRABB, DE KONING-WARD, GILSON, 2010; CHAN, FOWKES, BEESON, 2014). Em sua região extracelular, encontram-se a região *N*-terminal da proteína, domínios de ligação do tipo *Duffy* (LTD) e regiões interdomínios ricas em cisteína (RIRC). A formação de rosetas é associada aos domínios LTD do subtipo 1 α e a heparina inibe a formação de rosetas por ligação a esses domínios. A metilação total das aminas primárias oriundas das lisinas dos LTD1 α na região *N*-terminal leva à redução da afinidade com a heparina, sugerindo a importância desses grupamentos para a interação (JUILLERAT et al., 2010; JUILLERAT et al., 2011; ANGELETTI et al., 2015).

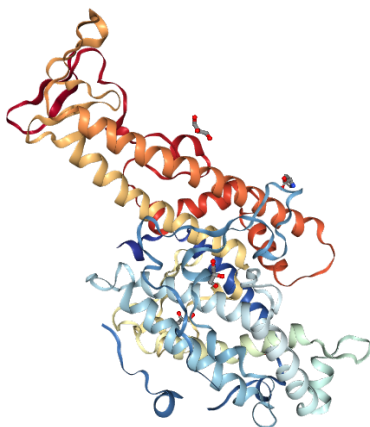
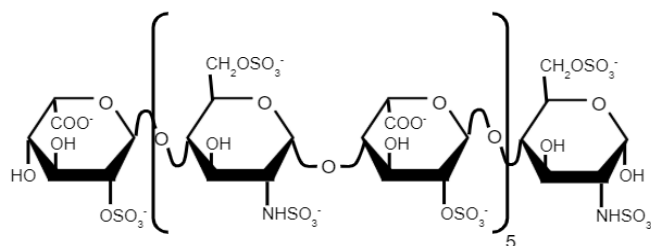


Figura 5: Estrutura cristalina tridimensional da região *N*-terminal do domínio LTD1 α da proteína PfEMP1 da variante varO de *P. falciparum*. Código PDB: 2XU0.

Por sua vez, a heparina é um polímero linear em que se repetem unidades de dissacarídeo. Cada unidade é formada por uma glicosamina e um ácido urônico. Na biossíntese, inicialmente um ácido D-glicurônico é ligado via β_1-4 a uma D-*N*-acetilglicosamina. Em seguida, os dissacarídeos formados são ligados α_1-4 . A molécula é então *N*-desacetilada e *N*-sulfonada (glicosaminas), ocorre a epimerização do ácido glicurônico para idurônico e *O*-sulfonação no carbono 2 do ácido urônico ou carbono 6 da glicosamina, e *O*-sulfonação do carbono 3 da glicosamina. As modificações sofridas pela cadeia inicial não ocorrem de maneira completa, o que leva a variações. Além disso, os métodos de extração e purificação para a obtenção de fármaco colaboram para o aumento do número de variações. Uma possível

estrutura para a molécula contendo 12 unidades de sacarídeo (Hep-12) é representada na Figura 6 (SHRIVER et al., 2012).



11

Figura 6: Possível estrutura para a molécula de derivado da heparina contendo doze unidades de sacarídeo - dodecâmero de heparina (Hep-12).

A atividade anti-roseta da heparina é dependente de seu tamanho e de sua sulfatação. Moléculas de heparina *N*-sulfonadas possuem um maior efeito anti-rosetas do que *O*-sulfonadas ou não sulfonadas e o tamanho mínimo para a inibição de sua formação é de 12 unidades de sacarídeo (BARRAGAN et al., 2000). Utilizando-se métodos de *docking* molecular e modelos computacionais, observou-se que oligossacarídeos de heparina interagem em diversos pontos do LTD1 α e que o aumento de tamanho desses oligossacarídeos levava ao aumento da especificidade da interação, havendo menos soluções possíveis para o *docking*. O experimento variou o tamanho entre dímero e dodecâmero. A cristalização da proteína na presença de oligossacarídeos de heparina não foi possível para tetra e hexassacarídeos, o que é considerado consistente com a baixa especificidade de interação, uma vez que oligossacarídeos ligados em regiões distintas dificultam o empacotamento para formação do cristal. Por meio de ensaios de afinidade (*surface plasmon resonance*), foi estabelecido que o aumento do tamanho do derivado de heparina levava ao aumento na força de ligação. A solução de menor energia para o *docking* do dodecâmero de heparina apresentada pelo estudo é mostrada na Figura 7 (JUILLERAT et al., 2011).

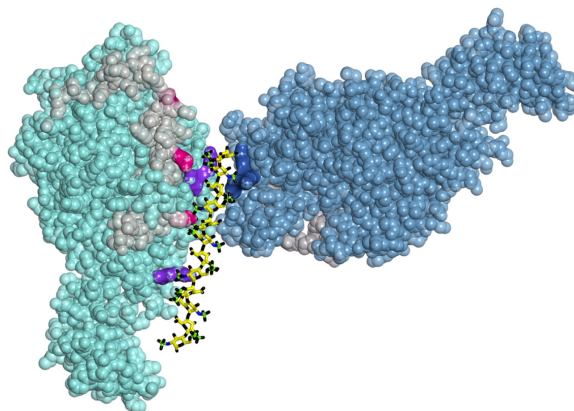


Figura 7: Solução de menor energia associada para o *docking* de heparina contendo 12 unidades de sacarídeo na região *N*-terminal do domínio LTD1 α da proteína PfEMP1 da variante varO de *Plasmodium falciparum*. Fonte: JUILLERAT, 2011.

Heparinas de baixa massa molecular são misturas heterogêneas com suas moléculas variando entre 10^3 e 10^4 Da e obtidas por despolimerização enzimática da heparina não fracionada. A dalteparina é um tipo de heparina de baixa massa molecular e que pode ter seus oligossacarídeos separados, sendo permitida a obtenção de pentassacarídeos a tetradecassacarídeos, todos determinados por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas (LCMS). Tal fato permite a redução na complexidade do produto inicial (BISIO et al., 2017), além de permitir a obtenção de Hep-12, que poderia ser empregada no direcionamento de uma TCA a eritrócitos infectados por *P. falciparum*.

Apesar de a heparina ser um possível grupo diretor para eritrócitos infectados por *P. falciparum* (VALLE-DELGADO, URBÁN, FERNÁNDEZ-BUSQUETS, 2013), sua viabilidade como grupo diretor no caso de malária causada por *P. vivax* ainda não está determinada. Isso se deve ao fato de a espécie *P. vivax* não possuir ortólogos à PfEMP1 (ZHANG et al., 2016), assim, para a utilização de heparina como grupo diretor a eritrócitos infectados por essa espécie, outras proteínas devem ser avaliadas. Em amostras sanguíneas, eritrócitos infectados por *P. vivax* também exibem citoaderência e esta propriedade parece estar associada a proteínas do tipo *P. vivax Tryptophan Rich Antigen* (PvTRAg), que pertencem à família Pv-fam-a (ZEESHAN et al., 2014). Particularmente, em um estudo utilizando *P. falciparum* modificado geneticamente para expressar PvTRAg36.6 e PvTRAg56.2, observou-se que essas duas proteínas eram exportadas para a membrana do eritrócito infectado (TYAGI et al., 2016). Assim, essas duas proteínas estariam disponíveis para a ligação da heparina e são candidatas a alvos moleculares em uma terapia dirigida a eritrócitos infectados por *P. vivax*.

Nesse sentido, uma avaliação da ligação de heparina à PvTRAg36.6 e à PvTRAg56.2 é interessante, pois permitiria determinar se uma terapia dirigida por heparina a eritrócitos infectados por *P. falciparum* também seria dirigida a eritrócitos infectados por *P. vivax*. Nesse sentido, uma vez que os fármacos utilizados no tratamento de *P. vivax* e *P. falciparum* são, essencialmente, os mesmos e que ACTs podem ser usadas em ambos os casos (WHO, 2021; PHILLIPS et al., 2017; TSE, KORSIK, TODD, 2019), melhorias na terapia de malária por conta do direcionamento seriam estendidas às duas espécies.

1.4 Ferramentas computacionais para o desenvolvimento de fármacos

Ferramentas computacionais são frequentemente empregadas durante os estágios iniciais do desenvolvimento de novos fármacos, permitindo a predição de diversas propriedades de uma grande quantidade de candidatos. Vantagens de metodologias *in silico* incluem sua velocidade e o seu baixo custo, quando comparados a métodos tradicionais de avaliação dessas propriedades (BRUNO et al., 2019). Uma dessas ferramentas comumente utilizada é o *docking*, que permite avaliar simulações de interações entre uma proteína de interesse e um ligante (SETHI et al., 2020; PINZI, RASTELLI, 2019).

A estrutura 3D da proteína de interesse é necessária para a realização de um *docking* (SETHI et al., 2020). Dessa forma, para avaliar *in silico* se a heparina seria capaz de se ligar a PvTRAg36.6 e/ou PvTRAg56.2, é necessário determinar a estrutura dessas proteínas, uma vez que nenhum estudo ainda as elucidou. Diferentes metodologias permitem a predição *in silico* da estrutura de proteínas, sendo elas mais rápidas do que determinações experimentais, como cristalografia por raio-X (DENG, JIA, ZHANG, 2018). As formas de predição podem ser divididas em 2 categorias básicas: com molde e sem molde (DENG, JIA, ZHANG, 2018).

Predições com molde se baseiam na comparação da sequência de aminoácidos da proteína de interesse com outras cujas estruturas 3D já foram determinadas experimentalmente (DENG, JIA, ZHANG, 2018; WU, XU, 2021). Uma vez que é esperada similaridade estrutural entre proteínas com sequências semelhantes, é possível construir um modelo da proteína de interesse baseado nas proteínas molde e com o uso de técnicas como mecânica molecular para preencher lacunas de não similaridade entre elas. Os modelos gerados por essa metodologia são considerados precisos e de alta qualidade, porém é evidente a necessidade de proteínas semelhantes com sua estrutura já determinada, o que pode ser um obstáculo (FISER, 2010; DENG, JIA, ZHANG, 2018).

Caso não sejam encontrados moldes, a metodologia que não os emprega (também chamada de *ab initio*) deve ser utilizada (DENG, JIA, ZHANG, 2018; FISER, 2010). Nesse caso, a estrutura 3D da proteína de interesse é construída apenas com base em sua sequência de aminoácidos. Algoritmos de *machine learning* são comumente empregados, os quais utilizam bases de dados com proteínas de estrutura conhecida para o aprendizado, além do uso de funções de energia e campos de força (DENG, JIA, ZHANG, 2018; KUHLMAN, BRADLEY, 2019).

Por fim, estudos de dinâmica molecular também podem ser utilizados para observar como uma proteína e um ligante interagem ao longo do tempo e, assim, avaliar a estabilidade da ligação. Dessa forma, os resultados de um *docking* podem ser complementados. Os *softwares* empregados para dinâmicas moleculares utilizam princípios de mecânica quântica e mecânica clássica para calcular as forças às quais cada átomo do sistema está submetido e, a partir disso, prever seu movimento em um determinado intervalo de tempo (SALMASO, MORO, 2018; HOLLINGSWORTH, DROR, 2018).

Assim, para determinar se a heparina também poderia ser utilizada no direcionamento de TCAs a eritrócitos infectados por *P. vivax*, seria interessante a construção de modelos tridimensionais da PvTRAg36.6 e da PvTRAg56.2. A partir deles, ensaios de *docking* e dinâmica molecular com derivados de heparina podem ser realizados.

1.5. Latenciação e nanotransportadores dendriméricos

Latenciação é um método de modificação molecular utilizado para obter derivados de fármacos que liberam os fármacos originais após ação química e/ou enzimática. Por esse método, pode-se obter pró-fármacos, em que um fármaco, pelo conceito geral, é ligado a um transportador, resultando em forma inativa, que é ativada após conversão *in vivo*, conforme

apresentado na Figura 8. A ativação pode se dar antes, durante ou após a absorção, podendo ser, inclusive, na região alvo de ação. Esta estratégia permite que características físico-químicas, biofarmacêuticas e farmacocinéticas de compostos ativos sejam melhoradas e envolve várias classes de formas latentes, incluindo os fármacos dirigidos de alta seletividade. (DIGENIS, SWINTOSKY, 1975; SILVA et al., 2005; CHUNG et al., 2005; ZAWILSKA, WOJCIESZAK, OLEJNICZAK, 2013; HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011).

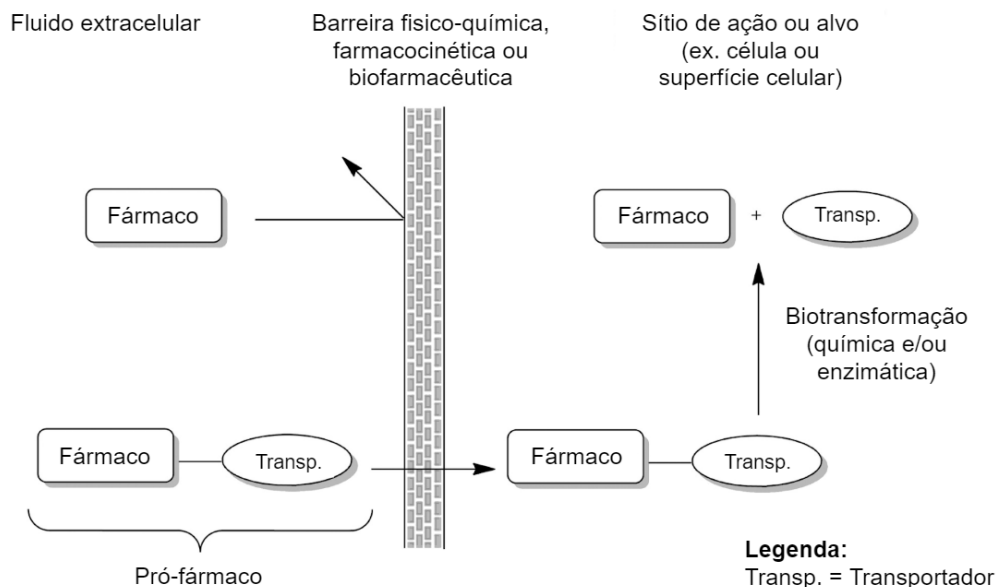


Figura 8: Esquema representando o conceito de pró-fármacos, explicitando o processo de biotransformação para a liberação de um fármaco. Fonte: HUTTUNEN, RAUNIO E RAUTIO, 2011.

Dendrímeros são uma classe de materiais poliméricos que podem ser empregados como transportadores de fármacos. São polímeros ramificados monodispersos com estrutura química bem definida. Possuem um centro iniciador (núcleo), com unidades de repetição radialmente ligadas (camadas interiores), que, por sua vez, são ligadas a uma unidade final de terminação e localizada na sua parte exterior. Cada camada de unidades de repetição adicionada é designada como uma nova geração a partir da geração 0, composta pelo núcleo (BASAVARAJ, et al., 2009; FLEIGE, QUADIR, HAAG, 2012; YOUSEFI, NARMANI, JAFARI, 2020).

Dois são os principais métodos para a síntese de dendrímeros. O primeiro consiste no método divergente, em que o crescimento da estrutura parte de um núcleo. O segundo método de síntese é o convergente, em que se parte do que será a superfície da molécula final em direção ao núcleo. Nesse segundo processo, é formado um dendron, que consiste em um dos ramos do dendrímero final, sendo necessária a união dos dendrons em um mesmo núcleo para a formação de um dendrímero. O método divergente é atualmente a rota preferida para a produção comercial de dendrímeros, enquanto o método convergente possui as vantagens de

formar menos reações paralelas à principal, a de possuir maior controle da massa molecular do produto e a de permitir a obtenção de produtos com grupamentos de interesse em posições e números exatos (BASAVARAJ et al., 2009; ESFAND, TOMALIA, 2001; YOUSEFI, NARMANI, JAFARI, 2020).

Devido a seu baixo tamanho e a sua baixa polidispersidade, são transportadores viáveis de fármacos, pois podem ultrapassar membranas celulares e possuem grupos químicos que permitem a funcionalização. Possuem, também, uma estrutura globular, o que mimetiza certas proteínas, lipossomos e micelas, sendo, portanto, um material biomimético. Modificações estruturais do dendrímero com adição de grupos polares ou apolares permitem aumentar a hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade, respectivamente, do composto. Além disso, podem auxiliar na redução de efeitos adversos e no aumento do tempo de meia-vida de fármacos lábeis (BASAVARAJ et al., 2009; ESFAND, TOMALIA, 2001; YANG, KAO, 2006; YOUSEFI, NARMANI, JAFARI, 2020).

A presença de mais de um grupo terminal em dendrímeros é uma característica desejável quando objetiva-se combinar diferentes propriedades em uma mesma molécula. Diferentes grupos terminais podem ser adicionados de maneira precisa em determinados pontos do dendrímero ou adicionados de maneira não ordenada e com base na probabilidade de ligação dos grupos terminais ao dendrímero. Quando um dendrímero possui duas metades distintas, seja em tamanho ou tipo de grupos terminais, corriqueiramente denomina-se como sendo um dendrímero de Janus. Sua síntese é normalmente realizada pela união de dois dendrons diferentes, podendo ser realizada uma ligação covalente entre eles ou com o auxílio de outra molécula como núcleo. Também é possível realizar um novo crescimento divergente a partir de um dendron já formado. (CAMINADE et al., 2012).

Dendrímeros podem ser conjugados com fármacos via diferentes métodos, sendo que a ligação de fármacos aos grupos terminais de dendrímeros permite a síntese de pró-fármacos dendriméricos. Nesse contexto, dendrímeros atuam como transportadores, podendo ultrapassar barreiras de interesse (como a hematoencefálica) e podendo carregar mais de uma molécula bioativa. Também podem atuar melhorando características farmacocinéticas, como aumento da biodisponibilidade oral de compostos pouco hidrofílicos. Além disso, podem aumentar a seletividade de um fármaco através do uso de moléculas diretoras da ação, que possuam maior afinidade com a célula de interesse (SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016).

A síntese de dendrímeros com unidades de repetição formadas a partir de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiônico (*BisMPA*) pelo método divergente é possível e já foi realizada previamente pelo nosso grupo de trabalho. Nessa síntese, inicialmente os grupos hidroxila do *BisMPA* são protegidos com dimetilacetal benzaldeído na presença de ácido toluenossulfônico e acetona, sendo que o anidrido da molécula protegida é obtido em uma reação posterior. Essa proteção impede que reações paralelas ocorram com esses grupos, permitindo que eles permaneçam disponíveis para o crescimento do dendron. Em seguida, ao anidrido, foi adicionado um núcleo podendo ser composto por propanodiamina, butanodiamina ou hexanodiamina. A proteção inserida inicialmente foi retirada por hidrogenólise da molécula com

catalisador de paládio em carbono (Pd/C). A partir de então foi possível seguir com o crescimento do dendron e ligação com grupos de interesse na camada de externa (terminação) (SANTOS, 2016).

Além disso, dendrímeros de alta geração formados a partir de *Bis*MPA são biocompatíveis, não se acumulando em tecidos e sendo rapidamente depurados pela corrente sanguínea (estudo realizados em ratos). Também se demonstrou boa compatibilidade *in vitro* de dendrímeros de *Bis*MPA em relação a sua toxicidade, quando testados contra células humanas. Assim, essa construção de dendrímero pode ser adequada para utilização *in vivo* e para o desenvolvimento de novas formulações (FELIU et al., 2016).

Outra construção viável de dendrímeros é representada pela poliamidoamina (PAMAM), que possui um núcleo diamínico com ramificações de amidoamina, cujo final da cadeia pode ser grupos amina ou carboxila, permitindo ligações de diversos grupos terminais. São moléculas altamente hidrofílicas por conta de seus grupos funcionais e já foram empregadas para encapsulamento ou ligação a diferentes fármacos, permitindo o seu direcionamento e redução da toxicidade. No entanto, a biocompatibilidade de dendrímeros PAMAM é baixa em função da citotoxicidade causada por cargas positivas de grupos amina na superfície da estrutura, sendo que um maior número de gerações leva ao aumento da toxicidade. Em função de sua carga negativa, a heparina permite uma redução da toxicidade dos dendrímeros PAMAM (THANH et al., 2018; ARTETA et al., 2014).

1.5.1. Dendrímeros dirigidos

A heparina pode ser utilizada como grupo diretor, sendo possível imobilizá-la em diferentes substratos, seja através de adsorção ou ligações covalentes. A ligação covalente de heparina a copolímeros vinílicos já se demonstrou possível pela utilização de grupos espaçadores consistindo em um cloreto de acila (cloreto de adipoila) ou um cianato (diisocianato de hexametileno). A heparina possui grupos hidroxila e ácidos carboxílicos em sua estrutura e esses grupos podem ser utilizados para a formação de ésteres. Assim, a utilização desses grupos funcionais poderia ser viável para a ligação da heparina a um dendron para a formação de um dendrímero (MURUGESAN, XIE, LINHARDT, 2008; MARCONI, BENVENUTI, PIOZZI, 1997).

O direcionamento de fármacos é uma possível ferramenta para permitir concentrações suficientemente altas do fármaco na região onde o parasita está presente, aumentando a eficácia, além da seletividade. Diferentes estudos mostraram a diminuição da concentração inibitória 50% (IC_{50}) do parasita, empregando-se nanotransportadores para fármacos já existentes. Além disso, a estratégia de latenciação poderia aumentar o tempo de meia-vida de derivados de artemisinina, aumentando o tempo de contato do parasita com estes fármacos. Assim, e uma vez que dendrímeros são uma alternativa viável e com diversas funcionalidades para a formação de pró-fármacos, dendrímeros carregando fármacos usados em TCAs e direcionados para eritrócitos infectados por *Plasmodium* por meio de heparina podem

apresentar melhor eficácia e perfil farmacocinético, comparativamente aos tratamentos atuais (SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016; MARQUES et al., 2017).

2. OBJETIVOS, PLANEJAMENTO E EXPERIMENTOS REALIZADOS

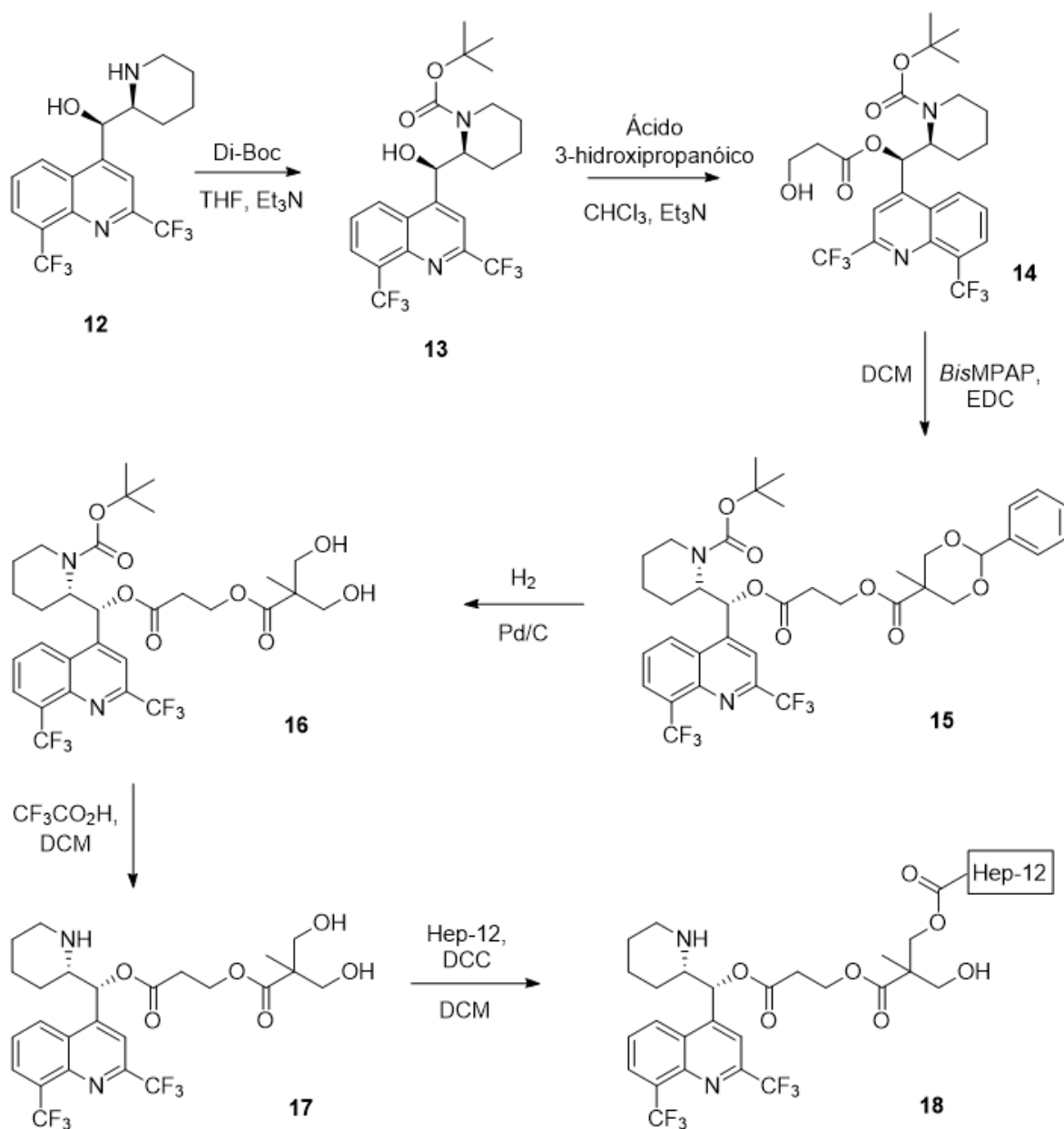
Com base no cenário descrito anteriormente, o presente trabalho tentou a síntese de dendrons e dendrímeros transportando artesunato e/ou mefloquina, dirigidos a eritrócitos infectados por malária. A latenciação de derivados de artemisinina pode resultar em moléculas que permitam um maior tempo de ação destes fármacos, o que teria uma influência positiva em suas eficácias, dado o seu baixo tempo de meia-vida no organismo (NOSTEN, WHITE, 2007; SANTOS, 2016). ASMQ foi utilizada como modelo de TCA por ser uma terapia eficaz (WHO, 2015) e recentemente desenvolvida pelo DNDi como terapia de dose-fixa (Portfolio DNDi, 2019), o que demonstra interesse por esta combinação. Além disso, tivemos como objetivo avaliar *in silico* se o sistema planejado é capaz de direcionar TCAs para eritrócitos infectados por *P. vivax*, além de infectados por *P. falciparum*. Os resultados desse estudo podem expandir os potenciais usos desse sistema de direcionamento.

No projeto inicial, foi descrito o planejamento de 6 dendrons/dendrímeros a serem sintetizados: 2 dendrons de *BisMPA*, ambos direcionados por Hep-12 a eritrócitos infectados por malária, e carregando mefloquina ou artesunato; um dendrímero de *BisMPA* direcionado por Hep-12 e carregando ambos os fármacos mencionados em uma única estrutura; 3 dendrímeros de Janus, sendo que a estrutura seria composta por um dendron de *BisMPA*, o qual seria responsável por carregar os fármacos, e um dendron de PAMAM, o qual teria Hep-12 ligado em sua terminações. Um dos dendrímeros de Janus teria apenas mefloquina em seu dendron de *BisMPA*, enquanto que outro teria apenas artesunato nessa região e o último dendrímero de Janus teria os dois fármacos. Durante o período, os esforços sintéticos foram direcionados para a síntese dos dendrons e do dendrímero de *BisMPA*.

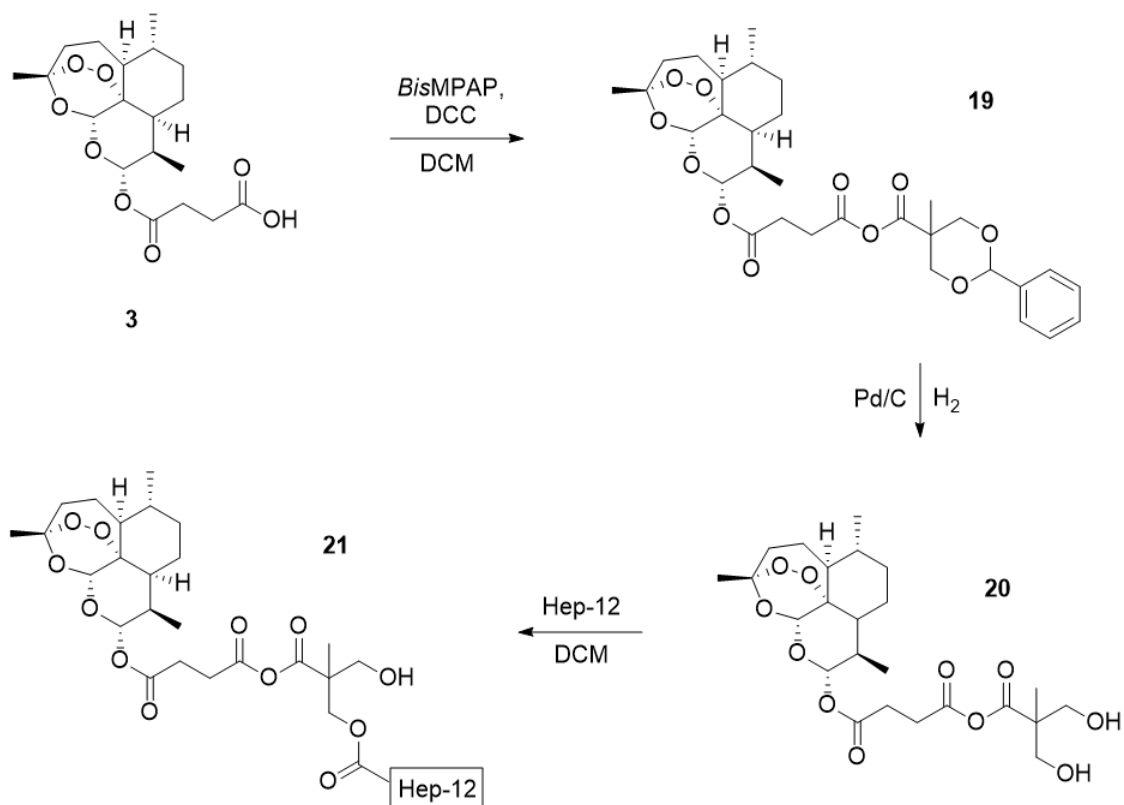
Em função de algumas dificuldades observadas durante a síntese dos dendrons e dendrímeros, durante o período relatado neste trabalho, foi planejada também uma nova estrutura simplificada, na qual os fármacos seriam ligados diretamente a derivados de heparina. Tal estrutura poderia ser sintetizada em apenas 3 etapas, mantendo a ideia original de direcionamento e facilitando esforços sintéticos.

Além disso, durante o período passado na Universidade de Dundee como *trainee* do *Wellcome Centre for Infectious Diseases (WCAIR)*, também foram avaliados diferentes *linkers* para a ligação de moléculas de interesse (mefloquina e derivados de 498) a PAMAM G0, com o objetivo de avaliar a influência desses componentes na solubilidade, atividade, permeabilidade, toxicidade e metabolismos da molécula ativa. Também foi realizado um estudo da relação estrutura atividade de 498 para identificar pontos em que a adição de um conector teria baixo impacto na atividade antiparasitária. Por fim, a viabilidade sintética do processo foi avaliada.

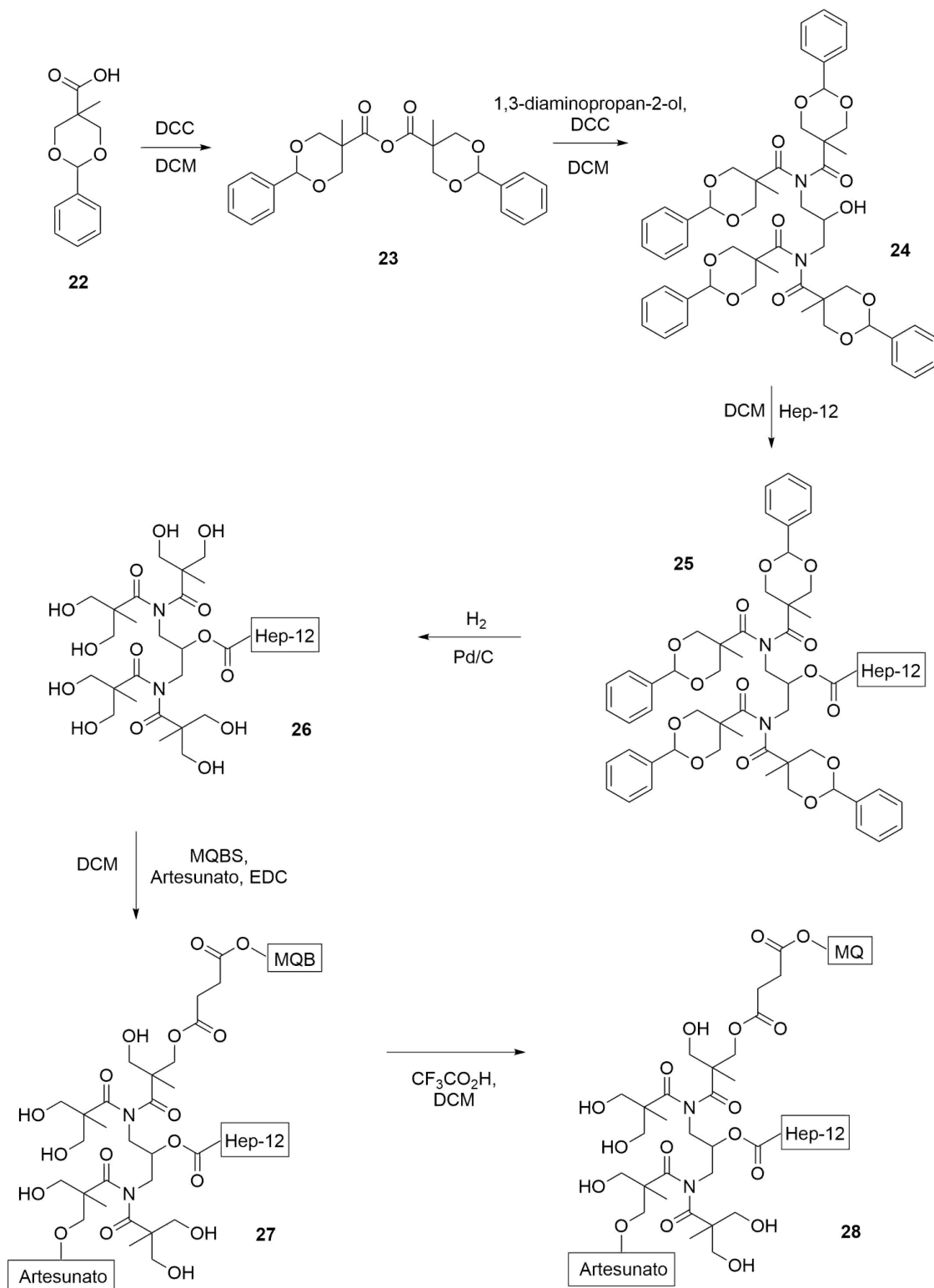
Objetiva-se, com a síntese destas novas moléculas, a obtenção de compostos que possuam maior atividade contra a malária em relação às terapias disponíveis atualmente. Além disso, a maior atividade também poderia resultar em moléculas potencialmente ativas contra malária resistente a fármacos. Os Esquemas de 1 a 3 mostram resumos das rotas sintéticas planejadas inicialmente para síntese dos dendrons e dendrímero de *Bis*MPA, enquanto que o Esquema 4 apresenta a nova proposta sintética da molécula simplificada e o esquema 5 apresenta a rota de síntese dos derivados de 498.



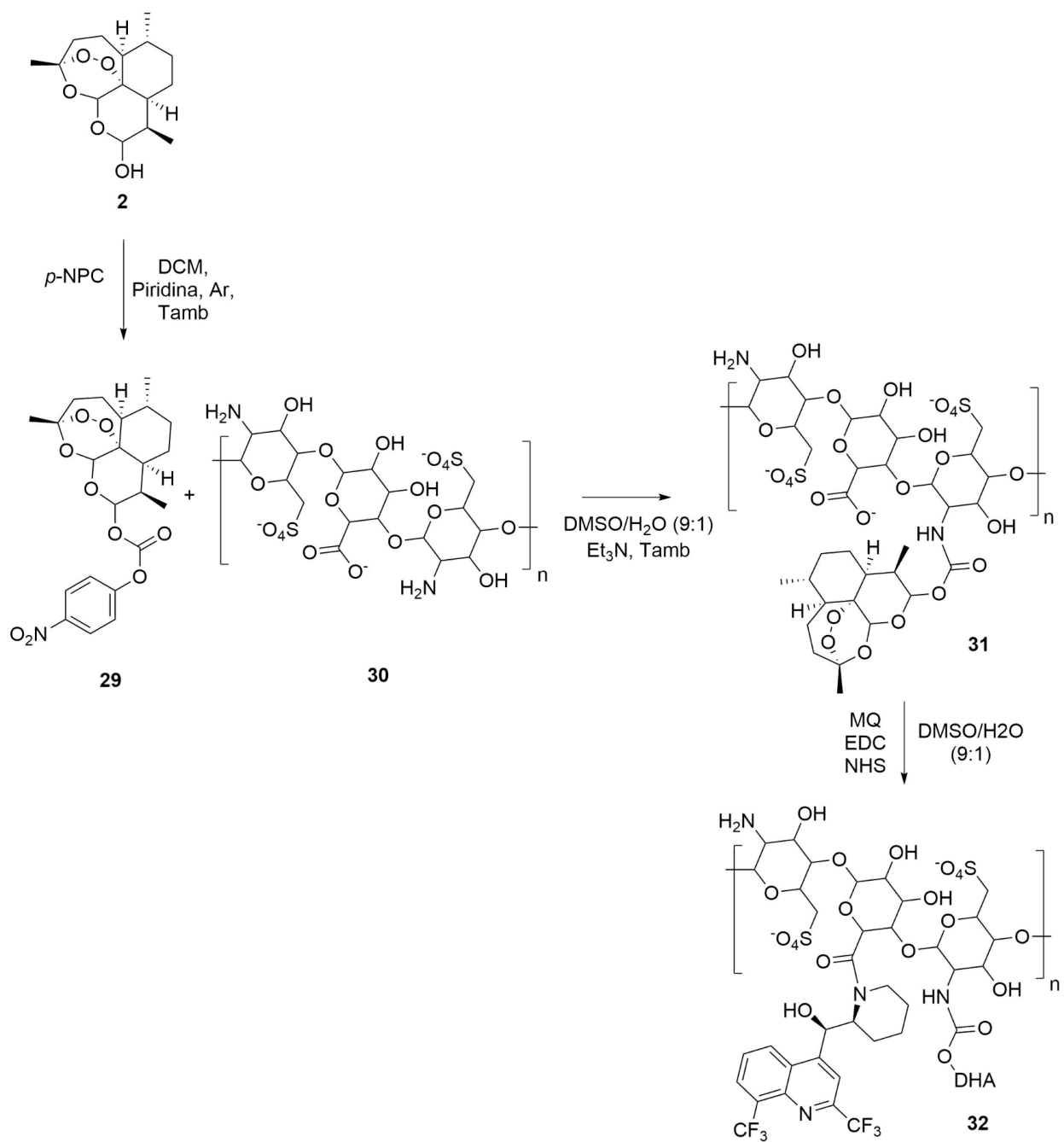
Esquema 1: Planejamento da rota de síntese do dendron de *BisMPA* contendo Hep-12 em suas regiões terminais e mefloquina conectada ao núcleo via um espaçador de ácido 3-hidroxipropanóico.



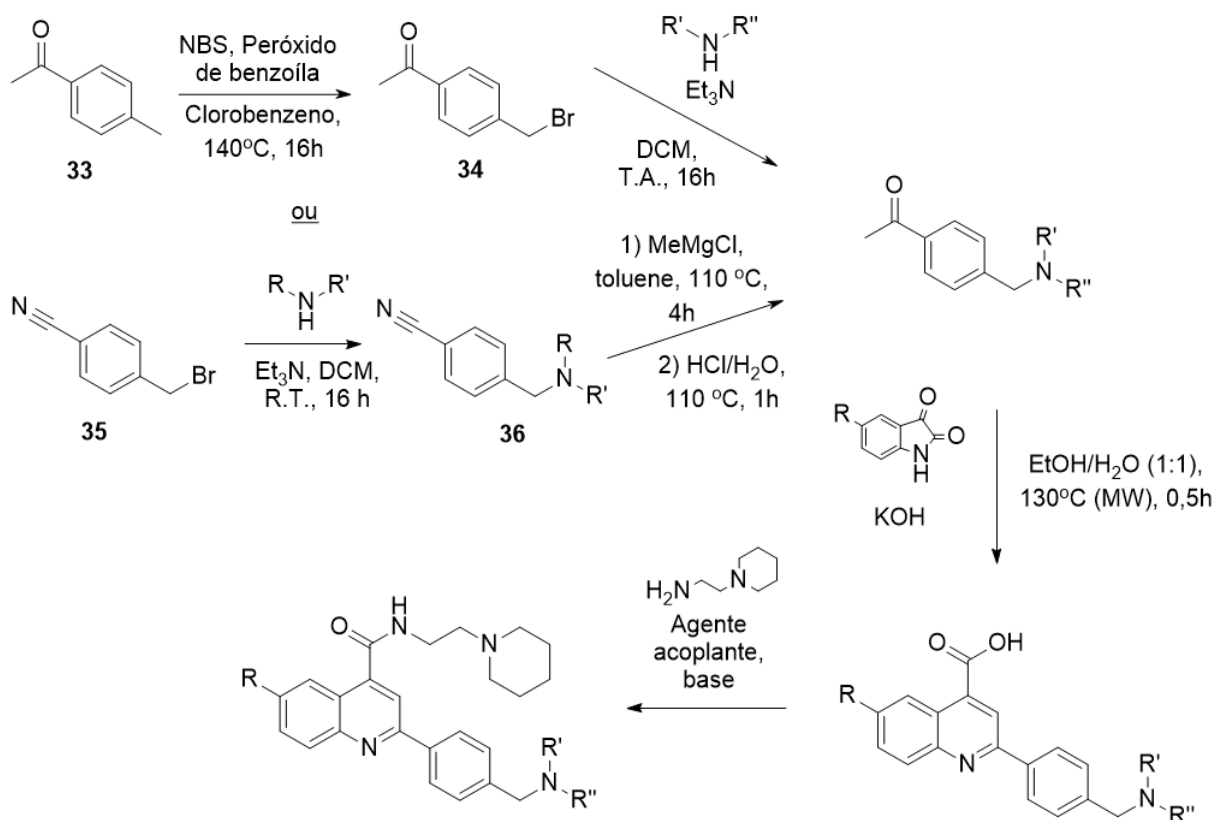
Esquema 2: Planejamento da rota de síntese do dendron de *BisMPA* contendo Hep-12 em suas regiões terminais e artesunato conectado ao núcleo.



Esquema 3: Planejamento da rota de síntese do dendrímero de *BisMPA* com núcleo de 1,3-diamino-2-propanol e regiões terminais de mefloquina e artesunato.



Esquema 4: Planejamento da rota de síntese para a ligação direta de mefloquina (**8**) e DHA (**2**) a um derivado de heparina (**30**).



Esquema 5: Rota sintética para a produção de derivados de 498.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da heparina como grupo diretor para eritrócitos infectados por *P. vivax*

3.1.1 Construção dos modelos 3D de PvTRAg36.6 e PvTRAg56.2

A sequência de aminoácidos das proteínas em questão foram obtidas do banco de dados PlasmDB no endereço plasmdb.org (códigos de identificação: PvTRAg36.6 = PVX_112690; PvTRAg56.2 = PVX088850). As mesmas sequências foram utilizadas no trabalho que determinou a localização dessas proteínas na membrana de eritrócitos infectados (TYAGI et al., 2016). Em seguida, foi realizado um *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) das sequências para a busca de homólogos no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB) (ALTSCHUL et al., 1990). As buscas foram conduzidas no servidor do *United States National Center for Biotechnology Information* (NCBI - blast.ncbi.nlm.nih.gov), sendo que se variou o *expect threshold* entre 0,05 e 10,0 e nenhum resultado foi encontrado, independentemente do *threshold* utilizado. Em seguida, o servidor Phobius (phobius.sbc.su.se) foi utilizado para a detecção de peptídeos sinais nas proteínas (KÄLL, KROGH, SONNHAMMER, 2007). Por fim, modelos das proteínas foram construídos utilizando-se o método *transform-restrained Rosetta*

(trRosetta) no servidor Robetta (robetta.bakerlab.org) (YANG et al., 2020). Para isso, as sequências de aminoácidos da PvTRAg36.6 (com e sem o peptídeo sinal identificado pelo Phobius) e da PvTRAg56.2 foram inseridas ao servidor.

3.1.2 Validação dos modelos

Os modelos obtidos tiveram seus arquivos PDB inseridos no servidor do SAVES (disponível em saves.mbi.ucla.edu), o qual é capaz de realizar diferentes programas de verificação estrutural. Assim, foram escolhidos os seguintes programas ERRAT (COLOVOS, YEATES, 1993), Verify3D (BOWIE, LÜTHY, EISENBERG., 1991; LÜTHY, BOWIE, EISENBERG., 1992) e PROCHECK (LASKOWSKI et al, 1993)

3.1.3 Comparação com AlphaFold

Modelos 3D para a PvTRAg36.6 (código AlphaFold: A0A0B4L206_PLAVI) e para a PvTRAg56.2 (código AlphaFold: A0A0B4L1H6_PLAVI) foram obtidos da base de dados do AlphaFold (alphafold.ebi.ac.uk) (JUMPER et al., 2021; VARADI et al, 2022). Os modelos gerados pelo método trRosetta foram comparados com os modelos do AlphaFold utilizando-se a ferramenta *Pairwise Structure Alignment* disponível no servidor do PDB (rcsb.org/alignment) utilizando-se os métodos jFATCAT-rigid e jFATCAT-flexible (YE, GODZIK, 2003; LI et al., 2020)

3.1.3 Docking

Os *dockings* foram realizados utilizando-se o *software* Autodock 4.2 (SANNER, 1999) e a estrutura 3D da heparina foi obtida do PDB (código PDB: 1hpn), sendo a mesma utilizada em um trabalho anterior (JUILLERAT et al., 2011). Cargas Geisteiger foram adicionadas à heparina e 30 ligações covalentes (indicadas na Figura 9) foram determinadas, de maneira similar ao realizado por Juillerat e colaboradores (2011).

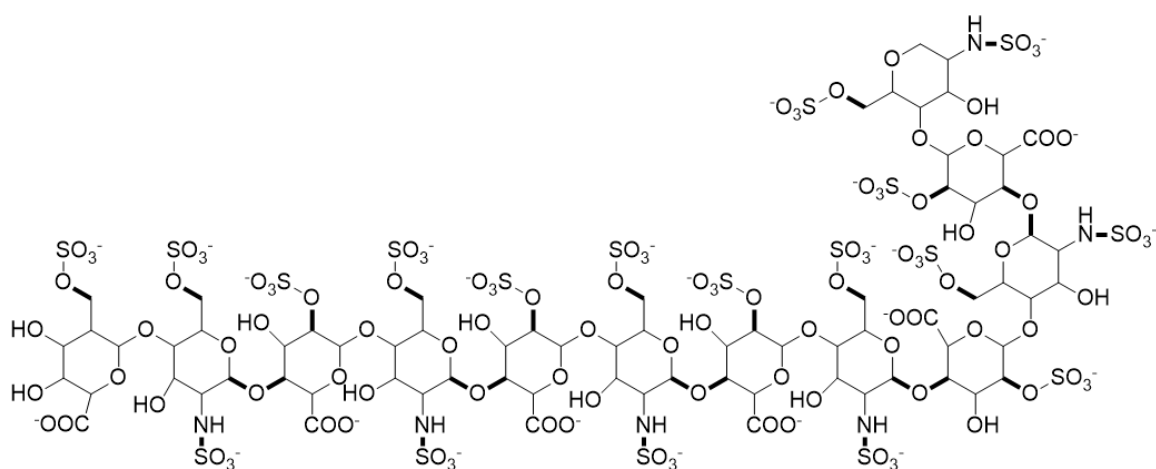


Figura 9: Estrutura da heparina utilizada nos ensaios de *docking*. Em negrito estão indicadas as ligações em que se permitiram rotações.

Como base de comparação para os resultados, realizou-se o *docking* da heparina sobre o segmento *N*-terminal da PfEMP1 (código PDB: 2XU0) de maneira análoga ao realizado por Juillerat e colaboradores (2011). Para a realização do *docking*, a estrutura da 2XU0 foi preparada, retirando-se moléculas de água, prolina, glicerol e magnésio e, em seguida, adicionando-se hidrogênios polares e cargas Kollman. No caso dos modelos construídos das proteínas de *P. vivax*, estas foram preparadas apenas adicionando hidrogênios polares e cargas Kollman.

Para determinação do sítio de ligação da heparina nas proteínas, iniciou-se o *docking* pela realização de 100 buscas por toda a superfície das proteínas (*docking* cego). *Grids* com um espaçamento de, pelo menos, 0,74 Å foram empregados, sendo, por vezes, necessários maiores espaçamentos ou múltiplos *grids* para cobertura completa da superfície. Os resultados do *docking* cego foram analisados, anotando-se os aminoácidos que interagem e estavam próximos da heparina na sua conformação de menor energia. Assim, novos *dockings* foram realizados através de 50 buscas utilizando-se um *grid* de 106x106x106 com um espaçamento de 0,375 Å, o qual foi visualmente centrado sobre os aminoácidos que foram anotados. Esse tamanho de *grid* foi suficiente para cobrir a superfície do sítio de ligação indicado pelo *docking* cego. Por fim, imagens foram criadas utilizando-se o *software* Pymol 2.4.1.

3.1.4 Dinâmica molecular

Para a dinâmica, iniciou-se pela construção da molécula de heparina a ser utilizada em um arquivo de linguagem compatível com o campo de força GLYCAM, o qual é otimizado para a construção de topologias de carboidratos (KIRSCHNER et al., 2008). Para isso, o construtor de glicosaminoglicanos do GLYCAM (disponível em glycam.org) foi empregado e uma molécula análoga à 1hpn foi construída. Assim, utilizando-se o AmberTools21, a topologia da heparina foi gerada utilizando-se o campo de força GLYCAM_06j-1 e a biblioteca expandida G1cNS_prep_files (disponível em glycam.org/docs/forcefield/all-parameters/)

O *software* GROMACS 5.1.1 foi utilizado para a realização das dinâmicas moleculares. Portanto, a topologia da heparina criada precisou ser convertida para uma linguagem compatível com o Gromacs e isso foi feito utilizando o *script* ACPYPE (disponível em github.com/alanwilter/acpype). Dessa forma, a topologia das proteínas foi criada utilizando-se o campo de força AMBER99SB e o campo TIP3P foi utilizado para a topologia da água. Um complexo heparina-proteína foi criado pela adição das coordenadas da heparina no arquivo .gro da proteína. Os parâmetros da topologia da heparina foram incluídos no arquivo .top gerado para a proteína. Cabe ressaltar que a nomenclatura dos átomos no arquivo dos parâmetros topológicos da heparina foi alterada, uma vez que certos átomos possuem a mesma nomenclatura, porém certos parâmetros são diferentes na topologia da heparina em relação à topologia da proteína. Em seguida, foi definida uma caixa dodecaédrica com 1 nm de espaço entre as arestas e o complexo. Tal caixa foi preenchida com moléculas de água e íons

Na⁺ e Cl⁻ até que o sistema estivesse eletricamente neutro. A energia do sistema foi então minimizada e a posição da heparina foi restringida simultaneamente à posição da proteína, prosseguindo-se, então, com um equilíbrio isotérmico e isocórico (NVT) e um equilíbrio isotérmico e isobárico (NPT). Por fim, uma simulação de 200 ns foi realizada.

3.2. Métodos de análise e tratamento de reagentes

3.2.1. Ponto de fusão

O ponto de fusão (p.f.) foi determinado em aparelho capilar marca Büchi.

3.2.2. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A obtenção de espectros de RMN foi realizada em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, disponível na FCF-USP. Na Universidade de Dundee, os espectros foram obtidos em espectrômetro de 400 Mhz, modelo Bruker Avance DPX 400, ou de 500 Mhz, modelo Bruker Avance DPX 500, ou em um aparelho com uma sonda criogênica (5 mm CPQCI 1H/19F-13C/15N/D Z-GRD) de 500 Mhz, modelo AVANCE III HD Ultrashield Plus 500MHz NMR. As amostras analisadas foram dissolvidas em solventes deuterados adequados, os quais foram utilizados sem tratamento prévio.

3.2.3. Espectrofotometria no Infravermelho (IV)

A análise no IV foi realizada por ATR (*Attenuated Total Reflectance*) em espectrofotômetro FTIR IRAffinity-1 Shimadzu, da Central Analítica do Departamento de Farmácia, FCF-USP.

3.2.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas com cromatoplaças de sílica-gel G-60, marca Merck, com as fases móveis apropriadas. Para a revelação, empregaram-se luz ultravioleta e soluções reveladoras de vanilina, molibdato de cério e verde de bromocresol.

3.2.5. Cromatógrafo automático flash

A purificação por cromatografia em coluna de sílica foi realizada em aparelho Isolera™ Prime, Biotage, no equipamento disponível na Central Analítica do Departamento de Farmácia, FCF-USP. Utilizou-se sílica *mesh* 200 para o preenchimento da coluna e eluentes adequados. Na Universidade de Dundee, foi utilizado aparelho Combiflash Companion Rf, Teledyne ISCO.

3.2.6 Cromatografia líquida-espectrometria de massas (LCMS)

LCMS foi realizado na Universidade de Dundee em um espectrômetro Agilent 6130 ESI associado a um cromatógrafo líquido de alta performance Agilent 1200 HPLC com um detector de diodos. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi realizada utilizando-se uma coluna Waters XBridge BEH 2.1 x 30 mm (tamanho de partícula 2,5 µm) e, como fase móvel,

água/acetonitrila, ambas com 0,1% de amônia. Também foi utilizado um aparelho Shimadzu LC-MS 2020 com detector de diodos. A HPLC foi realizada com uma coluna Hypersil Gold 50 x 2.1 mm (tamanho de partícula 1,9 μm) e, como fase móvel, água/acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido fórmico.

3.2.7 HPLC preparativo

O HPLC preparativo foi realizado na Universidade de Dundee utilizando-se um aparelho Gilson modelo 321-H2 com duas bombas de solvente e uma câmara de mistura dinâmica de volume variável entre 0,2 e 2,2 mL. O fluxo da fase móvel é determinado por um GX-215 dispensador sem bomba e um bombeador com seringa 215. O detector é composto por uma série de diodos, modelo 151 UV-Vis. A coluna utilizada foi uma Waters XSelect CSH Prep C18 OBD 19 x 100 mm (tamanho de partícula 5 μm) e a fase móvel foi água/acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido fórmico.

3.2.8 Reator de microondas

Para as reações em microondas realizadas na Universidade de Dundee, foi utilizado um reator Biotage® Initiator+.

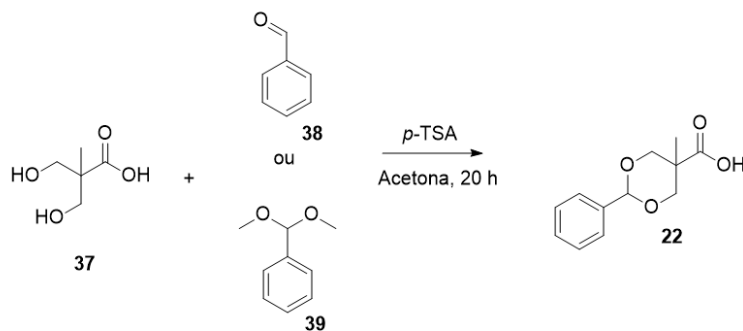
3.2.9. Material e tratamento de reagentes

Os solventes utilizados foram secados e purificados previamente segundo técnicas descritas em Armarego e Chai (2009). Os reagentes anidrido succínico, Et_3N , DCC, piridina e benzaldeído também foram purificados utilizando-se métodos usuais descritos por Armarego e Chai (2009). Outros reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados sem tratamento prévio.

Na Universidade de Dundee, utilizou-se solventes secos comercialmente disponíveis, mantidos em atmosfera de N_2 , com tampas seladas e na presença de peneiras moleculares. Outros reagentes empregados foram obtidos de diferentes fornecedores e não foi realizado tratamento prévio.

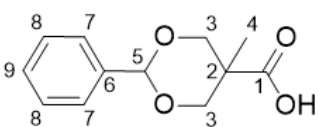
3.3. Métodos de síntese

3.3.1. Proteção das hidroxilas de BisMPA com dimetilacetal benzaldeído ou benzaldeído - síntese de BisMPAP (adaptado de SANTOS, 2016)

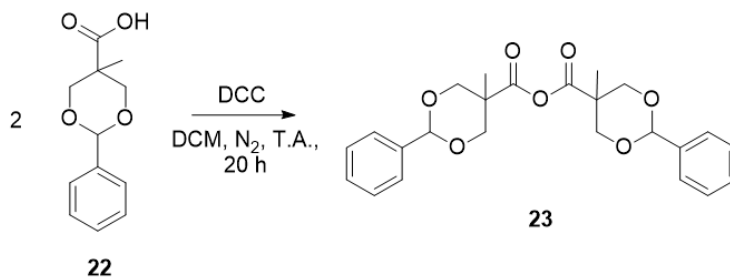


Esquema 6: Reação de proteção do *Bis*MPA com dimetilacetal benzaldeído ou benzaldeído.

Em um balão de 50 mL ou 250 mL de uma boca sob agitação magnética, adicionaram-se o *Bis*MPA (1 eq; 2,0 g; 0,015 mol ou 13,4 g; 0,1 mol), o dimetilacetal benzaldeído (1,5 eq; 3,4 mL; 0,023 mol) ou o benzaldeído (1,5 eq; 15,3 mL; 0,15 mol), a acetona (15 mL ou 100 mL) e o ácido *p*-toluenossulfônico (0,143 g; 0,764 mmol). A reação foi conduzida em temperatura ambiente durante 20 horas e acompanhada por CCD (Rf 0,56 para o produto; hexano:acetato de etila, 1:3 como eluente; azul de bromocresol como revelador). Após este período, a mistura reacional foi resfriada a -20 °C e permaneceu nesta temperatura por 24 horas, e foi, então, filtrada sob pressão reduzida. O sólido coletado foi recristalizado com acetona quente e posteriormente lavado com acetona gelada se detectado odor de benzaldeído remanescente. O produto foi obtido como sólido branco em 75% (2,5 g; 0,011 mol ou 15,8 g; 0,071 mol) de rendimento.

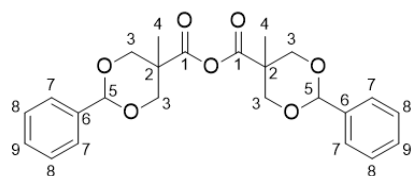

 RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm): 7,44 - 7,40 (m, 2H, H7), 7,34 - 7,31 (m, 3H, H8 e H9), 5,50 (s, 1H, H5), 4,56 (d, J = 11,5 Hz, 2H, H3), 3,71 (d, J = 11,4, 2H, H3), 1,03 (s, 3H, H4). RMN ¹³C (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): δ 178,00 (C1), 139,70 (C6), 129,85 (C9), 129,02 (C8), 127,39 (C7), 102,89 (C5), 74,51 (C3), 43,21 (C2), 18,11 (C4). IV: ν 2866 (br, O-H), 1695 cm⁻¹ (C=O). P.f.: 178,8 - 180,8 °C.

3.3.2. Síntese de anidrido de *Bis*MPAP (adaptado de SANTOS, 2016)



Esquema 7: síntese de anidrido de *Bis*MPAP.

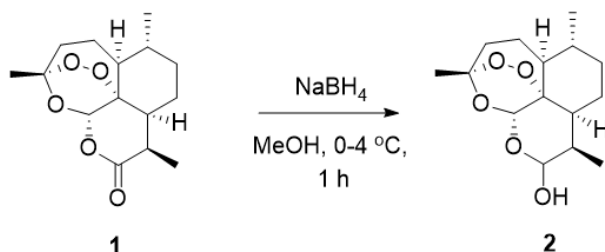
Em um balão de uma boca de 100 mL sob agitação magnética e atmosfera de N₂, adicionaram-se *Bis*MPAP (1 eq, 1,5g, 6,7 mmol) e DCM anidro (7,5 mL). Após cerca de 30 minutos de homogeneização da mistura reacional, DCC (0,5 eq, 0,65 g, 3,2 mmol) dissolvido em DCM anidro (10 mL) foi adicionado. A reação seguiu em temperatura ambiente por 20 h. Ao final do período, o meio reacional foi filtrado e o filtrado foi gotejado em 60 mL de hexano gelado para precipitação do anidrido. A suspensão foi mantida por 20 h a -20 °C e, em seguida, filtrada com recolhimento dos cristais brancos amorfos formados. Obteve-se rendimento de 55% (0,79 g, 1,85 mmol).



RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7,48-7,43 (m, 4H, H7), 7,40-7,29 (m, 6H, H8 e H9), 5,47 (s, 2H, H5), 4,66 (d, J = 10,9 Hz, 4H, H3), 3,68 (d, J = 10,8 Hz, 4H, H3), 1,12 (s, 6H, H4).
 RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ (ppm): 169,30 (C1), 137,77 (C6), 129,25 (C9), 128,38 (C8), 126,45 (C7), 102,30 (C5), 73,36 (C3), 44,35 (C2), 17,04 (C4). IV: ν 1815 (C=O), 1746 cm⁻¹

(C=O).

3.3.3. Redução de artemisinina à diidroartemisinina (DHA)



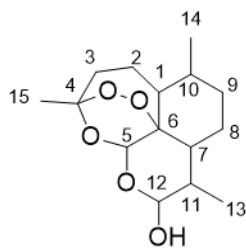
Esquema 8: Reação de redução da carbonila de artemisinina utilizando-se NaBH₄.

Método A - Em um balão de uma boca de 25 mL, sob agitação magnética, adicionaram-se a artemisinina (1 eq; 1,5 g; 5,3 mmol) e o metanol anidro (8,9 mL). Resfriou-se o balão a 0-4 °C e manteve-se sob atmosfera de N₂ por 30 minutos. Em seguida, 3 alíquotas de NaBH₄ (totalizando 2,7 eq; 0,55 mg; 14,5 mmol) foram pesadas e imediatamente adicionadas em intervalos de 10 minutos. Após a adição da última alíquota, deixou-se o balão atingir temperatura ambiente e conduziu-se a reação por mais 1 h. O meio reacional foi novamente resfriado a 0-4 °C e levado até pH = 5 utilizando-se solução gelada de ácido acético 30% (v/v) em MeOH. O solvente foi removido sob pressão reduzida e aquecimento (40 °C). O sólido obtido foi lavado com alíquotas de H₂O gelada e filtrado sob pressão reduzida. Os cristais obtidos foram coletados e uma CCD foi realizada (R_f 0,48 para o produto; MeOH:DCM, 1:20 como eluente; molibdato de cério como revelador). Purificou-se o produto por cromatografia *flash* em coluna de sílica utilizando-se o automatizador Isolera™ Prime. A coluna empregada possuía 50 g de sílica *mesh* 200. Utilizou-se um gradiente de MeOH e DCM como fase móvel, aumentando-se a concentração de MeOH de 0% a 10% (v/v). Foi obtido um pó branco amorfo

com rendimento de 30% (0,45 g; 1,59 mmol) (adaptado de PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016).

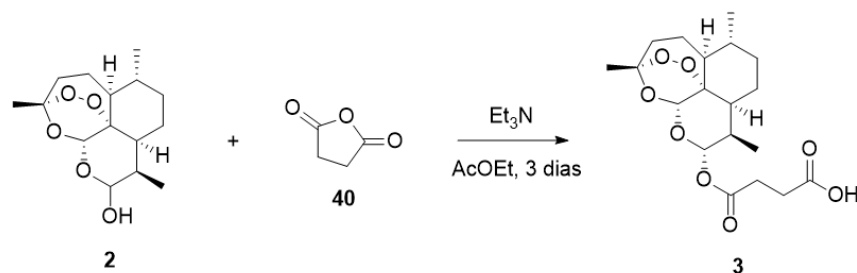
Método B - Em um balão de uma boca de 250 mL sob agitação magnética, adicionaram-se a artemisinina (1 eq; 1,5 g; 5,3 mmol) e MeOH anidro (60 mL), podendo ser adicionada uma pequena alíquota de 2 mL de DCM anidro para melhor dissolução. O meio foi resfriado a 0-4 °C em banho de gelo e mantidos sob atmosfera de N₂ por cerca de 40 minutos. Em seguida, uma carga de NaBH₄ foi adicionada (3 eq; 0,61 g; 16,0 mmol ou 4 eq; 0,84 g; 22,1 mmol). Nesse protocolo, alíquotas de NaBH₄ foram adicionadas e esperou-se até o borbulhamento intenso ser cessado, então uma nova alíquota era adicionada. Conduziu-se esse procedimento até adição total de agente redutor, de modo a realizá-la no menor tempo possível (cerca de 5 minutos). A reação foi acompanhada por CCD, como descrito anteriormente, até consumo total da artemisinina (cerca de 1 h). Etapas de neutralização, lavagem com H₂O e coleta de cristais foram realizadas como descrito no método A. O sólido obtido foi recristalizado com hexano:acetato de etila (3:1; v/v) quente. O precipitado foi filtrado sob pressão reduzida e coletado, sendo colocado em bomba de vácuo por 6-8 h para remoção de solvente. Assim, foi obtido um pó branco amorfo com rendimento de 15% (0,22 g; 0,80 mmol) (adaptado de BUZZI, PRESSER, VON FREYHOLD, 2007).

Método C - Em um balão de uma boca de 100 mL sob agitação magnética, adicionaram-se artemisinina (1 eq; 1,0 g; 3,5 mmol), dextrose (6,3 eq; 4 g; 22,2 mmol) e THF anidro (20 ml). Após homogeneização do sistema, adicionou-se NaBH₄ (37 eq; 5,0 g; 130 mmol) no menor intervalo de tempo possível, seguindo-se como descrito no método B. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 3 h. Em seguida, o meio reacional foi acidificado até pH = 5, como descrito anteriormente. Durante a neutralização, material foi ejetado e não se procedeu com etapas seguintes. (Adaptado de BHAKUNI et al., 2004).



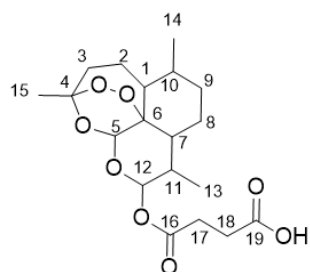
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 5,60 (s, 1H, H5β), 5,38 (s, 1H, H5α), 5,31 (t, J = 2,7 Hz, 1H, H12β), 4,74 (t, J = 8,6 Hz, 1H, H12α), 3,33 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,10 (bs, 1H), 2,66 - 2,56 (m, 1H), 2,37 (td, J = 13,9, 4,1 Hz, 4H), 2,07 - 1,97 (m, 2H), 1,93 - 1,44 (m, 17H), 1,42 (s, 3H, H15β), 1,41 (s, 3H, H15α), 1,38 - 1,18 (m, 7H), 0,95 (d, J = 1,7 Hz, 6H, H13), 0,93 (d, J = 2,9 Hz, 6H, H14). RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 104,52 (C4α), 104,24 (C4β), 96,49 (C12β), 94,85 (C12α), 91,38 (C5α), 87,88 (C5β), 81,27 (C6β), 80,51 (C6α), 52,68 (C1β), 51,73 (C1α), 45,63 (C7α), 44,53 (C7β), 37,61 (C10β), 37,51 (C10α), 36,53 (C3β), 36,45 (C3α), 34,98 (C11α), 34,89 (C9β), 34,38 (C9α), 30,94 (C11β), 26,17 (C15β), 26,04 (C15α), 24,87 (C2), 24,82 (C2), 24,70 (C8β), 22,27 (C8α), 20,50 (C14β), 20,37 (C14α), 13,31 (C13β), 12,86 (C13α).. IV: ν 3375 cm⁻¹ (br, O-H). P.f.: 148,2-150 °C (p.f. literatura: 150-151 °C - PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016).

3.3.4. Esterificação de DHA e anidrido succínico - síntese de artesunato (adaptado de PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016)



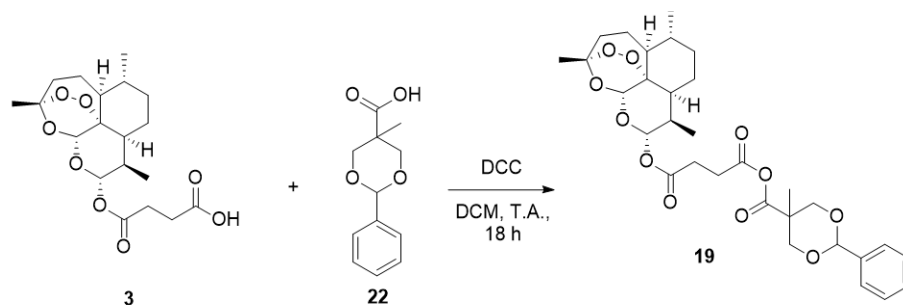
Esquema 9: Reação de esterificação de DHA com anidrido succínico.

Em um balão de uma boca de 5 mL sob agitação magnética e atmosfera de N_2 , adicionaram-se anidrido succínico sublimado (1,4 eq; 0,25 g; 2,5 mmol), Et_3N (0,6 eq; 0,15 mL; 1,1 mmol) e AcOEt (1,5 mL). Após homogeneização do sistema, 3 alíquotas de DHA foram adicionadas em intervalos de 10 minutos (totalizando 1 eq; 0,5 g; 1,8 mmol). Acompanhou-se a reação por CCD ($R_f = 0,22$; hexano:AcOEt (1:1) como fase móvel, molibdato de cério como revelador). A reação prosseguiu por 3 dias. Após o consumo total de DHA visualizado por CCD, o meio reacional foi levado a pH = 4, com solução aquosa 2 mol/L de H_2SO_4 . Alíquotas de AcOEt e H_2O foram adicionadas ao meio, as fases separadas em um funil de separação e a fase orgânica recolhida. A fase aquosa foi extraída exaustivamente com alíquotas de acetato de etila, sendo que todas as fases orgânicas foram recolhidas, secadas com $MgSO_4$, filtradas e o solvente foi removido sob pressão reduzida e aquecimento (40 °C). Um pó branco amorfo foi obtido com rendimento de 80% (0,54 g; 1,4 mmol).



RMN 1H (DMSO- D_6 300 MHz), δ (ppm): 12,23 (s, 1H, H19), 5,75 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H, H12), 5,64 (s, 1H, H5), 2,62 - 2,55 (m, 4H, H17 e H18), 2,42 - 2,34 (m, 1H), 2,27 (td, $J = 13,9, 3,7$ Hz, 1H), 2,13 - 2,02 (m, 1H), 1,95 - 1,84 (m, 1H), 1,77 - 1,40 (m, 6H), 1,37 (s, 3H, H15), 1,31 - 1,19 (m, 1H), 1,10-1,00 (m, 1H), 0,97 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H14), 0,85 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H, H13). RMN ^{13}C (DMSO- D_6 75 MHz), δ (ppm): 173,50 (C19), 170,95 (C16), 103,53 (C4), 91,71 (C12), 90,57 (C5), 79,82 (C6), 51,11 (C1), 44,56 (C7), 35,93 (C3 ou C10), 35,87 (C3 ou C10), 33,67 (C9), 31,61 (C11), 28,80 (C17), 28,45 (C18), 25,47 (C15), 24,15 (C2), 20,97 (C8), 20,00 (C14), 11,66 (C13).

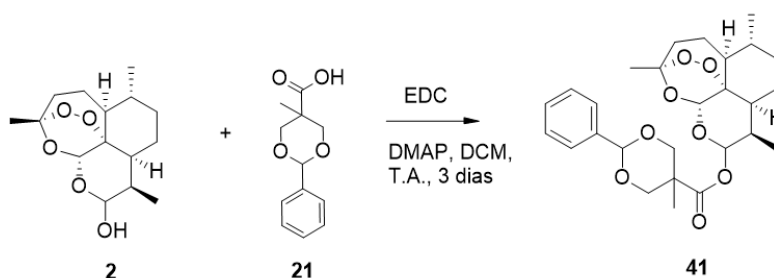
3.3.5. Síntese de anidrido de artesunato e BisMPAP (adaptado de SANTOS, 2016)



Esquema 10: Reação de formação do anidrido de artesunato e *BisMPAP*.

Em um balão de uma boca de 25 mL sob agitação magnética, adicionaram-se artesunato (1 eq; 0,25 g; 0,65 mmol), *BisMPAP* (1 eq; 0,144 g; 0,65 mmol) e DCM (6 mL). Em seguida, DCC (1 eq; 0,134 g; 0,65 mmol) dissolvido em DCM (0,6 mL) foi adicionado por gotejamento ao longo de 10 minutos. A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 18 h. Acompanhou-se o andamento por CCD até não se notar mais alteração (R_f obtidos: 0,42, 0,57, 0,64 e 0,86; DCM:MeOH (10:1) como eluente; molibdato de cério como revelador). Ao final do período, a suspensão foi filtrada e o filtrado coletado. O solvente foi removido por pressão reduzida e aquecimento (40 °C). O material foi purificado por cromatografia *flash* em coluna de sílica em um automatizador Isolera™ Prime, utilizando-se MeOH e DCM como fase móvel, variando-se a concentração de MeOH de 0 a 15%. O material purificado se degradou após o processo de purificação.

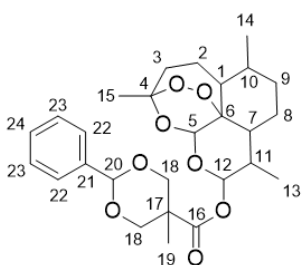
3.3.6. Esterificação de DHA e *BisMPAP* - síntese de *DHABP*



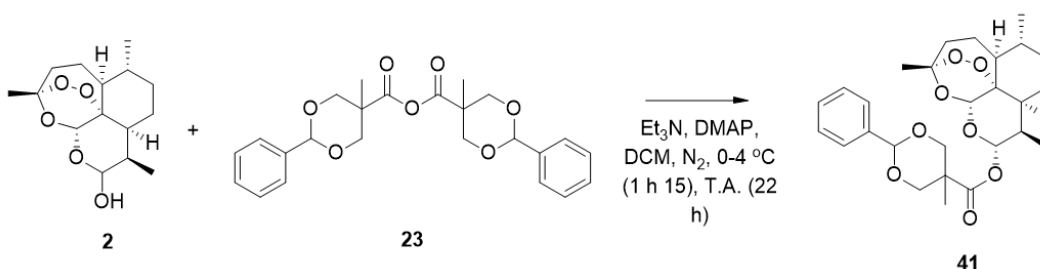
Esquema 11: reação de esterificação de DHA e *BisMPAP* utilizando-se EDC como agente condensante.

Método A: em um balão de uma boca de 50 mL sob agitação magnética, adicionaram-se cloridrato de EDC (0,8 eq; 54 mg; 0,28 mmol), *BisMPAP* (1,2 eq; 93 mg; 0,42 mmol) e DCM (15 mL). Após 30 minutos, DMAP (0,14 eq; 6 mg; 0,05 mmol) foi adicionado. Passados 45 minutos da adição de DMAP, DHA (1 eq; 100 mg; 0,35 mmol) foi adicionada ao meio reacional. A reação foi acompanhada por CCD (R_f 0,86 para o produto; DCM:MeOH (20:1) como fase móvel e molibdato de cério como revelador) e conduzida por 3 dias a temperatura ambiente até não se notar mais mudança no padrão de manchas da CCD. O solvente foi removido por pressão reduzida e aquecimento (40 °C), sendo o sólido obtido purificado por cromatografia *flash* em

coluna de sílica em um automatizador Isolera™ Prime, utilizando-se metanol e DCM como fase móvel em um gradiente que variou de 0 a 10% de MeOH. Foi obtido um pó branco amorfo com rendimento de 60% (104 mg; 0,21 mmol).



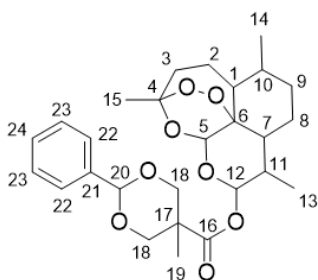
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,76 - 7,66 (m, 4H, H22), 7,57 - 7,48 (m, 6H, H23 e H24), 5,61 (s, 1H, H5 β), 5,47 (s, 1H, H20), 5,38 (s, 1H, H5 α), 5,29 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H, H12 β), 4,75 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H12 α), 4,63 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H), 4,30 - 4,16 (m, 12H), 3,68 (d, $J = 10,8$ Hz, 2H, H18), 2,69 - 2,55 (m, 2H), 2,38 (td, $J = 14,1, 3,6$ Hz, 4H), 2,06 (bs, 3H), 1,96 - 1,48 (m, 25H), 1,43 (s, 3H, H15 β), 1,42 (s, 3H, H15 α), 1,40 - 1,25 (m, 49H), 1,08 (s, 2H, H19), 0,95 (d, $J = 6,0$ Hz, 14H, H13), 0,91 (d, $J = 7,5$ Hz, 19H, H14). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 167,87 (C16), 132,62 (C21), 129,12 (C24), 128,34 (C23), 126,33 (C22), 104,52 (C4 β), 104,25 (C4 α), 102,00 (C20), 96,54 (C12 β), 94,84 (C12 α), 91,36 (C5 α), 87,92 (C5 β), 81,26 (C6 β), 80,50 (C6 α), 73,79 (C18 β), 52,69 (C1 β), 51,73 (C1 α), 45,62 (C7 α), 44,52 (C7 β), 37,63 (C10 β), 37,53 (C10 α), 36,54 (C3 β), 36,45 (C3 α), 34,93 (C11 α), 34,89 (C9 β), 34,39 (C9 α), 30,94 (C11 β), 26,18 (C15 β), 26,07 (C15 α), 24,88 (C2), 24,72 (C2), 22,28 (C8), 20,49 (C14 β), 20,37 (C14 α), 17,93 (C19), 13,30 (C13 β), 12,84 (C13 α).



Esquema 12: síntese de DHABP a partir de DHA e anidrido de *Bis*MPAP

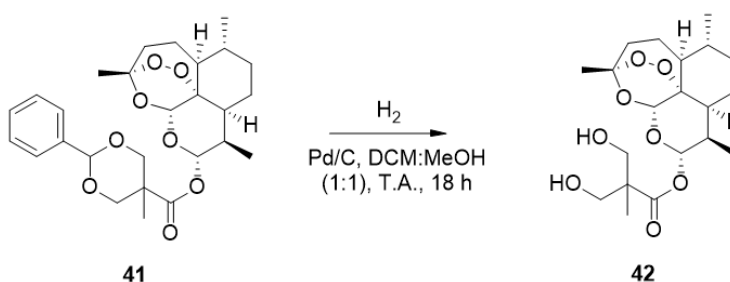
Método B: em um balão de uma boca de 15 mL sob agitação magnética, atmosfera de N_2 e à 0-4 °C, adicionaram-se DHA (1 eq, 100 mg, 0,36 mmol) e DCM anidro (6 mL). A solução ficou sob homogeneização por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se anidrido de *Bis*MPAP (1,2 eq; 181 mg; 0,42 mmol), Et_3N (1,2 eq; 59 μL ; 0,42 mmol) e 5mg de DMAP (0,1 eq, 5 mg; 0,04 mmol). A reação foi acompanhada por CCD (R_f 0,7 para o produto; MeOH:DCM (1:20) como eluente e UV seguido de molibdato de cério como reveladores. Após 1h15 de reação, deixou-se a reação atingir temperatura ambiente e prosseguir por mais 22h. Ao final, diluiu-se o material reacional com uma alíquota de DCM e a mistura reacional foi resfriada utilizando-se um banho de EtOH e gelo seco ($\text{CO}_{2(s)}$). O material resfriado foi lavado 2 vezes com uma solução aquosa de HCl de pH 4 e 2 vezes com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi secada com MgSO_4 e o solvente removido por pressão reduzida à temperatura ambiente. O sólido branco de cristais amorfos obtidos foi purificado por cromatografia *flash* em coluna de sílica de 25g *mesh* 200 em um automatizador Isolera™ Prime. A fase móvel utilizada foi de MeOH:DCM, variando-se a concentração de MeOH de 0 a 10% e o fluxo empregado foi de 15

mL/min. Foi obtido um sólido branco de cristais amorfos com 30% de rendimento (55mg; 0,11 mmol) (adaptado de ZUMA et al., 2016).



^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): δ 7,47 - 7,39 (m, 2H, H22), 7,35 - 7,28 (m, 3H, H23 e H24), 5,90 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H, H12 α), 5,47 (s, 1H, H5 α), 5,45 (s, 1H, H20), 4,72 (ddd, $J = 24,7, 11,3, 2,7$ Hz, 1H, H18), 4,65 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, H18), 3,68 (d, $J = 11,6$ Hz, 1H, H18), 3,62 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H, H18), 2,67-2,54 (m, 1H), 2,38 (td, $J = 13,9, 3,9$ Hz, 1H), 2,08-1,96 (m, 1H), 1,95 - 1,84 (m, 1H), 1,83-1,73 (m, 1H), 1,72-1,64 (m, 1H), 1,61 (s, 3H), 1,57-1,50 (m, 1H), 1,49-1,45 (m, 1H), 1,43 (s, 3H, H15), 1,40-1,36 (m, 1H), 1,31 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 1,28 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 1,20 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 1,12 (s, 1H, H19), 1,10 (s, 2H, H19), 1,08 - 1,01 (m, 1H), 0,96 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H, H13), 0,89 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, H14). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): δ 172,81 (C16), 138,09 (C21), 129,24 (C24), 129,02 (C23), 128,37, 128,26, 126,44 (C22), 104,50 (C4), 102,29 (C20), 102,12, 92,71 (C12), 91,76 (C5), 80,35 (C6), 73,75 (C18), 73,49 (C18), 73,36, 51,84 (C1), 45,49 (C17), 44,35 (C7), 42,75, 37,43 (C10), 36,42 (C3), 34,30 (C11), 32,24 (C9), 26,02 (C15), 24,76 (C2), 22,22 (C8), 20,36 (C14), 17,80 (C19), 17,04, 12,19 (C13). IV: ν 1749 cm^{-1} (C=O). P.f.: 53,6 - 55,6°C.

3.3.7. Desproteção do BisMPAP esterificado com DHA - desproteção de DHABP (adaptado de SANTOS, 2016)



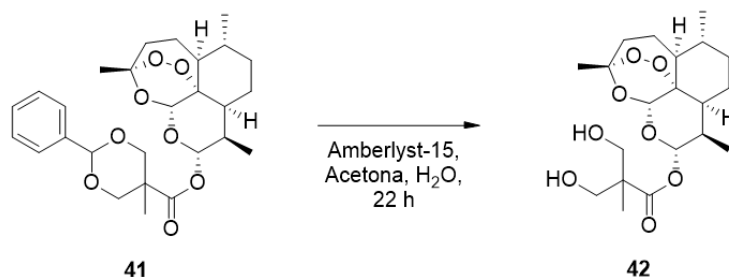
Esquema 13: Reação de hidrogenação catalítica de DHABP para desproteção das hidroxilas.

Em um reator mantido sob agitação magnética constante à temperatura ambiente e sob atmosfera de H_2 de 10 bar, adicionaram-se DHABP (1 eq; 104 mg; 0,21 mmol), Pd/C 10% (m/m) (138 mg) e DCM:MeOH (1:1; 50 mL). A reação foi conduzida por 18 h e, ao final do período, a mistura reacional foi filtrada com celite e o filtrado teve o solvente removido por pressão reduzida e aquecimento (40 °C). Alíquotas de acetona foram adicionadas e removidas em seguida por pressão reduzida e aquecimento (40 °C) para retirada de resquícios de água. O material obtido não correspondia ao produto de interesse.

3.3.8. Avaliação da estabilidade de DHA na presença de Amberlyst-15 (adaptado de COPPOLA, 1985)

Em um balão de 50 mL sob agitação magnética e à temperatura ambiente, adicionaram-se DHA (1 eq, 41 mg; 0,14 mmol), Amberlyst-15 (5,5 mg), acetona (20 mL) e H₂O (0,3 mL). Após a reação proceder por 23 h, a mistura foi filtrada com celite. A degradação da DHA durante o período, assim como sua possível adsorção na celite, foi acompanhada por CCD (DCM:MeOH (20:1) como eluente e molibdato de cério como revelador).

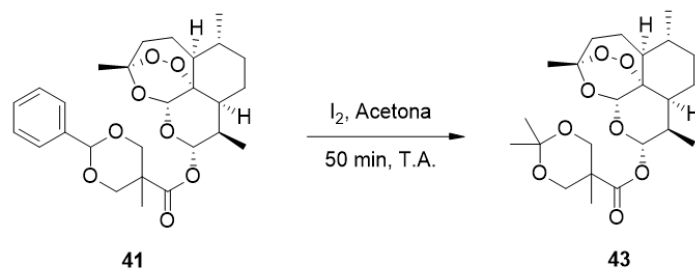
3.3.9. *Desproteção do BisMPAP da DHABP - hidrólise catalisada por Amberlyst-15 (adaptado de COPPOLA, 1985)*



Esquema 14: hidrólise do O,O-acetal da DHABP.

Em uma balão de uma boca de 5 mL sob agitação magnética lenta, adicionaram-se 25,4 mg de DHABP (1 eq; 25 mg; $5,9 \cdot 10^{-5}$ mol), Amberlyst-15 (2 mg), acetona anidra (2 mL) e acetona aquosa (200 μ L, preparada a partir de 40 mL de acetona adicionados de 0,6 mL de H₂O). O meio reacional foi mantido à temperatura ambiente por 22 h. A reação foi acompanhada por CCD (R_f 0,21 para o possível produto; MeOH:DCM (1:20) como fase móvel, e vanilina como revelador). Ao longo de 22 h, notou-se a formação de mancha intensa correspondente a DHA ($R_f = 0,28$) e a reação foi interrompida. Foi realizada uma purificação *flash* para recuperação de DHABP e tanto a DHA, quanto ao possível produto, como não possuíam massa suficiente para qualquer análise, foram descartados.

3.3.10. *Transacetalização da DHABP utilizando-se I₂ (adaptado de SUN et al., 2004)*

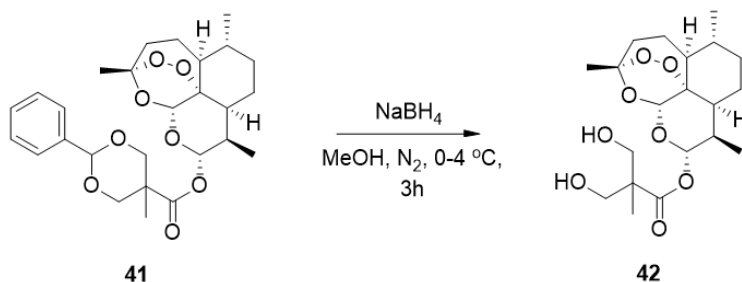


Esquema 15: transacetalização da DHABP com acetona na presença de I₂.

Em um balão de uma boca de 5 mL sob agitação magnética, adicionaram-se DHABP (1 eq; 39 mg; 0,08 mmol), 2,5 mg de I₂ (0,1 eq; 2,5 mg; 0,01 mmol) e acetona anidra (2 mL). Após

50 min, uma CCD foi realizada (MeOH:DCM (1:20) como eluente e vanilina como revelador). Notou-se mancha intensa correspondente a DHA e duas manchas muito fracas abaixo da DHA na placa. Assim, a reação foi interrompida e considerada não sucedida.

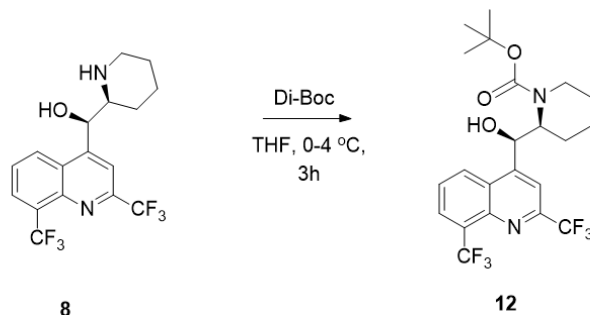
3.3.11. *Desproteção da DHABP por redução com NaBH₄ (adaptado de PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016)*



Esquema 16: redução do O,O-acetal da DHABP com NaBH₄.

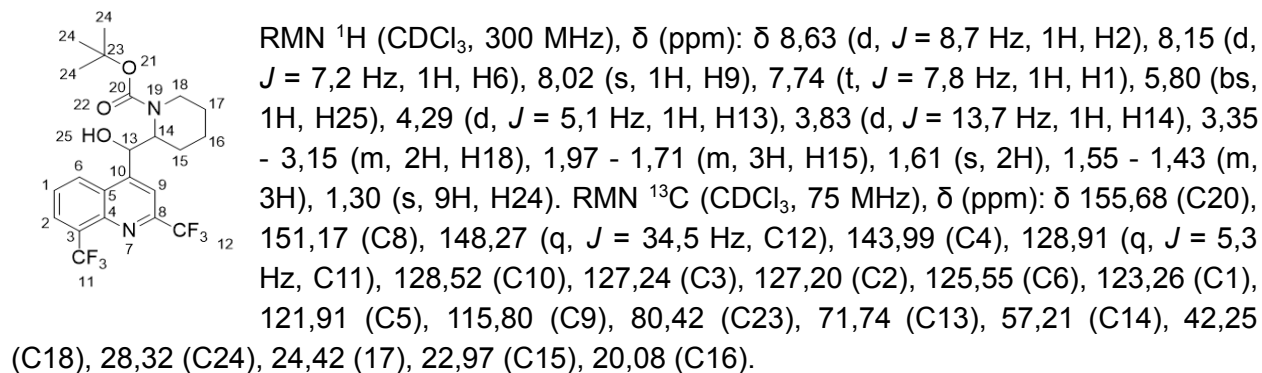
Em um balão de uma boca de 5 mL sob agitação magnética, atmosfera de N₂ e a 0-4 °C, adicionaram-se DHABP (1 eq; 53 mg; 0,11 mmol) e MeOH anidro (1,5 mL). Após 30 minutos, adicionou-se NaBH₄ (6 eq; 24 mg; 0,65 mmol). A reação foi conduzida por 3 h, acompanhada por CCD (MeOH:DCM (1:20) como eluente e vanilina como revelador) até não se notar mais mudanças no padrão das manchas. Em seguida, o conteúdo reacional foi acidificado até pH 5 (mantendo-se 0-4 °C), utilizando-se ácido acético em MeOH (30% de ácido, v/v). Em seguida, o balão foi mantido por 15 minutos a -20 °C para finalização do processo de neutralização. O solvente foi removido por pressão reduzida à temperatura ambiente e o sólido branco obtido foi solubilizado em acetona. A solução foi passada em uma pequena camada de sílica *mesh* 200 em uma pipeta de pasteur e a sílica foi lavada exaustivamente com acetona. Todas as frações de acetona recolhidas foram agregadas e o solvente foi removido por pressão reduzida à temperatura ambiente. O sólido obtido foi purificado por cromatografia *flash* em coluna de sílica de 10 g *mesh* 200 em um automatizador Isolera™ Prime. A fase móvel utilizada foi de MeOH:DCM, variando-se a concentração de MeOH de 0 a 10% e o fluxo empregado foi de 10 mL/min. Duas frações foram coletadas e analisadas por RMN, porém nenhuma correspondia ao produto de interesse.

3.3.12. *Proteção da amina de mefloquina com di-Boc - síntese de MQB (adaptado de GRELLEPOIS et al., 2005)*

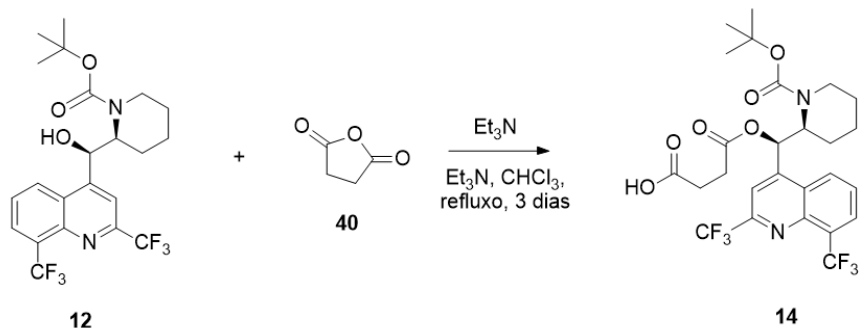


Esquema 17: proteção do grupamento amina da mefloquina.

Em um balão de uma boca de 50 mL sob agitação magnética, atmosfera de N₂ e a 0-4 °C, adicionaram-se cloridrato de mefloquina (1 eq; 500 mg; 1,2 mmol) e THF (14 mL). Após 30 minutos, adicionaram-se Et₃N (2,8 eq; 334 mg; 3,3 mmol) e 440 mg de di-Boc (1,7 eq; 440 mg; 2,0 mmol). A reação foi conduzida por 3 h e acompanhada por CCD (R_f 0,9 para o produto; DCM como fase móvel e revelada por UV). Em seguida, diluiu-se a mistura reacional com éter etílico e a fase orgânica foi lavada 5 vezes com solução saturada de NaCl. Prosseguiu-se com a secagem da fase orgânica com MgSO₄. O solvente foi removido por pressão reduzida e aquecimento (40 °C). O sólido obtido foi purificado por cromatografia *flash* em coluna de sílica *mesh* 200 em um automatizador Isolera™ Prime, utilizando-se MeOH e DCM como fase móvel, variando-se a concentração de metanol de 0 a 10% no processo de purificação. Obteve-se espuma de cor branca, com rendimento ao redor de 90% (594 mg; 1,2 mmol).



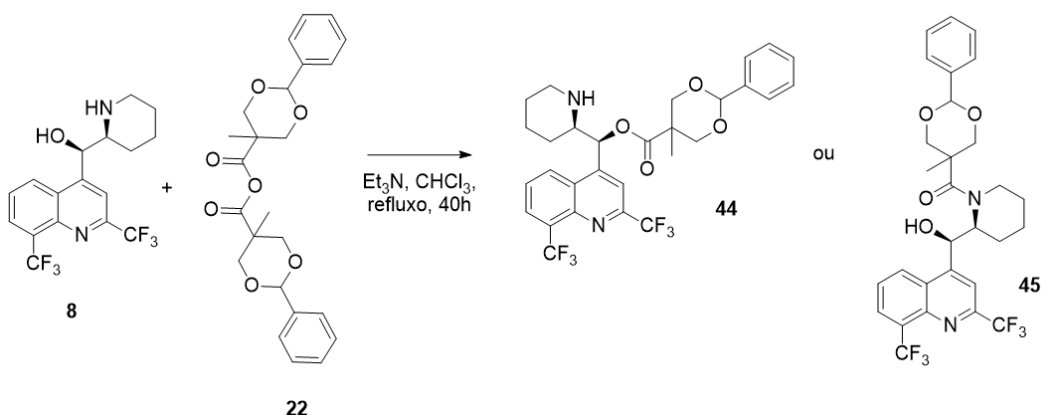
3.3.13. Esterificação de MQB com anidrido succínico - síntese de MQBS (adaptado de GRELLEPOIS et al., 2005)



Esquema 18: esterificação de MQB e anidrido succínico.

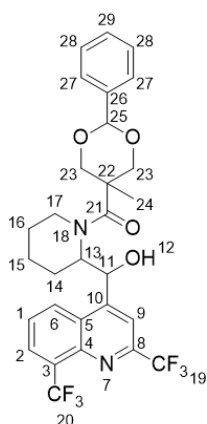
Em um balão de duas bocas de 50 mL sob agitação magnética e com um condensador de refluxo, adicionaram-se MQB (1 eq, 92 mg; 0,19 mmol), anidrido succínico (3 eq, 58 mg, 0,58 mmol), Et₃N (3 eq; 81 μL; 0,58 mmol) e CHCl₃ (21 mL). A reação foi mantida sob refluxo por 3 dias com adições de alíquotas de CHCl₃, caso fosse detectada perda de solvente. A reação foi acompanhada por CCD (AcOEt como fase móvel e UV seguido de verde de bromocresol como reveladores) até não se notar mais alteração no padrão de manchas. Ao final do período, a mistura reacional foi lavada 2 vezes com solução saturada de NaHCO₃ e 3 vezes com solução saturada de NaCl. Em seguida, a fase orgânica foi coletada, secada com Na₂SO₄ e o solvente foi removido por pressão reduzida e aquecimento (40 °C). O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna de 10 g de sílica *mesh* 200 com auxílio do automatizador Isolera™ Prime. A fase móvel utilizada foi MeOH:DCM, com fluxo de 10 mL/min e o gradiente de MeOH variou de 0 a 10% em sua concentração. Foi obtido um sólido não correspondente à molécula de interesse após análise por RMN.

3.3.14. Esterificação/amidação de mefloquina e BisMPAP (adaptado de GRELLEPOIS, 2005).



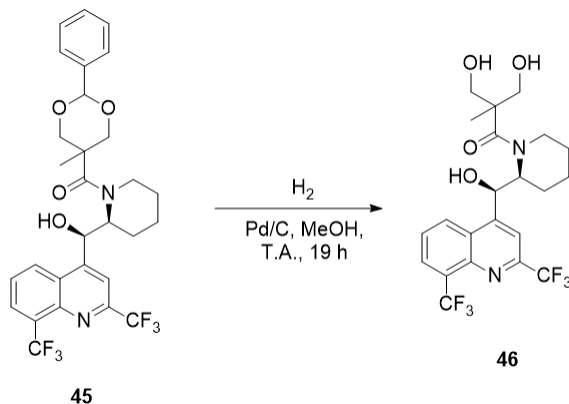
Esquema 19: reação de mefloquina com anidrido de BisMPAP.

Em um tubo de aproximadamente 50 mL de volume, adicionou-se cloridrato de mefloquina (1 eq; 0,50 g; 1,2 mmol), anidrido de BisMPAP (2 eq; 1,02 g; 2,4 mmol), Et₃N (3 eq; 477 μ L; 3,6 mmol) e CHCl₃ anidro (5 ml). O tubo foi selado e colocado em banho de óleo a 63 \pm 5 $^{\circ}$ C, sob agitação magnética constante. Após 40 min, o aquecimento foi desligado e o tubo foi retirado do banho para ser resfriado. Realizou-se CCD para determinação de resultado (R_f 0,88 e 0,72 para os possíveis produtos; MeOH:DCM (1:20) como fase móvel e UV e azul de bromocresol como reveladores). O material reacional foi diluído com CHCl₃ lavado 2 vezes com solução aquosa de HCl de pH 4, 1 vez com solução aquosa saturada de NaHCO₃ e 1 vez com solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi coletada, secada com MgSO₄ e o solvente foi removido por pressão reduzida e aquecimento (40 $^{\circ}$ C). O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna *flash* com automatizador Isolera™ Prime. Um cartucho de 50 g preenchido com sílica *mesh* 200 foi empregado e um gradiente de MeCN:AcOEt (início: 3% de MeCN, final: 28% de MeCN) com um fluxo de 20 mL/min foi utilizado. Uma fração foi recolhida e seu solvente removido por pressão reduzida e aquecimento (40 $^{\circ}$ C). Obteve-se rendimento de 58% (0,41 mg; 0,7 mmol). O produto apresentou o aspecto de espuma de cor branca a amarelada (adaptado de GRELLEPOIS, 2005)



Molécula 44 ou 45: ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 8,68 (d, J = 8,9 Hz, 1H, H2), 8,25 (d, J = 5,5 Hz, 1H, H6), 7,96 (s, 1H, H9), 7,87 (t, J = 6,3 Hz, 1H, H1), 7,46 - 7,37 (m, 1H, H27), 7,29 (s, 6H, H28 e H29), 6,62 (s, 1H), 5,57 (s, 1H, H25), 5,49 (s, 1H, H12), 4,68 (d, J = 9,8 Hz, 1H, H23), 4,61 (d, J = 10,3 Hz, 2H, H11), 3,84 (t, J = 11,5 Hz, 2H, H23), 3,67 (d, J = 11,1 Hz, 1H, H13), 2,81 (d, J = 12,4 Hz, 1H, H17), 2,54 (t, J = 12,1 Hz, 1H, H17), 1,73 (d, J = 11,2 Hz, 2H), 1,59 - 1,41 (m, 2H), 1,38 - 1,20 (m, 4H), 1,08 (s, 3H, H24), 1,01 (s, 2H). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 174,85 (C21), 148,49 (d, J = 40,5 Hz, C19), 145,12 (C8), 139,99 (C26), 139,34 (C4), 130,73, 130,70, 130,61, 130,39, 129,85, 129,66, 129,58, 129,34, 129,06, 128,91, 128,14, 127,41, 127,06, 116,89 (C9), 102,75 (C25), 102,66, 75,77, 75,16 (C23), 74,56, 74,28 (C11), 61,51, 60,60 (C13), 47,29, 44,24 (C17), 43,64 (C22), 30,65, 27,67 (C16), 26,13 (C14), 24,51 (C15), 18,55 (C24), 17,45, 1,48. IV: ν 1742 cm⁻¹ (C=O). P.f. = 151,6 - 152,6 $^{\circ}$ C.

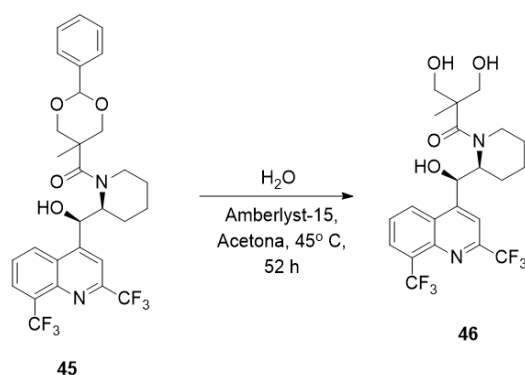
3.3.15. *Desproteção do BisMPAP de MQBP por hidrogenação catalítica (adaptado de SANTOS, 2016)*



Esquema 20: Desproteção da MQBP por hidrogenação catalítica com Pd/C.

Em um reator de alta pressão para hidrogenação catalítica, adicionou-se MQBP (127,5 mg; 0,22 mmol), Pd/C 10% (72 mg) e MeOH (8 ml). Em seguida, o reator foi selado, adicionou-se H₂ até que uma pressão de 10 barr fosse atingida e o conteúdo foi mantido sob agitação magnética. Entretanto, o reator apresentava vazamentos e a pressão atingia 0 barr após 3 h. Por essa razão, após esse período, uma nova carga de H₂ foi adicionada e a reação foi mantida sob agitação por 19 h. Outras tentativas foram realizadas em outros reatores, porém todos apresentavam vazamentos. Após o período indicado, o conteúdo reacional foi retirado, filtrado com celite e a solução obtida foi rotaevaporada a 40 °C. Uma purificação do sólido foi realizada por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho preenchido com 25 g de sílica gel 60 (*mesh* 230-400), fluxo de 10 mL/min e MeCN/AcOEt como fase móvel. Variou-se a concentração de MeCN de 5% a 100% ao longo do processo. Ao final, 4 frações foram obtidas, porém nenhuma correspondia ao produto.

3.3.16. Desproteção do BisMPAP de MQBP por hidrólise com Amberlyst-15 (adaptado de COPPOLA, 1985)

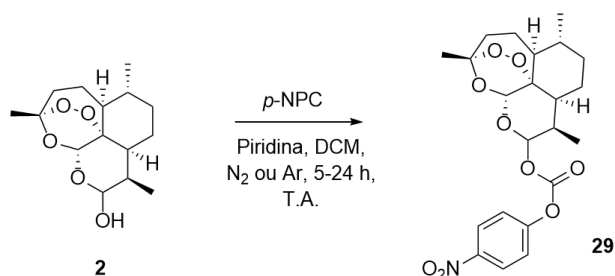


Esquema 21: Desproteção da MQBP por hidrólise ácida com Amberlyst-15.

Em um balão de uma boca de 5 ml, adicionou-se MQBP (29,9 mg; 0,05 mmol), Amberlyst-15 (2,3 mg), acetona molhada (200 μL; preparada adicionando-se acetona a 0,6 ml

de H₂O até que 40 mL de solução fossem obtidos) e acetona anidra (1 mL). A reação foi mantida sob agitação constante e acompanhada por 7,5 h por meio de CCD. Após esse período, não se observou reação alguma. Dessa forma, todo o conteúdo foi transferido para um tubo selável e o balão inicial foi lavado com 1 mL de acetona, a qual também foi transferida para o tubo. O conteúdo foi mantido sob agitação e em banho de óleo (45 ± 5 °C) por 52 h, sendo acompanhado por CCD ao longo do período. Entretanto, apenas a mancha correspondente ao material de partida foi identificada e, portanto, considerou-se que a reação não ocorreu.

3.3.17. Ativação da hidroxila de DHA por *p*-NPC



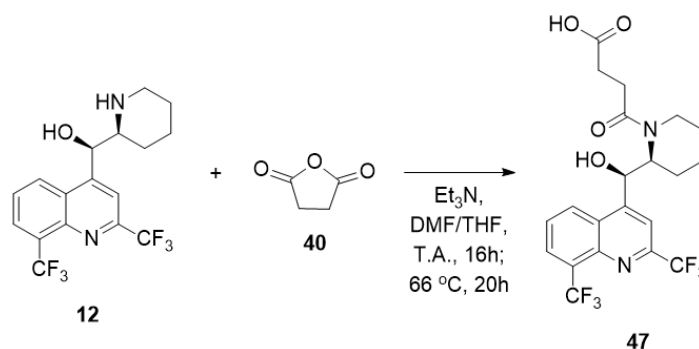
Esquema 22: reação de DHA com *p*-NPC.

Método A: em um balão seco de 2 bocas e 100 mL, adicionaram-se DCM anidro (15 mL) e DHA (1 eq; 137,1 mg; 0,48 mmol). O balão foi colocado em banho de gelo (0-4 °C) e mantido sob agitação magnética, em atmosfera de N₂, por 40 min. Em seguida, *p*-NPC com pureza de 96% (4.9 eq; 495,2 mg; 2,36 mmol) dissolvido em 3 mL de DCM anidro foi adicionado pelo septo com uma seringa. Piridina anidra também foi adicionada pelo septo (6,2 eq; 242 µL; 3,0 mmol). Após as adições, o banho de gelo foi retirado e deixou-se a reação atingir a temperatura ambiente. A reação foi conduzida sob atmosfera de N₂ e agitação magnética por 5 h, sendo acompanhada por CCD (MeOH:DCM (1:20) como fase móvel e UV e molibdato de cério como reveladores) durante o período. Após a interrupção da reação, o solvente foi rotaevaporado à temperatura ambiente e purificado por cromatografia *flash* com sílica-gel 60 (*mesh* 230-400) em um cartucho de 50 g, utilizando-se DCM:MeOH como fase móvel (variando-se a concentração de MeOH de 0 a 8%) e com um fluxo de 25 mL/min. Três frações foram coletadas, sendo que uma análise por RMN indicou que apenas a primeira poderia conter o produto. Como esta fração apresentava muitas impurezas, uma segunda purificação foi realizada utilizando-se cromatografia em coluna de sílica 60 de, aproximadamente, 20 cm e diâmetro de 2 cm. Utilizou-se fase móvel de hexano:acetona, iniciando-se com uma proporção de 0% de acetona (v/v) e finalizando-se com uma proporção de 35%. A concentração de acetona era aumentada em 2% a cada volume de coluna. Ao final, 3 frações foram coletadas (adaptado de CHUNG et al., 2010).

Método B: em um balão seco, de 3 bocas e 125 mL, foi adicionada DHA (1 eq; 284 mg; 1 mmol) e, em seguida, o sistema foi tampado e mantido sob vácuo por 15 min para retirada de

umidade. O balão permaneceu selado e adicionou-se atmosfera de argônio ao sistema. Após esta etapa, adicionaram-se 9 mL de diclorometano anidro e piridina anidra (1,3 eq; 105 μ L; 1,3 mmol), ambos pelo septo do balão com o auxílio de uma seringa. Por fim, *p*-NPC com grau de pureza 96% (1,2 eq; 252 mg; 1,2 mmol) foi dissolvido em diclorometano anidro e adicionado gota a gota pelo septo com uma seringa. O sistema foi mantido sob agitação magnética e atmosfera de argônio. Passadas 24 h, o solvente foi rotaevaporado e purificado por cromatografia *flash* com sílica gel 60 (*mesh* 230-400) em um cartucho de 100 g, utilizando-se hexano:acetona como fase móvel (variando-se a concentração de acetona de 0 a 40%) e com um fluxo de 12 mL/min. Ao final, 9 frações foram coletadas e realizou-se o RMN das primeiras 2 frações (adaptado de SAMMET, 2009)

3.3.18. Amidação de mefloquina e anidrido succínico (adaptado de GRELLEPOIS et al., 2005)

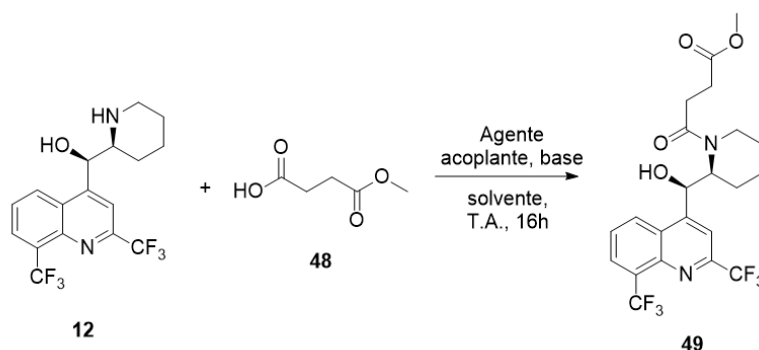


Esquema 23: amidação de MQ e anidrido succínico.

Em um tubo de ensaio, cloridrato de MQ (1 eq; 100 mg; 0,24 mmol), anidrido succínico (2 eq; 48mg; 0,48 mmol), Et₃N (3 eq; 101 μ L; 0,72 mmol) e THF (3 mL) foram adicionados. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética à temperatura ambiente e, após 16h, analisado por LCMS, que indicou a formação do produto desejado (Shimadzu - TR =1,78 min; M/z = 477; positivo), porém ainda havia a presença de material de partida (Shimadzu - mefloquina; TR = 1,44 min; M/z = 379; positivo). DMF foi adicionado para melhor solubilização dos reagentes e o sistema foi mantido sob agitação e aquecido a 55 °C. Após 1,5 h, um novo LCMS indicou que a reação ainda não foi completa, portanto a reação foi aquecida a 66 °C, o que levou à solubilização completa dos reagentes. A reação foi acompanhada por LCMS após 2,5 h, porém, novamente, foi notada a presença de material de partida. Assim, a reação foi deixada por mais 20 h sob agitação constante e à 66 °C. Um novo LCMS (Shimadzu) indicou novamente a presença de mefloquina. A agitação e o aquecimento foram, então, interrompidos e o solvente foi removido por rotaevaporação à 40 °C. Em seguida, o sólido obtido foi dissolvido em MeOH e a solução foi passada em uma coluna de troca iônica (Biotage Isolute PE-AX). O solvente foi coletado (L1) e a coluna foi eluída com 2 M de ácido fórmico em MeOH, sendo que o solvente foi novamente coletado (L2). Ambas frações foram analisadas por LCMS, que

indicou que o processo de purificação não foi eficiente, sendo que o produto de interesse foi coletado em L1 junto com outras impurezas. O material foi, então, descartado.

3.3.19. *Amidação de mefloquina e monometil succinato (adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016)*



Esquema 24: amidação de MQ e succinato de monometila.

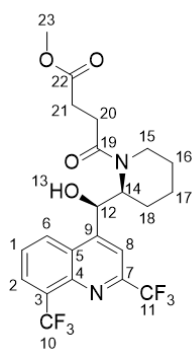
Método A: monometil succinato (2 eq; 6 mg; 0,050 mmol), DIPEA (5 eq; 16,4 μ L; 0,12 mmol), T3P 50% (m/m) em acetato de etila (2,1 eq; 30 μ L; 0,051 mmol) e MeCN (1 mL) foram adicionados em um tubo de ensaio e mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Cloridrato de mefloquina (1 eq.; 10 mg; 0,024 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação constante. Após 5h, acompanhou-se o andamento por LCMS, que indicou a presença de mefloquina (Shimadzu - TR = 1,50; M/z = 379; positivo) e formação de uma pequena quantidade de produto (Shimadzu - TR = 1,90 min; M/z = 515; positivo). Após ~16 h de reação, um novo LCMS indicou grande quantidade de material de partida e pouco produto, então a reação foi interrompida e descartada.

Método B: monometil succinato (2 eq; 16 mg; 0,12 mmol), EDC.HCl (2,1 eq; 24 mg; 0,13 mmol), DIPEA (5 eq; 53 μ L; 0,30 mmol) e MeCN (3 mL) foram adicionados em um tubo de ensaio e mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente por 15 min. Cloridrato de mefloquina (1 eq.; 25 mg; 0,06 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação constante. A reação foi acompanhada por LCMS (Shimadzu) após 1 h, 4 h e 16 h. Foi observada a formação de produto e diminuição da quantidade de mefloquina.

Método C: monometil succinato (2 eq; 6 mg; 0,050 mmol), EDC.HCl (2,1 eq; 10 mg; 0,051 mmol), HOBT (2,1 eq.; 7mg; 0,051 mmol), DIPEA (5 eq; 16,4 μ L; 0,12 mmol) e MeCN (1 mL) foram adicionados em um tubo de ensaio e mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 min. Cloridrato de mefloquina (1 eq.; 10 mg; 0,024 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação constante. Após ~16 h de reação, o acompanhamento por LCMS (Shimadzu) indicou consumo de mefloquina e formação de produto.

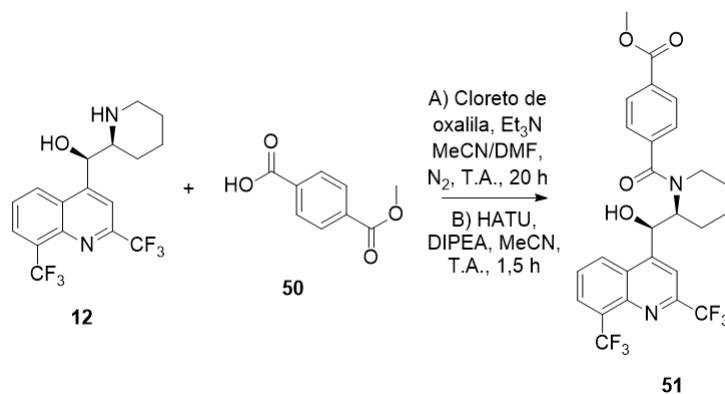
Método D: monometil succinato (2 eq; 6 mg; 0,050 mmol), COMU (2,1 eq; 22 mg; 0,051 mmol), DIPEA (5 eq; 16,4 μ L; 0,12 mmol) e DMF (1 mL) foram adicionados em um tubo de ensaio, resfriados em banho de gelo (0 °C) e mantidos sob agitação magnética por 10 min. Cloridrato de mefloquina (1 eq.; 10 mg; 0,024 mmol) foi adicionado e, após 1 h da adição, o banho de gelo foi removido. A reação foi acompanhada por LCMS (Shimadzu) após 16 h, sendo notada formação de produto.

Método E: monometil succinato (2 eq; 318 mg; 2,4 mmol), HATU (2,1 eq; 960 mg; 2,5 mmol), DIPEA (5 eq; 822 μ L; 6,0 mmol) e MeCN (10 mL) foram adicionados em um balão de uma boca de 25 mL e mantidos sob agitação magnética, atmosfera de N₂ e à temperatura ambiente por 10 min. Cloridrato de mefloquina (1 eq.; 500 mg; 1,2 mmol) foi adicionado e a reação foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação constante. Um LCMS (Shimadzu) após 2 h de reação indicou o consumo completo de mefloquina e formação de produto. Assim, a agitação foi interrompida e a reação diluída com uma alíquota de DCM (~10 mL). Água foi adicionada ao sistema (~20 mL) e a fração orgânica foi separada com um separador de fase (Biotage Isolute *Phase Separator*) e o solvente foi removido por rotaevaporação à 40 °C. O sólido obtido foi purificado por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e heptano/AcOEt como fase móvel. Variou-se a concentração de AcOEt de 0% a 60% ao longo do processo. Frações desejadas foram separadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C) e *blowdown* de N₂ (4 h, 40 °C). Foram obtidos 350,1 mg de produto com pureza de 95% (MeOH como contaminante, confirmado por ¹H RMN) com o aspecto de um sólido cristalino branco (rendimento = 56%; 0,68 mmol).



¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 9,02 (d, J = 8,7 Hz, 1H, H2), 8,33 (d, J = 7,3 Hz, 1H, H6), 8,11 (s, 1H, H8), 7,94 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H1), 6,21 (d, J = 4,9 Hz, 1H, H13), 5,71 (t, J = 5,9 Hz, 1H, H12), 4,79-4,71 (m, 1H, H14), 3,68 (d, J = 13,4 Hz, 1H, H15), 3,48 (s, 3H, H23), 3,46-3,41 (m, 1H, H15), 2,51 (s, 9H, H20 ou H21 e DMSO-D₆), 2,29-2,22 (m, 2H, H20 ou H21), 2,05-1,96 (M, 1H, H18), 1,94-1,82 (M, 1H, H17), 1,73-1,65 (m, 1H, H16), 1,56-1,41 (m, 2H, H16 e H17), 1,26, 1,21 (m, 1H, H18). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO) δ 173,04 (C19 ou C22), 170,49 (C19 ou C22), 153,99, 147,08, 146,74, 143,27, 130,35 (C2), 129,97, 129,91 (C6), 128,09, 127,88 (C1), 127,82, 127,57, 127,28, 125,60, 123,14, 122,88, 120,41, 116,08 (C8), 69,35 (C12), 53,68 (C14), 51,50 (C23), 41,95 (C15), 29,01 (C20 ou C21), 28,18 (C20 ou C21), 24,92 (C16), 22,97 (C18), 19,05 (C17). LCMS M/z = 515 (M + Na)⁺.

3.3.20. *Amidação de mefloquina e tereftalato de monometila (adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016)*



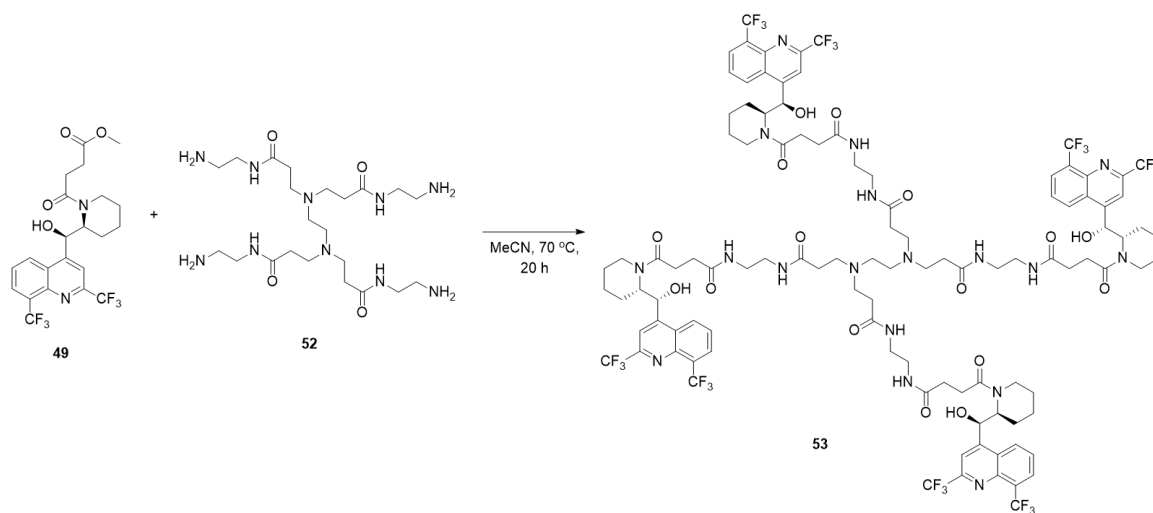
Esquema 25: amidação de MQ e tereftalato de monometila.

Método A: Em um tubo de ensaio em banho de gelo (0 °C), sob agitação magnética constante e atmosfera de N₂, tereftalato de monometila (2 eq.; 87 mg; 0,48 mmol) e MeCN (3 mL) foram adicionados. Em seguida, cloreto de oxalila (2,1 eq.; 43 µL; 0,51 mmol) e DMF (10 µL) foram adicionados. Após 20 min, cloridrato de MQ (1 eq.; 100 mg; 0,24 mmol) e Et₃N (3 eq.; 101 µL; 0,72 mmol) foram adicionados, removendo-se o banho de gelo em sequência. Após 50 min de reação, um LCMS indicou que produto não havia sido formado, assim a reação foi deixada sob temperatura ambiente, agitação magnética constante e atmosfera de N₂ por mais 19h. Uma nova análise por LCMS não indicou a formação de produto. A reação foi interrompida e ~5 mL de H₂O e ~10 mL de EtOAc foram adicionados. A fase orgânica foi separada, lavada 3x com solução aquosa saturada de NaCl, seca com Na₂SO₄ e rotaevaporada (40 °C). O sólido foi dissolvido em 0,5 mL de DMSO e purificado por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações obtidas foram coletadas e secas em um evaporador centrífugo (Genevac). Nenhuma das frações coletadas correspondia ao produto de interesse (análises por RMN).

Método B: em um tubo de ensaio à temperatura ambiente, sob agitação magnética constante e atmosfera de N₂, foram adicionados tereftalato de monometila (2 eq.; 22 mg; 0,12 mmol), HATU (2,1 eq.; 48 mg; 0,13 mmol), DIPEA (5 eq.; 41 µL; 0,30 mmol) e MeCN (3 mL). Após 10 min, cloridrato de MQ (1 eq.; 25 mg; 0,06 mmol) foi adicionado. Após 1,5 h de reação, uma análise por LCMS mostrou consumo completo de material de partida e formação de produto (Shimadzu - TR = 1,75 min; M/z = 541; positivo). ~10 ml de DCM e ~5 mL de H₂O foram adicionados, a fase orgânica foi coletada com um separador de fase (Biotage Isolute *Phase Separator*) e rotaevaporada (40 °C). O sólido obtido foi dissolvido em MeOH e passado em uma coluna de troca catiônica (Biotage Isolute SCX-2), a qual foi lavada 2x com MeOH (fração coletada SCX1) e com 2 M NH₃ em MeOH (fração coletada SCX2). Análise por LCMS indicou que não houve nenhuma separação (todo material foi coletado na SCX1). Assim, a fração SCX1 foi rotaevaporada (40 °C), dissolvida em EtOAc e purificada por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e heptano/AcOEt como fase móvel (0

a 60% de EtOAc em heptano). Apenas uma fração pura foi coletada, mas análise por RMN indicou que não se tratava de produto. As frações com mistura foram combinadas, rotaevaporadas (40 °C), dissolvidas em uma pequena alíquota de DMSO (o volume foi ajustado para 1 mL com a adição de H₂O:MeCN 1:1) e purificadas por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações obtidas foram coletadas e secas em um evaporador centrífugo (Genevac). Nenhuma das frações coletadas correspondia ao produto de interesse (análises por RMN).

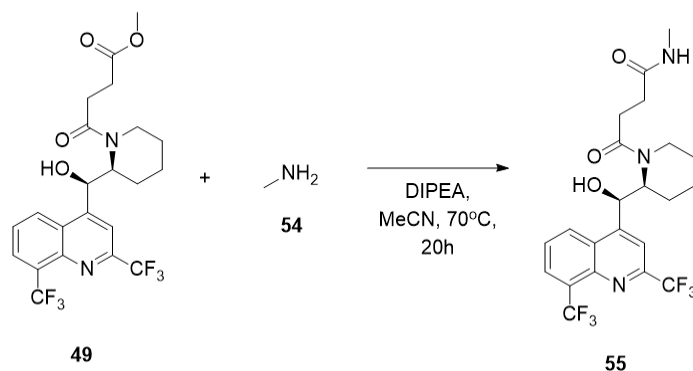
3.3.21. Ligação de MQMS a PAMAM G0 (adaptado de VOLLHARDT, SHORE, 2007 e CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012)



Esquema 26: aminólise de MQMS por PAMAM G0.

MQMS (1 eq; 50 mg; 0,10 mmol), PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1,1 eq; 321 µL; 0,11 mmol), DIPEA (2 eq; 26 µL; 0,19 mmol) e MeCN (1 mL) foram adicionados em um tubo selado sob agitação magnética e mantidos a 70 °C. Após 20h, análise por LCMS indicou que não foi formado produto de interesse, havendo apenas material de partida (Shimadzu - TR = 1,90 min; M/z = 515; positivo).

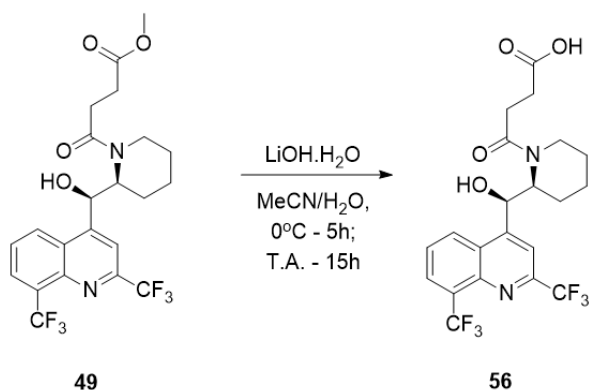
3.3.22. Aminólise de MQMS (adaptado de VOLLHARDT, SHORE, 2007 e CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012)



Esquema 27: aminólise de MQMS por metilamina.

MQMS (1 eq.; 25 mg; 0,048 mmol), metilamina (2 eq.; 48 μL ; 0,096 mmol), DIPEA (2 eq.; 48 μL ; 0,096 mmol) e MeCN (1 mL) foram adicionados a um tubo selado e mantidos sob agitação magnética à 70 °C. Após 20h de reação, uma análise por LCMS indicou a presença de material de partida (Shimadzu - TR = 1,90 min; M/z = 515; positivo) e ausência de produto, assim a reação foi interrompida e MQMS foi recuperada pela rotaevaporação (50 °C) dos outros reagentes/solvente.

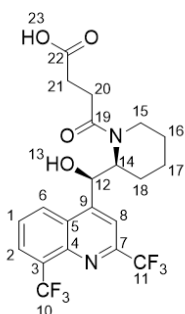
3.3.23. *Hidrólise do éster de MQMS (adaptado de CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012)*



Esquema 28: desproteção do éster de MQMS.

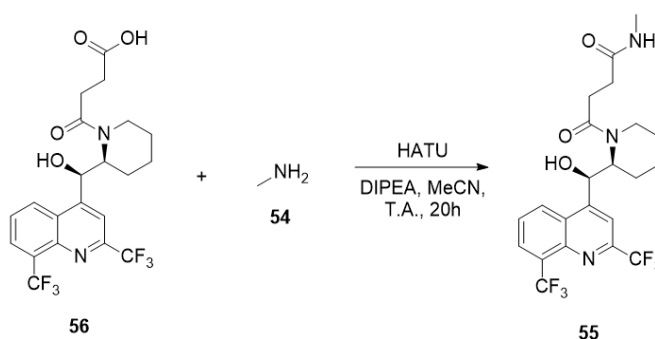
MQMS (1 eq; 210 mg; 0,41 mmol) e MeCN (4 mL) foram adicionados a um tubo de ensaio e mantidos em banho de gelo (0°C) Após 15 min, LiOH.H₂O (1,1 eq; 19 mg; 0,45 mmol) dissolvido em H₂O (18 eq; 600 μl ; 33 mmol) foi adicionado. A reação foi mantida no banho de gelo e sob agitação magnética por 5h e um acompanhamento por LCMS indicou uma taxa de conversão de ~50% (Shimadzu - TR = 1,78 min; M/z = 477; negativo). Assim, a reação foi deixada por mais 15 h à temperatura ambiente, entretanto, apesar de uma maior conversão, ainda havia a presença de material de partida (Shimadzu - TR = 1,90 min; M/z = 515; positivo).

Análises de LCMS após 26 e 28 h não indicaram maior conversão, assim a reação foi interrompida, diluída com DCM e lavada com solução saturada de NH_4Cl . A fase orgânica foi coletada e o solvente rotaevaporado (40°C). O sólido obtido foi dissolvido em metanol e passado em uma coluna de troca aniônica (Biotage Isolute PE-AX). A coluna foi lavada 2x com MeOH e o solvente foi coletado (fração PX-1). Em seguida, a coluna foi lavada 2x com solução 2M de ácido fórmico em MeOH, e a fração foi coletada em outro frasco (PX-2). Análise por LCMS indicou a presença de produto puro na fração PX-2, assim o solvente foi removido por rotaevaporação (40°C), sendo obtidos 126 mg de produto (rendimento = 62%; 0,25 mmol; pureza considerada = 95%).



^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 9,06 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H2), 8,34 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H6), 8,12 (s, 1H, H8), 7,96 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, H1), 6,20 (s, 1H, H13), 5,73 (s, 1H, H12), 4,68 (s, 1H, H14), 3,71 (d, $J = 13,7$ Hz, 1H, H15), 3,48 (t, $J = 13,2$ Hz, 1H, H15), 2,51 (s, 25H, H20 ou H21), 2,23 (s, 2H, H20 ou H21), 2,01 – 1,81 (m, 2H, H17 e H18), 1,68 (s, 1H, H16), 1,57 – 1,34 (m, 2H, H16 e H17), 1,19 (s, 1H, H18). LCMS $\text{M/z} = 477$ (M-H).

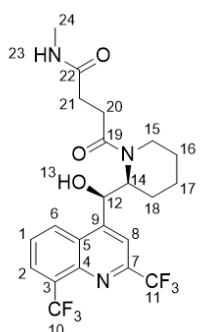
3.3.24. Amidação de MQSuc (adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016)



Esquema 29: amidação de MQSuc com metilamina.

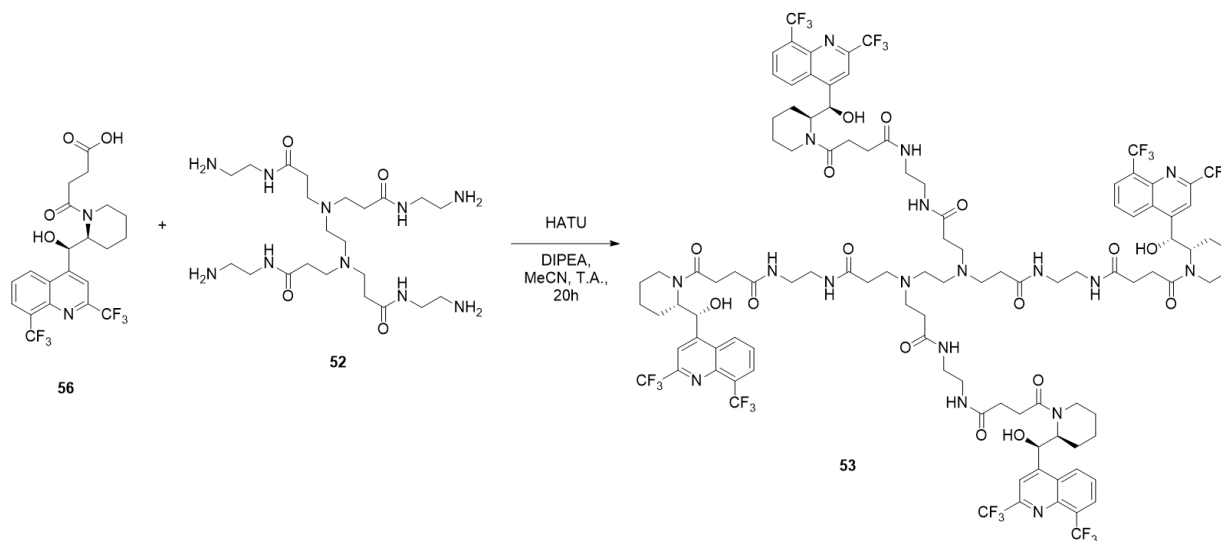
Em um tubo de ensaio sob agitação magnética e à temperatura ambiente, foram adicionados MQSuc (1 eq; 25 mg; 0,05 mmol), DIPEA (2,5 eq; 18 μL ; 0,13mmol), HATU (2,1 eq; 42 mg; 0,11 mmol) e MeCN (1 mL). Após 5 min, metilamina (2 eq; 52 μL ; 0,10 mmol) foi adicionada. Após 20 h, uma análise de LCMS mostrou o consumo total de MQSuc (Shimadzu - TR = 1,78 min; $\text{M/z} = 477$; negativo) e a formação de produto (Shimadzu - TR = 1,75 min; $\text{M/z} = 492$; positivo) então a reação foi diluída com ~5 mL de DCM, e lavada com H_2O . A fase orgânica foi coletada e o solvente foi removido. Em seguida, o sólido obtido foi dissolvido em 1 mL de DMSO e purificado por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em

uma corrida de 11 min de duração. As frações obtidas foram coletadas e secas em um evaporador centrífugo (Genevac). Ao final, 19,2 mg de produto foram obtidos (rendimento = 75%; 0,04 mmol)



^1H RMN (400 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm): 9,06 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H2), 8,34 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H6), 8,12 (s, 1H, H8), 7,95 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H1), 7,62 (s, 1H, H23), 6,18 (s, 1H, H13), 5,73 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H, H12), 4,70 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, H14), 3,72 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H15), 3,47 (t, $J = 13,6$ Hz, 1H, H15), 2,50 (s, 11H, H20 ou H21 e H24), 2,37 – 2,22 (m, 1H, H20 ou H21), 2,20 – 2,04 (m, 2H, H20 ou H21), 1,99 – 1,90 (m, 1H, H18), 1,89 – 1,81 (m, 1H, H17), 1,76 – 1,63 (m, 1H, H16), 1,53 – 1,38 (m, 2H, H16 e H17), 1,20 (s, 1H, H18). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm): 171,99 (C19 ou C22), 171,27 (C19 ou C22), 154,17, 147,11, 146,77, 143,23, 130,34 (C2), 130,04 (C6), 127,97 (C1), 127,72, 127,27, 125,59, 122,87, 115,91 (C8), 69,61 (C12), 53,78 (C14), 42,05 (C15), 30,78 (C20 ou C21), 28,88 (C20 ou C21), 25,86 (C24), 24,79 (C16), 22,64 (C18), 19,09 (C17). LCMS M/z: 492 (M + H) $^+$ e 514 (M + Na) $^+$.

3.3.25. Ligação de MQSuc com PAMAM G0 (adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016)

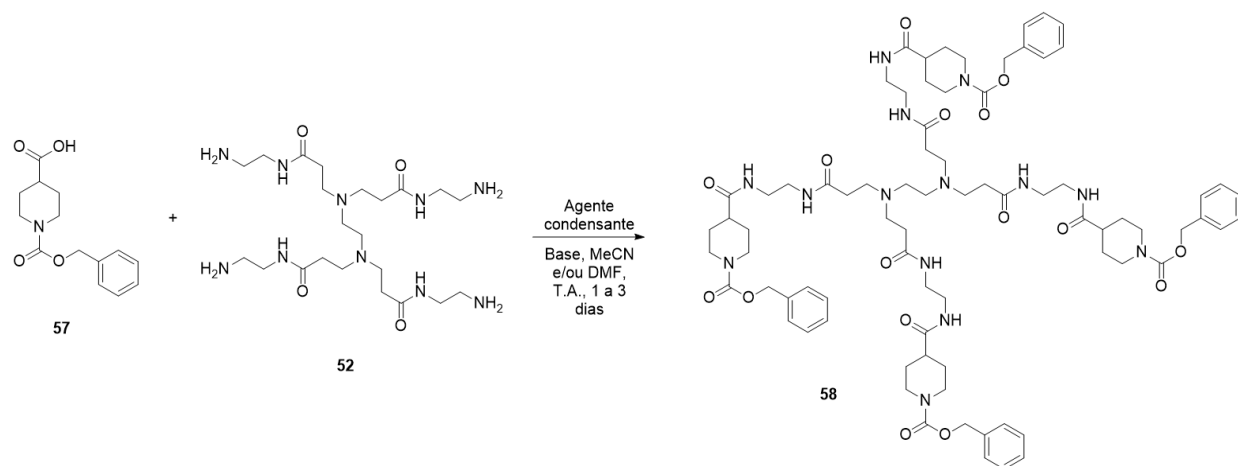


Esquema 30: amidação de MQSuc e PAMAM G0.

MQSuc (4 eq; 19 mg; 0,039 mmol), DIPEA (4,5 eq; 6 μL ; 0,044 mmol), HATU (4,1 eq; 15 mg; 0,40 mmol) e MeCN (1mL) foram adicionados a um tubo de ensaio e mantido sob agitação constante à temperatura ambiente por 5 min. PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq; 30 μL ; 0,097 mmol) foi adicionado e após 20h, notou-se a formação de diferentes produtos. A reação foi então interrompida, diluída com 5 mL de DCM e lavada com água. A fase aquosa e a fase orgânica foram secas por rotaevaporação (60 $^{\circ}\text{C}$ e 40 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente). Os materiais obtidos foram dissolvidos em 1 mL de DMSO cada e purificados por HPLC preparativo (Gilson,

coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações coletadas de cada purificação foram secas em um evaporador centrífugo (Genevac) e analisadas por RMN, entretanto nenhuma fração correspondia a produto. Em uma variação do *workup*, não foi realizada a diluição de DCM e lavagem com água, sendo o meio reacional seco diretamente por rotaevaporação, diluído em 1 mL de DMSO e purificado por HPLC preparativo, porém as frações coletadas não correspondiam a produto.

3.3.26. Ligação de ácido 1-((benziloxi)carbonil)piperidin-4-óico (ácido BCP) a PAMAM G0 (adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016 e BEUTNER et al., 2018)



Esquema 31: amidação de ácido BCP e PAMAM G0.

Método A: ácido BCP (4 eq; 20 mg; 0,077 mmol), DIPEA (4,5 eq; 12 μ L; 0,087 mmol), T3P 50% (m/m) em acetato de etila (4,4 eq; 51 μ L; 0,085 mmol), PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq; 58 μ L; 0,02 mmol) e MeCN (0,5 mL) foram adicionados a um tubo de ensaio à temperatura ambiente e sob agitação magnética constante. Após 16 h, uma análise de LCMS indicou a presença de grande quantidade de reagente ácido (Shimadzu - TR = 1,42 min; M/z = 262; negativo). A reação foi então descartada.

Método B: ácido BCP (4 eq; 81,5 mg; 0,31 mmol), MeCN (1,25 mL), DIPEA (4,5 eq; 48 μ L; 0,35 mmol), EDC.HCL (4,4 eq.; 65 mg; 0,34 mmol) e PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq; 234 μ L; 0,08 mmol) foram adicionados a um tubo de ensaio à temperatura ambiente e sob agitação magnética constante. Após 48 h, uma análise de LCMS indicou consumo quase completo de reagente ácido (Shimadzu - TR = 1,42 min; M/z = 262; negativo). Após mais 24 h, outra análise por LCMS indicou que não houve consumo adicional de ácido, então a reação foi interrompida e diluída com ~5 mL de H₂O e o pH da solução foi aumentado para 12 com adição de uma solução aquosa 35% de NH₄OH. então a reação foi interrompida e diluída com ~5 mL de H₂O e o pH da solução foi aumentado para 12 com adição de uma solução aquosa 35% de NH₄OH. A solução aquosa foi extraída 4x com DCM e as frações orgânicas foram combinadas,

rotaevaporadas (40 °C) e dissolvidas em 3,0 mL de DMSO. Foi realizada uma purificação por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações coletadas foram secas em um evaporador centrífugo (Genevac). Uma análise por espectrometria de massas de alta resolução indicou que uma das frações continha produto, porém com impurezas. Dessa forma, foram obtidos 6,7 mg de produto oleoso amarelado (rendimento = 6%; 0,004 mmol; pureza não determinada).

Método C: ácido BCP (4,1 eq; 42 mg; 0,16 mmol), MeCN (0,25 mL), DMF (10 µL) e DIPEA (4,5 eq; 24 µL; 0,17 mmol) foram adicionados a um tubo de ensaio à temperatura ambiente e sob agitação magnética constante. Após 10 min, cloreto de oxalila (4,4 eq.; 8 µL; 0,17 mmol) foi adicionada. Em outro tubo, foi retirado o solvente de PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq; 117 µL; 0,04 mmol) por rotaevaporação (40 °C) e o dendrímero foi dissolvido em MeCN (0,5 mL). A solução de dendrímero foi adicionada ao tubo reacional. Após 2 h, uma análise de LCMS indicou a presença de reagente ácido (Shimadzu - TR = 1,42 min; M/z = 262; negativo), assim a reação foi deixada por mais 16 h sob agitação constante à temperatura ambiente. Após o período, outra análise por LCMS indicou que não houve consumo adicional de ácido, então a reação foi interrompida e diluída com ~5 mL de H₂O e o pH da solução foi aumentado para 12 com adição de uma solução aquosa 35% de NH₄OH. A solução aquosa foi extraída 4x com DCM e as frações orgânicas foram combinadas, rotaevaporadas (40 °C) e dissolvidas em 1,7 mL de DMSO. Foi realizada uma purificação por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações coletadas foram secas em um evaporador centrífugo (Genevac). Análise por *cryo* RMN e espectrometria de massa de alta resolução indicou que o material coletado correspondia a produto e com um alto grau de pureza. 1,4 mg de produto líquido, oleoso e levemente amarelado foram coletados (rendimento = 2,5%; 0,001 mmol; pureza >99%). Tal produto e reação serviu de modelo para a análise do obtido em outras sínteses, as quais tinham por objetivo aumentar o rendimento reacional.

Método D: ácido BCP (4,1 eq; 18 mg; 0,068 mmol), MeCN (0,25 mL), DMF (5 µL) e cloreto de oxalila (4,4 eq.; 4 µL; 0,073 mmol) foram adicionados a um tubo de ensaio em banho de gelo (0 °C). Após 5 min, Et₃N (4,5 eq; 11 µL; 0,074 mmol) foi adicionada. Em outro tubo, foi retirado o solvente de PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq; 50 µL; 0,016 mmol) por rotaevaporação (40 °C) e o dendrímero foi dissolvido em MeCN (0,25 mL). A solução de dendrímero foi adicionada ao tubo reacional resfriado. Notou-se uma baixa solubilidade dos reagentes, então 0,5 mL de MeCN foram adicionados. O banho de gelo foi então retirado e a reação mantida sob atmosfera de N₂ e agitação magnética à temperatura ambiente. Após 16 h, uma análise de LCMS indicou a formação de produto (Shimadzu - RT = 1,64; M/z = 750; positivo). A reação foi então diluída com ~5 mL de DCM e ~5 mL de solução aquosa saturada de NaHCO₃ foram adicionados. As fases foram separadas e a aquosa foi lavada 4x com alíquotas de DCM. As frações orgânicas foram coletadas, concentradas por rotaevaporação (40 °C) e dissolvidas em 2 mL de DMSO. Foi realizada uma purificação por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção

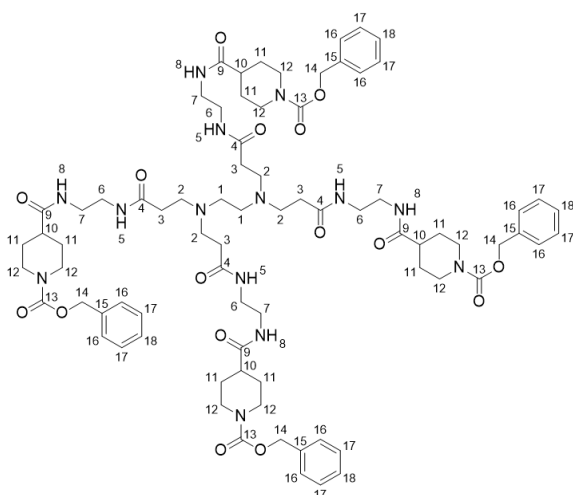
de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações coletadas de foram secas em um evaporador centrífugo (Genevac), e análise por ^1H RMN indicou que o material coletado correspondia a produto, porém com uma possível contaminação por material de partida. 8,5 mg de produto líquido, oleoso e levemente amarelado foram coletados (rendimento = 33%; 0,005 mmol; pureza não determinada).

Método E: ácido BCP (4,1 eq; 18 mg; 0,068 mmol), THF (0,5 mL), DMF (5 μL) e cloreto de oxalila (4,4 eq.; 4 μL ; 0,073 mmol) foram adicionados a um tubo de ensaio em banho de gelo (0 $^\circ\text{C}$). Após 5 min, Et_3N (4,5 eq; 22 μL ; 0,148mmol) foi adicionado. Em outro tubo, foi retirado o solvente de PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq; 50 μL ; 0,016 mmol) por rotaevaporação (40 $^\circ\text{C}$) e o dendrímero foi dissolvido em THF (0,5 mL). A solução de dendrímero foi adicionada ao tubo reacional resfriado. O banho de gelo foi então retirado e a reação mantida sob atmosfera de N_2 e agitação magnética à temperatura ambiente. Após 16 h, uma análise de LCMS indicou a formação de produto (Shimadzu - TT = 1,64; M/z = 750; positivo). A reação foi então diluída com ~5 mL de DCM e ~5 ml de solução aquosa saturada de NaHCO_3 foram adicionados. As fases foram separadas e a aquosa foi lavada 4x com alíquotas de DCM. As frações orgânicas foram coletadas, concentradas por rotaevaporação (40 $^\circ\text{C}$) e dissolvidas em 2 mL de DMSO. Foi realizada uma purificação por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações coletadas de foram secas em um evaporador centrífugo (Genevac), porém a análise por ^1H RMN indicou que o material coletado não correspondia a produto.

Método F: ácido BCP (4,1 eq; 18 mg; 0,068 mmol), *N*-metilimidazol (NMI - 12,7 eq.; 17 μL ; 0,21mmol), hexafluorofosfato de cloro-*N,N,N',N'*-tetrametil-formamidínio (TCFH - 4,6 eq; 21 mg; 0,076 mmol), PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq; 50 μL ; 0,016 mmol; o solvente foi retirado antes da adição ao meio reacional) e MeCN (1 mL) foram adicionados a um tubo de ensaio. A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 16 h, uma análise de LCMS indicou a formação de produto (Shimadzu - RT = 1,63; M/z = 750; positivo), porém, notou-se a presença do material de partida ácido (Shimadzu - TR = 1,42; M/z = 262; negativo). A reação foi então diluída com ~5 mL de DCM e ~5 ml de solução aquosa saturada de NaHCO_3 foram adicionados. As fases foram separadas e a aquosa foi lavada 4x com alíquotas de DCM. As frações orgânicas foram coletadas, concentradas por rotaevaporação (40 $^\circ\text{C}$) e dissolvidas em 2 mL de DMSO. Foi realizada uma purificação por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações coletadas de foram secas em um evaporador centrífugo (Genevac). 6,7 mg de um líquido oleoso amarelado correspondente a produto foram obtidos (rendimento = 25%; 0,004 mmol; 95% de pureza)

Método G: ácido BCP (4,1 eq; 18 mg; 0,068 mmol), MeCN (0,5 mL), DMF (5 μL) e cloreto de oxalila (4,4 eq.; 4 μL ; 0,073 mmol) foram adicionados a um tubo de ensaio em banho de gelo (0 $^\circ\text{C}$). Após 5 min, 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-5-eno (DBU - 9 eq; 22 μL ; 0,148mmol) foi adicionado. Em outro tubo, foi retirado o solvente de PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq;

50 μL ; 0,016 mmol) por rotaevaporação (40 $^{\circ}\text{C}$) e o dendrímero foi dissolvido em MeCN (0,5 mL). A solução de dendrímero foi adicionada, após 30 min, gota a gota ao tubo reacional resfriado. O banho de gelo foi então retirado e a reação mantida sob atmosfera de N_2 e agitação magnética à temperatura ambiente. Após 16 h, uma análise de LCMS indicou a formação de produto (Shimadzu - RT = 1,68; M/z = 750; positivo), porém, notou-se a presença do material de partida ácido (Shimadzu - TR = 1,42; M/z = 262; negativo). Após ~46h de reação, uma nova análise de LCMS indicou que não foi consumido mais material de partida (Shimadzu - TR = 1.,70, M/z = 750; positivo). A reação foi então diluída com ~5 mL de DCM e ~5 ml de H_2O foram adicionados. As fases foram separadas e a aquosa foi lavada 6x com alíquotas de DCM. As frações orgânicas foram coletadas, concentradas por rotaevaporação (40 $^{\circ}\text{C}$) e dissolvidas em 2 mL de DMSO. Foi realizada uma purificação por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. Nenhuma fração foi coletada.

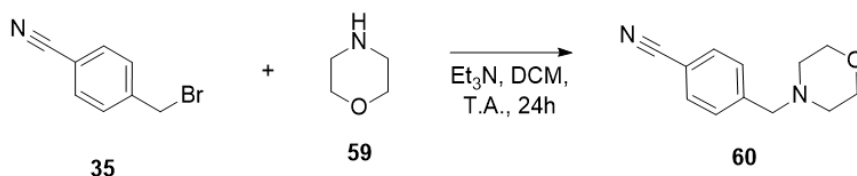


^1H RMN (500 MHz, DMSO- D_6) δ (ppm): 7,95 (s, 1H, H5), 7,86 (s, 1H, H8), 7,39 – 7,28 (m, 5H, H16, H17 e H18), 5.06 (s, 2H, H14), 4.05 – 3.94 (m, 2H, H12), 3,07 (s, 4H, H6 e H7), 2.80 (bs, 2H, H12), 2,66 – 2,59 (m, 2H, H2), 2,41 (s, 1H, H1), 2,27 (tt, J = 11,4, 3,7 Hz, 1H, H10), 2,18 (t, J = 7,1 Hz, 2H, H3), 1,67 (d, J = 12,9 Hz, 2H, H11), 1,48 – 1,36 (m, 2H, H11).

^{13}C RMN (126 MHz, DMSO) δ 174,44 (C9), 172,03 (C4), 154,82 (C13), 137,48 (C15), 128,88 (C16, C17 ou C18), 128,26 (C16, C17 ou C18), 127,94 (C16, C17 ou C18), 66,58 (C14), 51,18 (C1), 50,15 (C2), 43,53 (C12), 42,03 (C10), 38,82 (C6 ou C7),

38,71 (C6 ou C7), 33,70 (C3), 28,59 (C11). LCMS M/z = 1498,71 (M + H) $^+$.

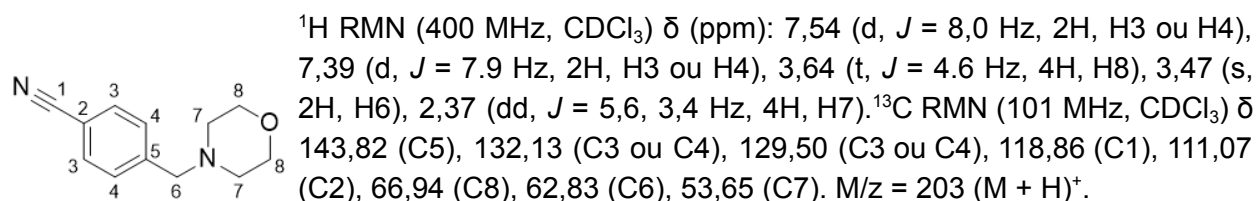
3.3.27. Síntese de 4-(morfolinometil)benzonitrila (BARAGAÑA et al., 2016)



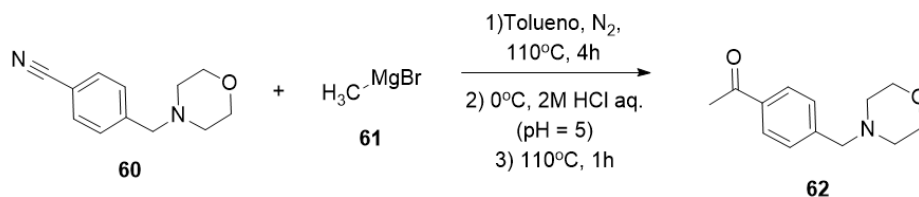
Esquema 32: substituição nucleofílica de 4-(bromometil)benzonitrila e morfolina.

4-(bromometil)benzonitrila (1 eq; 1g; 4,8 mmol), morfolina (1,55 eq; 655 μL , 7,5 mmol), Et_3N (2,1 eq; 1418 μL ; 10,2 mmol) e DCM (25 mL) foram adicionados a um balão e mantidos

sob agitação magnética à 25°C por 24h. Uma análise de LCMS indicou a formação de produto (Shimadzu - TR = 0,42; M/z = 203; positivo) e o consumo total de 4-(bromometil)benzocianeto. O conteúdo reacional foi então lavado com solução aquosa saturada de NaHCO₃ e, em seguida, o solvente da fração orgânica foi rotaevaporado e o material purificado por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel. Variou-se a concentração de MeOH de 0% a 2,5% ao longo do processo (0% MeOH por 1 min, 0-2,5% durante 15 min e 2,5% por 5 min). Frações desejadas foram separadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). Obteve-se 855,2 mg de um sólido (rendimento 87%; 4,2 mmol) correspondente a produto.



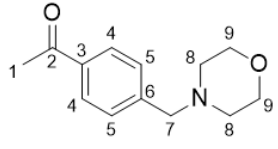
3.3.28. Síntese de 1-(4-(morfolinometil)fenil)etan-1-ona (BARAGAÑA et al., 2016)



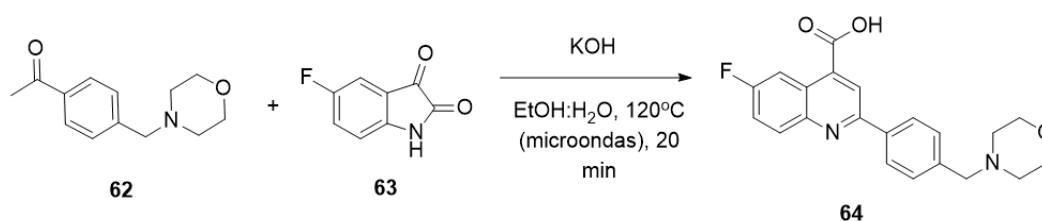
Esquema 33: reação de Grignard para formação de 1-(4-(morfolinometil)fenil)etan-1-ona.

4-(morfolinometil)benzocianeto (1 eq.; 600mg; 3,0 mmol) e tolueno (20mL) foram adicionados a um tubo selado e sob uma atmosfera de N₂. Em seguida, cloreto de metilmagnésio (3 eq.; 3 mL; 9,0 mmol) foi adicionado e a reação foi aquecida a 110 °C e mantida sob agitação magnética (a adição de reagente de Grignard levou a precipitação de material). Após 4 h, a reação foi resfriada em banho de gelo (0 °C) e acidificada (pH < 5) com solução aquosa 2 M de HCl. O sistema foi aquecido novamente a 110 °C por 1 h. Após esse período, deixou-se a reação atingir temperatura ambiente e, então, as frações orgânica e aquosa foram separadas e a fase orgânica foi extraída 1x com solução aquosa 2 M de HCl. As frações aquosas foram então combinadas, lavadas com EtOAc e o pH foi elevado para > 10 com uma solução aquosa ~30% NH₄OH. A fase aquosa foi extraída com DCM até que não se notou mais produto por LCMS (Shimadzu - TR = 0,69 min; M/z = 220; positivo). A fase orgânica foi rotaevaporada (40 °C) e purificada por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel. Variou-se a concentração de MeOH de 0% a 2,5% ao longo do processo (0% MeOH por 1 min, 0-2,5% durante 12 min e 2,5% por 5 min). Frações desejadas foram separadas e o solvente foi

removido por rotaevaporação (40 °C). 510,2 mg de um sólido (rendimento 74%; 2,21 mmol; pureza estimada = 95%) correspondente a produto.

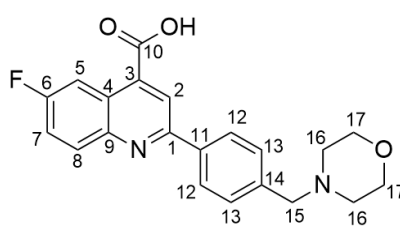
 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,89 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H3 ou H4), 7,42 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H3 ou H4), 3,69 (dd, *J* = 5,5, 3,6 Hz, 4H, H9), 3,53 (s, 2H, H7), 2,56 (s, 3H, H1), 2,48 – 2,39 (m, 4H, H8). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 197,46 (C2), 143,64 (C6), 136,33 (C3), 129,03 (C4 ou C5), 128,31 (C4 ou C5), 66,92 (C9), 62,93 (C7), 53,66 (C8), 26,40 (C1). LCMS M/z = 220 (M+H)⁺.

3.3.29. Síntese de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico (BARAGAÑA *et al.*, 2016)



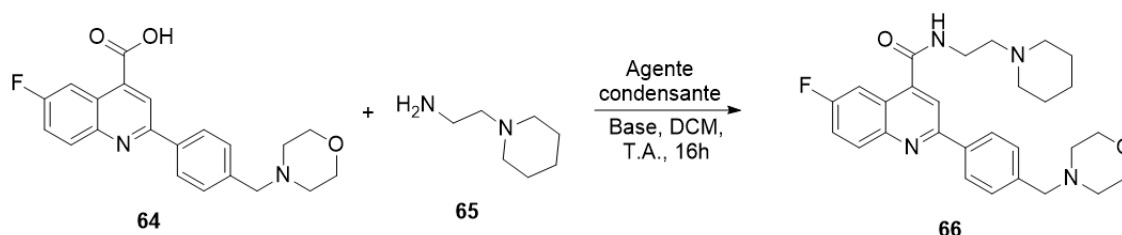
Esquema 34: reação de expansão de anel para síntese de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico

5-fluorisatina (1 eq.; 996 mg; 6,0 mmol), KOH (10 eq; 3386 mg, 60 mmol), 1-[4-(morfolinometil)fenil]etanona (1 eq.; 1438 mg; 6.0 mmol), EtOH (8mL) and H₂O (8mL) foram adicionados a um frasco, mantidos sob agitação magnética e aquecidos a 120 °C por radiação de microondas durante 20 minutos (reator Biotage Initiator+). Análise por LCMS indicou a formação do produto (Shimadzu - TR = 1,09 min; M/z = 367; +ve). Em seguida, o material foi diluído com 85 mL de H₂O e acidificado com solução aquosa 2M de HCl até a ocorrência de precipitação (pH 7-8). O sólido foi coletado por filtração e lavado com EtOAc, entretanto, uma análise de RMN indicou a presença de impurezas desconhecidas, assim o sólido foi lavado novamente com ~20 mL de H₂O e ~150 mL de EtOAc. 1301 mg de material sólido alaranjado foram obtidos (rendimento = 56%; 3,37 mmol; pureza estimada = 95%)

 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,53 (s, 1H, H2), 8,49 (dd, *J* = 11,0, 3,0 Hz, 1H, H5), 8,25 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H12 ou 13), 8,24 – 8,16 (m, 1H, H7 ou H8), 7,78 (td, *J* = 8,5, 3,0 Hz, 1H, H7 ou H8), 7,54 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H12 ou H13), 3,64 – 3,61 (m, 6H, H15 e H17), 2,48 (s, 3H, H16). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO) δ (ppm) 167,81 (C10), 161,89 (C6), 159,94, 155,73, 146,31, 139,77, 137,19, 133,05 (d, *J* = 9,8 Hz, C7 ou C8), 130,20 (C12 ou C13), 127,55 (C12 ou

C13), 120,80 (C7 ou C8), 120,60 (C2), 109,80 (d, $J = 24,5$ Hz, C5), 66,44 (C17), 62,28 (C15), 53,51 (C16). LCMS $M/z = 367$ (M + H)⁺; $M/z = 365$ (M - H)⁻.

3.3.30. Amidação final de análogo piperidínico de 498 (síntese de 498P) (adaptado de BARAGANA *et al.*, 2016)

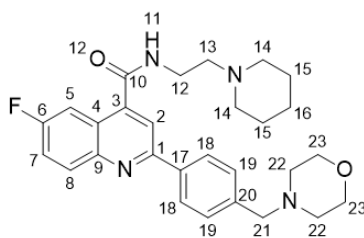


Esquema 35: amidação de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico para síntese de 498P.

Método A: Ácido 6-fluoro-2-[4-(morfolinometil)fenil]quinolin-4-óico (1 eq.; 50mg; 0,14 mmol), Et₃N (2 eq.; 20μL; 0,14 mmol), HATU (1 eq.; 52 mg; 0,14 mmol), 1-(2-aminoetil)-piperidina (1 eq.; 19 μL; 0,14 mmol) e MeCN (2 mL) foram adicionados a um tubo de ensaio à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Após 16h, uma análise por LCMS indicou a presença de produto (Shimadzu - TR = 0,99; $M/z = 477$; positivo) e ácido de partida (TR = 1,12 min). Assim, a reação foi deixada por mais 24h, o que não resultou em mais consumo de ácido. A reação foi, então, diluída com ~7 ml de DCM e lavada 2x com solução aquosa saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi rotaevaporada (40°C) e o material obtido foi purificado por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel (0-10% MeOH em DCM; 2 min 0%, 30min 0-10%, 10min 10%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40°C). 33,5 mg de produto foram obtidos (rendimento = 51%; 0,07 mmol; pureza = 99% LCMS).

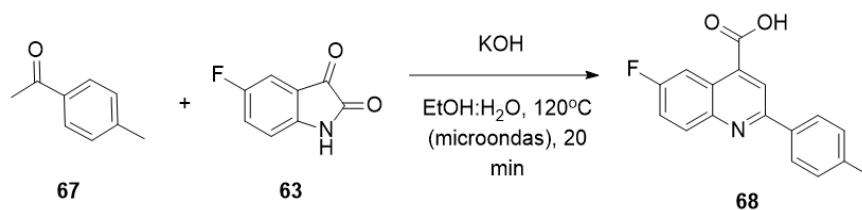
Método B: Ácido 6-fluoro-2-[4-(morfolinometil)fenil]quinolin-4-óico (1 eq.; 500mg; 1,4 mmol), 4-metilmorfolina (2 eq.; 300μL; 2,7 mmol) e DCM (15 mL) foram adicionados a um balão à temperatura ambiente e sob agitação magnética por 5 minutos (até a solubilização total do sistema). Em seguida, CDMT foi adicionado (1,2 eq.; 288 mg; 1,6 mmol) e, após 1h, 1-(2-aminoetil)-piperidina (1 eq.; 194 μL; 1,4 mmol) foi adicionada. Após 16h, uma análise por LCMS indicou o consumo completo do ácido e formação do produto desejado (Shimadzu - TR = 0,97; $M/z = 477$; positivo). A reação foi diluída com ~30 ml de DCM e lavada 3x com solução aquosa saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi rotaevaporada (40°C) e o material obtido foi purificado por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel (0-10% MeOH em DCM; 2 min 0%, 30min 0-10%, 10min 10%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40°C). Impurezas foram notadas em análise por LCMS, assim uma segunda cromatografia *flash* foi realizada utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g e 7M NH₃ em MeOH e DCM (0-10% 7M NH₃-MeOH;

2 min 0%, 23 min 0-10%, 5min 10%). As frações desejadas foram rotaevaporadas (40 °C). 383,1 mg de produto foram obtidos (rendimento = 56%; 0,76 mmol; pureza = 95% LCMS).



^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8,81 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, H11), 8,26 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H18 ou H19), 8,21 – 8,18 (m, 1H, H7 ou H8), 8,17 (s, 1H, H2), 8,08 (dd, $J = 10,3, 2,9$ Hz, 1H, H5), 7,76 (ddd, $J = 9,2, 8,3, 2,9$ Hz, 1H, H7 ou H8), 7,54 – 7,48 (m, 2H, H18 ou H19), 3,61 (t, $J = 4,6$ Hz, 4H, H23), 3,56 (s, 2H, H21), 3,50 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H, H12), 2,52 – 2,50 (m, 5H, DMSO e H13), 2,44 (s, 4H), 2,42 – 2,38 (m, 4H, H22), 1,56 (p, $J = 5,6$ Hz, 4H, H15), 1,46 – 1,39 (m, 3H, H16). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO) δ (ppm): 166,62 (C10), 161,50 (C6), 159,54, 155,78, 145,70, 143,45, 143,40, 140,39, 137,26, 132,82, 132,74, 129,91 (C18 ou C19), 127,58 (C18 ou C19), 124,65, 124,56, 120,84, 120,64, 117,79, 109,59 (d, $J = 47,9$ Hz, C5), 66,68 (C23), 62,55 (C21), 58,00 (C14), 54,53 (C13), 53,70 (22), 37,12 (C12), 26,05 (C15), 24,59 (C16). LCMS $M/z = 477$ ($M + H$) $^+$.

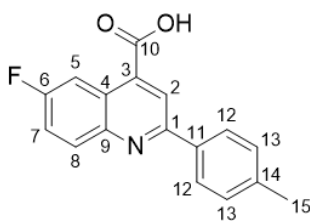
3.3.31. Síntese de ácido 6-fluoro-2-(*p*-tolil)quinolin-4-óico (adaptado de BARAGANA *et al.*, 2016)



Esquema 36: reação de expansão de anel para síntese de ácido 6-fluoro-2-(*p*-tolil)quinolin-4-óico.

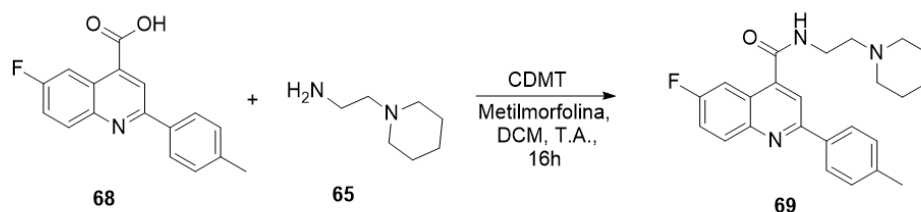
5-fluorisatina (1 eq.; 1000 mg; 6,1 mmol), 1-(4-metilfenil)etan-1-ona (1 eq; 809 μL , 6,1 mmol), KOH (6 eq; 2090 mg, 37 mmol), EtOH (8mL) and H_2O (8mL) foram adicionados a um frasco, mantidos sob agitação magnética e aquecidos a 120 °C por radiação de microondas durante 20 minutos (reator Biotage Initiator+). Em seguida, o material foi diluído com ~60 mL de H_2O e acidificado com solução aquosa 2M de HCl até a ocorrência de precipitação (pH 2). O sólido foi coletado por filtração e uma análise por LCMS indicou a formação do produto e presença de impurezas (Shimadzu - TR = 1,77 min; $M/z = 282$; +ve). Assim, dissolveu-se o material em EtOAc e o produto foi exaustivamente extraído com solução aquosa saturada de NaHCO_3 e solução aquosa 1 M de NaOH. Uma análise por LCMS mostrou a presença de produto na fase orgânica, assim o solvente foi removido e o sólido obtido foi dissolvido em DCM, sendo o produto extraído com solução aquosa 4 M de KOH. Em seguida, todas as frações aquosas foram combinadas e acidificadas para pH 1 com HCl ~15% em água. O produto foi extraído da fase aquosa com 5 alíquotas de EtOAc. As fases orgânicas foram

combinadas e rotaevaporadas (40 °C). Foram obtidos 1642,6 mg de produto sólido alaranjado (rendimento = 94%; 5,67 mmol; pureza LCMS = 97%).



^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,29 (dd, J = 10,5, 2,9 Hz, 1H, H5), 8,22 (s, 1H, H2), 8,16 (dd, J = 9,2, 5,5 Hz, 1H, H8), 8,05 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H12), 7,59 (ddd, J = 9,2, 8,1, 3,0 Hz, 1H, H7), 7,38 (d, J = 8,0 Hz, 2H, H13), 2,45 (s, 3H, H15). ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 173,10 (C10), 161,94 (d, J = 245,6 Hz, C6), 158,26 (C1), 147,12 (C9), 146,11 (C3), 141,05 (C14), 137,56 (C11), 132,52 (d, J = 8,8 Hz, C8), 130,61 (C13), 128,54 (C12), 126,30 (d, J = 11,3 Hz, C4), 120,74 (d, J = 23,9 Hz, C7), 119,79 (C2), 111,04 (d, J = 23,9 Hz, C5), 21,34 (C15). LCMS M/z = 282 ($M + H$) $^+$.

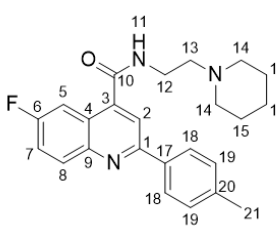
3.3.32. Amidação final de análogo toluênico de 498 (síntese de 498PTol) (adaptado de BARAGAÑA *et al.*, 2016)



Esquema 37: amidação de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico para síntese de 498PTol.

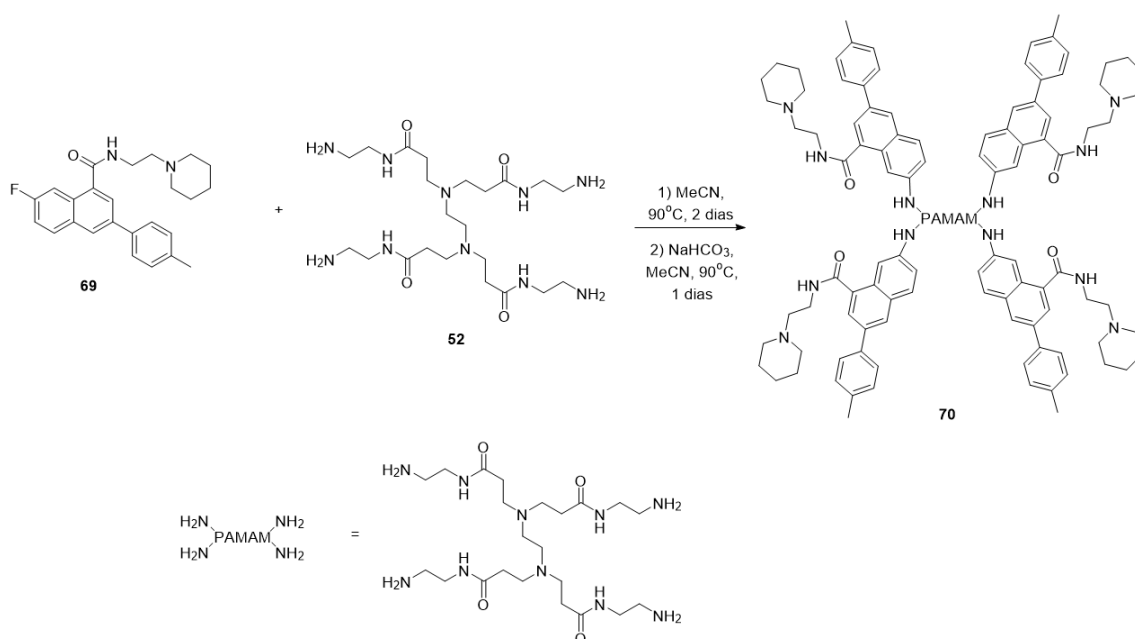
Ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico (1 eq.; 1400mg; 4,98 mmol), 4-metilmorfolina (2 eq.; 1095 μL ; 9,95 mmol) e DCM (40 mL) foram adicionados a um balão à temperatura ambiente e sob agitação magnética por 5 minutos (até a solubilização total do sistema). Em seguida, CDMT foi adicionado (1,2 eq.; 1049 mg; 5,97 mmol) e, após 1h, 1-(2-aminoetil)-piperidina (1 eq.; 707 μL ; 4,97 mmol) foi adicionada. Após 16h, uma análise por LCMS indicou o consumo a formação do produto desejado (Shimadzu - TR = 1,45; M/z = 392; positivo). A reação foi interrompida e lavada 3x com solução aquosa saturada de NaHCO_3 . A fase orgânica foi rotaevaporada (40°C) e o material obtido foi purificado por cromatografia flash, utilizando-se um cartucho de sílica de 24 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel (0-5% MeOH em DCM; 2,5 min 0%, 20min 0-5%, 5 min 5%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40°C). Notou-se a presença de ácido de partida nas frações coletadas, assim o sólido obtido após a rotaevaporação foi dissolvido em DCM, lavado 3x com solução aquosa saturada de NaHCO_3 e rotaevaporado (40 °C). O sólido foi dissolvido em MeOH e passado por uma coluna de troca aniônica (Biotage Isolute PE-AX), a qual foi lavada 2x com MeOH. As frações foram combinadas e rotaevaporadas (40 °C). 913,2 mg de produto sólido alaranjado foram obtidos (rendimento = 45%; 2,26 mmol; pureza = 97% LCMS).

^1H RMN (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,20 (dd, J = 9,3, 5,5 Hz, 1H, H8), 8,16 (s, 1H, H2), 8,11 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H18), 7,99 (dd, J = 10,1, 2,9 Hz, 1H, H5), 7,65 (td, J = 8,7, 2,9 Hz, 1H, H7), 7,40



(d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H19), 3,75 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, H12), 2,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, H13), 2,82 (s, 4H, H14), 2,46 (s, 3H, H21), 1,76 (p, $J = 5,7$ Hz, 4H, H15), 1,60 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H, H16). ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm) 168,36 (C10), 160,08 (d, $J = 245,7$ Hz, C6), 156,55 (C1), 145,63 (C9), 142,01 (d, $J = 10,1$ Hz, C3), 140,07 (C20), 135,67 (C17), 131,74 (d, $J = 10,1$ Hz, C8), 129,29 (C19), 127,11 (C18), 124,12 (d, $J = 11,3$ Hz, C4), 119,97 (d, $J = 26,5$ Hz, C7), 117,61 (C2), 108,62 (d, $J = 23,9$ Hz, C5), 57,01 (C13), 53,92 (C14), 35,98 (C12), 24,60 (C15), 23,13 (CC16), 19,95 (C21). LCMS $M/z = 393$ (M+H) $^+$.

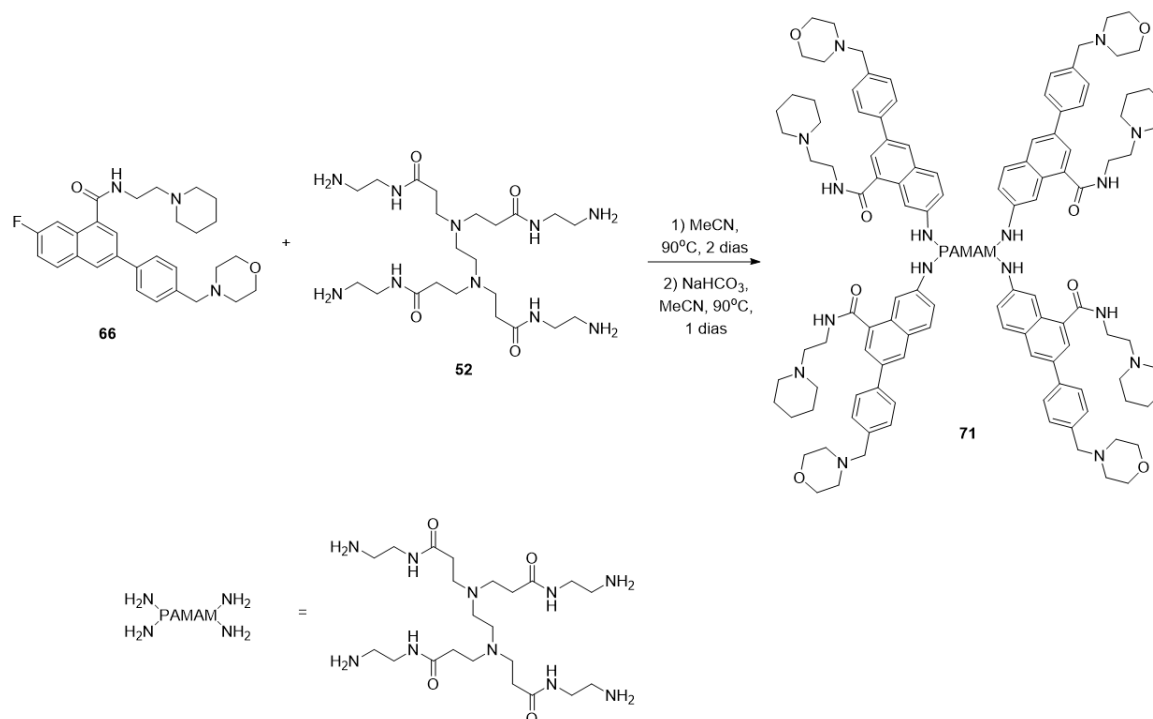
3.3.33. *Substituição nucleofílica aromática de 498PTol e PAMAM G0 (BEYKI, MAGHSOODLOU, HEYDAR, 2016; ISMAIL e ABASS, 2001)*



Esquema 38: reação de SNAr para acoplamento de 498PTol e PAMAM G0.

PAMAM G0 20 % (m/m) em MeOH (1 eq.; 50 μL ; 0,016 mmol) foi rotaevaporado (40 $^{\circ}\text{C}$) em um tubo de ensaio para remoção do solvente. Em seguida, 6-fluoro-N-[2-(1-piperidil)etil]-2-(*p*-tolil)quinolin-4-carboxamida (4,4 eq.; 28 mg, 0,073 mmol) e MeCN (1,5 mL) foram adicionados. Manteve-se a reação sob agitação magnética constante à 90 $^{\circ}\text{C}$. Após 20 h, uma análise por LCMS não indicou a presença de possível produto e uma grande quantidade de material de partida (Shimadzu - TR = 1,42 min; $M/z = 392$; positivo). Após 24 h, novamente foi notada uma grande quantidade de material de partida em análise de LCMS (Shimadzu). Assim, NaHCO_3 (4,5 eq.; 6 mg; 0,074 mmol) foi adicionado juntamente a 1 mL de MeCN para repor perdas por evaporação. Após mais 24 h, uma análise por LCMS (Shimadzu) mostrou grande quantidade de material de partida e a reação foi descartada.

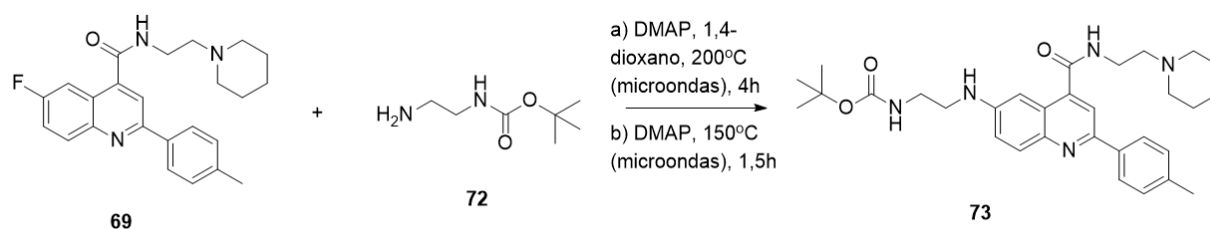
3.3.34. Substituição nucleofílica aromática de 498P e PAMAM G0 (BEYKI, MAGHSOODLOU, HEYDAR, 2016; ISMAIL e ABASS, 2001)



Esquema 39: reação de SNAr para acoplamento de 498P e PAMAM G0.

PAMAM G0 20 % (m/m) em MeOH (1 eq.; 50 µL; 0,016 mmol) foi rotaevaporado (40 °C) em um tubo de ensaio para remoção do solvente. Em seguida, 498P (3,4 eq.; 27 mg; 0,057mmol) e MeCN (1,5 mL) foram adicionados. Manteve-se a reação sob agitação magnética constante a 90 °C. Após 20 h, uma análise por LCMS não indicou a presença de possível produto e uma grande quantidade de material de partida (Shimadzu - TR = 1,01 min; M/z = 477; positivo). Após 24 h, novamente foi notada uma grande quantidade de material de partida em análise de LCMS (Shimadzu). Assim, NaHCO₃ (4,5 eq.; 6 mg; 0,074 mmol) foi adicionado juntamente a 1 mL de MeCN para repor perdas por evaporação. Após mais 24 h, uma análise por LCMS (Shimadzu) mostrou grande quantidade de material de partida e a reação foi descartada.

3.3.35. Substituição nucleofílica aromática de 498PTol e tert-butil (2-aminoetil)carbamato (BEYKI, MAGHSOODLOU, HEYDAR, 2016; ISMAIL e ABASS, 2001)

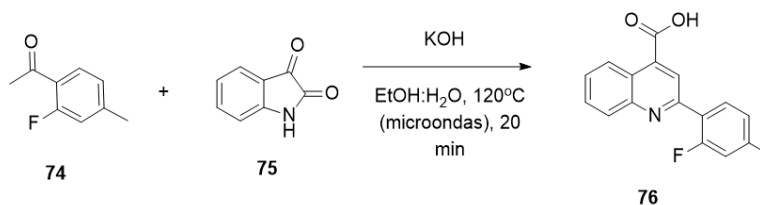


Esquema 40: reação de SNAR para acoplamento de 498PTol e espaçante diamínico protegido.

Método A: 6-fluor-N-[2-(1-piperidil)etil]-2-(p-tolil)quinolin-4-carboxamida (1 eq.; 10 mg; 0,026 mmol), DMAP (1 eq.; 3 mg; 0,026 mmol), tert-butil(2-aminoetil)carbamato (2 eq.; 81 μ L; 0,051 mmol) e 1,4-dioxano (1 mL) foram adicionados a um frasco e aquecidos em um reator de microondas (Biotage Initiator+) a 120 °C por 1h. Análise por LCMS indicou a presença apenas de material de partida (Shimadzu - TR = 1,44 min; M/z = 392; positivo). A reação foi então aquecida a 160 °C por 1,5 h no reator de microondas. Uma análise por LCMS indicou a presença de material de partida, mas sem a formação de produto. A reação foi, então, aquecida a 200 °C por 2 h no reator de microondas. Notou-se a formação de algum material, porém ele não correspondia a produto (Shimadzu - TR = 1,85, M/z = 306, positivo). Por fim, a reação foi aquecida novamente a 200 °C por 2 h no reator de microondas, porém não foi formado produto de interesse.

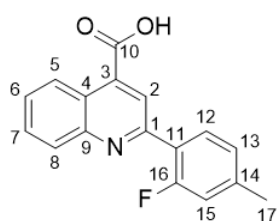
Método B: 6-fluor-N-[2-(1-piperidil)etil]-2-(p-tolil)quinolin-4-carboxamida (1 eq.; 10 mg; 0,026 mmol), tert-butil(2-aminoetil)carbamato (148 eq.; 600 μ L; 3,79 mmol) e DMAP (2 eq.; 6 mg; 0,051 mmol) foram adicionados a um frasco e aquecidos em um reator de microondas (Biotage Initiator+) a 150 °C por 30 min. Uma análise por LCMS indicou a presença de material de partida (Shimadzu - TR = 1,38 min; M/z = 392; positivo), sem a formação de produto. A reação foi aquecida a 150 °C no reator de microondas por mais 1 h, porém não houve formação de produto.

3.3.36. Síntese de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico (adaptado de BARAGANA *et al.*, 2016)



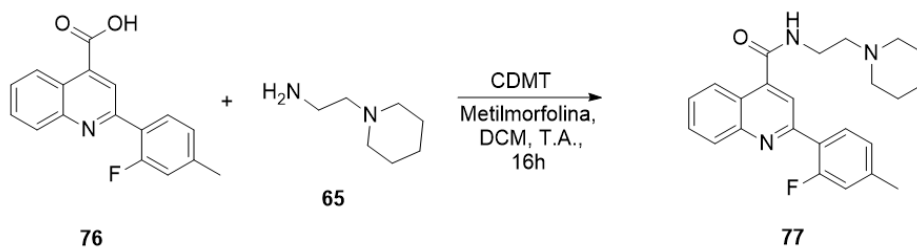
Esquema 41: reação de expansão de anel para síntese de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico

(055) Isatina (1 eq.; 997 mg, 6,6 mmol), KOH (10 eq.; 3687 mg, 66 mmol), 1-(2-fluor-4-metilfenil)etanona (1 eq.; 1000 mg; 6,6 mmol), EtOH (8 mL) e H₂O (8 mL) foram adicionados a um frasco, mantidos sob agitação magnética e aquecidos a 120 °C por radiação de microondas durante 20 minutos (reator Biotage Initiator+). Uma análise por LCMS confirmou a formação de produto (Shimadzu - TR = 1,65; M/z = 282; positivo). Em seguida, o material foi diluído com ~60 mL de H₂O e acidificado com solução aquosa 2M de HCl até a ocorrência de precipitação (pH 2-3). O sólido foi coletado por filtração e lavado com alíquotas de H₂O. Em seguida, o sólido foi dissolvido em DCM e extraído exaustivamente com solução aquosa 4 M de KOH. As fases aquosas foram combinadas, acidificadas (pH 2) com HCl 10% aquoso e o produto foi extraído com EtOAc. As alíquotas de EtOAc foram combinadas, rotaevaporadas (40 °C) e purificadas por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel. Variou-se a concentração de MeOH de 0% a 15% ao longo do processo (0% MeOH por 1 min, 0-15% durante 15 min e 15% por 4 min). Frações desejadas foram separadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). 558 mg de produto sólido alaranjado (rendimento 29%; 1,88 mmol; pureza estimada = 95%) foram obtidos.



¹H RMN (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,84 (dd, J = 8,6, 1,4 Hz, 1H, H5), 8,37 (d, J = 2,2 Hz, 1H, H2), 8,19 (dd, J = 8,6, 1,3 Hz, 1H, H8), 7,95 (t, J = 8,1 Hz, 1H, H12), 7,85 (ddd, J = 8,4, 6,8, 1,4 Hz, 1H, H7), 7,71 (ddd, J = 8,3, 6,8, 1,3 Hz, 1H, H6), 7,22 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 1H, H13), 7,15 (dd, J = 12,3, 1,6 Hz, 1H, H15), 2,47 (s, 3H, H17). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 167,69 (C10), 160,58 (d, J = 249,5 Hz, C16), 153,71 (C1), 148,67 (C9), 142,82 (d, J = 8,8 Hz), 136,92 (C3), 130,72 (d, J = 3,8), 129,92 (C7), 128,92 (C8), 127,72 (C6), 125,52 (H5), 125,31 (d, J = 2,5, C13), 123,98 (C4), 123,72 (d, J = 11,3, C11), 123,12 (d, J = 7,6 Hz, C2), 116,32 (d, J = 22,7 Hz, C15), 19,83 (C17). LCMS M/z = 282 (M + H)⁺.

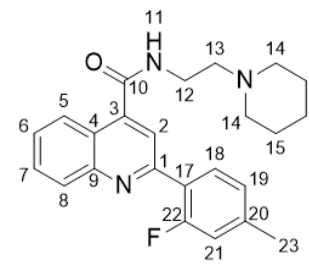
3.3.37. Amidação final de análogo *F*-toluênico de 498 (síntese de 498PFTol) (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)



Esquema 42: reação de amidação de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil) quinolin-4-óico para síntese de 498PFTol.

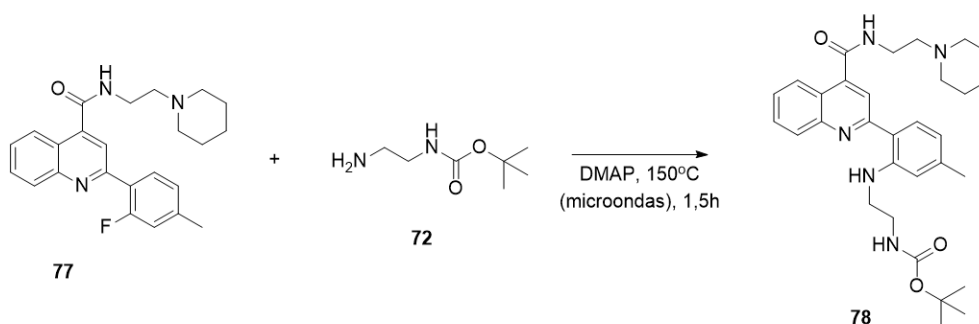
Ácido 2-(2-fluor-4-metilfenil)quinolin-4-óico (1 eq.; 588mg; 2,09 mmol), 4-metilmorfolina (2 eq.; 460 μ L; 4,18 mmol) e DCM (20 mL) foram adicionados a um balão à temperatura

ambiente e sob agitação magnética por 5 minutos (até a solubilização total do sistema). Em seguida, CDMT foi adicionado (1,2 eq.; 440 mg; 2,51 mmol) e, após 1h, 1-(2-aminoetil)-piperidina (1 eq.; 297 μ L; 2,09 mmol) foi adicionada. Após 16h, uma análise por LCMS indicou o consumo a formação do produto desejado (Shimadzu - TR = 1,30; M/z = 392; positivo). A reação foi rotaevaporada (40°C) e o material obtido foi purificado por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel (0-10% MeOH em DCM; 2,0 min 0%, 30min 0-10%, 10 min 10%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40°C). 607,2 mg de produto sólido alaranjado foram obtidos (rendimento = 73%; 1,52 mmol; pureza = 98% LCMS).



¹H RMN (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,27 (dd, J = 8,4, 1,3 Hz, 1H, H5), 8,17 (dt, J = 8,5, 0,8 Hz, 1H, H8), 7,95 (s, 1H, H2), 7,94 – 7,90 (m, 1H, H18), 7,85 (ddd, J = 8,4, 6,8, 1,4 Hz, 1H, H7), 7,68 (ddd, J = 8,2, 6,8, 1,2 Hz, 1H, H6), 7,22 (dd, J = 7,9, 1,6 Hz, 1H, H19), 7,15 (dt, J = 12,3, 1,2 Hz, 1H, H21), 3,67 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H12), 2,69 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H13), 2,59 (bs, 4H, H14), 2,47 (s, 3H, H23), 1,67 (p, J = 5,7 Hz, 4H, H15), 1,58 – 1,49 (m, 2H, H16). ¹³C RMN (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 168,44 (C10), 160,54 (d, J = 250,7 Hz, C22), 153,89 (C1), 148,24 (C9), 143,03 (C3), 142,74 (d, J = 8,8 Hz, C20), 130,79 (d, J = 2,5 Hz, C18), 130,16 (C7), 128,85 (C8), 127,30 (C6), 125,30 (d, J = 3,8 Hz, C19), 125,05 (C5), 123,96 (d, J = 11,3 Hz, C17), 123,36 (C4), 119,76 (d, J = 7,6 Hz, C2), 116,32 (d, J = 22,7 Hz, C21), 57,31 (C13), 54,14 (C14), 36,56 (C12), 25,26 (C15), 23,74 (C16), 19,83 (C23). LCMS M/z = 392 (M + H)⁺.

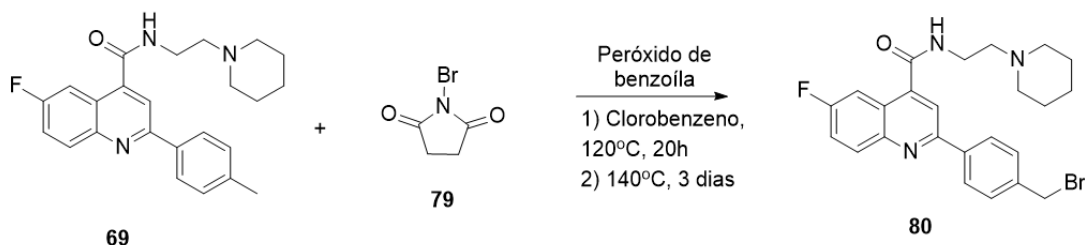
3.3.38. *Substituição nucleofílica aromática de 498PFTol e tert-butil(2-aminoetil) carbamato (BEYKI, MAGHSOODLOU, HEYDAR, 2016; ISMAIL e ABASS, 2001)*



Esquema 43: reação de SNAr de 498PFTol para adição de espaçante diamínico protegido.

498PFTol (1 eq.; 10 mg; 0,026 mmol), tert-butil(2-aminoetil)carbamato (148 eq.; 600 μ L; 3,79mmol) e DMAP (1,5 eq.; 5 mg; 0,051 mmol) foram adicionados a um frasco e aquecidos em um reator de microondas (Biotage Initiator+) a 150 °C por 1 h. Uma análise por LCMS indicou a presença de material de partida (Shimadzu - TR = 1,33 min; M/z = 392; positivo), sem a formação de produto.

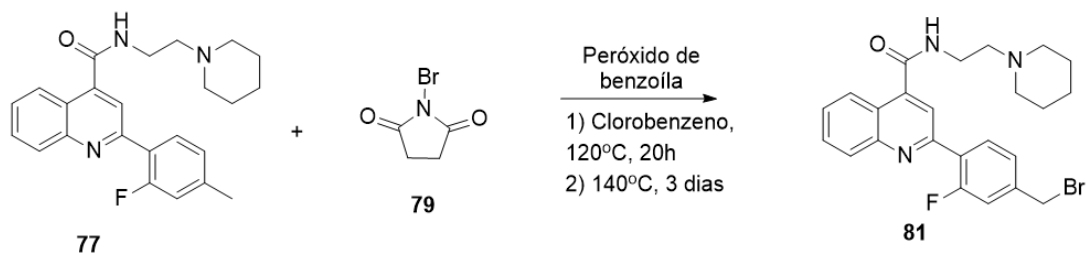
3.3.39. Bromação alílica de 498PTol (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)



Esquema 44: bromação da metila de 498PTol por NBS.

498PTol (1 eq.; 50 mg, 0,13 mmol) e clorobenzeno (2mL) foram adicionados a um balão com coluna de condensação e mantidos sob agitação magnética por 5 min. Em seguida, NBS (1-bromopirrolidin-2,5-diona) (1,1 eq.; 25 mg; 0,14 mmol) e peróxido de benzoíla (0,005eq.; 0,2 mg; 0,0006 mmol) foram então adicionados e a reação foi mantida a 120 °C por 20 h. Uma análise por LCMS indicou que não houve formação do produto, então a temperatura foi aumentada para 140 °C. Após 3 dias nessas condições, outra análise por LCMS indicou que produto não foi formado, então a reação foi descartada.

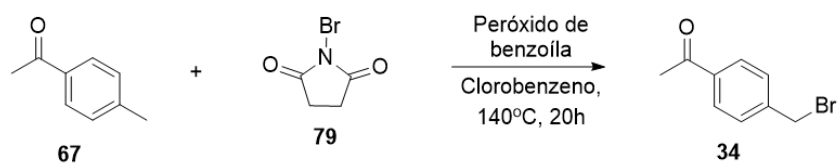
3.3.40. Bromação alílica de 498PFTol (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)



Esquema 45: bromação da metila de 498PFTol por NBS.

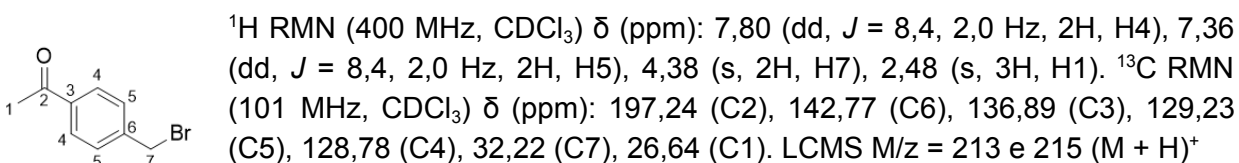
498PFTol (1 eq.; 50 mg; 0,13 mmol) e clorobenzeno (2 mL) foram adicionados a um tubo selável e mantidos sob agitação magnética. Após, 5 min, adicionou-se NBS (1,1 eq.; 25 mg; 0,14 mmol) e peróxido de benzoíla (0,005 eq.; 0,2 mg; 0.0006 mmol) e a reação foi aquecida a 140 °C. Após 20 h, uma análise por LCMS indicou que não havia sido formado produto de interesse e a reação foi descartada.

3.3.41. Síntese de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona (BARAGAÑA et al., 2016)

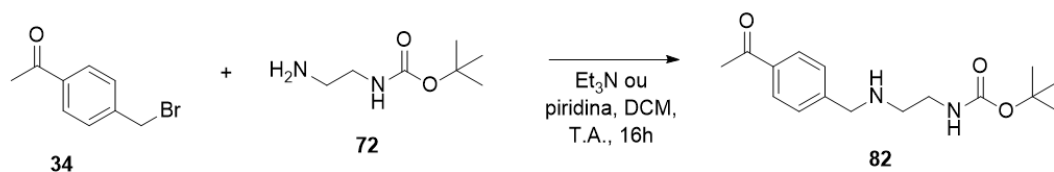


Esquema 46: bromação de 4-metilacetofenona por NBS.

1-(4-metilfenil)etan-1-ona (1 eq; 1000 mg; 7,4 mmol), NBS (1,1 eq; 1459 mg; 8,2 mmol), peróxido de benzoíla (0,005 eq; 9 mg; 0,04 mmol) e clorobenzeno (40 mL) foram adicionados a um balão de 100 mL e mantidos sob refluxo a 140 °C e agitação magnética constante. Após 20 h, uma análise por LCMS confirmou a formação do produto (Shimadzu - TR = 2,27 min; M/z = 213 e 215; positivo). A reação foi então resfriada à temperatura ambiente, diluída com 20 mL de tolueno e filtrada com celite. A celite foi lavada 2x com tolueno e o filtrado foi concentrado por rotaevaporação (60 °C). O material obtido foi purificado por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 24 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e heptano/AcOEt como fase móvel. Variou-se a concentração de AcOEt de 0% a 10% ao longo do processo (1,5 min 0% EtOAc; 12 min 0-10% EtOAc e 1,5 min 10% EtOAc). Frações desejadas foram separadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (60 °C). Foram obtidos 1456 mg de produto com o aspecto de um líquido levemente amarelado e com ponto de fusão próximo da temperatura ambiente (rendimento = 87%; 6,5 mmol).



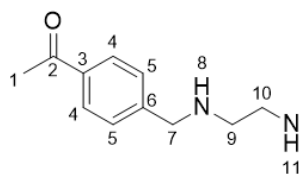
3.3.42. Substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)



Esquema 47: reação de substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato

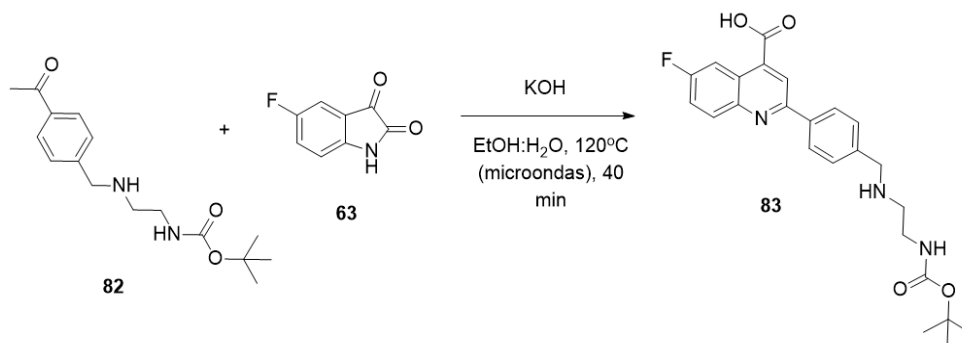
1-[4-(bromometil)fenil]etanona (1 eq.; 200mg; 0,94 mmol), *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato (1,55 eq.; 230 μL, 1,45 mmol), Et₃N (2 eq.; 262 μL, 1,88 mmol) e DCM (10 mL)

foram adicionados a um balão e mantidos à temperatura ambiente e sob agitação magnética constante. Em uma variação da síntese, utilizou-se piridina como base (2 eq.). Após 16 h, análise por LCMS (Shimadzu - TR = 1,15 min; M/z = 293; positivo) indicou a formação do produto desejado, então a reação foi rotaevaporada (40 °C) e purificada por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH e DCM como fase móvel (2min 0% MeOH; 12min 0-10%; 2 min 10%). Frações de interesse foram coletadas e rotaevaporadas. 292,4 mg de produto sólido foram obtidos (rendimento = 29%; 0,27 mmol; pureza estimada = 95%).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,83 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, H4), 7,33 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, H5), 5,05 (s, 1H, H11), 3,77 (s, 2H, H7), 3,16 (q, $J = 5,8$ Hz, 2H, H10), 2,66 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, H9), 2,50 (s, 3H, H1), 1,52 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, H8), 1,36 (s, 9H, H14). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 197,82 (C2), 156,15 (C12), 145,86 (C6), 135,96 (C3), 128,51 (C4), 128,08 (C5), 79,14 (C13), 53,06 (C2), 48,67 (C7), 41,39 (C9), 28,40 (C14), 26,60 (C1). LCMS M/z = 293 (M + H) $^+$.

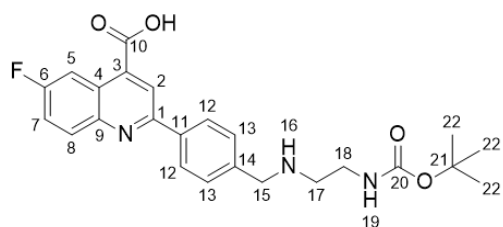
3.3.43. Síntese de ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)



Esquema 48: reação de expansão de anel para síntese de ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico.

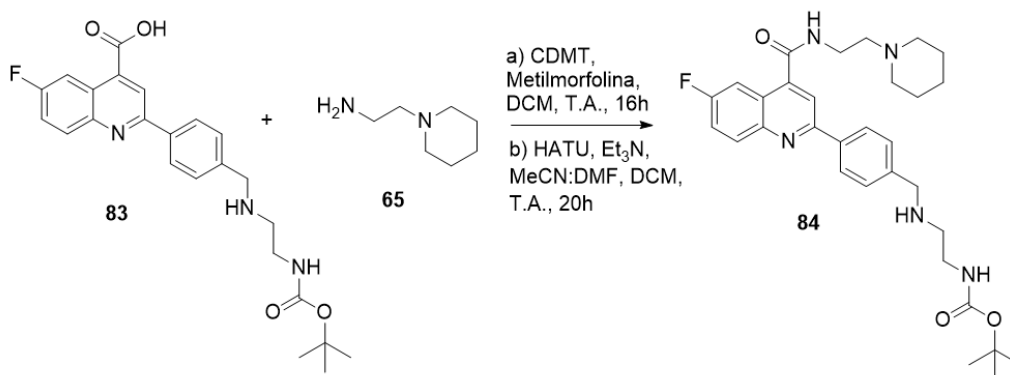
N-[2-[(4-acetilfenil)metilamino]etil]carbamato de *tert*-butila (1 eq.; 117 mg; 0,40 mmol), 5-fluorisatina (1 eq.; 66 mg, 0,40 mmol), KOH (10 eq.; 225 mg, 4,0 mmol), EtOH (2mL) e H_2O (2mL) foram adicionados a um frasco, mantidos sob agitação magnética e aquecidos a 120 °C por radiação de microondas durante 20 minutos (reator Biotage Initiator+). Uma análise por LCMS confirmou a formação de produto (Shimadzu - TR = 1,44; M/z = 440; positivo), mas material de partida ainda foi observado, então a etapa de microondas foi repetida, levando a formação de mais produto. Em seguida, o material foi diluído com ~10 mL de H_2O e 20 mL de solução aquosa saturada de NH_4Cl , sendo que a fração aquosa foi extraída 5x com EtOAc. As fases orgânicas foram combinadas e rotaevaporadas (40 °C). O sólido obtido foi purificado por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e

MeOH/DCM. Variou-se a concentração de MeOH de 0% a 20% ao longo do processo (0% MeOH por 2,5 min, 0-10% durante 20 min; 10% por 7 min e 20% por 10 min). As frações desejadas foram coletadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). Além disso, notou-se que a fase aquosa inicial ainda continha produto, assim ela foi acidificada com solução aquosa 2M de HCl (pH 5) e, em seguida, extraída 5x com EtOAc. A nova fase orgânica foi rotaevaporada (40 °C) e o sólido obtido foi purificado por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g e MeOH/DCM. Variou-se a concentração de MeOH de 0% a 20% ao longo do processo (0-20% MeOH durante 20 min e 20% por 10 min). As frações desejadas foram coletadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). O material coletado de cada purificação foi combinado. Análise de LCMS indicou a presença de impurezas e, então uma terceira purificação foi realizada utilizando-se um cartucho de sílica de 5 g e 7M NH₃ em MeOH e DCM como fase móvel (0-20% 7M NH₃-MeOH durante 10 min e 20% 7M NH₃-MeOH por 10 min). Entretanto, não houve separação de impurezas. As frações desejadas foram combinadas, rotaevaporadas (40 °C) e foram obtidos 66,5 mg de produto impuro (rendimento 20%; 0,08 mmol; pureza = 52% LCMS).



¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,47 (d, J = 11,2 Hz, 2H, H5), 8,42 (d, J = 15,1 Hz, 2H, H2), 8,26 (d, J = 7,8 Hz, 2H, 12), 8,16 (dd, J = 15,5, 7,0 Hz, 3H, H8), 7,75 (d, J = 7,8 Hz, 2H, H13), 7,61 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H7), 7,46 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,44 (s, 2H), 4,37 (s, 2H, H15), 3,47 (t, J = 6,1 Hz, 2H, H18), 3,42 (s, 3H), 3,35 (s, 1H), 3,23 (t, J = 6,1 Hz, 2H, H17), 1,45 (s, 9H, H22). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 170,99 (C10), 163,48, 163,34, 161,51, 161,38, 158,80 (C20), 157,42, 156,74, 147,46, 147,39, 141,02, 140,49, 139,10, 133,98, 133,31 (d, J = 10,3, C8) 133,13, 133,05, 131,72 (C13), 129,50, 129,13 (C12), 128,79, 126,58, 126,40, 121,22 (d, J = 16,5, C2), 120,99 (d, J = 15,6 Hz, C7), 110,84 (d, J = 24,4 Hz, C5), 80,92, 51,73 (C15), 48,71 (C17) 48,05, 45,83, 39,13, 37,91 (C18), 28,69 (C22). LCMS M/z = 440 (M+H)⁺.

3.3.44. *Amidação final de análogo de 498 com espaçante boc-diaminoetilico (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)*

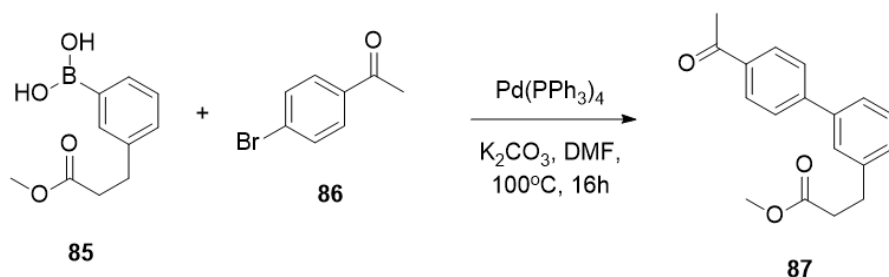


Esquema 49: reação de amidação de ácido 2-(4-(((2-(tert-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico para síntese de 498PTdiA.

Método B: ácido 2-[4-[[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamino]metil]fenil]-6-fluor-quinolin-4-óico (1 eq.; 66 mg; 0,15 mmol), 4-metilmorfolina (2 eq.; 33 μ L; 0,30 mmol) e DCM (2mL) foram adicionados a um tubo de ensaio e mantidos sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. Por conta da baixa solubilidade apresentada, MeCN (1mL) foi adicionada, porém ainda notou-se a presença de material precipitado. Após 5 min, CDMT foi adicionado (1,2 eq.; 32mg; 0,18 mmol) e, após 1h, 1-(2-aminoetil)-piperidina (1 eq.; 21 μ L, 0,15 mmol) foi adicionada. Após 16 h, análise por LCMS indicou que não houve formação de produto e, assim, a reação foi descartada.

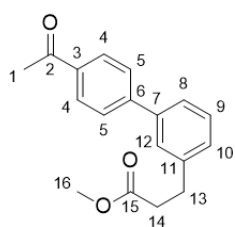
Método B: ácido 2-[4-[[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilamino]metil]fenil]-6-fluor-quinolin-4-óico (1 eq.; 62 mg; 0,14 mmol), Et₃N (2 eq.; 39 μ L; 0,28 mmol) e MeCN (3mL) foram adicionados a um balão e mantidos sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. O material de partida não foi completamente solubilizado, então DMF (1mL) foi adicionado. HATU (1,5 eq.; 80 mg; 0,21 mmol) e 1-(2-aminoetil)-piperidina (1,1 eq.; 22 μ L; 0.16 mmol) foram adicionados em seguida. Após 20 h, uma análise de LCMS (Agilent) indicou que material de partida havia sido completamente consumido, mas não foi notada a presença de produto. A reação foi interrompida, diluída com ~20ml de EtOAc e lavada 3x com solução aquosa saturada de NaHCO₃ e 1x com solução aquosa saturada de NaCl. Foi realizada uma purificação por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e 7M NH₃-MeOH e DCM como fase móvel (2 min 0% 7M NH₃-MeOH; 10 min 0-10%; 3 min 10%). Frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40 °C), porém nenhuma correspondia ao produto.

3.3.45. Síntese de metil 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato (adaptado de MIYAURA e SUZUKI, 1979)



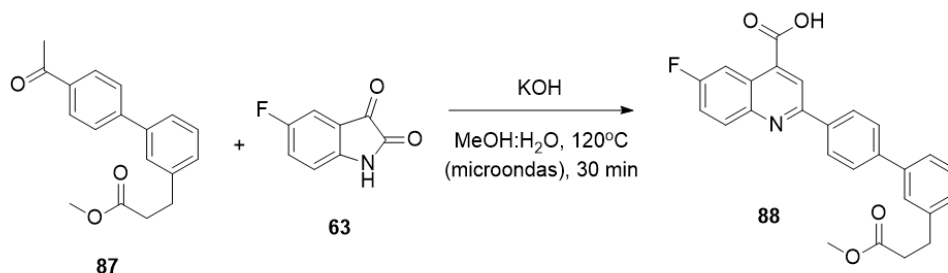
Esquema 50: reação de Suzuki para síntese de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila

3-(3-boronofenil)propionato de metila (1,5 eq.; 314mg; 1,5 mmol), 1-(4-bromofenil)etanonona (1 eq.; 200mg; 1.0 mmol), carbonato de potássio (2 eq.; 278mg, 2.0 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)paládio(0) (0,002 eq.; 2.3 mg; 0,002 mmol) e DMF (2mL) foram adicionados a um tubo selado mantido sob agitação constante à 100 °C. Após 16 h de reação, análise por LCMS indicou conversão completa do material de partida e formação de produto (Shimadzu - TR = 2,35; M/z = 283; positivo). A reação foi então interrompida, diluída com EtOAc e DCM e alíquotas de solução aquosa 1 M de HCl foram adicionadas até que o sistema não borbulhasse mais (não foi visto borbulhamento nem na primeira adição). O material foi então filtrado com celite e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). Por fim, 20 mL de água foram adicionados ao sólido obtido e o produto foi extraído 5x com DCM e 3x com EtOAc. As fases orgânicas foram coletadas, o solvente rotaevaporado (40 °C). O material foi então purificado por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e EtOAc/heptano como fase móvel. Variou-se a concentração de EtOAc de 0% a 30% ao longo do processo (0% EtOAc por 1 min, 0-30% durante 15 min e 30% por 3 min). Frações desejadas foram separadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). 257,4 mg de um sólido (rendimento 90%; 0,90 mmol; pureza = 99% LCMS) correspondente a produto.



^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,86 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H4), 7,51 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,32 (s, 1H, H12), 7,30 (s, 1H, H8), 7,22 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H9), 7,09 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H10), 3,52 (s, 3H, H16), 2,88 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, H13), 2,54 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, H14), 2,46 (s, 3H, H1). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 197,51 (C2), 173,07 (C15), 145,60 (C6), 141,34 (C11), 140,05 (C3 ou C7), 135,90 (C3 ou C7), 129,14 (C9), 128,87 (C4), 128,18 (C10), 127,25 (C12), 127,17 (C5), 125,26 (C8), 51,57 (C16), 35,56 (C14), 30,93 (C13), 26,54 (C1). LCMS M/z = 283 (M + H) $^+$.

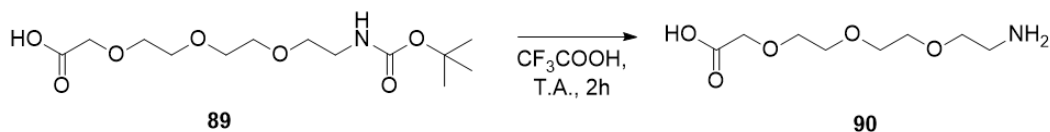
3.3.46. Síntese de ácido 6-fluoro-2-(3'-(3-metoxi-3-oxopropil)-[1,1'-bifenil]-4-il)quinolin-4-óico (adaptado de BARAGANA *et al.*, 2016)



Esquema 51: reação de expansão de anel para síntese de ácido 6-fluoro-2-(3'-(3-metoxi-3-oxopropil)-[1,1'-bifenil]-4-il)quinolin-4-óico

5-fluorisatina (1 eq; 150 mg; 0,91 mmol), KOH (10 eq; 511 mg; 9,1 mmol), 3-[3-(4-acetilfenil)fenil]propanoato de metila (1 eq; 257 mg; 0,91 mmol) e MeOH (5mL) foram adicionados a um frasco, mantidos sob agitação magnética e aquecidos a 120 °C por radiação de microondas durante 30 minutos (reator Biotage Initiator+). Análise por LCMS indicou a desproteção do éster no produto final, assim o material foi descartado (Agilent - TR = 1,029 min, M/z = 416, positivo).

3.3.47. Desproteção de ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-óico (PEG3-boc) (adaptado de BLONDELLE, HOUGHTEN, 1993)

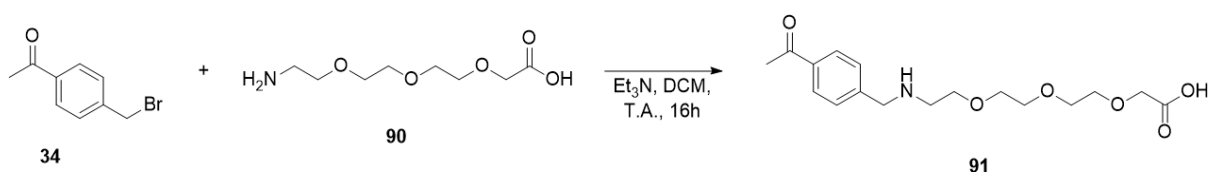


Esquema 52: reação de desproteção de PEG3-boc

Ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-óico (1 eq.; 100 mg; 0,32 mmol) e ácido trifluoroacético (40 eq.; 1000 μ L, 13 mmol) foram adicionados a um tubo de ensaio e mantidos sob agitação constante à temperatura ambiente por 2 h. Uma análise de LCMS indicou consumo completo de material de partida e formação do produto de interesse (Shimadzu - TR = 0,37 min; M/z = 208; positivo). Ácido trifluoroacético foi removido por fluxo de N_2 e uma análise de RMN do óleo obtido indicou a desproteção do grupo boc. Foi considerado um rendimento de 100% da reação.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 4,06 (s, 1H), 3,66 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 8,8, 3,9 Hz, 4H), 3,10 – 3,04 (m, 2H), 2,02 – 1,94 (m, 2H), 1,81 – 1,74 (m, 2H), 1,67 – 1,58 (m, 1H), 1,26 (q, J = 11,5, 10,7 Hz, 4H), 1,13 (ddd, J = 12,7, 8,9, 3,7 Hz, 1H). LCMS M/z = 208 (M+H)⁺.

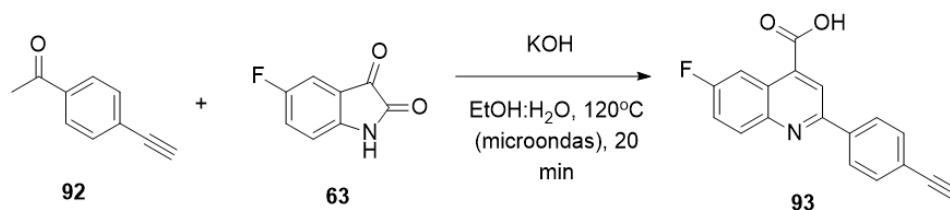
3.3.48. Substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e PEG3 (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)



Esquema 53: reação de substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e PEG3.

PEG3-boc (200 mg, 0,8 eq, 0,65 mmol) foram desprotegidos em um tubo de ensaio conforme descrito na seção anterior. O ácido trifluoroacético foi removido por fluxo de N_2 e, em seguida 1-(4-(bromometil)fenil)etanona (1 eq, 166 mg, 0,78 mmol), Et_3N (3,4 eq, 376 μL , 2,7 mmol) e DCM (6mL) foram adicionados e a reação foi mantida sob agitação a 25°C . Após 16 h, observou-se por LCMS a substituição do bromo por Et_3N ao invés do espaçante PEG (Shimadzu - RT = 1,04 min; M/z = 234; positivo). A reação foi então interrompida e o solvente foi removido por rotaevaporação (40°C). O material obtido foi purificado por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH e DCM como fase móvel (10 min 0-10%, 5 min 10-20% MeOH, 10 min 20% MeOH). As frações isoladas foram analisadas por RMN e confirmou-se que foi formado apenas o subproduto da reação entre a 1-(4-(bromometil)fenil)etanona e Et_3N . Assim, o material foi descartado.

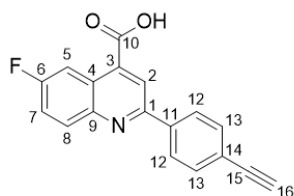
3.3.49. Síntese de ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico (adaptado de BARAGAÑA et al., 2016)



Esquema 54: reação de expansão de anel para síntese de ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico.

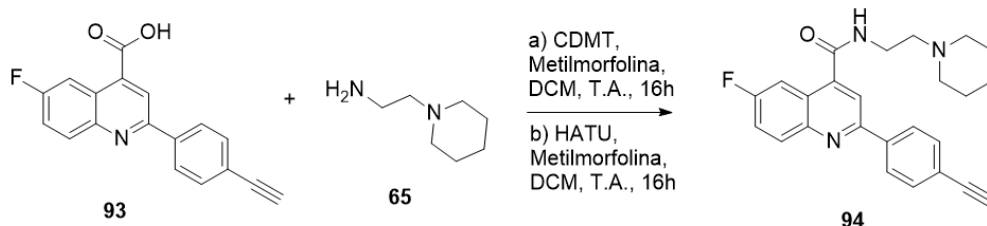
1-(4-etinilfenil)etanona (1 eq.; 218 mg; 1,51 mmol), 5-fluorisoatinina (1 eq.; 250 mg, 1,51 mmol), KOH (6 eq.; 523 mg, 9,32 mmol), EtOH (8mL) e H₂O (8mL) foram adicionados a um frasco, mantidos sob agitação magnética e aquecidos a 120°C por radiação de microondas durante 20 minutos (reator Biotage Initiator+). Uma análise por LCMS confirmou a formação de produto (Shimadzu - TR = 1,78; M/z = 292; positivo). Em seguida, o material foi diluído com ~20 mL de H₂O e acidificado com solução aquosa 2M de HCl até a ocorrência de precipitação (pH 1). O sólido foi coletado por filtração e lavado com alíquotas de H₂O. Já o filtrado foi extraído 4x com EtOAc, sendo que as fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 e

rotaevaporadas (40 °C). Os sólidos obtidos foram combinados e purificados 3x por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM ou EtOAc/heptano como fase móvel. As purificações foram realizadas com os seguintes gradientes: 1) 2,5 min 0% MeOH; 22,5 min 0-15%; 10 min 15%; 2) 5 min 0% MeOH; 20 min 0-5%; 5 min 5%; 3) 2,5min 10% EtOAc; 20min 10-60%; 5 min 60%. As frações desejadas foram coletadas e o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C). 192,6 mg de um sólido com baixa pureza de produto foram obtidos (rendimento 4%; 0,07 mmol; pureza = 10% LCMS).



^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,59 (s, 1H, H5 ou H2), 8,24 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H12 ou H13), 7,69 – 7,66 (m, 2H, H12 ou H13), 7,38 (td, J = 8,8, 2,8 Hz, 1H), 7,33 (dd, J = 6,9, 2,7 Hz, 1H), 7,18 (dd, J = 7,8, 2,7 Hz, 1H), 7,07 (td, J = 9,0, 2,7 Hz, 1H), 6,96 (dd, J = 8,5, 3,8 Hz, 1H), 6,87 (dd, J = 8,5, 4,1 Hz, 1H), 3,68 (s, 1H), 2,18 (s, 1H), 1,27 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 138,45, 132,21 (C12 ou C13), 127,05 (C12 ou C13), 124,38, 124,18, 120,70, 120,01, 119,80, 116,29, 116,09, 113,29, 113,24, 111,61, 111,41, 111,15, 111,06, 110,96, 109,35, 109,14, 82,62(C15 ou C16), 79,12 (C15 ou C16), 28,13. LCMS M/z = 292 (M+H) $^+$.

3.3.50. Amidação final de análogo alcínico de 498 (síntese de 498PIno) (adaptado de BARAGAÑA *et al.*, 2016)

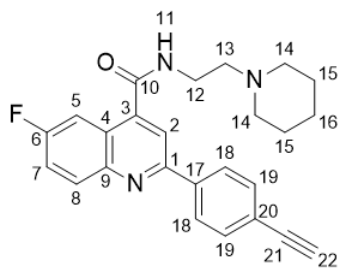


Esquema 55: reação de amidação de ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico para síntese de 498PIno.

Método A: ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluoro-quinolin-4-óico (1 eq.; 192 mg; 0,66 mmol), 4-metilmorfolina (2 eq.; 146 μL ; 1,32 mmol) e DCM (5 mL) foram adicionados a um tubo de ensaio à temperatura ambiente e sob agitação magnética por 5 minutos (até a solubilização total do sistema). Em seguida, CDMT foi adicionado (1,2 eq.; 139 mg; 0,79 mmol) e, após 1h, 1-(2-aminoetil)-piperidina (1 eq.; 94 μL ; 0,66 mmol) foi adicionada. Após 16h, uma análise por LCMS indicou a formação do produto desejado (Shimadzu - TR = 1,45; M/z = 402; positivo). A reação diluída com 10 mL de DCM, lavada 3x com solução aquosa saturada de NaHCO_3 , rotaevaporada (40°C) e o material obtido foi purificado por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel (0-10% MeOH em DCM; 2,5 min 0%, 20min 0-10%, 5 min 10%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40°C), porém análises por LCMS e RMN de ^1H indicaram a presença de

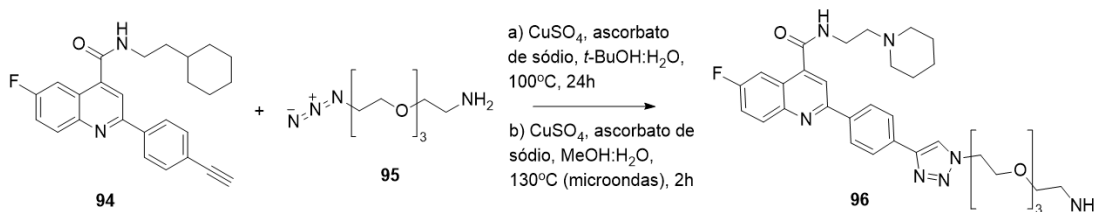
impurezas na amostra. Assim, uma segunda cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel (0-10% MeOH em DCM; 2,5 min 0%, 20min 0-10%, 5 min 10%) foi realizada e as frações desejadas foram rotaevaporadas (40 °C). 75,4 mg de produto sólido alaranjado foram obtidos (rendimento = 27%; 0,18 mmol; pureza estimada = 95%).

Método B: ácido 2-(4-etilfenil)-6-fluor-quinolin-4-óico (1 eq.; 530mg; 1,82 mmol), 4-metilmorfolina (2 eq.; 400 µL; 3,63 mmol) e DCM (20 mL) foram adicionados a um balão à temperatura ambiente e sob agitação magnética por 5 minutos (até a solubilização total do sistema). Em seguida, HATU foi adicionado (1,2 eq.; 830 mg; 2,18 mmol) e 1-(2-aminoetil)-piperidina (1 eq.; 259 µL; 1,82 mmol) foi adicionada. Após 16h, uma análise por LCMS indicou o consumo a formação do produto desejado (Agilent - TR = 2,17 min; M/z = 402; positivo). A reação lavada 3x com solução aquosa saturada de NaHCO₃, rotaevaporada (40°C) e o material obtido foi purificado por cromatografia *flash*, utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH/DCM como fase móvel (0-8% MeOH em DCM; 2,5 min 0%, 30min 0-8%, 10 min 8%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40°C). 486,1 mg de produto sólido alaranjado foram obtidos (rendimento = 60%; 1,09 mmol; pureza = 90% LCMS).



¹H RMN (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,03 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 2H, H18), 8,00 – 7,98 (m, 1H, H8), 7,97 (s, 1H, H2), 7,81 (dd, *J* = 10,1, 2,9 Hz, 1H, H5), 7,51 – 7,47 (m, 2H, H18), 7,48 – 7,44 (m, 1H, H7), 3,60 (s, 1H, H22), 3,58 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, H12), 2,68 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, H12), 2,57 (s, 4H, H14), 1,57 (p, *J* = 5,6 Hz, 4H, H15), 1,44 – 1,38 (m, 2H, H16). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 167,99 (C10), 160,96 (d, *J* = 248,2 Hz, C6), 155,13 (d, *J* = 2,5 Hz, C1), 145,57 (C9), 142,04 (d, *J* = 5,0 Hz, C3), 138,41 (C17), 132,14 (C19), 132,04 (d, *J* = 8,8 Hz, C8), 127,08 (C18), 124,30 (d, *J* = 10,1 Hz, C4), 123,86 (C20), 120,08 (d, *J* = 26,5 Hz, C7), 117,42 (C2), 108,64 (d, *J* = 25,2 Hz, C5), 82,68 (C21), 57,11 (C13), 53,96 (C14), 53,46 (C22), 36,13 (C12), 24,76 (C15), 23,36 (C16). LCMS M/z = 402 (M+H)⁺.

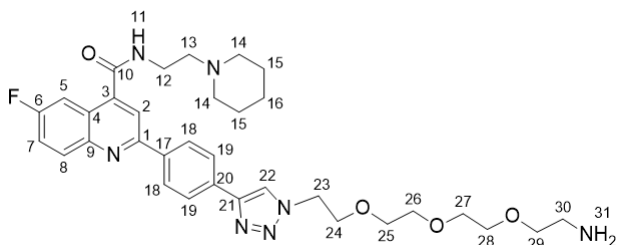
3.3.51. Adição de espaçante de PEG por *click chemistry* a 498PIno (síntese de 498PPEG) (adaptado de DEVARAJ, FINN, 2021; HIMO et al., 2005 e FANTONI, EL-SAGHEER, BROWN, 2021)



Esquema 56: reação de click chemistry para adição de espaçante de PEG e síntese de 498PPEGMS.

Método A: 1-amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecano (1 eq.; 25 μ L; 0,12 mmol), 498PIno (1 eq.; 50 mg; 0,12mmol), CuSO_4 (0,01 eq; 0,31 mg, 0,0012 mmol), ascorbato de sódio (0,1 eq; 2,5 mg; 0,012 mmol), *t*-BuOH (1mL) e H_2O (1mL) foram adicionados a um tubo de ensaio e mantidos sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. Após 2 dias, uma análise de LCMS indicou que não houve a formação de produto, assim, uma segunda carga de CuSO_4 (0,01 eq; 0,31 mg, 0.0012 mmol), ascorbato de sódio (0,1 eq; 2,5 mg; 0,012 mmol), 1-amino-11-azido-3,6,9- trioxaundecano (1 eq.; 25 μ L; 0,12 mmol) de outro frasco disponível no laboratório, *t*-BuOH (1mL) e H_2O (1mL) foi adicionada. Após 4h, um LCMS indicou a formação de produto de interesse (Shimadzu - TR = 1,34 min; M/z = 620; positivo). A reação foi então aquecida a 60 °C. Após 16h, foi notada a presença de material de partida (Shimadzu - TR = 1,62 min; M/z = 402; positivo), então a reação foi aquecida a 100 °C. Após 24 h, uma nova análise por LCMS indicou uma conversão de ~50% (Shimadzu). A reação foi então resfriada à temperatura ambiente, concentrada por fluxo de N_2 e diluída para 3 mL com DMSO:MeCN:H₂O (4:1:1). Em seguida, o material foi purificado por HPLC preparativo (Gilson, coluna C-18) utilizando MeCN e 0,1% ácido fórmico em água (v/v) como fase móvel. Variou-se a proporção de MeCN de 5 a 95% em uma corrida de 11 min de duração. As frações coletadas foram secas num evaporador centrífugo (Genevac). 3,3 mg de produto sólido amarelado foram obtidos (rendimento = 4%; 0,005 mmol; pureza estimada = 95% LCMS).

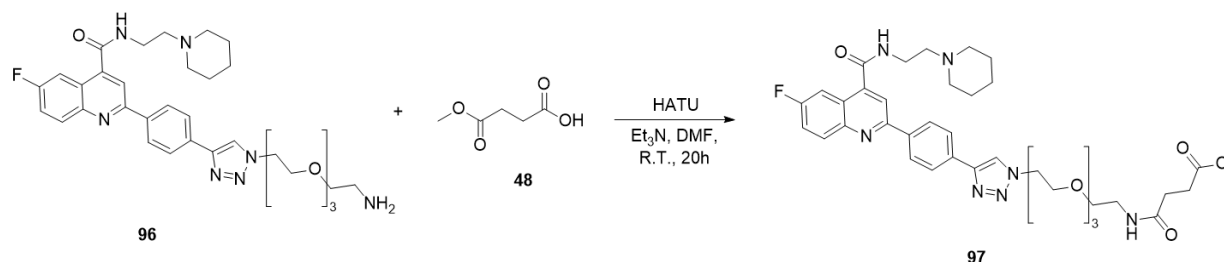
Método B: 1-amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecano (1 eq.; 241 μ L; 1,21 mmol), 498PIno (1 eq.; 487 mg; 1,21 mmol), CuSO_4 (0,01 eq; 3,0 mg, 0.012 mmol), ascorbato de sódio (0,1 eq; 24 mg; 0,12 mmol), MeOH (8mL) e H_2O (8mL) foram adicionados a um frasco sob agitação magnética e aquecidos a 130 °C por radiação de microondas durante 1 h (reator Biotage Initiator+). Uma análise por LCMS (Agilent - TR = 1,81 min; M/z = 620, positivo) indicou a formação de produto e presença de material de partida (Agilent - TR = 1,13 min; M/z = 219; positivo; TR = 2,16 min; M/z = 402, positivo), então a etapa de microondas foi repetida, levando ao consumo completo de material de partida. A reação foi então concentrada por rotaevaporação (60 °C) e purificada por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 12 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e 7M NH_3 -MeOH e DCM como fase móvel (2.5 min 0% 7M NH_3 -MeOH; 15 min 0-20%; 12,5 min 20%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas. 101,3 mg de produto sólido amarelado foram obtidos (rendimento = 13%; 0,16 mmol; pureza = 100% LCMS).



^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,44 (s, 1H, H22), 8,24 (d, J = 8,0 Hz, 2H, H19), 8,16 - 8,11 (m, 2H, H2 e H8), 7,96 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H18), 7,93 (s, 1H, H5), 7,58 (t, J = 8,8 Hz, 1H, H7), 4,63 (t, J = 5,2 Hz, 2H, H23), 3,94 (t, J = 5,2 Hz, 2H, H24), 3,67 - 3,63 (m, 2H, H12), 3,63 - 3,60 (m, 2H, H25), 3,57 - 3,50 (m, 6H), 3,43 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,72

(t, $J = 5,4$ Hz, 2H), 2,65 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H13), 2,54 (bs, 4H), 1,64 (p, $J = 5,8$ Hz, 4H), 1,49 (bs, 2H, H16). ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 167,95 (C10), 160,85 (d, $J = 247,7$ Hz, C6), 155,54 (C21), 146,55 (C20), 145,60 (C9), 142,34 (d, $J = 5,6$ Hz, C3), 137,96 (C1), 131,98 (C17), 131,89 (C8), 127,69 (C19), 125,64 (H18), 124,29 (d, $J = 10,5$ Hz, C3), 122,22 (C22), 120,01 (d, $J = 26,3$ Hz, H7), 117,36 (C2), 108,65 (d, $J = 23,9$ Hz, C5), 71,49, 70,10 (C25), 70,04, 69,85, 68,92 (C24), 57,44 (C13), 54,20 (C14), 50,19 (C23), 40,53, 36,61 (C12), 25,31 (C15), 23,85 (C16). LCMS $M/z = 620$ (M+H) $^+$.

3.3.52. Amidação de ácido metil succínico com o 498PPEG (síntese de 498PPEGMS)
(adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016)



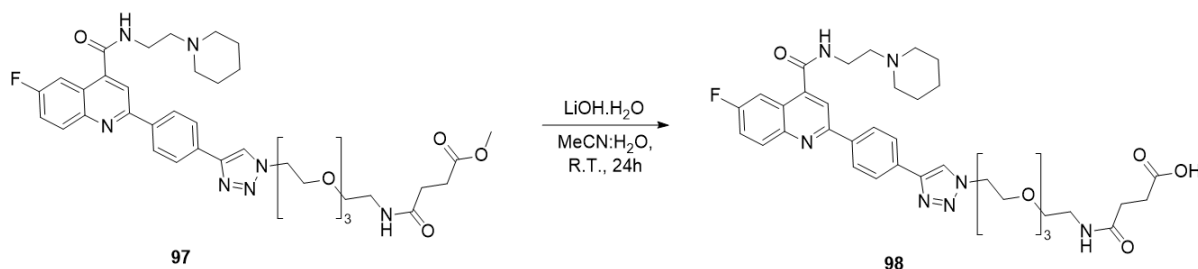
Esquema 57: reação amidação de 498PPEG com succinato de monometila.

Em um tubo de ensaio sob agitação magnética constante, à temperatura ambiente e sob atmosfera de N_2 , foi adicionado o 498PPEG (1 eq.; 50mg; 0,08mmol), succinato de monometila (1,5 eq.; 16 mg; 0,12mmol), Et_3N (2 eq.; 0,02 mL; 0,16 mmol), HATU (52,15 mg; 0,14 mmol) e DMF (1mL). Após 20 h, uma análise por LCMS indicou consumo total de material de partida e formação de produto (Agilent - TR = 1,86min, $M/z = 734$, positivo), então a reação foi interrompida, diluída com 2 mL de H_2O e 10 mL de solução aquosa saturada de NaHCO_3 . A fase aquosa foi extraída 3x com EtOAc e 3x com DCM. As frações orgânicas foram combinadas e secas por rotaevaporação (40 °C). Foi realizada uma purificação por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH e DCM como fase móvel (2 min 0% MeOH; 16 min 0-15%; 2 min 15%). As frações desejadas foram coletadas e rotaevaporadas (40 °C). 36,5 mg de produto sólido foram obtidos (rendimento = 61%; 0,05 mmol; pureza = 99% LCMS).

^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,33 (s, 1H, H22), 8,19 – 8,15 (m, 2H, H19), 8,09 (s, 1H, H2), 8,08 – 8,03 (m, 1H, H8), 7,89 – 7,84 (m, 2H, H18), 7,50 (ddd, $J = 9,3, 8,1, 2,9$ Hz, 1H, H7), 4,54 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, H23), 3,85 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H, H24), 3,70 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, H12), 3,56 – 3,54 (m, 2H), 3,50 (s, 3H, H36), 3,47 – 3,45 (m, 2H), 3,43 – 3,40 (m, 2H, H25), 3,33 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H, H29), 3,17 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H, H30), 3,05 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, H13), 2,97 (bs, 4H, H14), 2,42 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, H33),

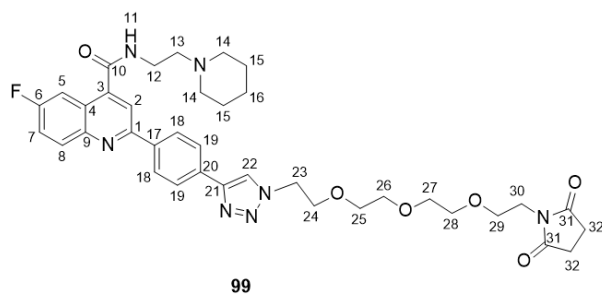
2,32 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, H34), 1,70 (p, $J = 5,7$ Hz, 4H, H15), 1,55 – 1,49 (m, 2H, H16). ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 173,37 (C35), 172,85 (C32), 168,65 (C10), 160,94 (d, $J = 247,8$ Hz, C6), 155,59 (C21), 146,58 (C20), 145,73 (C9), 141,41 (d, $J = 5,2$ Hz, C3), 137,91 (C1), 132,04 (d, $J = 9,3$ Hz, H8), 131,95 (C17), 127,72 (C19), 125,70 (C18), 124,23 (d, $J = 10,6$ Hz, C4), 122,26 (C22), 120,04 (d, $J = 26,3$ Hz, C7), 117,59 (C2), 108,63 (d, $J = 24,3$ Hz, C5), 70,11, 70,08, 70,04, 69,87 (C25), 69,10 (C29), 68,88 (C24), 56,68 (C13), 53,77 (C14), 50,77 (C36), 50,21 (C23), 39,00 (C30), 35,52 (C12), 29,99 (C34), 28,79 (C33), 23,93 (C15), 22,26 (C16). LCMS $M/z = 734$ (M+H) $^+$.

3.3.53. *Desproteção do éster de 498PPEGMS (síntese de 498PPEGS)* (adaptado de CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012)



Esquema 58: reação de desproteção de éster de 498PPEGMS para síntese de 498PPEGS

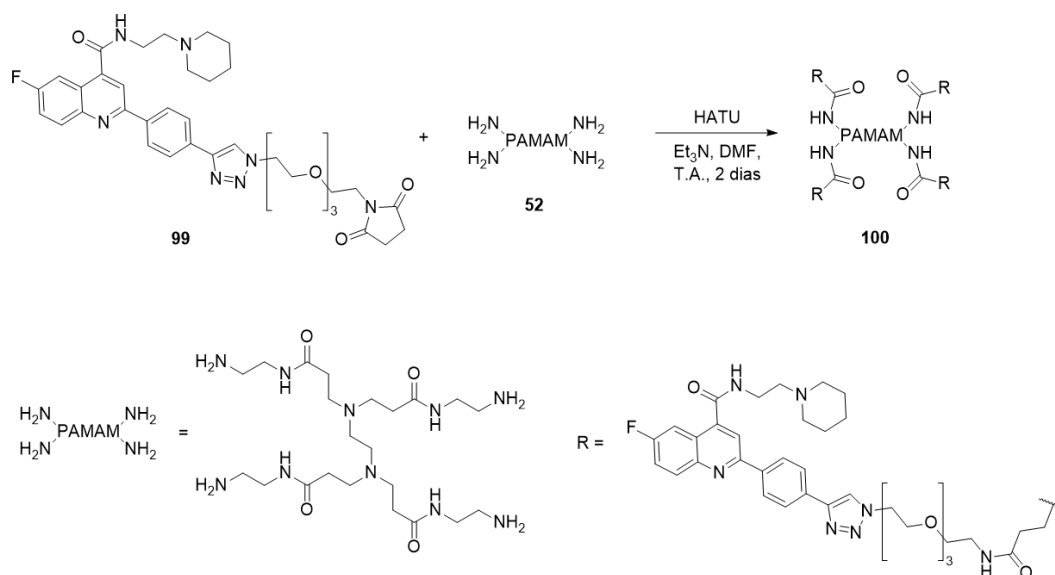
498PPEGMS (1 eq; 25mg; 0,03 mmol), LiOH.H₂O (1,1 eq; 1,6 mg; 0,04 mmol), H₂O (81 eq.; 50 μL ; 2,78 mmol) e MeCN (1 mL) foram adicionados a um tubo de ensaio e mantidos sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. Após 24 h, uma análise por LCMS indicou a formação de produto (Shimadzu - TR = 1,85 min; $M/z = 702$; positivo). A reação foi diluída com 15 mL de H₂O e acidificada a pH 1 com solução aquosa 1 M de HCl. A fase aquosa foi extraída 3x com DCM e 2x com EtOAc e notou-se, em uma análise de LCMS, que havia produto remanescente na fase aquosa. Assim, o pH da solução aquosa foi aumentado para 4 com uma solução aquosa saturada de NaHCO₃ e essa fração foi extraída 3x com DCM. O procedimento foi repetido mais 2 vezes após aumento do pH para 7 (solução aquosa de NaHCO₃) e para 10 (solução aquosa 1M de NaOH). Todas as frações orgânicas foram combinadas e rotaevaporadas. Obtiveram-se 15,3 mg de um sólido correspondente a produto (rendimento = 59%; 0,02 mmol; pureza estimada = 95%).



^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 8,37 (s, 1H, H22), 8,22 – 8,18 (m, 2H, H19), 8,14 – 8,06 (m, 2H, H2 e H8), 7,92 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H18), 7,88 (dd, $J = 10,1, 2,9$ Hz, 1H, H5), 7,52 (ddd, $J = 9,4, 8,2, 2,9$ Hz, 1H, H7), 4,56 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, H23), 3,86 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, H24), 3,59 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H, H12), 3,56 – 3,52 (m, 2H), 3,51 – 3,47 (m, 2H, H30), 3,47 – 3,44 (m, 2H), 3,42 (d, $J = 7,7$ Hz, 4H), 2,65 (t,

$J = 6,7$ Hz, 2H, H13), 2,57 – 2,52 (m, 4H, H14), 2,52 (s, 4H, H32), 1,58 (q, $J = 5,7$ Hz, 4H, H15), 1,48 – 1,40 (m, 2H, H16). ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm): 178,37 (C31), 168,10 (C10), 160,92 (d, $J = 247,3$ Hz, C6), 155,72 (C21), 146,58 (C20), 145,69 (C9), 142,35 (d, $J = 5,6$ Hz, C3), 138,06 (C1), 131,99 (d, $J = 3,4$ Hz, H8), 131,92 (C17), 127,73 (C19), 125,72 (C18), 124,33 (d, $J = 10,5$ Hz, C4), 122,33 (C22), 120,03 (d, $J = 26,3$ Hz, H7), 108,64 (d, $J = 24,2$ Hz, C5), 70,13, 70,10, 70,06, 69,71, 68,93 (C24), 66,70, 57,28 (C13), 54,11 (C14), 50,25 (C23), 37,62 (C30), 36,43 (C12), 27,65 (C32), 25,07 (C15), 23,60 (C16). LCMS $M/z = 702$ (M+H)⁺.

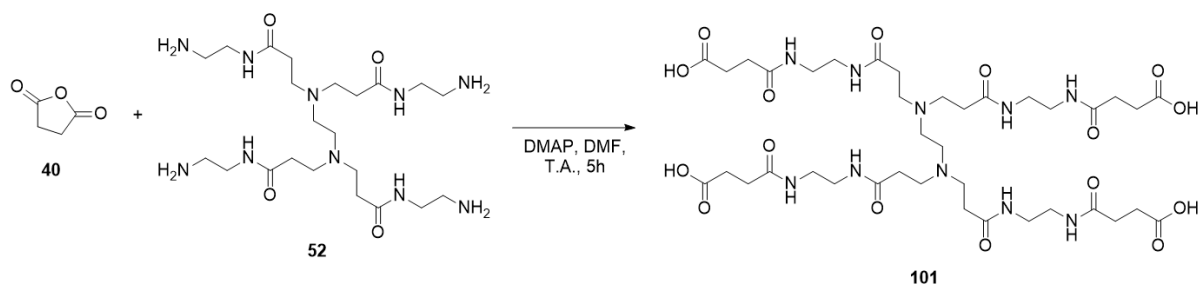
3.3.54. Amidação de PAMAM G0 e 498PPEGS (adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016)



Esquema 59: reação acoplamento de 498PPEGS e PAMAM G0.

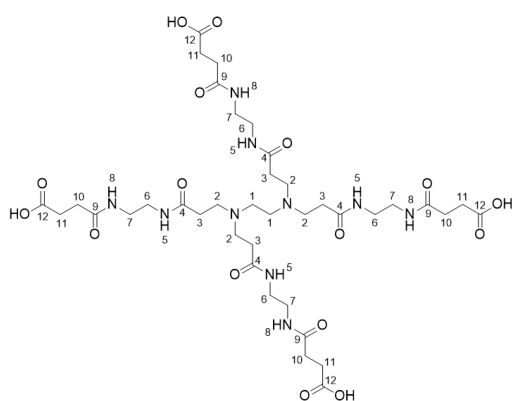
498PPEGS (4 eq.; 15mg; 0,021 mmol) e PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq.; 16 μL , 0,005 mmol) foram adicionados a um tubo de ensaio e o solvente foi removido por *blowdown* de N₂. Et₃N (8 eq.; 6 μL ; 0,042 mmol), HATU (6 eq.; 13 mg; 0,031 mmol) e DMF (1 mL) foram adicionados e a reação foi mantida sob agitação magnética constante e à temperatura ambiente. Análises de LCMS após 20 e 48 h indicaram a presença de material de partida, sem formação de produto de interesse (Agilent - TR 1,59 min; $M/z = 724$; positivo).

3.3.55. Succinoilação de PAMAM G0 (adaptado de SANTOS, 2016)



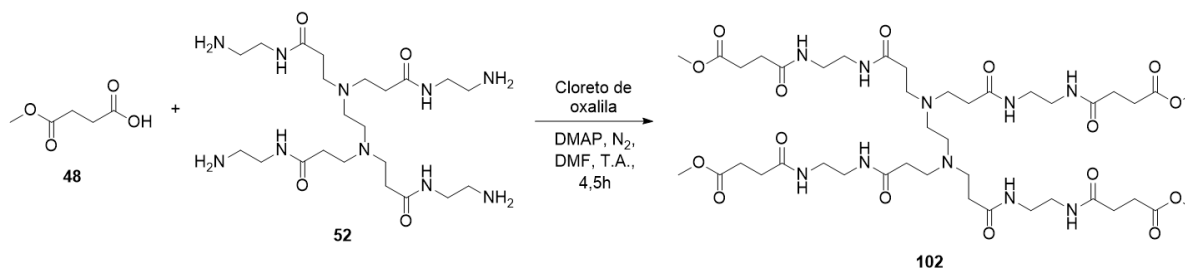
Esquema 60: reação amidação de anidrido succínico e PAMAM G0.

PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq.; 0.2 mL, 0,066 mmol) foi adicionado a um tubo de ensaio e rotaevaporado (40 °C). Anidrido succínico (10 eq.; 66 mg; 0,66 mmol), DMAP (11 eq.; 89 mg; 0,73 mmol) e DMF (1mL) foram então adicionados e a reação foi mantida sob agitação constante à temperatura ambiente. Após 3 h, uma análise por LCMS (Shimadzu - TR = 0,75 min; M/z = 915; negativo; M/z= 917; positivo) indicou a formação de produto e, após 5h, uma CCD (20% MeOH em DCM) revelada com ninidrina indicou o consumo total de PAMAM. A reação foi então diluída com 5 mL de MeOH e passada em uma coluna de troca aniônica (Biotage Isolute PE-AX). A coluna foi lavada 1x com MeOH (fração PEAX1) e 1x com 2M ácido fórmico em MeOH (fração PEAX2). Análise por LCMS indicou que o produto de interesse foi coletado na fração PEAX2, então ela foi rotaevaporada (40 °C), porém uma análise por RMN indicou a presença de possíveis impurezas. Assim, o material foi purificado por cromatografia *flash* utilizando-se um cartucho de sílica de 4 g (Teledyne ISCO RediSep Rf) e MeOH e DCM como fase móvel (2min 0% MeOH; 20 min 0-20%; 2 min 20%). Nenhuma das frações coletadas possuía produto. A coluna cromatográfica foi lavada por 15 min com 20% MeOH em DCM, porém uma análise por RMN mostrou que produto não havia sido coletado. A coluna foi lavada com 100 mL de MeOH, sendo todo o solvente coletado e rotaevaporado (40 °C). 19,7 mg de produto oleoso foram coletados (rendimento = 31%; 0,02 mmol; pureza estimada = 95%).



^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 3.20 (s, 4H, H6 e H7), 2,99 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H2), 2,93 (s, 1H, H1), 2,46 (t, J = 6,9 Hz, 2H, H3), 2,42 (t, J = 7,3 Hz, 2H, H10), 2,35 (t, J = 6,4 Hz, 2H, H11). ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 177,97 (C12), 174,59 (C9), 172,41 (C4), 49,50 (C1), 48,57 (C2), 38,80 (C6 ou C7), 38,45 (C6 ou C7), 31,75 (C11), 31,72 (C12), 31,17 (C3). LCMS M/z = 917 (M+H) $^+$.

3.3.56. Metil-succinoilação de PAMAM G0 (adaptado de DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016)



Esquema 61: reação amidação de succinato de monometila e PAMAM G0.

Succinato de monometila (10 eq.; 218 mg; 1,65 mmol), DMAP (11 eq.; 222 mg; 1,81 mmol) e 1 mL de DMF foram adicionados a um tubo de ensaio sob agitação magnética constante, atmosfera de N₂ e à temperatura ambiente. Em seguida, cloreto de oxalila (11 eq.; 89 µL; 1,81 mmol) foi adicionado gota a gota. Em um tubo de ensaio diferente, PAMAM G0 20% (m/m) em MeOH (1 eq.; 500 µL; 0,16 mmol) foi rotaevaporado (40 °C) e dissolvido em 1 mL de DMF, sendo esta solução adicionada gota a gota ao tubo de ensaio com o meio reacional. Foi notada a presença de material precipitado após a adição do dendrímero, então 2 mL de DMF foram adicionados. Após 4,5h, uma análise por LCMS (Shimadzu - TR = 1,41 min; M/z = 973; positivo) indicou a formação de produto, enquanto uma análise por CCD (20% MeOH em DCM) revelada com ninidrina indicou o consumo total de PAMAM. A reação foi resfriada em banho de gelo (0 °C) e diluída com 2 mL de H₂O. O meio reacional foi passado em uma coluna mista de troca aniônica e catiônica (Biotage Isolute PEAX/SCX-2), a qual foi lavada 2x com 10 mL de MeOH. Todo o solvente foi coletado e uma análise de LCMS indicou a presença de produto e outras impurezas. Pelo fim do período na Universidade de Dundee, nenhum outro procedimento foi realizado com essa reação. Foi considerado um rendimento de 100% por conta do resultado da CCD.

3.4. Ensaios físico-químicos e biológicos de compostos de interesse

Todos os ensaios listados no item 3.4 foram realizados pela equipe da Universidade de Dundee, a partir dos protocolos descritos abaixo.

3.4.1. Ensaios de atividade anti-malárica (BARAGANA et al., 2016)

35 mL de sangue foram adicionados a um tubo *falcon* de 50 mL e o volume foi completado com meio celular "incompleto" pH 7,3 (15,9 g/L RPMI1640, 1g/L NaHCO₃, 2 g/L glicose, 20 mg/L gentamicina e 2 mL/L de solução de hipoxantina - 13,6 g/L de hipoxantina em 0,1 M NaOH). O conteúdo foi lavado 4 vezes em um processo que consistia na centrifugação a 1800 g por 5 min e eliminação do sobrenadante. O material precipitado foi ressuscitado em meio "completo" (mesma composição do meio "incompleto" com a adição de Albumax II na concentração de 5 g/L) e as células foram sedimentadas por centrifugação a 1800 g por 3 min.

P. falciparum 3D7 foram cultivados em uma suspensão de hemácias com hematócrito 5%, utilizando-se as células preparadas conforme processo descrito acima. A temperatura foi mantida em 37°C e a atmosfera foi mantida umidificada e com 1% de O₂, 3% de CO₂ e o restante de N₂. Para o ensaio com o composto, foram adicionados, em cada poço de uma placa de 96 poços, 150 µL de *P. falciparum* cultivado em suspensão de hemácias com hematócrito 2,5% e parasitemia de 0,3%. Diferentes concentrações de molécula potencialmente ativa foram adicionadas até um máximo de 25 µM. Os parasitas foram incubados com as moléculas de interesse por 3 dias a 37°C e com atmosfera umidificada, contendo 1% de O₂, 3% de CO₂ e o restante de N₂. Foram realizadas duplicatas e mefloquina foi utilizada como controle positivo.

A determinação da concentração de composto que causa inibição de 50% no crescimento do parasita (EC₅₀) foi realizada em um ensaio de fluorescência utilizando-se verde SYBR.

3.4.2. Clearance em microssomos hepáticos de camundongo (BARAGAÑA *et al.*, 2016; PATTERSON *et al.*, 2013)

As moléculas de interesse, em uma concentração de 0,5 µM, foram incubadas com microssomos hepáticos de camundongos fêmeas CD1 (Xenotech LLC; 0,5 mg/ml em 50 mM de tampão fosfato, pH 7.4). Em seguida, 8 mg/mL de NADPH foram adicionados e alíquotas de 50 µL dessa solução foram retiradas logo após a adição de NADPH e após 3, 6, 9, 15 e 30 min. Para neutralizar os microssomos, foram adicionados 100 µL de MeCN a cada alíquota. Um padrão interno também foi adicionado a cada alíquota. As proteínas de cada alíquota foram precipitadas por centrifugação e analisadas por cromatografia líquida de ultra performance associada a um espectrômetro de massas em tandem (UPLC-MS/MS), marca Waters, modelo Quattro Premier XE. A partir da diminuição em função do tempo na área do pico do composto em relação ao padrão, foi calculado o *clearance* conforme descrito na literatura (BARAGAÑA *et al.*, 2016; PATTERSON *et al.*, 2013). Verapamil foi utilizado como controle positivo.

3.4.3. Avaliação da toxicidade em células HepG2 (PATTERSON *et al.*, 2013)

Células HepG2 foram adicionadas a poços (10⁵ células por mL) de uma placa de 384 poços e incubadas com o composto de interesse por 72 h. Foram utilizadas 10 concentrações diferentes do composto de interesse, iniciando-se com uma concentração de 100 µM e diluindo-a 1:3 seriadamente. Após a incubação, resazurina foi adicionada aos poços de interação e o sistema foi incubado por mais 3-4 h. A fluorescência de cada poço foi então medida em um PHERAstar (BMG LabTech) e a concentração de composto que causa inibição de 50% no crescimento das células (EC₅₀) foi calculada em seguida.

3.4.4. Avaliação da solubilidade aquosa

5 µL de solução 10 mM em DMSO do composto testado foram adicionados a 195 µL de tampão fosfato aquoso (pH 7,4) e agitado por 24 h a 900 rotações por minuto (RPM) e à 25 °C.

A solução foi filtrada e alíquotas de 0,4 e 0,5 μL foram analisadas por UHPLC para determinação de sua concentração por comparação com uma curva de calibração.

A curva de calibração foi construída utilizando-se a solução inicial de 10 mM em DMSO. Essa solução foi diluída para 500 μL em DMSO e, em seguida, diluída novamente em água:MeCN (1:1) para uma concentração de 50 μL . Alíquotas de 0,2, 2,0 e 5 μL foram injetadas no UHPLC e a área do pico do composto de interesse de cada alíquota foi calculada e utilizada para construção da curva.

3.4.5. Avaliação da permeabilidade em células MDCK

Células MDCK-MDR1 foram utilizadas para avaliação da permeabilidade dos compostos de interesse. Células cultivadas previamente em meio *Dulbecco's Modified Eagle* suplementado com 1% penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino foram utilizadas para semear frascos ThinCerts™ (Greiner Bio-One) com uma população de 35000 células. As células semeadas foram cultivadas no meio Dulbecco suplementado mencionado previamente por 3 dias à 37 °C e em uma atmosfera com 5% de CO₂. O meio de cultura foi renovado e incubou-se as células por mais 1 h. O meio foi então trocado para meio tampão fosfato Dulbecco e as células foram incubadas novamente por 1 h. Separadamente, uma solução 3 μM de composto de interesse e 10 μM de luciferina amarela (1% em DMSO) foi preparada.

Em uma placa de 24 poços, foram adicionados 1,2 mL de tampão fosfato com 1% de DMSO a cada poço. 0,35 mL da solução com composto de interesse foram adicionados ao lado apical das células cultivadas nos frascos ThinCert, os quais foram colocados na placa de 24 poços. O sistema foi incubado por 1 h e os frascos foram transferidos para uma placa vazia. 100 μL da porção apical, 100 μL da porção basolateral e 100 μL da solução teste original são então colocados em poços de uma placa de 96 poços e 150 μL de solução contendo um padrão interno (100 ng/mL de sulfadimetoxina) são adicionados aos poços, os quais são analisados por LC-MS/MS. Para controle positivo, o mesmo procedimento é realizado com bupropiona e, para controle negativo, com atenolol. A permeabilidade aparente (P_{app}) é calculada pela Equação 1 abaixo:

$$P_{\text{app}} = [(V_{\text{B}}/A_{\text{ThinCert}}) \times (A_{\text{B}}/A_{\text{a}})] / t_{\text{inc}}$$

Equação 1: equação de determinação de P_{app} em nm/s. V_{B} é o volume do frasco contendo a porção basolateral, A_{ThinCert} é a área da região em que as células são cultivadas no frasco ThinCert, A_{B} é a área do pico do produto de interesse obtida no ensaio de LC-MS/MS da amostra da região basolateral, A_{a} é a área do pico do produto de interesse obtida no ensaio de LC-MS/MS da amostra da região apical e t_{inc} é o tempo de incubação do experimento em segundos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de Resultados e Discussão será dividida em 5 partes. A primeira parte (4.1.) apresentará os resultados obtidos dos ensaios *in silico* para avaliação da ligação de heparina a

PvTRAg36.6 e PvTRAg56.2. A segunda parte (4.2.) apresentará os resultados referentes à síntese dos derivados de *BisMPA*: *BisMPAP* e anidrido de *BisMPAP*. A terceira parte (4.3.) apresentará os resultados da síntese do dendron de artesunato. A quarta parte (4.4.) apresentará os resultados referentes à síntese do dendron de mefloquina. A quinta parte (4.5.) apresentará os resultados referentes ao período na Universidade de Dundee. A sexta parte (4.5.) apresentará os resultados referentes à tentativa de ligação direta de DHA e MQ a um derivado de heparina

4.1. Avaliação *in silico* da ligação de heparina a PvTRAg36.6 e PvTRAg56.2

4.1.1 Construção dos modelos 3D de PvTRAg36.6 e PvTRAg56.2

Para a construção dos modelos 3D das proteínas em questão, iniciou-se com uma busca por proteínas homólogas na base de dados do PDB através de um BLAST. A busca com o valor padrão de *expect value threshold* do BLAST (0,05) não encontrou resultado, assim, para uma busca menos restrita, o valor foi aumentado para 10, porém, novamente, nenhum resultado foi retornado, indicando que nenhuma proteína homóloga existe no PDB e que, portanto, estratégias de homologia não poderiam ser utilizadas para a construção dos modelos de PvTRAg36.6 e PvTRAg56.2.

Assim, inicialmente utilizou-se o servidor do Phobius para identificação de peptídeo sinal nas proteínas, o qual é necessário para o correto endereçamento delas, mas é clivado eventualmente. (SAITO et al., 2011; CHOO, RANGANATHAN, 2008). Foi identificado um peptídeo sinal apenas na PvTRAg36.6, sendo ele formado pelos 28 primeiros aminoácidos da proteína. Dessa forma, 3 sequências de proteínas foram utilizadas para a construção dos modelos 3D: PvTRAg36.6, PvTRAg36.6 sem o peptídeo sinal (PvTRAg36.6-NS) e PvTRAg56.2. A sequência da PvTRAg36.6 com o peptídeo sinal foi incluída para aumentar a diversidade de estruturas e para cobrir erros na predição do Phobius. Para cada sequência utilizada, o método trRosetta retorna 5 modelos de proteína e, portanto, 15 modelos foram obtidos.

Os modelos da PvTRAg36.6 são formados por α -hélices conectadas por *loops*, formando uma estrutura semelhante a um tubo (Figura 10). No caso do modelo 4 dessa proteína, algumas α -hélices e *loops* perto da região N-terminal (aminoácidos 1 a 116) estão em uma disposição perpendicular ao restante da proteína, fazendo com que sua estrutura terciária se assemelhe à letra T. O modelo 5 também possui particularidades, sendo que a região formada pelos aminoácidos 30 a 120 aparenta estar alongada e levemente dobrada. Assim, esse modelo aparenta ser uma estrutura intermediária entre o formato de tubo e o T.

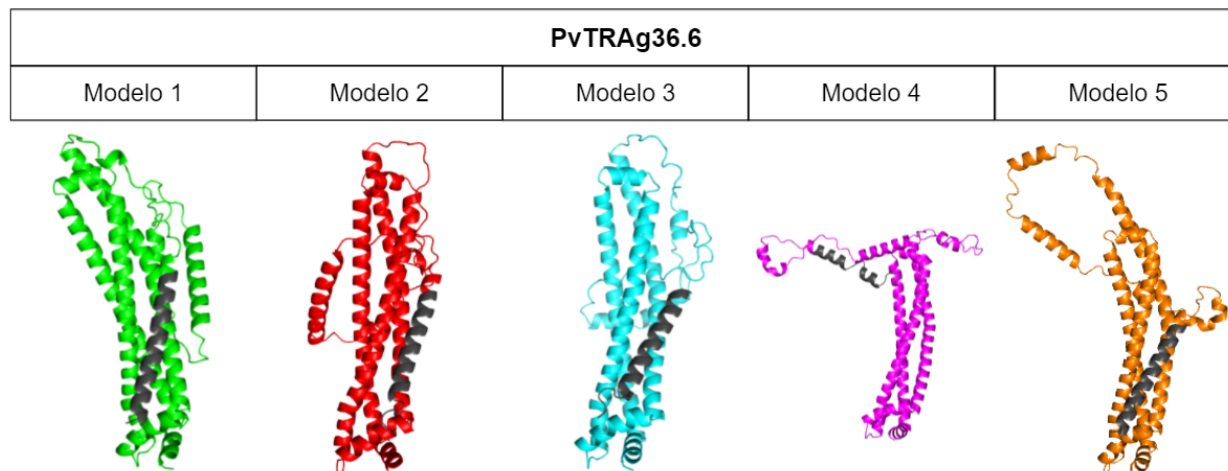


Figura 10: Modelos construídos da PvTRAg36.6. O peptídeo sinal de 28 aminoácidos previsto pelo Phobius está indicado em cinza nas imagens.

Os modelos da PvTRAg36.6-NS também são formados por α -hélices conectadas por *loops* em um formato tubular (Figura 11) e, como esperado, são semelhantes aos da PvTRAg36.6. Particularmente, a região *N*-terminal do modelo 4 (aminoácidos 1 a 88) e do 5 (aminoácidos 1 a 82) está em uma disposição alongada e ligeiramente dobrada. Especialmente no caso do modelo 5 da PvTRAg36.6-NS, o formato lembra ligeiramente a letra T, assim como o modelo 4 da PvTRAg36.6.

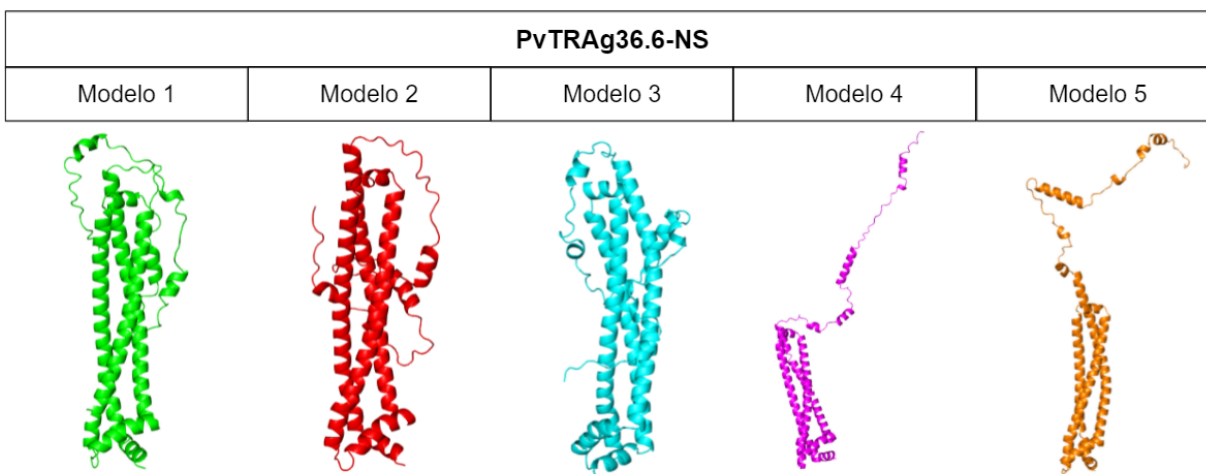


Figura 11: Modelos construídos da PvTRAg36.6-NS

Uma vez que a sequência de aminoácidos da PvTRAg56.2 é mais longa do que a PvTRAg36.6, sua estrutura 3D é mais complexa (Figura 12), também é formada por α -hélices conectadas por *loops*. A maioria das α -hélices está disposta em um formato tubular, entretanto,

próximo à região C-terminal (aminoácidos 387 a 457), os aminoácidos estão dispostos perpendicularmente ao tubo, conferindo à proteína a aparência da letra L. No caso dos modelos 1 e 5, outras α -hélices próximas da região N-terminal (aminoácidos 68 a 136 e 1 a 150, respectivamente) estão em orientações espaciais diferentes em relação à parte tubular da proteína.

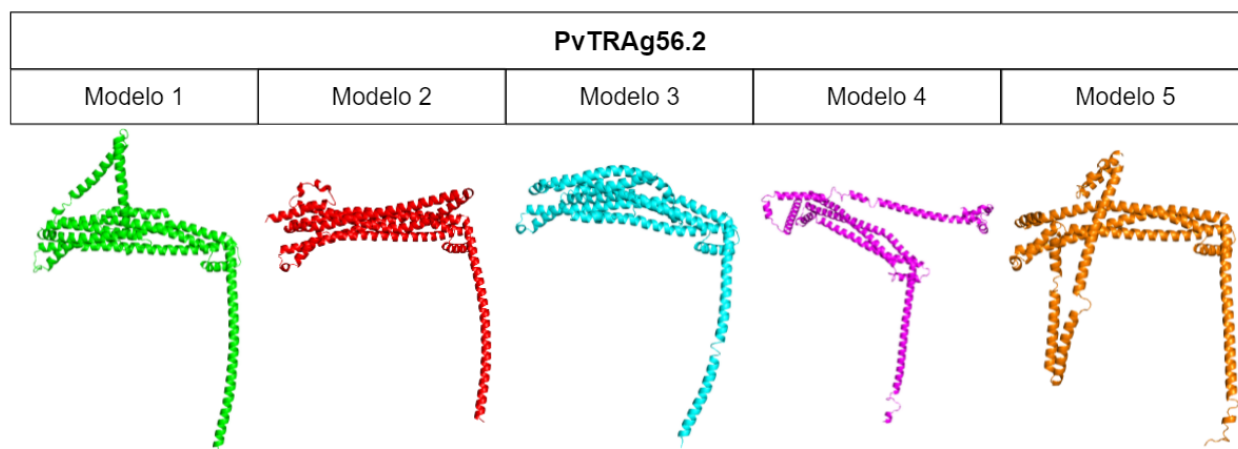


Figura 12: Modelos construídos da PvTRAg56.2.

Juntamente com os modelos, o servidor do Robetta também fornece erros estimados para a posição de cada aminoácido da proteína e um valor de confiança entre 0 e 1 (HIRANUMA et al., 2021). Os valores de confiança obtidos foram 0,60 para a PvTRAg36.6, 0,64 para a PvTRAg36.6-NS e 0,49 para a PvTRAg56.2. Apesar de os valores aparentarem ser baixos, é possível notar um resultado interessante analisando-se o erro estimado dos aminoácidos (Figura 13). No caso da PvTRAg36.6 e PvTRAg36.6-NS, há uma queda notável no erro estimado a partir das posições 120 e 75, respectivamente. Assim, regiões após essas posições possuem maior grau de confiança. Entretanto, o mesmo não ocorreu com a PvTRAg56.2, apesar de algumas posições terem um baixo erro estimado.

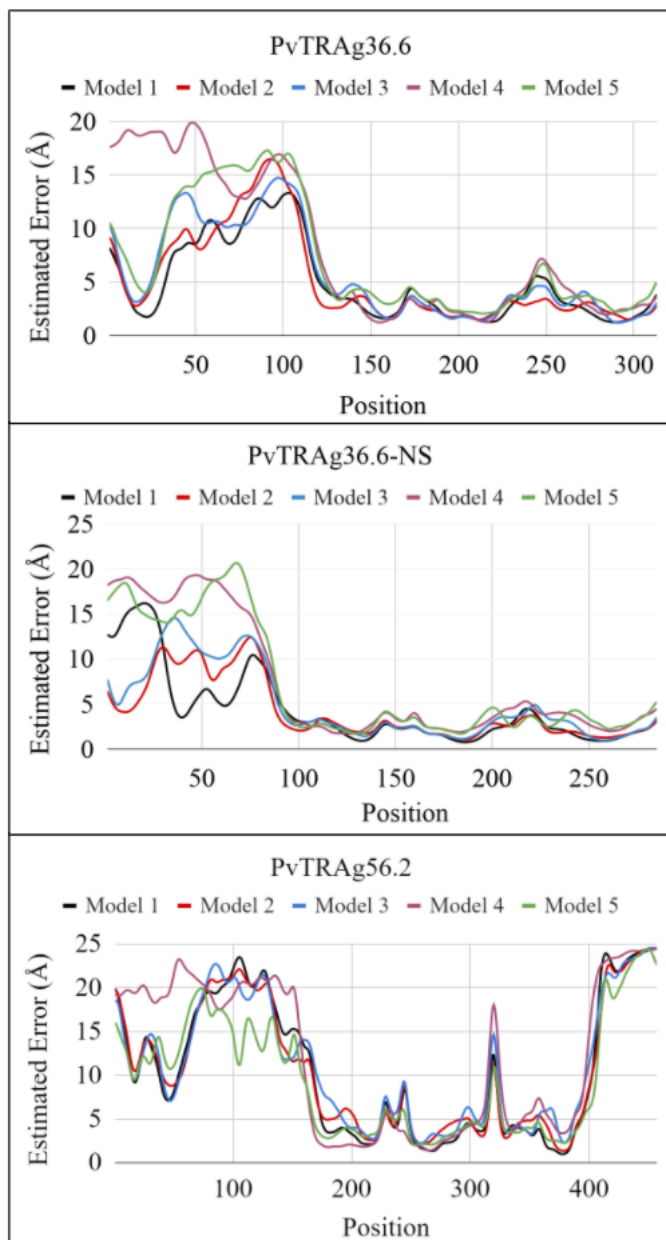


Figura 13: Erro estimado (\AA) para cada resíduo de aminoácido dos diferentes modelos construídos. De cima a baixo estão os gráficos da PvTRAg36.6, PvTRAg36.6-NS e PvTRAg56.2, sendo que, em cada gráfico, cada curva representa um modelo distinto.

Assim, apesar da baixa confiança apresentada, a presença de múltiplos modelos de proteínas permite a realização de diferentes *dockings*. Caso haja uma convergência no sítio de ligação e na energia de ligação, os erros nas posições dos aminoácidos podem não ser relevantes. Esse comportamento foi observado e será discutido nas etapas seguintes. Além disso, no caso da PvTRAg36.6 e PvTRAg36.6-NS, vários aminoácidos envolvidos na ligação estão em regiões de baixo erro estimado. Por fim, um estudo que modelou uma proteína de

membrana de SARS-CoV-2 por métodos sem molde determinou que o método trRosetta foi o de melhor desempenho após a utilização de diferentes *softwares* de validação (MAHTARIN et al, 2020). Dessa forma, pode-se considerar que os modelos obtidos são válidos para a realização do *docking*.

4.1.2 Validação dos modelos construídos

A análise do ERRAT parte do fundamento que a distribuição de diferentes átomos em relação a outros átomos (a análise é feita entre pares de átomos) em uma proteína segue determinados padrões. Esse comportamento foi observado na análise de diferentes proteínas depositadas no PDB com cristais considerados de alta qualidade Assim, se uma região em que os átomos se distribuem de maneira aleatória for encontrada, é provável que a atribuição das posições esteja incorreta. Além disso, os autores desse método de análise a consideram sensível para encontrar erros de aproximadamente 1,5 Å no *backbone* da proteína (COLOVOS, YATES, 1993). Na Tabela 1 encontra-se o valor de qualidade geral dos modelos de acordo com o ERRAT, sendo que esse valor se refere à porcentagem de aminoácidos que se adequam ao teste e, portanto, possuem baixa probabilidade de estarem incorretamente distribuídos.

Tabela 1: Qualidade geral pelo método ERRAT dos modelos de proteínas construídos. A última linha da tabela apresenta a média dos valores dos modelos de cada proteína.

Modelo	PvTRAg36.6 (%)	PvTRAg36.6-NS (%)	PvTRAg56.2 (%)
1	97,697	94,853	100
2	97,377	95,956	100
3	97,049	96,739	97,105
4	98,033	97,810	100
5	98,689	96,377	100
Média	97,769	96,347	99,421

Na análise de cada modelo da PvTRAg36.6, nota-se que a maioria dos aminoácidos considerados incorretos estava em posições abaixo de 60, sendo que apenas os modelos 2 e 5 apresentaram aminoácidos incorretos em outras regiões além dessas (100-120 e 120-130, respectivamente). Tal resultado encontra-se de acordo com os erros estimado pelo próprio trRosetta, uma vez que eles são mais elevados até a posição 120. No caso da PvTRAg36.6-NS, os aminoácidos incorretos pelo ERRAT encontram-se todos abaixo da posição 85, exceto no modelo 4, em que também havia aminoácidos incorretos entre as posições 190 e 200. Novamente, esse resultado encontra-se de acordo com os erros estimados pelo trRosetta, o qual identificou um maior erro para aminoácidos abaixo da posição 75. Por fim, quanto a PvTRAg56.2, apesar de os erros estimados pelo trRosetta serem maiores em relação às outras proteínas, o ERRAT apresentou valores de qualidade maiores para a

PvTRAg56.2, sendo que apenas o modelo 3 possui aminoácidos incorretos segundo o ERRAT (nas regiões entre os aminoácidos 25-35, 105-115 e 260-270). Isso pode indicar que as posições atribuídas pelo trRosetta ao *backbone* da PvTRAg56.2 possuem uma alta qualidade.

No geral, os valores de qualidade obtidos pela análise com o ERRAT são elevados, sendo que resultados acima de 95% estão associados a estruturas com boa resolução, de acordo com a página de resultados emitida pelo servidor. Apenas o modelo 1 da PvTRAg36.6-NS apresentou um valor abaixo de 95%, porém ele encontra-se muito próximo desse limite. Assim, considera-se que os modelos construídos estão validados na análise do ERRAT e, portanto, o *backbone* da proteína possui uma estrutura adequada.

Em seguida, utilizou-se o programa VERIFY 3D para outra validação das estruturas. Esse programa determina certos ambientes na estrutura terciária de uma proteína em que cada tipo de resíduo de aminoácido pode ser encontrado. Isso é feito a partir da análise de diferentes estruturas previamente determinadas de proteínas. Assim, é possível atribuir uma nota correspondente à probabilidade de se encontrar um determinado aminoácido em um determinado ambiente e, ao final, pode-se avaliar se a sequência de aminoácidos é compatível com a estrutura (BOWIE, LÜTHY, EISENBERG, 1991). Na Tabela 2 é apresentada a porcentagem de aminoácidos com uma nota maior ou igual a 0,2. O servidor utilizado considera a estrutura adequada se a porcentagem for maior ou igual a 80%.

Tabela 2: Porcentagem de aminoácidos com nota $\geq 0,2$ pelo método VERIFY 3D para todos os modelos construídos das proteínas PvTRAg36.6, PvTRAg36.6-NS e PvTRAg56.2.

Modelo	PvTRAg36.6 (%)	PvTRAg36.6-NS (%)	PvTRAg56.2 (%)
1	82,43	88,07	50,55
2	83,71	81,05	56,24
3	82,75	80,70	55,36
4	66,13	71,93	43,98
5	72,52	76,49	63,24
Média	77,51	79,65	53,87

Nos casos da PvTRAg36.6 e PvTRAg36.6-NS, observa-se que os modelos 4 e 5 não foram considerados adequados pelo VERIFY 3D. Também pode ser notado que esses modelos possuem estruturas distintas dos outros, com regiões alongadas e outras perpendiculares à porção tubular das estruturas previstas. Já, no caso da PvTRAg56.2, nenhum modelo passou no teste. Esses resultados negativos podem ser oriundos de uma limitação do VERIFY 3D, sendo que o programa depende da existência de estruturas 3D conhecidas que possuam uma estrutura terciária semelhante à das proteínas testadas (BOWIE, LÜTHY, EISENBERG, 1991).

Assim, existe a possibilidade de as proteínas avaliadas serem suficientemente distintas das já caracterizadas e disponíveis em bancos de dados, o que tornaria a análise pelo VERIFY 3D pouco representativa. Como nenhuma proteína similar foi identificada na busca por homólogos na base de dados do PDB (mesmo com graus de similaridade baixos), acreditamos que essa possibilidade é concreta e, portanto, nenhum modelo construído foi descartado.

Por fim, pela análise do PROCHECK, verificou-se em quais regiões os aminoácidos dos modelos construídos se encontram no gráfico de Ramachandram. O gráfico de Ramachandram apresenta regiões “permitidas” e “não-permitidas” com base nos ângulos ϕ e ψ de um aminoácido (ângulos atribuídos às ligações C-N-C $_{\alpha}$ -C e N-C $_{\alpha}$ -C-N, respectivamente). Essas regiões são atualmente determinadas empiricamente pela análise de diversas estruturas de aminoácidos e proteínas (Hollingsworth, Karplus, 2010). Assim, na Tabela 3 encontram-se as porcentagens de aminoácidos de cada modelo (excluindo-se o aminoácido inicial, o terminal e aminoácidos de glicina e prolina, que correspondem a 27 unidades na PvTRAg36.6, 26 na PvTRAg36.6-NS e na 11 na PvTRAg56.2) em 3 regiões do gráfico de Ramachandram: mais favorável, permitida e não permitida.

Tabela 3: Porcentagem de aminoácidos de cada modelo construído em regiões mais favoráveis, permitidas ou não permitidas de acordo com o gráfico de Ramachandram. Na coluna da região não permitida, também foi incluída a designação dos aminoácidos com essa classificação

Proteína/Modelo	Região mais favorável (%)	Região permitida (%)	Região não permitida (%)
PvTRAg36.6/1	95,1	4,9	0
PvTRAg36.6/2	93,7	5,6	0,7 (Gln-37, Ser-111)
PvTRAg36.6/3	92,6	7,0	0,4 (Asn-38)
PvTRAg36.6/4	94,0	4,9	1,1 (Asn-38, Thr-102, Ser-187)
PvTRAg36.6/5	94,0	5,3	0,7 (Asn-38, Val-64)
PvTRAg36.6-NS/1	93,0	7,0	0
PvTRAg36.6-NS/2	91,8	8,2	0
PvTRAg36.6-NS/3	93,0	7,0	0
PvTRAg36.6-NS/4	95,3	3,9	0,8 (Asn-72[100], Thr-102[130])
PvTRAg36.6-NS/5	94,2	5,4	0,4 (Val-36[64])
PvTRAg56.2/1	96,2	3,6	0,2 (Ile-226)

PvTRAg56.2/2	98,4	1,4	0,2 (Asp-105)
PvTRAg56.2/3	93,7	5,7	0,6 (Glu-108, Lys-426, Asn-429)
PvTRAg56.2/4	95,5	3,5	1,0 (Ser-48, Gln-124, Thr-136, Glu-165, Ile-229)
PvTRAg56.2/5	95,3	3,6	0,4 (Asp-245, Ile-444)

Pela análise do PROCHECK, em todos os modelos, mais de 90% dos aminoácidos encontram-se nas regiões mais favoráveis do gráfico de Ramachandram. Segundo a página de resultados fornecida pelo servidor usado e Kleywegt e Jones (1996), tal característica é esperada em modelos de alta qualidade. Além disso, poucos aminoácidos devem estar em regiões não permitidas (KLEYWEGT, JONES, 1996) e, nos modelos construídos, o máximo encontrado foi de 1,1% dos aminoácidos nessa região. Por essa razão, pode-se considerar que os modelos são adequados e passam pelo teste do PROCHECK.

Dessa forma, após os programas de validação aplicados e das considerações em relação ao VERIFY 3D, os modelos construídos parecem ter boa qualidade e, portanto, todos foram considerados para realização de *docking* e dinâmicas moleculares.

4.1.3 Comparação dos modelos construídos com o disponível no AlphaFold

Os modelos obtidos na base de dados do AlphaFold serão denominados PvTRAg36.6-alpha e PvTRAg56.2-alpha (Figura 14).

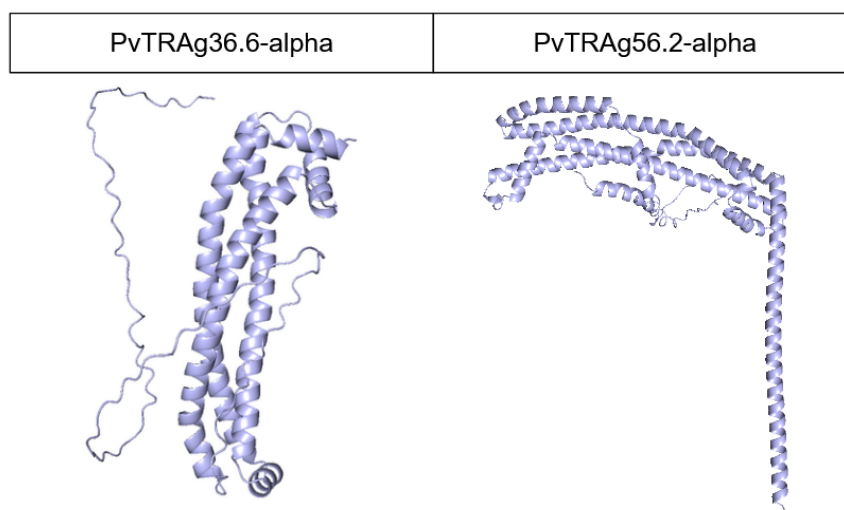


Figura 14: estrutura dos modelos PvTRAg36.6-alpha (esquerda) e PvTRAg56.2-alpha (direita).

Em função do número de aminoácidos dos modelos construídos pelo AlphaFold, pode-se dizer que peptídeos sinais foram identificados para ambas as proteínas e excluídos.

Dessa forma, nota-se uma diferença inicial para PvTRAg56.2, uma vez que a predição pelo Phobius não indicou a presença desse tipo de sequência nessa proteína, enquanto que o AlphaFold considerou uma sequência de 61 aminoácidos (396 resíduos no modelo do AlphaFold e 457 na proteína original). Além disso, o peptídeo sinal considerado para PvTRAg36.6 difere de um aminoácido, sendo que a sequência final de PvTRAg36.6-NS possui 285 resíduos, enquanto que PvTRAg36.6-alpha possui 284 (a proteína original possui 313).

PvTRAg36.6-alpha e PvTRAg56.2-alpha foram comparados aos modelos construídos pelo método tr-Rosetta utilizando-se a metodologia FATCAT rígida e flexível. A metodologia empregada faz um alinhamento dos aminoácidos e, na opção “flexível”, permite a flexibilidade de alguns pontos da proteína, de forma permitir a comparação de estruturas semelhantes. Os resultados (YE, GODZIK, 2003; LI et al., 2020). A comparação é expressa pelo *root mean square deviation* (RMSD) dos carbonos α após a superposição das proteínas. O comparador utilizado também fornece o *template modeling score* (TM-score), que é uma medida de similaridade com um maior peso para a topologia das proteínas (XU, ZHANG, 2010), e o número de aminoácidos que são estruturalmente equivalentes entre as proteínas (PROTEIN DATA BANK, 2022). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4

Tabela 4: RMSD, TM-score e resíduos equivalentes da comparação entre os modelos de proteína gerados pelo tr-Rosetta com o modelo disponível pelo AlphaFold. A metodologia FATCAT foi utilizada, uma com os modelos de proteínas rígidos (FATCAT rígido) e uma com os modelos possuindo um grau de flexibilidade (FATCAT flexível).

Proteína/Modelo	FATCAT rígido			FATCAT flexível		
	RMSD (Å)	TM score	Resíduos equivalentes	RMSD (Å)	TM score	Resíduos equivalentes
PvTRAg36.6/1	3,05	0,57	208	2,83	0,36	233
PvTRAg36.6/2	3,10	0,57	208	2,84	0,35	236
PvTRAg36.6/3	3,05	0,57	210	2,66	0,40	222
PvTRAg36.6/4	3,52	0,53	196	3,07	0,34	219
PvTRAg36.6/5	3,12	0,57	204	3,05	0,57	204
PvTRAg36.6-NS/1	3,57	0,62	213	3,27	0,35	233
PvTRAg36.6-NS/2	3,03	0,61	206	2,93	0,37	235
PvTRAg36.6-NS/3	3,01	0,62	209	3,08	0,33	233
PvTRAg36.6-NS/4	2,90	0,57	192	4,13	0,09	233

PvTRAg36.6-NS/5	2,45	0,60	192	2,45	0,60	192
PvTRAg56.2/1	6,46	0,48	334	2,97	0,35	360
PvTRAg56.2/2	7,97	0,47	349	3,38	0,40	363
PvTRAg56.2/3	8,26	0,48	358	3,78	0,44	356
PvTRAg56.2/4	9,27	0,41	332	3,41	0,32	346
PvTRAg56.2/5	5,49	0,50	303	3,88	0,29	353

De maneira geral, valores de RMSD entre 0-2,5 Å indicam proteínas com alta similaridade, enquanto que valores de 2,5 a 7,0 Å indicam média similaridade e valores acima de 7,0 Å indicam baixa similaridade (Zhang, 2019). Nas comparações utilizadas, observa-se que os valores de RMSD da metodologia flexível são menores do que os da metodologia rígida (excluindo-se os casos da PvTRAG36.6-NS/3 e da PvTRAG36.6-NS/4), o que era esperado, pois o método flexível permite variações na posição de algumas regiões das proteínas, de forma a aumentar a superposição (YE, GODZIK, 2004; LI et al., 2020).

Nos modelos de PvTRAG36.6 e PvTRAG36.6-NS, nota-se uma alta similaridade dos modelos produzidos pelo método trRosetta em relação ao produzido pelo AlphaFold, o que sugere que, para esse modelo, ambas metodologias convergem para estruturas semelhantes. Além disso, os valores de TM-score para a metodologia rígida são superiores a 0,5, que indica uma alta similaridade (XU, ZHANG, 2010). Curiosamente, o TM-score para o modelo flexível foi, em geral, consideravelmente menor do que o para o modelo rígido, apesar de o flexível possuir um menor RMSD, sendo que a tendência esperada seria de maior TM-score para menores valores de RMSD (OLECHNOVIČ et al, 2019). Entretanto, o RMSD é a medida de menor correlação com as outras medidas de similaridade de proteínas e tanto RMSD quanto TM-score são altamente dependentes da orientação dos domínios protéicos (OLECHNOVIČ et al, 2019). Assim, é possível que uma orientação que favoreça o RMSD acabe por não favorecer o TM-score e vice-versa.

Para PvTRAg56.2, os valores comparativos obtidos indicam que o modelo do AlphaFold e os modelos do trRosetta apresentam menor similaridade quando comparados à avaliação de PvTRAg36.6. Ainda assim, os valores de RMSD obtidos pelo FATCAT flexível (~3 Å) sugerem que os modelos do trRosetta possuem razoável similaridade ao modelo do AlphaFold. O TM-score próximo de 0,5 para todos os modelos também sugere uma boa similaridade. Por fim, foi notada o mesmo fenômeno de redução do TM-score com redução do RMSD entre a comparação rígida e a flexível, sendo que os mesmos comentários se aplicam.

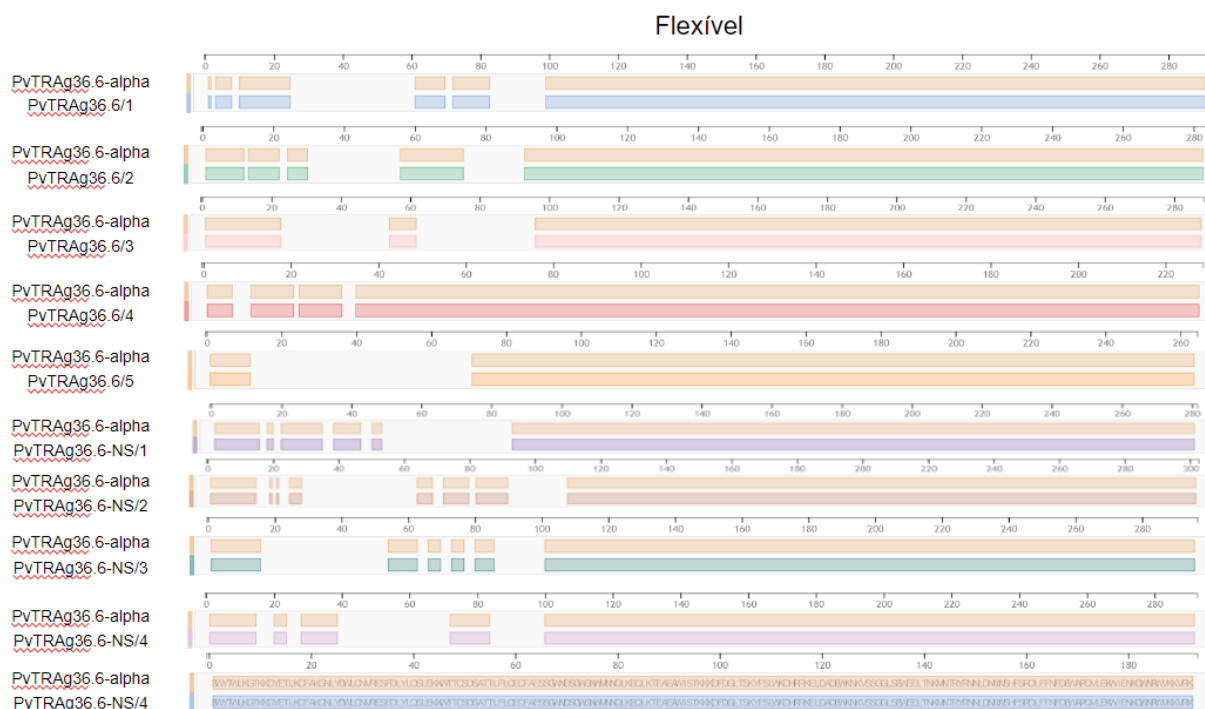


Figura 15: alinhamento da sequência de PvTRAg-36.6 construídos pelo trRosetta com o modelo PvTRAg36.6-alpha pelos métodos FATCAT rígido e flexível.

Os modelos de PvTRAg56.6 pelo trRosetta também possuem grandes porções alinhadas com o modelo do AlphaFold (Figura 16), porém essas regiões possuem pequenas diferenças entre os modelos. De modo geral, a partir do aminoácido 150, há uma grande similaridade apresentada, porém ela ocorre em blocos separados por poucos aminoácidos e não de maneira contínua como ocorre com a PvTRAg36.6. É interessante notar ainda que o modelo construído pelo AlphaFold possui menos regiões de alta confiança (dado disponível na entrada da proteína no servidor do AlphaFold - A0A0B4L1H6_PLAVI) do que PvTRAg36.6-alpha, o que está de acordo com o erro estimado pelo trRosetta, dado que o erro dos aminoácidos para PvTRAg56.6 é, em geral, mais alto do que para PvTRAg36.6. Assim, é esperado que haja menos concordância entre os modelos de PvTRAg56.2. De qualquer forma, nos estudos de *docking* com heparina, o ligante interagiu com aminoácidos de posição >300 (α -hélice perpendicular na região C-terminal) e todos os modelos são similares no alinhamento dessa região.

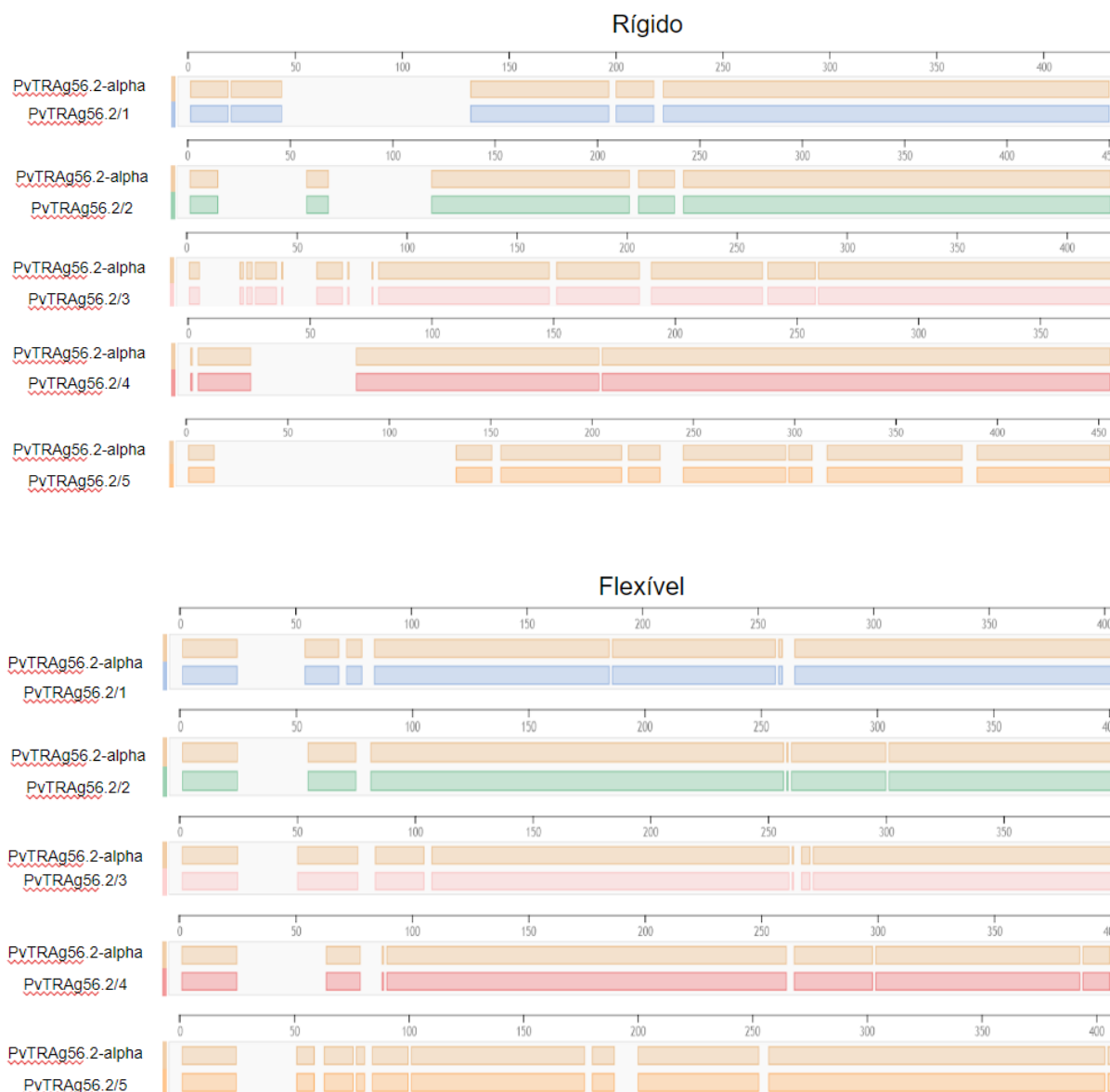


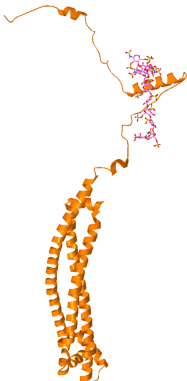
Figura 16: alinhamento da sequência de PvTRAg-56.2 construídos pelo trRosetta com o modelo PvTRAg56.2-alpha pelos métodos FATCAT rígido e flexível.

4.1.3. Docking de heparina na PvTRAg36.6 e na PvTRAg36.6-NS

De modo a fazer uma correspondência entre as posições dos aminoácidos da PvTRAg36.6 e da PvTRAg36.6-NS, quando um resíduo da PvTRAg36.6-NS for mencionado, convencionou-se indicar um número entre colchetes, por exemplo: Thr-1[29]. O número entre colchetes é a posição do aminoácido da PvTRAg36.6-NS somada de 28, assim, essa seria a posição equivalente na PvTRAg36.6, uma vez que na PvTRAg36.6-NS foi subtraído o peptídeo sinal de 28 aminoácidos. A mesma convenção será usada para PvTRAg36.6-alpha, porém

somando-se 29 ao número entre colchetes, e para PvTRAg56.6-alpha, porém somando-se 61 ao valor entre colchetes.

A partir do *docking* cego realizado, notou-se que, na configuração de menor energia, a heparina se liga em uma região semelhante em todos os modelos dessas proteínas. Tal região encontra-se próxima à Lys-138 (Lys-110[138] no caso da PvTRAg36.6-NS e Lys-109[138] para PvTRAg36.6-alpha). Inicialmente, apenas uma exceção foi notada no modelo 5 da PvTRAg36.6- NS, em que a conformação de menor energia apresentava ligações de H com os resíduos Lys-50[78], Lys-61[89] e Lys-66[94], os quais encontram-se distantes da Lys-110[138]. Entretanto, a conformação com a segunda menor energia possuía ligações de H com Lys-103[131], a qual está próxima de Lys-110[138] e, portanto, de acordo com os outros modelos. Por essa razão, na etapa de refino do *docking* cego do modelo 5 da PvTRAg36.6-NS, dois *dockings* foram realizados: um com um grid centrado nos aminoácidos da região com menor energia de ligação (*grid A*) e um com um grid na região com a segunda menor energia de ligação (*grid B*). Uma vez que o refino com o *grid B* resultou em uma conformação com menor energia do que o refino com o *grid A*, conclui-se que, mesmo nesse modelo, a heparina deve se ligar preferencialmente à região próxima da Lys-110[138]. Um resumo desta investigação encontra-se na Tabela 4.

Imagem do <i>docking</i> cego	Aminoácidos que interagem	Menor energia de ligação do <i>docking</i> cego (kcal/mol)	Menor energia de ligação do <i>docking</i> refinado (kcal/mol)
	Lys-39[67], Lys-50[78], Lys-61[89], Ile-63[91], Lys-66[94]	+7.87	+1.38

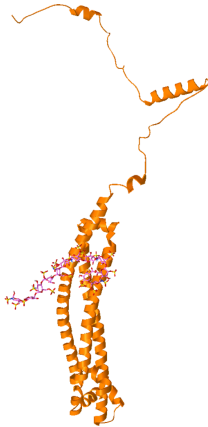
	<p>Leu-99[27], Lys-100[128], Lys-103[131], Tyr-106[134], Arg-239[67]</p>	<p>+8.52</p>	<p>-0.74</p>
---	--	--------------	--------------

Tabela 4: Refino das duas conformações de menor energia resultantes do *docking* cego da heparina sobre o modelo 5 da PvTRAg36.6-NS. A conformação de menor energia mostrou a heparina se ligando a uma região diferente (A) dos outros modelos, enquanto que a conformação com a segunda menor energia de ligação estava em uma região similar (B) à dos outros modelos. O *docking* de refino na região B apresentou menor energia de ligação do que na região A, assim a região B foi considerada como a correta.

Em seguida, o refino do *docking* cego ofereceu mais informações sobre a interação da heparina com as proteínas. Imagens das conformações de menor energia podem ser vistas na Figura 17.

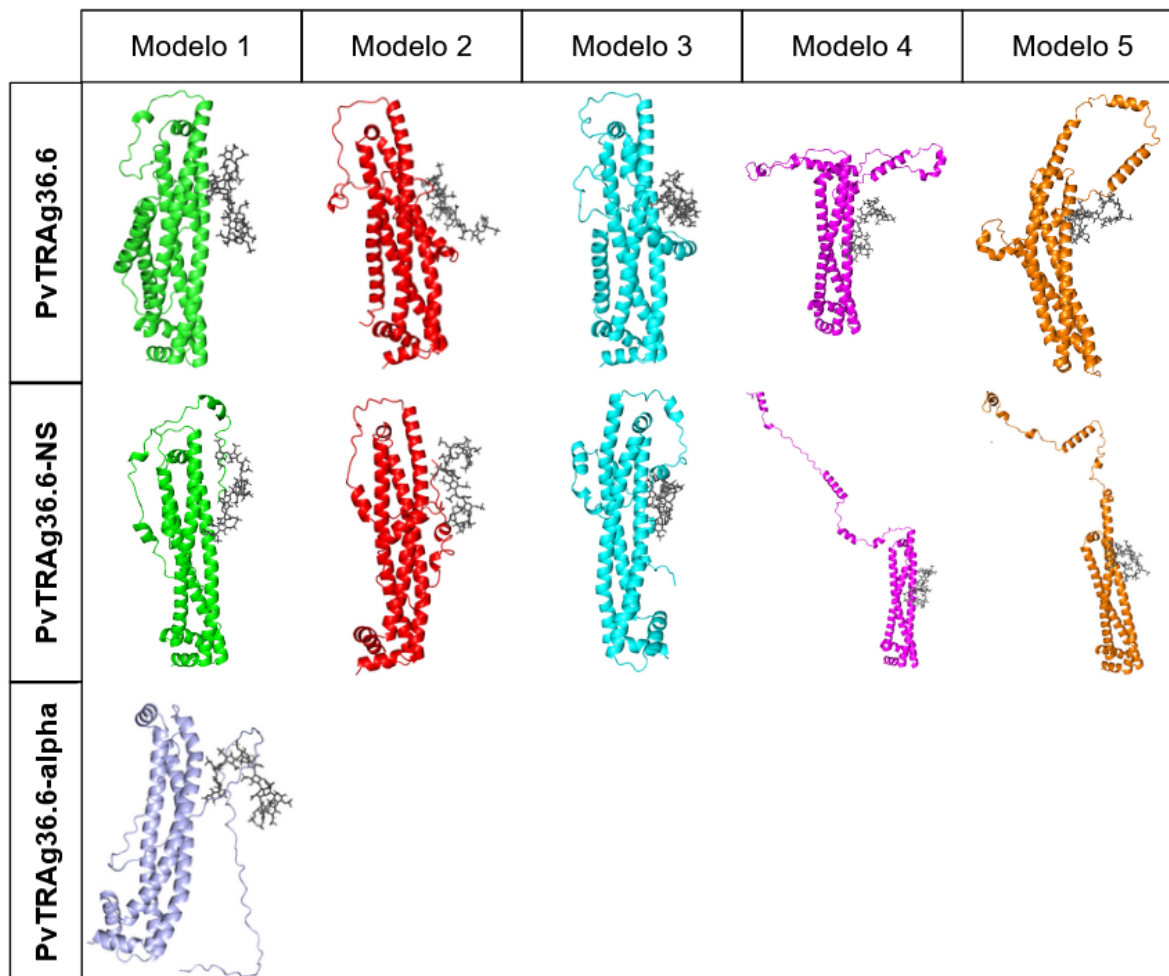


Figura 17: configurações de menor energia de ligação resultantes do refino do *docking* cego de heparina sobre todos os modelos de PvTRAg36.6, PvTRAg36.6-NS E PvTRAg36.6-alpha.

Considerando-se que o método de atribuição de *score* do Autodock é otimizado para sistemas em que a interação proteína-ligante se dê por ligações de H e por interações eletrostáticas (FORLI et al., 2016), os valores obtidos de energia de ligação devem ser representativos, uma vez que são essas as interações esperadas nesse sistema (JUILLERAT et al., 2011). A média do menor valor de energia de ligação após o refino foi de -3,29 kcal/mol para PvTRAg36.6 e -2,36 kcal/mol para PvTRAg36.6-NS (resultados detalhados na Tabela 5) e esses valores negativos sugerem uma interação favorável entre a heparina e as proteínas. Foram observadas exceções no modelo 4 da PvTRAg36.6-NS e no modelo PvTRAg36.6-alpha, que possuem valor de energia de ligação positivos. Uma vez que este comportamento foi visto apenas para dois modelos, ele pode não ser representativo. Além disso, comparando esses valores com a menor energia de ligação da heparina na PfEMP1 (-5,87 kcal/mol), espera-se que a afinidade de ligação da heparina com essas proteínas de *P. vivax* seja menor.

Tabela 5: resultados do *docking* após o refino sobre os diferentes modelos de PvTRAg36.6 e PvTRAg36.6-NS

Proteína/Modelo	Aminoácido de interação (ligação de H)	Aminoácido de interação (outras interações)	Menor energia de ligação (kcal/mol)
PvTRAg36.6/1	Lys-45, Lys-131, Lys-138, Arg-267, Asn-274, His-278	Lys-41, Glu-135	-5,34
PvTRAg36.6/2	Lys-53, Lys-78, Lys-131, Lys-138, Lys-142, Asn-271	Ile-57, Tyr-134, Glu-135, Cys-139, Asn-274	-4,97
PvTRAg36.6/3	Lys-62, Lys-86, Lys-89, Lys-142, Arg-267, Asn-274	Lys-67, Asn-90, Lys-138, Cys-139, Lys-263,	-3,62
PvTRAg36.6/4	Lys-131, Lys-138, Lys-142, Lys-263, Arg-267, His-278	Glu-135, Asn-271, Asn-274	-1,45
PvTRAg36.6/5	Lys-62, Lys-67, Lys-263, Arg-267	Pro-55, Leu-56, Gly-59, Pro-60, Pro-61, Thr-266, Asn-270, Asn-271	-1,05
PvTRAg36.6-NS/1	Thr-1[29], Arg-89[117], Tyr96-[124], Lys-103[131], Lys-110[138], Lys-114[142]	Ala-3[31], Met-4[32], Pro-5[33], Cys-111[139], Arg-239[267], Asn-243[271]	-4,67
PvTRAg36.6-NS/2	Lys-53[81], Lys-103[131], Lys-104[132], Lys-114[142]	Pro-5[33], Phe-7[35], Pro-8[36], Asn-10[38], Asn-11[39], Asp-51[79], Glu-107[135], Thr-108[136]	-2,30
PvTRAg36.6-NS/3	Lys-25[53], Lys-61[89], Lys-199[227]	Lys-17[45], Asp-18[46], Leu-21[49], Lys-66[94], Lys-191[219], Asp-192[220], Gly-195[223], Leu-196[224], Ser-198[226], Asp-206[234]	-4,90
PvTRAg36.6-NS/4	Lys-110[138], Lys-114[142], Arg-239[267], Asn-243[271]	Lys-103[131], Lys-235[263], Asn-242[270], Asn-246[274]	+0,80
PvTRAg36.6-NS/5	Lys-100[128], Lys-104[132], Asn-243[271]	Lys-103[131], Tyr-106[134], Lys-110[138], Arg-239[267]	-0,74
PvTRAg36.6/ AlphaFold	Lys-33[62], Asp-37[66], Lys-38[67], Lys-103[32], Lys-113[142]	Glu-106[135], Thr-107[136], Lys-109[138], Cys-110[139]	+3,25

Apesar da abundância de triptofano nas proteínas em questão, nenhuma interação foi observada entre esse tipo de resíduo. Entretanto, observou-se que diversas interações por ligações de H com resíduos de lisina, o que é consistente com resultados prévios da interação de heparina com PfEMP1, em que se observou que essas interações com lisina parecem ser essenciais para a ligação da heparina (JUILLERAT et al., 2011). Uma visão mais detalhada das configurações de menor energia da heparina sobre o modelo 1 da PvTRAg36.6 e sobre o modelo 5 da PvTRAg36.6-NS é apresentada na Figura 18. Foram escolhidos esses modelos para essa representação por serem os modelos de menor energia de ligação.

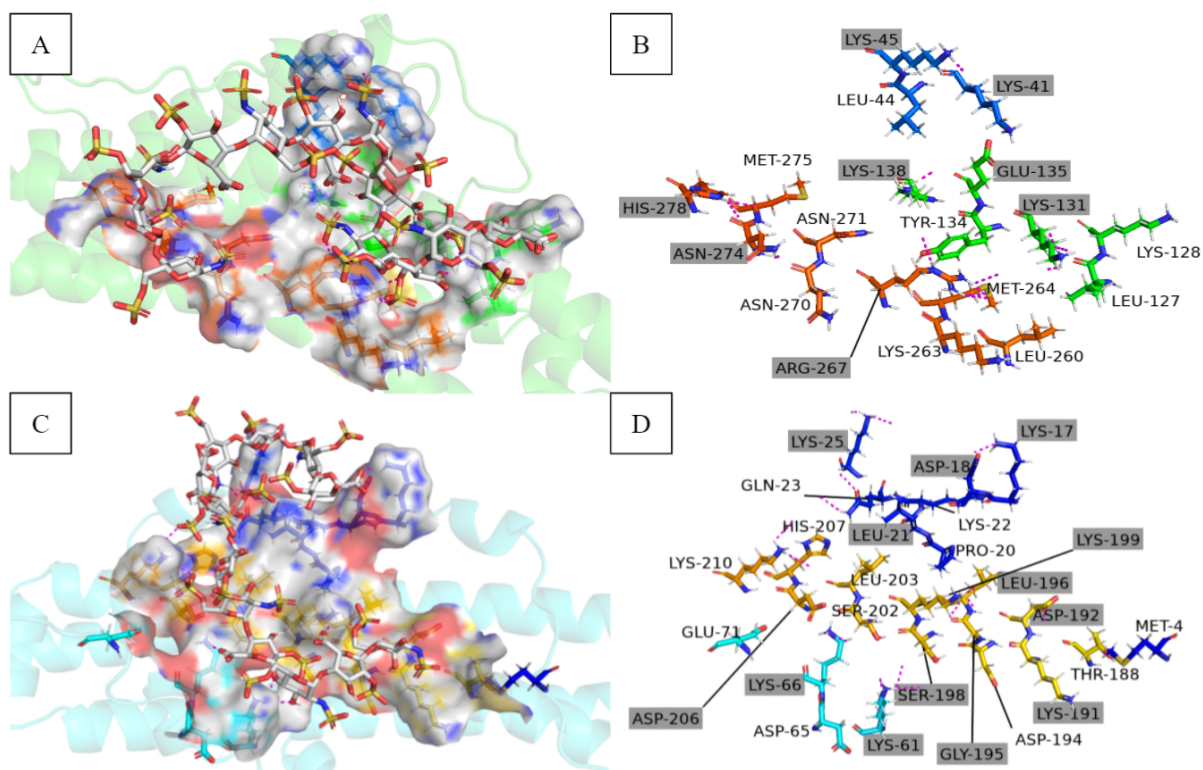


Figura 18: Detalhe da posição de menor energia da heparina no modelo 1 da proteína PvTRAg36.6 (A e B) e modelo 3 da PvTRAg36.6-NS. A e C mostram a conformação da heparina e a superfície molecular da proteína na região de interação. B e D apresentam a mesma perspectiva, porém apenas os aminoácidos da região de interação estão visíveis. O pontilhado magenta representa interações polares entre a heparina e as proteínas, enquanto que os aminoácidos destacados (marcados pela legenda com fundo cinza) são aqueles envolvidos na interação. Além disso, para simplificar a imagem, a posição correspondente dos aminoácidos da PvTRAg36.6-NS (números em colchetes) foi omitida.

Apesar das similaridades já destacadas, particularidades da ligação da heparina em cada modelo podem ser notadas. Isso pode ser notado nos modelos 4 e 5 da PvTRAg36.6, provavelmente em função de seus formatos distintos. No modelo 4, a interação da heparina com os aminoácidos 1-130 não ocorreu, pois eles estão localizados na porção perpendicular ao

tubo de α -hélices (porção horizontal do “T”). Já no modelo 5, apesar de próximos da região de interação, a heparina não interage com os aminoácidos 131-142. Analisando-se a conformação com a segunda menor energia de ligação, é possível notar que, nesse caso, houve interação com Lys-131 e Lys-132. Uma vez que a energia é muito semelhante entre essas duas conformações (-1,05 e -1,01 kcal/mol), é possível que esses aminoácidos também façam parte da interação. Além disso, no modelo 5, um *loop* passa próximo a Lys-138, o que pode impedir, estericamente, a interação da heparina com este resíduo (Figura 19). Por fim, a falta dessas interações indicadas nos modelos 4 e 5 podem ser as responsáveis pelo aumento da energia de ligação.

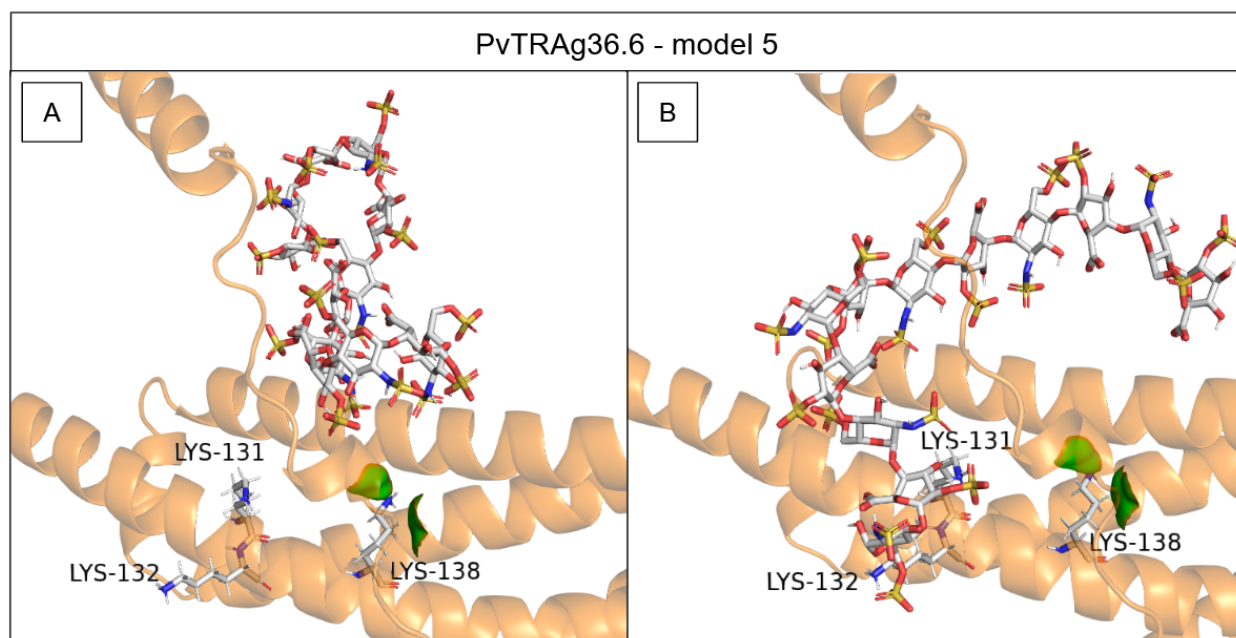


Figura 19: Detalhe da conformação de menor energia (A) e de segunda menor energia (B) da heparina sobre PvTRAg36.6-NS.

Analisando-se os *dockings* refinados da PvTRAg36.6-NS, percebe-se que particularidades existem em todos os modelos construídos. O modelo 1 é o único com interações com aminoácidos de posição menor do que 70[98], de posição entre 100[128] e 114[142] e, por fim, de posição entre 199[227] e 246[273]. No caso do modelo 3, as lisinas entre a posição 100[128] e 110[138] estavam em uma localização oposta à heparina, apesar de próximas à região de interação (Figura 20). Esse comportamento foi observado em todas as 5 conformações de menor energia e, portanto, tais lisinas não devem fazer parte dessa interação. Apesar disso, a menor energia de ligação foi observada para este modelo e, portanto, a ausência da interação com estes aminoácidos não comprometeu a afinidade prevista. Nos modelos 4 e 5, os aminoácidos de posição menor do que 100[128] estão nas porções alongadas das proteínas e, portanto, não participam da interação. Uma vez que esses modelos também apresentaram as maiores energias de ligação (menor afinidade), pode-se supor que a

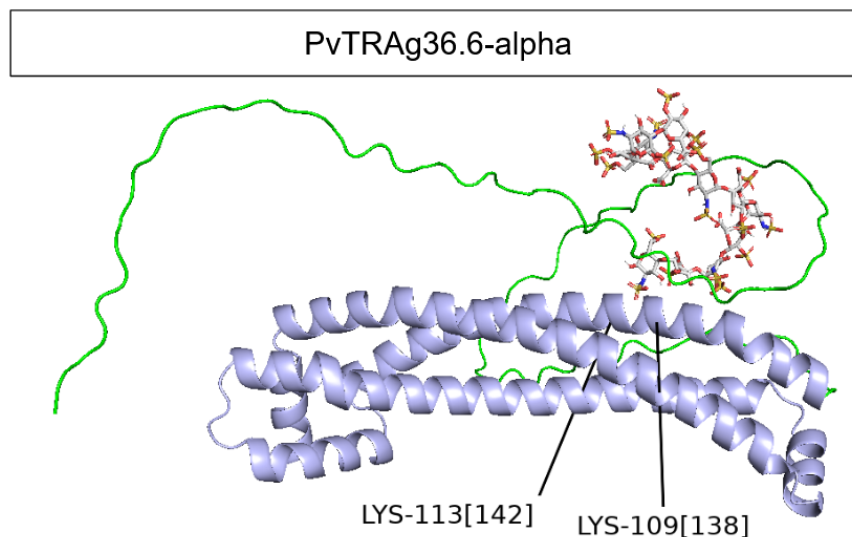


Figura 21: detalhe da conformação de menor energia de PvTRAg36.6-alpha e heparina mostrando o possível impedimento estérico dos resíduos 1[30]-93[124] (em verde) sobre a região de ligação da heparina.

4.1.4. Docking de heparina na PvTRAg56.2

Os resultados do *docking* cego da heparina em todos os modelos da PvTRAg56.2 foi consistente. Nas configurações de menor energia, a heparina se ligou próxima à Arg-413, que está localizada na α -hélice perpendicular à porção tubular da proteína. Após a etapa de refino (resultados na Tabela 6), a média das menores energias de ligação foi de -4,11 kcal/mol (3,71 kcal/mol se incluído o modelo do AlphaFold), a qual é menor do que a apresentada pela PvTRAg36/6/PvTRAg36.6-NS e sugere uma ligação mais forte da heparina com PvTRAg56.2. É interessante notar que, para o modelo 5, a energia de ligação foi de -7,01 kcal/mol, menor energia de ligação obtida para a PfEMP1 (-5,87 kcal/mol). Isso sugere que a ligação da heparina à PvTRAg56.2 pode ser mais favorável do que a ligação com a PfEMP1, no entanto, este resultado foi observado apenas nesse modelo e, portanto, pode não ser representativo. De maneira geral, pela média das menores energias de ligação, pode-se concluir que a ligação da heparina com a PvTRAg56.2 é favorável, porém com uma menor afinidade do que a ligação com PfEMP1.

Tabela 6: Resultados detalhados do *docking* de heparina em PvTRAg56.2 após a etapa de refino

Proteína/Modelo	Aminoácido de interação (ligação de H)	Aminoácido de interação (outras interações)	Menor energia de ligação (kcal/mol)
PvTRAg56.2/1	Arg-413, Lys-421, Lys-424	Lys-409, Lys-416, Lys-417,	-4.82

		Met-420	
PvTRAg56.2/2	Lys-409, Lys-410, Lys-416, Lys-417, Lys-427	Arg-413, Lys-414, Met-420, Phe-423	-3.29
PvTRAg56.2/3	Arg-413, Lys-417, Asn-425	Lys-410, Lys-414, Lys-416, Met-420, Lys-421	-1.81
PvTRAg56.2/4	Arg-413, Lys-421, Lys-424, Lys-427	Lys-410, Lys-417, Met-420	-3.60
PvTRAg56.2/5	Lys-406, Lys-410, Arg-413, Lys-416, Lys-417, Lys-421, Lys-424	Leu-403, Lys-409	-7.01
PvTRAg56.2/ AlphaFold	Arg-352[413], Lys-355[416], Lys-356[417], Lys-360[421], Lys-363[424]	Lys-353[414], Met-359[420]	-1,72

Em todos os modelos, a região de ligação da heparina ocorreu entre os aminoácidos 403 e 427, que é um segmento rico em lisina (12 aminoácidos em um segmento de 25 unidades) e sem qualquer porção da proteína próxima capaz de impedir estericamente a região (Figura 22). Novamente, nenhum resíduo de triptofano interagiu com a heparina e várias ligações de H foram observadas entre grupos sulfato da heparina e resíduos de lisina, o que evidencia a importância desse tipo de aminoácido. Particularmente, apenas o modelo 2 não realizou ligações de H com Arg-413. O detalhamento da ligação da heparina com o modelo 5 (menor energia de ligação entre todos os modelos) pode ser visto na Figura 23.

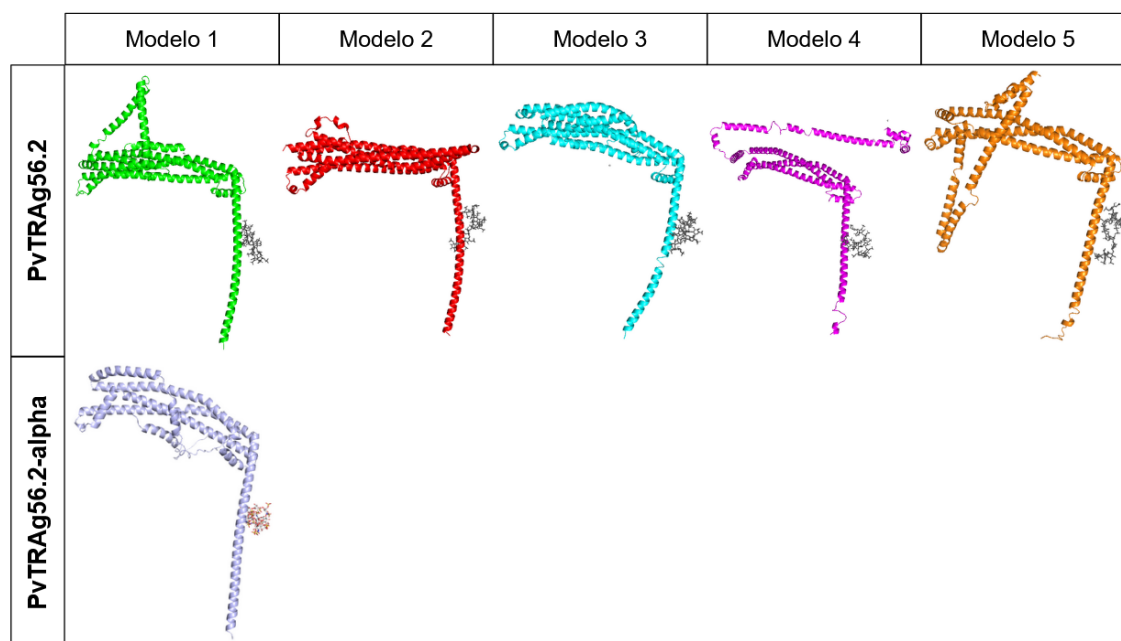


Figura 22: Configurações de menor energia de ligação resultantes do refino do *docking* cego de heparina sobre todos os modelos de PvTRAg56.2.

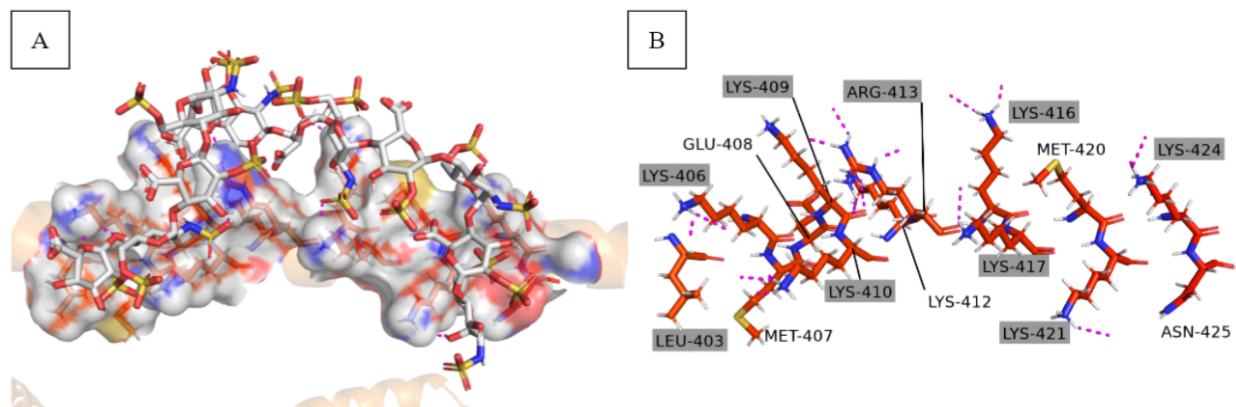


Figura 23: Detalhe da posição de menor energia da heparina no modelo 5 da PvTRAg56.2. A imagem A mostra a conformação da heparina e a superfície molecular da proteína na região de interação. B apresenta a mesma perspectiva, porém apenas os aminoácidos da região de interação estão visíveis. O pontilhado magenta em B representa interações polares entre a heparina e a proteína, enquanto que os aminoácidos destacados (marcados pela legenda com fundo cinza) são aqueles envolvidos na interação.

4.1.5 Dinâmica molecular de PvTRAg36.6

A dinâmica da interação de heparina e de PvTRAg36.6 com seu peptídeo sinal foi realizada utilizando-se o modelo 1, pois este foi o modelo com menor energia de ligação nos *dockings* realizados. O tempo total de simulação foi de 200 ns e, pelo RMSD da heparina (Figura 24), observa-se que foi possível atingir um estado de equilíbrio com o tempo utilizado, uma vez que o RMSD se apresentou constante após ~12,5 ns.

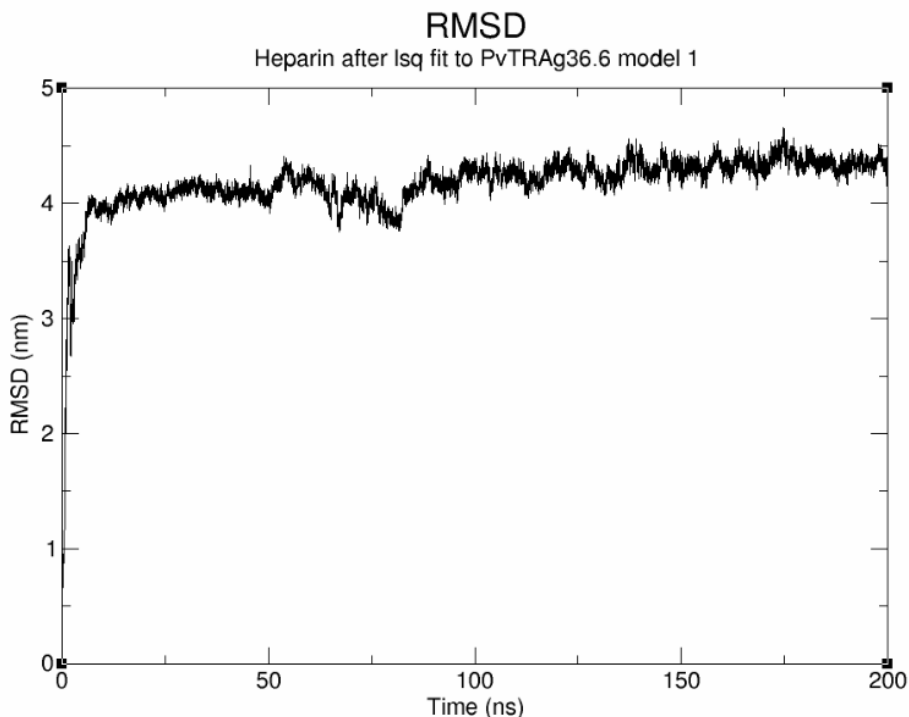


Figura 24: RMSD dos átomos de heparina (excluindo-se átomos de hidrogênio) calculado em relação ao *backbone* da proteína.

Pelo resultado obtido, observa-se um RMSD relativamente elevado, ao redor de 4,25 nm. Isso significa que houve relativa movimentação da heparina durante o tempo de simulação, o que é esperado, dado o grande tamanho do ligante. Também pode-se inferir que a heparina não interage fixamente com um grupo de aminoácidos, sendo que ela pode se acomodar de diferentes formas, assumindo diferentes conformações e, nesse processo, interagir com diferentes aminoácidos. Mesmo assim, apesar da aparente inespecificidade, caso o ligante se mantenha em uma determinada região da proteína, pode-se sugerir que a interação é favorável e isso poderia ser suficiente para o direcionamento de um fármaco.

Foi calculado também o *root mean square fluctuation* (RMSF - Figura 25) dos C_{α} da proteína a partir de $t = 12,5$ ns, que é quando o sistema se estabiliza, segundo os dados de RMSD. O RMSF indica as regiões da proteína que mais se movimentaram durante a simulação (MARTÍNEZ, 2015). Para a PvTRAg36.6, pode-se observar que as regiões de maior flutuação encontram-se entre os aminoácidos 35-50, 75-100 e 100-120. Comparando-se essas regiões com as interações previstas pelo *docking*, observa-se a interação da heparina foi prevista em regiões de maior flutuação de aminoácidos e isso pode explicar o RMSD elevado obtido, uma vez que o ligante deve se acomodar em uma região em constante mudança.

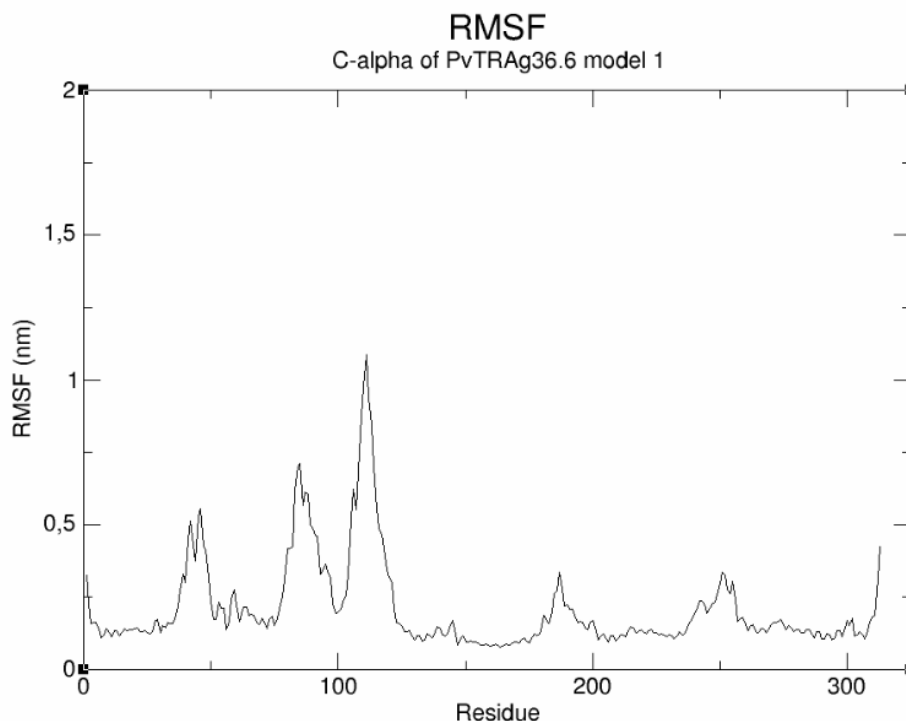


Figura 25: RMSF dos C_{α} PvTRAg36.6 indicados por resíduo de aminoácido. O RMSF foi computado a partir de $t = 12,5$ ns, que é o instante em que a simulação se estabiliza.

O raio de giro é uma medida do quão compacta a proteína se encontra (FALSAFI-ZADEH, 2012). No caso da PvTRAg36.6, pode-se observar que o raio de giro tem uma tendência de queda ao longo do tempo da simulação e isso é mais uma evidência da flexibilidade da proteína avaliada (Figura 26). Assim, reforça-se a ideia de que as flutuações observadas na heparina pelo seu RMSD podem ser fruto de mudanças na conformação da proteína avaliada.

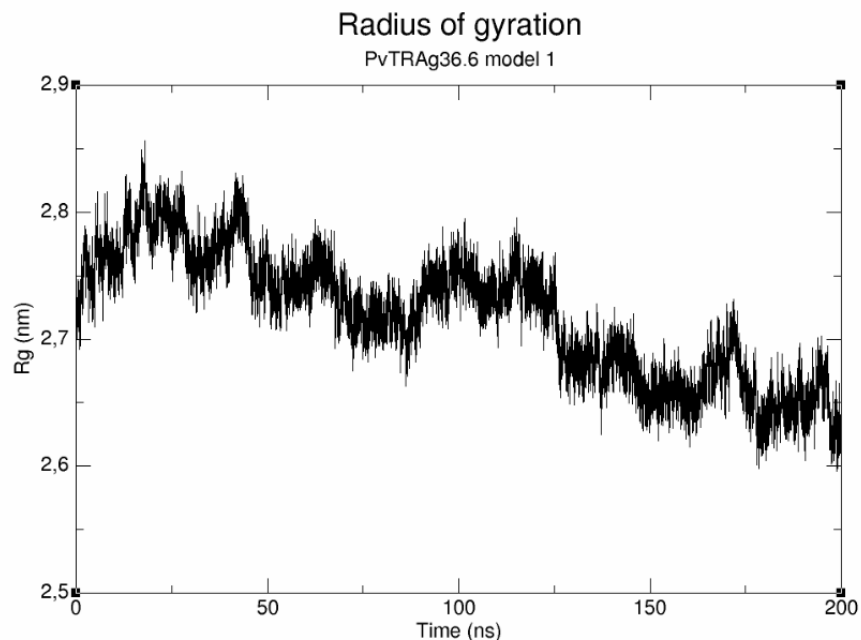


Figura 26: raio de giro de PvTRAg36.6 ao longo de todo o tempo de simulação.

Arquivos .pdb nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns foram extraídos da simulação para avaliação visual (Figura 27). Conforme indicado pelo RMSD, observamos que a posição da heparina permanece relativamente estável nas imagens a partir de 50 ns e que essa posição é diferente da posição em $t = 0$, o que indica a convergência do sistema após um período inicial de equilíbrio. A heparina manteve-se próxima dos aminoácidos Lys-6, Ala-165 e Thr-169, que é uma região diferente do previsto pelo docking e, portanto, os estudos não convergiram. Também é possível observar que a PvTRAg36.6 flutuou ao longo do tempo, o que pode ter levado à heparina assumir diferentes conformações para se ajustar, causando o elevado RMSD observado.

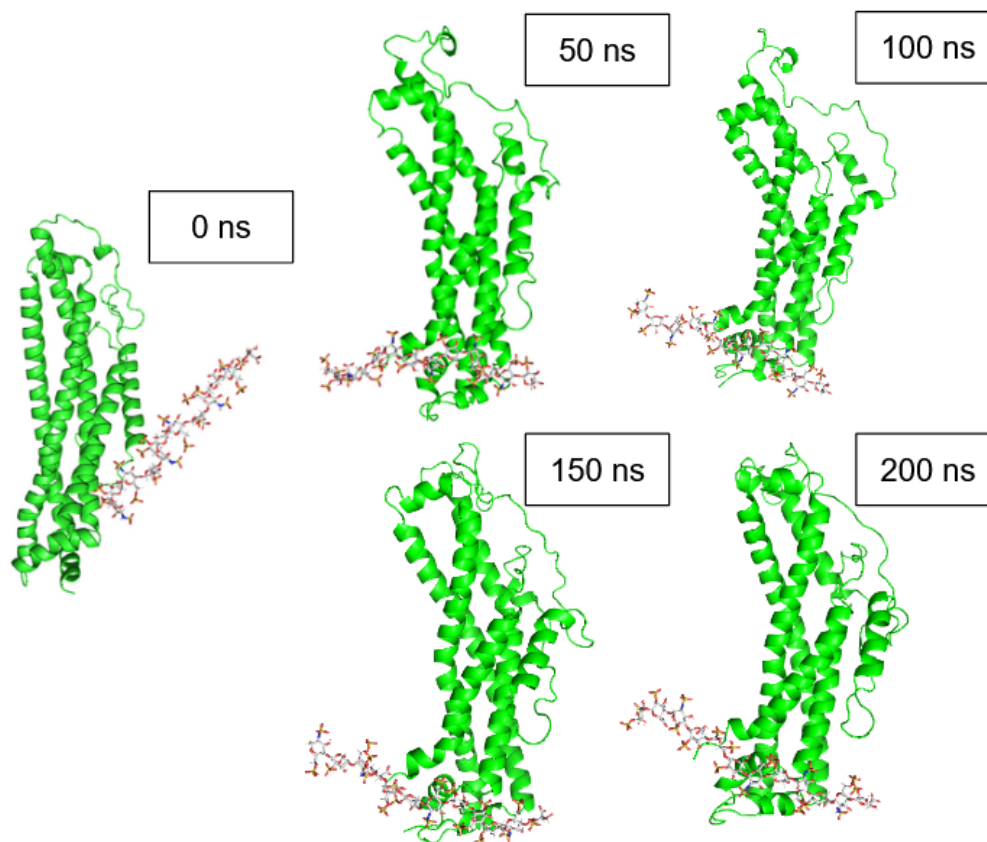


Figura 27: imagens da simulação nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns.

A quantidade de ligações de H do modelo 1 de PvTRAg36.6 não seguiu uma tendência clara de aumento ou decréscimo ao longo do tempo e flutuações no valor aparentam ser aleatórias (Figura 28). O número de interações ficou ao redor de 12 na maior parte do tempo, o que sugere uma boa interação entre a proteína e seu ligante.

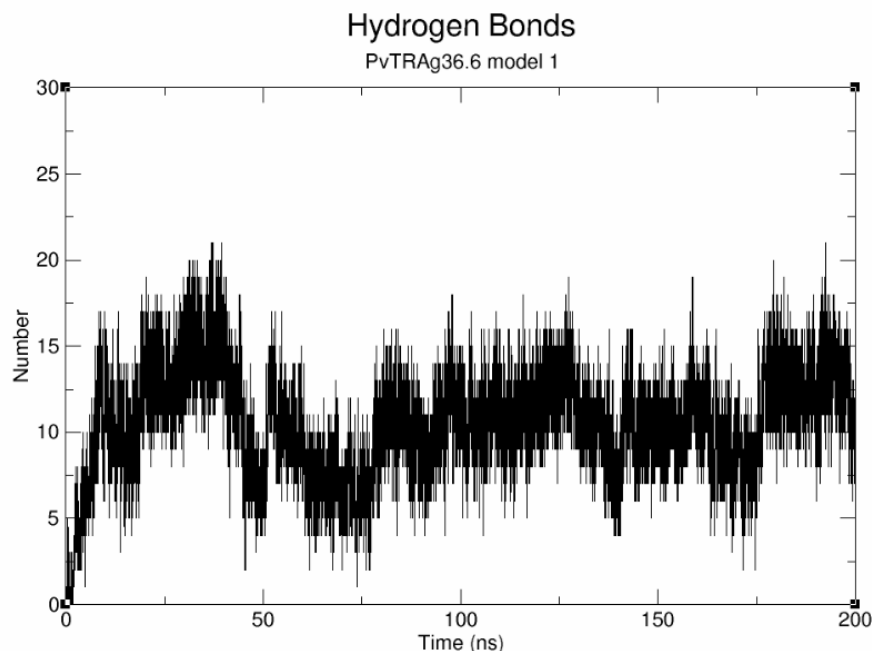


Figura 28: número de interações de hidrogênio entre a proteína e o ligante ao longo do tempo de simulação.

Por fim, foi calculada a interação Coulômbica de curto campo média, que resultou em um valor de -892 ± 20 kJ/mol, e a interação de Lennard-Jones de curto campo média, que resultou em um valor de $-201,7 \pm 7,5$ kJ/mol. Isso resulta em uma energia total de interação de $-1093,7 \pm 27,5$ kJ/mol e esse valor, associado ao número de ligações de H, pode sugerir que a interação dessa proteína com a heparina é favorável.

4.1.6. Dinâmica molecular de PvTRAg36.6-NS

Assim como para PvTRAg36.6, foi escolhido o modelo de menor energia de ligação para a dinâmica molecular de PvTRAg36.6-NS (modelo 3). A dinâmica foi de 200 ns e, pelo RMSD (Figura 29), observa-se que o sistema se estabilizou rapidamente, ao redor de $t = 10$ ns, e com um valor elevado de $\sim 3,25$ nm. Assim, o modelo sem o peptídeo sinal apresenta características semelhantes ao modelo com o peptídeo.

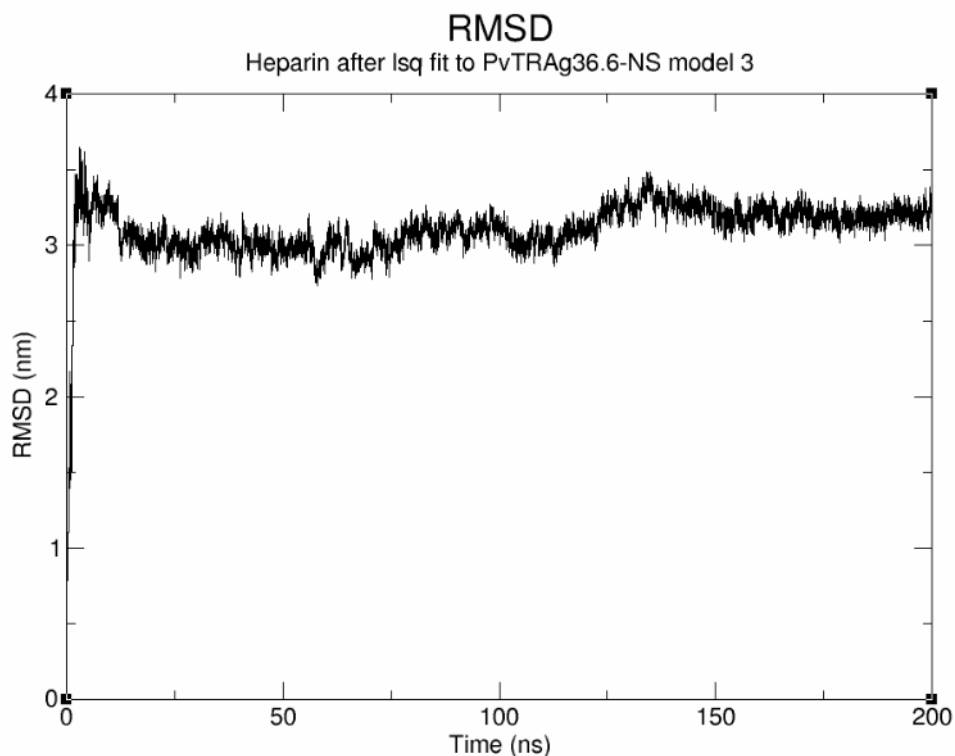


Figura 29: RMSD dos átomos de heparina (excluindo-se átomos de hidrogênio) calculado em relação ao *backbone* da proteína.

Após a determinação do momento em que o sistema se equilibra, foi calculado o RMSF entre os instantes 10 e 200 ns (Figura 30). Foi observado que o RMSF foi, em geral, menor para os resíduos de aminoácidos de PvTRAg36.6-NS do que para os resíduos de PvTRAg36.6. As regiões com maiores flutuações de aminoácidos para a proteína sem o peptídeo sinal incluem a porção N-terminal, do aminoácido 1 ao 100 e do aminoácido 137 ao 175.

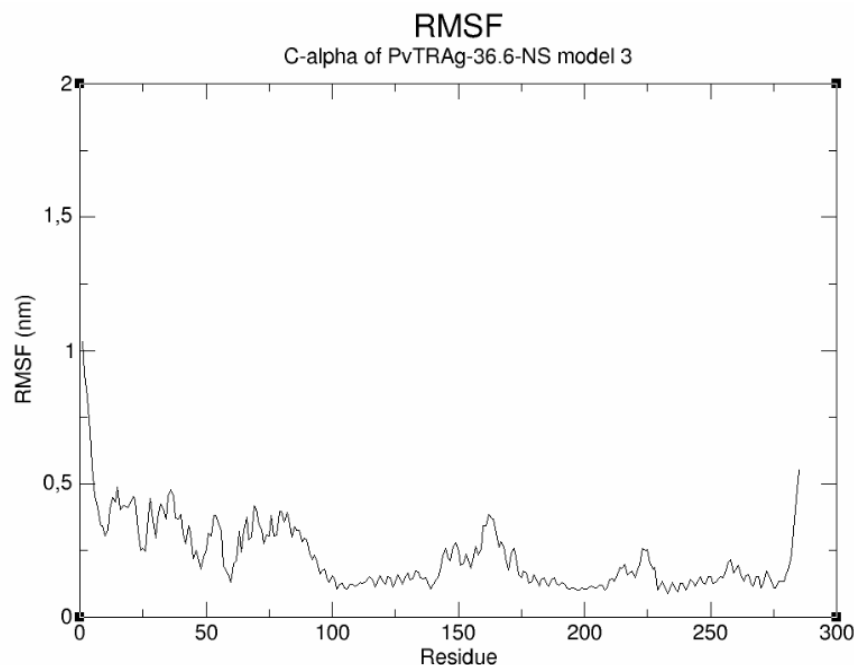


Figura 30: RMSF dos C_{α} PvTRAg36.6-NS indicados por resíduo de aminoácido. O RMSF foi computado a partir de $t = 10$ ns, que é o instante em que a simulação se estabiliza.

Diferentemente da proteína com peptídeo sinal, PvTRAg36.6-NS possui um raio de giro sem uma tendência de queda (Figura 31). Pela relativa estabilidade dessa métrica, pode-se dizer que a proteína se manteve em uma conformação mais consistente ao longo do tempo. Assim, uma vez que o RMSD da PvTRAg36.6-NS foi inferior ao RMSD de PvTRAg36.6 e que a proteína se mostrou mais constante na simulação sem o peptídeo sinal, há mais um fator sugerindo que o RMSD elevado do ligante pode estar relacionado à flexibilidade da proteína em questão durante a simulação, não sendo uma evidência de ligação inespecífica.

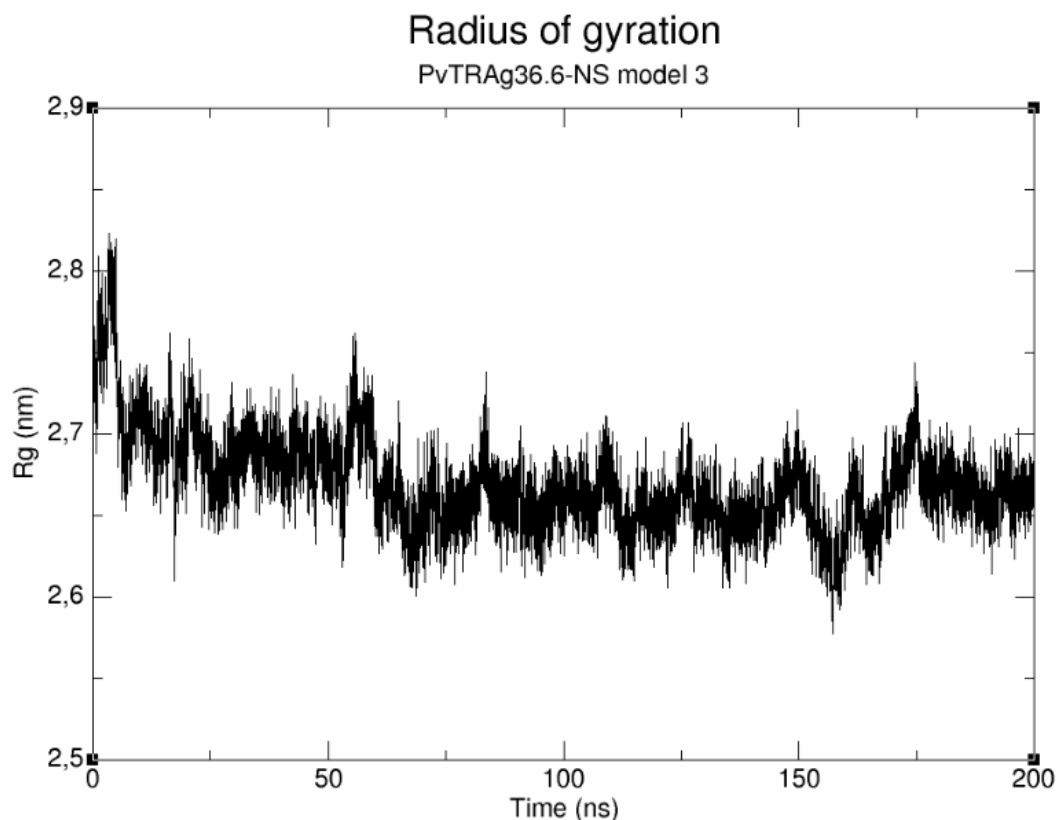


Figura 31: raio de giro de PvTRAg36.6-NS ao longo de todo o tempo de simulação.

Pelas imagens geradas a partir dos arquivos .pdb em diferentes instantes da simulação (Figura 32), percebe-se que a heparina posicionou-se em uma região diferente da simulação realizada com PvTRAg36.6. No caso da proteína sem o peptídeo sinal, o ligante ficou próximo das seguintes regiões: 56[84]-59[87], 131[159]-146[174], 185[213]-194[222] e Asn-234[262]. Assim, a interação predita pela dinâmica molecular de PvTRAg36.6-NS e heparina ficou relativamente próxima do *docking* realizado entre essas duas entidades e, assim, os resultados convergem. Ressalta-se que a heparina ficou em uma conformação mais compacta no *docking*, enquanto que ela ficou em uma conformação mais linear na dinâmica. Essa diferença pode ser resultante de uma maior consideração de repulsões intramoleculares pela dinâmica.

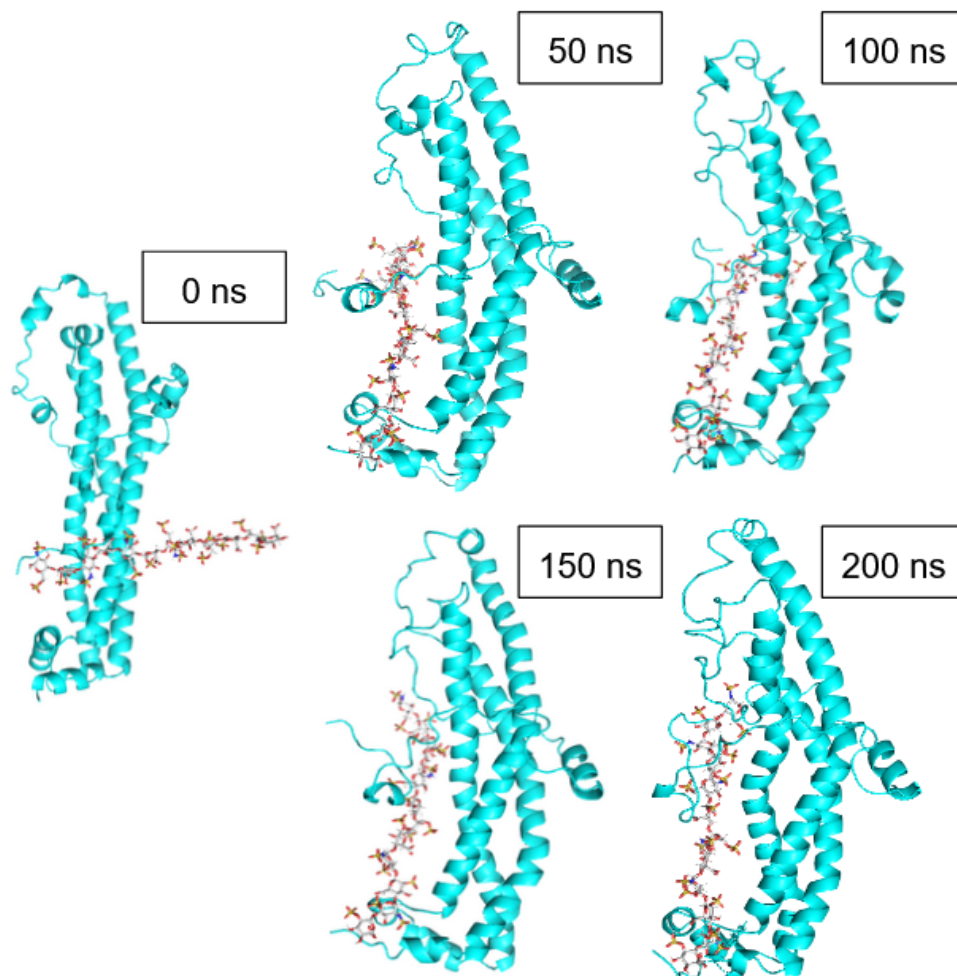


Figura 32: imagens da simulação nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns.

O número de interações de H (Figura 33) entre PvTRAg36.6-NS e heparina foi superior ao número de ligações entre este ligante e PvTRAg36.6, ficando ao redor de 20 ligações. Isso sugere uma ligação mais intensa da heparina com a proteína sem o peptídeo sinal, o que era esperado devido a maior sobreposição aparente entre as moléculas na Figura 28. Entretanto, este resultado está em leve desacordo com o docking realizado, uma vez que a menor energia interação observada foi entre heparina e a proteína com o peptídeo sinal.

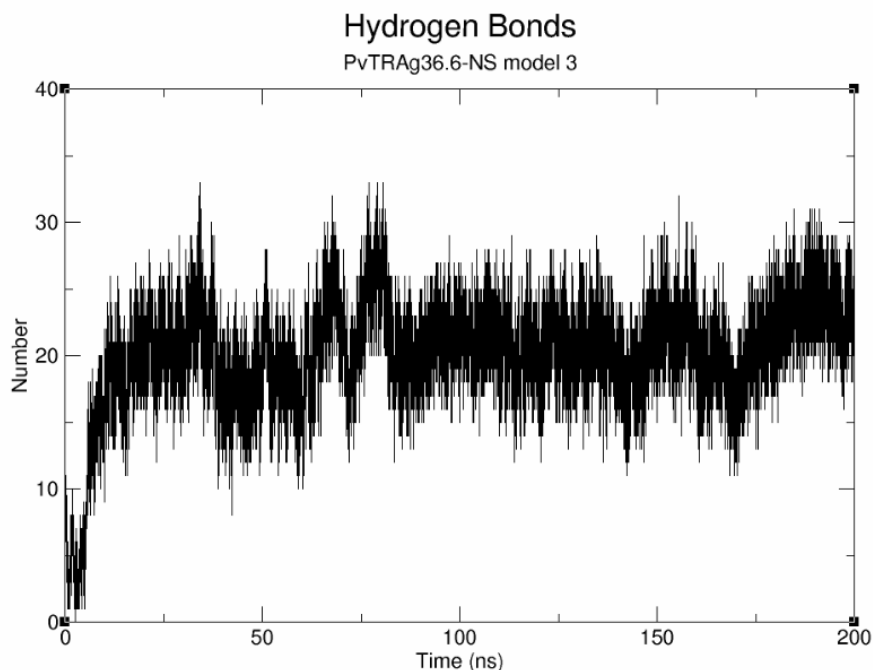


Figura 33: número de interações de hidrogênio entre a proteína e o ligante ao longo do tempo de simulação.

O cálculo da interação Coulômbica de curto campo média resultou em um valor de -1790 ± 45 kJ/mol, e a interação de Lennard-Jones de curto campo média, que resultou em um valor de -396 ± 24 kJ/mol. Isso resulta em uma energia total de interação de -2186 ± 69 kJ/mol, que é menor do que a energia total de interação de PvTRAg36.6 e heparina, sugerindo uma interação mais consistente para a proteína sem o peptídeo sinal (CHONG et al, 2021). Esse resultado está de acordo com a maior interação observada nas imagens geradas na Figura 33 e de acordo com o maior número de ligações de nesse sistema.

4.1.7. Dinâmica molecular de PvTRAg36.6- α

Em comparação com as outras dinâmicas envolvendo a PvTRAg36.6, seja com ou sem seu peptídeo sinal, a simulação com o modelo produzido pelo AlphaFold demorou mais tempo para entrar em equilíbrio. Observa-se que a curva de RMSD da heparina em relação à proteína (Figura 34) ficou próxima de um platô apenas após 75 ns e, mesmo assim, pode ser percebida uma certa flutuação após este instante. O valor do RMSD durante a estabilidade ficou ao redor de 2,4 nm, valor que indica uma elevada flexibilidade, porém menor do que nos outros modelos. Dessa forma, pode-se dizer que as flutuações no modelo do AlphaFold são menores, o que pode indicar uma ligação mais intensa da heparina com a proteína.

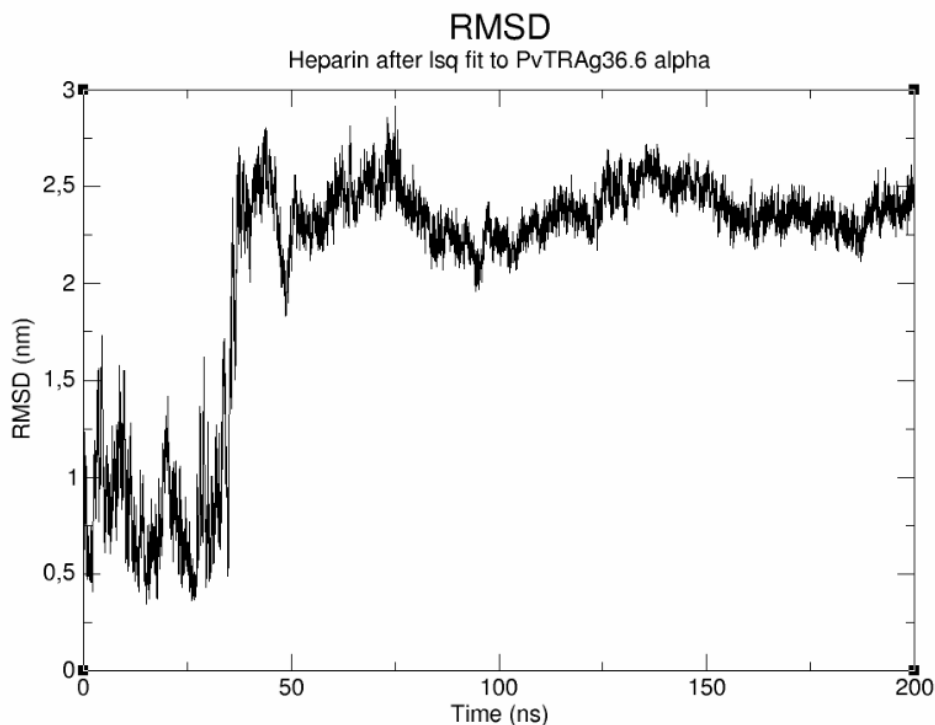


Figura 34: RMSD dos átomos de heparina (excluindo-se átomos de hidrogênio) calculado em relação ao *backbone* da proteína.

Como nos outros modelos, o RMSF da proteína (Figura 35) foi calculado a partir do momento de estabilização da simulação, nesse caso, de 75 a 200 ns. Observa-se, novamente, maiores flutuações na porção N-terminal da proteína, basicamente do resíduo 1 ao 75, com especial destaque para a região entre 50 e 75. Ainda assim, mudanças na posição dos aminoácidos parecem ser menores para PvTRAg36.6-alpha, em função dos menores valores de RMSF.

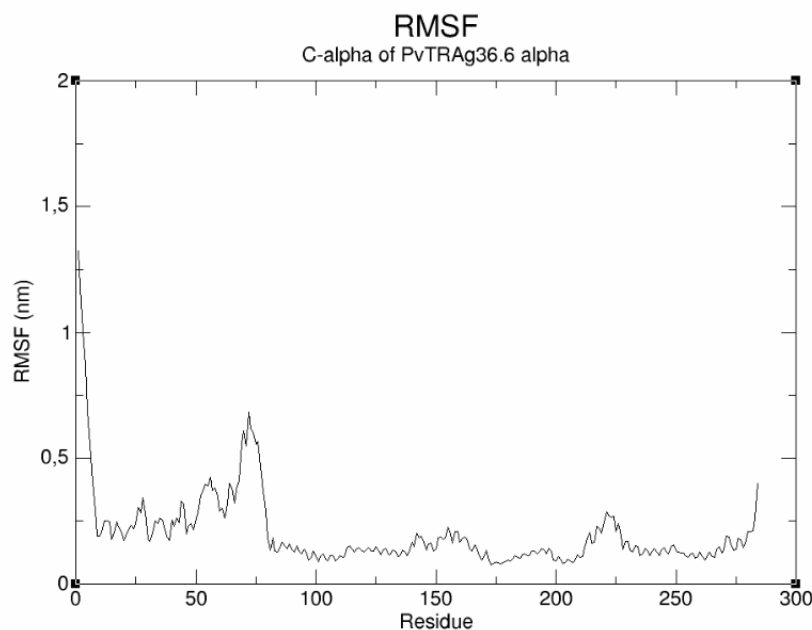


Figura 35: RMSF dos C_{α} PvTRAg36.6-alpha indicados por resíduo de aminoácido. O RMSF foi computado a partir de $t = 10$ ns, que é o instante em que a simulação se estabiliza.

O raio de giro da proteína (Figura 36) teve uma leve tendência de aumento a partir de sua estabilização no instante 12,5 ns. Isso sugere que a PvTRAg36.6-alpha apresentou variações conformacionais durante a simulação, reforçando a flexibilidade do sistema.

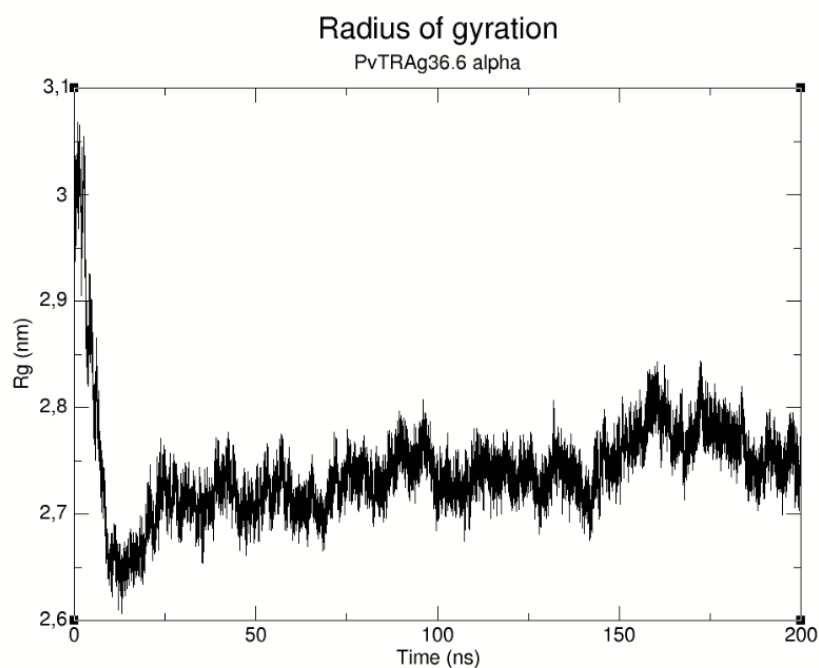


Figura 36: raio de giro de PvTRAg36.6-alpha ao longo de todo o tempo de simulação.

Assim como para PvTRAg36.6, a dinâmica molecular indicou uma região de interação diferente da região do *docking*. Isso foi constatado pela obtenção de arquivos .pdb nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns (Figura 37). Na dinâmica, o modelo do AlphaFold está próximo dos aminoácidos 57[86]-61[90], 196[125]-209[238] e 233[262]-244[273]. Como na dinâmica com PvTRAg36.6-NS, a heparina encontra-se visualmente bastante próxima da PvTRAg36.6-alpha, sugerindo uma boa interação entre os componentes.

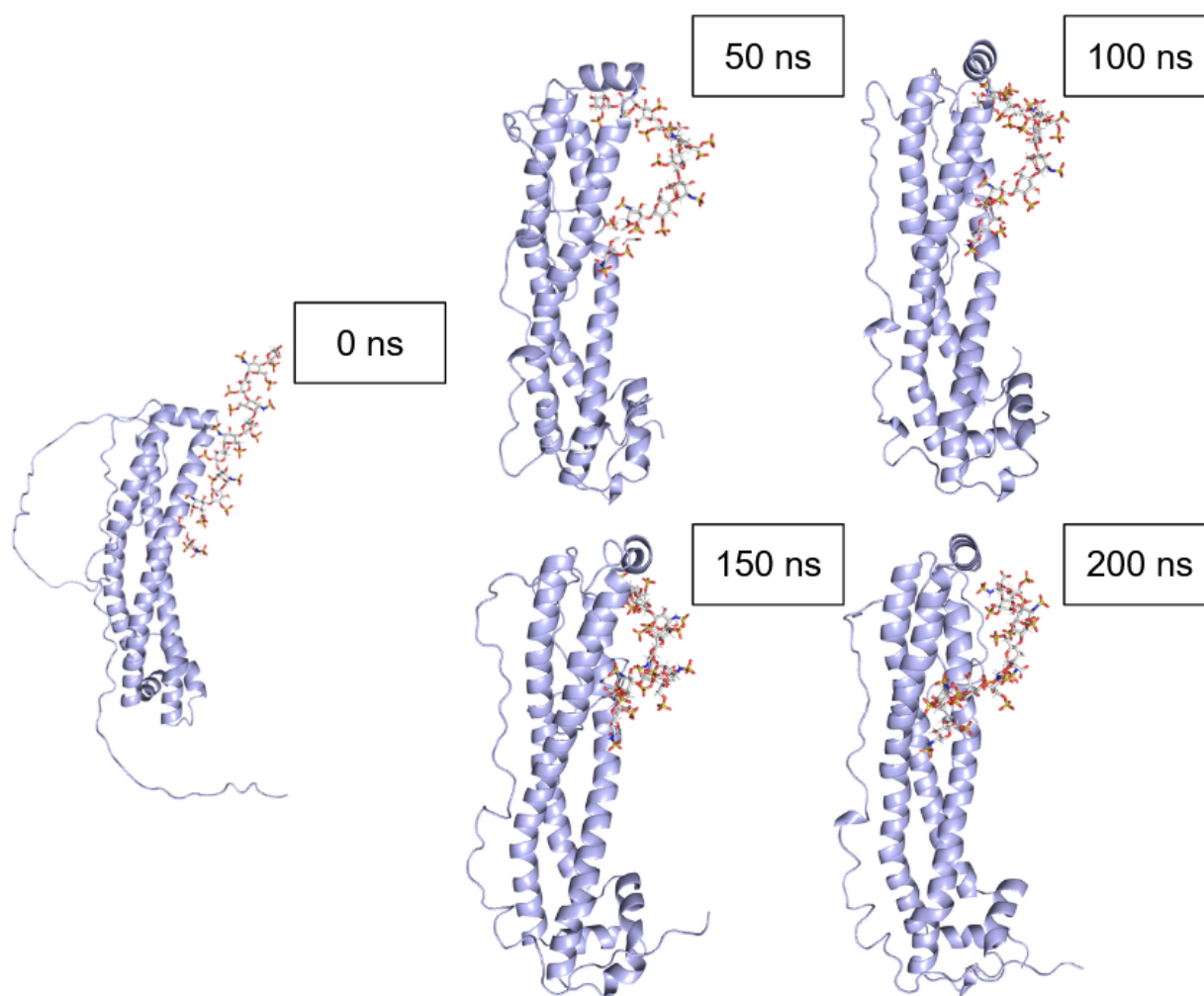


Figura 37: imagens da simulação nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns.

O número de ligações de H entre o ligante e a proteína ao longo do tempo também foi obtido (Figura 38). Observa-se que, inicialmente, o número de ligações de H se mantém ao redor de 10 e, com o passar do tempo, o número sobe e fica ao redor de 16. Isso sugere que a

interação entre a heparina e a proteína tende a ficar mais forte com o tempo e também pode sugerir uma nova estabilização do sistema após 125 ns.

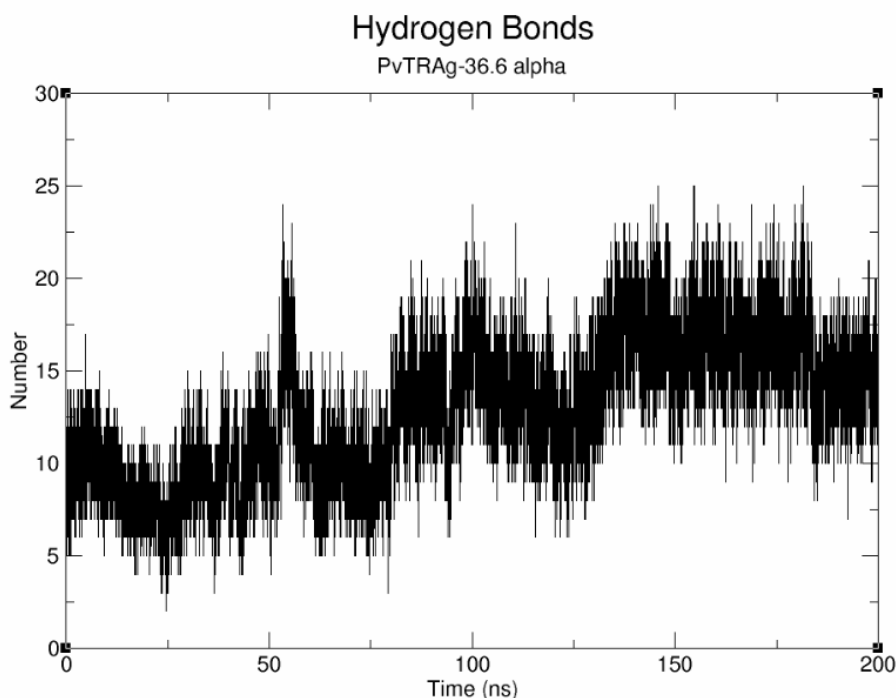


Figura 38: número de interações de hidrogênio entre a proteína e o ligante ao longo do tempo de simulação.

Quanto às energias envolvidas, a interação Coulômbica de curto campo média resultou em um valor de -1003 ± 150 kJ/mol, e a interação de Lennard-Jones de curto campo média, que resultou em um valor de $+1635 \pm 19$ kJ/mol, resultando em uma energia total de $+632 \pm 169$ kJ/mol, valor que é significativamente superior às outras simulações realizadas. Esse aumento causado pela interação de Lennard-Jones indica que há uma grande sobreposição de orbitais eletrônicos, causando repulsão entre as moléculas nessa conformação (ADAMS, 2001). Isso sugere uma interação desfavorável para o modelo produzido pelo AlphaFold, que é um resultado esperado em função da menor energia de ligação obtida pelo *docking*, em que o modelo PvTRAg36.6-alpha foi o com a maior energia de ligação em comparação com os outros modelos testados. Assim, utilizando-se o modelo do AlphaFold, conclui-se que esse sistema não indica uma boa interação entre a proteína e o ligante.

4.1.8 Dinâmica molecular de PvTRAg56.2 modelo 5

Dinâmicas moleculares também foram realizadas para o modelo 5 de PvTRAg56.2, uma vez que este foi o com a menor energia de interação dentre todos os modelos construídos. O RMSD da heparina em relação à proteína (Figura 39) mostra que a simulação atingiu uma relativa estabilidade a partir de 12,5 ns e a estabilidade se acentuou a partir de 50 ns.

Novamente foi observado um valor elevado, ao redor de 3,75 nm, indicando que o sistema possui elevada flexibilidade. Novamente, isso é esperado, especialmente em função do grande tamanho do ligante, que permite que ele assuma diferentes conformações.

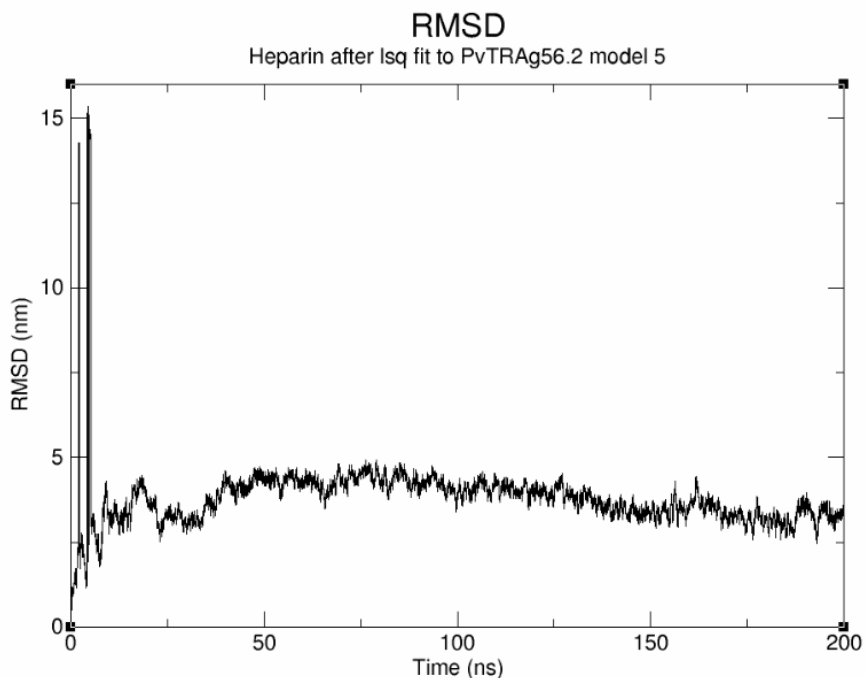


Figura 39: RMSD dos átomos de heparina (excluindo-se átomos de hidrogênio) calculado em relação ao *backbone* da proteína.

O RMSF (Figura 40) dos C_{α} de PvTRAg56.2 foi calculado e nota-se que diversas regiões da proteína são de alta flutuação. Assim, a proteína pode ser considerada como um todo flexível e mudanças conformacionais são esperadas ao longo da simulação. Pelo maior tamanho de PvTRAg56.2 em relação a PvTRAg36.6, a maior flexibilidade também era esperada.

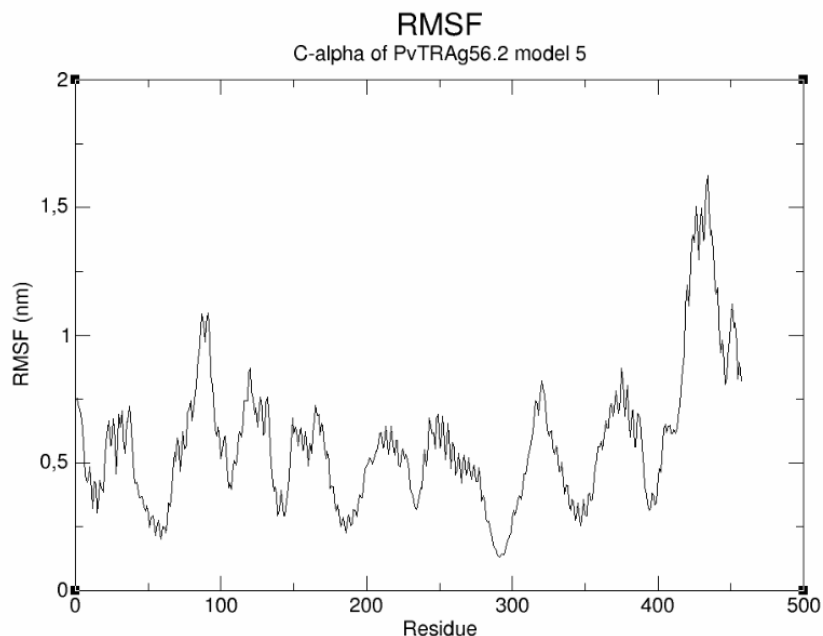


Figura 40: RMSF dos C_{α} de PvTRAg56.2 modelo 5 indicados por resíduo de aminoácido. O RMSF foi computado a partir de $t = 50$ ns, que é o instante a partir do qual a simulação apresentou maior estabilidade.

Como esperado pela flexibilidade, o raio de giro da proteína (Figura 41) também variou consideravelmente ao longo da simulação, apresentando relativa estabilidade apenas após 150 ns. Como a variação nessa métrica não apresentou nenhuma tendência clara, a proteína passou por diferentes níveis de compactação, ora aumentando, ora diminuindo, o que confirma que diferentes conformações foram assumidas na simulação.

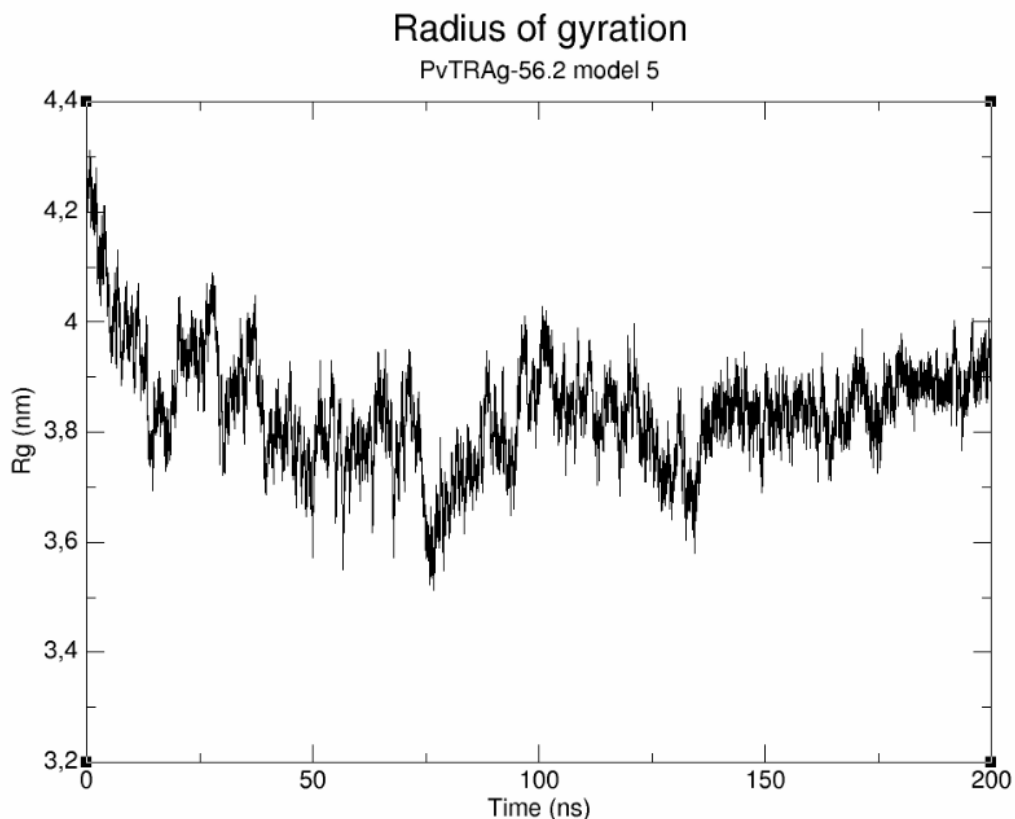


Figura 41: raio de giro de PvTRAg56.2 modelo 5 ao longo de todo o tempo de simulação.

As imagens tiradas nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns (Figura 42) mostram que a PvTRAg56.2 perdeu sua conformação característica apresentada nos modelos considerados (ela ainda está presente em 0 ns). A região de ligação da heparina também foi diferente de todos os *dockings* realizados para esta proteína, sendo que a interação se deu próximo aos aminoácidos 1-40 na dinâmica, ou seja, enquanto que a heparina ficou na região C-terminal no *docking*, o ligante ficou na região N-terminal na dinâmica. Assim, mais uma vez, os resultados do *docking* e da dinâmica não foram convergentes.

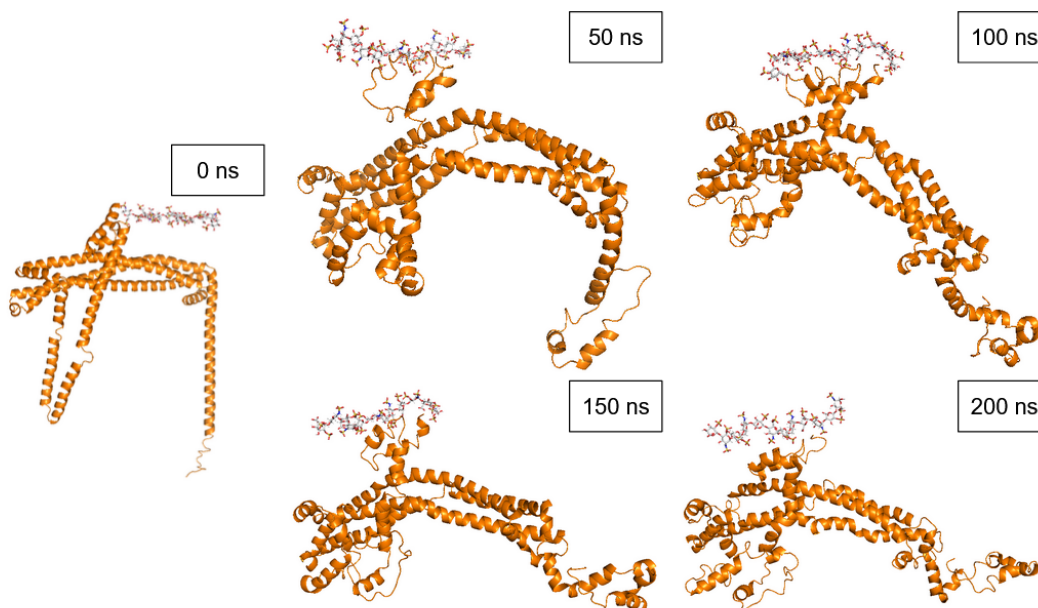


Figura 42: imagens da simulação nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns.

O gráfico das ligações de H ao longo do tempo (Figura 43) mostra que esse tipo de interação teve uma tendência de aumento no início da simulação, até atingir um valor próximo de 15 após 30 ns. A partir de 125 ns, o número de ligações de H teve uma leve queda, ficando próximo de 10 a partir de então, sugerindo uma interação menos intensa.

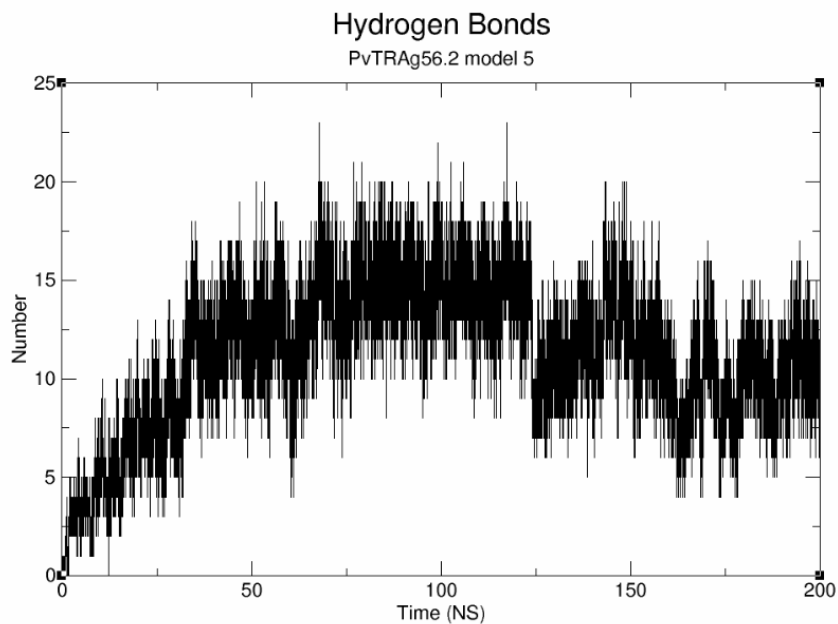


Figura 43: número de interações de hidrogênio entre a proteína e o ligante ao longo do tempo de simulação.

O cálculo da interação Coulômbica de curto campo média resultou em um valor de -928 ± 97 kJ/mol, e a interação de Lennard-Jones de curto campo média, que resultou em um valor de $+167 \pm 15$ kJ/mol, resultando em uma energia total de -1095 ± 112 kJ/mol. A energia total, nesse caso, é muito similar à energia de PvTRAg36.6, porém maior do que a energia de PvTRAg36.6-NS. Assim, é possível que a interação da heparina com PvTRAg56.2 seja tão favorável quanto com PvTRAg36.6.

4.1.8 Dinâmica molecular de PvTRAg56.2-alpha

Para PvTRAg56.2-alpha, o RMSD apresentou um valor elevado inicialmente, porém, após $t = 75$ ns, observa-se uma queda seguida de uma relativa estabilização (Figura 44). Entretanto, a estabilização não se manteve, uma vez que é possível observar um aumento discreto, porém contínuo nos valores de RMSD durante o período de 75 a 200 ns. Apesar disso, os valores de RMSD da interação de heparina com o modelo alpha foram inferiores aos valores com o modelo 5 e, assim, conclui-se que esse sistema apresentou menor flexibilidade durante o período de simulação.

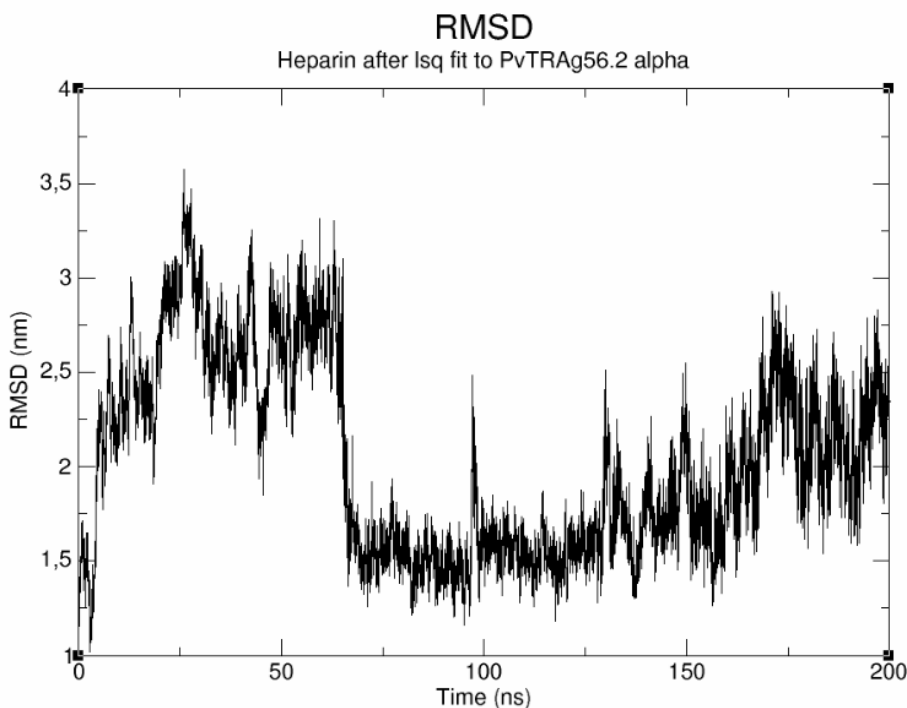


Figura 44: RMSD dos átomos de heparina (excluindo-se átomos de hidrogênio) calculado em relação ao *backbone* da proteína.

A partir desse resultado, o RMSF (Figura 45) foi calculado a partir do instante $t = 75$ ns e observou-se que a maior flutuação de aminoácidos encontra-se nos resíduos de 350 a 396, situação que também foi observada para o modelo 5 de PvTRAg56.2. Isso é particularmente interessante, pois essa foi a região de ligação prevista pelo *docking* e a maior flutuação pode dificultar a ligação da heparina.

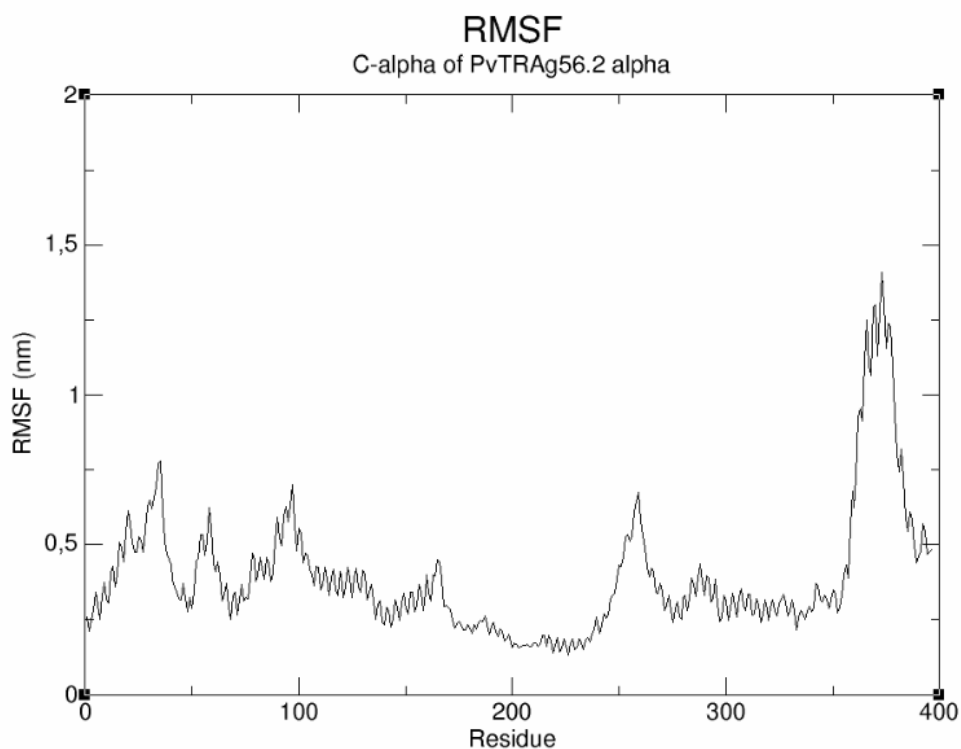


Figura 45: RMSF dos C_{α} de PvTRAg56.2-alpha indicados por resíduo de aminoácido. O RMSF foi computado a partir de $t = 75$ ns, que é o instante a partir do qual a simulação apresentou maior estabilidade.

Ao longo do tempo de simulação, também observa-se que o raio de giro (Figura 46) não se estabilizou ao longo do tempo e, portanto, a proteína apresentou diferentes níveis de compactação. No geral, para essa simulação, a proteína ficou mais compacta ao final, o que pode ser observado pela constante diminuição nos valores de raio giro. Dessa forma, esses valores, associados aos valores de RMSD e RMSF, sugerem que a proteína assumiu diferentes conformações durante o período avaliado.

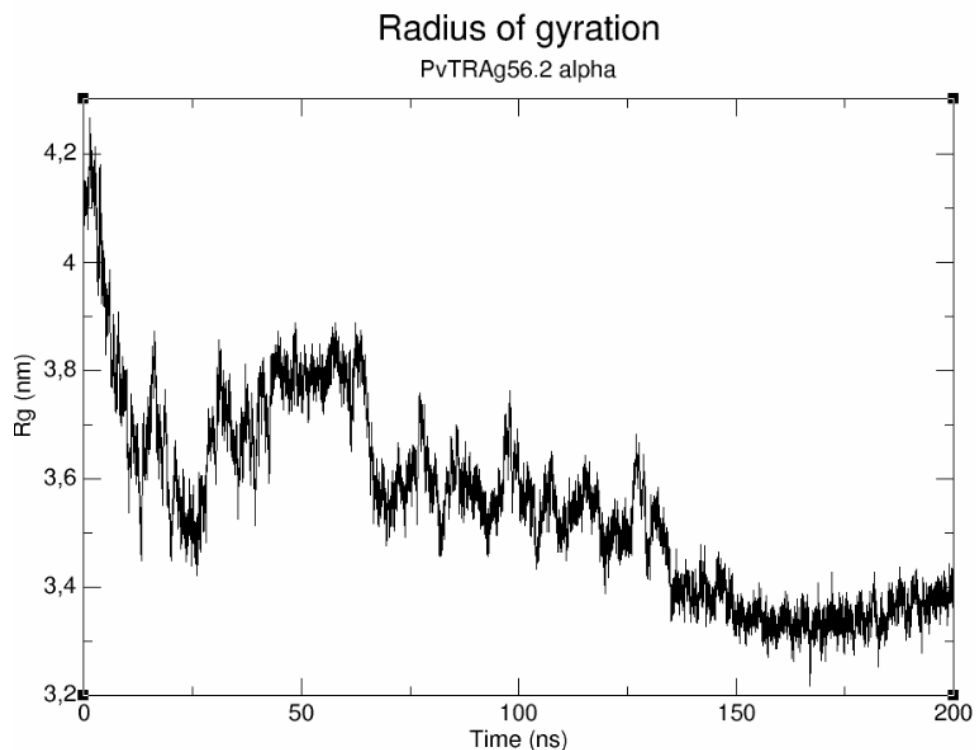


Figura 46: raio de giro de PvTRAg56.2-alpha ao longo de todo o tempo de simulação.

As imagens da interação nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns (Figura 47) evidenciam que o local de ligação previsto pelo *docking* foi distinto do local previsto pela simulação, o que também ocorreu com o modelo 5. Para o modelo alpha, a simulação previu proximidade com os aminoácidos 1[62]-6[67], 225[286]-229[290] e 257[318]-279[340], os quais encontram-se na região oposta aos aminoácidos C-terminais (352[413]-363[424]) e que foram preditos como sendo a região de interação pelo *docking*. Além disso, as dinâmicas moleculares dos modelos de PvTRAg56.2 não convergiram para um mesmo local de ligação.

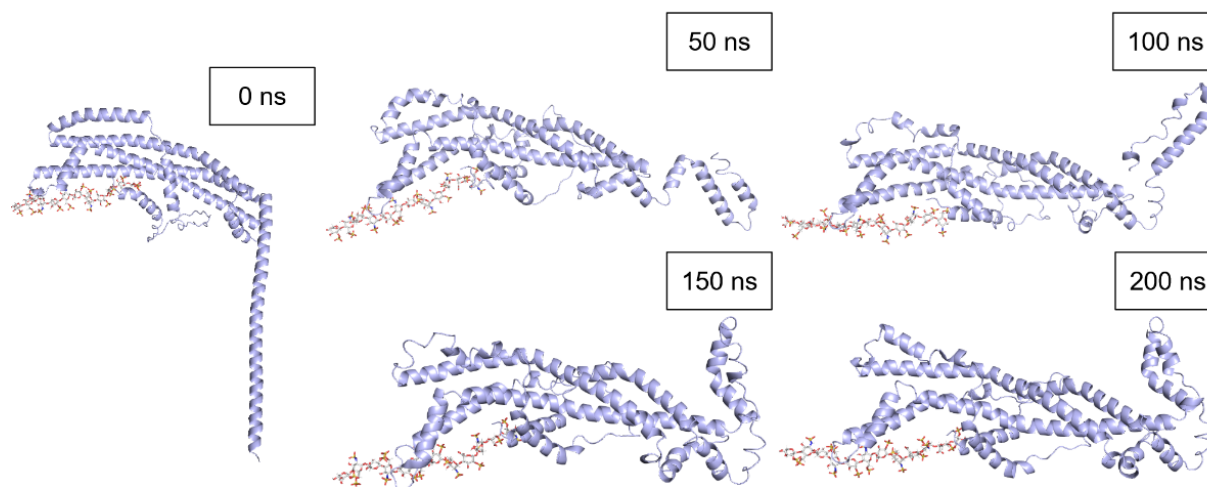


Figura 47: imagens da simulação nos instantes 0, 50, 100, 150 e 200 ns.

O número de ligações de H permaneceu razoavelmente constante ao longo da dinâmica e próximo de 15 (Figura 48). Esse resultado sugere uma ligação razoavelmente estável e de intensidade semelhante ao modelo 5. Além disso, pode sugerir uma interação suficiente para sua utilização como grupo diretor de uma terapia dirigida.

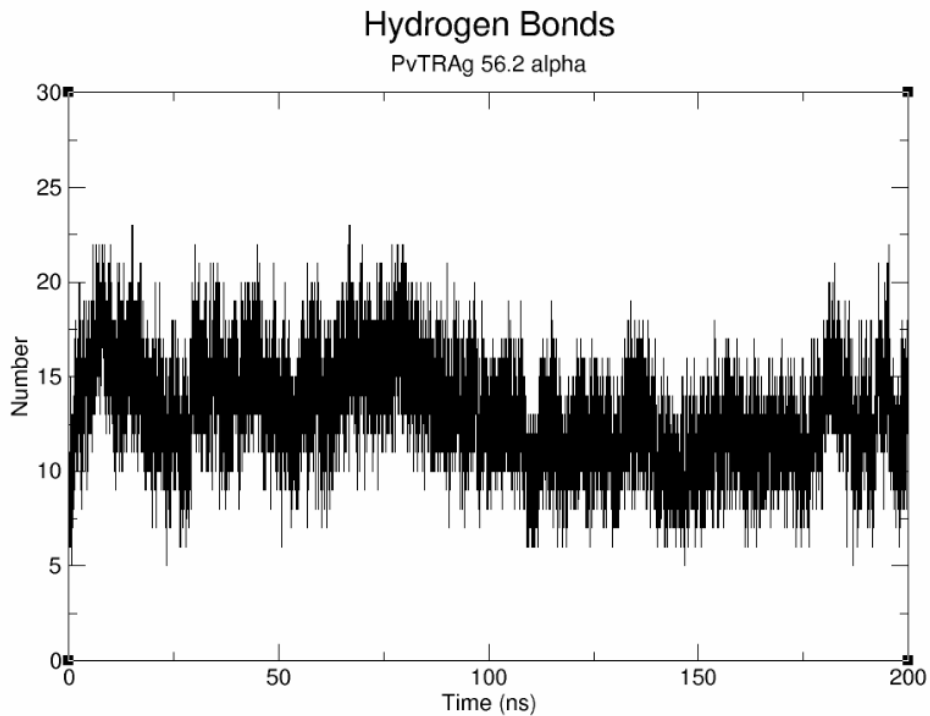
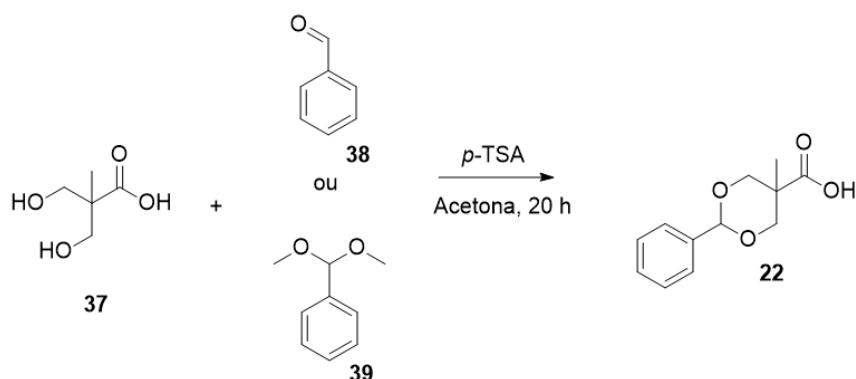


Figura 48: número de interações de hidrogênio entre a proteína e o ligante ao longo do tempo de simulação.

O cálculo da interação Coulômbica de curto campo média resultou em um valor de $+5795 \pm 44$ kJ/mol, e a interação de Lennard-Jones de curto campo média, que resultou em um valor de $+149 \pm 5$ kJ/mol, resultando em uma energia total de $+5944 \pm 49$ kJ/mol. Esse valor foi muito superior à energia total da interação entre heparina e o modelo 5 de PvTRAg56.2, indicando uma interação ruim do ligante com o modelo alpha e sugerindo que a proteína não é adequada para o direcionamento.

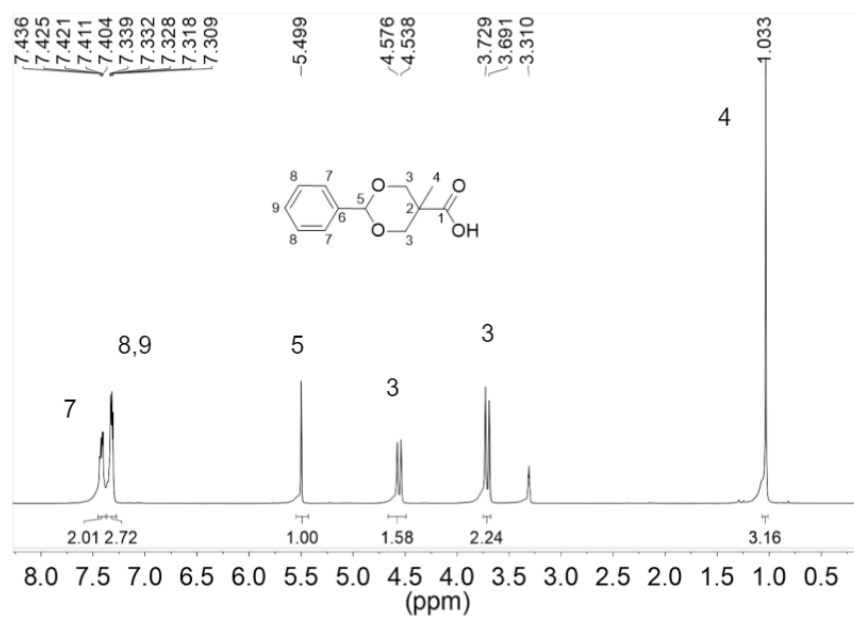
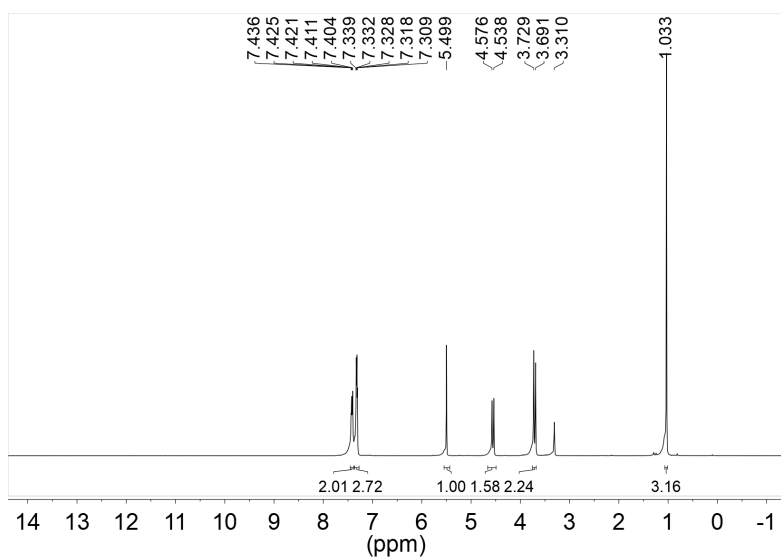
4.2. Síntese dos derivados de *BisMPA*

4.2.1. Proteção das hidroxilas do *BisMPA* - síntese de *BisMPAP*

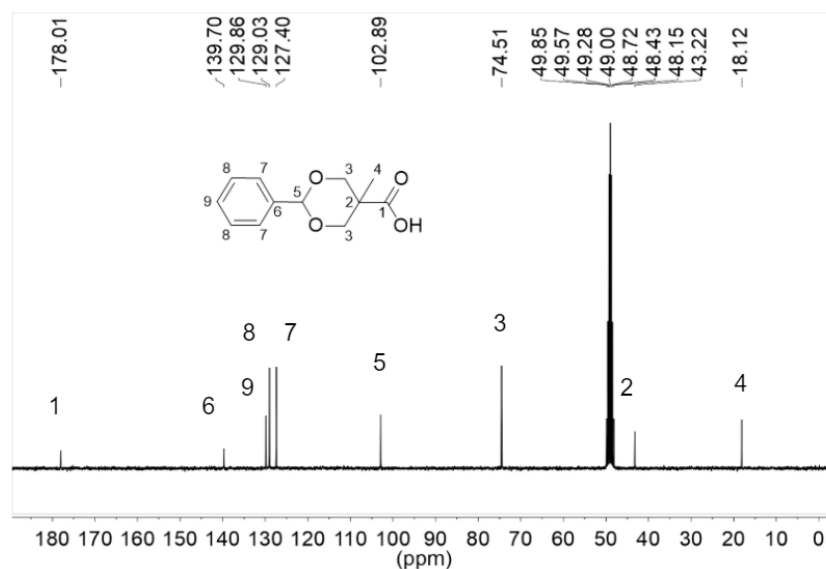
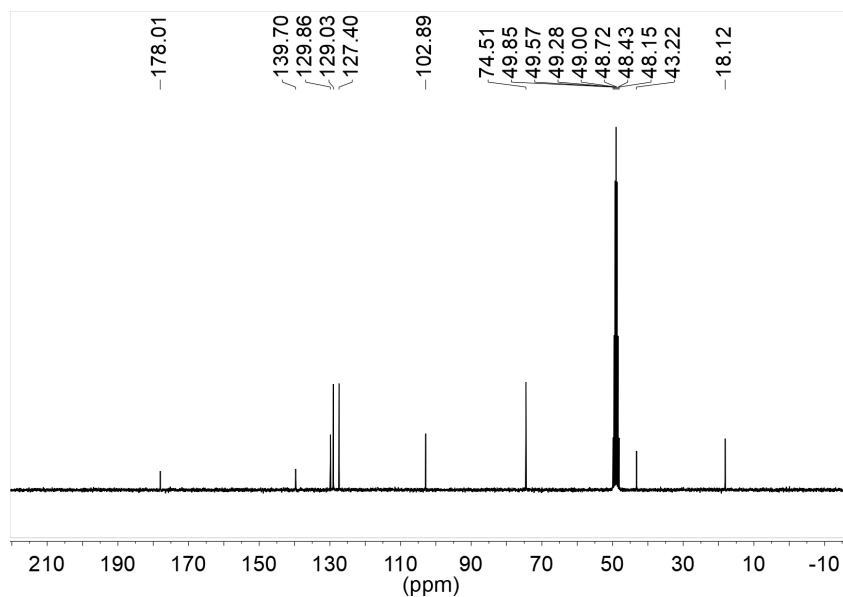


Esquema 6: Reação de proteção do *BisMPA* com dimetilacetal benzaldeído ou benzaldeído.

A síntese de *BisMPAP* foi acompanhada por CCD, sendo o R_f do produto superior ao R_f do *BisMPA*, o que era esperado devido à menor polaridade do produto (*BisMPAP*) em relação ao reagente (*BisMPA*). De forma a diminuir o custo financeiro da reação, benzaldeído também foi empregado em substituição ao dimetil acetal benzaldeído, sendo obtido o mesmo produto e com rendimento semelhante (cerca de 75%). Entretanto, a reação com benzaldeído apresentou etapas mais trabalhosas para a purificação, uma vez que o sólido obtido precisou ser lavado exaustivamente com acetona gelada para a retirada do excesso de benzaldeído. De qualquer forma, ambas as rotas sintéticas foram boas opções, permitindo a obtenção do produto com bom rendimento.



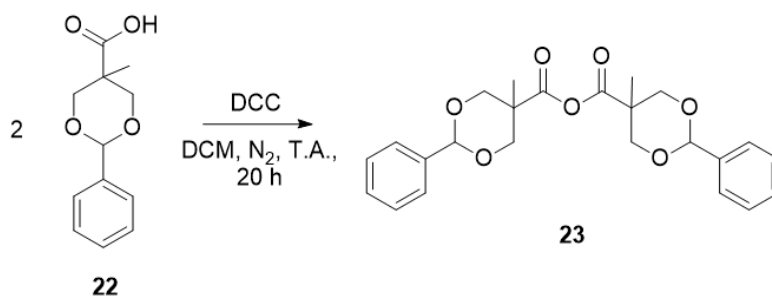
Espectro 1a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de *BisMPAP*. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 1b: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de *BisMPAP*. Acima, encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

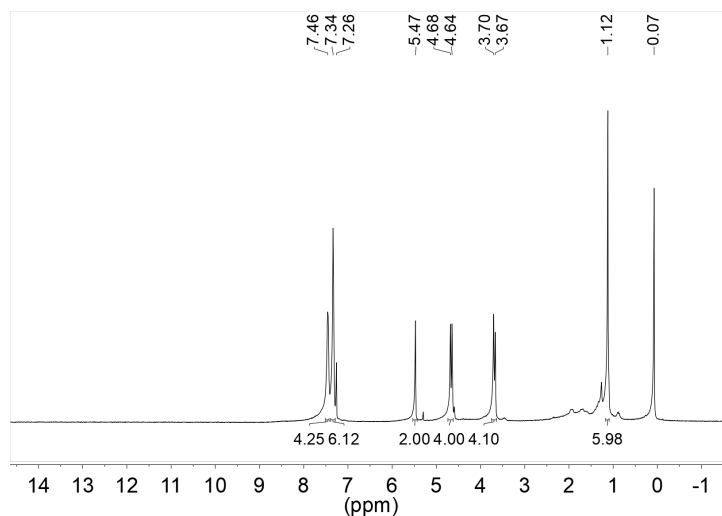
Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (espectros 1a e 1b, respectivamente) confirmaram a obtenção do produto, estando de acordo com o obtido por Santos (2016). Ressalta-se a presença de sinais de hidrogênio aromáticos em 7,31-7,44 ppm, oriundos do grupo protetor, além da integral dos sinais de hidrogênio estar de acordo com a estrutura do produto.

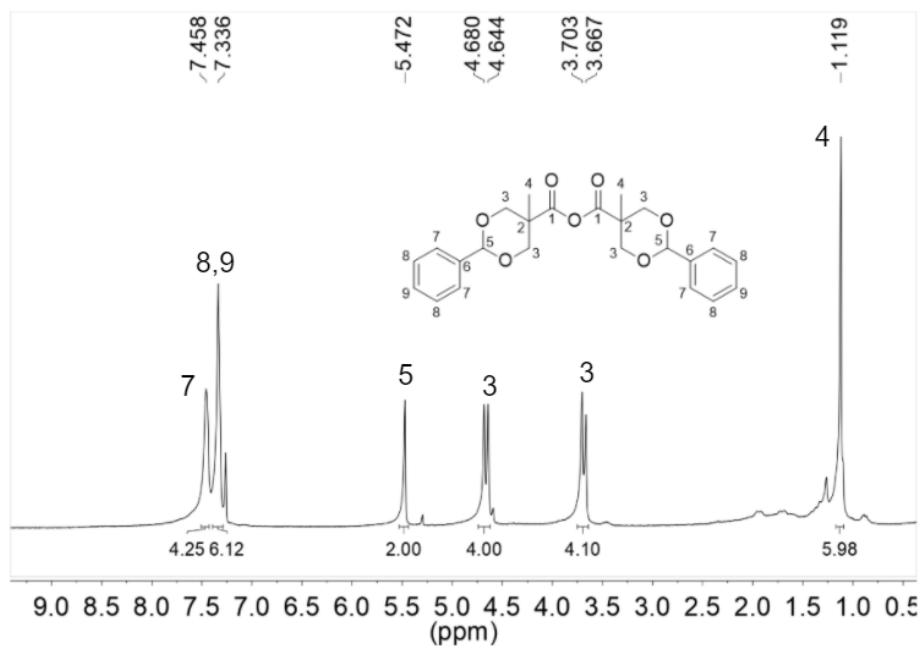
4.2.2 Formação de anidrido de *BisMPAP*



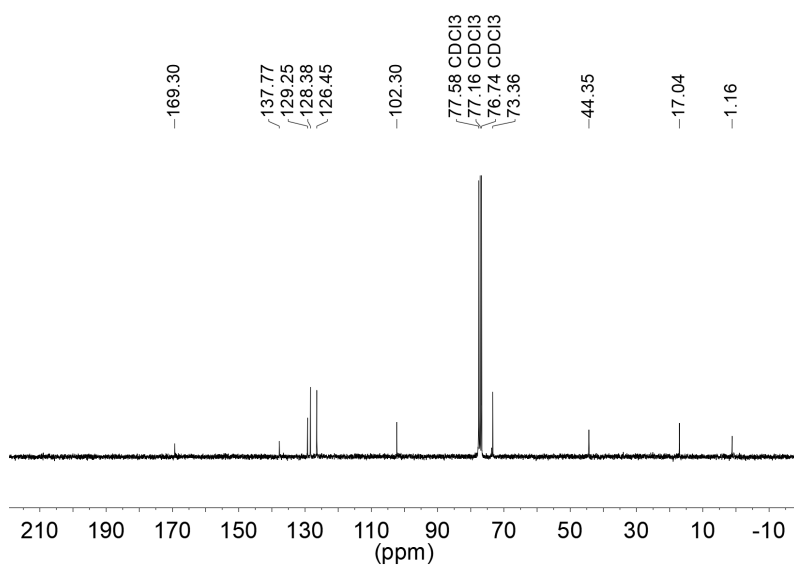
Esquema 7: síntese de anidrido de *Bis*MPAP.

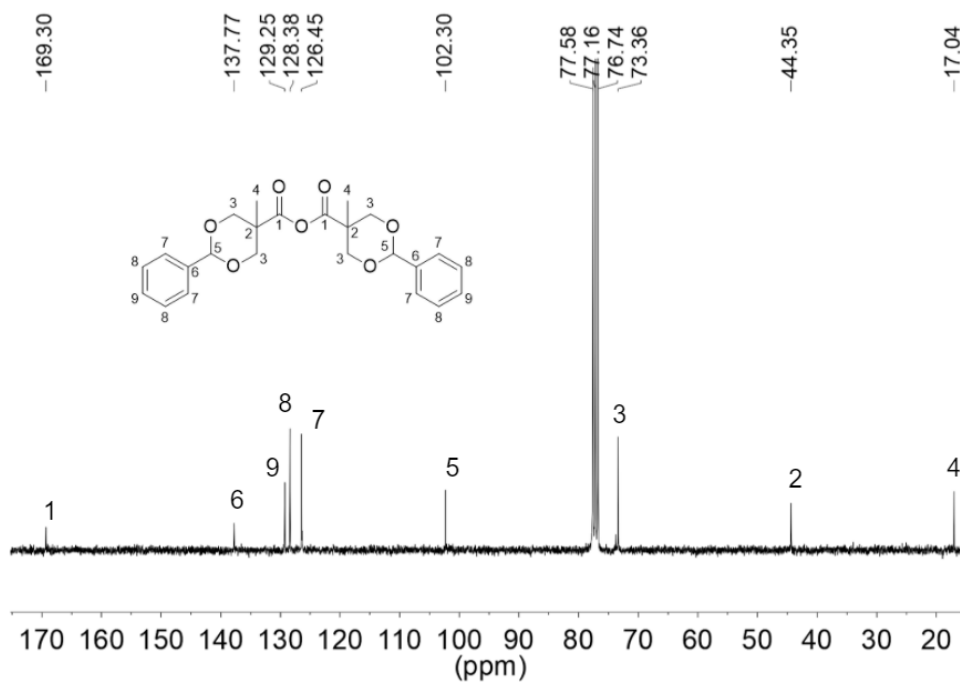
Anidrido de *Bis*MPAP foi sintetizado, seguindo-se protocolo estabelecido previamente (SANTOS, 2016). Assim, obteve-se anidrido de *Bis*MPAP, um sólido branco cristalino amorfo, com rendimento de 60%. Acredita-se que esse rendimento poderia ter sido maior, pois a quantidade de DCM prevista no protocolo e utilizada para dissolução do DCC durante a etapa de adição não foi capaz de solubilizar todo o sólido, indicando que parte do reagente utilizado havia sido degradada a DCU durante o armazenamento. Assim, sínteses subsequentes de anidrido de *Bis*MPAP foram realizadas com DCC purificado, seguindo o protocolo de Armarego e Chai (2009).





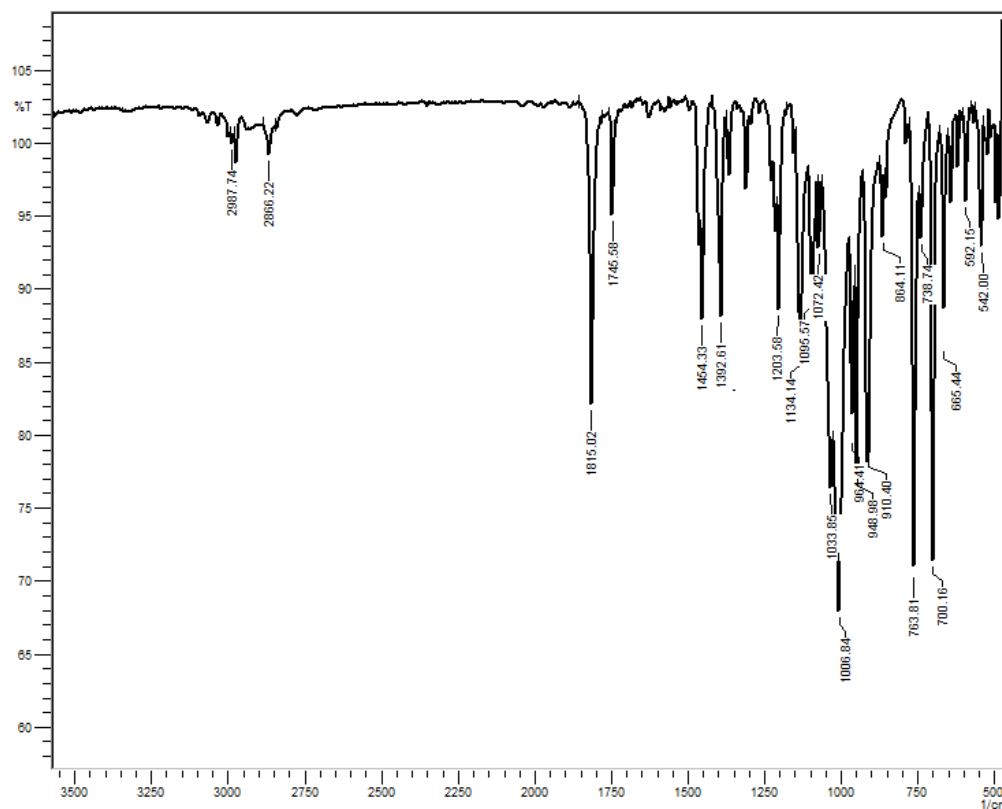
Espectro 2a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do anidrido de *BisMPAP*. Acima, encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.





Espectro 2b: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do anidrido de BisMPAP. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

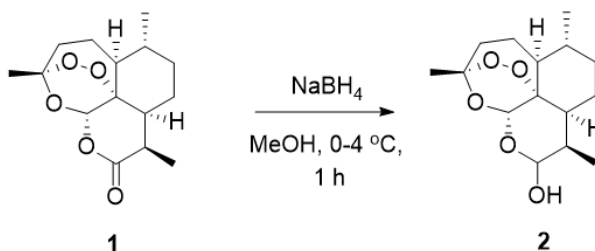
Os espectros de RMN de ^1H (Espectro 2a) e ^{13}C (Espectro 2b) apresentam-se idênticos aos obtidos por Santos (2016) e ressalta-se o deslocamento do sinal dos carbonos carbonílicos para regiões de maior campo (em relação ao ácido correspondente) no espectro de ^{13}C como evidência da formação do anidrido. Assim, houve mudança de 178,01 ppm no ácido para 169,30 ppm no anidrido. Além disso, no espectro de IV (Espectro 2c), é possível notar as duas bandas de estiramento das carbonilas em 1815 e 1746 cm^{-1} , indicando a formação do anidrido, e a ausência de um sinal largo entre 3400 e 2400 cm^{-1} (PAVIA et al., 2009), indicando a ausência de hidroxila de ácido carboxílico.



Espectro 2c: espectro de IV do anidrido de *BisMPAP*.

4.3. Síntese do dendron de artesunato

4.3.1. Síntese de diidroartemisinina (*DHA*)



Esquema 8: Reação de redução da carbonila de artemisinina utilizando-se NaBH_4 .

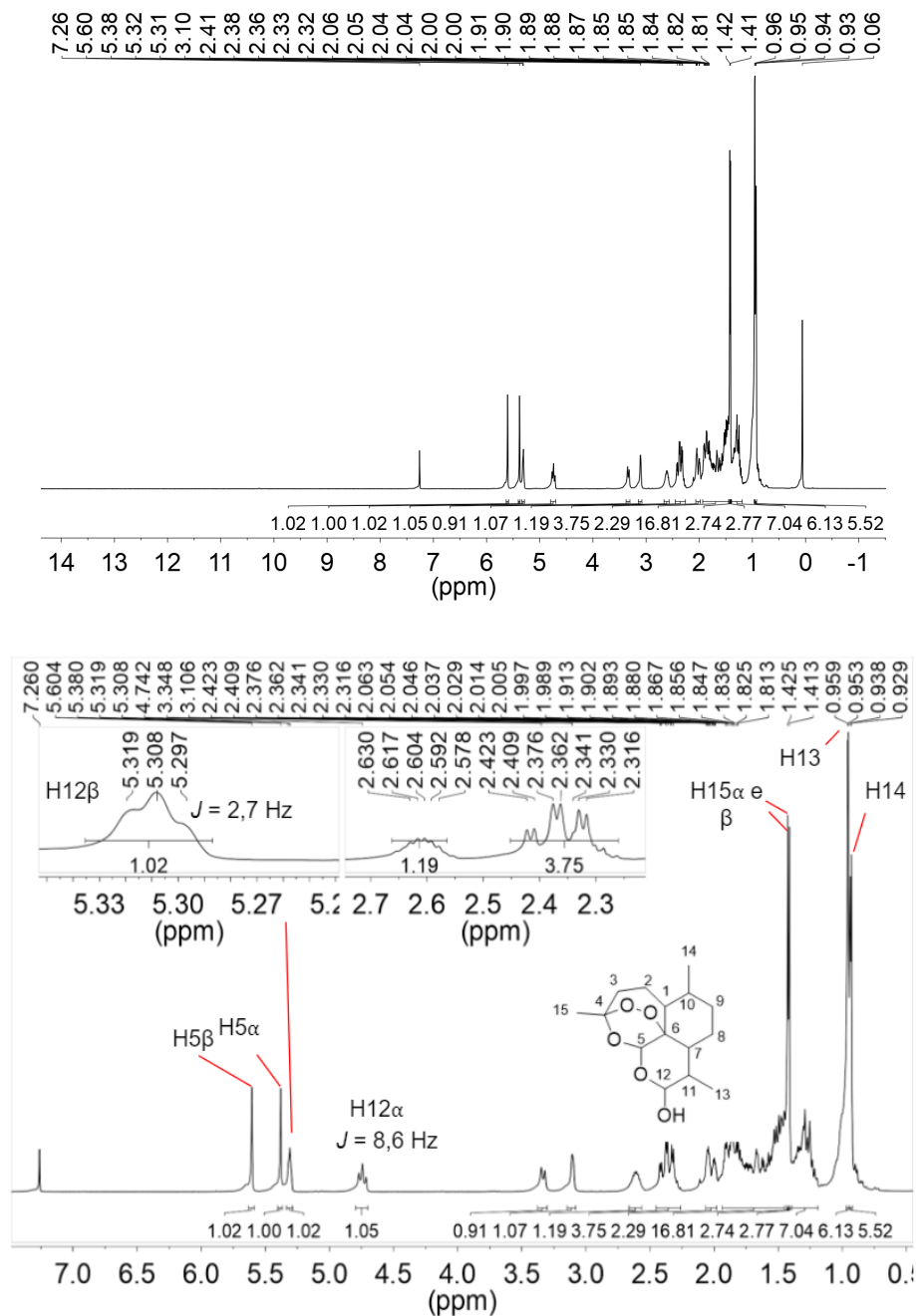
O primeiro protocolo utilizado para a síntese de *DHA* foi o descrito por Presser, Feichtinger e Buzzi (2016). Esta rota emprega NaBH_4 como agente redutor e MeOH como solvente, sendo que o artigo relata rendimento de 98%. Ao tentar-se a reprodução do procedimento, um rendimento máximo de 30% foi obtido. Durante o processo de remoção do solvente após acidificação do meio reacional ao final da síntese, notava-se que era obtida uma pasta ao invés de cristais, o que difere do obtido por Presser, Feichtinger e Buzzi (2016). A

pasta é facilmente solubilizada em água durante o processo de lavagem e, portanto, não pode corresponder a DHA, a qual é pouco solúvel em H₂O (PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016). Acredita-se que tal resultado seja oriundo de algum processo de degradação da DHA, uma vez que a ponte endopéroxido, essencial para a atividade dos derivados de artemisinina, é sensível a alta temperatura e ambientes com ácidos ou bases fortes, podendo ser formados diversos produtos de degradação nessas condições (HAYNES et al., 2007; PARAPINI et al., 2015; PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016). Em sínteses preliminares, realizadas no laboratório, notou-se um intenso aquecimento do meio reacional ao se adicionar a solução de ácido acético/MeOH (30%, v/v). Assim, mesmo resfriando-se o balão e a solução ácida antes de sua adição, não pode ser descartada a hipótese de aquecimento e consequente degradação durante a etapa de adição. Ressalta-se que algumas sínteses seguindo esse protocolo resultaram em rendimento de 0%, sendo formada exclusivamente a pasta não correspondente à DHA. Entretanto, análises por RMN, IV ou p.f. do material que compõe a pasta não foram realizados. Assim, dado que este protocolo resultou em um rendimento ruim, buscaram-se na literatura protocolos alternativos.

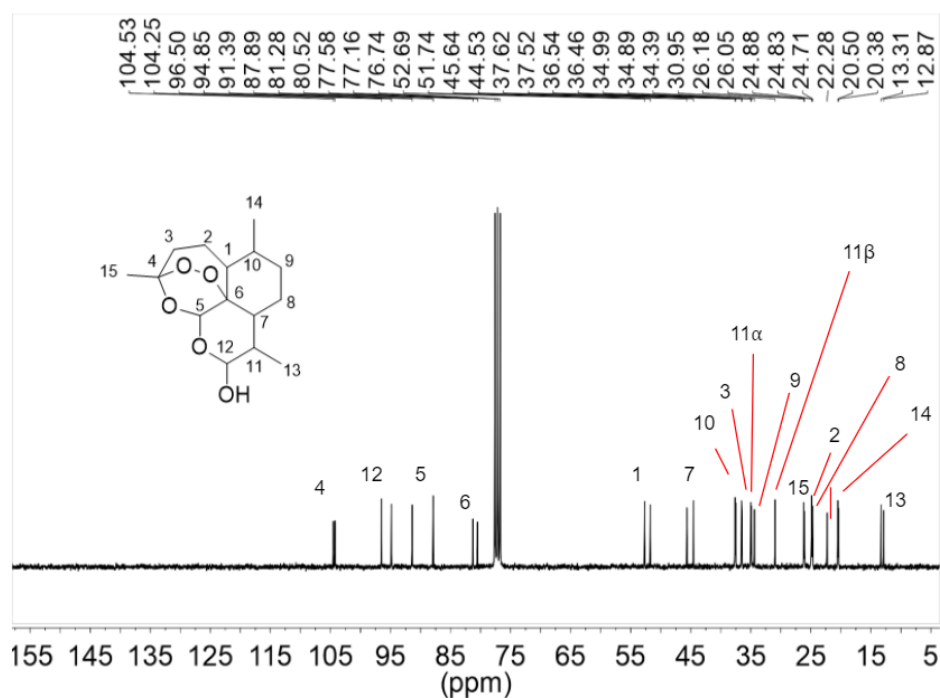
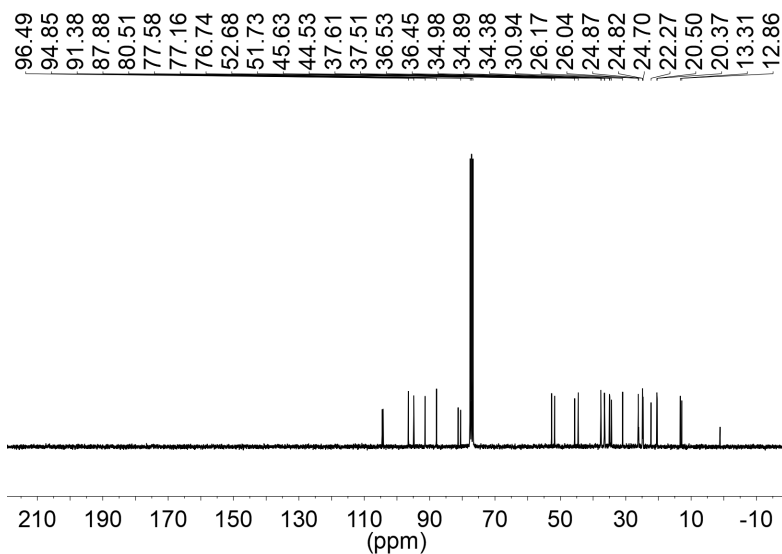
Poucas variações da reação são relatadas e, em geral, rendimentos superiores a 70% são obtidos (SINGH, CHAUDHARY, PURI, 2008; BROSSI et al., 1988; BHAKUNI et al., 2004). Baseando-se na patente de Bhakuni et al. (2004), tentou-se uma variação da redução com NaBH₄, sendo empregado THF como solvente e glicose como catalisador. O resultado continuou insatisfatório, pois a etapa de neutralização gerou um borbulhamento muito intenso da suspensão, com a formação de uma grossa espuma, que foi ejetada pela boca do balão. Além disso, a grande quantidade de material sólido para a baixa quantidade de solvente comprometeu a dissolução e o agitador magnético teve dificuldade em manter uma boa agitação.

A partir de então, uma nova análise do protocolo disponível no artigo de Presser, Feichtinger e Buzzi (2016) foi realizada e notou-se que o artigo aparenta uma grande influência de outro estudo publicado por parte dos autores, em 2007 (BUZZI, PRESSER, VON FREYHOLD, 2007), entretanto, a quantidade de solvente (MeOH) utilizada foi consideravelmente superior na publicação antiga. Assim, sínteses mimetizando o estudo de 2007 foram tentadas, porém, mantendo-se o baixo rendimento. Apesar disso, a quantidade maior de metanol levou a melhor solubilização da artemisinina e menor deposição de material na parede do balão de síntese, além de facilitar a realização de CCDs para acompanhamento e determinação do consumo total de artemisinina. Além disso, a escolha de recristalização para o processo de purificação do produto foi vantajosa por ser procedimento menos laborioso e com menor gasto de solvente do que a purificação por cromatografia em coluna de sílica.

A DHA obtida usando-se o protocolo de Presser, Feichtinger e Buzzi (2016) ou o de Buzzi, Presser e Von Freyhold (2007) apresentou-se como um sólido de cristais amorfos, possuindo um R_f de 0,48, utilizando-se DCM:metanol (20:1) como fase móvel, e faixa de fusão de 148,2-150,0 °C. Tais resultados se encontram em concordância com Presser, Feichtinger e Buzzi (2016).



Espectro 3a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de DHA. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam sua atribuição.



Espectro 3b: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de DHA. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam sua atribuição sem distinção entre os epímeros, exceto para os sinais referentes ao C11

Devido à presença de 4 anéis não aromáticos na molécula de DHA, seus hidrogênios apresentam diferentes conformações e, por essa razão, estão sujeitos a diferentes densidades eletrônicas. Isso se traduz em regiões de difícil análise do espectro de RMN de ^1H (espectro 3a), em função dos diferentes acoplamentos possíveis e sobreposição de sinais, sendo necessária a utilização de aparelhos de maior potência (550 MHz) para uma correta atribuição

(LUO et al., 1984). Entretanto, o espectro de RMN de ^1H apresentou-se idêntico ao espectro de referência (PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016), sendo possível observar a presença de dois epímeros, os quais são dependentes da orientação espacial da hidroxila e se interconvertem ao longo do tempo e em uma proporção dependente do sistema solvente (PATHAK, JAIN, SHARMA, 1997; PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016).

Como os espectros foram obtidos utilizando-se CDCl_3 como solvente e, conforme relatado por Presser, Feichtinger e Buzzi (2016), observou-se proporção de 1:1 entre os epímeros α e β . O epímero α apresenta a hidroxila em posição equatorial no anel, enquanto o β possui sua hidroxila em posição axial (Figura 49). A determinação da configuração α ou β para os sinais referentes ao H12 pode ser realizada em função do valor da constante de acoplamento. O tripleto em 5,31 ppm apresenta $J = 2,7$ Hz, indicando que o H12 está em posição equatorial e, portanto, a hidroxila está em posição axial (β). Já o tripleto em 4,74 ppm apresenta uma constante de maior valor ($J = 8,6$ Hz) do que aquele em 5,31 ppm, indicando que o hidrogênio está em posição axial e, portanto, a hidroxila está em posição equatorial (α) (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005). Já para os hidrogênios H5 e H15, uma vez que os sinais são simpletos, não é possível utilizar a constante de acoplamento para determinação da configuração da molécula responsável pelo sinal. Entretanto, tal diferenciação pode ser feita pelo deslocamento químico. No caso do H5, ele está em posição axial (PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016), assim, em função de sua maior proximidade com a hidroxila axial no epímero β , espera-se maior desblindagem de H5 nesse caso e, portanto, maior deslocamento para regiões de menor campo em relação a α .

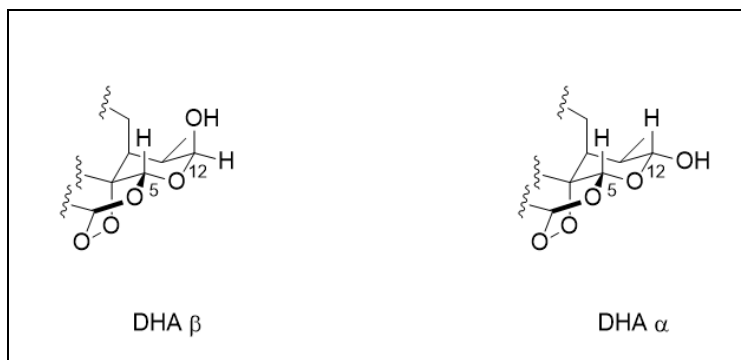
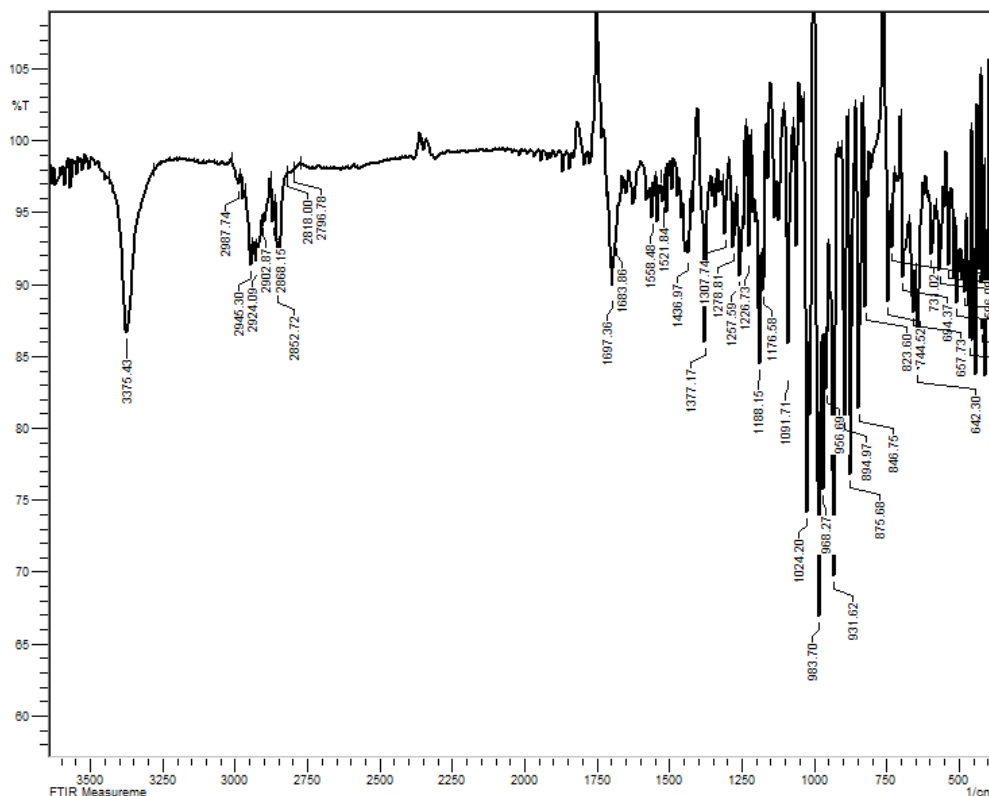


Figura 49: Orientação espacial da hidroxila e do H5 nos epímeros de DHA.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C mostrou resultados que estão de acordo com dados disponíveis na literatura (SY, HUI, BROWN, 1997; PATHAK, JAIN, SHARMA, 1997). Foi observada a presença de 30 sinais em função de ambos os epímeros em solução. Além disso, ressaltam-se os sinais em 96,49 e 94,85 ppm referentes ao C12, os quais não estão em região típica de carbonila, confirmando a redução desse grupo na artemisinina (observado em 172,09 ppm em espectro de RMN de ^{13}C realizado no material de partida) e a formação de um carbono carbinólico.

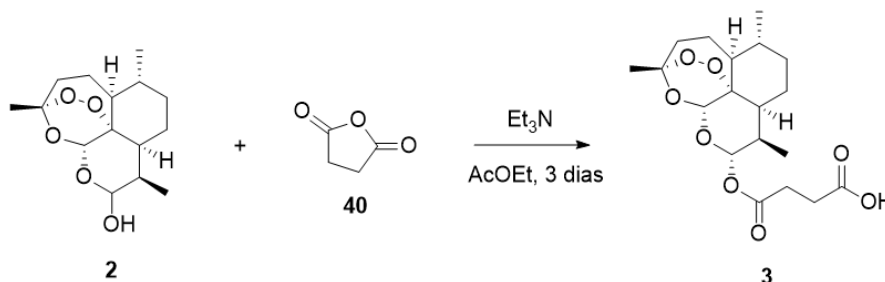
Também é possível notar o aparecimento de um sinal largo em 3375 cm^{-1} , indicativo da presença de uma hidroxila, e a ausência de um sinal de estiramento de carbonila no espectro de IV da DHA (Espectro 3c), a qual está presente em 1734 cm^{-1} no espectro de IV da artemisinina utilizada como material de partida (Espectro 1 na seção 9. Apêndice). Esses dados também confirmam a obtenção de DHA.



Espectro 3c: Espectro de IV da DHA.

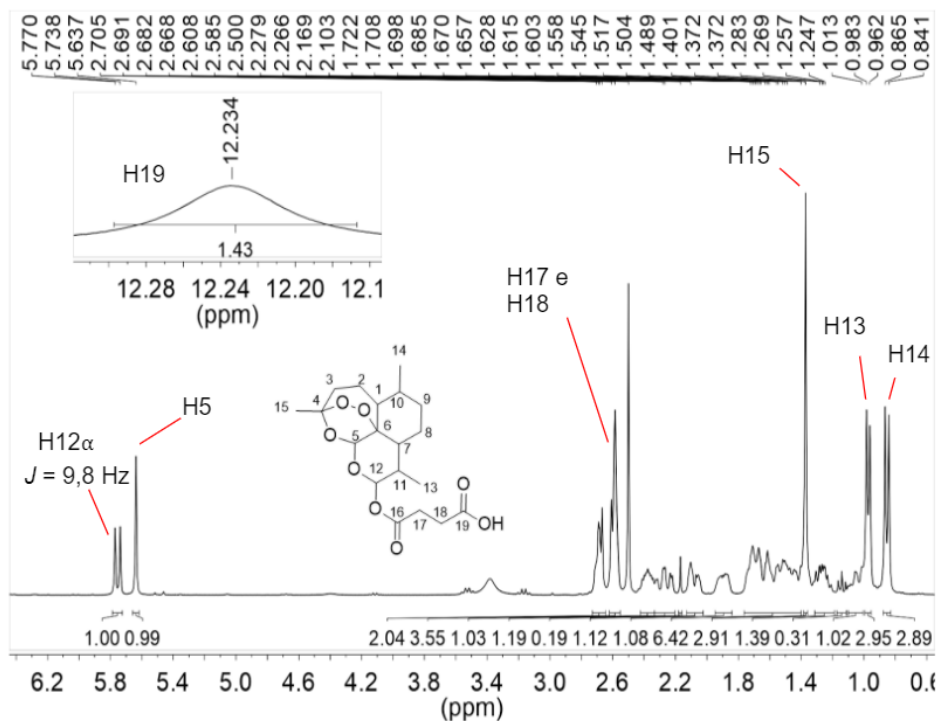
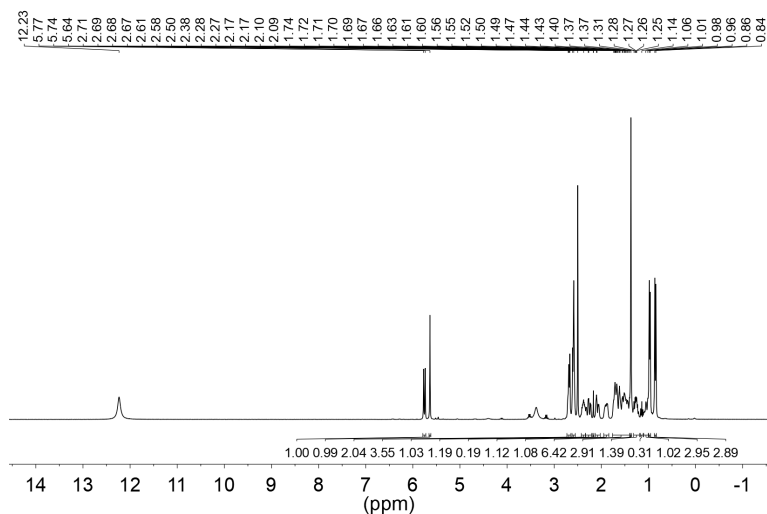
A confirmação da obtenção do produto de interesse permitiu o avanço para etapas seguintes na síntese do dendron de artesunato.

4.3.2. Síntese de artesunato

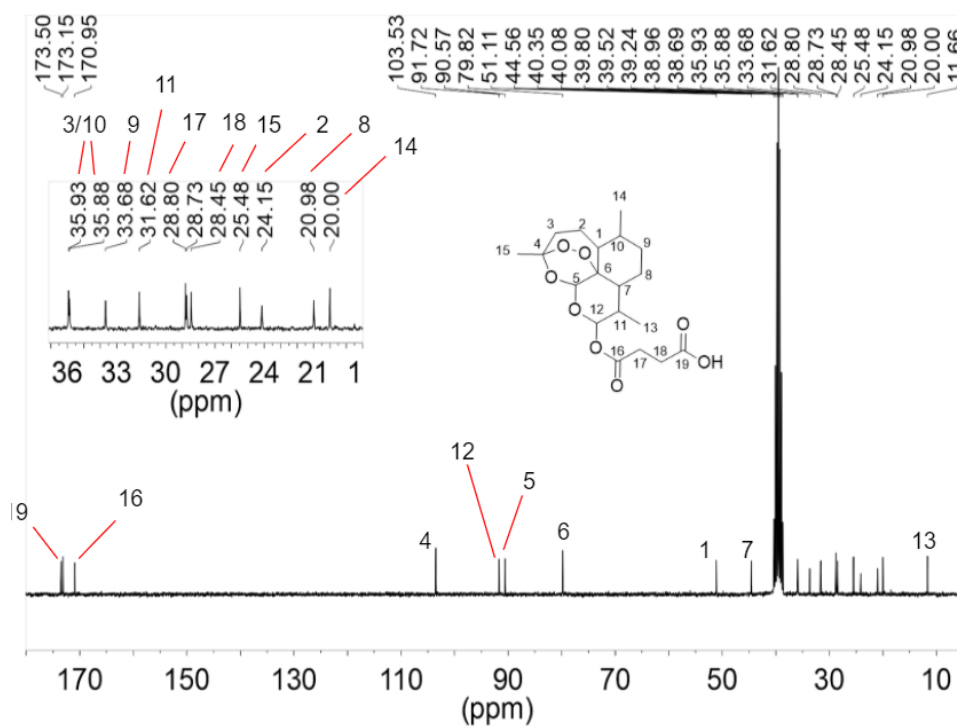
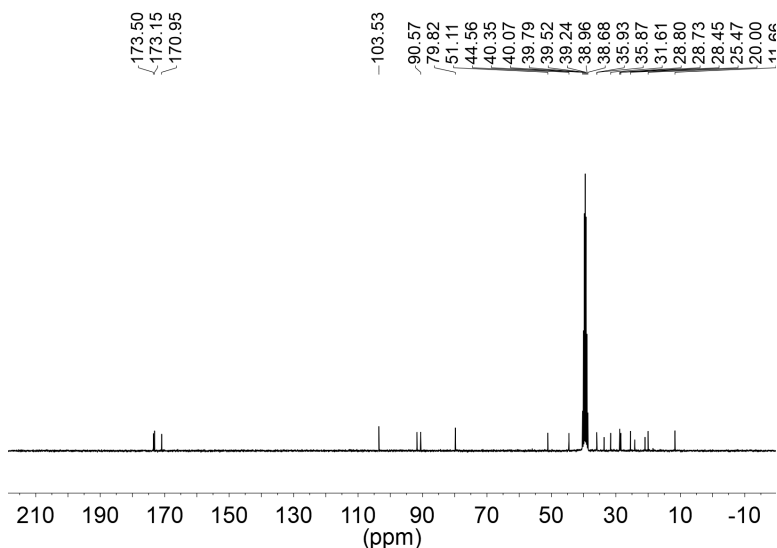


Esquema 9: Reação de esterificação de DHA com anidrido succínico.

A síntese de artesunato foi realizada para a obtenção do fármaco usualmente empregado na TCA com mefloquina. Seguiu-se uma modificação do protocolo de Presser, Feichtinger e Buzzi (2016). Isso se deu pelo fato de que, durante o acompanhamento da reação por CCD, notou-se que, ao longo do período de reação estipulado no protocolo original (4 h), não havia sido consumida toda a DHA presente no meio reacional. Assim, a reação foi mantida por 3 dias para o consumo total do material de partida, gerando mancha única na CCD de acompanhamento.



Espectro 4a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-D_6) de artesunato. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, resalta-se a atribuição de alguns sinais.



Espectro 4b: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO-D_6) de artesunato. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Na análise do espectro de RMN de ^1H (Espectro 4a), evidencia-se a esterificação pela presença do multiplete em 2,58-2,62 ppm com integral para 4 hidrogênios referente aos H17 e H18, além da presença de um sinal em 12,23 ppm, indicando o hidrogênio ácido H19. O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 4b) também confirmou a obtenção de artesunato pela

presença dos sinais de carbonila em 173,5 e 170,95 ppm, referentes aos carbonos C19 e C16, respectivamente, e pelos sinais em 28,80 e 28,45 ppm, referentes aos C17 e C18, respectivamente. Entretanto, também foi possível a identificação de ácido succínico como contaminante pela presença de sinais excedentes no espectro de ^{13}C (173,15 e 28,73 ppm) e de ^1H (multiplete em 2,67-2,71 ppm), conforme apresentado na Figura 50. Tal contaminante é provavelmente oriundo da hidrólise de excesso de anidrido succínico durante o processo de extração.

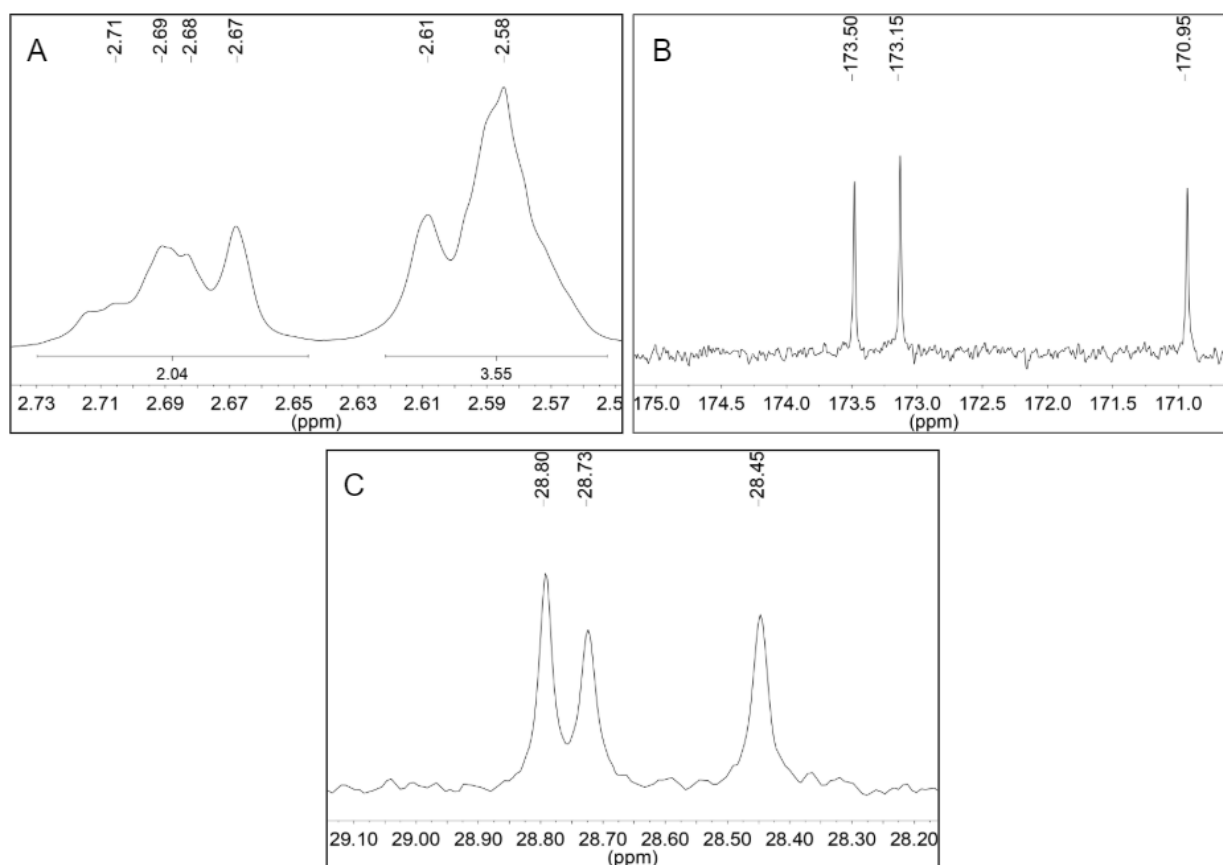
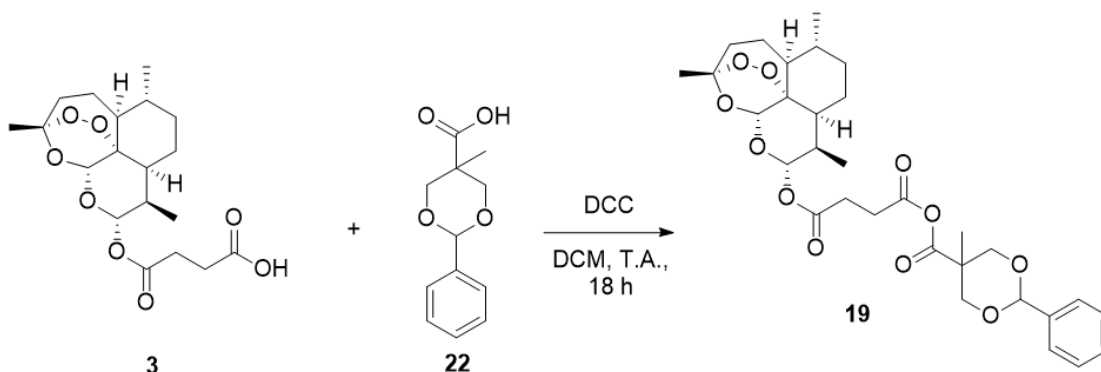


Figura 50: ampliação das regiões com sinais excedentes nos espectros de RMN do artesunato. **A** corresponde à região do espectro de ^1H como multiplete excedente em 2,67-2,71 ppm. **B** corresponde à região do espectro de ^{13}C com o sinal de ácido succínico em 173,15 ppm. **C** corresponde à região do espectro de ^{13}C com sinal excedente em 28,73 ppm.

Assim como o obtido por Presser, Feichtinger e Buzzi (2016), apenas um epímero foi constatado nos espectros de RMN. Em função da constante de acoplamento elevada ($J = 9,8$ Hz) para o dubleto em 5,75 ppm correspondente ao H12, conclui-se que este hidrogênio está na posição axial e, portanto, o grupo referente ao ácido succínico está em posição equatorial, o que corresponde ao epímero α . A razão para a formação exclusiva deste isômero se deve, provavelmente, ao fato de que a hidroxila equatorial da DHA α possui menor impedimento estérico para a reação com o anidrido succínico (PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016).

Apesar da presença da impureza identificada, considerou-se a síntese bem-sucedida, com base no resultado da RMN de ^{13}C e ^1H , sendo que os dados obtidos se encontram de acordo com o publicado previamente (PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016). O artesunato foi utilizado na etapa seguinte (formação de anidrido de *Bis*MPAP e artesunato) sem uma etapa extra de purificação para retirada do ácido succínico remanescente. Optou-se por esse procedimento, pois, ao serem realizadas CCDs com o uso de diferentes fases móveis (foram testadas combinações de acetato de etila, hexano e DCM), apenas uma mancha foi observada e, assim, não foi obtido um bom sistema de solventes para a realização de uma cromatografia em coluna de sílica.

4.3.3. Síntese de anidrido de artesunato e *Bis*MPAP



Esquema 10: Reação de formação do anidrido de artesunato e *Bis*MPAP.

Para a síntese do anidrido de artesunato e *Bis*MPAP, utilizou-se uma adaptação do protocolo descrito por Santos (2016), o qual utiliza DCC como agente condensante e DCM como solvente. Após 18 h de reação, notou-se que as CCDs de acompanhamento não apresentavam mais mudanças em seu padrão de manchas e a reação foi retirada, apesar de ainda haver material de partida presente. Assim, para a purificação do produto formado, realizou-se uma purificação por cromatografia em coluna de sílica. Imediatamente após esse procedimento, as frações coletadas tiveram seu solvente removido por pressão reduzida e aquecimento (40 °C).

No dia seguinte à purificação, foi constatada por CCD a degradação do material obtido. Sugeriu-se, então, que o produto apresenta instabilidade, o que inviabilizaria seu uso para a construção dos dendrímeros propostos ou para estudos seguintes de atividade antimalárica. A instabilidade pode ser resultado da função anidrido carboxílico formada. Essa função é reativa, pois carboxilatos são bons grupos de partida (VOLLHARDT, SHORE, 2007) e a ligação do anidrido pode, então, ser facilmente clivada, gerando o material de partida. Além disso, é possível que o anidrido tenha reagido com o MeOH (um dos eluentes da cromatografia empregada para a purificação) durante o processo de remoção do solvente, uma vez que anidridos são comumente utilizados para a síntese de ésteres a partir de álcoois (VOLLHARDT,

SHORE, 2007). Nesse caso, seriam formados os ésteres metílicos dos ácidos que compõem o anidrido (Figura 51).

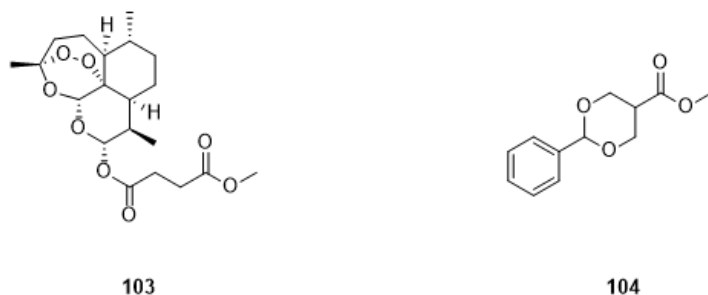
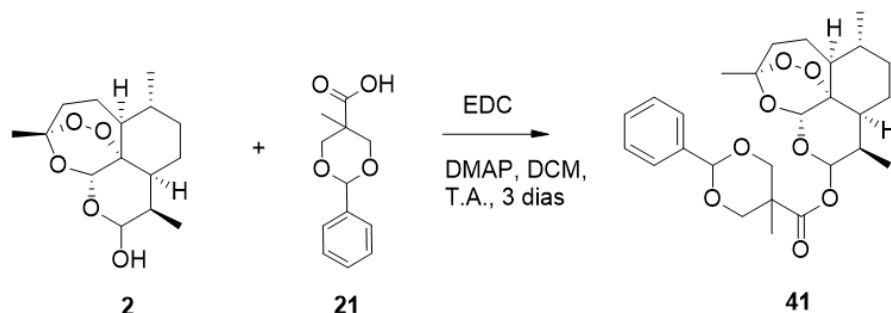


Figura 51: possíveis subprodutos formados durante a remoção do solvente das frações obtidas após purificação por cromatografia em camada de sílica.

Propôs-se, então, realizar uma reação de esterificação do *BisMPAP* diretamente à DHA, o que eliminaria uma etapa de síntese para a obtenção do artesunato. Isso simplifica as etapas sintéticas e diminui perdas em função dos rendimentos. Além disso, a DHA apresenta elevada atividade contra malária (CHOTSIRI et al., 2019) e, portanto, também é molécula que pode ser utilizada para os fins propostos neste trabalho.

4.3.4. Esterificação de *BisMPAP* e DHA - síntese de *DHABP*



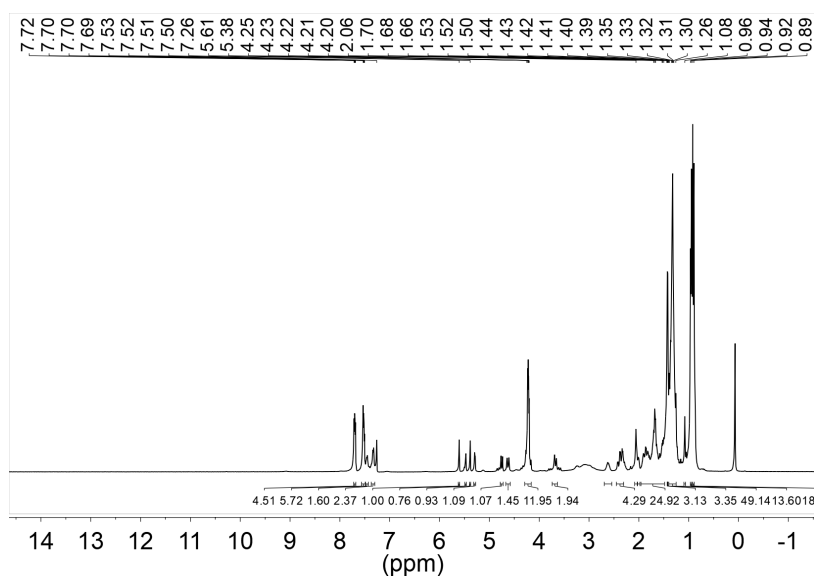
Esquema 11: reação de esterificação de DHA e *BisMPAP* utilizando-se EDC como agente condensante.

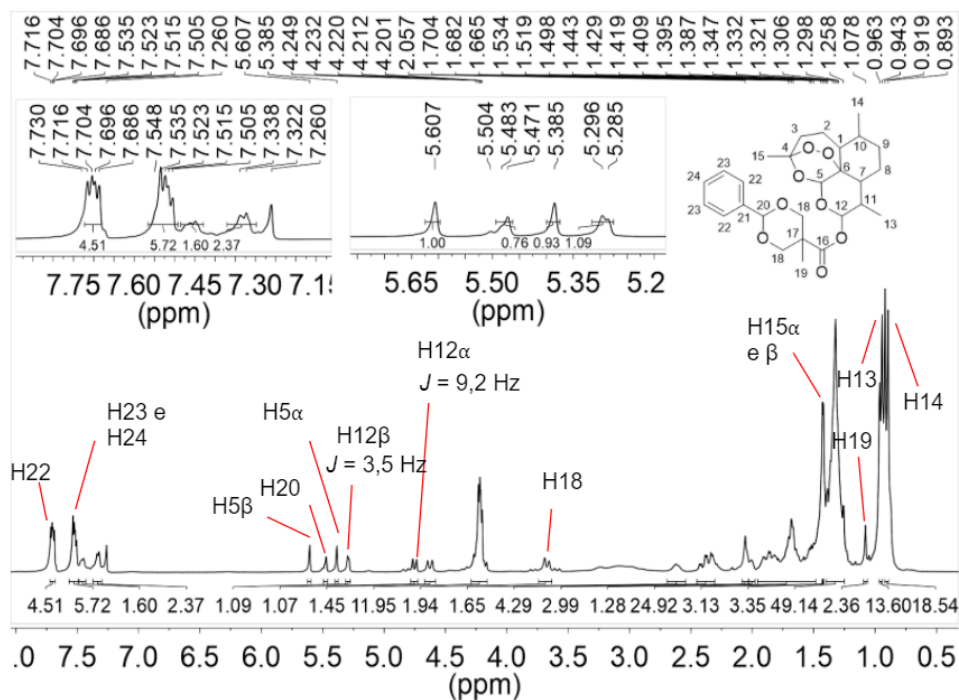
Em função da instabilidade do endoperóxido da DHA (HAYNES et al., 2007; PARAPINI et al., 2015; PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016), condições reacionais brandas devem ser empregadas para a sua esterificação com *BisMPAP*. Assim, para que a esterificação ocorra nessas condições, a ativação da carboxila é necessária e pode ser feita pela utilização de um agente condensante como DCC ou pela utilização do anidrido do ácido carboxílico empregado (VOLLHARDT, SHORE, 2007). Como a obtenção do anidrido de *BisMPAP* envolvia uma etapa sintética a mais, optou-se inicialmente pela utilização de um agente condensante para a esterificação em questão. O agente condensante escolhido foi o EDC, pois seu subproduto

reacional (EDU) é facilmente removido em processos de lavagem com H₂O, facilitando o processo de purificação do produto formado (TSAKOS et al., 2015).

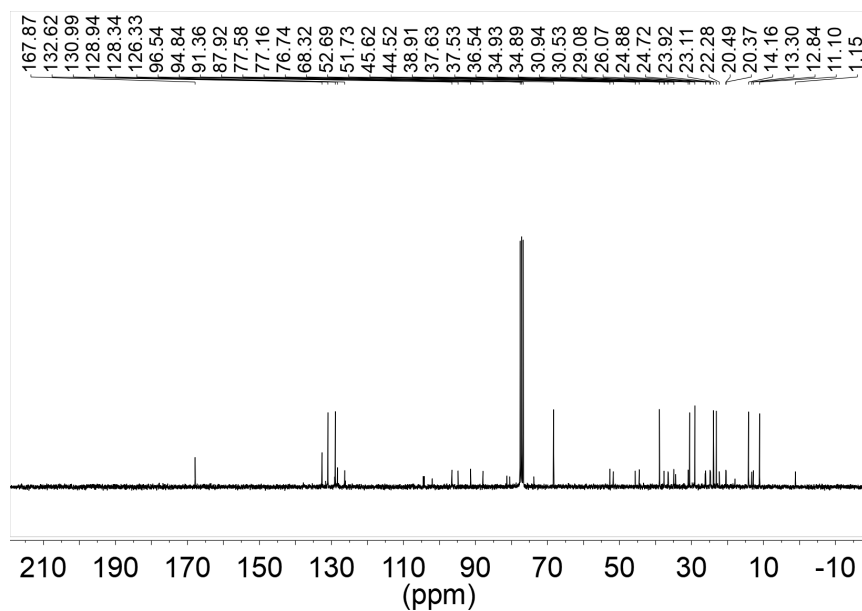
Assim, a síntese foi conduzida utilizando-se DHA e *Bis*MPAP na presença do agente condensante EDC e DMAP como base. A reação procedeu por 3 dias, sendo acompanhada por CCD até não serem notadas mudanças no padrão de manchas. Em seguida, realizou-se a purificação do material obtido por cromatografia em coluna de sílica para a retirada de subprodutos reacionais e resquícios dos materiais de partida, obtendo-se um sólido amorfo e de coloração levemente amarelada.

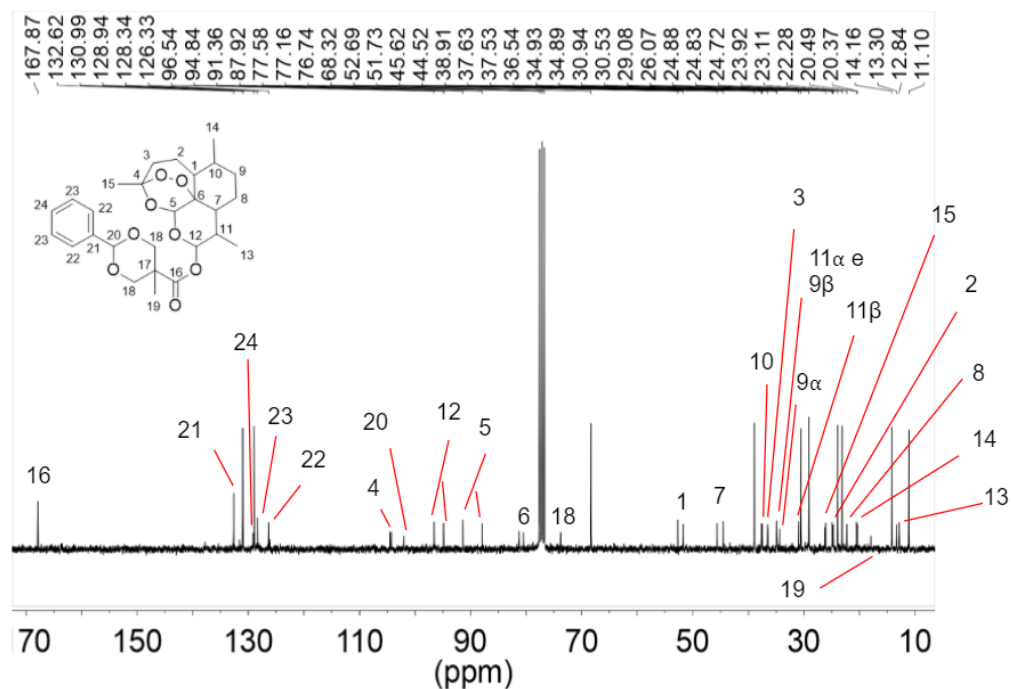
A esterificação de DHA e *Bis*MPAP foi confirmada por RMN de ¹H (Espectro 5a) e ¹³C (Espectro 5b). Foi possível notar a presença de sinais em região aromática no espectro de ¹H (entre 7 e 8 ppm) e ¹³C (entre 120 e 140 ppm), os quais são referentes ao anel benzênico da DHABP, assim como foi possível observar mudança de 178 ppm (*Bis*MPAP) para 167,87 ppm (DHABP) no sinal do carbono carbonílico no espectro de ¹³C. O deslocamento para um campo maior sugere uma carboxila de éster ao invés de ácido carboxílico (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005).





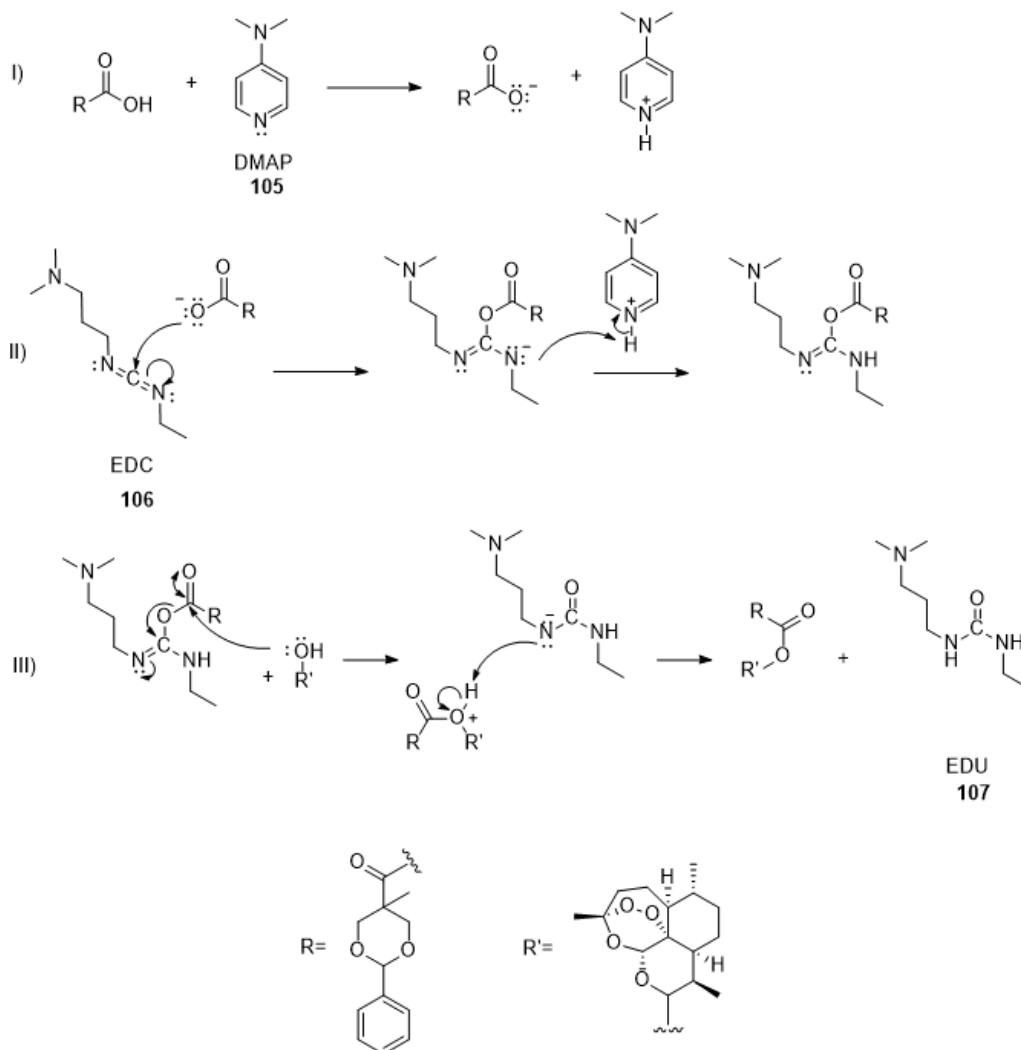
Espectro 5a: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) de DHABP sintetizada com EDC. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números indicam a atribuição dos sinais.





Espectro 5b: espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de DHABP sintetizada com EDC. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números indicam as atribuições dos sinais.

Os espectros de RMN também permitiram observar a presença de impurezas no material. No espectro de ^{13}C , é possível observar um grupo de sinais com intensidade muito superior aos demais: 130,99, 128,94, 68,32, 38,91, 30,53, 29,08, 23,92, 23,11, 14,16, 11,10 ppm. Estes sinais não foram atribuídos à DHABP e provavelmente correspondem a impurezas. Os sinais 14,16, 30,53, 38,91 e 68,32 poderiam corresponder a carbonos de EDU, entretanto são esperados 8 sinais distintos para o EDU no espectro de ^{13}C , sendo um deles um sinal característico de carbonila (referente ao grupo ureia), o que não foi possível observar. Os sinais de carbono aromático 128,94 e 130,99 poderiam ser referentes a carbonos de DMAP, entretanto, faltam sinais característicos ao redor de 150 ppm de anéis piridínicos (FULMER et al., 2010). Assim, não foi possível determinar a impureza com base no subproduto formado (explicitado no Esquema 10) ou materiais de partida.



Esquema 62: processo de esterificação utilizando-se EDC como agente condensante e DMAP como base.

O espectro de ^1H também apresentou sinais que sugerem a presença de impurezas: 7,49-7,43 (m, 2H), 7,37-7,30 (m, 2H), 4,30-4,16 (m, 12H), 1,96-1,48 (m, 25H) 1,40-1,24 (m, 50H). Os sinais em região aromática poderiam corresponder a *Bis*MPAP ainda presente na amostra, porém a única carbonila presente no espectro de ^{13}C não sugere a presença de ácido remanescente. Uma possibilidade seria a presença de resquícios de DMAP, entretanto, o espectro de ^{13}C sugere que este não seria um contaminante. Os sinais em 1,96 - 1,48 ppm (m, 25H), 1,40 - 1,24 ppm (m, 50H) podem ser atribuídos a hidrogênios do produto de interesse, no entanto, a integral obtida estava muito elevada em relação ao esperado. Analogamente, sinais entre 1,00 e 0,85 ppm apresentaram uma integral muito superior ao esperado, apesar de alguns sinais poderem ser oriundos do produto de interesse, como os sinais em 0,95 (d, $J = 6,0$ Hz, 14H, H13) e 0,91 ppm (d, $J = 7,5$ Hz, 19H, H14).

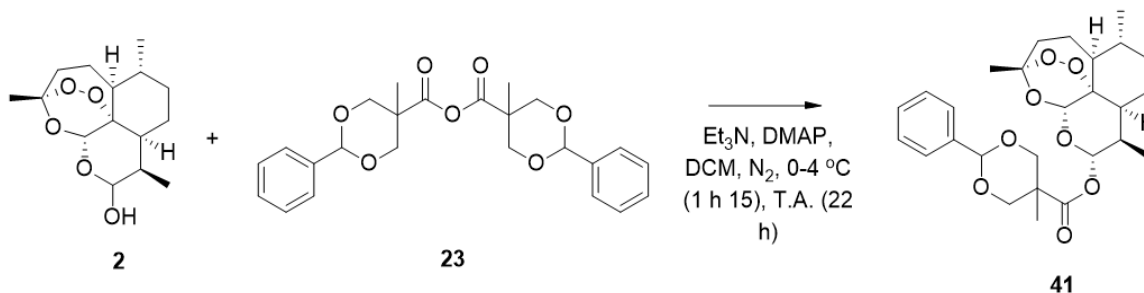
Diferentemente da síntese de artesunato, na síntese de DHABP puderam ser notados sinais referentes aos dois epímeros possíveis do produto (5,61 (s, 1H, H5 β), 5,38 (s, 1H, H5 α), 5,2 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H, H12 β) e 4,75 ppm (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H12 α)). A atribuição dos sinais aos epímeros α e β se deu pela constante de acoplamento para o H12 e pelo deslocamento químico para H5, de maneira análoga ao discutido anteriormente. Assim, apesar de o *Bis*MPAP ser molécula maior do que o anidrido succínico, nas condições aqui apresentadas, isso não impediu a reação do ácido ativado com EDC com o epímero mais estericamente impedido. Acredita-se que o uso do agente condensante na reação possa ter aumentado a reatividade do ácido (*Bis*MPAP) a ponto de permitir a reação mesmo em condições estéricas desfavoráveis com o epímero β . Além disso, a estrutura do EDC é majoritariamente formada por uma cadeia linear de ligações simples, o que confere certa maleabilidade e, portanto, seu volume pode acabar não sendo impeditivo para a reação com a hidroxila na posição axial.

Por fim, o solvente empregado nessa reação (DCM) difere daquele empregado na síntese de artesunato (AcOEt). Não foi avaliada a proporção entre os epímeros em AcOEt (PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016), sendo que este solvente poderia favorecer o epímero α da DHA (como ocorre em MeCN/H₂O (PRESSER, FEICHTINGER, BUZZI, 2016)), resultando no artesunato α . Em DCM a proporção 1:1 entre os epímeros pode ter auxiliado na obtenção de ambos isômeros.

Pode-se concluir, também, que o processo de purificação da amostra não foi adequado, pois, apesar das evidências sugerindo a formação do produto, diversas integrais se mostraram inconsistentes com o que deveria ter sido obtido, o que sugere uma amostra com muitas impurezas, apesar de a CCD indicar apenas um material. Nesse sentido, as próximas tentativas de purificação do produto serão feitas com melhor controle dos materiais empregados.

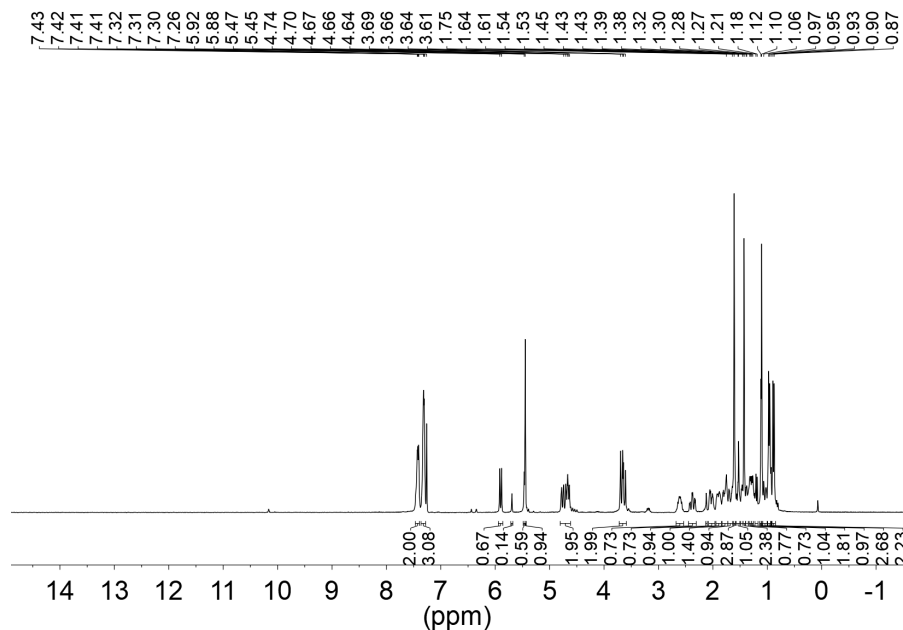
Outras tentativas para sintetizar mais material não foram bem-sucedidas, mesmo empregando-se o mesmo protocolo. Em uma das repetições da síntese, notou-se, por CCD, que pouco produto havia sido formado e, portanto, deixou-se a reação prosseguir ao longo de uma semana. Entretanto, mesmo com o maior tempo de reação, as CCDs de acompanhamento indicaram que pouco produto havia sido formado. Nesse caso, não foi possível isolar DHABP por cromatografia *flash* e, assim, decidiu-se optar pela utilização de anidrido de *Bis*MPAP ao invés do ácido para a obtenção do produto.

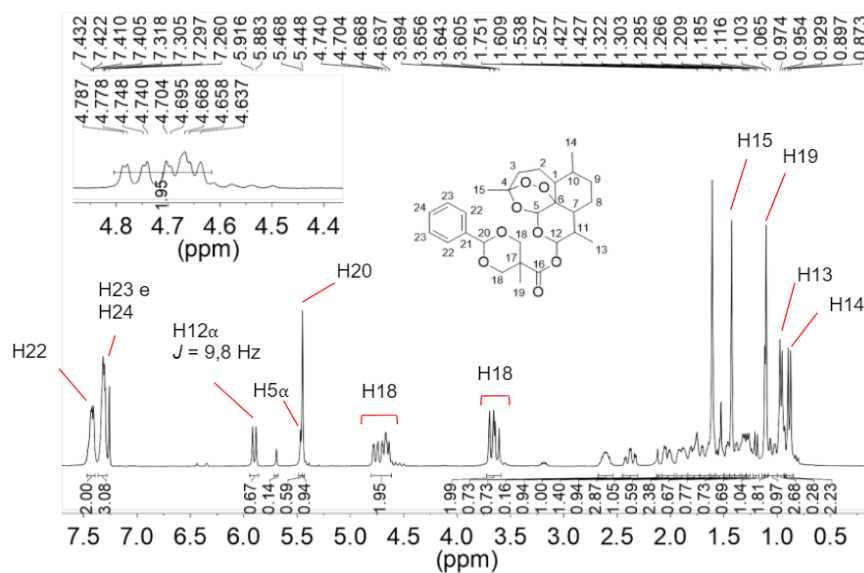
Em razão da dificuldade de repetição da síntese de DHABP com EDC, realizou-se busca na literatura e encontrou-se a esterificação de derivados de artemisinina a partir de anidridos e cloretos de diferentes ácidos (ZUMA et al., 2016). Assim, optou-se pela síntese de DHABP, empregando-se anidrido de *Bis*MPAP como reagente, pois a síntese deste anidrido já havia sido descrita previamente por Santos (2016). Além disso, anidridos têm a vantagem de poder ser armazenados, não necessitando sua utilização imediatamente após sua síntese, como ocorre usualmente com cloretos de ácido (VOLLHARDT, SCHORE, 2007). Desta forma, foi seguido o esquema reacional delimitado no Esquema 12.



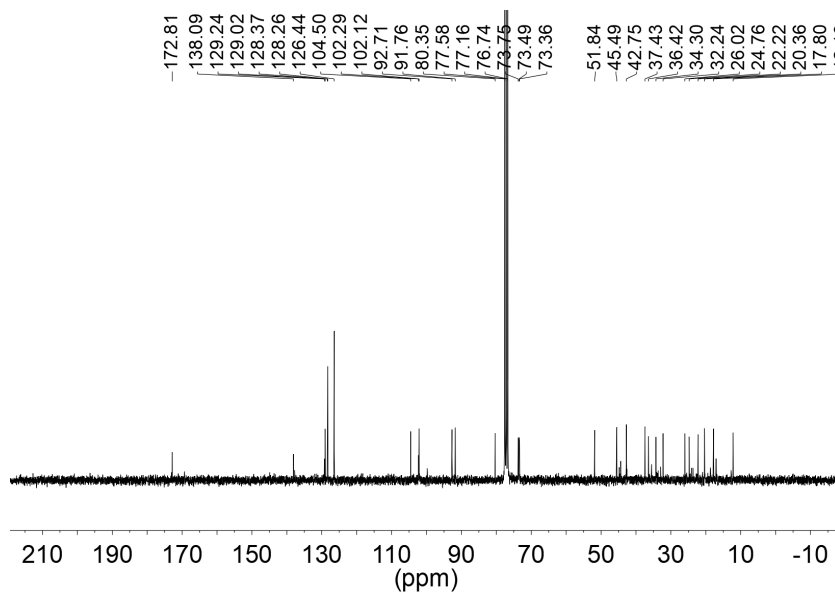
Esquema 12: síntese de DHABP a partir de DHA e anidrido de *Bis*MPAP

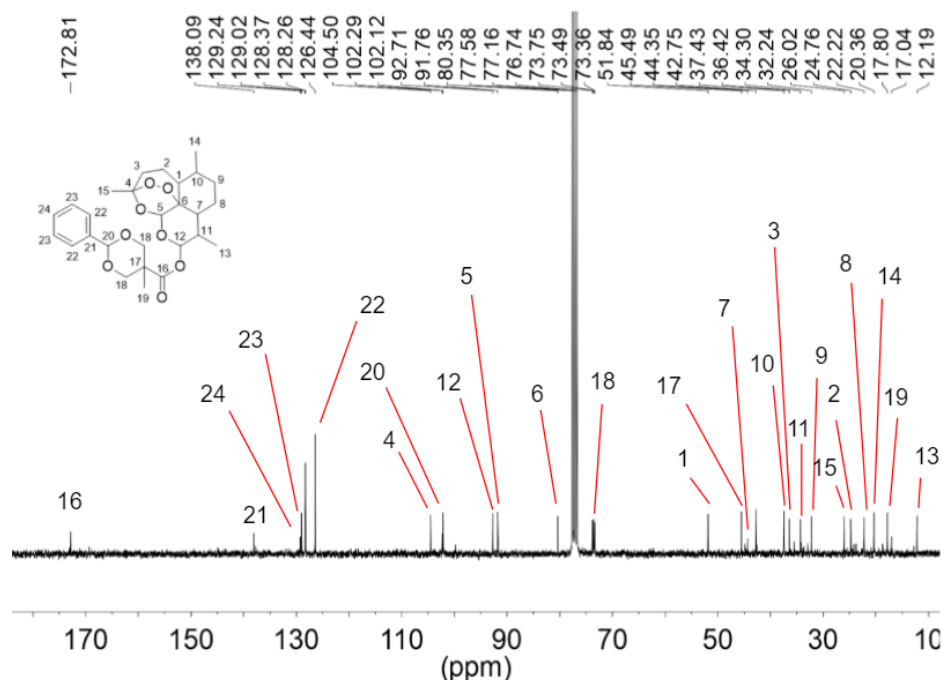
Assim, seguindo-se o protocolo descrito por Zuma e colaboradores (2016), DHA foi adicionada com anidrido de *Bis*MPAP em um balão colocado em banho de gelo e deixou-se a reação prosseguir por 1 h e 15 minutos. Durante o período, a reação foi acompanhada por CCD e notou-se que a DHA não havia sido completamente consumida durante o período. Assim, diferentemente do protocolo de Zuma e colaboradores (2016), retirou-se a reação do banho de gelo, prosseguindo-se por mais 22 h em temperatura ambiente. Após esse período, ainda foi notada DHA nas CCDs de acompanhamento, porém a reação foi retirada. Em reações em maior escala, deixou-se a reação prosseguir em temperatura ambiente por 2 dias após o período em banho de gelo, mas mesmo com o tempo estendido de reação, o consumo de DHA não foi total. Ao final de reação, realizou-se purificação por cromatografia em camada de sílica, obtendo-se o produto de interesse com rendimento não elevado (30%).





Espectro 6a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da DHABP sintetizada com anidrido de *Bis*MPAP. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números indicam a atribuição dos sinais.



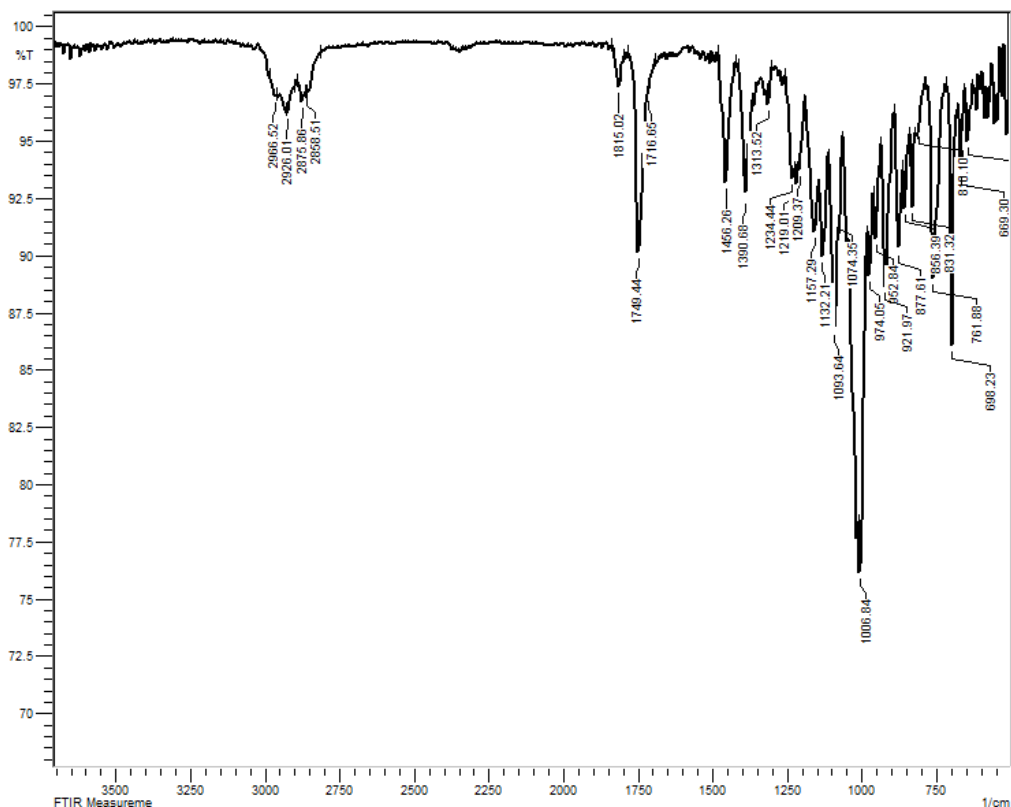


Espectro 6b: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da DHABP sintetizada com anidrido de *Bis*MPAP. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Através do espectro de ^{13}C (Espectro 6b) é possível ver sinais referentes ao *Bis*MPA, além de sinais referentes à DHA. Ressalta-se a presença dos sinais aromáticos em 138,09, 129,24, 129,02, 126,44 ppm referentes ao grupo benzênico da molécula. Também ressalta-se a presença dos sinais em 26,02, 20,36, 17,80 e 12,19 ppm referentes às metilas da DHA e do *Bis*MPAP. Tal fato, associado a um único sinal (172,81 ppm) na região de carbonilas de ésteres ou anidridos, sugere a formação do produto de interesse.

No espectro de ^1H RMN (Espectro 6a), destacam-se os sinais em região aromática (entre 7 e 8 ppm), oriundos do grupo protetor do *Bis*MPAP, e os sinais abaixo de 2 ppm, oriundos dos anéis não aromáticos da DHA. Destacam-se os sinais em 5,90 (d, $J = 9,8$ Hz), 5,47 ppm (s) referentes aos H12 e H5, respectivamente, e os sinais em 1,43 (s), 1,10 (s), 0,96 (d, $J = 6,0$) e 0,89 ppm (d, $J = 7,2$ Hz) referentes às metilas da molécula e facilmente identificáveis na região acima de 2 ppm, onde há uma grande sobreposição de sinais. Assim, os espectros de ^{13}C e ^1H confirmam a obtenção do produto de interesse.

Já no espectro de IV, é possível notar um sinal em 1749 cm^{-1} , indicativo de uma carbonila, apesar de sua baixa intensidade observada. Também foi possível observar o desaparecimento do sinal de hidroxila em 3375 cm^{-1} da DHA. Ambos os dados confirmam a esterificação entre a DHA e o anidrido de *Bis*MPAP.



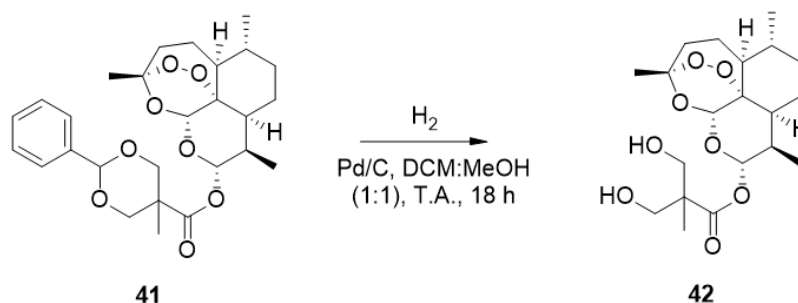
Espectro 6c: espectro de IV da DHABP sintetizada com anidrido de *Bis*MPAP.

Além disso, no espectro de ^1H , observou-se apenas um sinal para o H12 e um para o H5, o que sugere a formação de apenas um epímero. Em função da constante de acoplamento de 9,8 Hz para o H12, fica evidente a formação do epímero α , assim como observado na síntese de artesunato. Desta forma, em sínteses em que anidrido foi usado como material de partida para a obtenção de derivados de artemisinina, observou-se presença de apenas um epímero, o que está de acordo com o discutido por Buzzi, Presser e Feichtinger (2016). Enquanto isso, na síntese com agente condensante para obtenção de derivados de artemisinina, observou-se a presença de dois epímeros.

Dessa forma, a hipótese de que o solvente teve influência na obtenção de ambos os epímeros na síntese de DHABP com EDC pode ser descartada, uma vez que ambas as metodologias empregadas para a obtenção de DHABP, seja com EDC ou com anidrido de *Bis*MPAP, utilizaram DCM. Assim, as hipóteses de que o EDC aumente a reatividade do *Bis*MPAP e seja suficientemente maleável para permitir a reação com a hidroxila da DHA \square parecem as mais adequadas para os resultados obtidos. Entretanto, a síntese com EDC deve ser tentada novamente, de modo a repeti-la com sucesso e permitir a confirmação dos resultados obtidos.

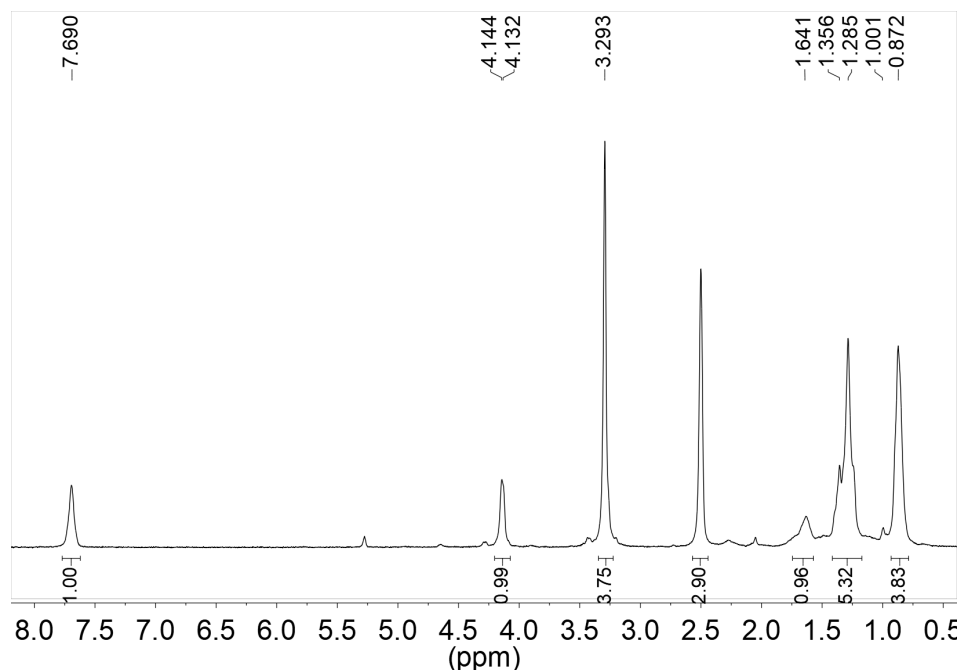
De qualquer forma, a síntese com anidrido de *Bis*MPAP levou ao produto desejado com rendimento de 30%, sendo uma alternativa viável para a obtenção de DHABP, quando comparada à síntese com EDC.

4.3.5. Desproteção de DHABP por hidrogenação catalítica



Esquema 13: Reação de hidrogenação catalítica de DHABP para desproteção das hidroxilas.

A desproteção da DHABP obtida a partir da síntese com EDC foi tentada utilizando-se hidrogenação com Pd/C como catalisador. Tal protocolo já havia sido executado com sucesso previamente por outros integrantes do laboratório (SANTOS, 2016) e é uma alternativa usual na síntese de dendrímeros de *Bis*MPAP (CARLMARK, MALMSTRÖM, MALKOCH, 2013). Assim, o protocolo de Santos (2016) foi seguido, porém foi sem sucesso. A análise do espectro de RMN de ^1H (Espectro 7) do produto obtido indicava os mesmos sinais aromáticos entre 7 e 8 ppm da DHABP, sugerindo que o grupo protetor continuava presente na molécula. Dessa forma, o material recolhido da síntese foi recuperado e uma nova tentativa de desproteção repetindo-se o protocolo de Santos (2016) foi realizada. Após a obtenção do produto da segunda tentativa de desproteção, notou-se que o espectro de RMN de ^1H possui um padrão de sinais na região entre 0,5 e 3,0 ppm, que não se assemelhava ao espectro da DHABP ou DHA, sugerindo modificações estruturais nos anéis não aromáticos da molécula. Ressalta-se, ainda, a presença de apenas um sinal na região entre 4,5 e 6,0 ppm, onde se encontram os sinais dos H5 e H12 e a presença de um sinal em região aromática (7,69 ppm). Assim, assumiu-se a ocorrência de uma possível degradação da DHABP.



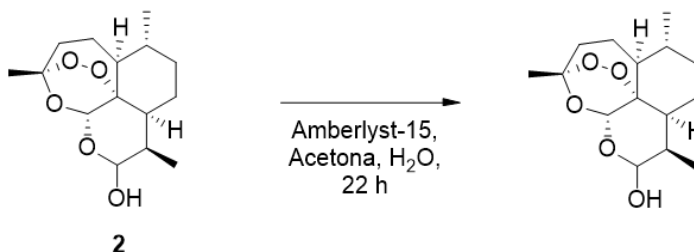
Espectro 7: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-D_6) do obtido com a tentativa de desproteção da DHABP por hidrogenação catalítica.

Uma busca na literatura foi realizada para melhor compreensão de possíveis condições reacionais para a desproteção da DHABP. Informações conflitantes foram encontradas, sendo que um artigo indicava a síntese de DHA a partir de artemisinina empregando-se Pd/C e H_2 para a redução da carbonila (KRISTIANI, PERTIWI e ADILINA, 2017), o que indica estabilidade química do endoperóxido frente ao catalisador metálico. Outra referência indicava a degradação do endoperóxido na presença de Pd/C (GUOQIAO et al., 2018). Entretanto, analisando melhor o artigo de Kristiani, Pertiwi e Adilina (2017), notou-se que os rendimentos obtidos foram menores do que 1%, sugerindo que uma quantidade significativa de degradação ocorreu.

Em razão desse fato, o uso de hidrogenação catalítica com catalisadores metálicos foi descartado para a desproteção da DHABP.

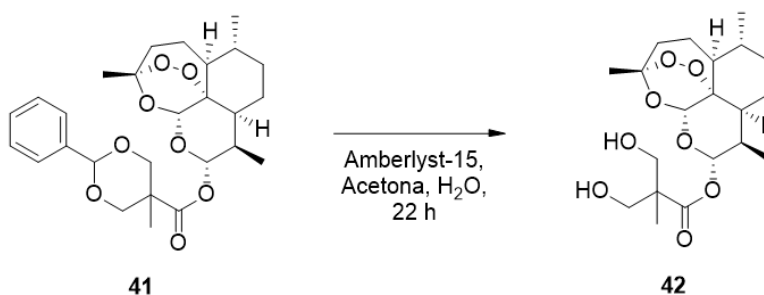
4.3.6. Desproteção de DHABP por hidrólise catalisada por Amberlyst-15

Em uma busca por métodos alternativos para a desproteção de DHABP, chegou-se na possibilidade de utilização de Amberlyst-15, uma vez que um protocolo para sua utilização na desproteção de BisMPAP esterificado com o fármaco rosuvastatina estava disponível (SANCHES, 2019). Nessa alternativa sintética, uma hidrólise do O,O-acetal é realizada utilizando-se a resina ácida Amberlyst-15 como catalisadora do processo e metanol ou acetona aquosos como solventes (COPPOLA, 1985). Dessa forma, uma avaliação da estabilidade da DHA nas condições experimentais descritas em 3.3.8 e ilustrada no Esquema 13 foi conduzida.



Esquema 63: representação do teste de estabilidade de DHA frente à resina ácida Amberlyst e em condições experimentais que permitiriam a hidrólise de *O,O*-acetais.

Após o período de teste, a DHA utilizada foi recuperada inalterada, demonstrando sua estabilidade nas condições propostas. Assim, essa rota foi escolhida para uma nova tentativa de desproteção de DHABP.



Esquema 14: hidrólise do *O,O*-acetal da DHABP.

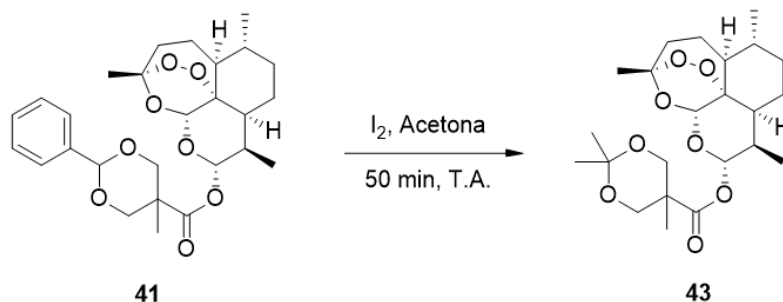
O protocolo de Coppola e colaboradores (1985) para hidrólise de *O,O*-acetais foi utilizado para a desproteção da DHABP obtida a partir da síntese com anidrido de *Bis*MPAP. Ressalta-se que no ensaio teste com DHA, notou-se que a resina, por vezes, desintegrava. Assim, optou-se pela utilização de agitação lenta, a qual se mostrou suficiente para manter a integridade física do Amberlyst-15.

A reação foi acompanhada por CCD a cada hora nas primeiras 5 horas de reação. Inicialmente, foi notado o aparecimento de mancha de $R_f = 0,21$, a qual não correspondia ao material de partida ou DHA. Essa mancha possuía intensidade muito baixa, mas sugeria a formação de produto de interesse. Entretanto, com o passar do tempo, essa mancha não teve sua intensidade aumentada, enquanto uma mancha correspondente a DHA surgiu e passou a aumentar de intensidade. Optou-se por manter a reação *overnight* para maior consumo do material de partida e eventual formação de produto em quantidade suficiente para prosseguir com a purificação. Entretanto, a CCD final indicava apenas uma grande quantidade de DHA. Assim, diferentemente do obtido por Sanches (2019), a ligação éster foi a principal ligação hidrolisada na tentativa de desproteção da DHABP. O resultado negativo pode ser explicado pelo fato de ligações do tipo éster também serem passíveis de hidrólise na presença de ácidos

(VOLLHARDT, SCHORE, 2007). Concluiu-se, portanto, que a ligação éster da DHABP é mais sensível à hidrólise ácida do que seu acetal.

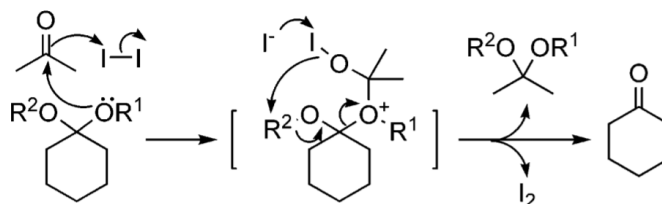
Dessa forma, alternativas foram buscadas na literatura.

4.3.7. Transacetalização da DHABP utilizando-se I_2 e acetona



Esquema 15: transacetalização da DHABP com acetona na presença de I_2 .

Na busca por formas de se desproteger a molécula, encontrou-se um artigo que reportava a desproteção de grupos acetal utilizando-se I_2 em acetona (SUN et al., 2004). Essa reação desprotege o aldeído ou cetona que gerou o acetal e forma um novo acetal com as hidroxilas, segundo o mecanismo apresentado no Esquema 17.

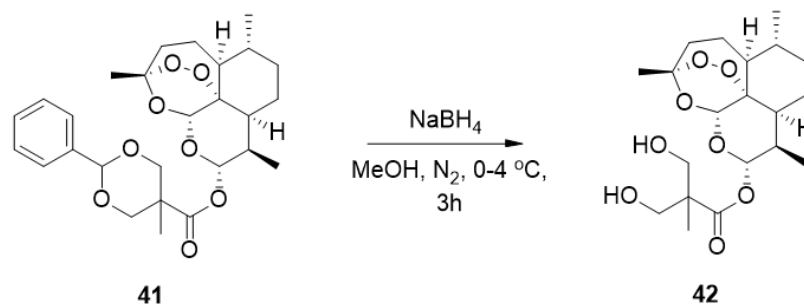


Esquema 64: desproteção de carbonilas acetalizadas utilizando-se iodo molecular e acetona. Fonte: Sun et al., 2004.

Esperava-se a obtenção de um novo acetal, que poderia ser mais lábil do que o anterior, o que permitiria sua desproteção em etapas seguintes ou paralelamente à reação de transacetalização.

Entretanto, o resultado dessa tentativa também foi insatisfatório. Após 50 minutos de reação, notou-se a formação de mancha intensa na CCD correspondente à DHA, além de outras duas manchas muito pouco intensas abaixo daquela. Assim, apesar de potencialmente ter sido formado produto, o rendimento seria muito baixo e isso inviabilizaria o uso dessa reação, pois grandes quantidades de material de partida seriam desperdiçadas no processo.

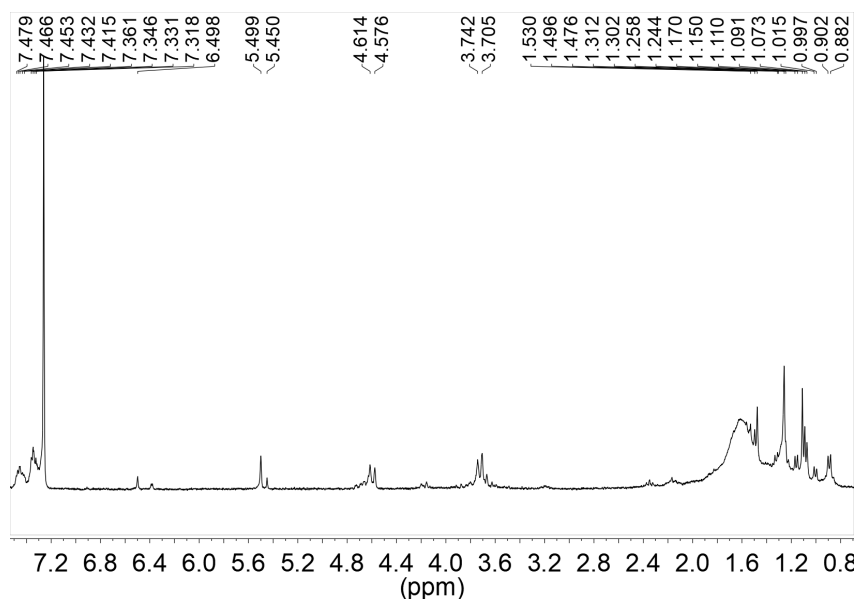
4.3.8. Desproteção de DHABP por redução com $NaBH_4$



Esquema 16: redução do O,O-acetal da DHABP com NaBH_4 .

Dada a estabilidade já conhecida da artemisinina na presença de NaBH_4 , tentou-se realizar a redução do acetal com este agente redutor. Assim, tentou-se um protocolo análogo à redução de artemisinina a DHA. Uma diferença no protocolo consiste na utilização de números de equivalentes molares de NaBH_4 maiores em relação à DHABP, correspondendo a 3 equivalentes de NaBH_4 para cada ligação química a ser reduzida. Este excesso de agente redutor por ligação química está de acordo com excessos testados por Presser, Feichtinger e Buzzi (2016) para a síntese de DHA a partir da artemisinina. Outra diferença foi a exclusão da etapa de lavagem com H_2O do material obtido ao término da reação, pois a presença de grupos polares (carboxila do éster e hidroxilas) poderia fazer com que a molécula de interesse fosse solúvel em água. No lugar dessa etapa, optou-se pela passagem do material recolhido da reação em uma pequena camada de sílica seguida de purificação por cromatografia *flash*.

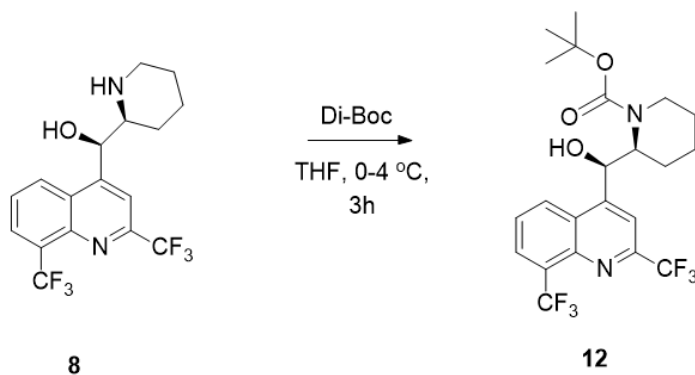
Durante o acompanhamento por CCD da reação, notou-se mancha de R_f menor do que o R_f da DHA e outra mancha correspondente à DHA. Após a purificação por cromatografia em coluna de sílica, duas frações com materiais distintos foram obtidas. Uma das frações coletadas (F2) apresentou um espectro de RMN de ^1H indicando que se tratava de *Bis*MPAP. Já outra fração (F1) mostrou sinais em região aromática (entre 7 e 8 ppm) (espectro 8). Sinais na região entre 1,3 e 2 ppm foram encobertos por um sinal largo, o que dificulta a avaliação estrutural da molécula obtida. Além disso, apesar de 25 mg de material (toda a fração F1 recolhida) terem sido enviados para análise de RMN, a quantidade não foi suficiente para obtenção de um espectro de ^{13}C , sendo observados apenas sinais relativos ao solvente utilizado (CDCl_3) e, portanto, este espectro não auxiliou na elucidação estrutural. Outras formas de proteção das hidroxilas do *Bis*MPA não puderam ser tentadas ao longo do período apresentado neste trabalho.



Espectro 8: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido com a tentativa de desproteção da DHABP utilizando-se NaBH_4 .

4.4. Síntese do dendron de mefloquina

4.4.1. Proteção da amina de mefloquina com di-Boc - síntese de MQB



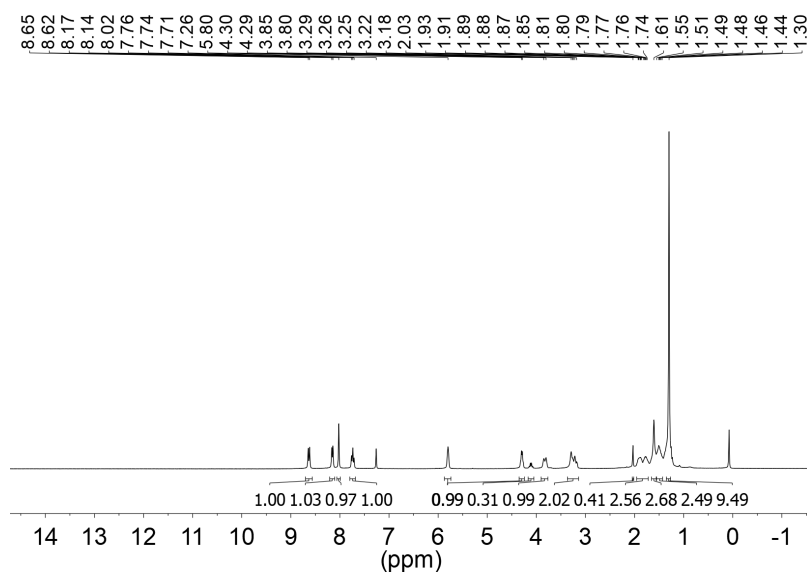
Esquema 17: proteção do grupamento amina da mefloquina.

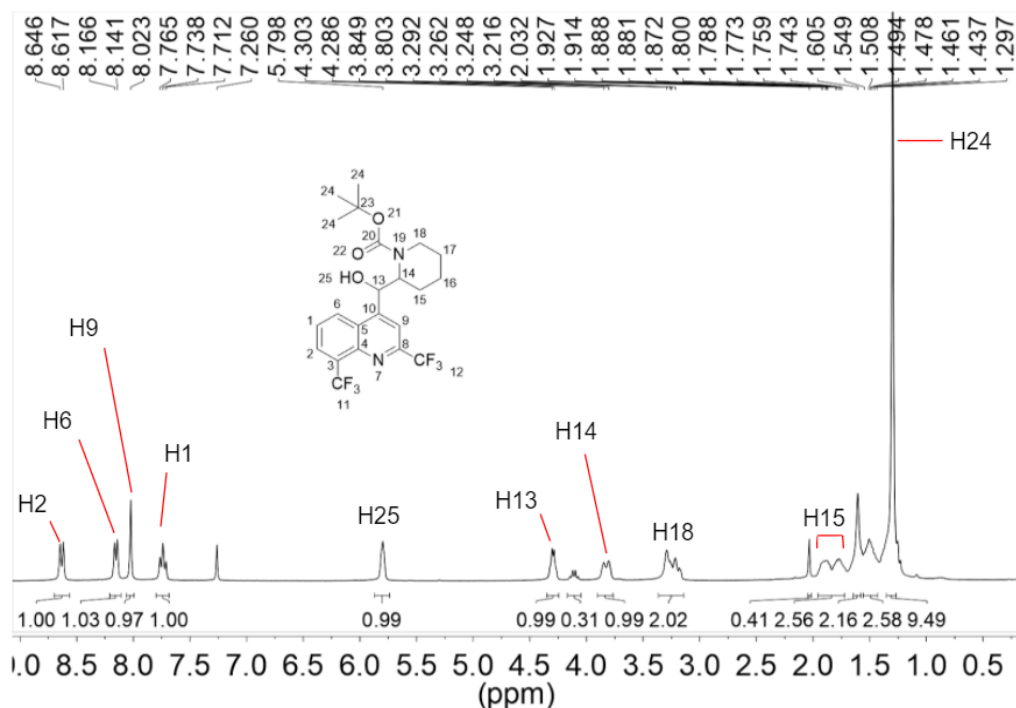
A molécula de mefloquina apresenta dois grupos funcionais de interesse para a síntese de dendrons: um álcool e uma amina, ambos secundários. Esses dois grupos permitem a formação de ligações éster ou amida, as quais podem ser clivadas *in vivo* e são empregadas para a formação de pró-fármacos (KARAMAN, 2013). Levando-se em conta o fato de que esterificações e amidações podem ocorrer em condições reacionais semelhantes, é interessante proteger um dos grupos da mefloquina. Isso evita que reações paralelas ocorram e favorece a obtenção de um único produto. Dessa forma, optou-se pela proteção inicial do grupamento amina da MQ com di-Boc, utilizando-se um protocolo já descrito previamente por

Grellepois e colaboradores (2005), para obtenção de MQB, a qual poderia ser empregada em etapas subsequentes de síntese do dendrons propostos.

Assim, a proteção de mefloquina com di-Boc foi realizada ao longo de 3 h em banho de gelo e utilizando-se THF como solvente. A reação foi acompanhada por CCD e após o período indicado no protocolo de Grellepois e colaboradores (2005), observou-se que material de partida ainda persistia no meio reacional. Assim, após retirada da reação, foi realizada purificação por cromatografia em coluna de sílica, obtendo-se MQB com rendimento ao redor de 90%, sendo este um resultado bastante satisfatório para a etapa inicial de uma rota sintética, uma vez que pouco fármaco é perdido no processo.

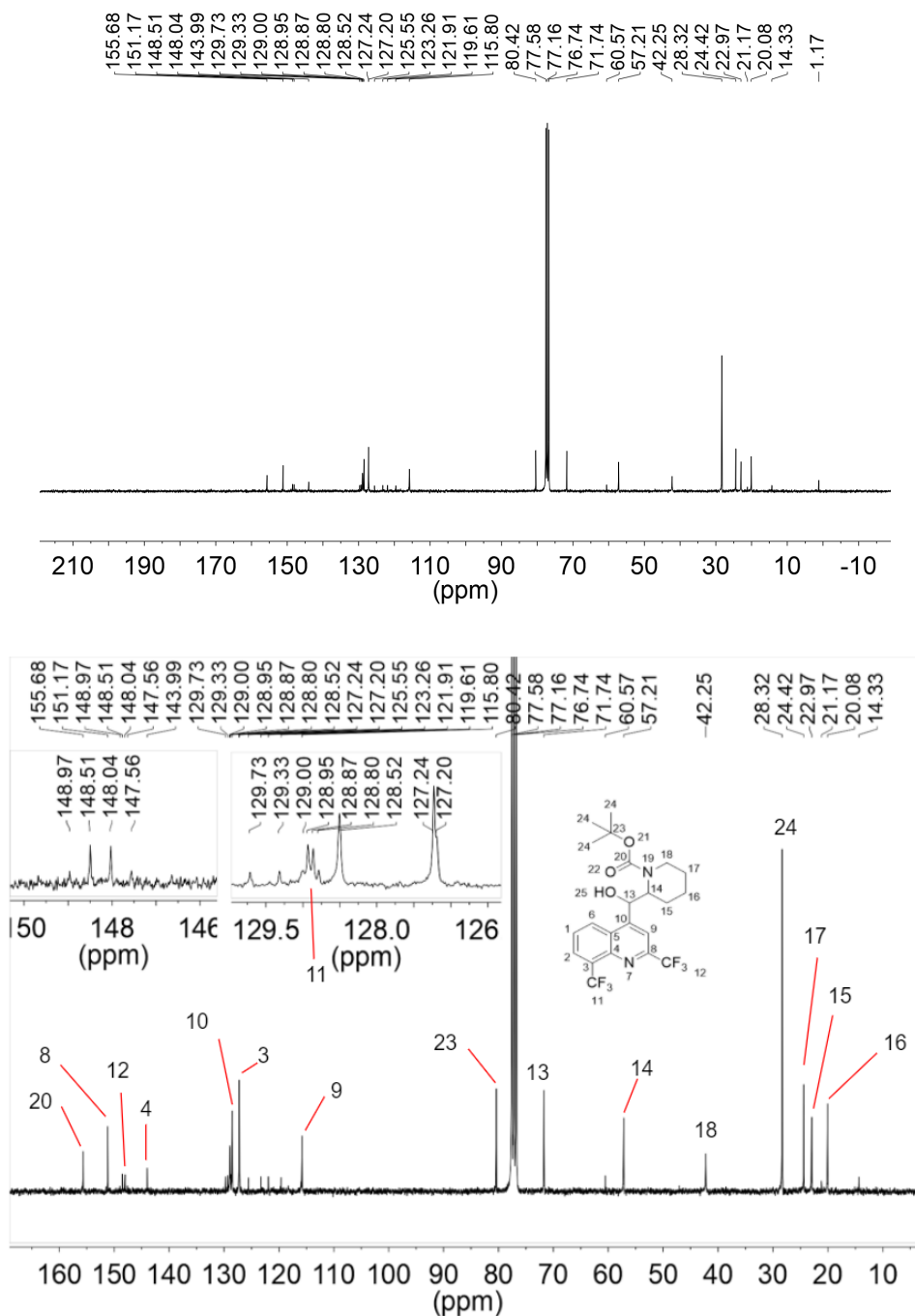
O espectro de RMN de ^1H (Espectro 9a) encontra-se condizente com o obtido por Grellepois e colaboradores (2005). Destaca-se o sinal em 1,30 ppm (s) com integral para 9 hidrogênios referentes aos H24 do grupo *t*-butila, confirmando a presença deste grupo na molécula obtida. Além disso, os sinais em 8,63 (d, $J = 8,7$ Hz), 8,15 (d, $J = 7,2$ Hz), 8,02 (s) e 7,74 ppm (t, $J = 7,8$ Hz) com integral para 1 H confirmam o núcleo quinolínic, enquanto que os sinais acima de 2,1 ppm confirmam o anel não aromático da MQB.





Espectro 9a: espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de MQB. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

O resultado do RMN de ^{13}C (Espectro 9b) da amostra também está em concordância com o artigo de referência. O sinal em 155 ppm, o qual não está presente no espectro de ^{13}C da mefloquina e é indicativo de um carbamato, confirma o produto. Além disso, os sinais em 24,42 e 80,42 ppm indicam a presença dos carbonos 24 e 23, respectivamente. Os sinais em 148,97, 148,50, 148,04 e 147,56 ppm foram considerados como acoplados e pertencentes ao C12, uma vez que o sinal deste carbono encontra-se nessa região e pode formar um quarteto, como obtido por Grellepois et al. (2005). Isso se deve ao acoplamento ^{13}C - ^{19}F , o qual é visível mesmo em espectros desacoplados de ^{13}C . A elevada constante de acoplamento de 34,5 Hz encontra-se de acordo com o esperado nesse tipo de acoplamento (PAVIA et al., 2009).



Espectro 9b: espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de MQB. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

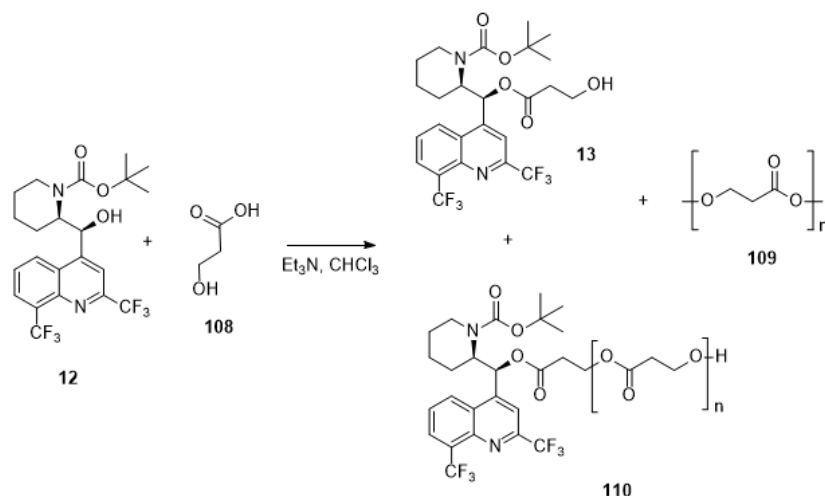
Quanto ao C11, foi possível identificar um quarteto com $J = 5,3$ Hz, o que é uma constante menor do que o esperado (PAVIA et al., 2009), mas que pode ser resultado da resolução obtida. Além disso, o acoplamento entre carbono e flúor pode ser observado mesmo com mais de uma ligação C-C de distância, sendo que a constante de acoplamento é reduzida com o aumento da distância ao F (PAVIA et al., 2009). Assim, seria possível acoplamentos para

os carbonos 3 e 8, o que explica a quantidade maior de sinais na região aromática do que carbonos aromáticos, efetivamente. Entretanto, por uma questão de resolução, provavelmente, não foram observados quartetos bem definidos para outros carbonos.

Desta forma, a molécula MQB foi obtida com sucesso, o que permitiu o prosseguimento da síntese do dendron.

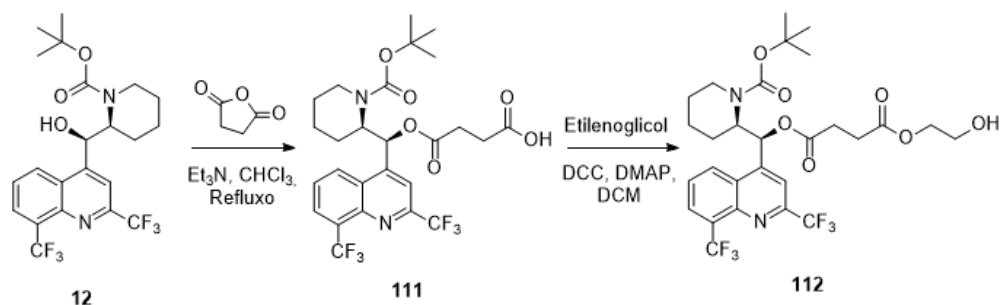
4.4.2. Esterificação de MQB e anidrido succínico - síntese de MQBS

O projeto proposto inicialmente previa a esterificação da MQB com ácido 3-hidroxiopropanóico. Tal reação teria, como objetivo, adicionar um grupo espaçante à MQB para sua ligação posterior ao *Bis*MPAP, para, subseqüentemente, prosseguir com a síntese do dendrímero dirigido. Entretanto, no método proposto ou em uma variação com um agente condensante como DCC ou EDC, havia a possibilidade da polimerização do ácido (molécula 109), além da esterificação de tais polímeros de massas moleculares diversas (dependente do número de monômeros que teriam reagido) à MQB (molécula 110). As reações possíveis encontram-se esquematizadas no Esquema 20. Por essa razão, optou-se por alterar a rota sintética proposta.



Esquema 64: possíveis resultados da reação de esterificação de MQB com ácido 3-hidroxiopropanóico.

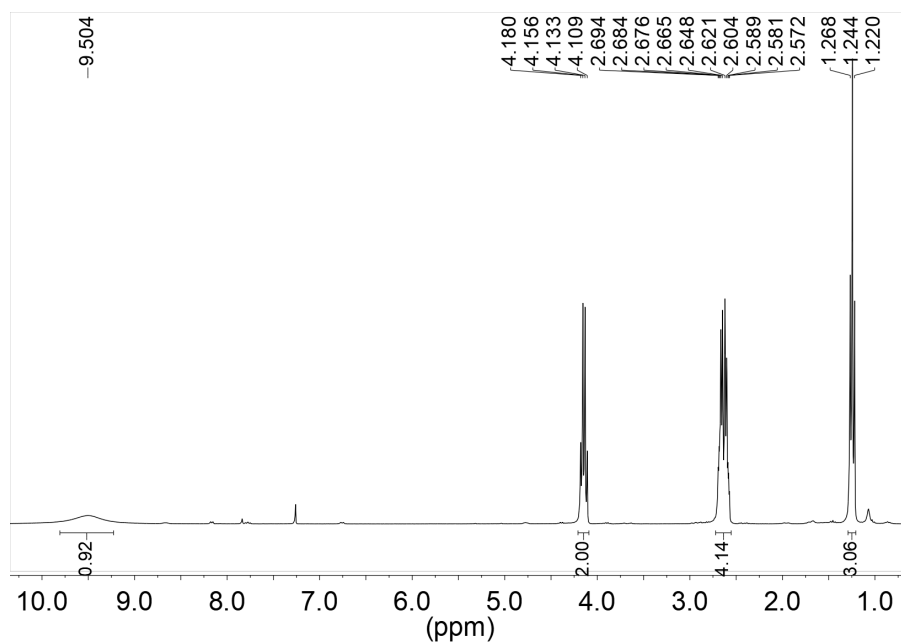
Uma proposta plausível seria esterificar a MQB com anidrido succínico e, em seguida, realizar uma nova esterificação com etano-1,2-diol (etilenoglicol), como representado no Esquema 21. O produto obtido ao final dessas duas etapas teria uma hidroxila livre para ser esterificada com *Bis*MPAP, indo ao encontro da proposta inicial do projeto.



Esquema 65: nova rota proposta para espaçamento da MQB e *Bis*MPAP.

Seguindo-se o raciocínio descrito, a esterificação entre MQB e anidrido foi conduzida nas condições propostas por Grellepois e colaboradores (2005). A reação foi acompanhada por CCD e após um período de 3 dias, procedeu-se com seu *work-up*, apesar de todo o material de partida não ter sido consumido.

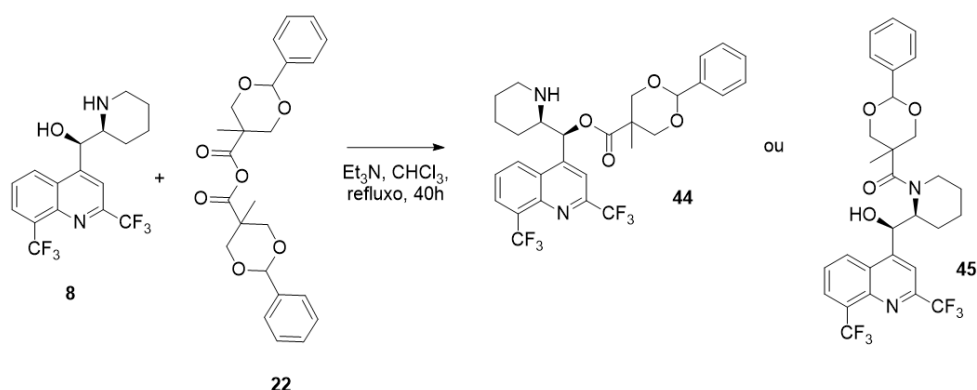
Uma purificação por cromatografia *flash* em coluna de sílica no automatizador Isolera™ Prime foi realizada, utilizando-se MeOH:DCM como fase móvel. Entretanto, obteve-se um óleo amarelado e não um “musgo bege” como relatado por Grellepois e colaboradores (2005). O produto foi encaminhado para análise de ^1H RMN para verificação estrutural. Pela análise do espectro (Espectro 10) obtido, há, predominantemente, material que não poderia corresponder ao produto desejado, aparentando ser um aldeído de cadeia curta, cuja estrutura não pode ser elucidada sem o espectro de ^{13}C ou uma análise elementar. Assim, após repetições do protocolo com resultados muito próximos, a reação não ocorreu como o proposto.



Espectro 10: espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto obtido na tentativa de síntese da molécula 45.

Dessa forma, assim como realizado com a DHA, foi proposta a esterificação direta da MQB ao *BisMPAP*, utilizando-se o anidrido do ácido como reagente.

4.4.3. Esterificação/amidação de mefloquina e *BisMPAP*



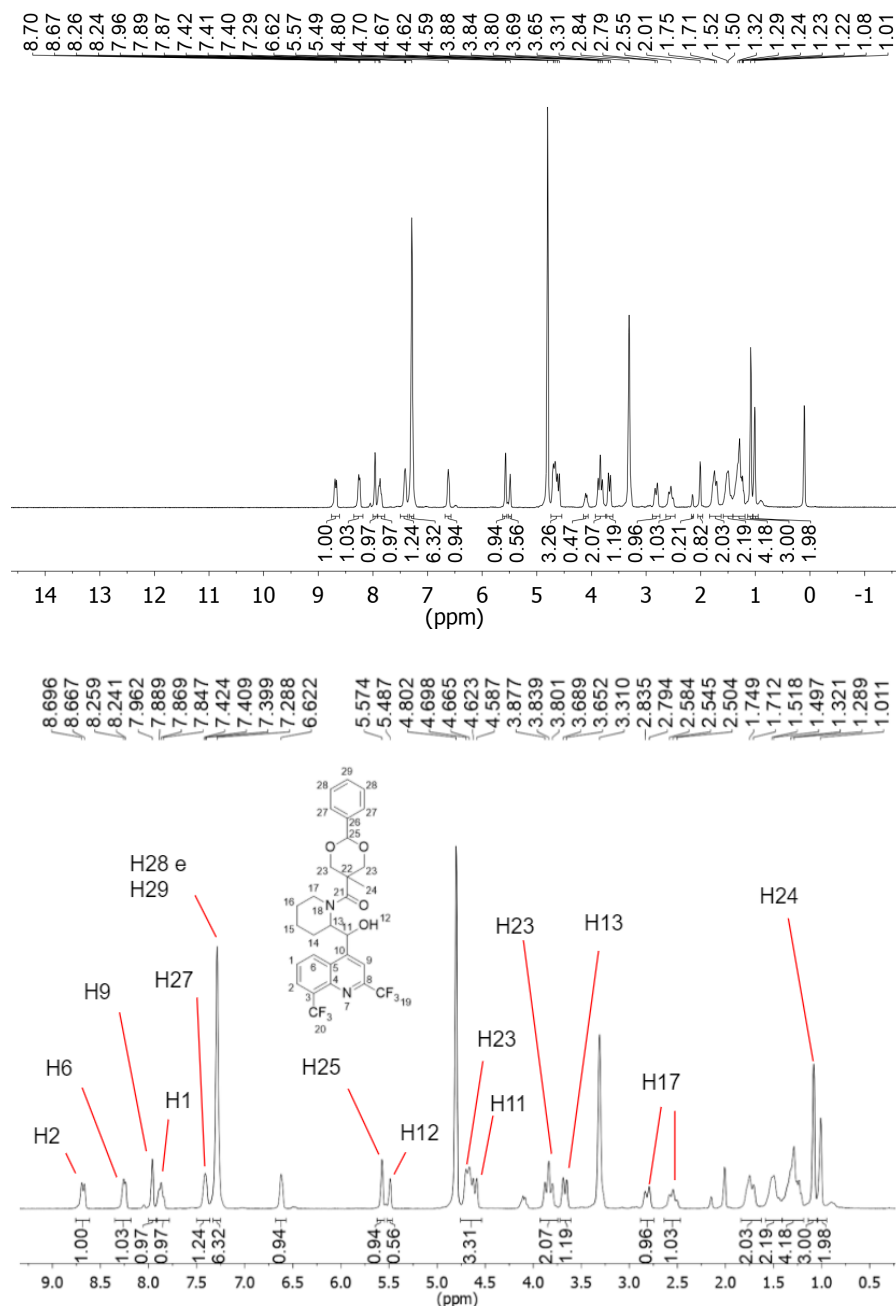
Esquema 19: reação de mefloquina com anidrido de *BisMPAP*.

Nas tentativas de ligação direta da mefloquina ao *BisMPAP*, utilizando-se o anidrido como reagente, optou-se por não mais proteger a amina secundária da mefloquina. Essa decisão foi tomada, pois, segundo o artigo de referência (GRELLEPOIS et al., 2005), durante a desproteção, parte dos ésteres também foram clivados e a amida formada. Assim, os possíveis ganhos de rendimento com a etapa de proteção podem acabar sendo mitigados durante a desproteção. Além disso, como a ligação amida também permite a formação de um pró-fármaco (KARAMAN, 2013) e com o intuito de eliminar mais uma etapa da reação global, a proteção da amida foi descartada.

Assim, a reação foi conduzida seguindo-se as mesmas condições protocoladas por Grellepois e colaboradores (2005), alterando-se o anidrido empregado (foi utilizado anidrido succínico na referência) e utilizando-se mefloquina no lugar da MQB. A reação foi conduzida em tubo selado ao invés de um balão com uma coluna de refluxo, pois o CHCl_3 é um solvente muito volátil e não seria possível uma vedação adequada do sistema utilizando-se as vidrarias disponíveis. Não foram realizadas CCDs de acompanhamento para que o sistema não fosse perturbado, uma vez que isso implicaria na retirada do banho de óleo e espera até resfriamento do tubo. Em função disso, a reação também foi deixada sob refluxo por 2 dias ao invés das 18 h descritas no protocolo de Grellepois e colaboradores (2005). Após a purificação por cromatografia em coluna de sílica, apenas um produto foi isolado.

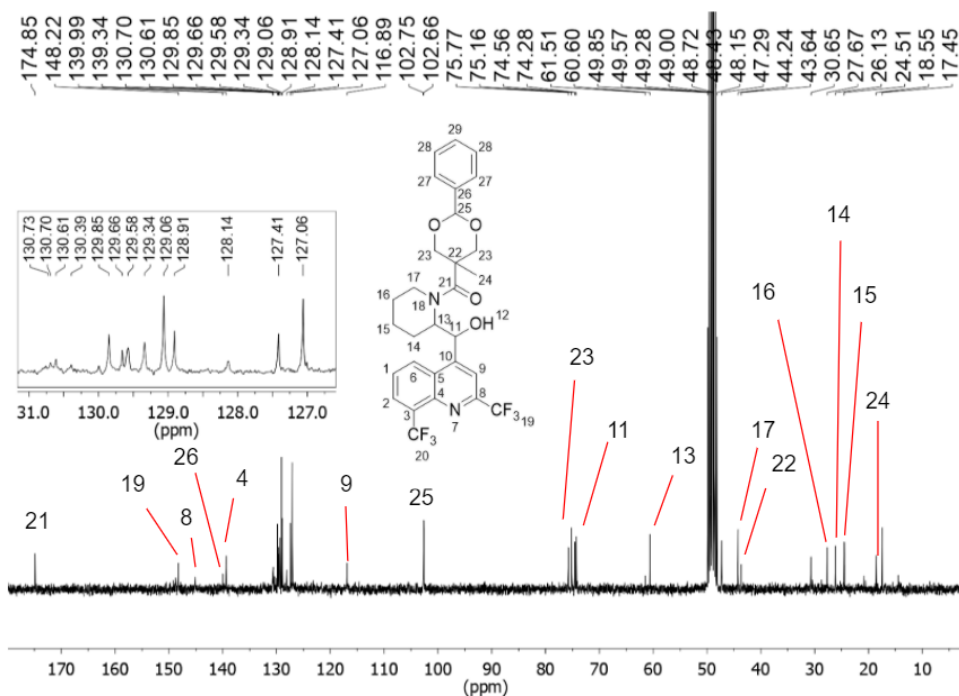
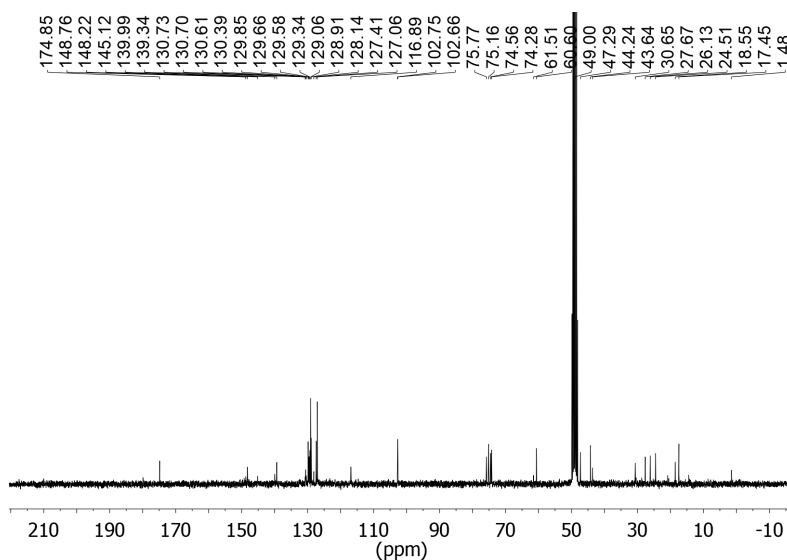
O espectro de ^1H (Espectro 11a) se mostra bastante coerente com o esperado. Os sinais referentes ao anel benzênico do grupo protetor do *BisMPAP* (7,46 - 7,37 ppm (m, 1H), 7,29 ppm (s, 6H)) apresentam particularidades. O sinal em 7,29 ppm resultou em um simpleto

de integral correspondente a 6, enquanto no material de partida o sinal correspondente é um multipeto referente a 3H. Já o multipeto em 7,46-7,37 ppm referente a 1H do produto é um multipeto referente a 2H no material de partida. Apesar disso, a presença desses sinais sugere a formação da molécula de interesse. Também foi possível observar sinais referentes a todos os hidrogênios do anel quinolínico com integral para 1 H, em região abaixo de 7,5 ppm.



Espectro 11a: espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) da MQBP. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

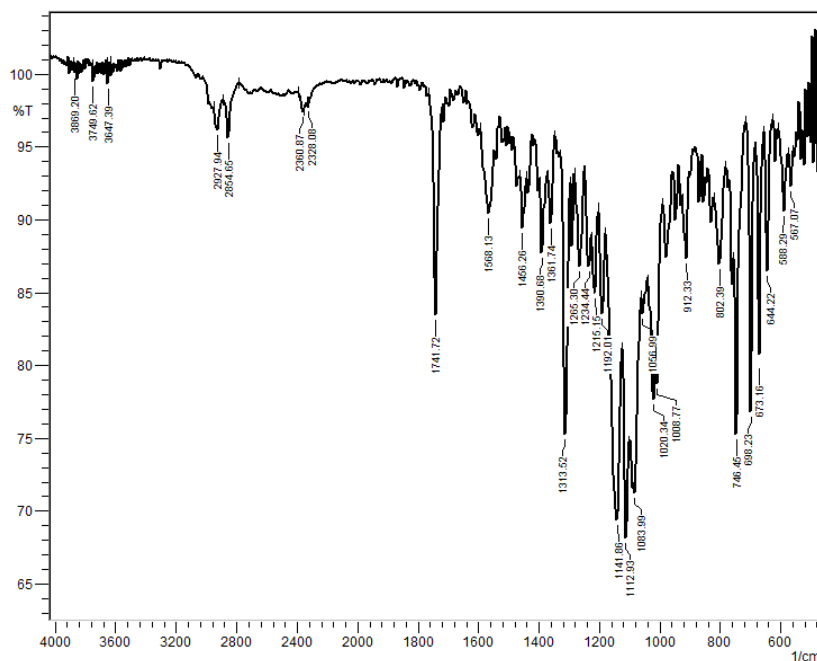
Através da análise do espectro de ^{13}C , é difícil determinar se o produto formado corresponde a um éster ou amida, uma vez que os dois tipos de ligação possuem um deslocamento químico em uma mesma região (PAVIA et al., 2009). Além disso, com a formação de uma amida ou éster, espera-se a mesma multiplicidade dos sinais de H no espectro de ^1H e, portanto, sua análise também não permitiria a diferenciação. Assumiu-se que foi formada a amida em função do longo tempo de reação, o que favorece a formação do produto mais estável (termodinâmico). Acredita-se que não foi formado produto com dupla substituição, dado que o espectro de RMN de ^{13}C aponta para a presença de apenas um tipo de carbonila.



Espectro 11b: espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) da MQBP. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

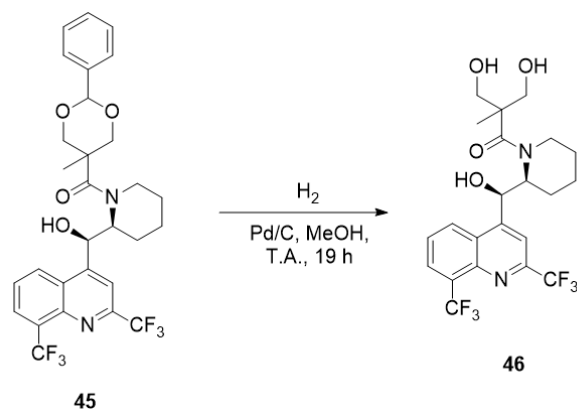
Como mencionado previamente, na análise do espectro de ^{13}C foi possível notar um sinal em 174,85 ppm, o qual indica a formação da ligação éster ou amida. Na região aromática entre 126 e 131 ppm, a análise do espectro de ^{13}C é complexa em função dos diferentes acoplamentos possíveis entre os carbonos do anel quinolínic e o flúor, resultando em diversos sinais que podem se sobrepor. Apesar disso, é possível notar os sinais em 102,75 (C25), 74,56 (C23), 43,64 (C22) e 18,55 ppm (C24), os quais correspondem aos carbonos não aromáticos do BisMPAP. O que reforça a obtenção do produto de interesse.

O espectro de IV da molécula reforça a hipótese de obtenção do produto amídico. No espectro de IV da mefloquina utilizada como material de partida (Espectro 2 na seção 9. Apêndice), é possível observar dois sinais largos acima entre 3500 e 2500 cm^{-1} , sendo o sinal largo em 3361 cm^{-1} condizente ao estiramento N-H da amina secundária e o sinal largo em 2799 cm^{-1} correspondente ao estiramento O-H da hidroxila secundária. Já no espectro da MQBP (Espectro 11c), nota-se o desaparecimento do sinal em 3361 cm^{-1} , indicando que não há mais o estiramento N-H e, portanto, foi formada a amida. Também é possível notar o aparecimento de um sinal em 1742 cm^{-1} , indicativo do estiramento C=O, o qual indica a carbonila da MQBP. Entretanto, ressalta-se que as intensidades dos sinais nos espectros obtidos estavam baixas, o que impede a confirmação da hipótese de formação da amida pelo IV, apesar de ele ser mais uma evidência na determinação da ligação formada.



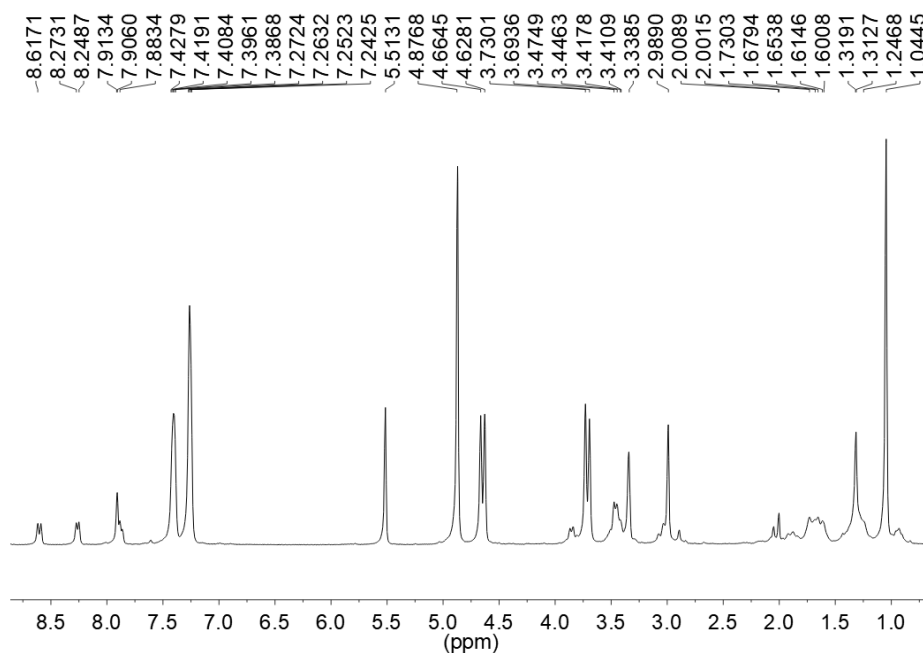
Espectro 11c: Espectro de IV da MQBP.

4.4.4. Desproteção das hidroxilas de MQBP por hidrogenação catalítica



Esquema 20: Desproteção da MQBP por hidrogenação catalítica com Pd/C.

A desproteção da MQBP por hidrogenação catalítica não foi bem-sucedida. Tal conclusão se deu após análise do RMN de ^1H (Espectro 12a), em seguida à purificação, no qual são observados os sinais característicos do grupamento aromático do BisMPAP nas regiões próximas a 7,4 e 7,2 ppm.

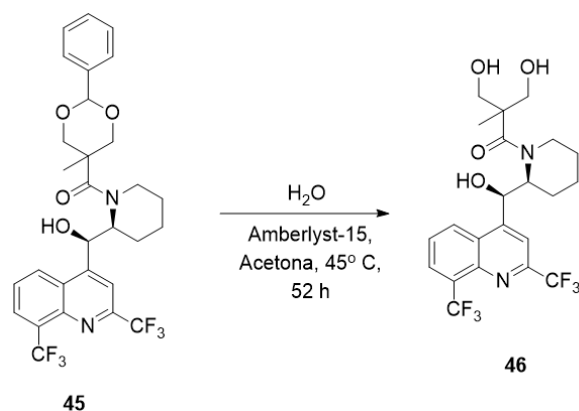


Espectro 12a: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto obtido.

Acredita-se que isso ocorreu, pois não foi possível vedar os reatores utilizados para a reação, sendo que gás hidrogênio escapava pelos parafusos que fecham e apertam a tampa do reator. Mesmo com a utilização de fita teflon para auxiliar na vedação ou com a troca dos parafusos, não foi possível solucionar este problema. Dessa forma, a pressão de H_2 caía ao longo tempo, comprometendo a reação.

Em função disso, optou-se por tentar a reação de desproteção por hidrólise com Amberlyst-15, evitando-se, assim, o uso dos reatores. Além disso, em uma etapa futura, pretende-se tentar essa desproteção sem o uso de reatores, utilizando-se apenas vidraria comum disponível no laboratório e condições de pressão atmosférica de H₂, conforme realizado por Santos (2016).

4.4.5 Desproteção das hidroxilas de MQBP por hidrólise ácida com Amberlyst-15



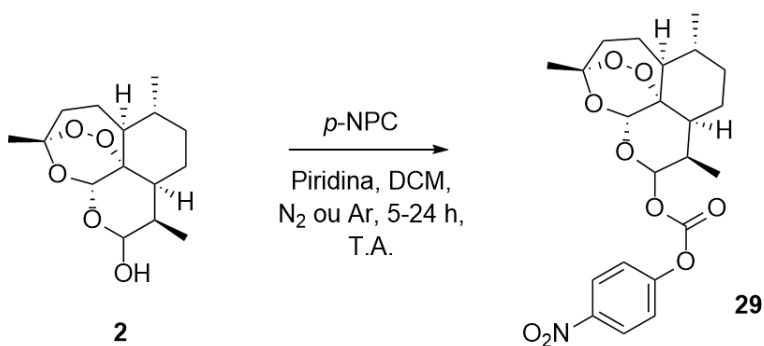
Esquema 21: Desproteção da MQBP por hidrólise ácida com Amberlyst-15.

Inicialmente, a hidrólise do acetal com Amberlyst-15 foi tentada à temperatura ambiente, porém, após 7,5 h de reação, não foi constatada mudança no padrão de manchas nas CCDs de acompanhamento realizadas, indicando que não ocorreu reação. Assim, o sistema foi aquecido para acelerar o possível acontecimento da reação, porém, novamente, as CCDs indicavam apenas a presença de material de partida, mesmo após 52 h de acompanhamento.

Dessa forma, em etapas futuras, essa rota será tentada aumentando-se a quantidade de Amberlyst-15, para verificar se a redução no pH do sistema seria suficiente para favorecer a reação planejada. Caso o acetal continue inerte a essas condições, uma tentativa com diferentes concentrações de HCl será realizada para avaliar se esta hidrólise ácida é possível.

4.5. Síntese do pró-fármaco direcionado de DHA, MQ e heparina

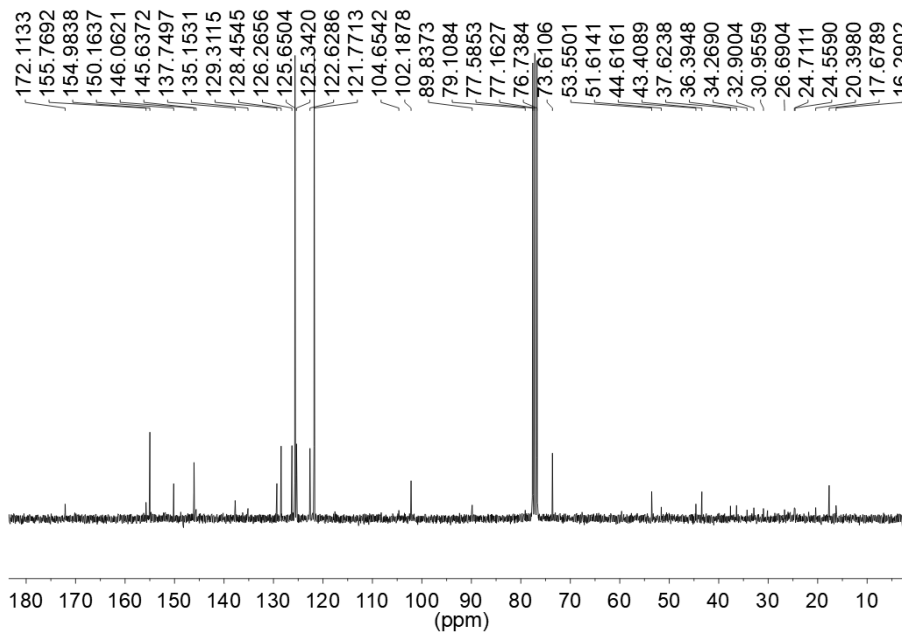
4.5.1. Síntese de DHANPC



Esquema 22: reação de DHA com p -NPC.

p -NPC é um agente condensante bastante versátil, permitindo a formação de carbamatos e ésteres carbonato (SAMMET, 2009). Tal reagente já foi empregado previamente para a ligação de plurônico a heparina, iniciando-se com a formação de um carbonato entre o p -NPC e a hidroxila do plurônico, seguida da reação deste composto ativado com a heparina, formando uma ligação carbamato entre as aminas da heparina e o carbonato, com a liberação de p -nitrofenol no processo (CHUNG et al., 2010). Com base nisso, a mesma rota pode ser utilizada para realizar a ligação da DHA na heparina, uma vez que ela envolve os mesmos grupos funcionais.

Assim, iniciou-se a ativação da DHA por p -NPC utilizando-se um protocolo semelhante ao realizado por Chung e colaboradores (2010), porém com maior excesso de p -NPC, conforme utilizado por Guo e colaboradores (2015). Tal alteração foi realizada devido à preocupação com a degradação do p -NPC por resquícios de água nos solventes e reagentes, que poderiam estar presentes apesar do tratamento prévio realizado. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se MeOH:DCM (1:20) como fase móvel e, quando não se notaram mais alterações no padrão de manchas, a reação foi interrompida e purificada por cromatografia em sílica com MeOH e DCM como fase móvel. Ao final, a análise de RMN de ^{13}C (Espectro 13a) revelou certos sinais que sugerem a presença da DHA (como os sinais de 10 a 55 ppm), além de sinais sugerindo a presença do anel aromático do p -NPC (120 a 145 ppm) e do carbonato (sinais próximos a 155 ppm), sugerindo a formação do produto de interesse. Entretanto, a grande quantidade de impurezas não permitiu avaliar se o composto foi formado.



Espectro 13a: espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do material obtido com o método A de síntese da DHANPC e após a primeira purificação.

Assim, novas CCDs foram realizadas, buscando uma fase móvel que permitisse a separação das impurezas, chegando-se ao sistema de hexano e acetona, que mostrou a presença de diversas manchas, as quais não haviam se separado previamente. Com base nesse resultado, uma segunda purificação foi realizada utilizando-se hexano e acetona como eluentes. Entretanto, não foi possível a obtenção de uma fração pura e novas tentativas de purificação terão de ser realizadas.

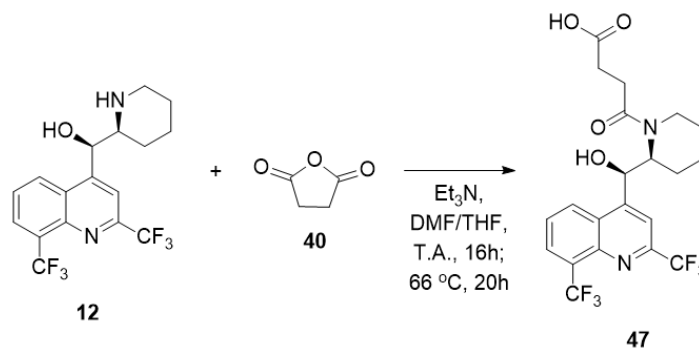
De forma a minimizar a quantidade de impurezas formadas, optou-se por diminuir o excesso de *p*-NPC, utilizando-se proporção molar próxima de 1:1 de *p*-NPC e DHA, o que está de acordo com Letsinger e Ogilvie (1967). Além disso, para se assegurar de que não havia resquícios de água no balão de reação, após a adição de DHA, aplicou-se pressão reduzida no sistema e, em seguida, foi empregada atmosfera de argônio. Por essa razão, essa reação não foi acompanhada por CCD, pois não havia maneira de coletar uma alíquota sem a abertura do sistema. Assim, ao final de 24 h, a reação foi interrompida e uma CCD foi realizada, revelando grande quantidade de impurezas novamente. A purificação por cromatografia levou à coleta de 9 diferentes frações, porém, até o momento foi apenas realizado o RMN das frações 1 e 2, revelando que eram DHA com algumas impurezas.

Com base nestes resultados, a purificação do material obtido com o método A poderia ser tentada por recristalização, utilizando proporção adequada de acetona e hexano. Caso não seja possível a separação do produto de interesse, pode-se realizar estratégia *one-pot* (SAMMET, 2009), em que a heparina seria adicionada logo após a formação do produto, sem a necessidade de purificação. Em relação às outras frações obtidas com a purificação do material obtido pelo método B, estas foram avaliadas por RMN e não correspondiam ao produto de

interesse. Os trabalhos com esse sistema tiveram que ser interrompidos em função do fim do doutorado.

4.6. Experimentos realizados no período sanduíche na Universidade de Dundee

4.6.1 Succinoilação de mefloquina



Esquema 23: amidação de MQ e anidrido succínico.

O primeiro agente espaçante avaliado em Dundee foi o ácido succínico. Assim, inicialmente, optou-se pela reação de anidrido succínico e mefloquina na presença de base (Et_3N). Análises de LCMS (Figura 52) indicaram que foi formada uma pequena quantidade de produto (TR = 1,78min) e que ainda havia uma grande quantidade de mefloquina que não reagiu (TR = 1,44 min), mesmo após aquecimento da reação. Assim, a reação foi interrompida e tentou-se a purificação do produto utilizando-se uma coluna de troca aniônica, uma vez que é carregado negativamente. Entretanto, a purificação não foi efetiva.

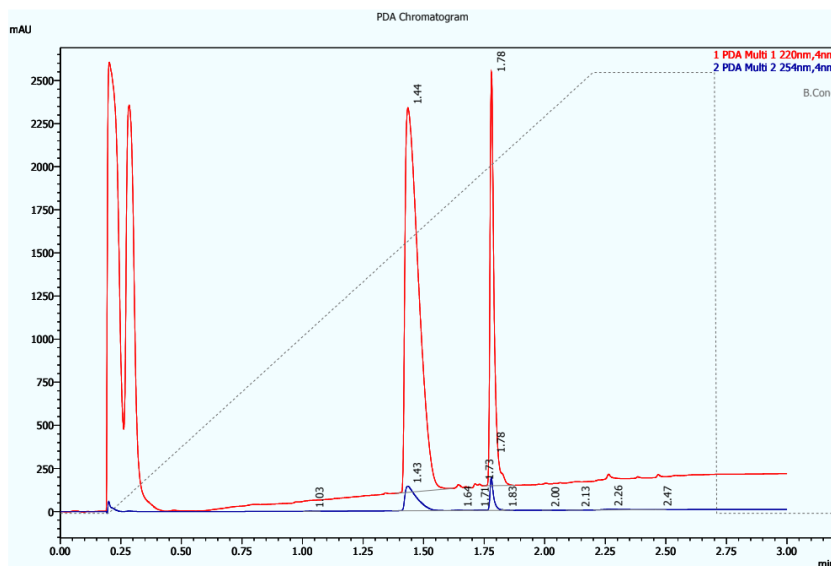


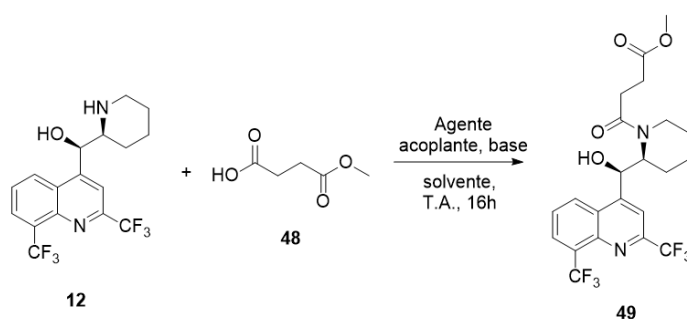
Figura 52: cromatograma da análise de LCMS realizada após 20h à $66\text{ }^\circ\text{C}$.

Empiricamente, produtos ácidos tendem a ficar muito próximos da linha de base na CCD ou, quando seu deslocamento é adequado, é comum a ocorrência de *tailing*. Dessa

forma, a purificação por cromatografia em sílica também costuma não ser satisfatória, pois são geralmente necessárias grandes quantidades de solvente e nem sempre há separação dos compostos presentes na mistura. Associando-se isso ao baixo rendimento, conclui-se que tentar purificações por cromatografia seria oneroso em termos de tempo e a quantidade de produto obtida ao final seria pequena. Ressalta-se ainda que, por ser uma etapa inicial, o baixo rendimento é um ponto negativo, uma vez que seriam necessárias reações em grande escala para obtenção de material suficiente para as próximas etapas.

Em função dessas considerações, optou-se pela busca de outras formas de adição do espaçante succínico à MQ e, assim, decidiu-se utilizar succinato de monometila, de forma a obter um produto não ácido ao final da reação, o que facilitaria a purificação.

4.6.2 Amidação de mefloquina e succinato de monometila



Esquema 24: amidação de MQ e succinato de monometila.

A reação de MQ e succinato de monometila foi realizada na presença de diferentes agentes acoplantes, de forma a avaliar qual seria o mais adequado para a reação em termos de rendimento e de formação de subprodutos/impurezas reacionais. Assim, diferentes reações foram iniciadas e acompanhadas após 16 h por LCMS. A partir da área dos picos do cromatograma, estimou-se qual reação teria o maior rendimento pela razão entre a área do pico referente ao produto (Área_p) e a área do pico referente a MQ (Área_{MQ}). Para que tal razão reflita o rendimento reacional, assumiu-se MQ não reagiu com nenhum outro material além do ácido e, assim, qualquer consumo de MQ resultaria na formação do produto de interesse.

Tabela 7: condições empregadas e estimativa de rendimento ($\text{Área}_p/\text{Área}_{MQ}$) dos diferentes agentes acoplantes utilizados para a amidação de succinato de monometila e MQ. $\text{Área}_p/\text{Área}_{MQ}$ corresponde à área do pico referente ao produto dividido pela área do pico referente a MQ no cromatograma obtido por LCMS (Shimadzu).

Amina	Eq.	Ácido	Eq.	Agente acoplante	Eq.	Base	Eq.	Solvente	$\text{Área}_p/\text{Área}_{MQ}$ (LCMS)
MQ	1	Succinato de monometila	2	EDC	2,1	DIPEA	5	MeCN	6,11

MQ	1	Succinato de monometila	2	HATU	2,1	DIPEA	5	MeCN	4,93
MQ	1	Succinato de monometila	2	COMU	2,1	DIPEA	5	DMF	3,44
MQ	1	Succinato de monometila	2	T3P	2,1	DIPEA	5	MeCN	0,03
MQ	1	Succinato de monometila	2	EDC/HOBt	2.1	DIPEA	5	MeCN	2,72

Nas condições avaliadas, o maior rendimento obtido foi utilizando-se o agente acoplante EDC, entretanto, tal rendimento foi questionado em função de duas constatações. A primeira foi a constatação de que o rendimento utilizando-se EDC/HOBt foi inferior ao rendimento utilizando-se apenas EDC, sendo que o esperado é o inverso, uma vez que HOBt é normalmente utilizado como aditivo, levando a formação de ésteres intermediários mais reativos a partir do ácido utilizado, o que aumenta a reatividade frente à amina de interesse e leva a um maior rendimento (VALEUR, BRADLEY, 2009; DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016). A segunda foi que o cromatograma obtido apontou que a amostra utilizada estava altamente diluída (Figura 53) e, assim, é possível que a concentração de MQ estivesse próxima aos limites de detecção, levando a uma avaliação incorreta. Em função disso, considerou-se que a reação com EDC deve, na realidade, possuir rendimento semelhante à reação com EDC/HOBt e, portanto, HATU seria o melhor agente acoplante para essa reação.

Ressalta-se que não foram utilizados agentes clorantes para formação do cloreto de acila derivado de succinato de monometila, pois uma reação análoga com tereftalato de monometila e MQ na presença de cloreto de oxalila havia sido tentada previamente (a reação será discutida na seção 4.6.3.), porém não houve a formação de produto. Assumiu-se, portanto, que tal via para formação de amidas com MQ não é adequada e que não havia razão para tentá-la novamente.

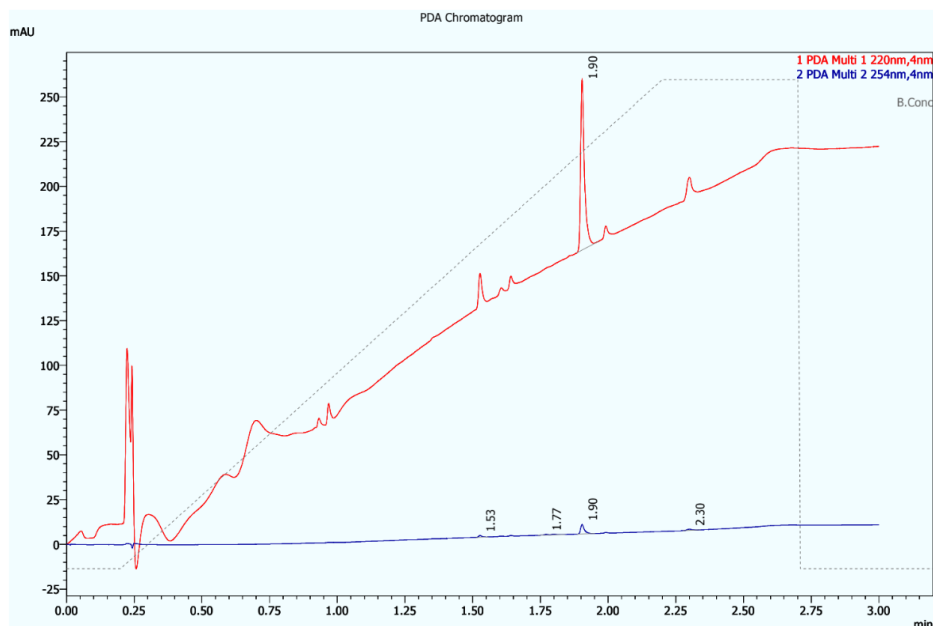
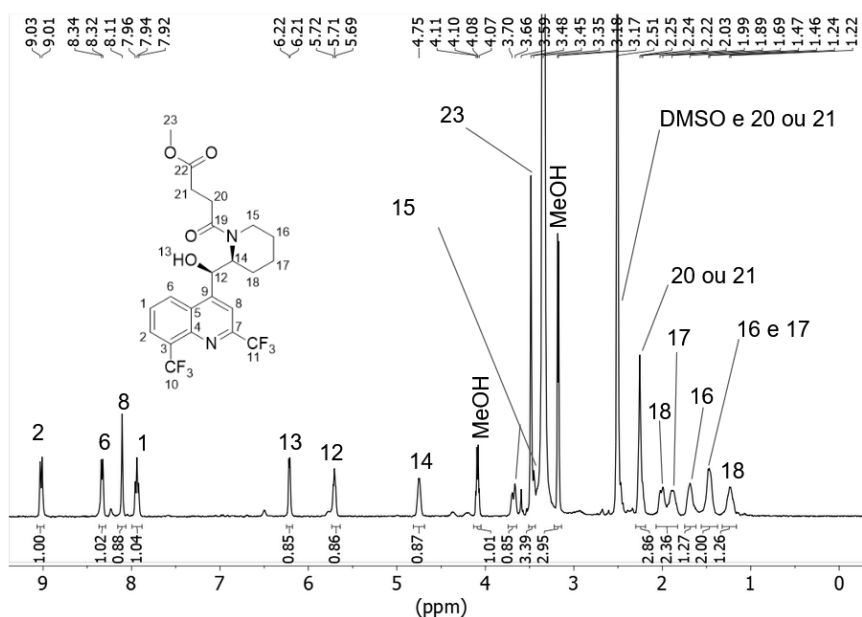
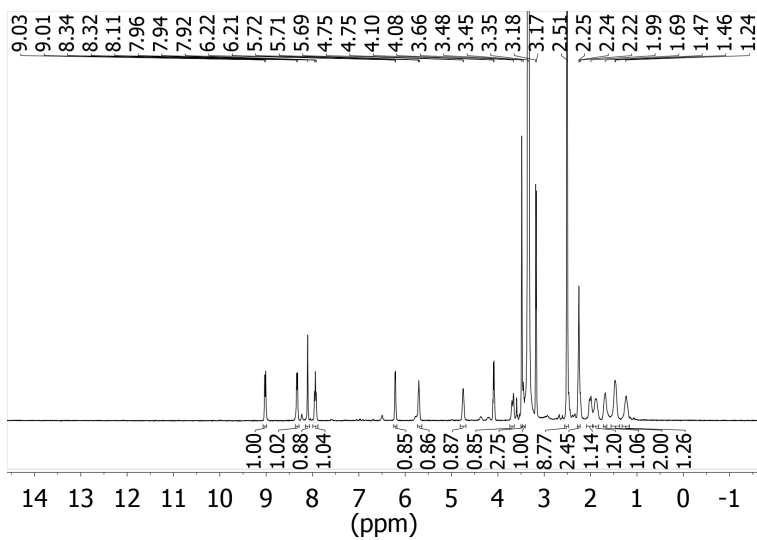


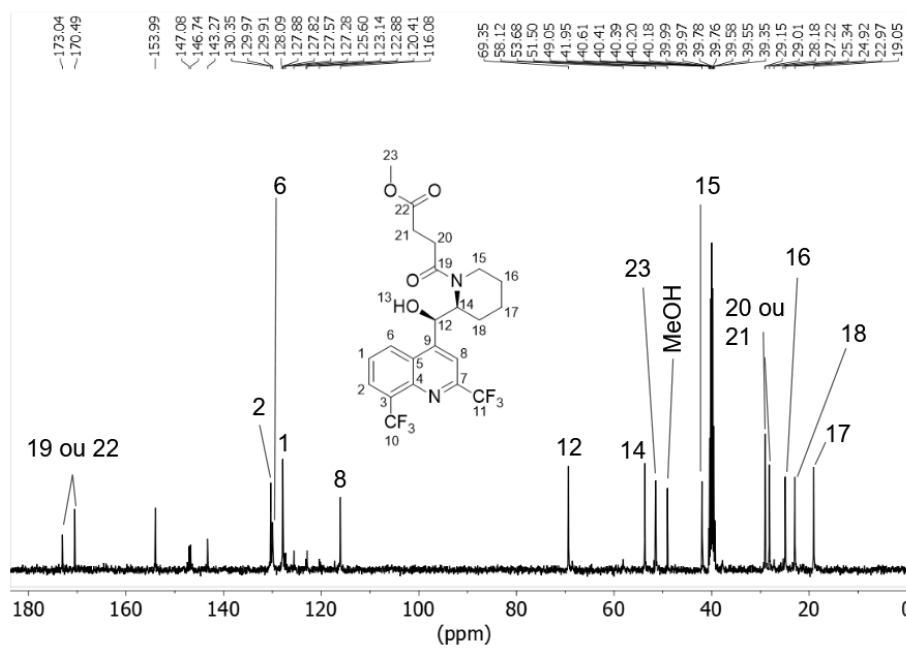
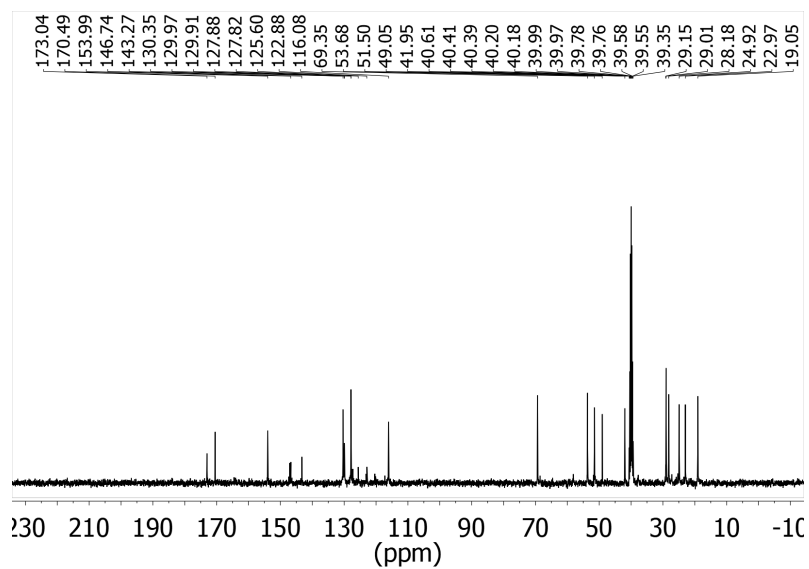
Figura 53: cromatograma da análise de LCMS da reação realizada com EDC após 16 h.

Assim, uma reação em maior escala de MQ e succinato de monometila utilizando-se HATU como agente acoplante foi realizada, obtendo-se um rendimento final de 56%. O produto foi confirmado por RMN de ^1H , ^{13}C e RMNs bidimensionais (COSY e HSQC).

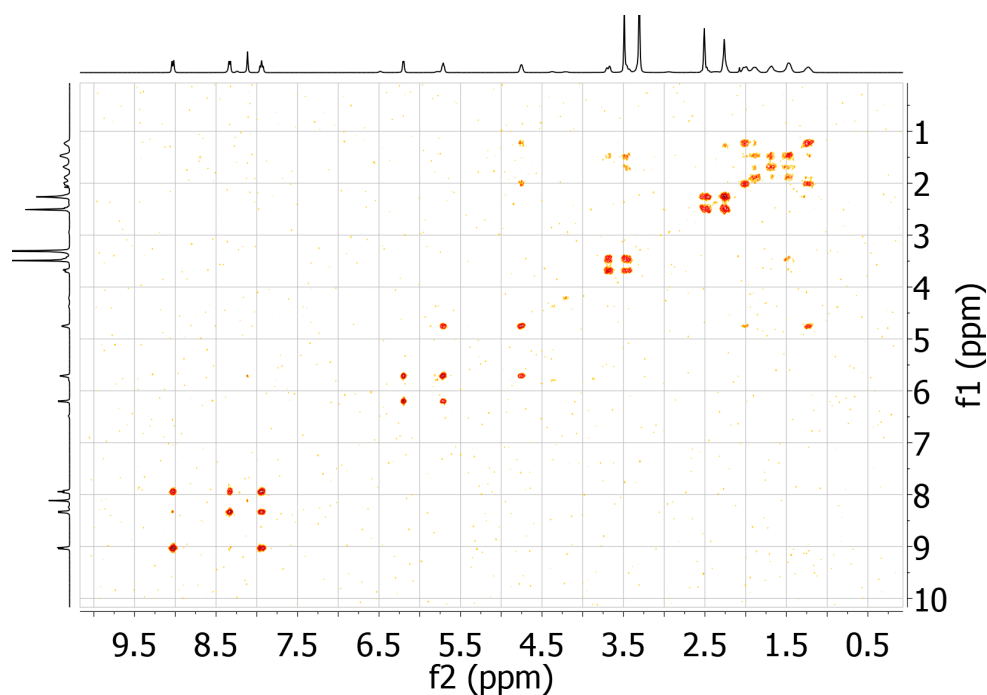
No espectro de ^1H (Espectro 14a), foi possível a atribuição de todos os H da molécula, havendo apenas alguns sinais com possível ambiguidade que não pode ser desfeita com os espectros de COSY (Espectro 14c) e HSQC (Espectro 14d). Destaca-se o sinal em 3,48 ppm correspondente a metila do succinato de monometila adicionado (H23), que possui uma integral corresponde a 3 H e que foi confirmado como CH_3 pelo HSQC. Além disso, o HSQC evidenciou que um dos H dos CH_2 (H20 ou H21) do succinato de monometila possui o mesmo deslocamento do solvente utilizado (2,50 ppm) e, portanto não é possível distinguir entre esses sinais, apesar de ser possível confirmar a presença dessa porção da molécula. Também foi possível notar o outro CH_2 do grupo adicionado (H20 ou H21) com um deslocamento de 2,24 ppm, apesar de não ser possível diferenciar entre eles. Esses sinais, associados aos outros sinais característicos da mefloquina (como os sinais na região aromática (7,5 a 9,5 ppm), confirmam a obtenção do composto de interesse, sendo possível observar também a presença de MeOH (sinais em 3,17 e 4,09 ppm) com uma concentração de 5% (m/m).



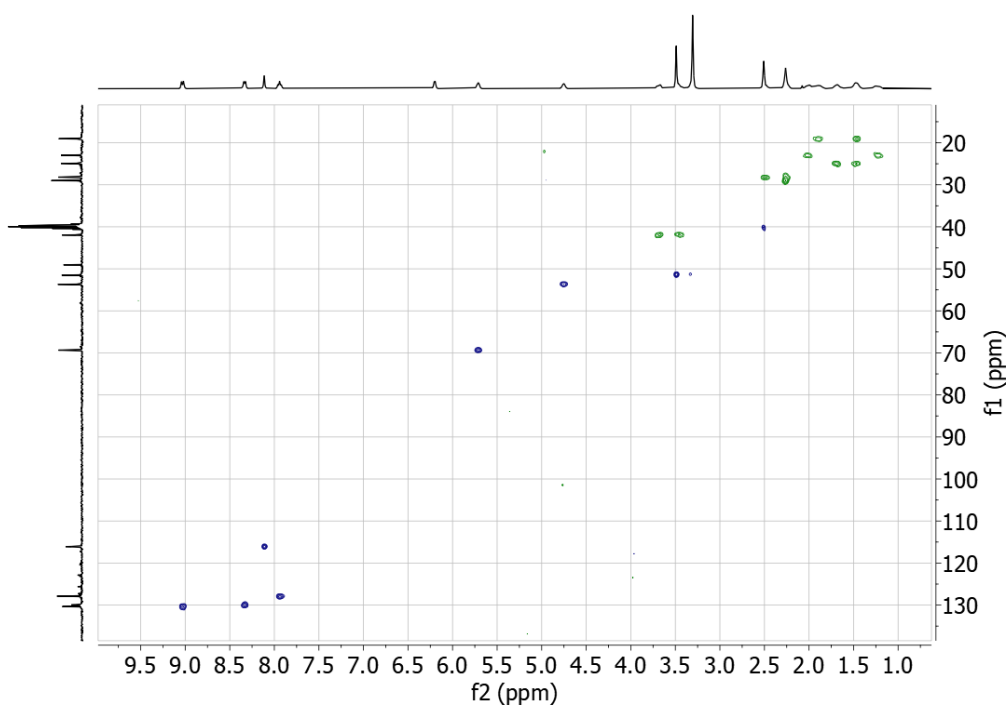
Espectro 14a: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) de MQMS sintetizada com o agente condensante HATU. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 14b: espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6) de MQMS sintetizada com o agente condensante HATU. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



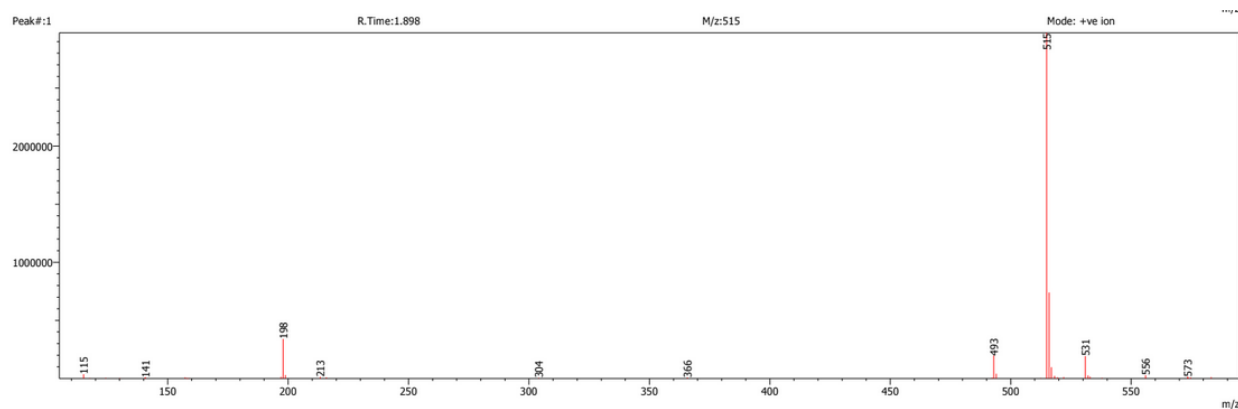
Espectro 14c: espectro COSY de RMN de MQMS sintetizada com o agente condensante HATU.



Espectro 14d: espectro HSQC de RMN de MQMS sintetizada com o agente condensante HATU. Azul indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e verde indica hidrogênios pares (CH₂).

O espectro de ^{13}C (Espectro 14b) também confirmou a formação de produto, especialmente pelos sinais em 173,04 e 170,49 ppm, que correspondem às carboxilas do succinato de monometila adicionado. Os sinais em 29,01 e 28,18 ppm são complementares, uma vez que correspondem a C20 e C21 (ou vice-versa). Entretanto, não foi possível atribuir inequivocamente todos os sinais de C à estrutura do produto, apesar de o número de sinais estar de acordo com o esperado e levando-se em conta que acoplamentos entre carbono e flúor podem ser observados (PAVIA et al., 2009), conforme discutido na seção 4.4.1. Para isso, um espectro RMN HMBC seria suficiente, porém tal experimento não foi realizado à época. De qualquer forma, a correlação dos H com os C mostrada pelo HSQC também sugere a obtenção do produto.

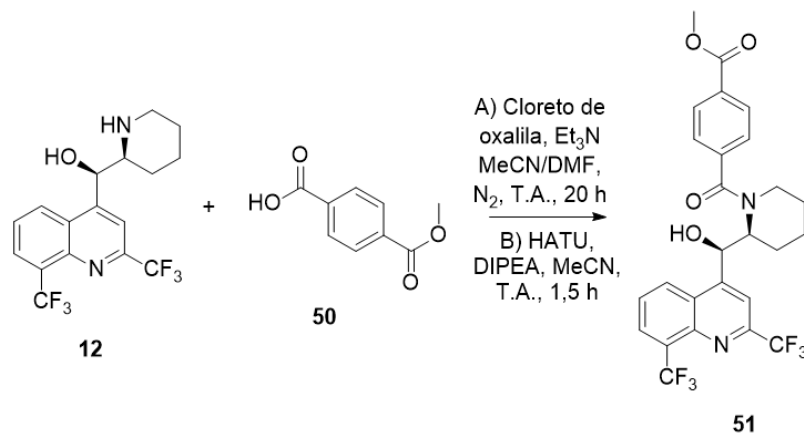
A análise do espectro de massas (Espectro 14e) obtido com um LCMS também auxiliou a confirmação do produto. Foram observados dois picos no espectro obtido com o detector no modo positivo: um elevado com massa de 515 e um de menor intensidade com massa de 493. O pico com massa 515 provavelmente é referente ao aduto da molécula de produto e um íon de Na, enquanto que o pico com massa de 493 corresponde a um aduto de produto com um próton. (STRICKER et al., 2021).



Espectro 14e: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

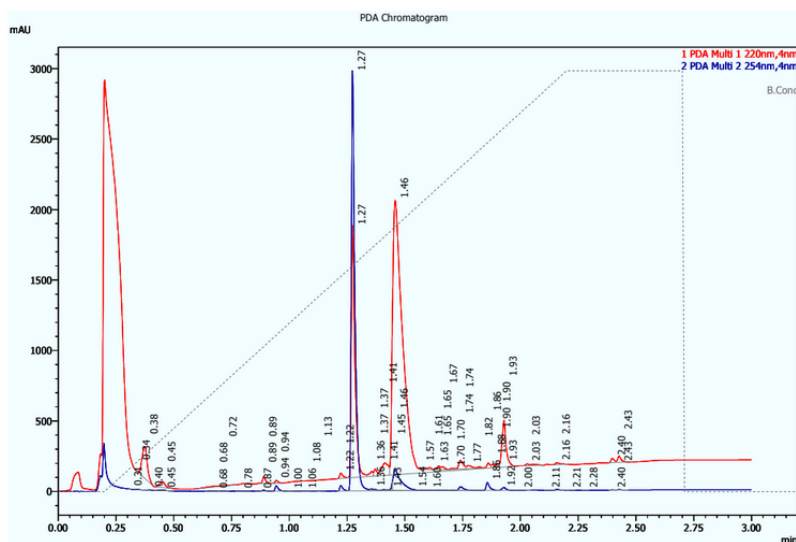
Confirmada a estrutura, pode-se prosseguir com as tentativas de ligação da MQ ao dendrímero de PAMAM com o espaçante succínico.

4.6.3 Amidação de mefloquina e tereftalato de monometila



Esquema 25: amidação de MQ e tereftalato de monometila.

Inicialmente, a amidação de MQ e tereftalato de monometila foi tentada pela formação de um cloreto de acila a partir do ácido, utilizando-se, para isso, cloreto de oxalila na presença de quantidade catalítica de DMF (VALEUR, BRADLEY, 2009; DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016). A reação foi acompanhada por LCMS após diferentes intervalos, porém, mesmo após 20h, foi observada uma grande quantidade de material de partida (Figura 54 - tereftalato de monometila: TR = 1,77 min; MQ: TR = 1,46 min) e quantidade traço de produto (TR = 1,70; %área <0,1). Tentou-se realizar a separação do produto por HPLC preparativo, entretanto após análise por RMN, nenhuma fração coletada continha o material desejado.



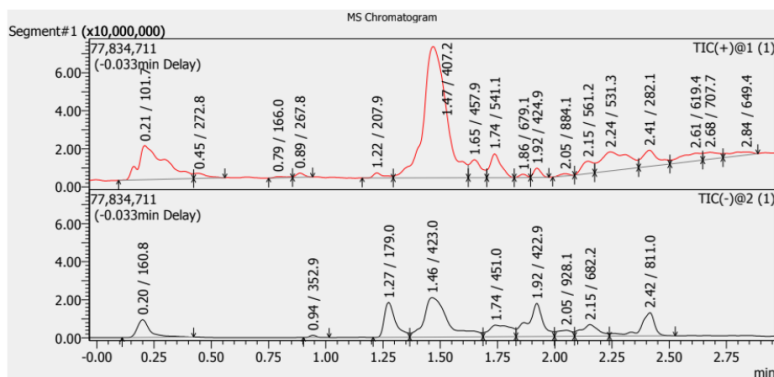


Figura 54: cromatogramas da análise de LCMS da reação realizada com cloreto de oxalila após 20h. O cromatograma na parte superior foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm), enquanto que o cromatograma na parte inferior corresponde à corrente total de íons (TIC). No cromatograma TIC, acima de cada pico, estão indicados seu TR e M/z.

Uma vez que o rendimento da reação se mostrou baixo utilizando-se cloreto de oxalila, optou-se pela utilização de um agente condensante. Assim, HATU foi utilizado, dado que havia sido a melhor opção na reação entre MQ e succinato de monometila (seção 4.6.2.). Condições análogas foram então utilizadas, reagindo-se 25 mg de cloridrato de MQ com 22 mg de terftalato de monometila na presença de HATU e DIPEA e, após 1,5 h, uma análise de LCMS indicou o consumo completo de MQ, formação de produto de interesse (RT = 1,75 min) e de subproduto desconhecido de M/z = 563 com TR = 1,90 min (Figura 55).

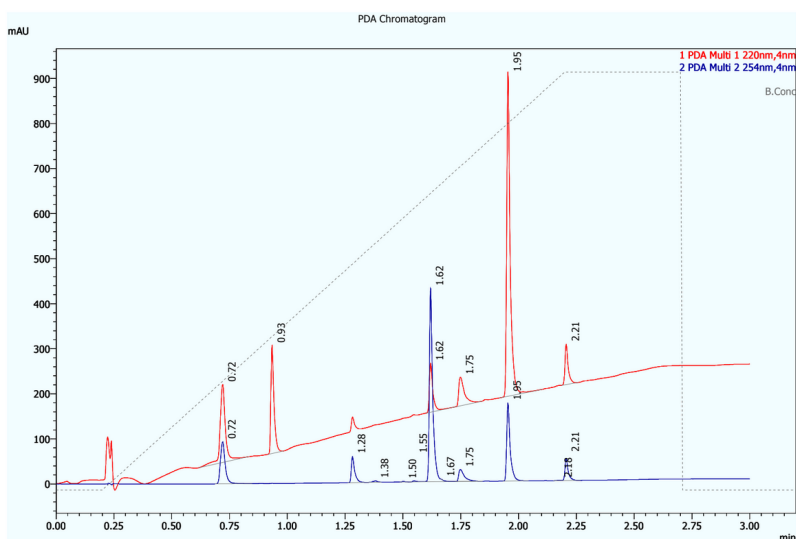
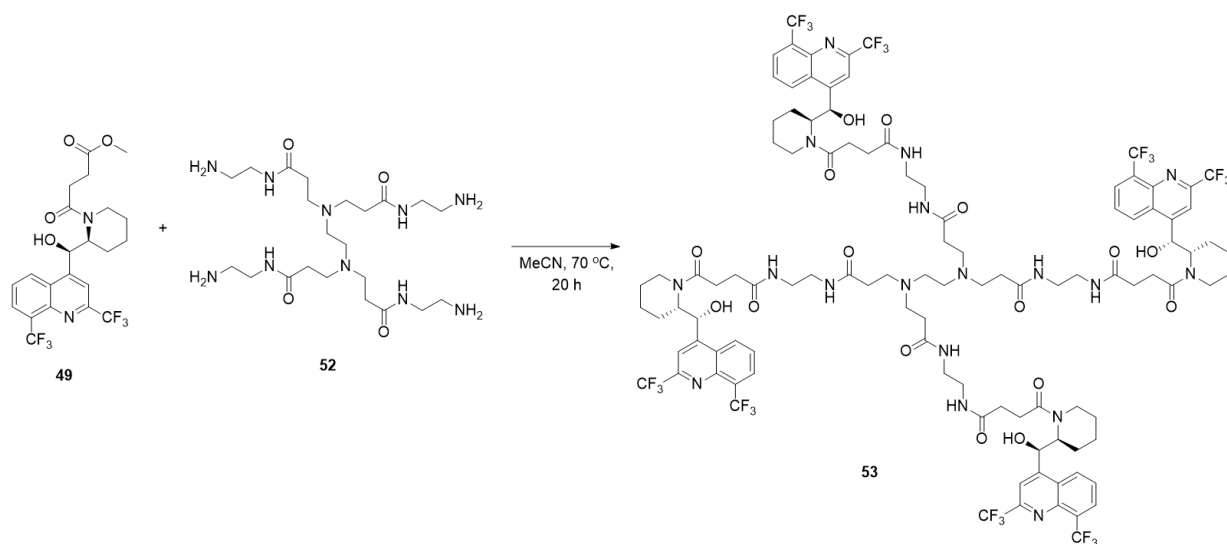


Figura 55: cromatograma da análise de LCMS da reação realizada com HATU após 1,5 h. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Apesar de o subproduto desconhecido ter sido o produto majoritário (% área = 20%, 254 nm), a quantidade de produto de interesse formado aparentava ser maior (% área = 5%, 254nm) do que a formada pela reação em presença de cloreto de oxalila. Assim, inicialmente tentou-se purificar o produto pela passagem da mistura reacional em uma coluna de troca catiônica (para eliminação de DIPEA), porém não houve separação dos materiais. Em seguida, tentou-se a purificação do obtido por cromatografia *flash*, porém a maioria das frações continha misturas e a única fração pura obtida não era produto (analisada por RMN). A fração pura foi então descartada e todas as outras foram combinadas e purificadas por HPLC preparativo. Apesar de diferentes frações terem sido coletadas, suas análises por RMN indicaram que não se tratavam de produto, então todas foram descartadas.

Por conta dos resultados negativos e visto que um espaçante (succinato de monometila) havia sido adicionado de maneira bem-sucedida ao fármaco, optou-se por priorizar a ligação da molécula com o espaçante ao dendrímero de PAMAM G0, de modo a avaliar se as etapas seguintes seriam viáveis ou não. Por conta disso, os trabalhos envolvendo o espaçante aromático foram interrompidos.

4.6.4 Ligação de MQMS a PAMAM G0



Esquema 26: aminólise de MQMS por PAMAM G0

A primeira tentativa de ligação de MQMS ao PAMAM G0 foi realizada por aminólise do éster de MQMS com a amida do dendrímero (CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012). Assim, MQMS e PAMAM G0 foram mantidos sob aquecimento (70 °C) durante 20 h na presença de DIPEA e analisados por LCMS em seguida. O cromatograma indicou a presença apenas de material de partida (TR = 1,90 min, M/z = 515 (M + Na)⁺) e uma pequena quantidade de MQ

(TR = 1,52; M/z = 379), a qual pode ter sido formada pela hidrólise de MQMS nas condições empregadas (Figura 56).

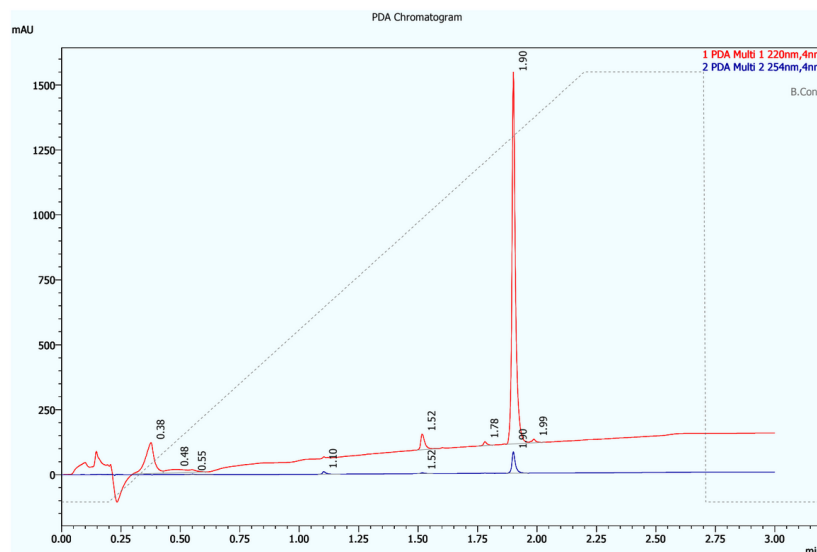
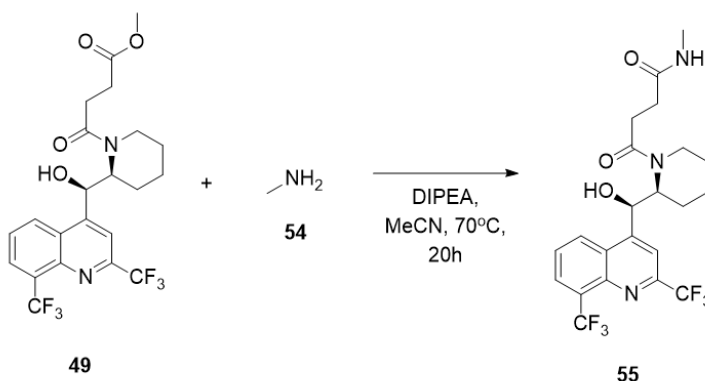


Figura 56: cromatograma da análise de LCMS da reação de aminólise após 20 h. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

A aminólise seria a rota com menor número de etapas reacionais para a ligação de MQMS ao dendrímero, entretanto, ela se mostrou ineficaz nas condições propostas. Optou-se, então, pela hidrólise do éster de MQMS, formando-se um ácido carboxílico (MQSuc), que permitiria o uso de outras estratégias de outras estratégias de acoplamento com o dendrímero, como o uso de agentes acoplantes ou pela formação do cloreto de acila do ácido.

4.6.5 Aminólise de MQMS



Esquema 27: aminólise de MQMS por metilamina.

Foi tentada também a aminólise de MQMS com metilamina para a formação de MQMAS. Objetivou-se tal composto para que o espaçante ficasse com sua estrutura mais semelhante à estrutura do dendrímero final planejado. MQMAS seria então empregada como um controle em ensaios biológicos de atividade contra *P. falciparum*, toxicidade, solubilidade, permeabilidade e metabolismo. Esse tipo de controle é necessário, pois é possível que MQ permaneça ligada ao dendrímero ou não seja liberada em sua forma original, pois a ligação do espaçante com o fármaco pode ser estável *in vivo*. Dessa forma, ensaios biológicos devem ser realizados na molécula de fármaco com o espaçante e, se esse composto possuir toxicidade relevante ou baixa eficácia contra o parasita, então não seria uma molécula de interesse para ligação com o dendrímero, pois suas características não são adequadas para um fármaco.

Com base nisso, paralelamente e com condições análogas à reação da seção 4.6.4, tentou-se reagir metilamina diretamente com MQMS. Entretanto, após 20 h de reação, uma análise por LCMS (figura 57) indicou uma grande quantidade de material de partida (TR = 1,90 min; M/z = 515; positivo) sem a formação de produto.

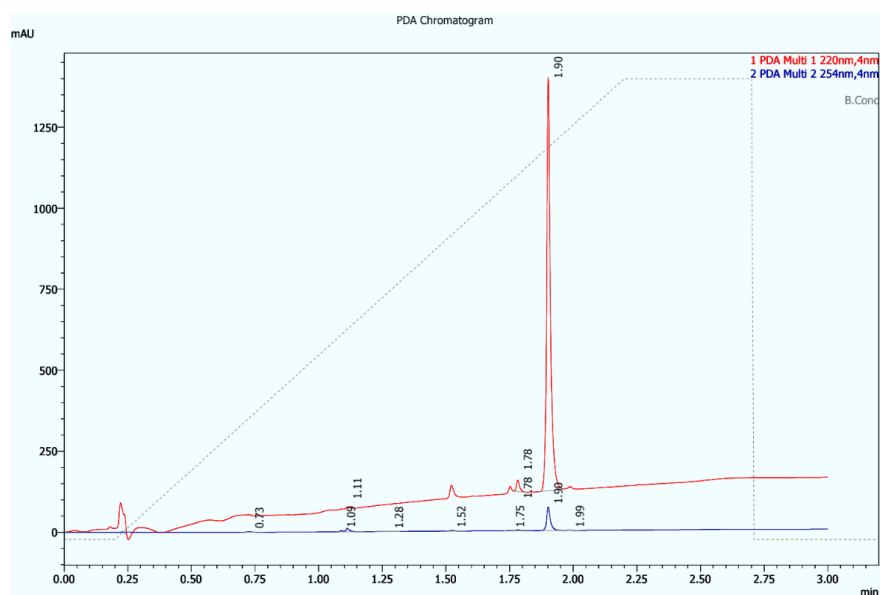
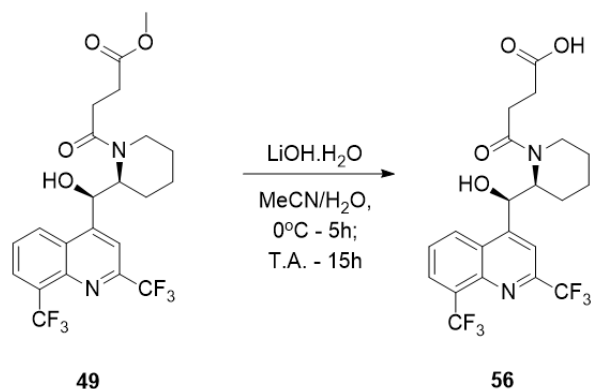


Figura 57: cromatograma da análise de LCMS da reação de aminólise com metilamina após 20 h. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Assim, para a obtenção de MQMAS, também optou-se pela hidrólise do éster de MQMS seguida da amidação do ácido com metilamina, de maneira análoga ao indicado em 4.6.4.

4.6.6 Hidrólise do éster de MQMS



Esquema 28: desproteção do éster de MQMS.

Para o aumento da reatividade da carboxila de MQMS, o éster foi hidrolisado em meio básico (CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012) com LiOH após um total de ~20 h de reação, sendo obtido um rendimento próximo de 60%. Apesar de análises de LCMS indicarem que ainda havia material de partida no meio reacional (Figura 58), o aumento de tempo não levou a uma maior conversão. Em uma tentativa inicial, a temperatura do sistema foi aumentada para 50 °C após 3h de reação e mantida assim por mais 3h, o que levou a um consumo completo do material de partida, porém também levou à clivagem da amida, liberando o espaçante. Nessa tentativa prévia, o rendimento final da reação foi de 59% e conclui-se, com isso, que o aquecimento do sistema não leva a uma maior conversão.

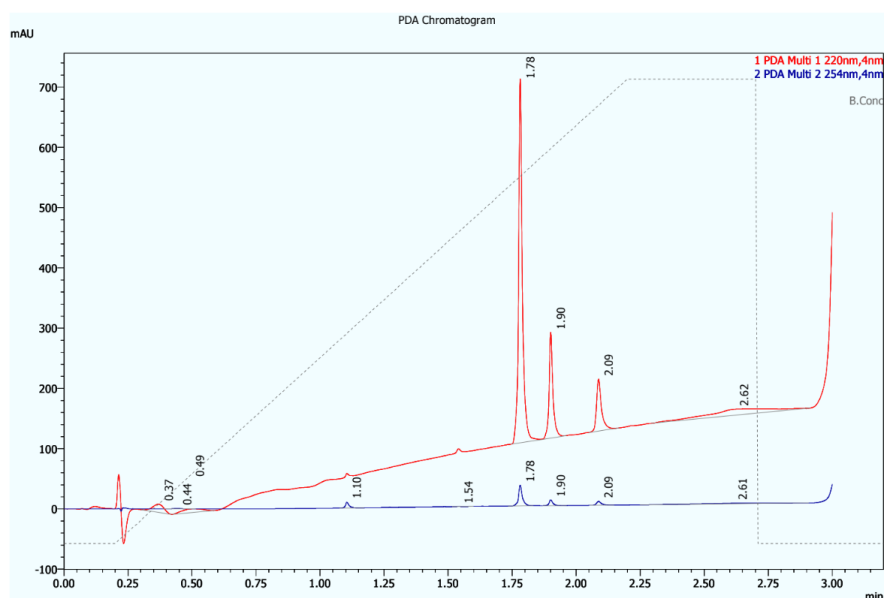
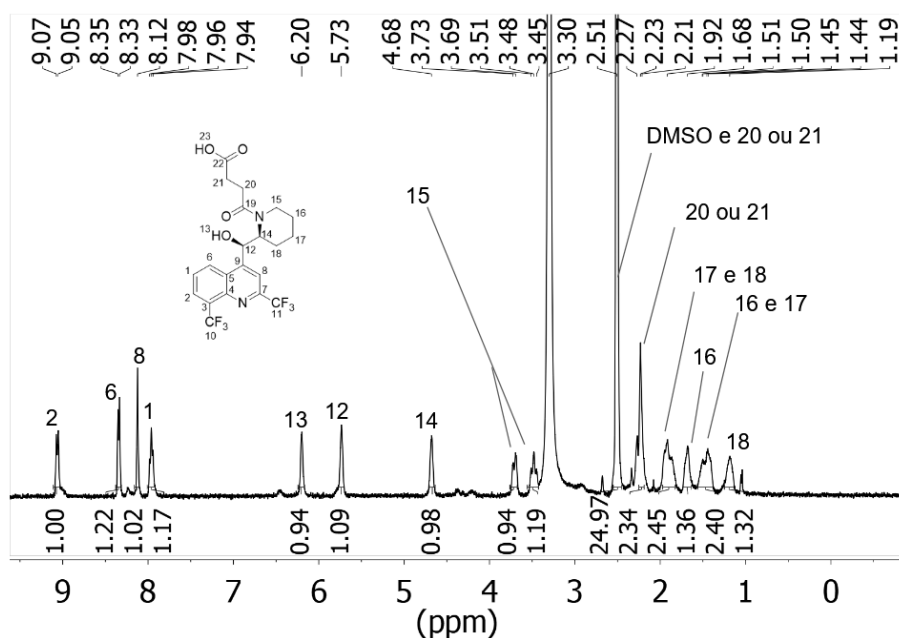
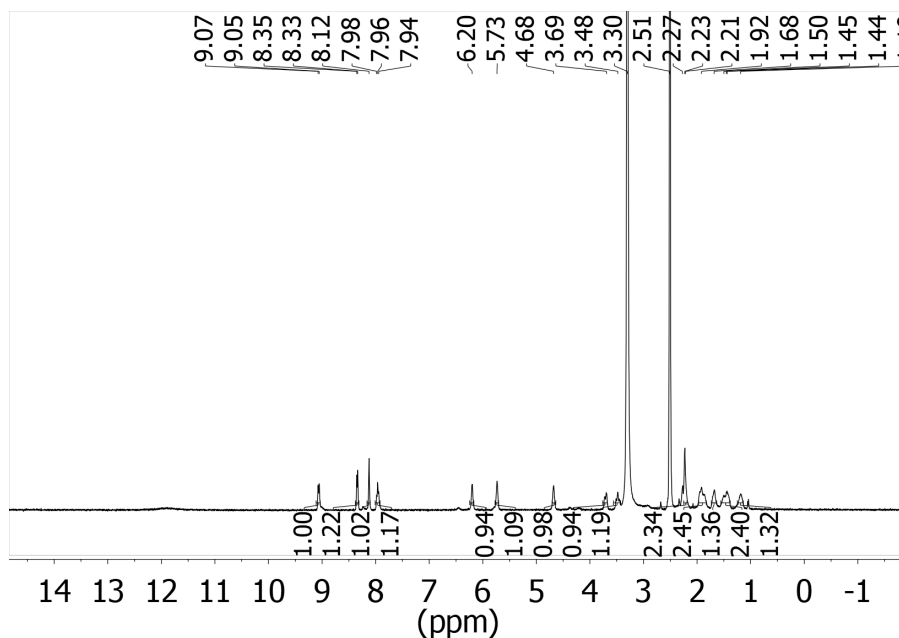


Figura 58: cromatograma da análise de LCMS da reação de hidrólise de MQMS após 20 h. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

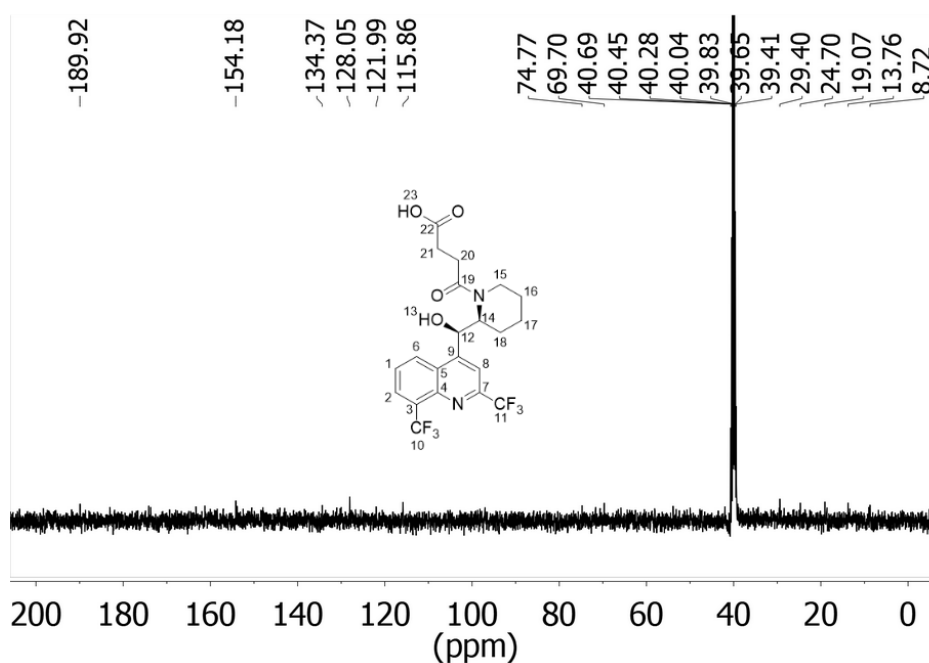
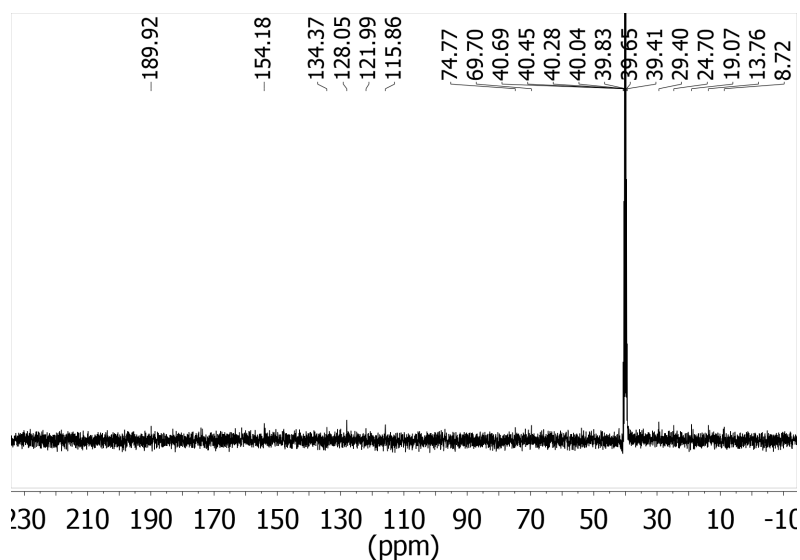
A reação foi facilmente purificada utilizando-se uma coluna de troca aniônica (PE-AX), o que simplifica a obtenção do produto e reduz o tempo total do processo em comparação com purificações por cromatografia. A pureza obtida pelo processo foi de ~93%, em análise do cromatograma de um LCMS realizado ao final da purificação.

O produto obtido foi confirmado em análise de RMN (^1H , ^{13}C) e espectro de massas. Na análise de ^1H (Espectro 15a), ressalta-se que o simpleto em 3,48 ppm de MQMS não está mais presente no composto final, enquanto que todos os outros picos mantiveram-se em regiões semelhantes. Assim, confirma-se a perda da metila e a obtenção do produto desejado.



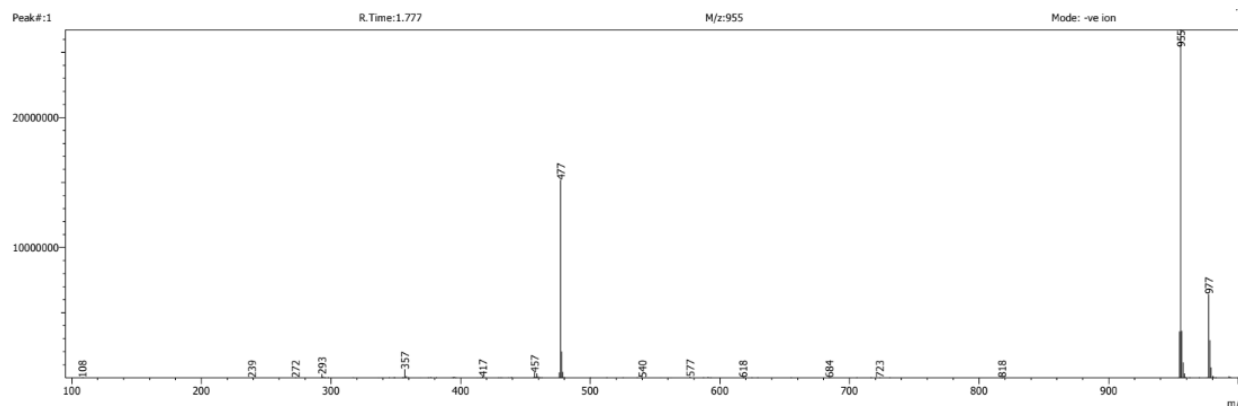
Espectro 15a: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) de MQSuc. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Pela altura dos picos do produto em relação ao pico do solvente (2,51 ppm) e da água presente no solvente (3,30 ppm) no espectro de ^1H , nota-se que a amostra enviada para análise de RMN estava com uma baixa concentração de produto. Isso fez com que os picos no espectro de ^{13}C não ficassem bem definidos, dificultando sua análise e impedindo sua utilização para confirmação estrutural inequívoca. Entretanto, o pico em 51,50 ppm referente ao carbono metílico do éster não aparentava estar presente, o que sugere que o obtido corresponde ao produto final.



Espectro 15b: espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6) de MQSuc. Acima, encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os sinais foram atribuídos automaticamente pelo *software* MestreNova.

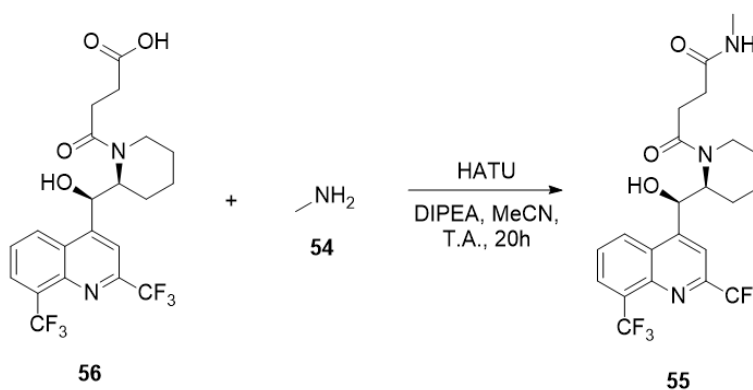
Por fim, no espectro de massas no modo negativo, foram observados dois picos principais: um com massa de 477 e um com massa de 955. O pico de 477 corresponde ao composto menos um próton no processo de ionização $[\text{M}-\text{H}]^-$. Já o pico com massa de 955 pode ser atribuído ao aduto de duas moléculas de produto menos um próton $[\text{M}+\text{M}-\text{H}]^-$. Esses resultados contribuem para a confirmação estrutural da molécula obtida.



Espectro 15c: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo negativo.

Com base nos espectros obtidos, acredita-se que há evidências suficientes de que MQSuc foi formada na reação. Isso permitiu que as etapas seguintes de amidação de MQSuc com metilamina e ligação de MQSuc a PAMAM G0 pudessem ser tentadas.

4.6.7. Amidação de MQSuc



Esquema 29: amidação de MQSuc com metilamina.

Para a ligação de MQSuc com metilamina, optou-se pela utilização de HATU como agente condensante, uma vez que este se mostrou o melhor para a ligação de MQ a succinato de monometila (seção 4.6.2.). Assim, os reagentes foram combinados na presença de DIPEA como base e, após 20h de reação (Figura 59), uma análise por LCMS indicou que não havia mais MQSuc no meio reacional e produto havia sido formado (TR = 1,75 min; M/z = 492; positivo). Em seguida, o conteúdo reacional foi lavado com água e purificado por HPLC preparativo, sendo obtido produto com um rendimento de 75%.

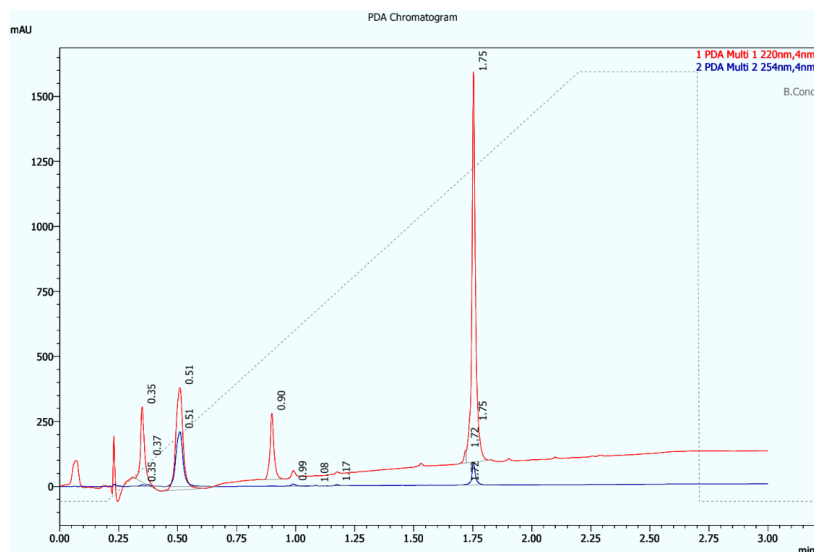
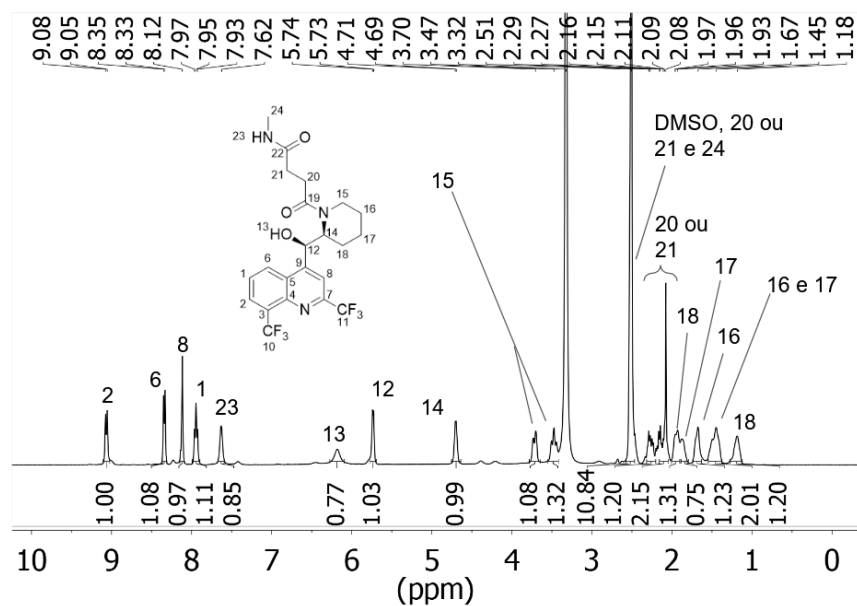
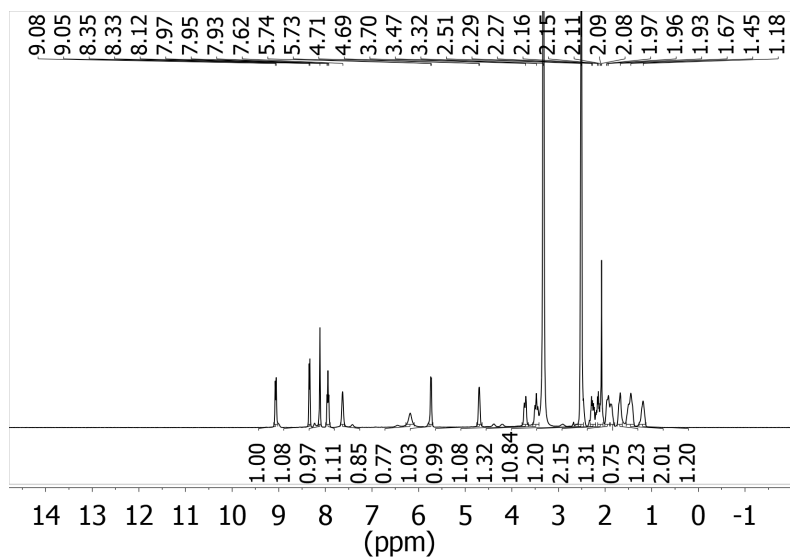
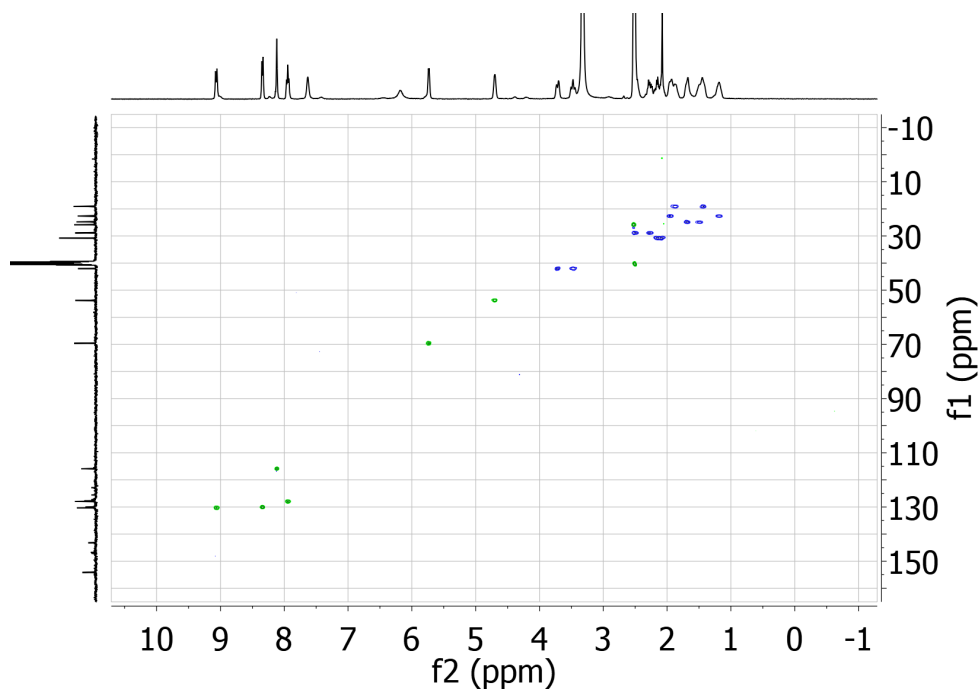


Figura 59: cromatograma da análise de LCMS da amidação de MQSuc e metilamina. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

A confirmação da estrutura do produto foi realizada utilizando-se RMN (^1H , ^{13}C e HSQC), além de espectroscopia de massas. A análise do RMN de ^1H (Espectro 16a) foi muito facilitada pelo HSQC (Espectro 16b), pois alguns sinais do produto estão na mesma região do solvente e, assim, não é possível distinguí-los no espectro 1D. Observou-se um novo sinal em 7,62 ppm, que não está correlacionado com nenhum carbono no HSQC e que não estava presente nos espectros de MQMS e MQSuc. Por conta disso, conclui-se que tal sinal corresponde ao H amídico (H23) na molécula de MQMAS, o que é reforçado pelo fato de que hidrogênios desse tipo de função orgânica costumam se situar na região de 5,0-8,0 ppm (PAVIA et al., 2009). Além disso, por conta do HSQC, notou-se que há H pertencente a um CH ou CH_3 em 2,52 ppm (correlacionado com um carbono em 25,86 ppm) e que está sobreposto pelo sinal do DMSO-D_6 . Na molécula de produto, a única possibilidade para tal sinal é o H24, que corresponde à metila da amida formada. Pela mesma análise, observou-se H pertencentes a um CH_2 em 2,50 (correlacionados com um carbono em 28,88 ppm), cujo sinal também está sobreposto pelo sinal de DMSO-D_6 . Tais hidrogênios devem corresponder a H20 ou H21.

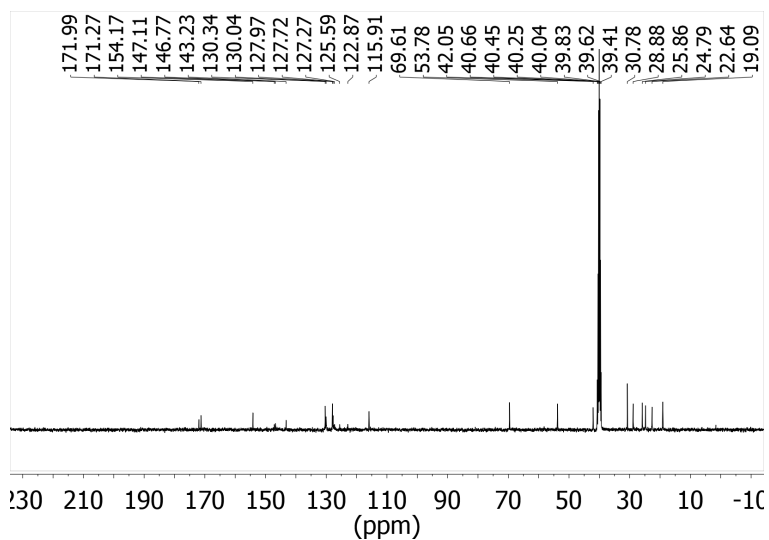


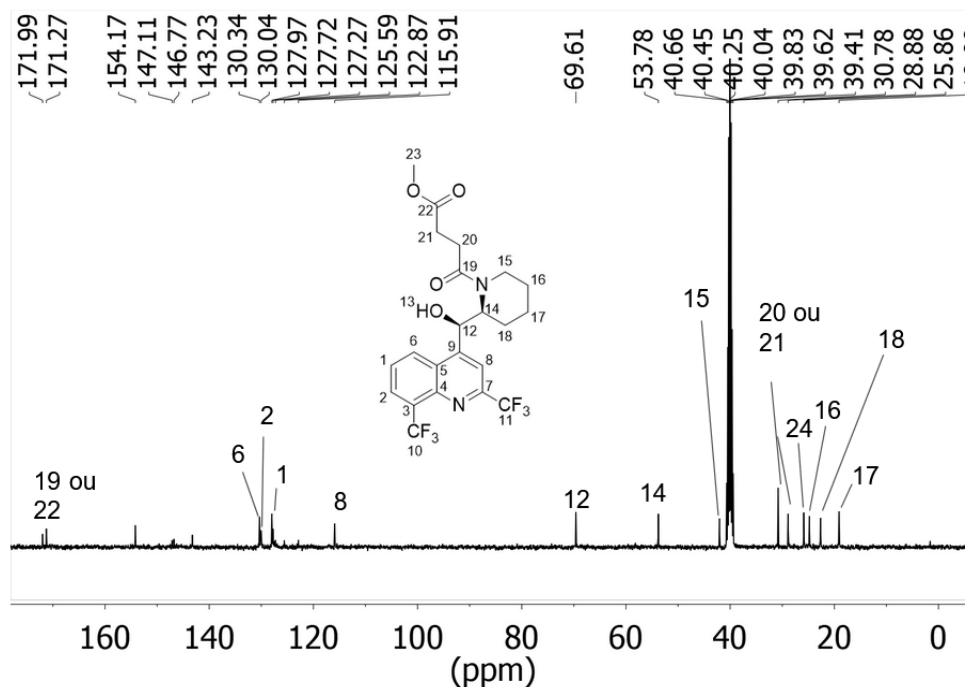
Espectro 16a: espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) de MQMAS. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 16b: espectro HSQC de RMN de MQMAS. Verde indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e azul indica hidrogênios pares (CH₂).

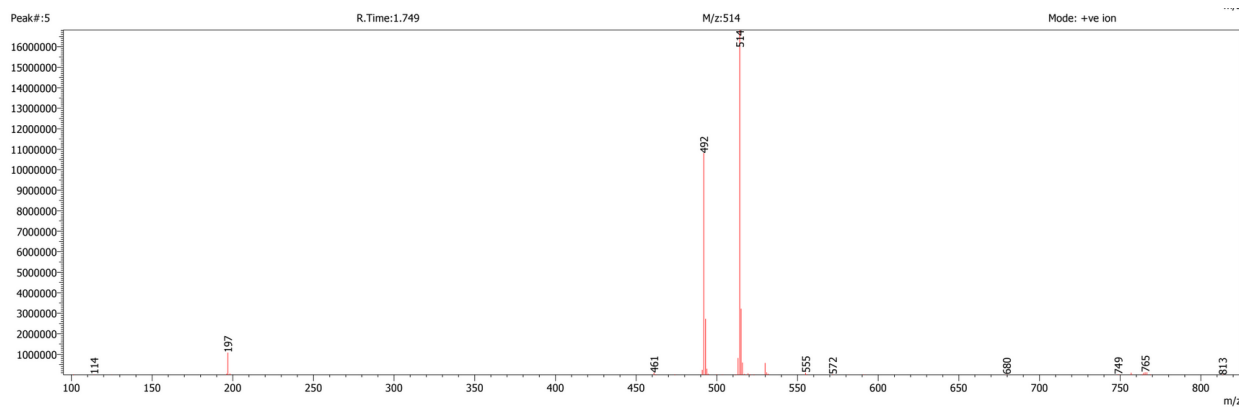
O espectro de ¹³C não é suficientemente conclusivo para determinação estrutural do composto obtido, uma vez que, novamente, os acoplamentos entre carbono e flúor (PAVIA et al., 2009) dificultam a análise do espectro, porém foram observados 2 sinais entre 171-172 ppm indicativos de carboxilas de éster ou amida (PAVIA et al., 2009), o que confirma a presença do espaçante na molécula. Além disso, no espectro bidimensional, os carbonos puderam ser correlacionados aos H, que foram atribuídos com informações dos espectros obtidos e com os espectros de MQMS e MQSuc.





Espectro 16c: espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-D_6) de MQMAS. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

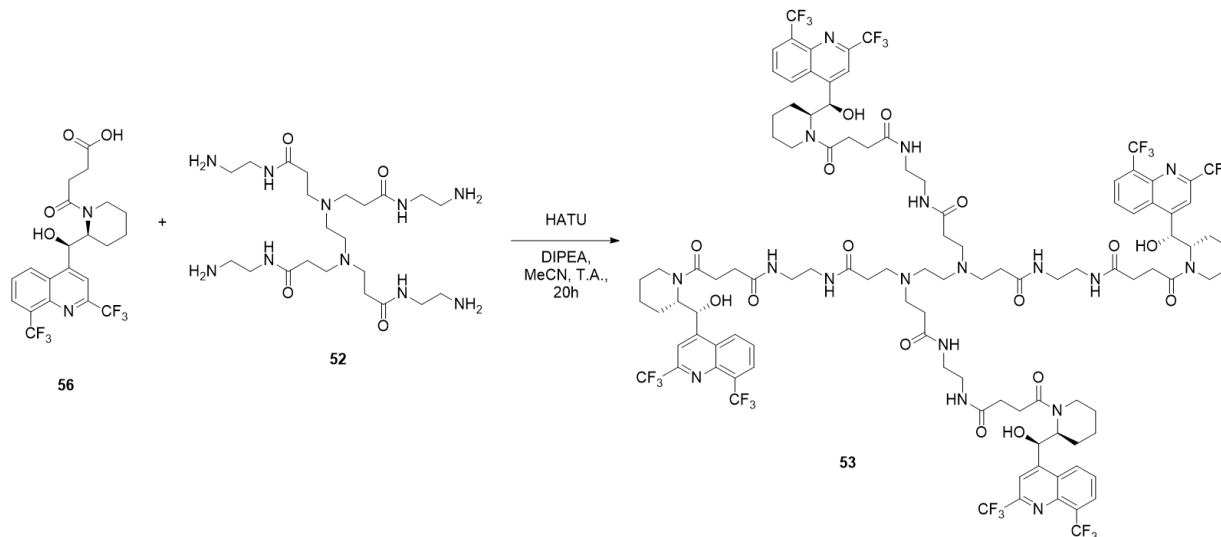
Por fim, o espectro de massas no modo positivo apresenta 2 picos para TR = 1,75 min: um com massa de 492 e um com massa de 514. O com massa de 492 corresponde a $(\text{M} + \text{H})^+$, enquanto que o com massa de 514 corresponde a $(\text{M} + \text{Na})^+$.



Espectro 16d: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

Assim, com base em todos os espectros, confirma-se a obtenção do produto MQMAS, que será utilizado como uma espécie de controle nos ensaios biológicos, conforme descrito na seção 4.6.5.

4.6.8. Ligação de MQSuc com PAMAM G0



Esquema 30: amidação de MQSuc e PAMAM G0.

Uma vez que HATU havia sido um agente condensante adequado para a reação de formação de amida entre metilamina e MQSuc, optou-se por utilizar tal reagente para a ligação do fármaco e do espaçante ao PAMAM G0. Assim, empregou-se um método análogo ao utilizado na seção 4.6.7. Após 20h, uma análise por LCMS (Figura 60) indicou a presença de diferentes produtos na reação, porém, a massa da molécula desejada (2357 g/mol) é superior ao limite de detecção do espectrômetro de massas utilizado e, assim, a massa correta do produto não seria observada. Assim, em função do aparecimento dos novos picos no cromatograma, optou-se por interromper a reação e prosseguir com sua purificação, a qual foi realizada por HPLC preparativo.

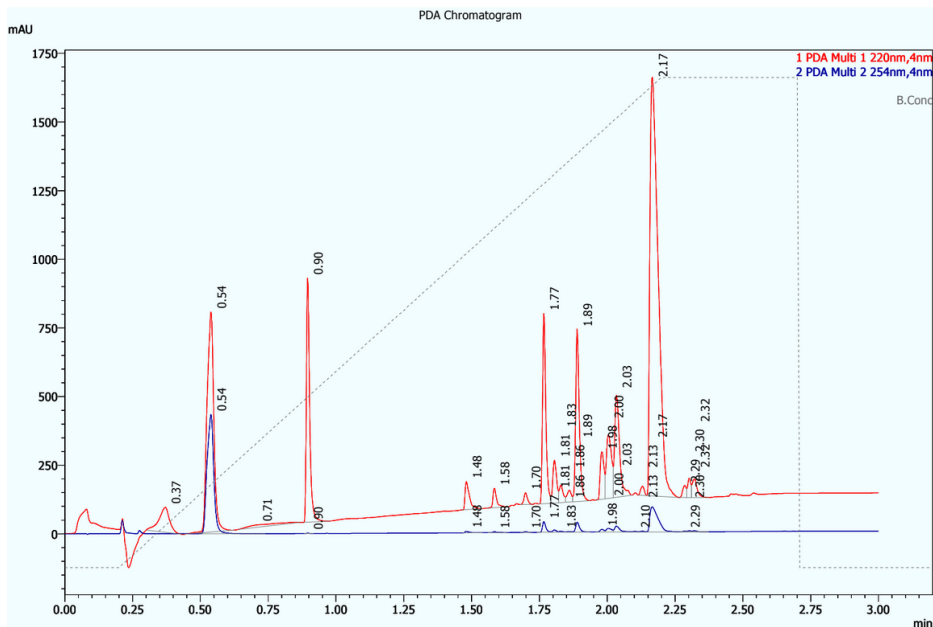


Figura 60: cromatograma da análise de LCMS da amidacção de MQSuc e metilamina. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Mesmo com diferentes *workups* empregados previamente à purificação, as diferentes fases coletadas no HPLC não continham o produto desejado (análise por RMN). Para o sucesso dessa reação, seria necessária uma nova avaliação de diferentes agentes condensantes e condições reacionais, entretanto isso também requeria grande quantidade de MQSuc para as diferentes reações. Isso se mostrou um problema, pois MQ é um reagente de custo elevado e as duas etapas reacionais para obtenção de MQSuc levam a um rendimento combinado de 34%, o que implica uma quantidade ainda maior de MQ para o estudo. Frente a essa dificuldade, optou-se por utilizar uma molécula que possuísse certa semelhança estrutural com MQSuc e que estivesse disponível em grande quantidade (ao menos 25 g) no inventário do laboratório da Universidade de Dundee. Ao final da busca, chegou-se no composto ácido BCP (ácido BCP) (Figura 61)

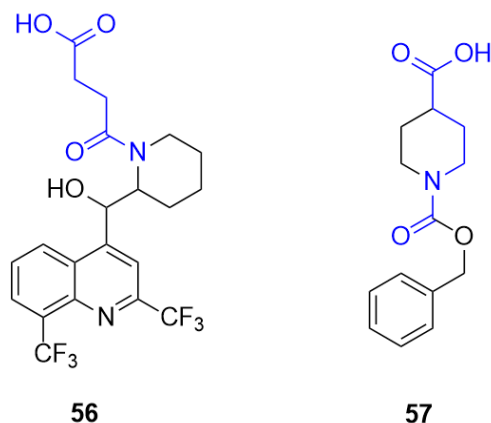
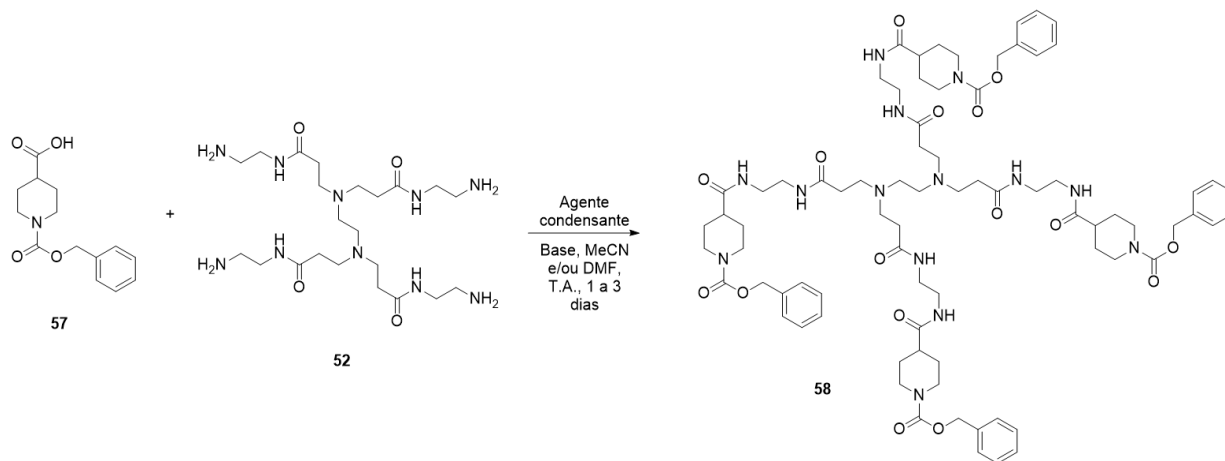


Figura 61: MQSuc (56) à esquerda e ácido BCP (57) à direita. Em azul destaca-se a semelhança entre o espaçador succínico e o anel piperidínico do ácido BCP.

Ácido BCP era o composto com maior semelhança disponível no inventário e destaca-se a presença do anel aromático, do anel piperidínico e a distância de 4 carbonos entre o N e a carboxila do ácido. Decidida a estrutura, a avaliação do melhor agente acoplante para reação de amidação de PAMAM G0 pode ser realizada.

4.6.9. Ligação de ácido BCP a PAMAM G0



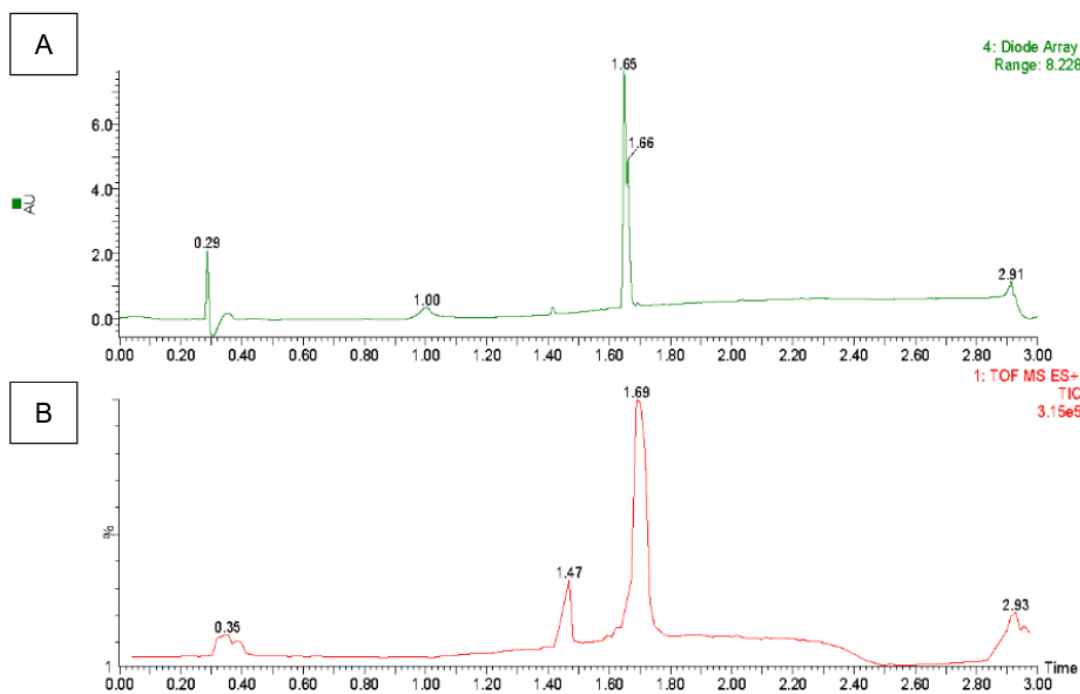
Esquema 31: amidação de ácido BCP e PAMAM G0.

A reação entre ácido BCP e PAMAM G0 foi realizada utilizando-se diferentes agentes condensantes. O primeiro a ser tentado foi T3P, porém, após 16 h de reação, uma análise por LCMS indicou que havia uma grande quantidade de ácido ainda presente e, por conta disso, conclui-se que o rendimento da reação seria próximo a zero e o conteúdo foi descartado. Em seguida, EDC (reação 200936-030) foi utilizado e após 72 h de reação, notou-se que o material de partida havia sido consumido quase que totalmente em análise de LCMS e, portanto, a

reação foi interrompida. Paralelamente, em outra reação (200936-031), cloreto de oxalila foi empregado para a formação do cloreto de ácido do material de partida, sendo o sistema acompanhado por LCMS após 2 e 16 h. Observou-se que a proporção entre ácido e potencial produto (pico com TR = 1,63 min e M/z = 749) se manteve a mesma durante o período e assim a reação foi interrompida. Ressalta-se que ainda não se sabia se havia sido formado produto, uma vez que a massa indicada pelo LCMS não correspondia à massa esperada do produto.

As duas reações foram então purificadas por HPLC preparativo e as frações coletadas foram analisadas por RMN. Duas frações de 200936-030 aparentavam conter produto, enquanto que apenas uma de 200936-031 aparentava o mesmo. Entretanto, por conta do tamanho da estrutura do dendrímero, a análise por RMN não estava clara e não havia certeza de que o obtido era o desejado. Além disso, diferentes graus de substituição poderiam ocorrer, ou seja, o dendrímero poderia se ligar com 1 a 4 moléculas de ácido BCP, o que dificulta ainda mais a análise do sistema por RMN. Assim, era necessário confirmar a formação do produto, além de determinar a pureza do obtido e o grau de substituição, para, então, realizar a elucidação dos espectros de RMN. Para tal confirmação, optou-se pela utilização de um aparelho de LCMS de alta resolução disponível na Universidade de Dundee.

O espectro de massas de alta resolução das duas frações de 200936-030 e da fração de 200936-031 foram bastante satisfatórios e permitiram a identificação dos compostos. Apenas uma das frações de 030 continha dendrímero substituído (tetra substituído, no caso), porém havia mais de um produto na amostra (Figura 62). Já a fração de 200936-031 apresentava alta pureza e a massa obtida ($(M + H)^+ = 1498,71$) correspondia ao dendrímero tetra substituído ($M = 1497,80$ g/mol), o que permitiria sua análise por RMN Figura (63).



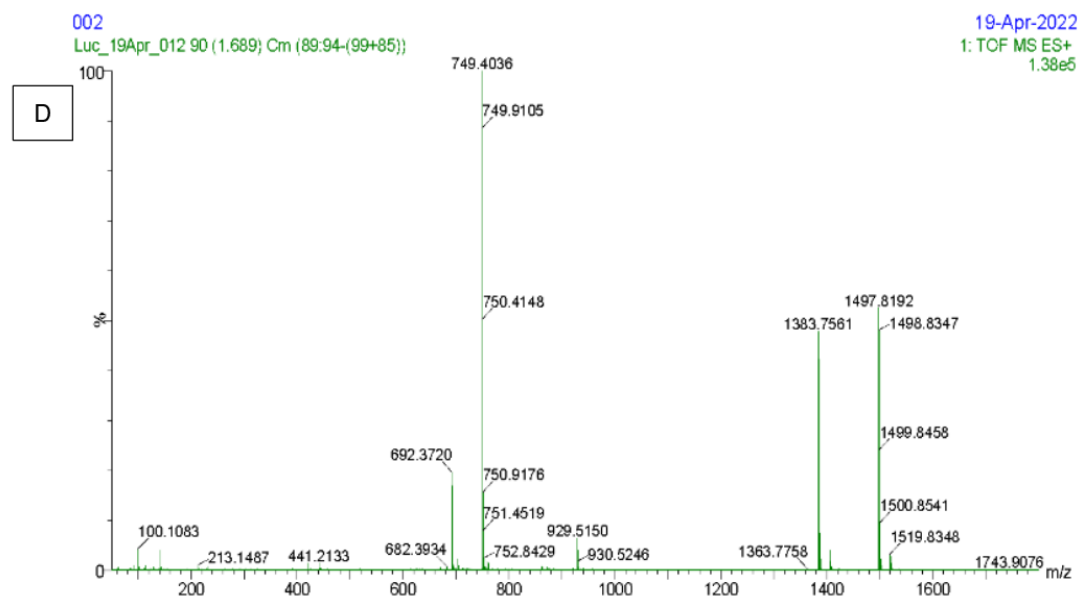
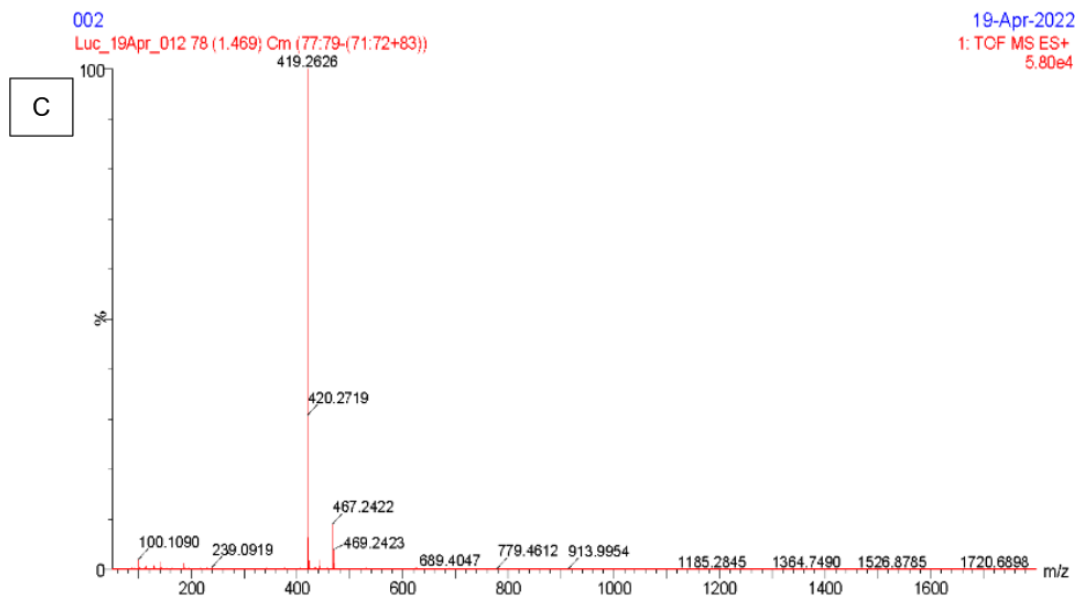
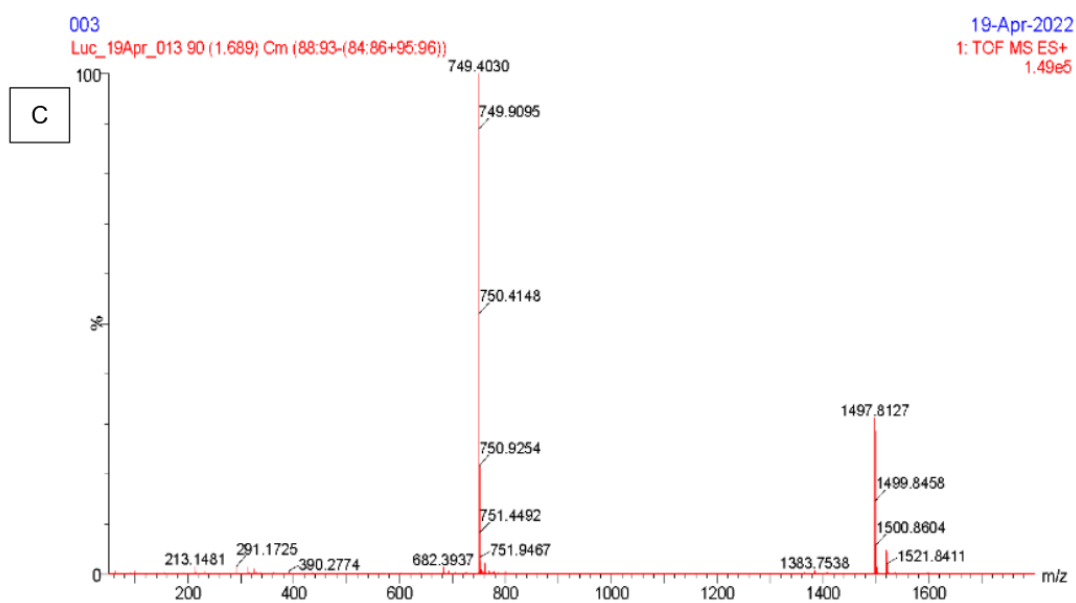
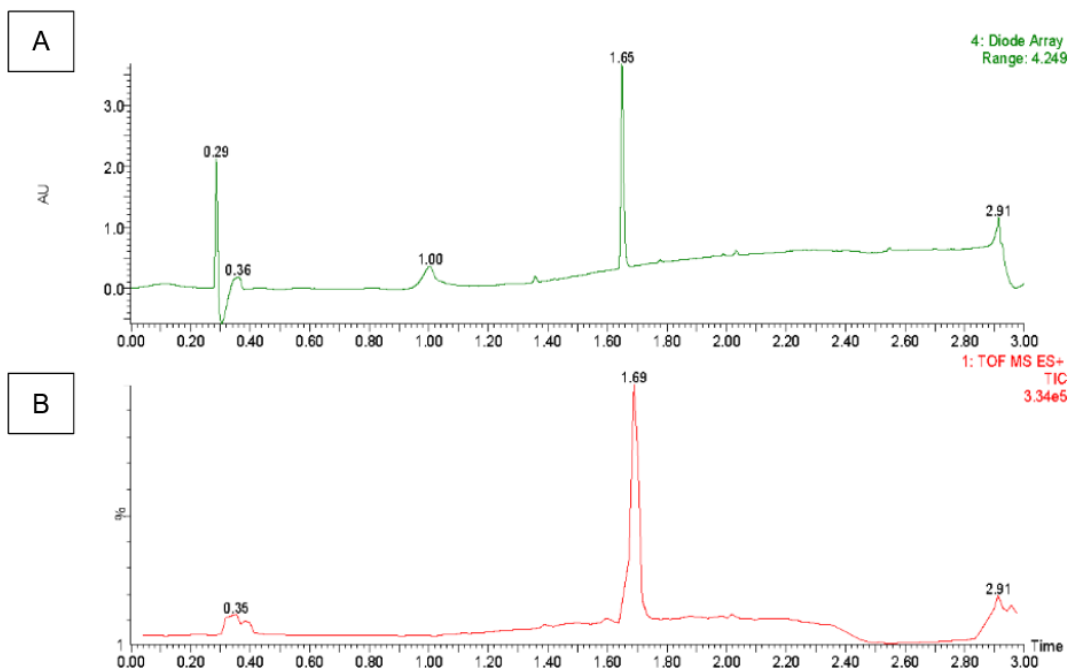


Figura 62: resultados do LCMS de alta resolução de uma fração obtida da reação 200936-030. “A” corresponde ao cromatograma obtido por detecção com luz emitida por um arranjo de diodos emissores de luz (comprimento de onda não informado). “B” é o cromatograma obtido pela corrente total de íons (TIC). “C” é o espectro de massas obtido no modo positivo do pico com TR = 1,47 min (luz). “D” é o espectro de massas obtido no modo positivo do pico com TR = 1,69 min (TIC).



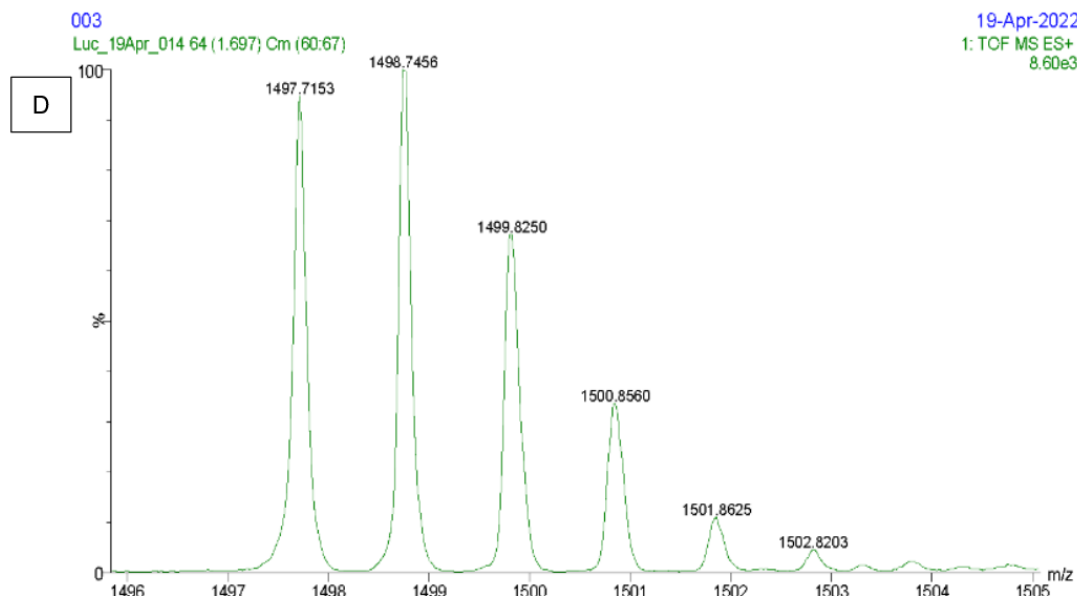


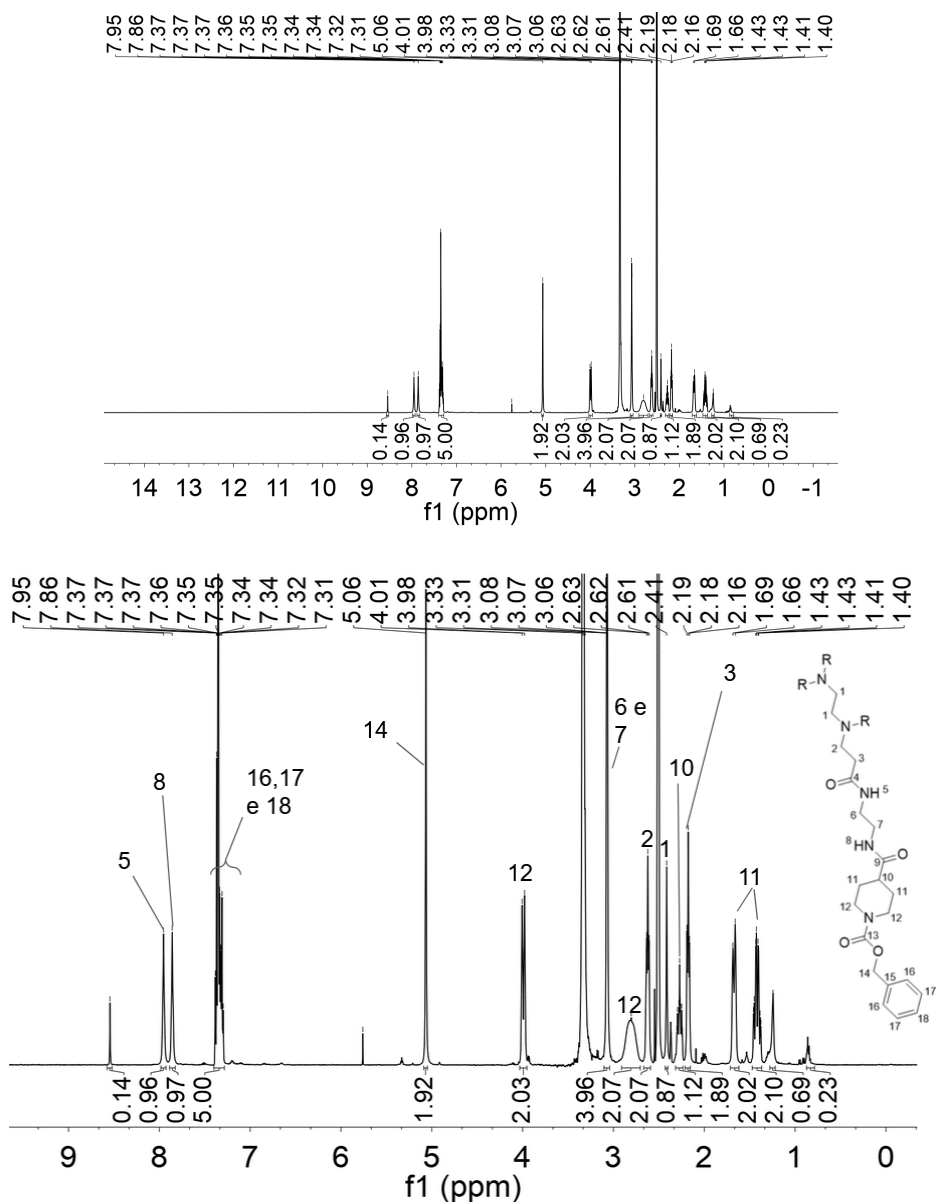
Figura 63: resultados do LCMS de alta resolução da fração obtida da reação 200936-031. “A” corresponde ao cromatograma obtido por detecção com luz emitida por um arranjo de diodos emissores de luz (comprimento de onda não informado). “B” é o cromatograma obtido pela corrente total de íons (TIC). “C” é o espectro de massas obtido no modo positivo do pico com TR = 1,69 min (TIC). “D” é a expansão do pico com massa ~1497 mostrado em “C”.

O espectro de massas de alta resolução ofereceu um bom grau de certeza da obtenção do produto, porém era necessária a análise de seu RMN para determinação estrutural. A quantidade de material obtida na reação 200936-031 era muito pequena (1,4 mg), o que deixou os sinais oriundos da molécula muito próximos da linha base do espectro. Em virtude disso, foi utilizado um aparelho de RMN com sonda criogênica (Cryo RMN) para aumento de sensibilidade (KOVACS, MOSKAU, 2013). Dada a complexidade estrutural do produto, foram realizados RMNs unidimensionais (^1H e ^{13}C -DEPT) e bidimensionais (COSY, HMBC e HSQC), os quais permitiram a atribuição dos sinais obtidos com a estrutura prevista.

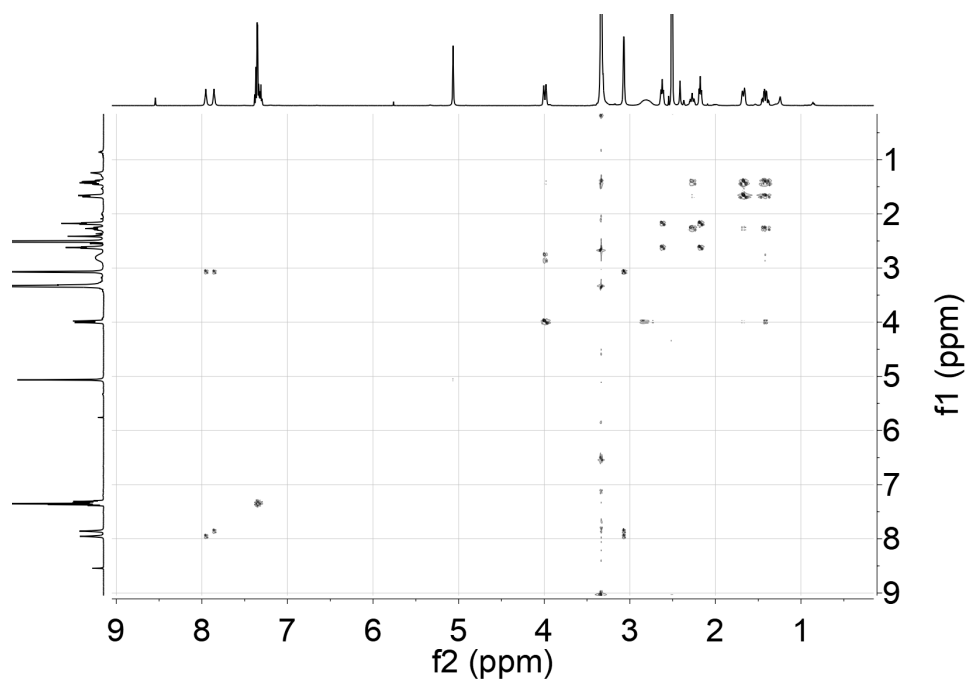
No espectro de ^1H (Espectro 17a), as integrais foram normalizadas para um braço do dendrímero. Assim, o multipletto entre 7,39 e 7,28 ppm, correspondente aos H do anel aromático do ácido BCP possui uma integral equivalente a 5 H e não 20 H como seria esperado na estrutura completa da molécula. Além dos sinais aromáticos do ácido BCP, também foram observados sinais em 5,06 (s, 2H), 4,05-3,94 (m, 2H), 2,27 (tt, $J = 11,4, 3,7$ Hz, 1H), 2,80 (bs, 2H), 1,67 (d, $J = 12,9$ Hz, 2H) e 1,48-1,36 (m, 2H), correspondentes aos outros H desta porção do produto. completam os sinais do ácido.

Quanto aos sinais do PAMAM, estes também estão presentes e com suas integrais de acordo com o padrão de tetrassubstituição, porém nem sempre a multiplicidade obtida correspondeu com a esperada. Por exemplo, há o simpleto em 2,41 ppm e com integral para 1 H, o qual corresponde aos H do núcleo central do dendrímero de PAMAM. A integral obtida

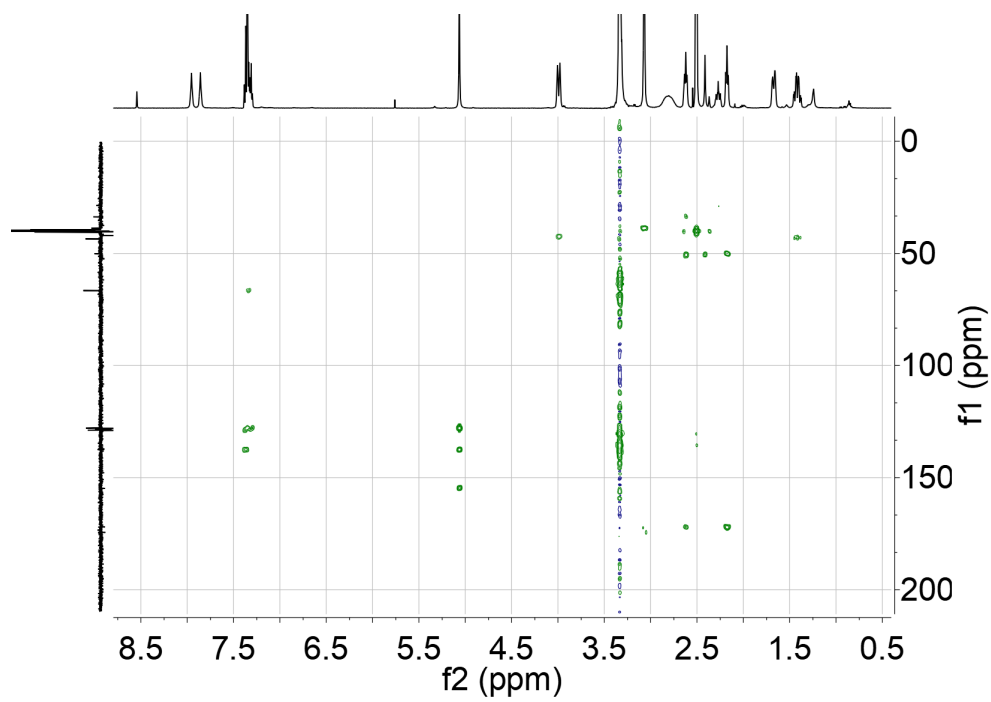
está de acordo com o esperado para a estrutura final, porém a multiplicidade esperada era a de um tripleto. Tal diferença pode ser oriunda da resolução do espectro obtido e da complexidade estrutural da molécula. Em casos como esse, a atribuição se baseou em outras evidências dos espectros de COSY (Espectro 17b), HMBC (Espectro 17c) e HSQC (Espectro 17d). Utilizando-se novamente o sinal em 2,41 ppm como exemplo, nota-se, pelo HSQC, que tal sinal corresponde a um CH₂ e que está acoplado com um sinal de C em 51,21 ppm, já no espectro de COSY, notamos que o H do sinal em 2,41 ppm não acopla com nenhum outro H diferente de si, o que ocorre apenas com H1 e H14. Por fim, no espectro de HSQC, nota-se que o sinal em 2,41 ppm não acopla a C em região aromática, e, portanto, tal sinal só pode corresponder ao H1.

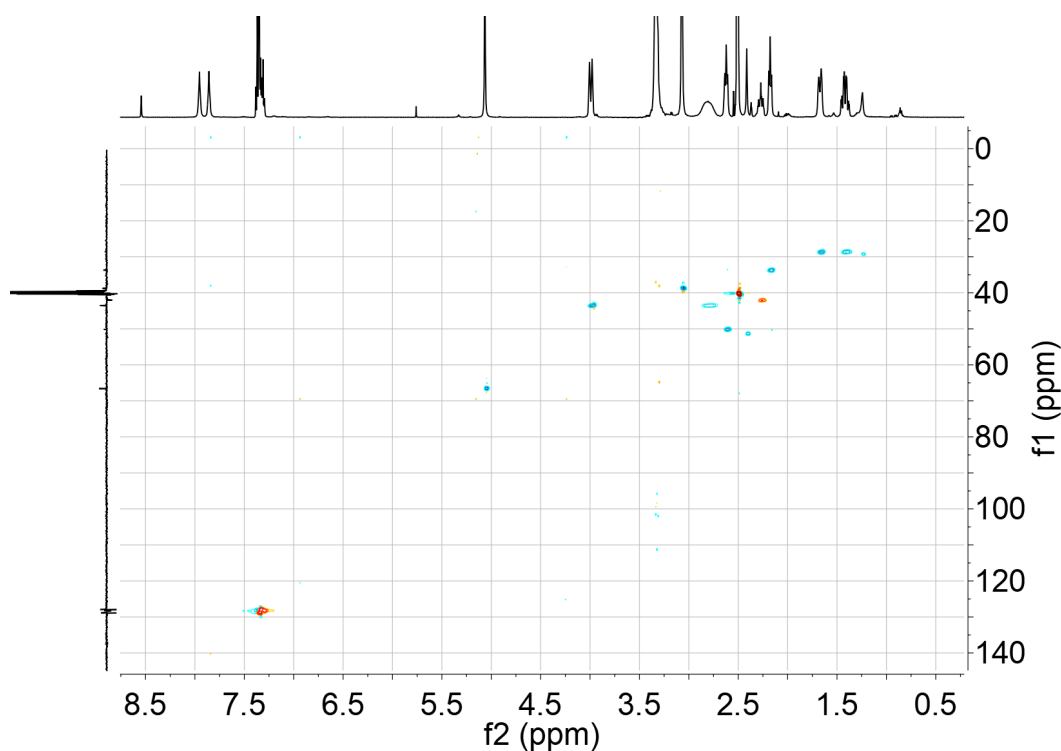


Espectro 17a: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) do dendrímero tetrassubstituído com ácido BCQ. Acima, encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

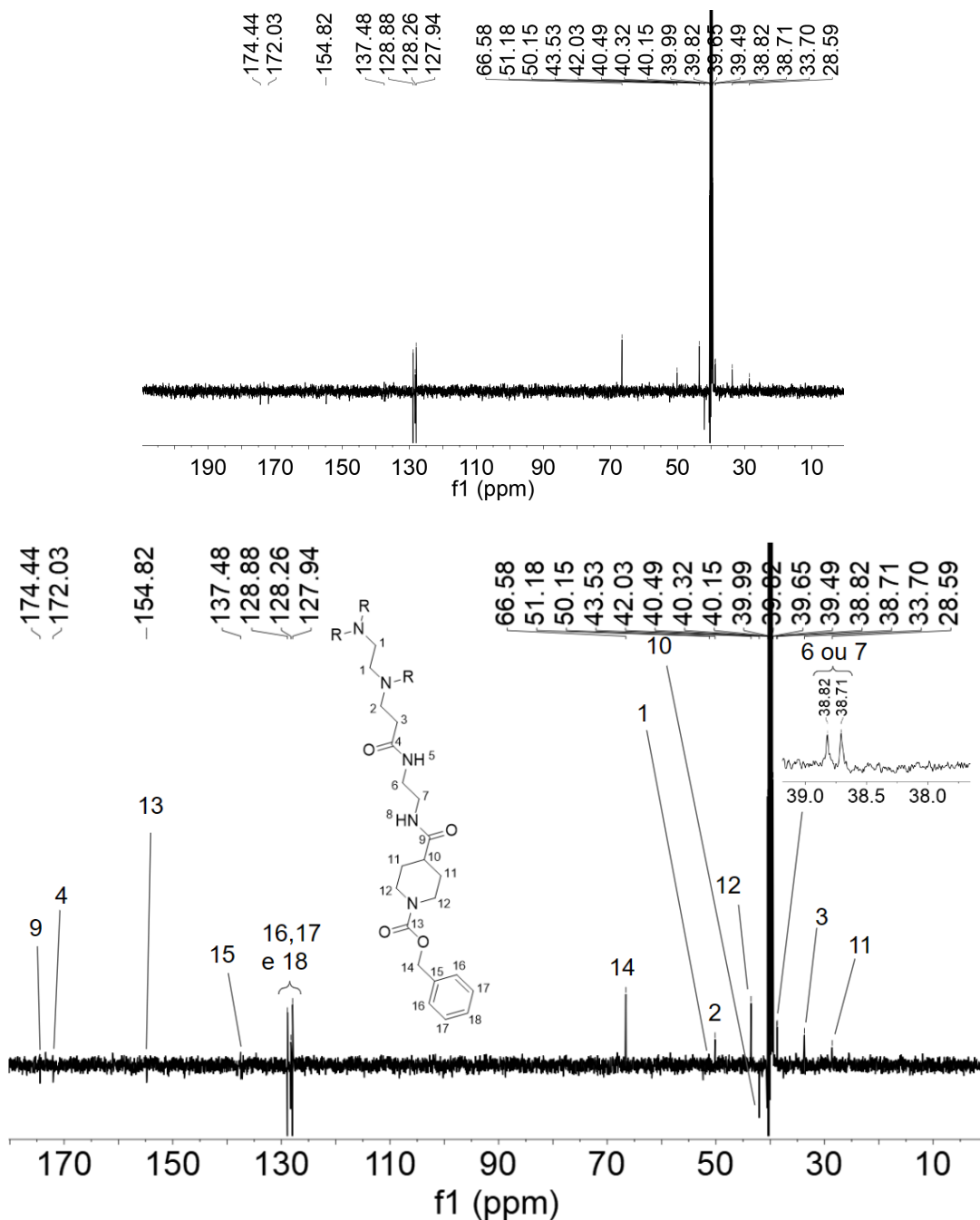


Espectro 17b: espectro COSY de RMN de MQMS do dendrímero tetrassubstituído com ácido BCQ



Espectro 17c: espectro HMBC de RMN do dendrímero tetrassubstituído com ácido BCQ**Espectro 17d:** espectro HSQC de RMN do dendrímero tetrassubstituído com ácido BCQ. Em laranja estão indicados H ímpares (CH e CH₃) e, em azul, H pares (CH₂)

Apesar da utilização de uma sonda criogênica para realização dos RMN, alguns sinais obtidos no espectro de ¹³C DEPT (Espectro 17e) possuem uma intensidade muito baixa e só puderam ser identificados pela análise do HSQC ou do HMBC. De qualquer forma, notam-se sinais em 174,44 ppm, 172,03 ppm, correspondente às duas amidas da molécula, e 154,82 ppm, correspondente carbamato, o que sugere a obtenção do produto desejado. Em relação a esses sinais, foi observada uma incongruência com o esperado, uma vez que encontram-se invertidos, enquanto que o esperado era que possuísem o sentido normal (acima da linha base, no mesmo sentido de sinais provenientes de CH₂). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de o espectro encontrar-se fora de fase, o que pode ser observado nos sinais entre 127 e 129 ppm. Nessa região, são esperados 3 sinais invertidos (CH do anel aromático) e um no sentido normal, porém os sinais invertidos possuem uma componente invertida e outra no sentido normal, evidenciando o problema de fase. Outro fator que sugere que os sinais abaixo de 154 ppm sejam sinais de carbonila com o sentido invertido por um erro de fase é o fato de que, no HSQC, eles não estão correlacionados a nenhum H, ao mesmo tempo que é possível vê-los correlacionados com hidrogênios esperados no HMBC.



Espectro 17e: espectro de ^{13}C (modo DEPT; 126 MHz, DMSO-D_6) do dendrímero tetrassubstituído com ácido BCQ. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições

Por meio dessas evidências, concluiu-se que o obtido correspondia ao produto desejado e os espectros e cromatogramas obtidos foram utilizados como padrão para os produtos das outras reações utilizando-se diferentes condições reacionais (Tabela 8).

Tabela 8: condições reacionais exploradas para a amidação de ácido BCQ e PAMAM G0 após a obtenção de produto pelo uso de cloreto de oxalila.

ID reação	Amina	Eq.	Ácido	Eq.	Agente acoplante	Eq.	Base	Eq.	Solvente	Rendimento
200936-036	PAMAM	1	BCP	4,1	Cloreto de oxalila/DMF	4,4	Et ₃ N	4,5	MeCN	33%
200936-037	PAMAM	1	BCP	4,1	Cloreto de oxalila/DMF	4,4	Et ₃ N	4,5	THF	0%
200936-041	PAMAM	1	BCP	4,1	TCFH/NMI	4,6/ 12,7	-	-	MeCN	25%
200936-043	PAMAM	1	BCP	4,1	Cloreto de oxalila/DMF	4,4	DBU	9	MeCN	0%

Após o sucesso da reação com cloreto de oxalila, repetiu-se a reação (200936-036) com o objetivo de se confirmar o rendimento obtido pela reação 200936-031. A repetição apresentou um rendimento aparente consideravelmente maior (33% vs. 2,5%), entretanto, a análise do produto obtido na reação 200936-036 por RMN indicou que ele poderia estar contaminado por dendrímico não substituído. Essa conclusão se deu pelo fato de os sinais obtidos no RMN de 200936-036 serem os mesmos de 200936-031, porém, as integrais diferiram do esperado.

O solvente utilizado na reação foi substituído para THF na 200936-037, dado que MeCN não era capaz de solubilizar completamente o sistema, entretanto, tal mudança fez o rendimento cair para 0%. Isso provavelmente se deve a uma solubilidade ainda menor dos materiais de partida nesse solvente. Outra mudança tentada foi a troca da base utilizada por DBU, que possui maior pKa do que Et₃N e é mais básico, portanto (TSHEPELEVITSH et al., 2019). O objetivo dessa mudança era garantir que as aminas de PAMAM estivessem desprotonadas no meio reacional, permitindo a reação com o cloreto de ácido (CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012) e aumentando o rendimento reacional. Contrário ao esperado, a reação com DBU apresentou um rendimento de 0% e, portanto, conclui-se que os baixos rendimentos obtidos não eram ocasionados pela protonação das aminas de PAMAM no meio reacional.

Por fim, também tentou-se utilizar a combinação TCFH/NMI como agente condensante na reação 200936-041, dado que tal combinação possui efetividade em sistemas com impedimento estérico e aminas pouco nucleófilas. Para essa reação, não foi utilizada nenhuma base além de NMI, conforme indicado na literatura disponível (BEUTNER et al., 2018). Tal combinação levou a formação bem sucedida de produto com um rendimento de 25%, que é comparável ou superior ao rendimento de 200936-036 após considerar que o produto obtido nesta reação estava potencialmente contaminado com PAMAM não substituído.

Apesar do sucesso das reações realizadas com cloreto de oxalila e TCFH/NMI, o rendimento obtido foi insatisfatório. Combinando-se o rendimento para a obtenção de MQSuc com o rendimento obtido no acoplamento de ácido BCQ e PAMAM G0, seria esperado um

rendimento final de ~10% para a reação o acoplamento de MQ com PAMAM G0 utilizando-se o espaçante succínico. Esta situação faria com que grandes quantidades de MQ fossem necessárias e isto implicaria em um alto custo. Ao mesmo tempo, a equipe responsável pelo treinamento dos estudantes na Universidade de Dundee concordou que a diversidade de reações nessa rota de síntese é baixa, reduzindo as oportunidades de aprendizado. Nesse sentido, a síntese de derivados de 498 e a tentativa de ligação dessas moléculas com o dendrímero seria muito mais frutífera do ponto de vista do aprendizado possível, além de ser menos onerosa do ponto de vista financeiro. Por conta disso, os trabalhos com MQ foram interrompidos e todos os esforços sintéticos foram direcionados para os trabalhos com derivados de 498.

4.6.10. Avaliação da REA de 498

De forma a se evitar a perda de atividade na ligação de análogos de 498 com espaçantes ou com PAMAM G0, foi necessária uma avaliação da REA desses compostos para a identificação de regiões com pouco impacto na atividade contra *P. falciparum*. Para essa análise, outros fatores como solubilidade e permeabilidade não foram levados em conta, pois a ligação com o dendrímero/espaçante mudaria consideravelmente a estrutura da molécula e, por consequência, também mudaria essas propriedades (SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016).

Assim, com base nesses princípios, analisou-se a atividade biológica da série de compostos que levou à identificação de 498 (BARAGANA et al., 2016) e, a partir dela, duas regiões foram identificadas para a ligação dos espaçantes (Figura 64). A primeira consiste na posição do F presente no anel quinolínico (posição 6 do anel), pois notou-se que o F não é essencial para a atividade, sendo importante apenas para a modulação da permeabilidade do composto. A segunda região consiste no anel aromático ligado à quinolina, sendo que foi constatado pelo estudo original que tal região permite certa flexibilidade sem perda de atividade antimalárica.

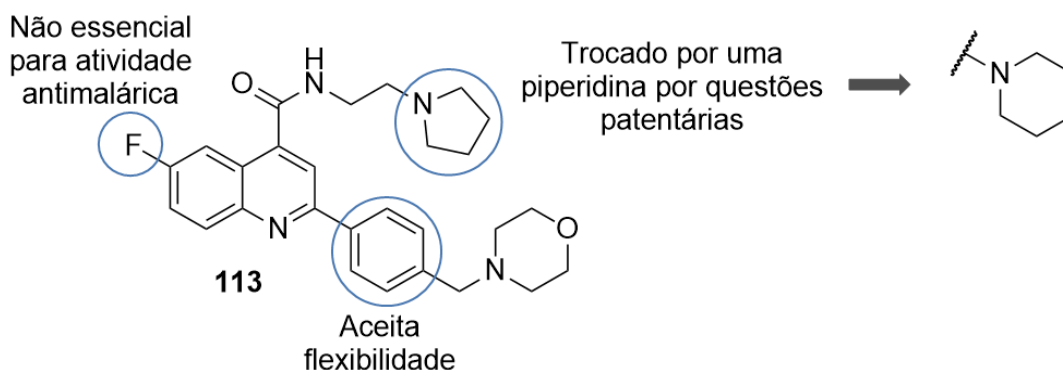


Figura 64: regiões identificadas na avaliação da REA de 498 como propícias para modificações com objetivo de ligar derivados do candidato a fármaco com espaçantes ou dendrímeros e região modificada para síntese de compostos fora da patente de 498.

Antes da síntese dos derivados de 498, foi realizada uma última constatação. Por questões patentárias, a síntese de 498 não pode ser realizada na UoD e, portanto, a pirrolidina presente na molécula original foi substituída por uma piperidina (Figura 64), resultando na molécula denominada 498P, uma vez que isso não resultaria numa perda significativa de eficácia (BARAGAÑA et al., 2016) e um composto fora da patente seria obtido (GILBERT, 2013).

Nesse contexto, para o acoplamento de 498P e análogos a PAMAM G0, optou-se, inicialmente, por reações de substituição nucleofílica aromática (S_NAr). Nessa reação, a amina livre de PAMAM G0 substituiria o flúor de análogos de 498P (Figura 65), formando uma ligação C-N que uniria as duas moléculas. A vantagem dessa opção consiste no fato de que não é necessária a adição de espaçantes entre a molécula ativa e o dendrímero, reduzindo o número de etapas sintéticas necessárias. Essa reação foi considerada adequada para o sistema, pois F é o halogênio mais reativo em reação de S_NAr (CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012; VOLLHARDT, SHORE, 2007) e o átomo não é essencial para a atividade antimálarica.

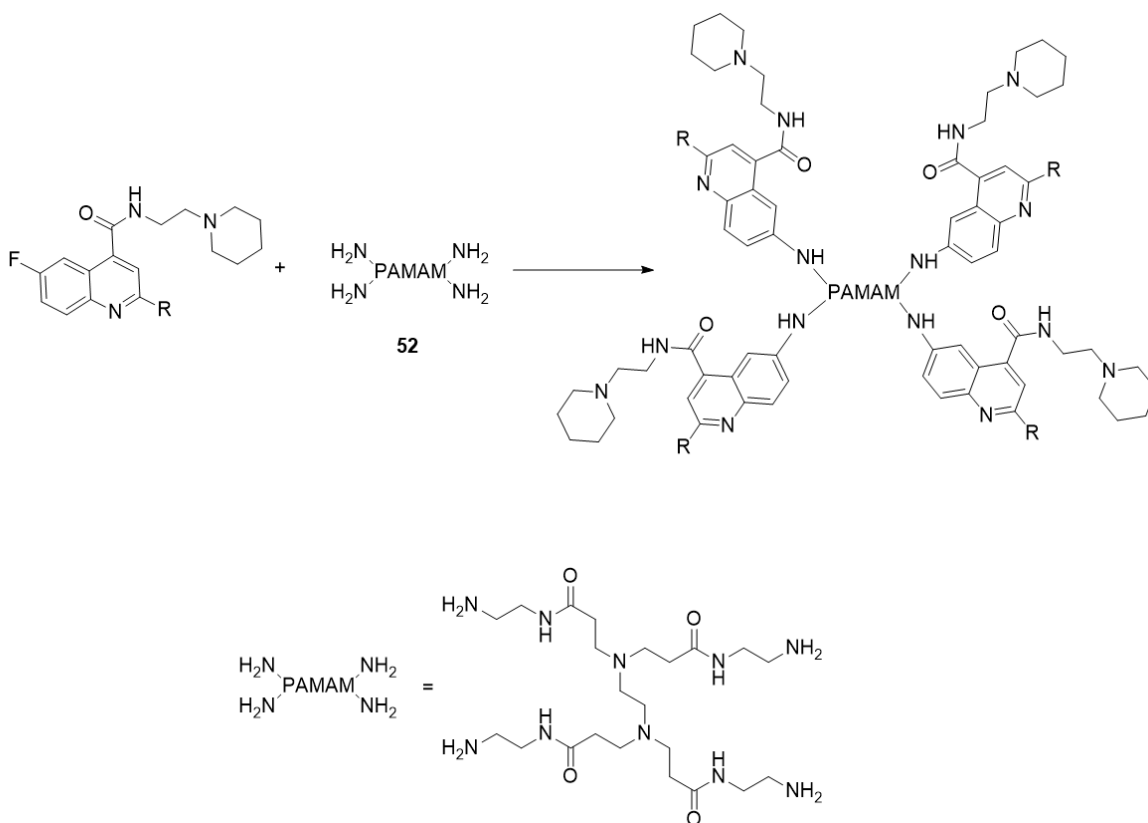
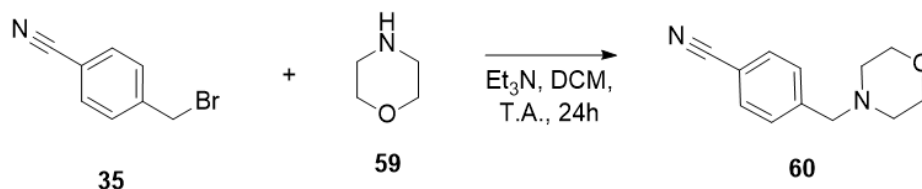


Figura 65: reação de S_NAr entre análogos de 498P e PAMAM G0.

4.6.11 Síntese de 4-(morfolinometil)benzonitrila



Esquema 32: substituição nucleofílica de 4-(bromometil)benzonitrila e morfolina.

O primeiro composto sintetizado para o acoplamento com PAMAM foi 498P, por ser a molécula que menos se desvia estruturalmente de 498.

A síntese de 498 se inicia pela reação de 4-(bromometil)benzonitrila com morfolina para construção da cadeia lateral na posição 2 da quinolina (BARAGAÑA et al, 2016). Após a substituição nucleofílica ocorrer no composto bromado, o produto formado terá a nitrila convertida a uma cetona em uma reação de Grignard para a reação com 5-fluoroisatina. Assim, 4-(morfolinometil)benzonitrila foi sintetizada conforme a literatura (BARAGAÑA et al, 2016) e a reação foi acompanhada por LCMS. Após 24 h da adição dos reagentes (Figura 66), observou-se consumo total de 4-(bromometil)benzonitrila e formação de produto (TR = 0,42; M/z = 203; positivo).

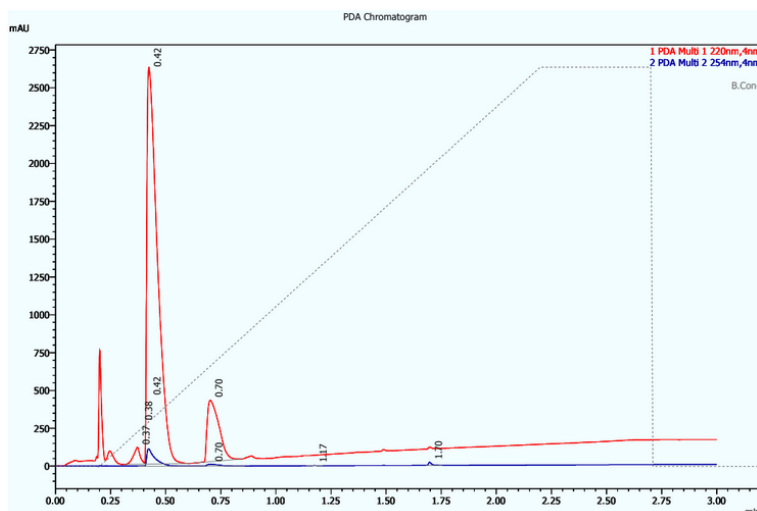
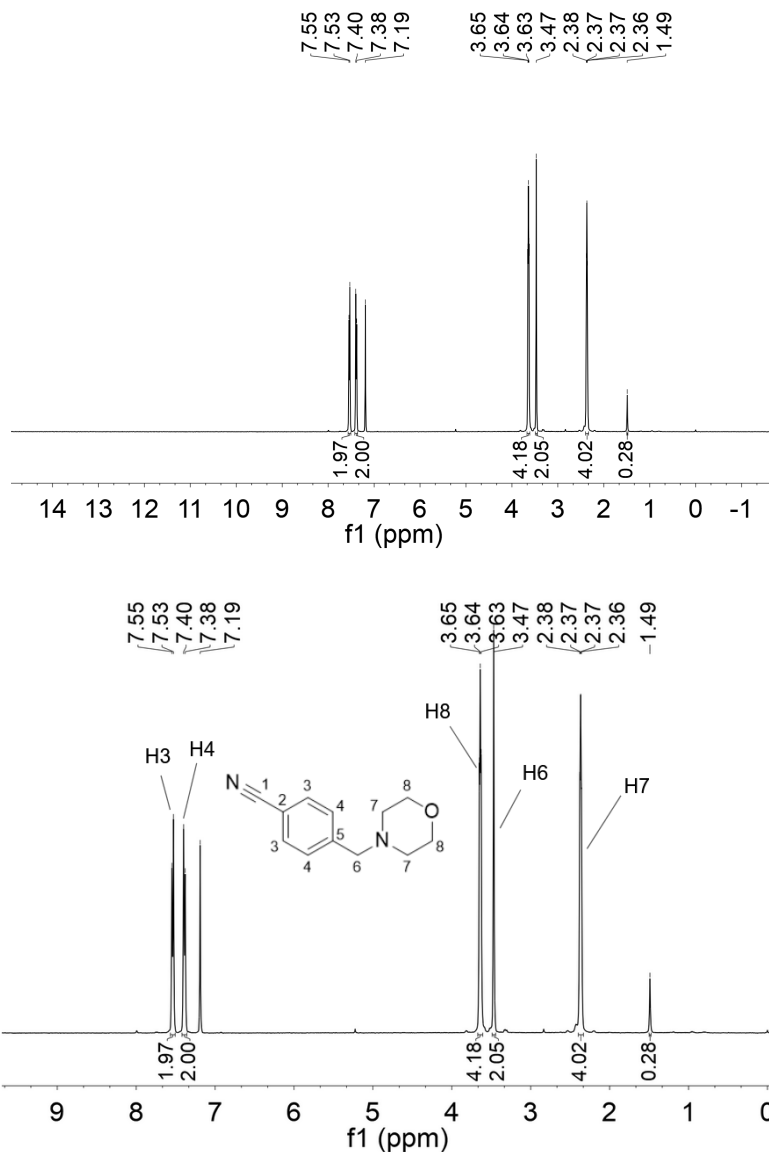


Figura 66: cromatograma da análise de LCMS da substituição nucleofílica de 4-metilacetofenona. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

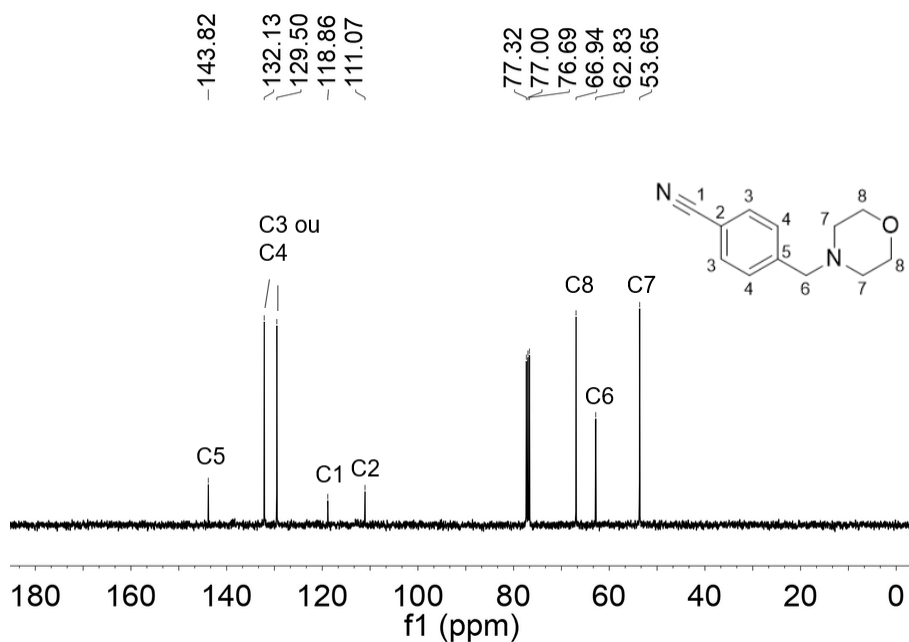
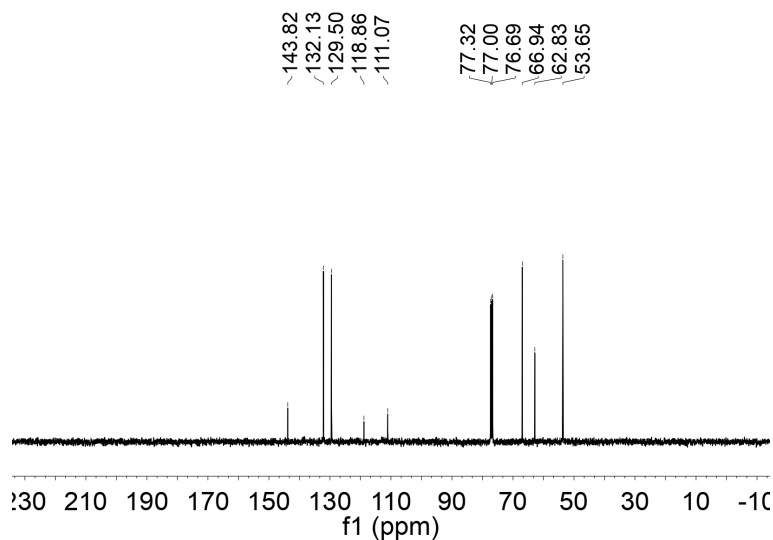
A obtenção do produto foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C e espectro de massas. No RMN de ^1H (espectro 19a), foram observados sinais em região de aromáticos (7,19-7,53 ppm) com integral para 4 H no total, simpleto em 3,47 ppm com integral para 2H corresponde a ponte

de CH₂ entre o anel aromático e a morfolina e dois sinais com integral para 4 H (um em 3,64 e outro em 2,37 ppm) correspondentes aos hidrogênios da morfolina.



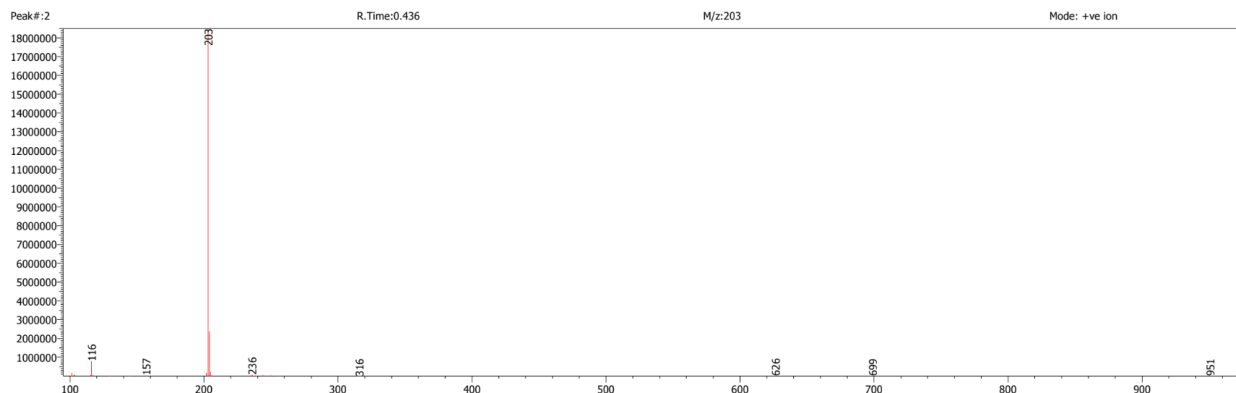
Espectro 19a: espectro de RMN de ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) de 4-(morfolinometil)benzotrila. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

O espectro de ¹³C também confirmou a obtenção do produto. Foram identificados 8 sinais, 5 deles em região acima de 110 ppm, correspondente a sinais de C aromáticos e ao C da nitrila (PAVIA et al, 2009), além de 3 sinais alifáticos em 66,94, 62,83 e 53,65 ppm, todos com deslocamento em regiões de menor campo quando comparados a alcenos, indicando que são carbonos ligados a heteroátomos eletronegativos.



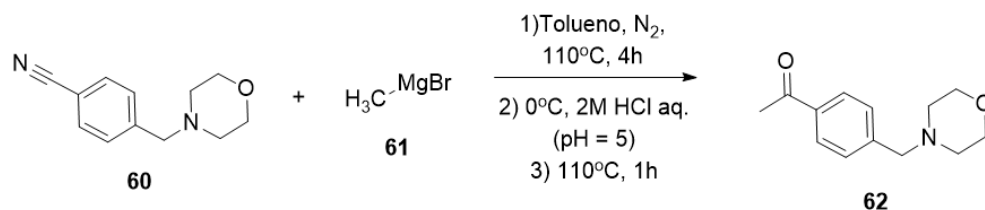
Espectro 19b: espectro de RMN de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) de 4-(morfolinometil)benzonitrila. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Por fim, o espectro de massas do LCMS indicou um pico em 203 u no modo positivo, o qual corresponde a $(\text{M} + \text{H})^+$. Esse dado reforçou a obtenção do produto desejado.



Espectro 19c: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

4.6.12 Síntese de 1-(4-(morfolinometil)fenil)etan-1-ona



Esquema 33: reação de Grignard para formação de 1-(4-(morfolinometil)fenil)etan-1-ona.

Sintetizada a 4-(morfolinometil)benzonitrila, foi necessário converter a nitrila em uma cetona para a formação posterior do núcleo quinolínic de 498. Essa transformação foi realizada utilizando-se cloreto de metilmagnésio em refluxo de tolueno, seguido da adição de ácido clorídrico aquoso e mais um período de refluxo. O conteúdo reacional foi lavado com diferentes soluções aquosas e a presença do produto foi confirmada por LCMS (Figura 67 - TR = 0,69 min; M/z = 220; positivo).

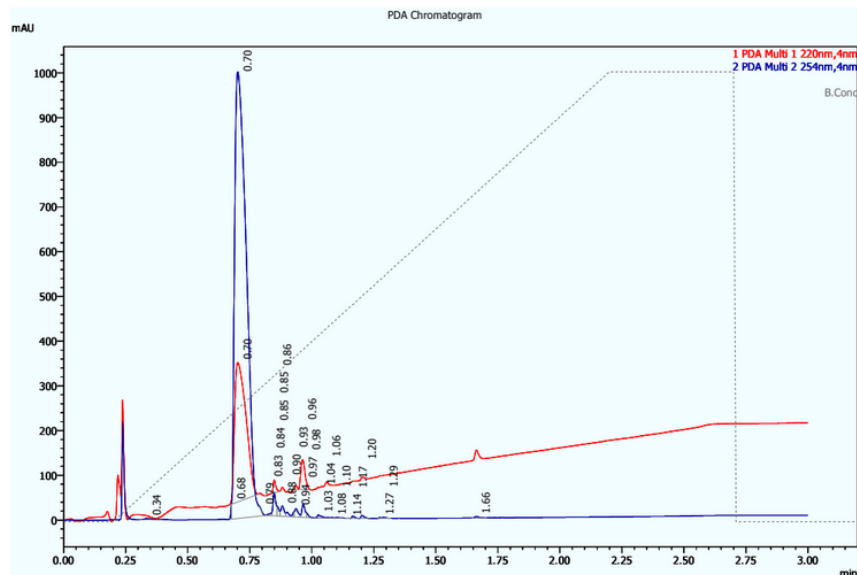
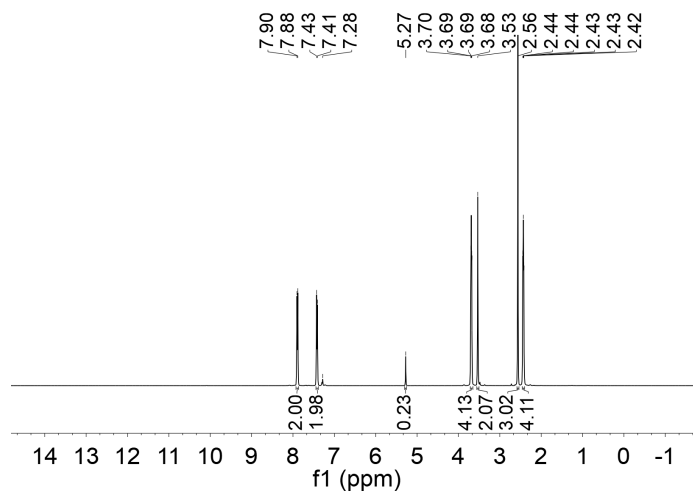
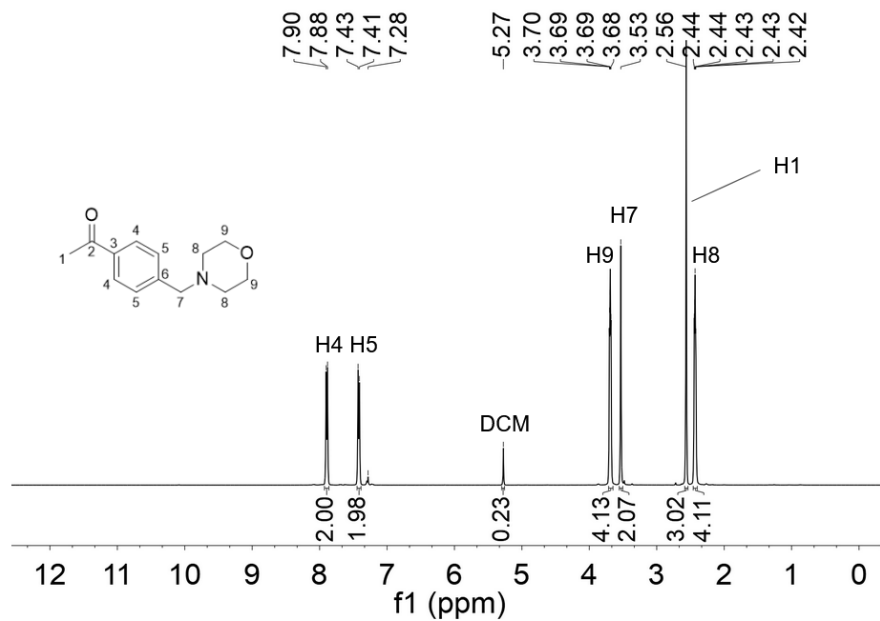


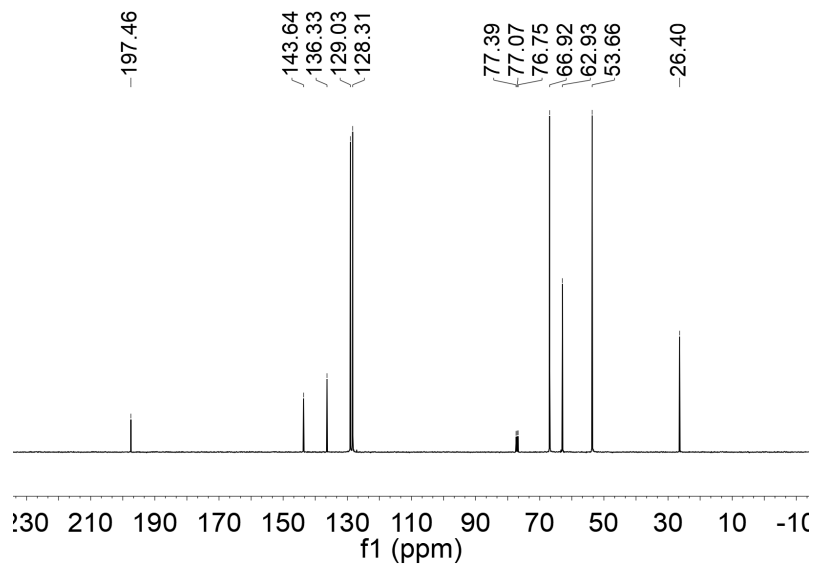
Figura 67: cromatograma da análise de LCMS da reação de Grignard. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

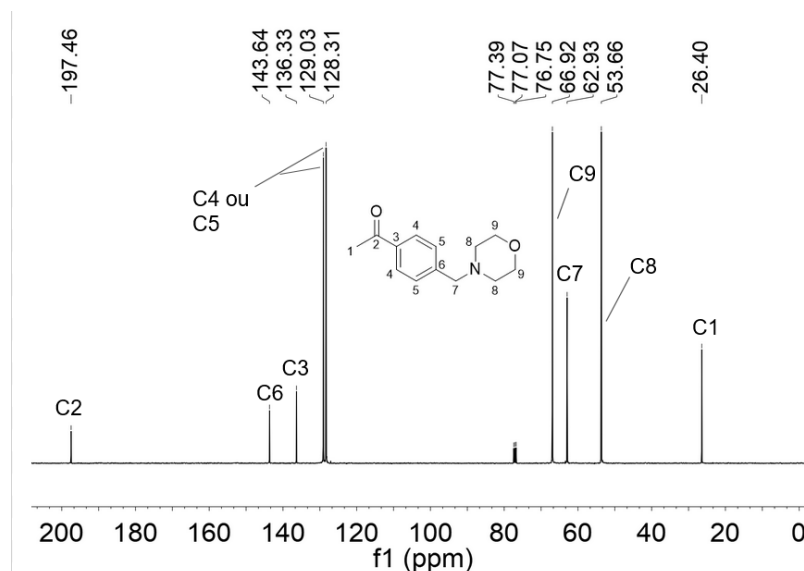
Após a purificação do produto por cromatografia *flash*, foi realizado um RMN de ^1H e um de ^{13}C para confirmação estrutural. O espectro de ^1H possui grande semelhança com o espectro de ^1H de 4-(morfolinometil)benzonitrila, entretanto há a presença de um novo simpleto em 2,56 ppm com integral para 3 H, o qual indica a presença da metila cetônica. Também foi observada uma contaminação do produto com DCM pela presença de um sinal em 5,27ppm. Quanto ao espectro de ^{13}C , também foi observada grande semelhança com o espectro de 4-(morfolinometil)benzonitrila, porém com o aparecimento de 2 novos sinais. O sinal novo em 197,46 ppm confirma a presença da cetona, enquanto que o sinal em 26,40 ppm corresponde à metila cetônica. Esses dados associados ao espectro de massas obtido no LCMS que indicou massa de 220 u para o íon $(\text{M}+\text{H})^+$, conclui-se que o produto foi obtido e com um rendimento satisfatório (74%).



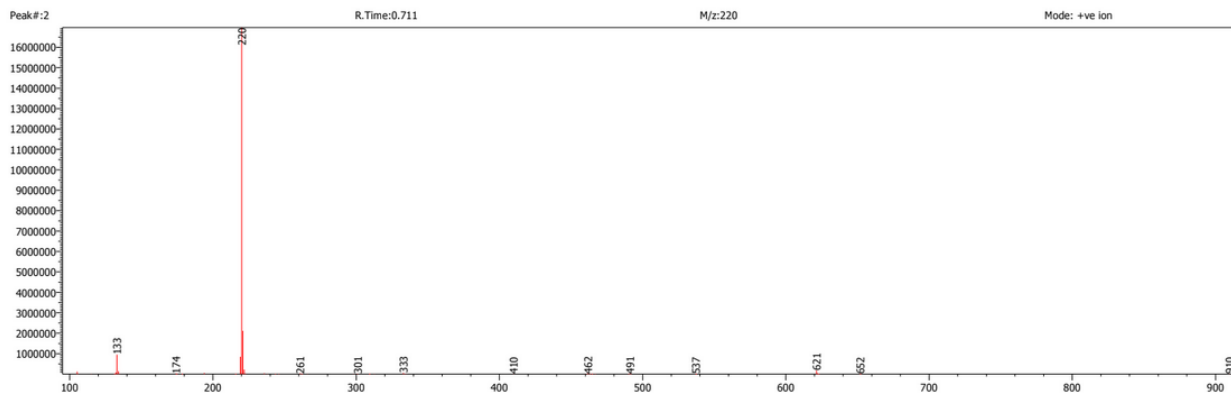


Espectro 20a: espectro de RMN de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de 1-(4-(morfolinometil)fenil)etan-1-ona. Os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



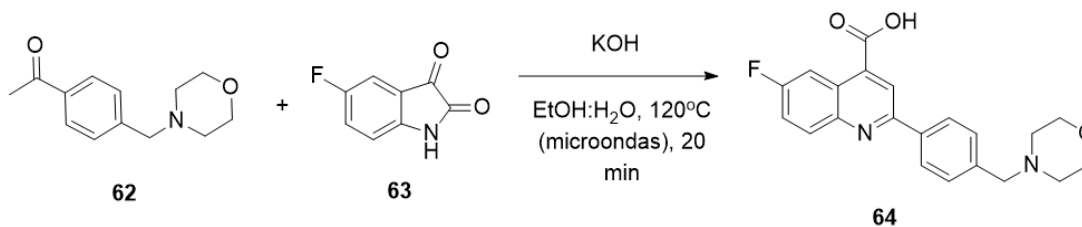


Espectro 20b: espectro de RMN de ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) de 1-(4-(morfolinometil)fenil)etan-1-ona. Os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 19c: espectro de massas obtido por LCMS do produto com o detector no modo positivo.

4.6.13 Síntese de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico

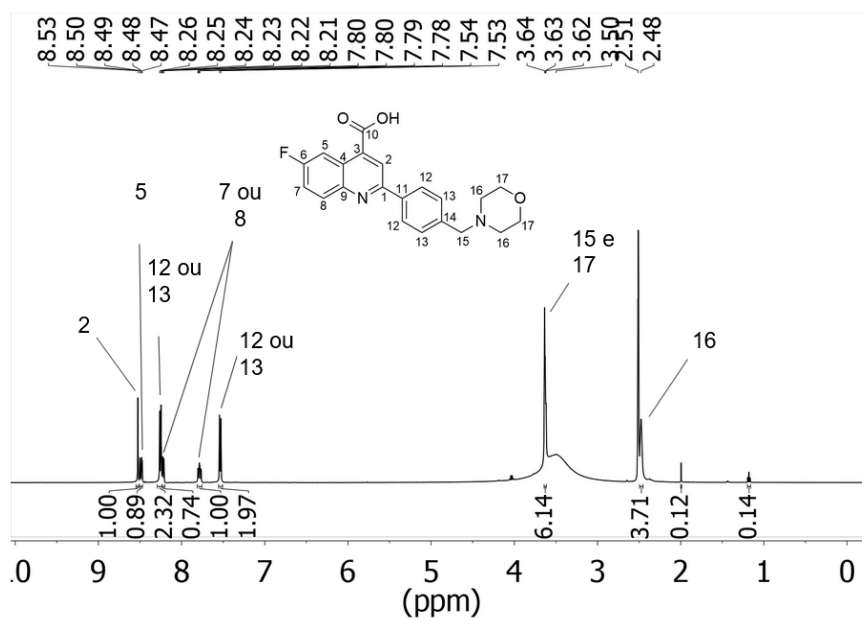
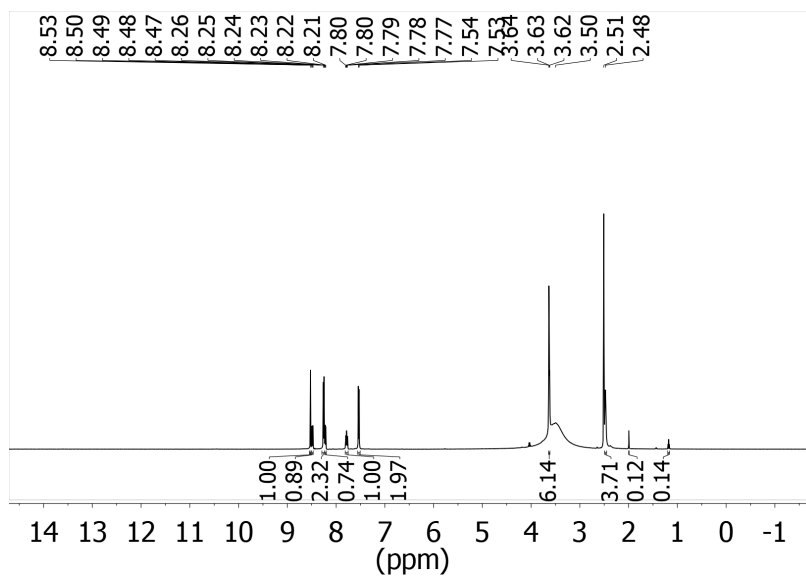


Esquema 34: reação de expansão de anel para síntese de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico

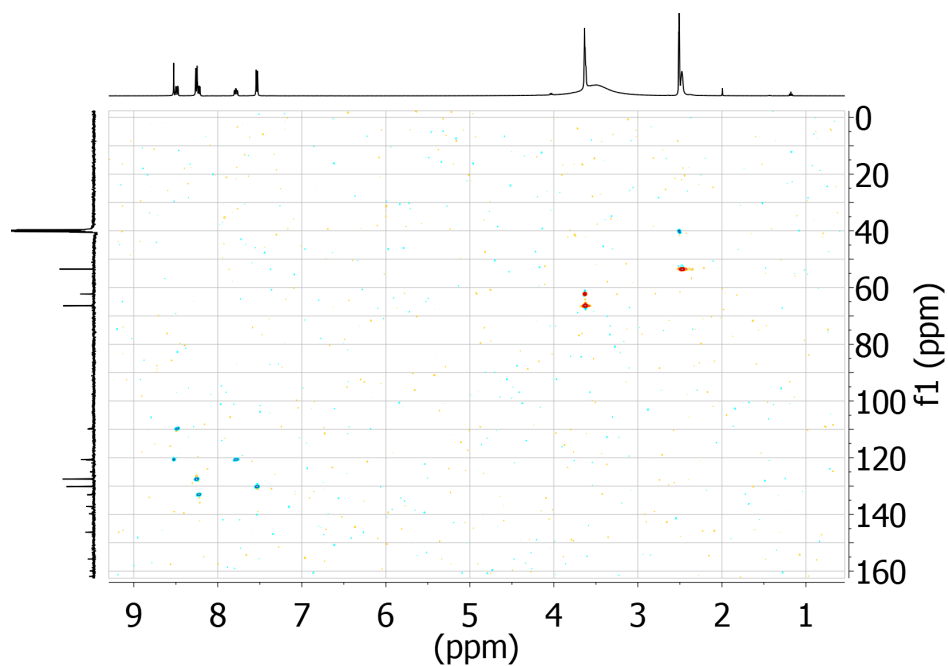
Após a síntese da cetona de interesse, utilizou-se 1-[4-(morfolinometil)fenil]etanona para a primeira reação com 5-fluorisatina para formação da quinolina. Essa reação foi realizada em um reator de microondas, conforme descrito na literatura (BARAGAÑA et al, 2016). Após precipitação e filtração do produto, análises de RMN (^1H , ^{13}C e HSQC) e de espectrometria de massas confirmaram a estrutura.

O RMN de ^1H (espectro 22a) possui um sinal largo em 3,50 ppm e que dificultou a análise na região alifática. Analisando-se o espectro de HSQC (espectro 22b), nota-se que esse sinal não está associado a nenhum carbono e que, portanto, pode ser causado por água na amostra (FULMER et al., 2010). Também foi possível observar que o sinal alifático em 3,64 – 3,61 (m, 6H) é, na verdade, uma sobreposição de sinais de hidrogênio de dois CH_2 diferentes, enquanto que 2,48 (s, 4H) é um sinal de apenas um CH_2 . Com base nisso, foi possível atribuir o sinal em 3,64 – 3,61 (m, 6H) ao H17 e H15, enquanto que 2,48 corresponde ao H16. Em relação aos H em região aromática, foi possível atribuir os sinais em 8,25 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H) e 7,54 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H) a H12 e H13. A atribuição de H5 e H2 foi possível pela associação com o HSQC e o espectro de ^{13}C (Espectro 22c), além do auxílio da predição gerada *software* ChemDraw Professional versão 18. Pela predição, o deslocamento para o C5 deve ser próximo de 109 ppm que é significativamente menor do que os outros carbonos aromáticos da molécula. No espectro obtido de ^{13}C , observamos dois sinais em 109,89 e 109,70 ppm e notamos no HSQC que eles acoplam com o sinal 8,49 ppm (dd, $J = 11,0, 3,0$ Hz, 1H). Portanto, esses dois sinais devem ser um duplete (causado pelo F (PAVIA et al., 2009)) e correspondem a C5. Consequentemente, o sinal em 8,49 ppm corresponde ao H5 e o simpleto em 8,53 deve corresponder a C2. Os sinais restantes no espectro de ^1H - 8,24 – 8,16 (m, 1H), 7,78 (td, $J = 8,5, 3,0$ Hz, 1H) - correspondem a H7 e H8, não sendo possível a atribuição exata de cada um.

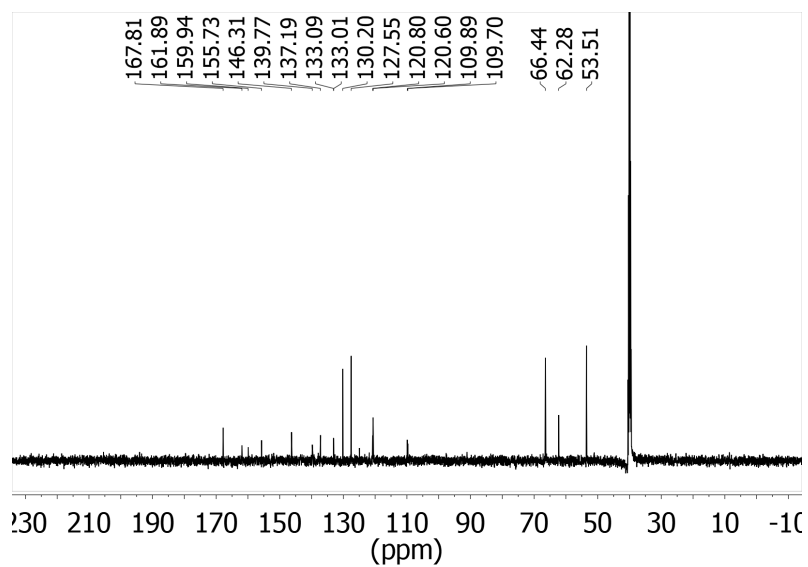
Já no espectro de ^{13}C , não foi possível a atribuição de todos os sinais, porém observou-se o sinal em 167,81 ppm, que corresponde à carboxila do ácido (C10). A previsão do ChemDraw permitiu a identificação de C6 (161,89 ppm) e C5 (109,80 ppm - d, $J = 24,5$ Hz). Atribuiu-se também os sinais correlacionados a hidrogênios no HSQC. O espectro de massas obtido por LCMS (espectro 22d) do produto também indicou a formação da molécula de interesse, sendo observado um pico em 367, correspondente a $(\text{M} + \text{H})^+$.

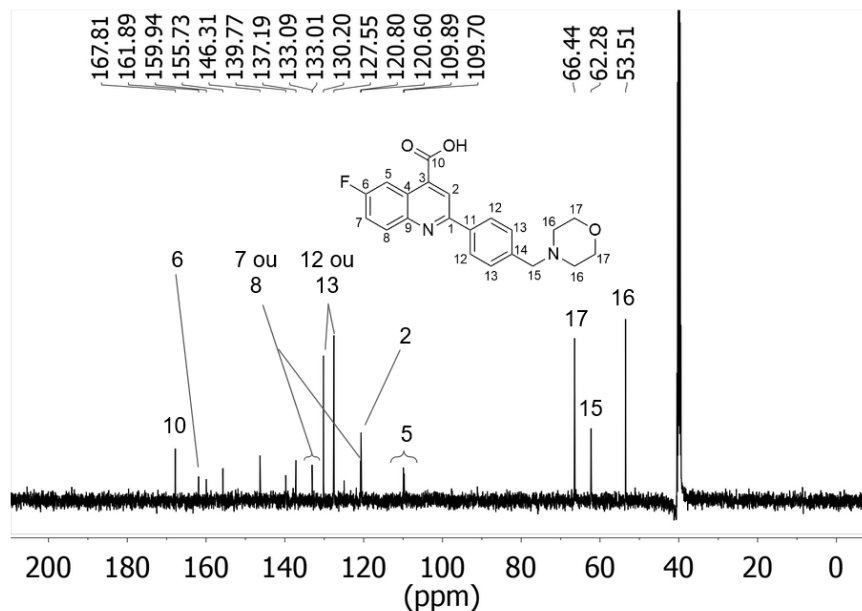


Espectro 22a: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

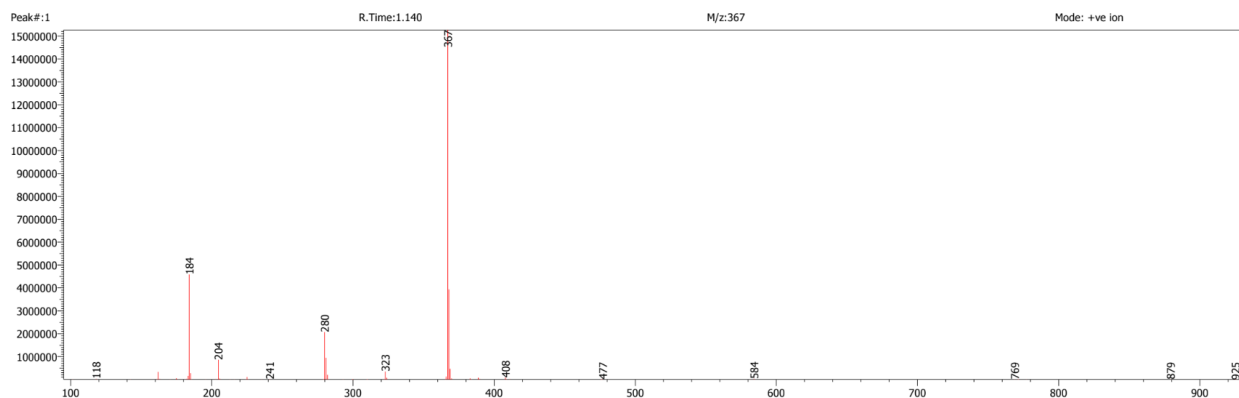


Espectro 22b: espectro de RMN HSQC de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico. Azul indica hidrogênios ímpares (CH e CH_3) e laranja indica hidrogênios pares (CH_2).





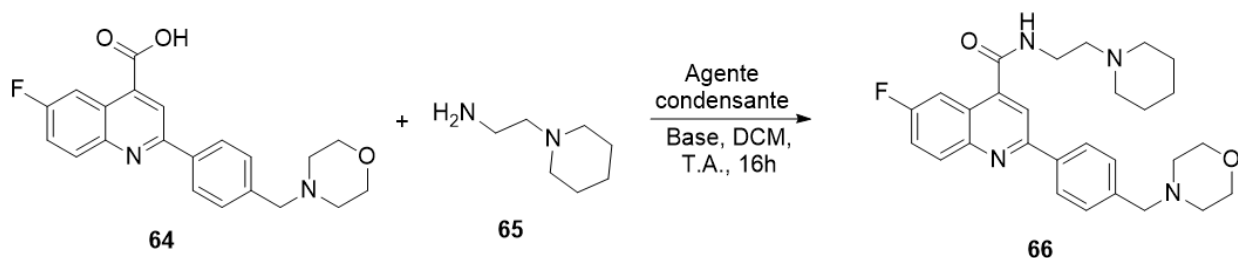
Espectro 22c: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 22d: espectro de massa de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico obtido no modo positivo.

Os espectros obtidos foram considerados suficientes para a confirmação da obtenção do produto. A partir disso, o composto obtido foi utilizado como material de partida para a reação de amidação com 2-(piperidin-1-il)etan-1-amina, formando 498P.

4.6.14. Amidação final da síntese de 498P



Esquema 35: amidação de ácido 6-fluoro-2-(4-(morfolinometil)fenil)quinolin-4-óico para síntese de 498P.

A amidação final do ácido quinolinóico com a diamina é realizada utilizando-se CDMT como agente condensante na presença de 4-metilmorfolina e ácido 6-fluor-2-[4-(morfolinometil)fenil]quinolin-4-óico com 1-(2-aminoetil)-piperidina (BARAGAÑA et al. 2016). Na primeira reação realizada dessa forma, uma análise por LCMS após 20 h indicou que nenhum produto foi formado e conclui-se que esse resultado foi decorrente da má solubilização do ácido em DCM. Empiricamente notou-se que a ordem de adição dos reagentes é crítica para esta reação e deve ser realizada da seguinte forma: primeiro devem ser adicionados o ácido e o solvente e, em seguida, 4-metilmorfolina, aguardando-se alguns minutos até a completa dissolução do ácido. Após a dissolução, CDMT é adicionado e a reação é conduzida conforme a literatura a partir desse ponto (BARAGAÑA et al., 2016). A razão para este procedimento está no fato que o ácido apenas se solubilizava após a adição da base, enquanto que a adição simultânea de CDMT e 4-metilmorfolina impedia sua solubilização. Estabelecido o novo protocolo, a reação foi bem sucedida.

Enquanto a ordem de adição não havia sido otimizada, HATU foi utilizado com Et_3N como base. O rendimento de ambas as reações foi muito similar, apesar de análises por LCMS indicarem que houve consumo total do ácido de partida ($\text{TR} = 1,12$; $\text{M/z} = 367$) na reação com CDMT, enquanto que o mesmo não ocorreu com HATU (Figura 68). Dessa forma, para que as reações tenham o mesmo rendimento, material da reação com CDMT deve ter sido perdido no *work-up* ou na purificação.

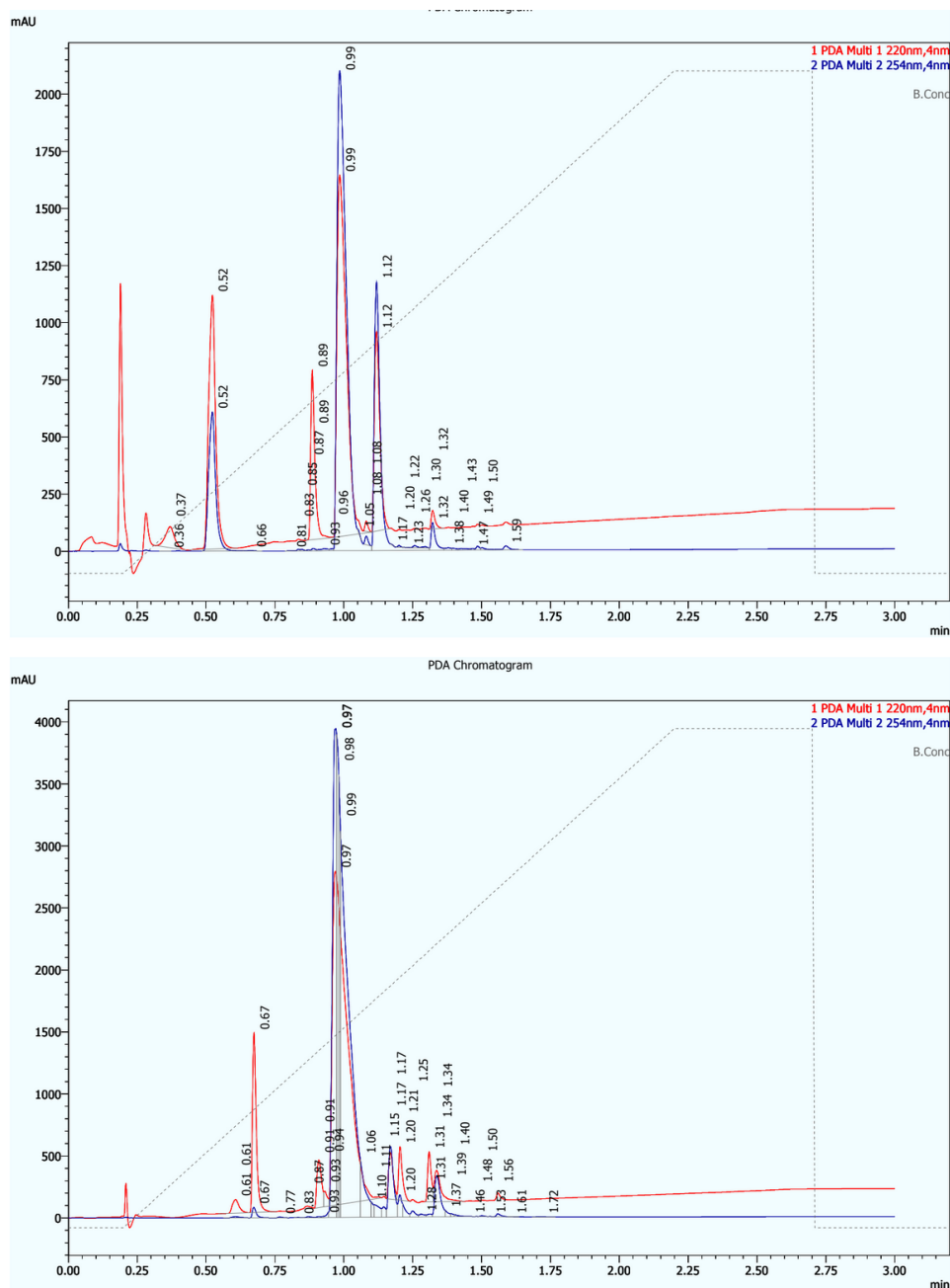
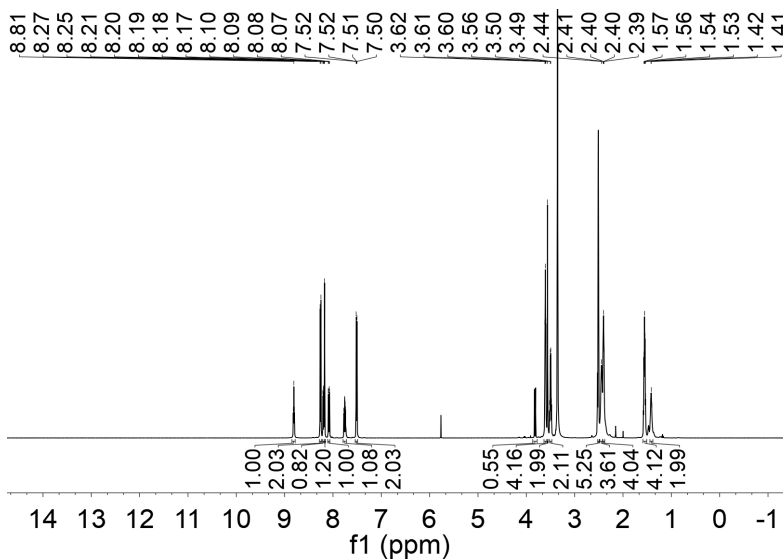
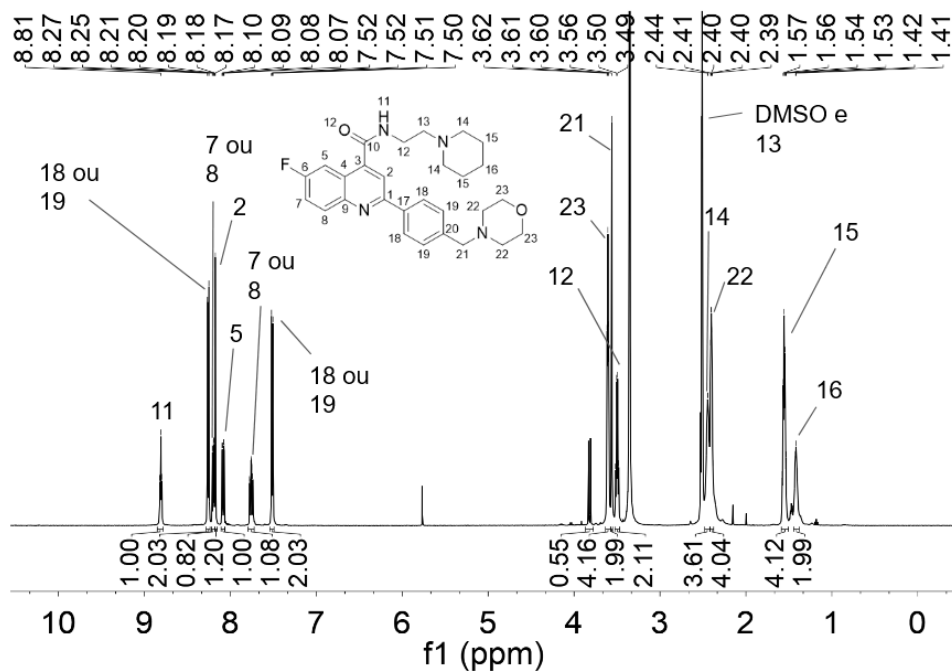


Figura 68: cromatograma obtido por LCMS da reação utilizando-se HATU como agente condensante (superior) e da reação utilizando-se CDMT (inferior). Em ambos cromatogramas, observa-se a formação do produto de interesse (TR ~0,98 min), porém no cromatograma da reação com HATU também observa-se o pico do material de partida (TR = 1,12 min). O espectro de massas dos picos entre 1,10 e 1,20 min no cromatograma da reação com CDMT indicou que não são oriundos de material de partida, sendo algum subproduto reacional.

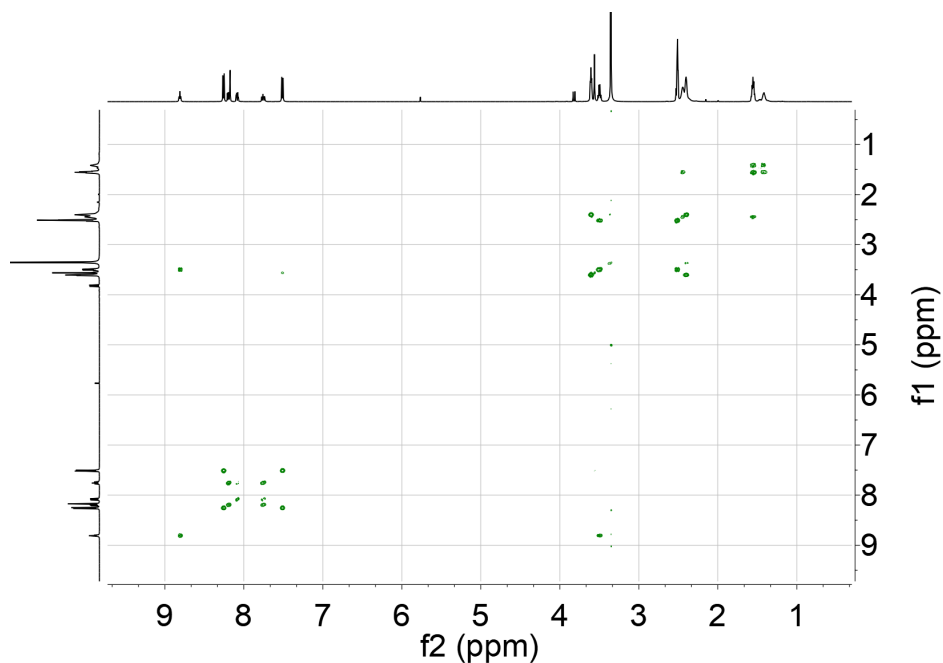
A estrutura do produto foi confirmada por RMN de ^1H , ^{13}C e COSY. No RMN de ^1H (Espectro 23a), foi possível a identificação dos sinais aromáticos de 498P, apesar de uma

atribuição inequívoca de H7, H8, H18 e H19 não ter sido possível. Com auxílio do COSY (Espectro 23b), foi possível determinar os sinais em 8,17 e 8,08 ppm como pertencentes ao H2 e ao H5, pois não estão correlacionados com nenhum outro hidrogênio. A diferenciação entre eles foi possível pela multiplicidade, uma vez que o H5 está próximo a um átomo de flúor e, portanto, deve se desdobrar, enquanto que o sinal de H2 deve ser um simpleto (PAVIA et al., 2009). Assim, o sinal em 8,17 ppm (s, 1H) é referente ao H2, enquanto que o sinal em 8,08 ppm (dd, 1H) é referente ao H5. Também foi possível observar o H11 em 8,81 (t, 1H), cuja identificação se deu pela sua correlação com hidrogênios alifáticos (H12) no COSY e pela sua localização em região de baixo campo. Por fim, comparando-se o espectro obtido com o Espectro 22a do material de partida, observou-se o aparecimento dos sinais em região alifática da 1-(2-aminoetil)-piperidina adicionada, como 3,50 (q, 2H), 2,44 (s, 4H), 1,56 (p, 4H), 1,46 – 1,39 (m, 2H), referentes aos H12, H14, H15 e H16, respectivamente. Pelo COSY identificou-se o H13, que está sobreposto com o sinal de DMSO.





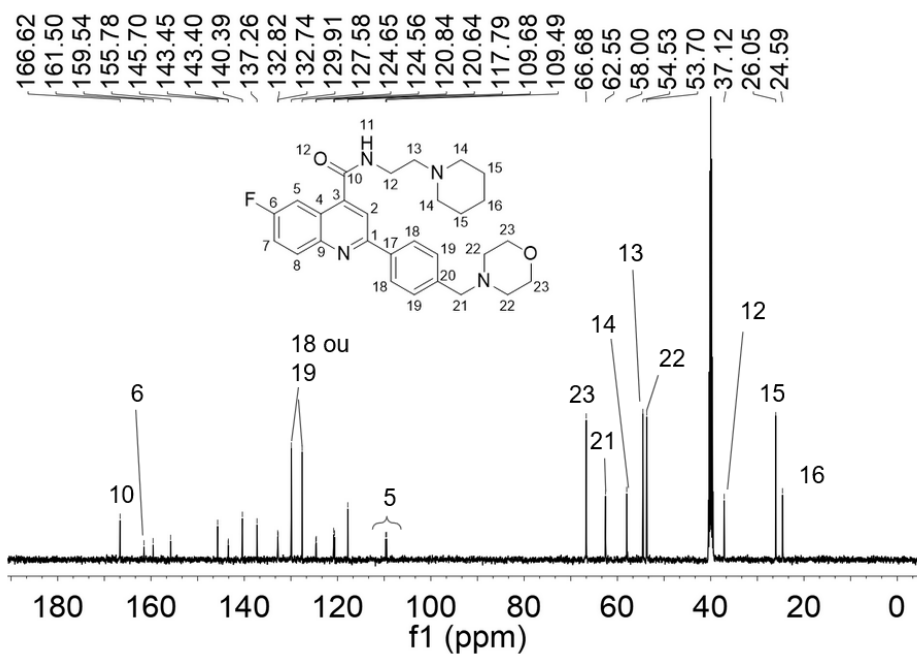
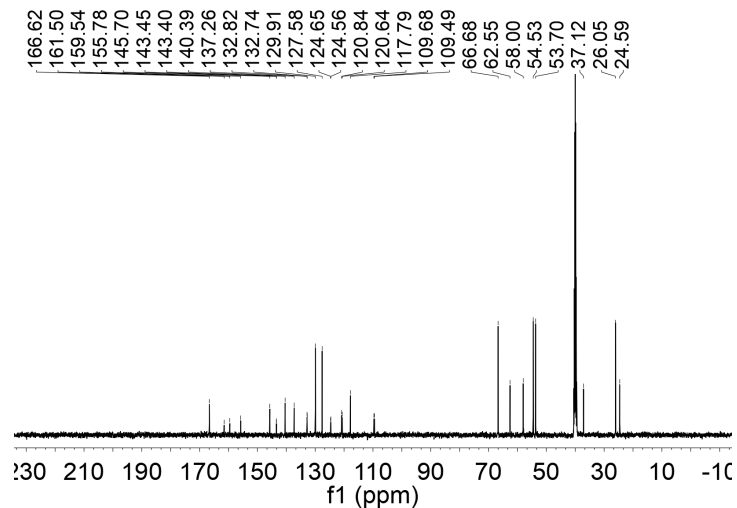
Espectro 23a: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 498P. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



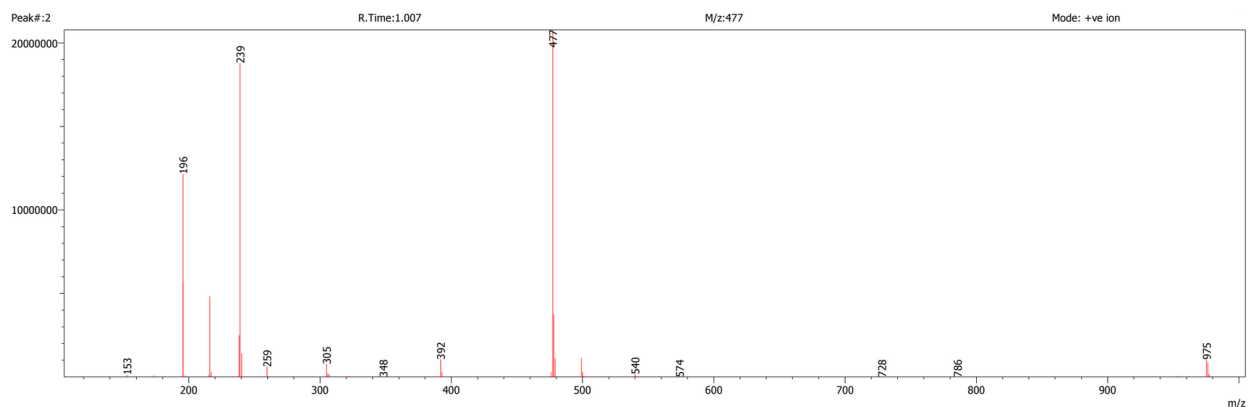
Espectro 23b: espectro de RMN COSY de 498P.

No espectro de ^{13}C (Espectro 23c), a falta de espectros 2D impossibilitou a atribuição de todos os sinais observados, porém a comparação com o Espectro 22c do material de partida e o uso da ferramenta de predição do ChemDraw permitiu a identificação dos carbonos alifáticos.

Finalmente, o espectro de massas (Espectro 23d) gerado por LCMS apresentou uma massa de 477u no modo positivo, correspondente a $(M + H)^+$.



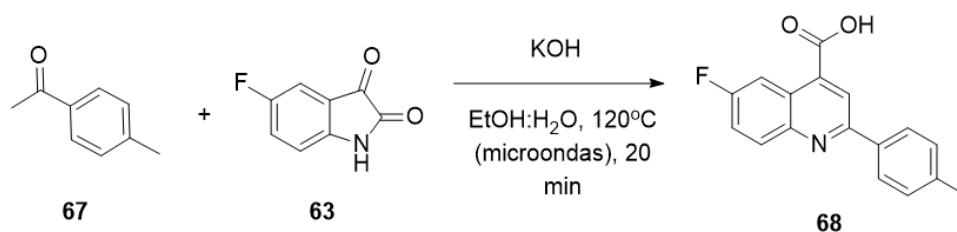
Espectro 22c: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 498P. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 23d: espectro de massas obtido por LCMS no modo positivo.

Confirmado o produto, a reação de SNAr de 498P com PAMAM G0 pode ser tentada.

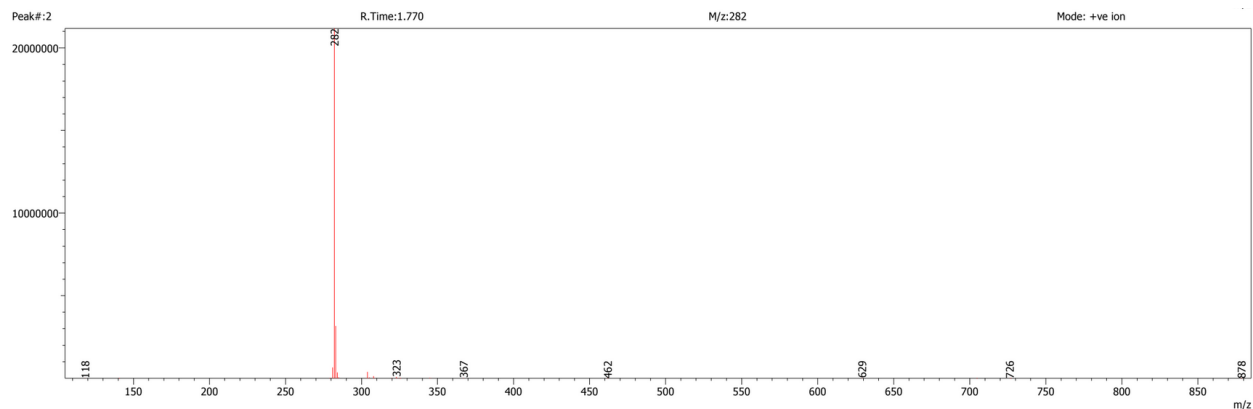
4.6.15. Síntese de ácido 6-fluoro-2-(*p*-tolil)quinolin-4-óico



Esquema 36: reação de expansão de anel para síntese de ácido 6-fluoro-2-(*p*-tolil)quinolin-4-óico.

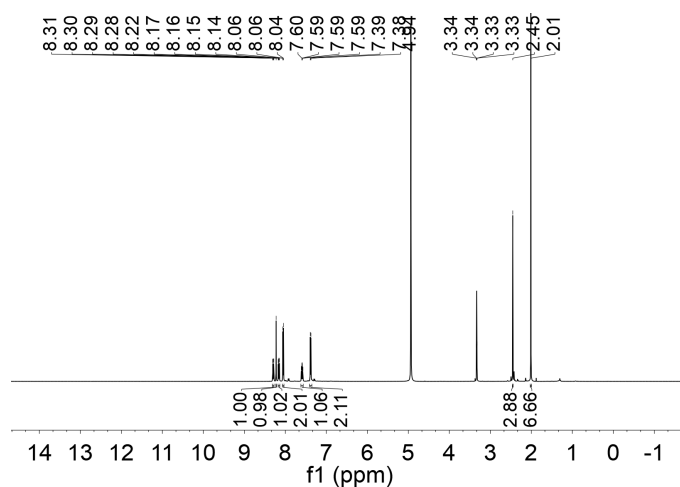
Além de 498P, seria interessante a obtenção de outros análogos com síntese simplificada, permitindo que menos tempo fosse despendido em sua produção. Isso permitiria que mais condições de acoplamento com PAMAM G0 por SNAr fossem tentadas, com o objetivo de otimizar a reação.

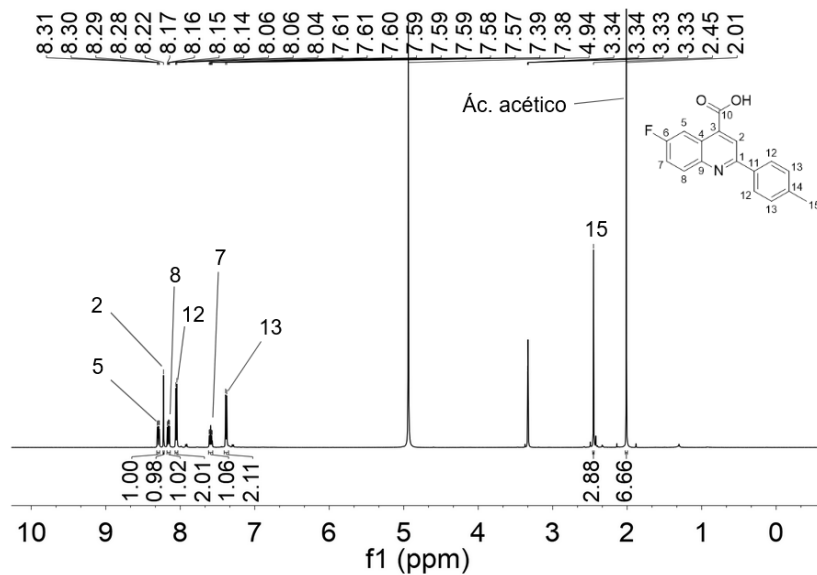
Nesse contexto, poderia ser sintetizado um análogo de 498P sem a morfolina (498PTol), composto semelhante ao *hit* inicial que levou à descoberta de 498 (BARAGANA et al., 2016). Isso eliminaria duas etapas sintéticas e a síntese se iniciaria a partir da reação da cetona aromática (1-(4-metilfenil)etan-1-ona) com a 5-fluorisatina. Com isso em mente, reagiu-se 5-fluorisatina e 1-(4-metilfenil)etan-1-ona em uma mistura 1:1 de água e etanol com aquecimento a 120 °C por microondas durante 20 min, conforme descrito na literatura (BARAGANA et al., 2016). Após purificação, um LCMS (Espectro 24a) indicou massa de 282 u para o produto obtido, correspondente a (M + H)⁺, e análises por RMN confirmaram a estrutura do composto.



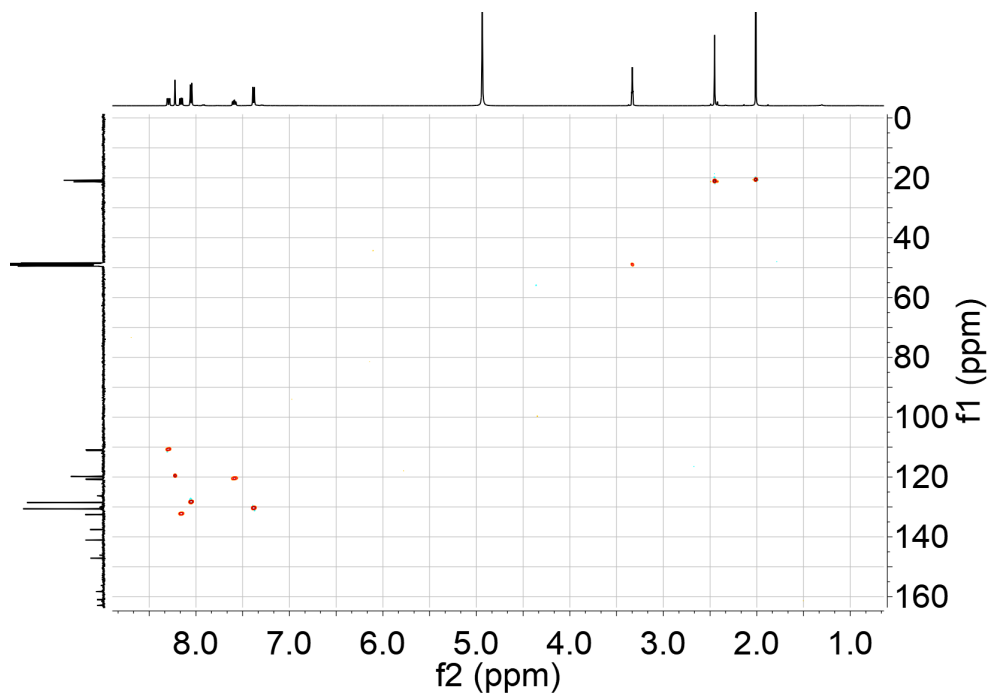
Espectro 23a: espectro de massas obtido por LCMS no modo positivo.

No espectro de ^1H (Espectro 23b), foi possível observar todos os hidrogênios aromáticos e o hidrogênio alifático H15. A atribuição se baseou na análise conjunta do HSQC (Espectro 23c) e do HMBC (Espectro 23d). O RMN de ^{13}C (espectro 23e) também teve todos seus sinais atribuídos com auxílio do HSQC e do HMBC. O sinal em 173,10 ppm, em particular, evidencia a carboxila. Além disso, foi possível determinar a contaminação da amostra com ácido acético, o qual possui origem desconhecida, uma vez que não foi utilizado em nenhuma etapa.

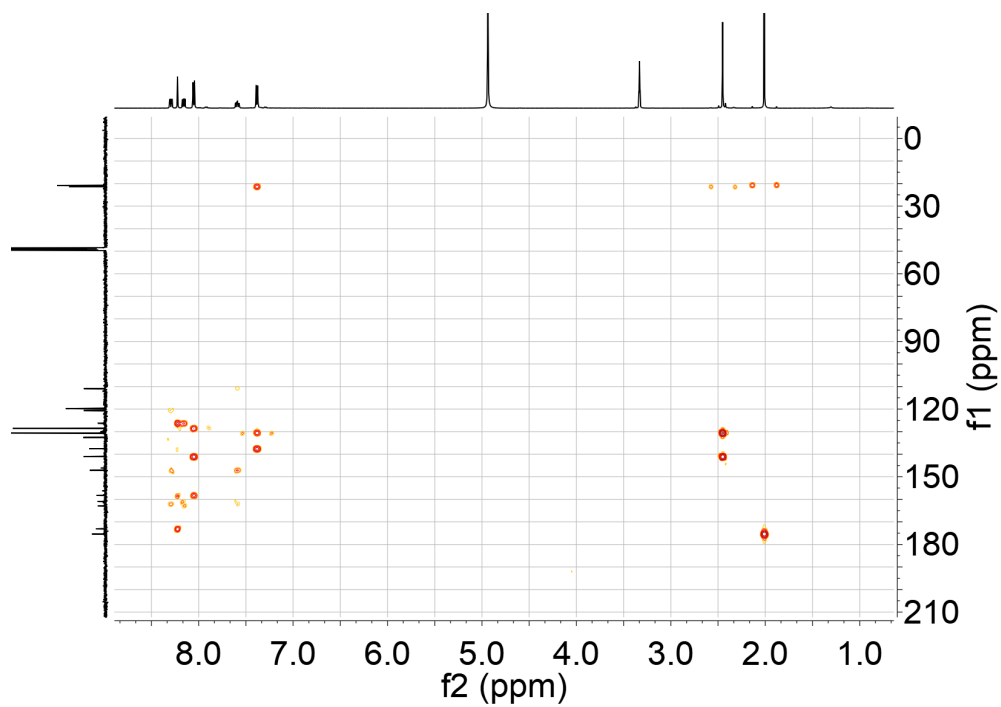




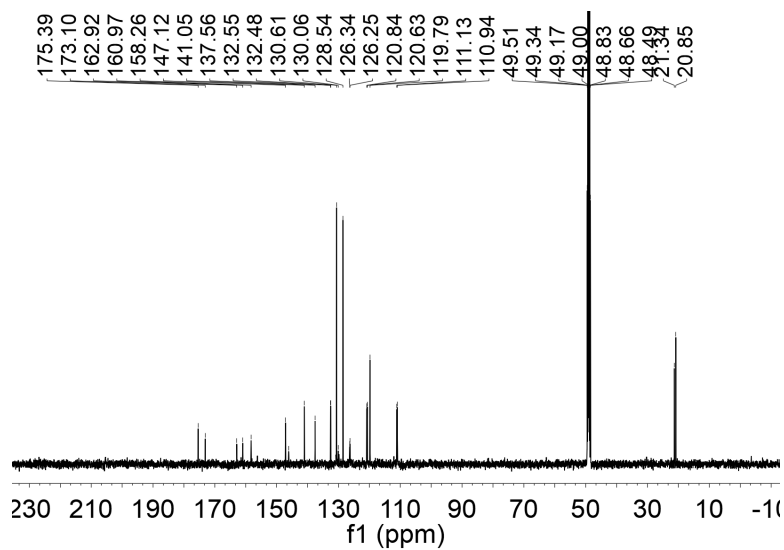
Espectro 23b: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico. Acima, encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

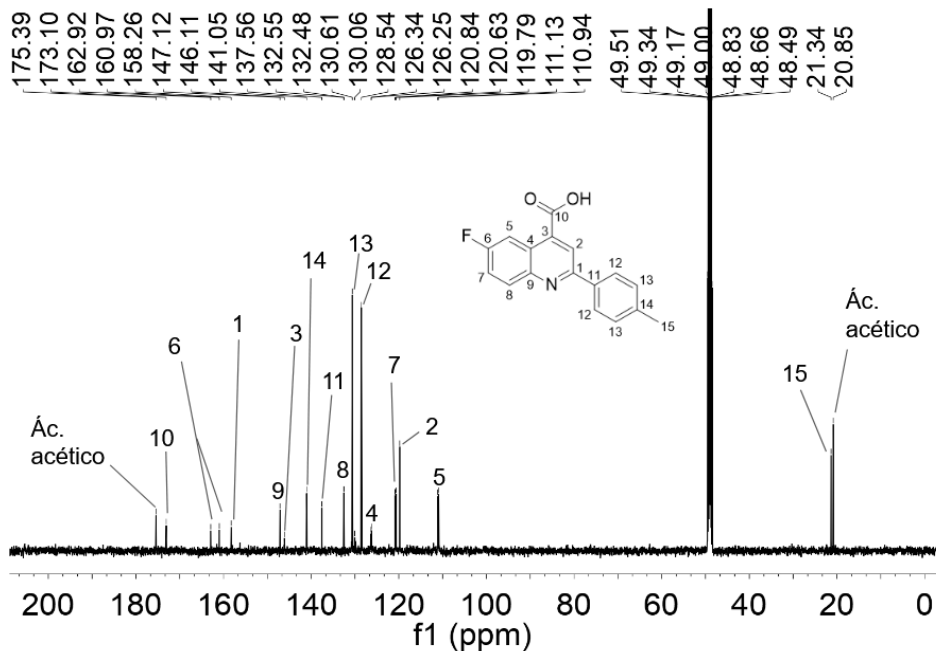


Espectro 23c: espectro de RMN HSQC de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico. Laranja indica hidrogênios ímpares (CH e CH_3) e azul indica hidrogênios pares (CH_2).



Espectro 23d: espectro de RMN HMBC de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico.

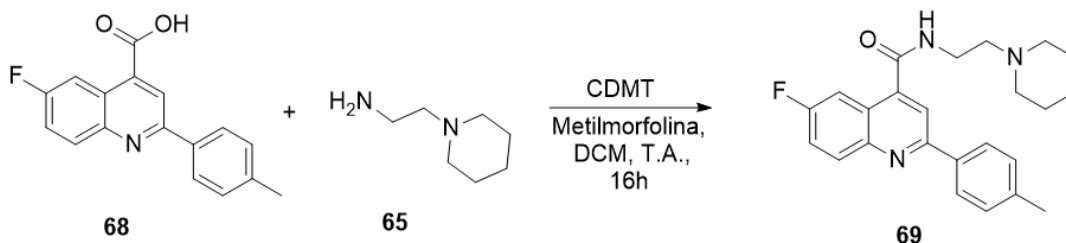




Espectro 23e :espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Apesar da impureza de ácido acético identificada, foi possível seguir com a etapa seguinte de amidação do ácido com 1-(2-aminoetil)-piperidina.

4.6.16. Amidação final de análogo toluênico de 498P (498PTol)



Esquema 37: amidação de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico para síntese de 498PTol.

A amidação de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico foi realizada com o agente condensante CDMT seguindo a ordem de adição definida previamente na síntese de 498P. Após 16h, a reação foi interrompida após a análise por LCMS indicar a formação de produto (TR = 1,44 min, M/z = 392), apesar de ainda haver material de partida presente (TR = 1,79 min, M/z = 282) (Figura 69).

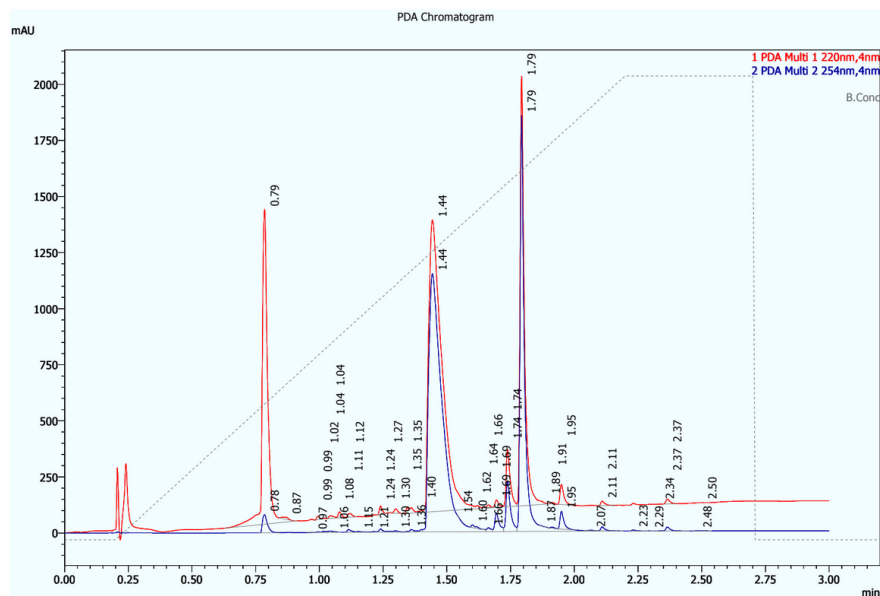
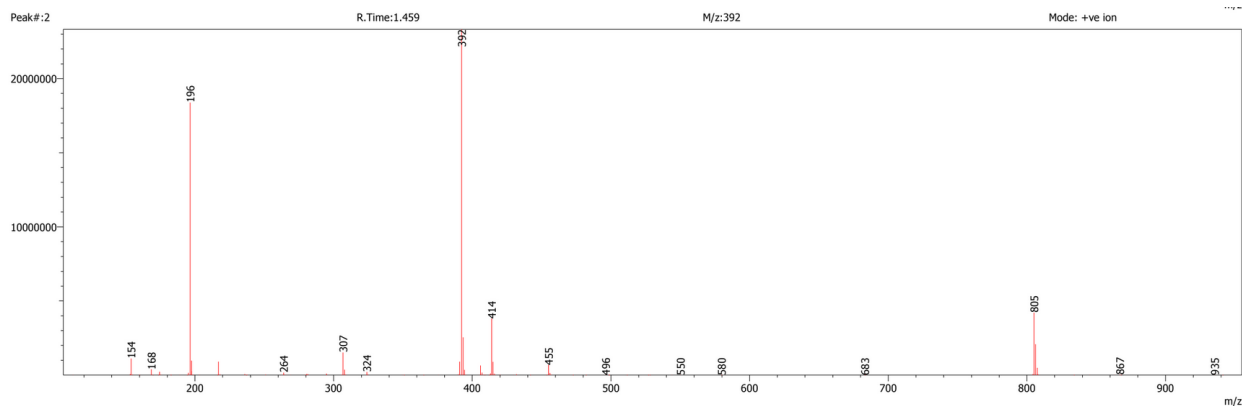


Figura 69: cromatograma obtido por LCMS da reação utilizando-se CDMT como agente condensante para a síntese de 498PTol

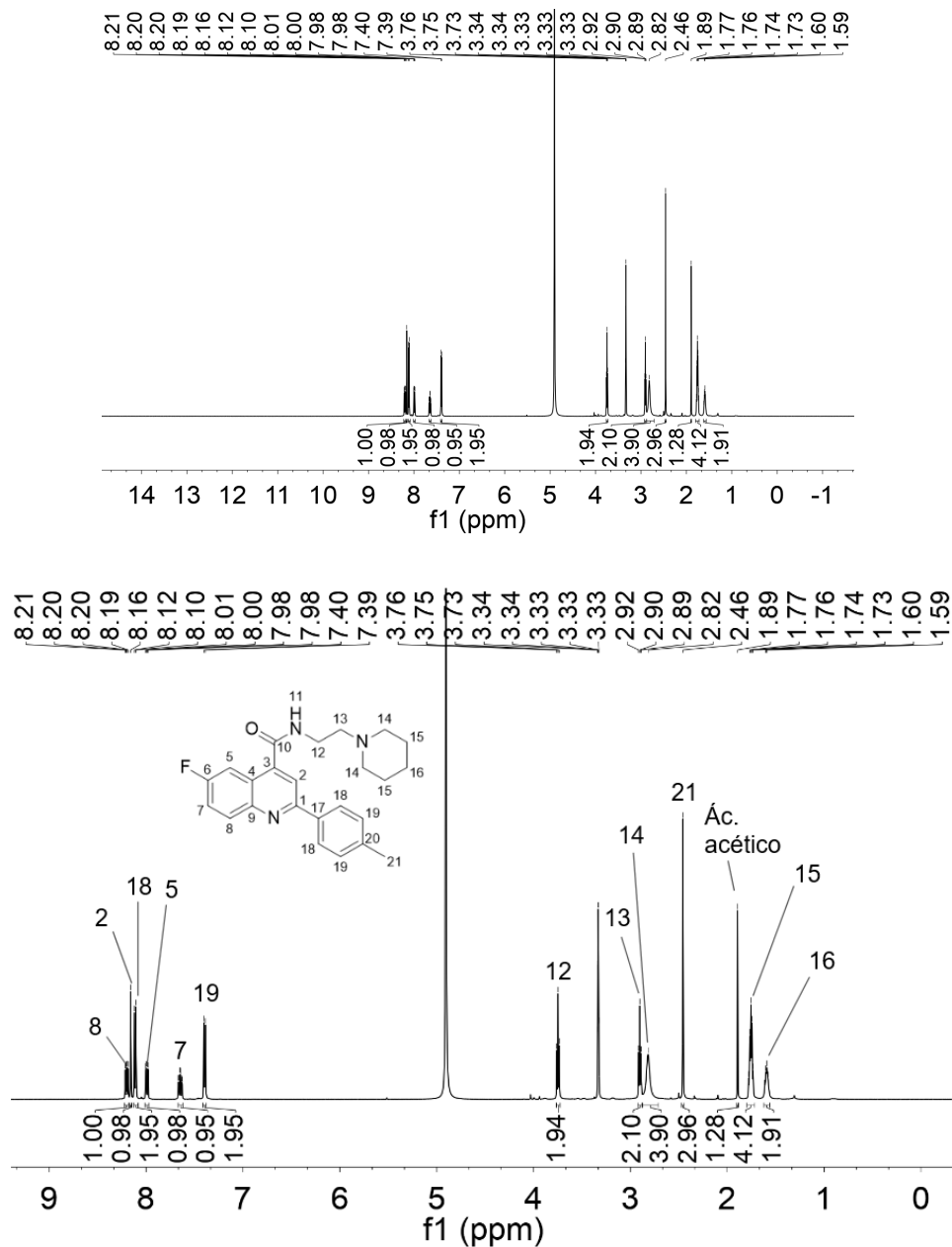
Após a purificação, o espectro de massas obtido por LCMS (Espectro 24a) indicou o valor de 392 u para o produto obtido, o que corresponde a $(M + H)^+$ e sugere a obtenção da molécula desejada. Análises por RMN confirmaram a estrutura.



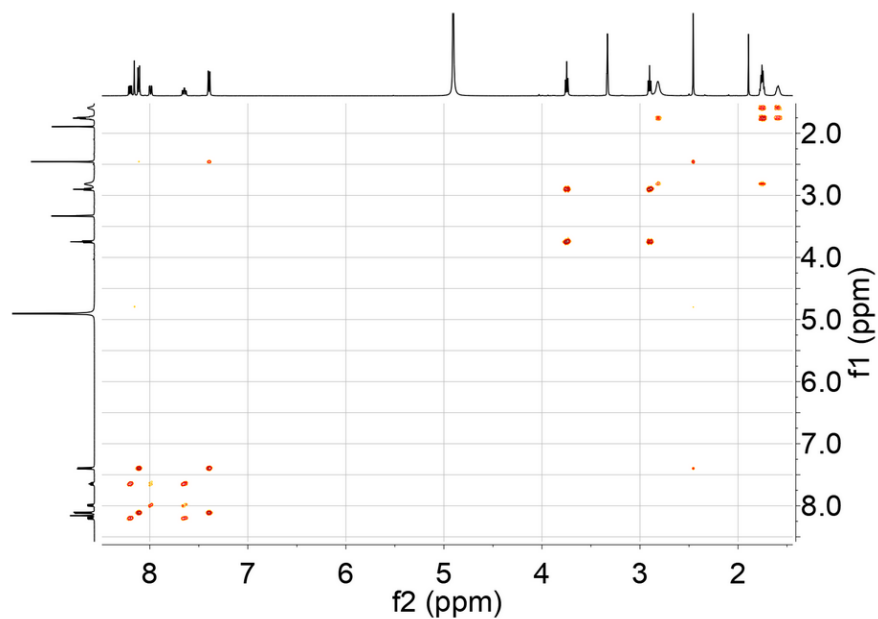
Espectro 24a: espectro de massas obtido por LCMS no modo positivo.

No espectro de ^1H (Espectro 24b), foi possível a atribuição de todos os sinais à molécula de produto desejado. Para isto, utilizou-se do auxílio de espectros 2D: COSY (Espectro 24c), HSQC (Espectro 24d) e HMBC (Espectro 24e). O espectro é semelhante ao do ácido de partida, porém notam-se novos sinais em 3,75 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,82 (s, 4H), 1,76 (p, $J = 5,7$ Hz, 4H) e 1,60 ppm (q, $J = 6,0$ Hz, 2H), os quais são referentes aos hidrogênios 12, 13, 14, 15 e 16, respectivamente, indicando a adição de 1-(2-aminoetil)-piperidina. Também foram observados resquícios de ácido acético (1,89 ppm)

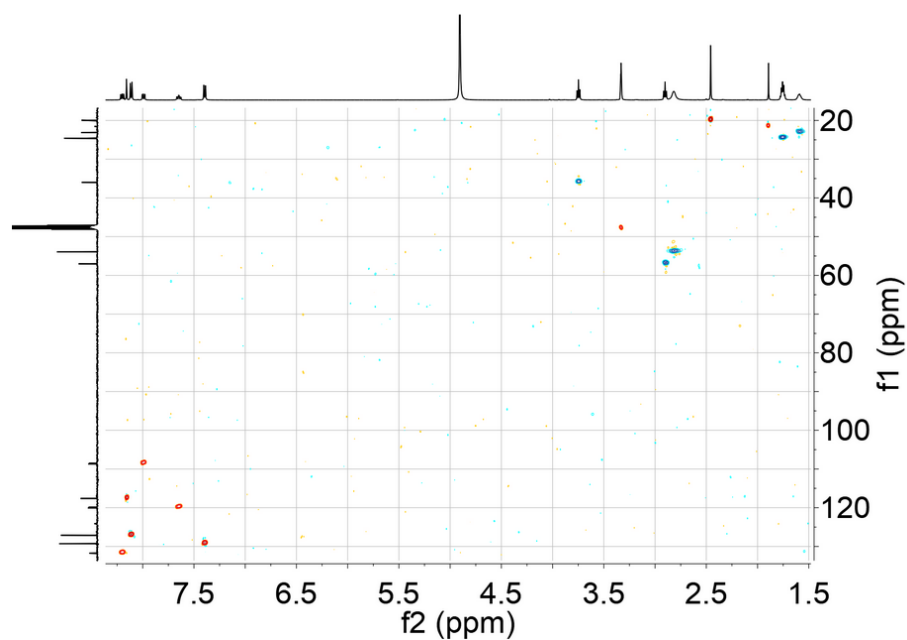
(FULMER et al., 2010) oriundos, provavelmente, da contaminação observada no material de partida.



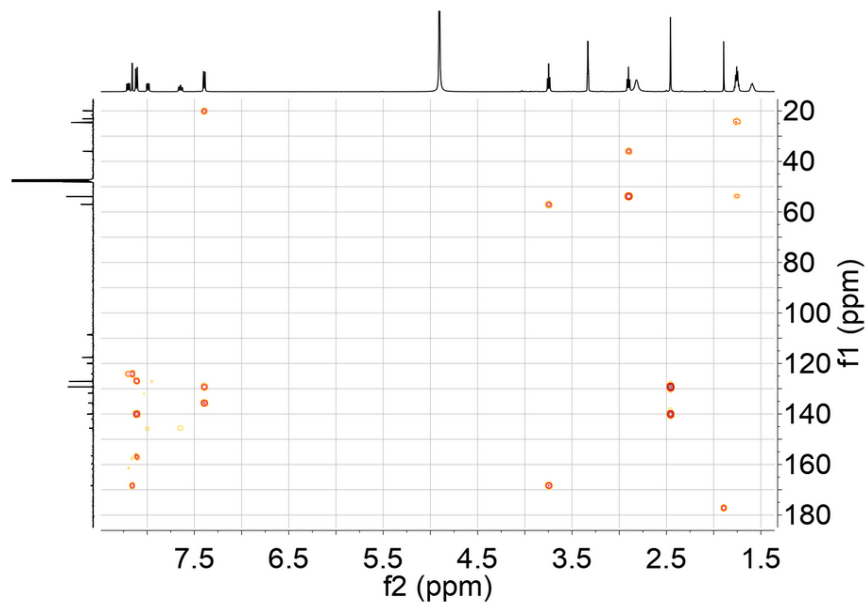
Espectro 24b: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de 498PTol. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 24c: espectro de RMN COSY de 498PTol.

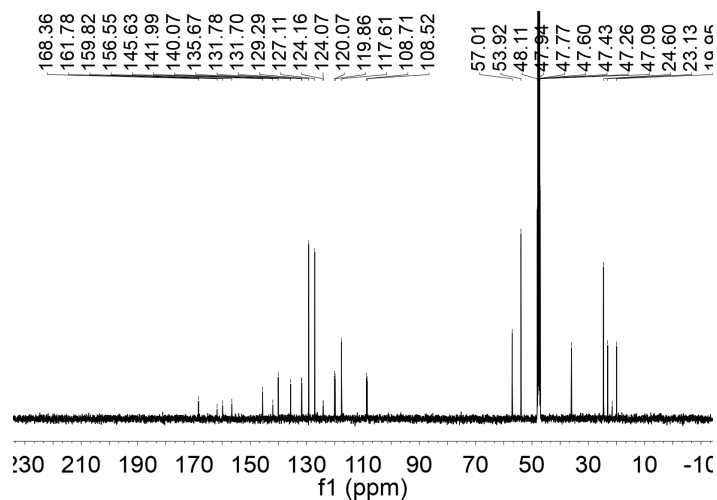


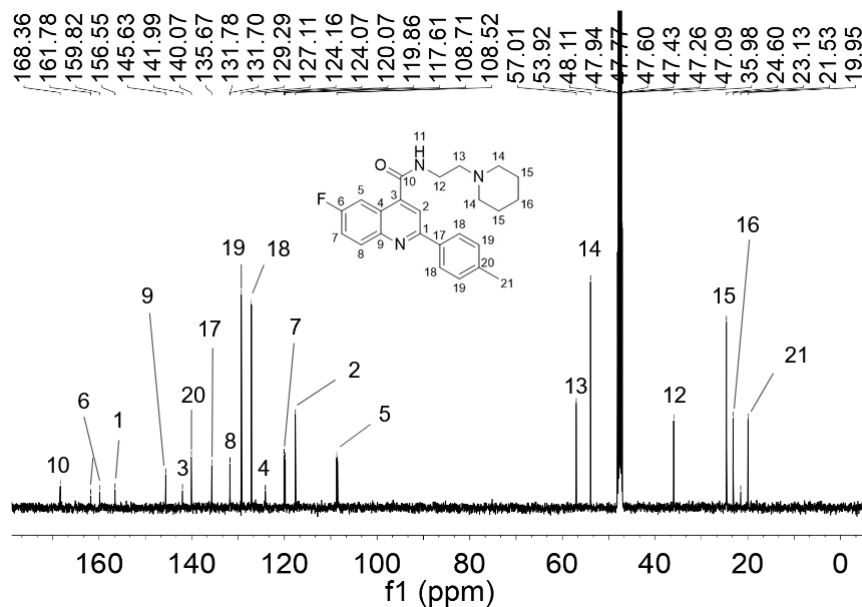
Espectro 24d: espectro de RMN HSQC de ácido 6-fluoro-2-(p-tolil)quinolin-4-óico. Laranja indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e azul indica hidrogênios pares (CH₂).



Espectro 24e: espectro de RMN HMBC de 498PTol.

Assim como no espectro de ^1H , foi possível observar o aparecimento de sinais referentes à 1-(2-aminoetil)-piperidina no espectro de ^{13}C . Apesar de a atribuição da maioria dos sinais observados ter sido realizada, não foi possível identificar o referente ao C3, pois não foi vista correlação dos seus possíveis sinais com o H5 no HSQC. Entretanto, acredita-se que 141,99 ppm seja o sinal de C3, uma vez que o único sinal que não pode ser atribuído a outros C.

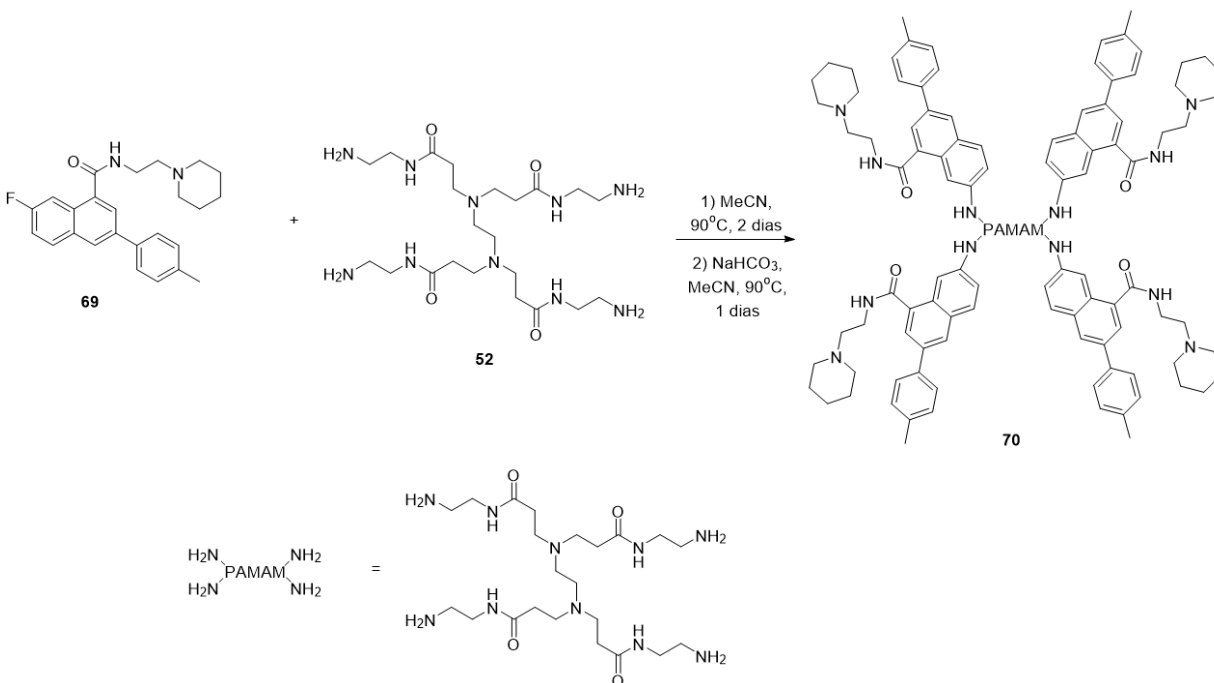




Espectro 24f: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 498PTol. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Com os análogos 498P e 498PTol, foi possível prosseguir com as primeiras tentativas de ligação das moléculas potencialmente ativas com PAMAM G0 por SNAr.

4.6.17. Substituição nucleofílica aromática de análogo 498PTol e PAMAM G0



Esquema 38: reação de SNAr para acoplamento de 498PTol e PAMAM G0.

A primeira tentativa de SNAr para funcionalização de PAMAM G0 utilizou 498PTol (reação discutida nessa seção) e 498P (reação discutida na seção seguinte) como moléculas potencialmente ativas. Inicialmente, retirou-se o MeOH da solução comercial de PAMAM G0 e, em seguida, 498PTol foi adicionado com MeCN e o sistema foi mantido sob refluxo em um tubo selado a 90 °C (BEYKI, MAGHSOODLOU, HEYDAR, 2016). A reação foi acompanhada por LCMS e, após 2 dias, uma grande quantidade de 498PTol (TR = 1,44 min; M/z = 392) ainda estava presente e não haviam indícios de formação de produto (Figura 70).

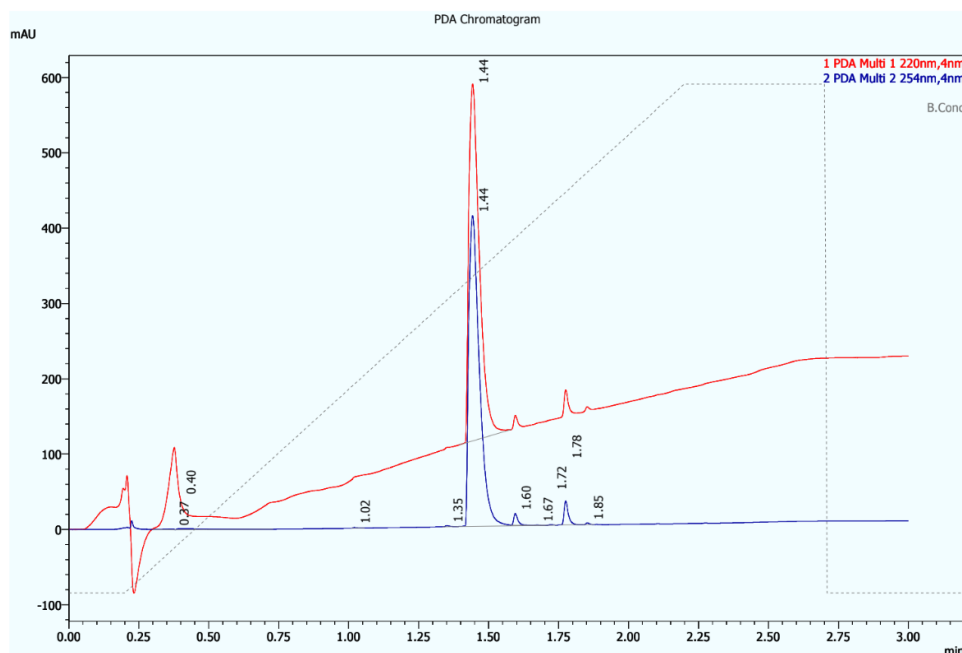


Figura 70: cromatograma obtido por LCMS da reação de SNAr de 498PTol e PAMAM G0 após 2 dias.

De forma a facilitar a reação, foi adicionada uma base (NaHCO_3) para a retirada do próton no processo de adição-eliminação da reação (ilustrado na Figura 71) (NUDELMAN, 1996). Entretanto, após 24 h, uma nova análise por LCMS novamente mostrou uma grande quantidade de material de partida na amostra e nenhuma evidência de formação de produto.

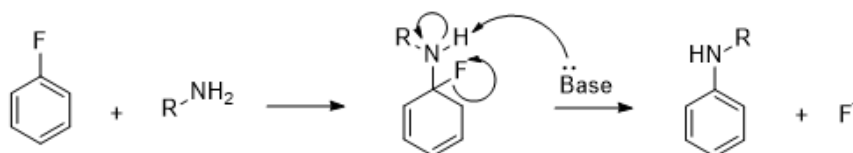
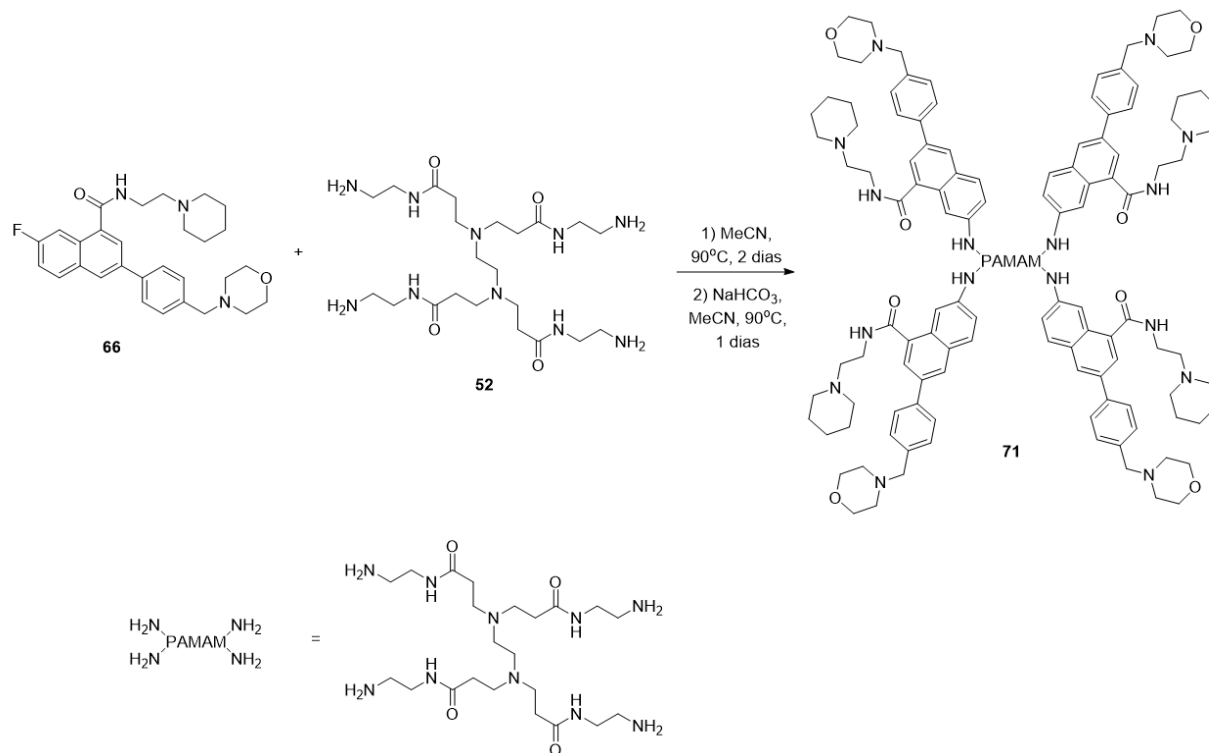


Figura 71: mecanismo da reação de SNAr com aminas e atuação da base na retirada do próton de um intermediário reacional.

Em função da aparente falta de reatividade entre os reagentes, a reação foi interrompida e descartada.

4.6.18. Substituição nucleofílica aromática de 498P e PAMAM G0



Esquema 39: reação de SNAr para acoplamento de 498P e PAMAM G0.

Como mencionado anteriormente, tentou-se a reação se SNAr de 498P e PAMAM G0 paralelamente à reação entre 498PTol e o dendrímero. Para esta reação, foram utilizadas condições análogas e, portanto, iniciou-se com a remoção de MeOH de PAMAM G0 e, em seguida, adicionou-se MeCN e 498P, mantendo-se o sistema sob refluxo a 90 °C em um tubo selado. A reação foi acompanhada por LCMS e, assim como no caso de 498PTol discutido anteriormente, após 2 dias de reação, notou-se apenas material de partida (TR = 0,99 min; M/z = 477) (Figura 72).

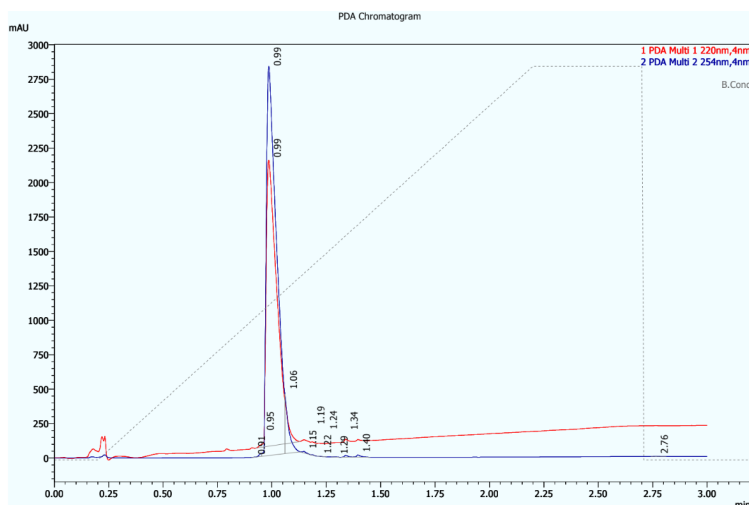
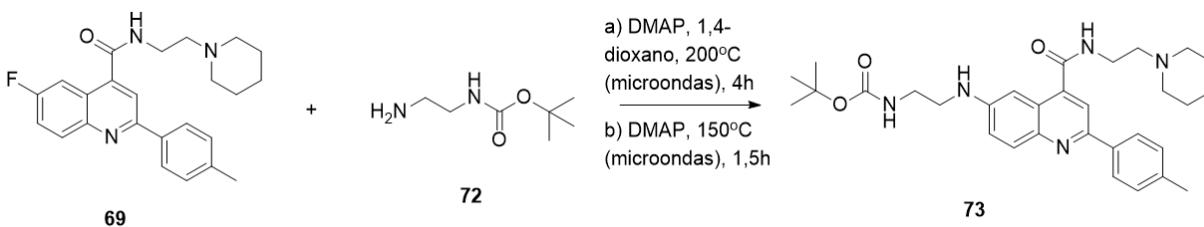


Figura 72: cromatograma obtido por LCMS da reação de SNAr de 498P e PAMAM G0 após 2 dias.

NaHCO_3 também foi adicionado na tentativa de facilitar a reação, porém após mais 24 h de reação, uma análise por LCMS indicou que não houve nenhuma alteração. Por conta deste resultado e do resultado da reação com 498PTol, conclui-se que a reação direta de SNAr com o dendrímero não seria viável, talvez por uma questão de impedimento estérico das moléculas ativas com o dendrímero. Para solucionar esse problema e para confirmar se ele é causado por uma questão estérica, foi proposta a adição de um espaçante diamínico de cadeia pequena - etilenodiamina - por SNAr aos análogos de 498P. Além disso, pelo menor custo desse espaçante em relação ao dendrímero, diferentes condições sintéticas poderiam ser testadas e em escalas maiores, de forma a otimizar as condições reacionais.

4.6.19. Substituição nucleofílica aromática de 498PTol e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato



Esquema 40: reação de SNAr para acoplamento de 498PTol e espaçante diamínico protegido.

Para a adição de etilenodiamina a análogos de 498P por SNAr, optou-se pelo uso de etilenodiamina com um dos grupos aminícos protegidos com Boc, pois isso evitaria a formação de dímeros da molécula potencialmente ativa, conforme exemplificado na Figura 73. Além disso, foi escolhido 498PTol inicialmente pela maior facilidade de síntese em relação a 498P.

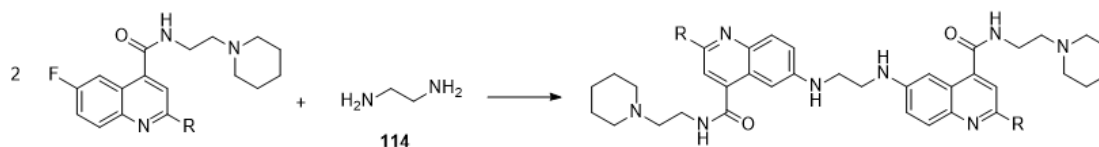


Figura 73: formação de dímeros de análogos de 498 pela reação com etilenodiamina.

Outra mudança em relação à reação com PAMAM G0 foi que optou-se por usar 1,4-dioxano como solvente, por ele possuir maior ponto de ebulição do que MeCN. Além disso, decidiu-se usar o reator de microondas para essa reação, o que permitiu a condução da reação em temperaturas ainda mais elevadas quando comparadas a refluxos tradicionais. Como base, optou-se pelo uso de DMAP, pois bicarbonato de sódio possui baixa solubilidade em solventes orgânicos (ELLINGBOE, RUNNELS, 1966). Essas condições reacionais foram utilizadas com o objetivo de acelerar a reação e facilitar a obtenção do produto.

Assim, 498PTol, *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato, 1,4-dioxano e DMAP foram adicionados em um tubo próprio para o reator de microondas e aquecidos a 120 °C por 1 h. Entretanto, a análise por LCMS após esse período não indicou a formação de produto. O tubo reacional foi devolvido ao reator de microondas e o sistema foi aquecido a 160 °C por 1,5 h. Novamente, não foi observada a formação de produto. Por fim, o sistema foi aquecido a 200 °C por 4 h e a reação foi acompanhada por LCMS após 2 e 4 h do seu início. Mesmo com o uso de temperatura elevada e um maior tempo reacional, observou-se a presença de material de partida (TR = 1,46 min; M/z = 392) e outros subproduto desconhecidos de massa molecular diferente da esperada (Figura 74). Após esse resultado, a reação foi descartada.

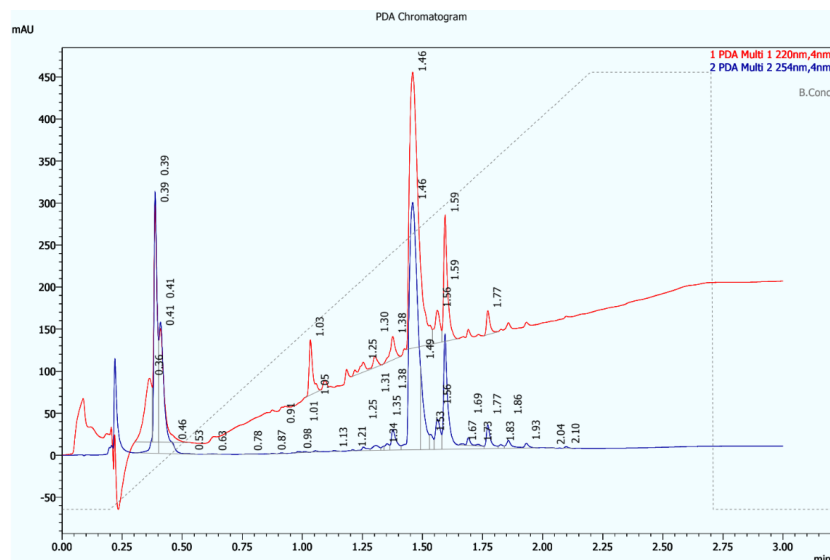


Figura 74: cromatograma obtido por LCMS da reação de SNAr de 498PTol e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato após 4 h a 200 °C.

Outro método foi tentado para se obter sucesso na reação. Decidiu-se utilizar *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato como solvente reacional, o que garantiria um grande excesso (148 eq.) desse reagente, favorecendo a reação. Novamente decidiu-se usar irradiação por microondas para aquecimento da reação e a temperatura de 150 °C foi escolhida por ser ~2x o ponto de ebulição do solvente, condição recomendada no guia de uso do reator. Após 1,5 h de reação, o material foi analisado por LCMS, que indicou, novamente, a presença de material de partida (TR = 1,47 min; M/z = 392) e ausência de produto (Figura 75).

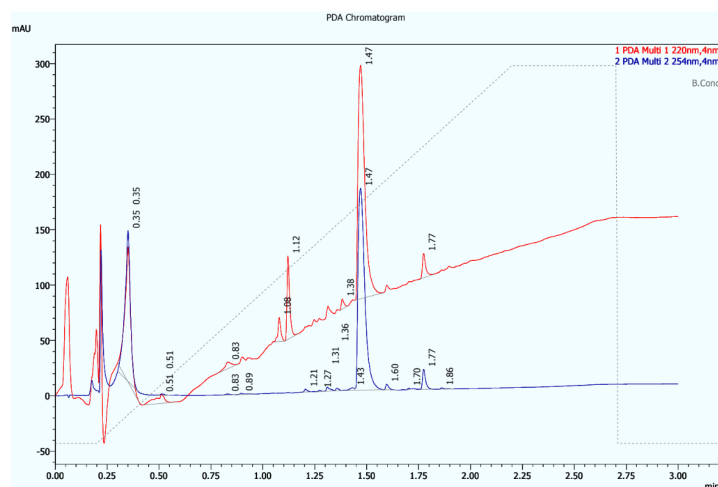
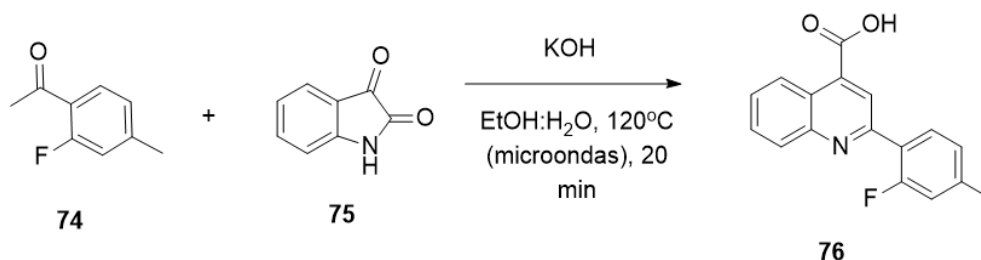


Figura 75: cromatograma obtido por LCMS da reação de SNAr de 498PTol e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato (utilizada como solvente) após 4 h a 200 °C.

A partir desses resultados, considerou-se 498PTol e 498P, conseqüentemente, inertes para reações de SNAr. Uma possibilidade levantada para isso é a de que a posição 6 dessas quinolinas não deve ser eletrofílica o suficiente para reações de SNAr, o que motivou a síntese de outro análogo de 498P com o F em outra posição de interesse, o que será discutido na próxima seção.

4.6.20. Síntese de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico



Esquema 41: reação de expansão de anel para síntese de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico

Conforme discutido previamente, o anel aromático na posição 2 de 498 permite modificações estruturais com baixo impacto na atividade antimálarica do composto (BARAGAÑA et al., 2016). Isso permite a conclusão de que a adição do espaçante etilenodiamínico nesse anel deva ter um baixo impacto na atividade do composto. Assim, para averiguar se um átomo de flúor em uma posição diferente da de 498PTol fosse mais reativo frente a condições de SNAr, optou-se pela síntese de um análogo de 498PTol com o F no anel aromático da posição 2 da quinolina. Além disso, para simplificar a síntese, conforme feito para 498PTol, decidiu-se pela síntese de um análogo de 498P sem a morfolina, reduzindo o número de etapas necessárias para obtenção do composto.

A síntese desse novo análogo se inicia com a obtenção de uma quinolina com um ácido carboxílico na posição 4, através da reação de uma cetona aromática e isatina, de maneira semelhante à síntese de outros análogos de 498P. Para este análogo, utilizou-se isatina e 1-(2-fluor-4-metilfenil)etanona. Após 20 min a 120 °C no reator de microondas e em presença de KOH, EtOH e água, analisou-se o conteúdo reacional por LCMS e observou-se a formação do produto desejado (TR = 1,65 min; M/z = 282), conforme apresentado na Figura 76 e Espectro 25a.

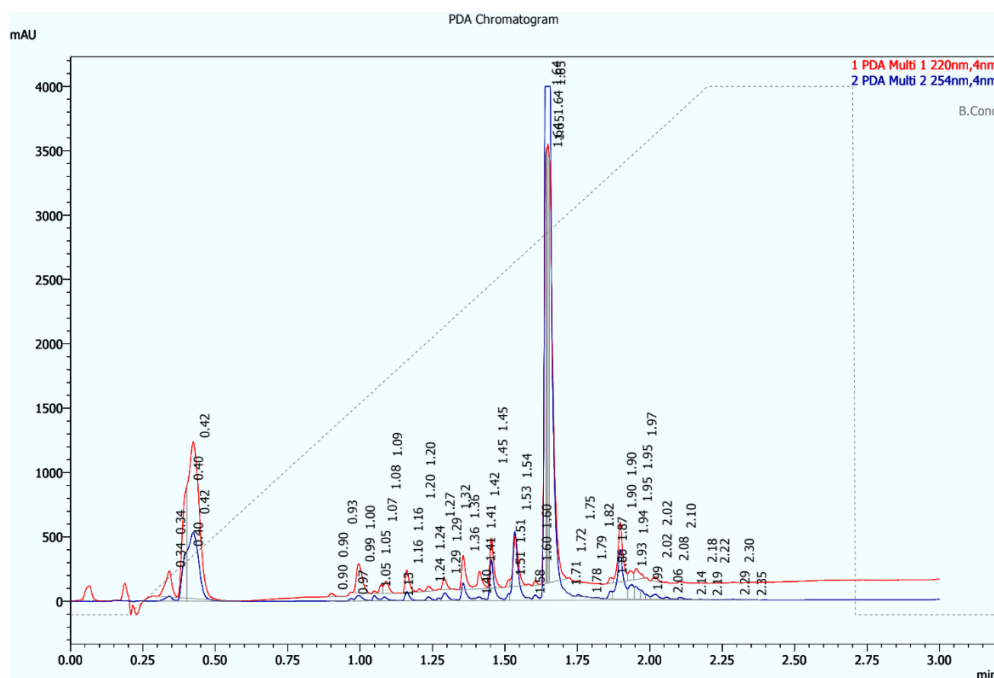
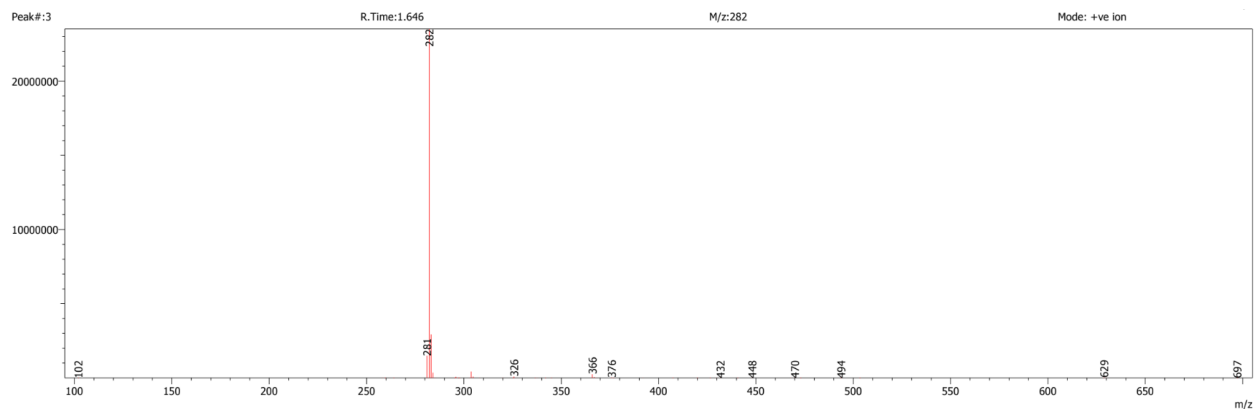
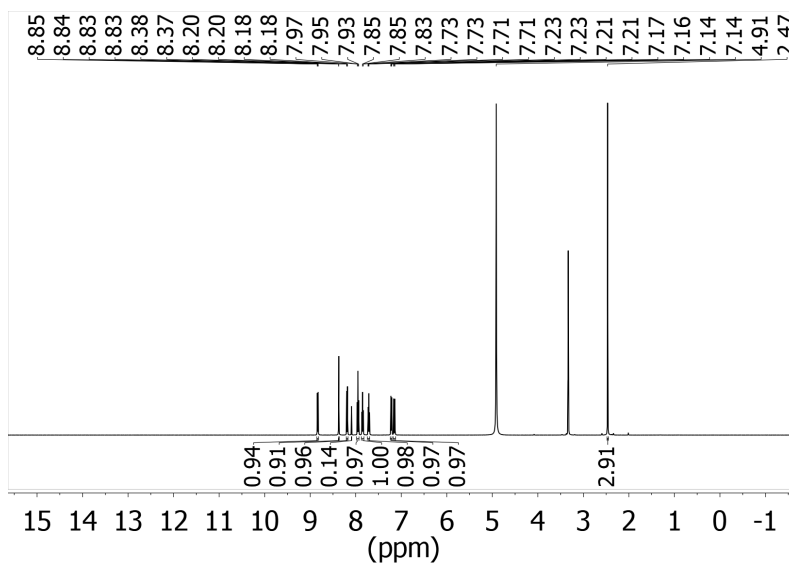


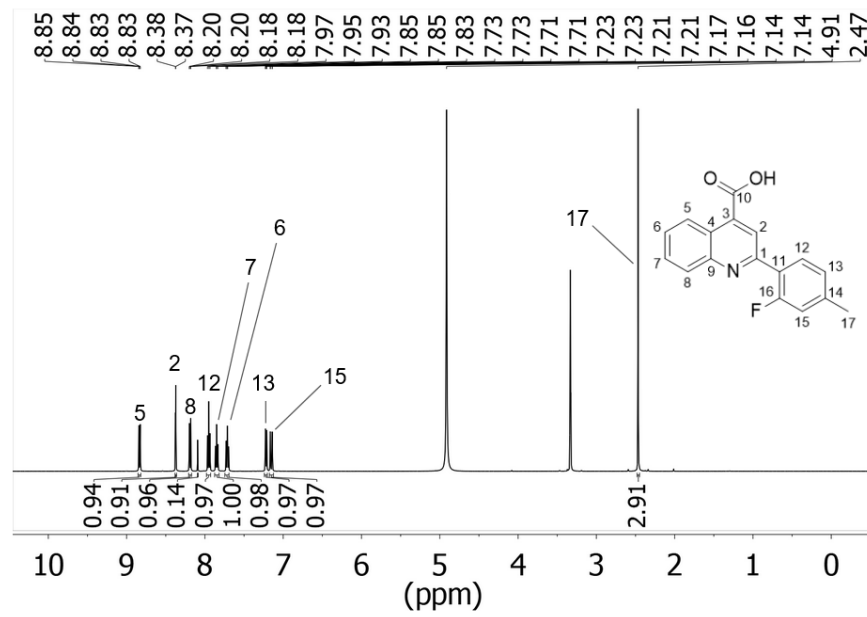
Figura 76: cromatograma obtido por LCMS da reação de síntese de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico



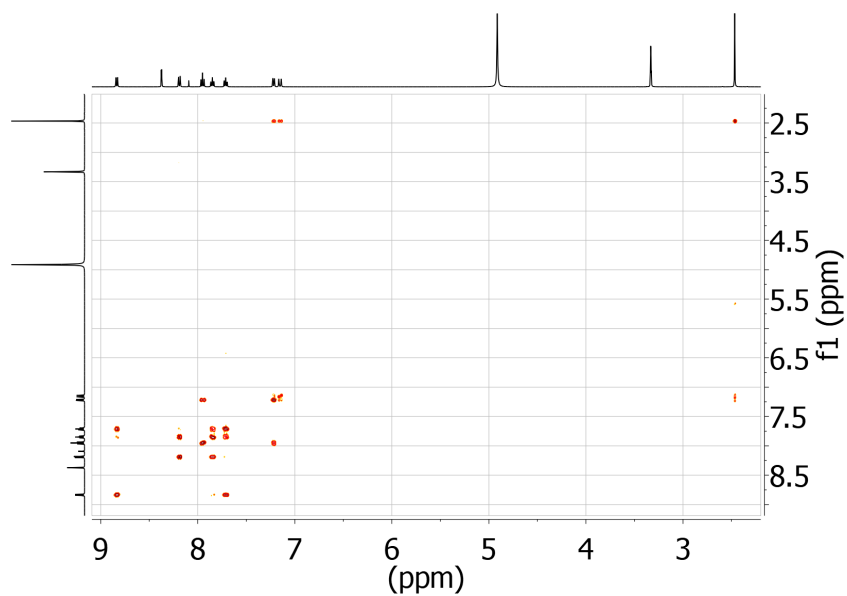
Espectro 25a: espectro de massas obtido por LCMS no modo positivo e após purificação da amostra.

A estrutura do produto foi então confirmada por RMN. Foi possível a atribuição de todos os sinais no espectro de ^1H (Espectro 25b) com o auxílio de espectros bidimensionais: COSY (Espectro 25c), HSQC (Espectro 25d) e HMBC (Espectro 25e). Destaca-se que no espectro de ^1H existem 8 H não equivalentes em região aromática, o que era esperado pela estrutura do produto. Além disso, há um simpleto em 2,47 ppm correspondente à metila da cadeia lateral toluênica. Já no espectro de ^{13}C , também foi possível a atribuição de todos os sinais e foi possível observar a grande constante de acoplamento ($J = 249,5$ Hz) entre os sinais em 161,57 e 159,59 ppm, formando um duplete referente ao C16. Tal constante é esperada para acoplamentos C-F (PAVIA et al., 2009).

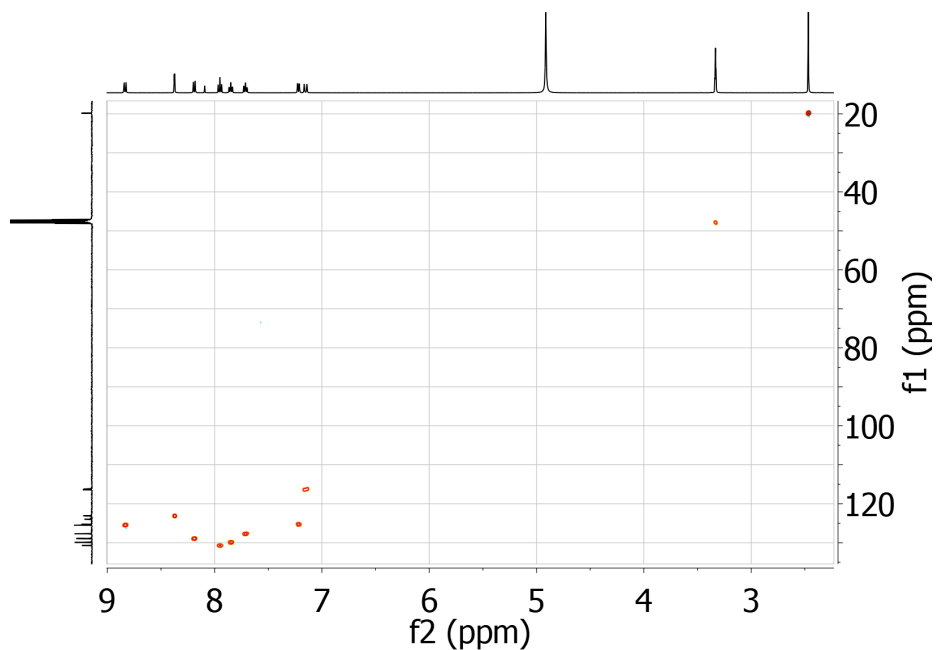




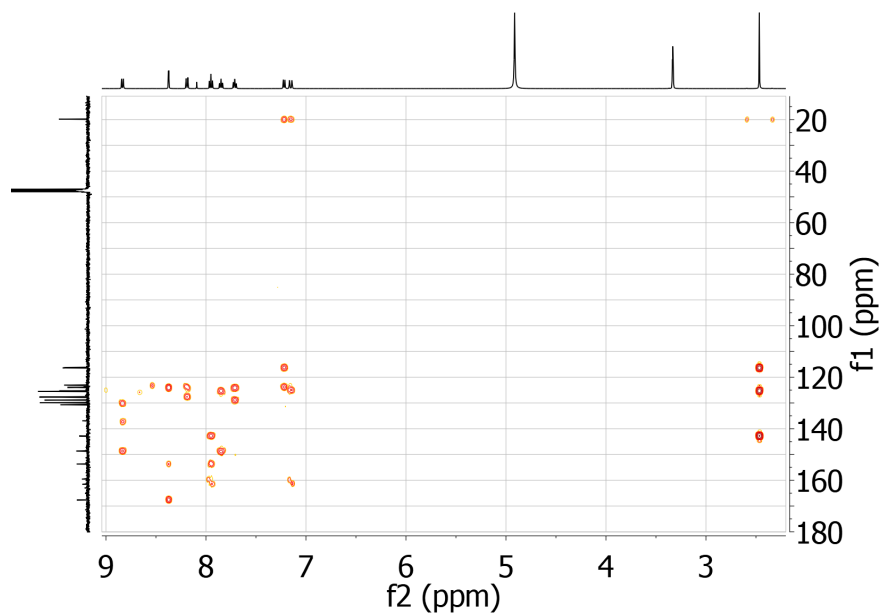
Espectro 25b: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



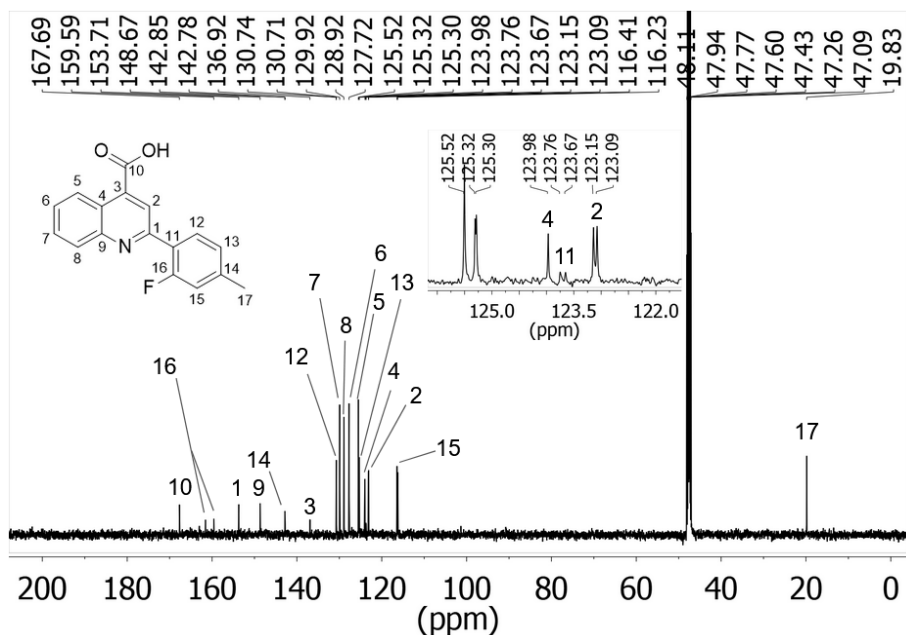
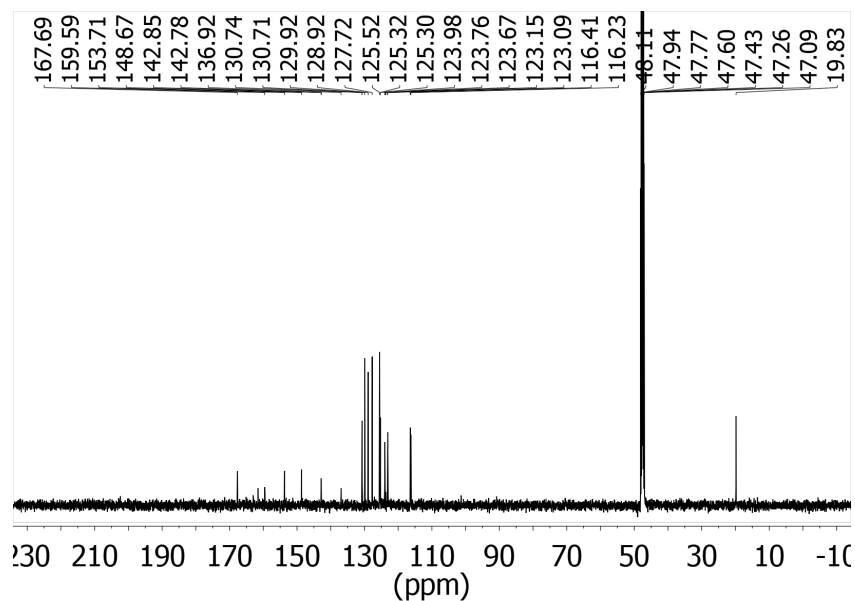
Espectro 25c: espectro de RMN COSY de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico.



Espectro 25d: espectro de RMN HSQC de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico. Laranja indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e azul indica hidrogênios pares (CH₂).



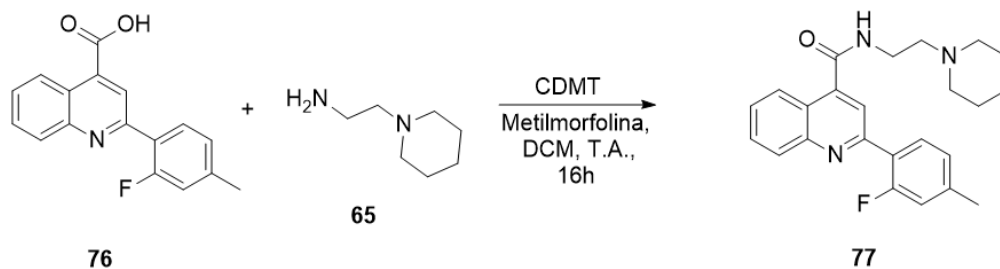
Espectro 25e: espectro de RMN HMBC de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico.



Espectro 25f: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil)quinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

De qualquer forma, os resultados obtidos são suficientes para confirmar a obtenção da molécula desejada e prosseguimento para a amidação do produto com 1-(2-aminoetil)-piperidina para formação do análogo 498PFTol, conforme discutido na seção seguinte.

4.6.21. Amidação final de análogo *F*-toluênico de 498 (498PFTol)



Esquema 42: reação de amidação de ácido 2-(2-fluoro-4-metilfenil) quinolin-4-óico para síntese de 498PFTol.

A amidação de ácido 6-fluor-2-(p-tolil)quinolin-4-óico com 1-(2-aminoetil)-piperidina se deu de maneira análoga aos outros derivados de 498P, utilizando-se CDMT como agente condensante. A reação também foi acompanhada por LCMS (Figura 77) após 16h, que indicou a formação do produto desejado (TR = 1,30; M/z = 392).

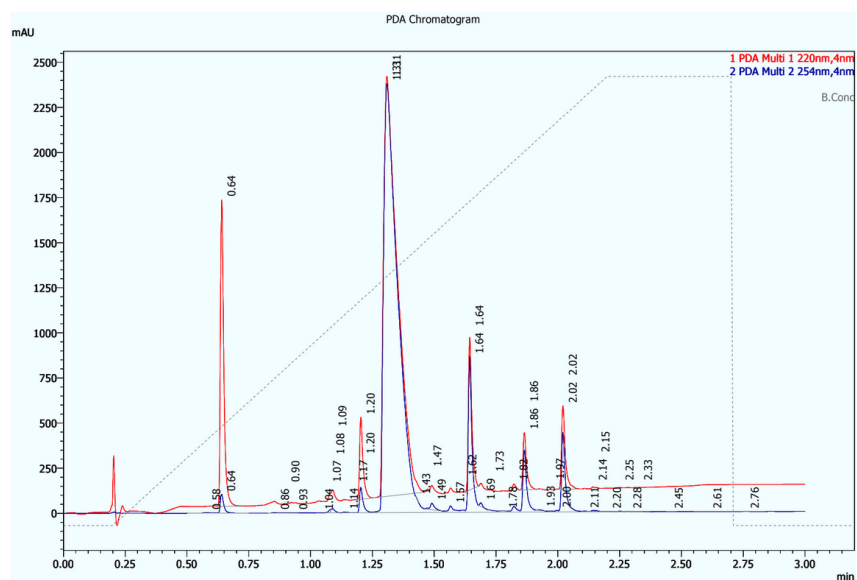
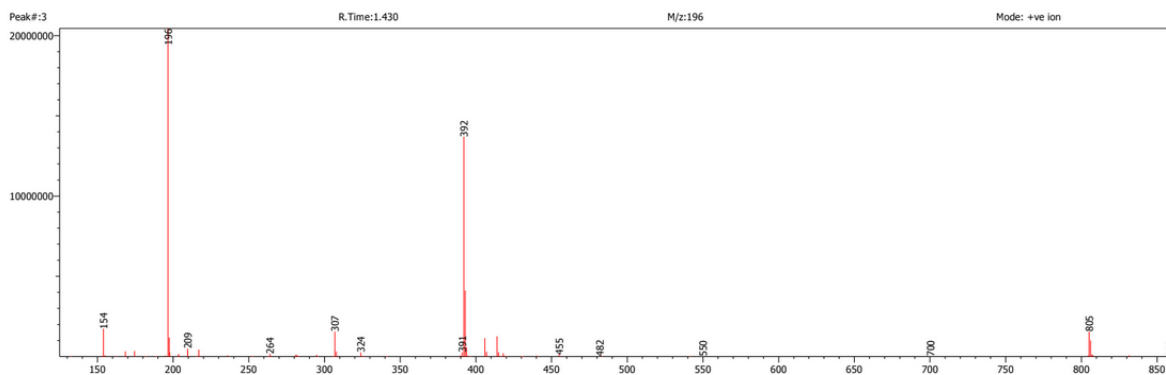


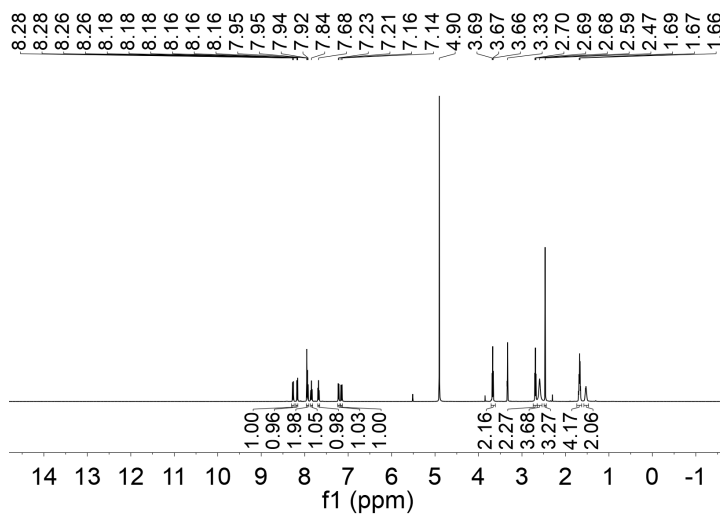
Figura 77: cromatograma obtido por LCMS da reação de síntese de 498PFTol.

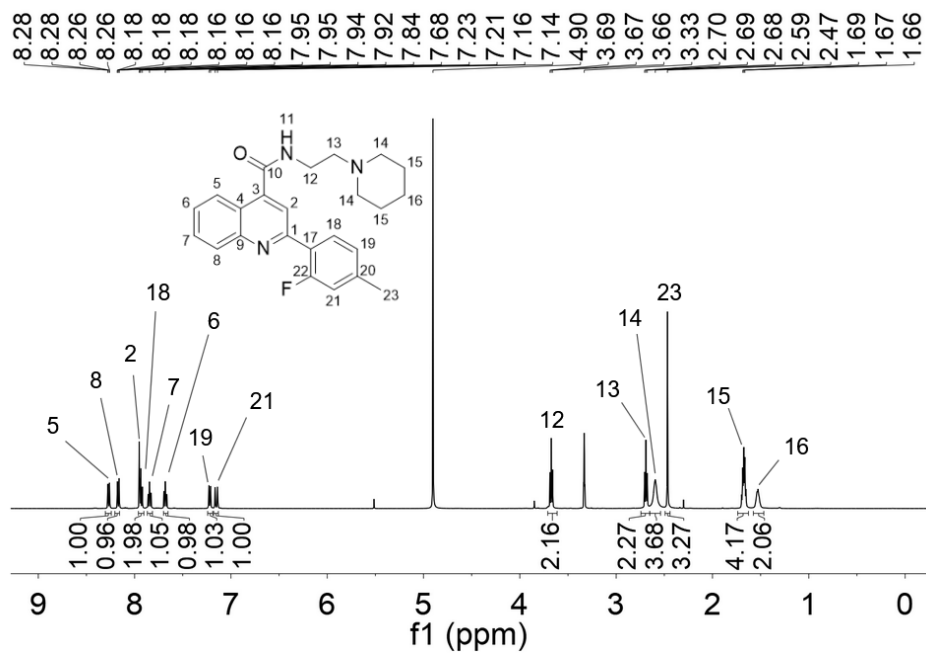
A estrutura do composto foi confirmada inicialmente por espectrometria de massas (Espectro 26a), que indicou massa de 392 u, correspondente a $(M+H)^+$. Em seguida, na análise de RMN de ^1H , foi possível a atribuição de todos os sinais aos hidrogênios do produto, com auxílio de espectros 2D de COSY, HSQC e HMBC. O mesmo vale para o espectro de ^{13}C . Em particular, destacam-se os sinais em 3,67 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,69 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,59 (s, 4H), 1,67 (p, $J = 5,7$ Hz, 4H) e 1,58 – 1,49 ppm (m, 2H), que correspondem aos hidrogênios da 1-(2-aminoetil)-piperidina. Já no espectro de ^{13}C , os carbonos dessa região correspondem aos sinais em 57,31, 54,14, 36,56, 25,26 e 23,74 ppm. Além disso, foi observada a formação de dupletos no espectro de ^{13}C por conta do acoplamento F-C, sendo que a constante para o C22

foi de 250,7 Hz, que é um valor elevado, porém esperado para esse tipo de sistema (PAVIA et al., 2009).

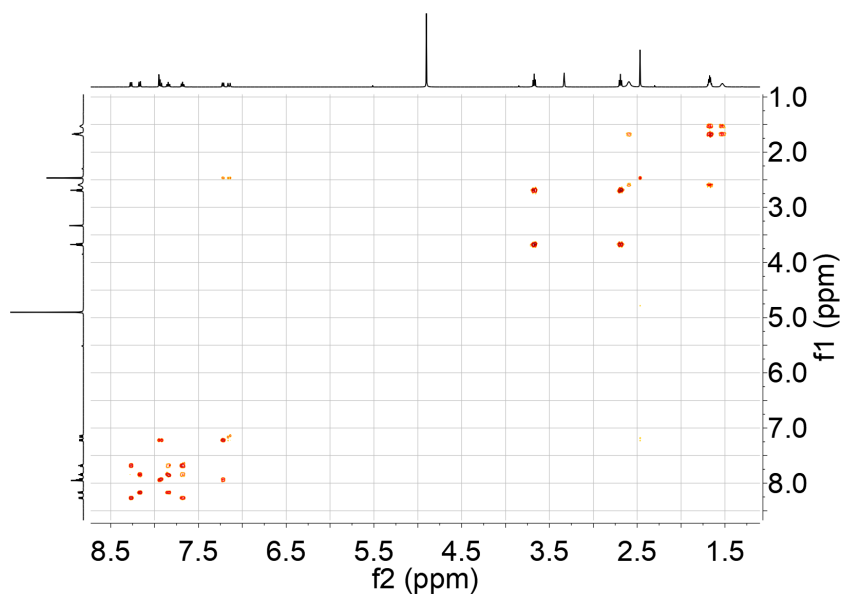


Espectro 26a: espectro de massas obtido por LCMS no modo positivo e após purificação da amostra.

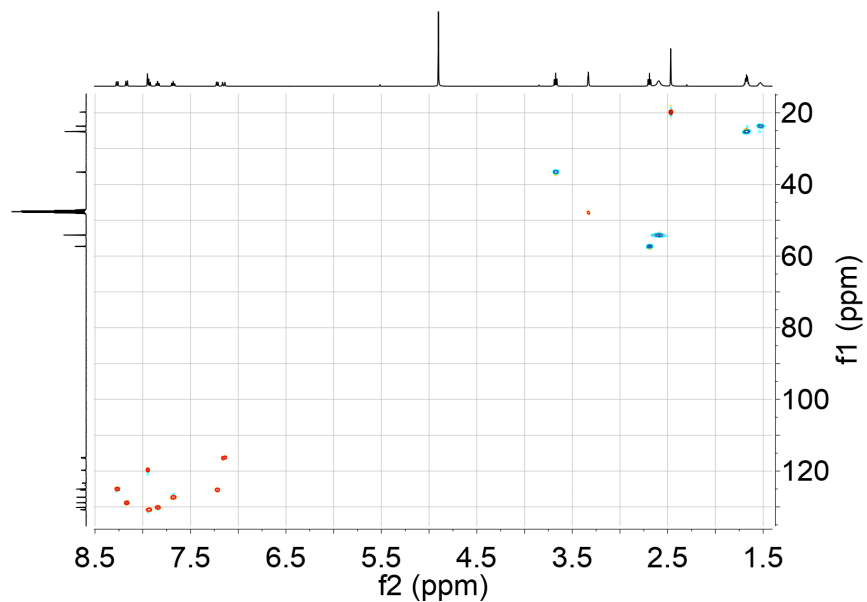




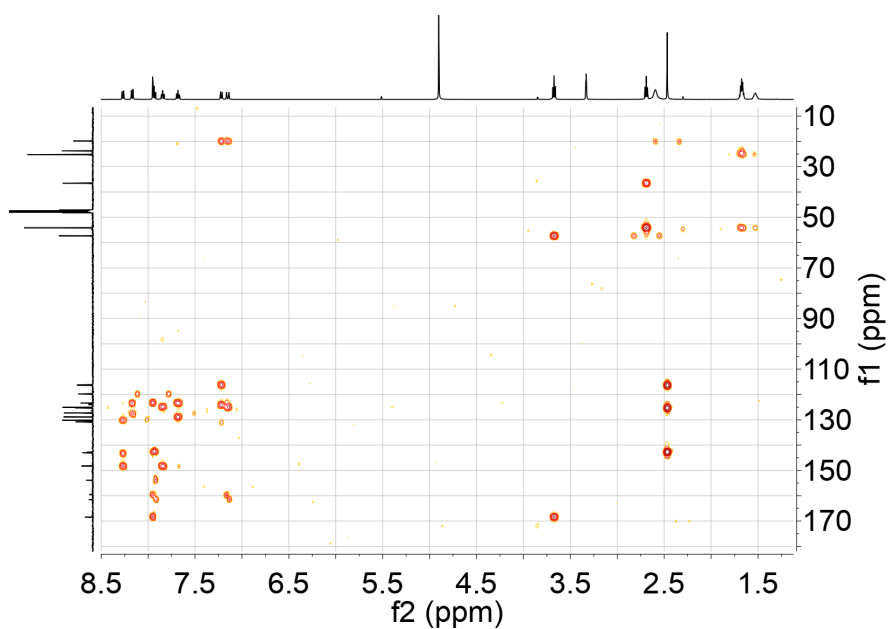
Espectro 26b: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de 498PFTol. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



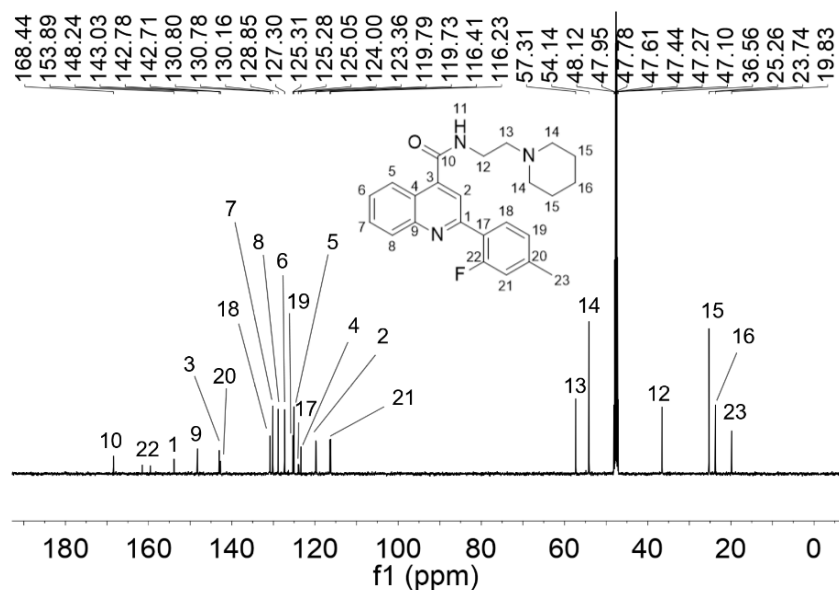
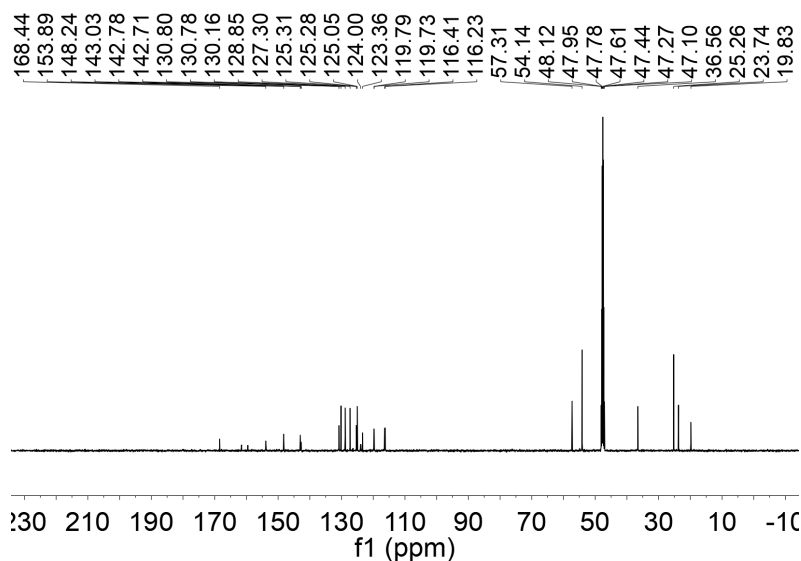
Espectro 26c: espectro de RMN COSY de 498PFTol.



Espectro 26d: espectro de RMN HSQC de 498PFTol. Laranja indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e azul indica hidrogênios pares (CH₂).



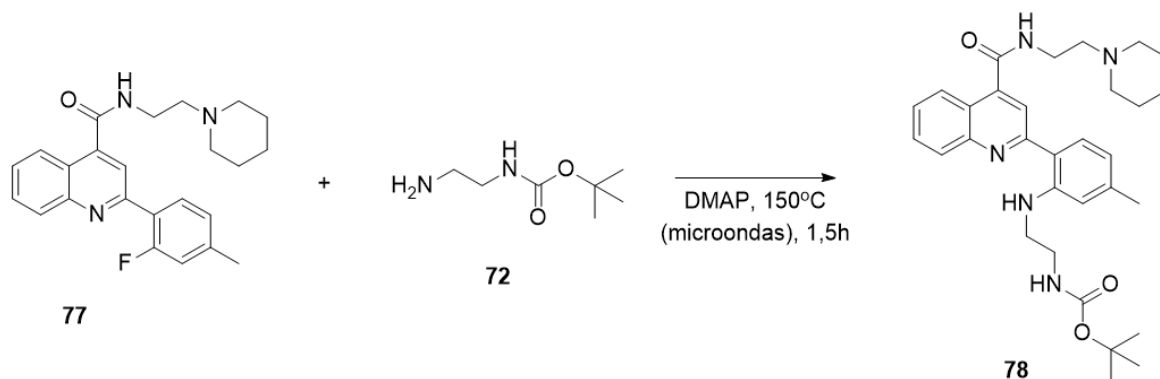
Espectro 26e: espectro de RMN HMBC de 498PFTol.



Espectro 26f: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, MeOD) de 498PFTol. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Com a confirmação da estrutura do produto e a mudança de posição do F em relação ao composto 498PTol, foi possível tentar outra reação de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ da molécula potencialmente ativa com o espaçante *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato, para avaliar se a molécula seria mais reativa nesse tipo de reação.

4.6.22. Substituição nucleofílica aromática de 498PFTol e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato



Esquema 43: reação de SNAr de 498PFTol para adição de espaçante diamínico protegido.

Assim como realizado com 498PTol, tentou-se realizar uma SNAr de 498PFTol e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato. O objetivo dessa reação era avaliar se a nova posição do F deixaria o composto mais reativo para esse tipo de reação e, assim, permitir a adição do agente espaçante desejado. Com base nos resultados anteriores, decidiu-se iniciar a reação nas condições mais favoráveis possíveis, utilizando-se o espaçante como solvente reacional e aquecendo-se a reação a 150 °C em um reator de microondas por 1,5 h. Entretanto, a análise da reação por LCMS (Figura 78) após esse período indicou que produto não foi formado e que 498PFTol (TR = 1,33 min; M/z = 392) não reagiu nem se degradou nessas condições.

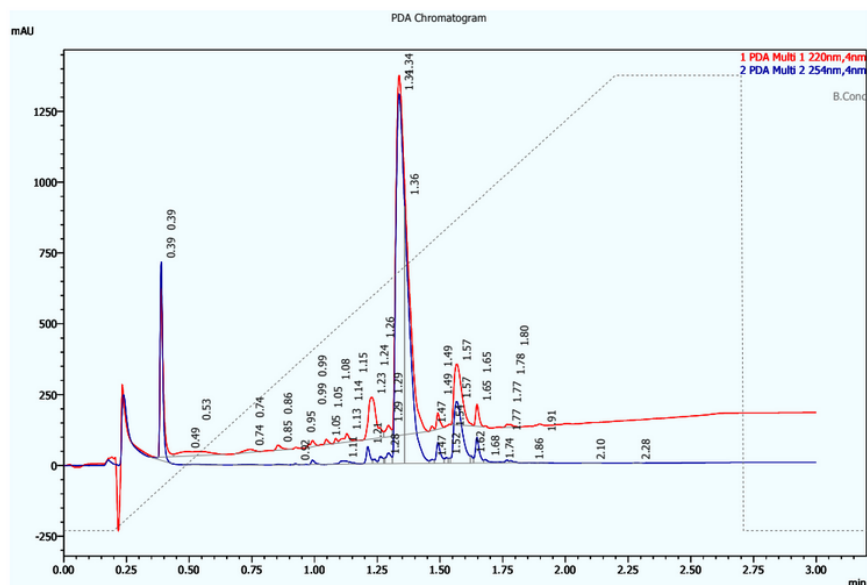
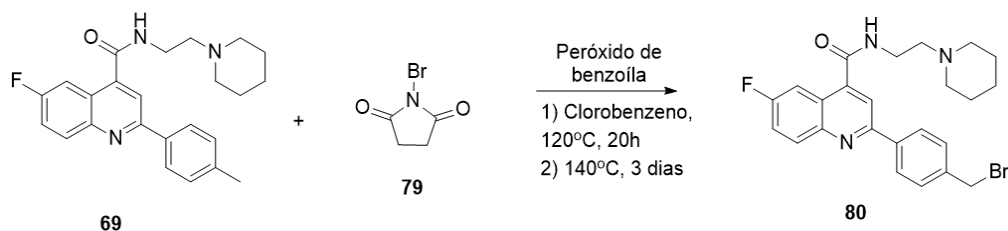


Figura 78: cromatograma obtido por LCMS da reação de adição do espaçante aminínico a 498PFTol por SNAr.

Assim, também considerou-se o análogo 498PFTol como sendo inerte a reações de SNAr. A partir desse resultado, decidiu-se tentar a bromação da metila toluênica na cadeia lateral de 498PTol e 498PFTol, seguindo uma reação análoga à utilizada em reações de síntese de derivados de 498 (BARAGAÑA et al., 2016). O bromo permitiria que reações de substituição nucleofílica fossem realizadas nesta posição e, assim, espaçantes poderiam ser adicionados ou poderia ser realizado o acoplamento direto com PAMAM G0.

4.6.23. Bromação alílica de 498PTol



Esquema 44: bromação da metila de 498PTol por NBS.

A primeira tentativa de bromação de análogos de 498P foi realizada com 498PTol utilizando-se um protocolo semelhante ao disponível na literatura (BARAGAÑA et al., 2016). Inicialmente, utilizou-se uma temperatura ligeiramente mais baixa (120 °C), pois havia o receio de as condições oxidativas da reação degradarem a molécula potencialmente ativa. Entretanto, após 20 h de reação, analisou-se a reação por LCMS (Figura 79), que indicou que o produto de interesse não havia sido formado, havendo material de partida ainda presente (TR = 1,44 min; M/z = 392). O pico com TR = 1,66 corresponde a clorobenzeno.

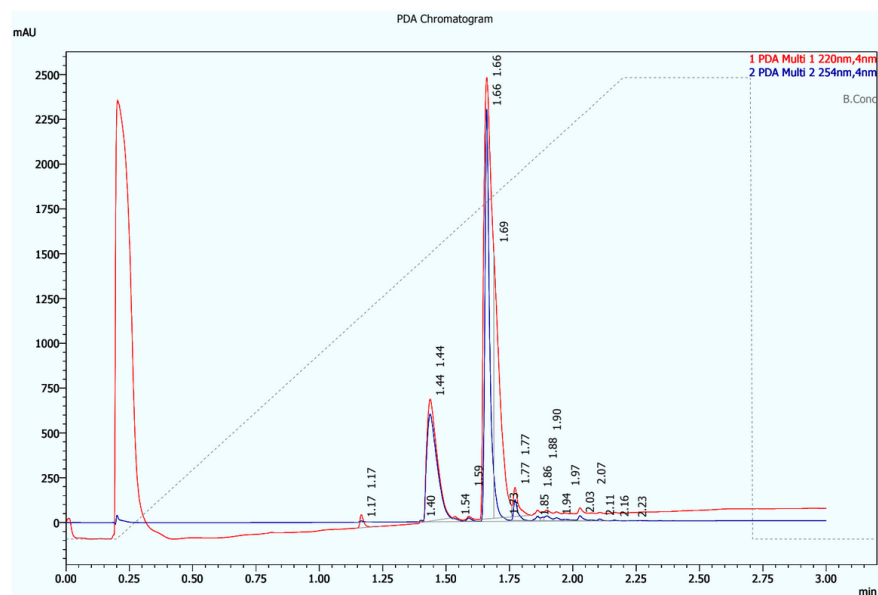
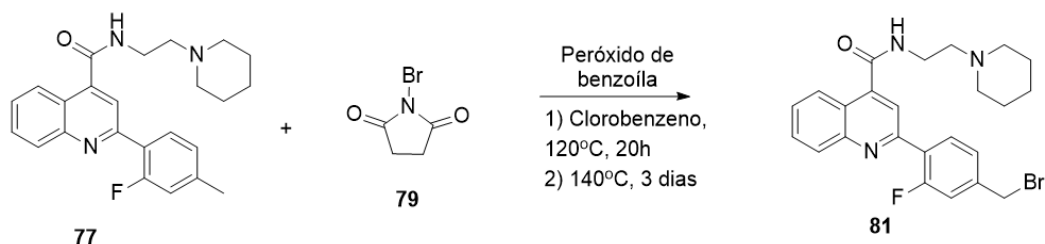


Figura 79: cromatograma obtido por LCMS da reação de bromação de 498PTol.

Por conta disso, a reação foi aquecida a 140 °C e mantida durante o final de semana para reagir. Entretanto, uma nova análise de LCMS indicou o mesmo resultado e, assim, a reação foi descartada.

4.6.24. Bromação alílica de 498PFTol



Esquema 45: bromação da metila de 498PFTol por NBS.

Pela falta de sucesso da bromação de 498PTol, tentou-se a bromação com o análogo 498PFTol, para avaliar se a posição do F influenciaria a reação. Desta vez, no entanto, iniciou-se a reação a 140 °C, pois a reação com 498PTol mostrou que as moléculas potencialmente ativas são estáveis nessas condições reacionais. Novamente, após 20 h de reação, notou-se por LCMS (Figura 80) que não foi formado produto de interesse, havendo majoritariamente material de partida (TR = 1,39 min; M/z = 392) e clorobenzeno (TR = 1,66 min). Dessa forma, a reação foi descartada.

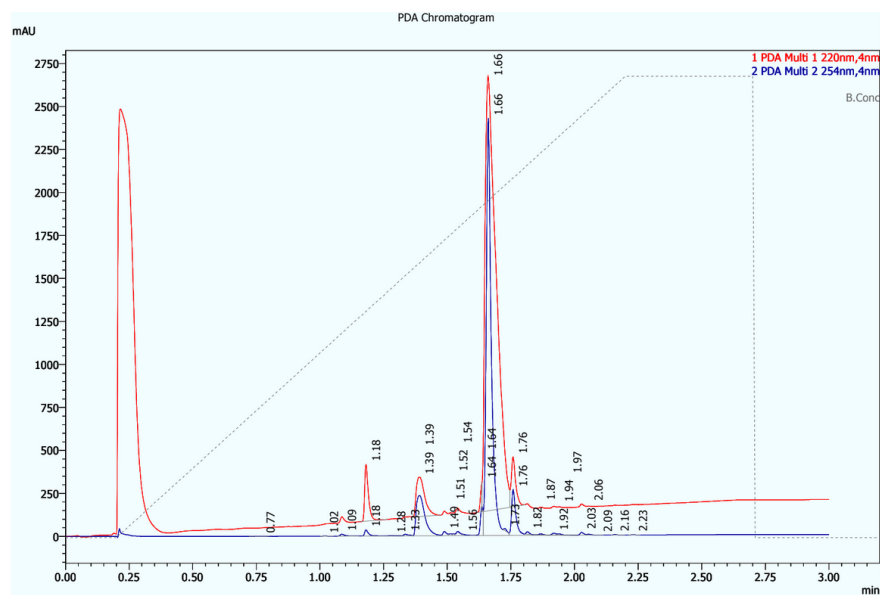
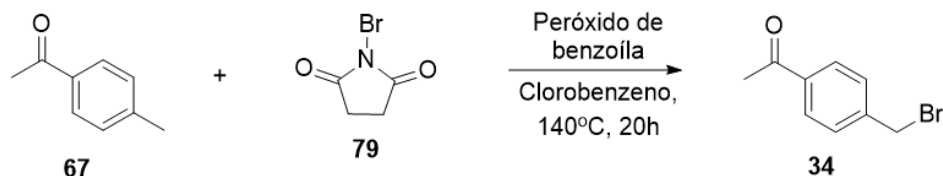


Figura 80: cromatograma obtido por LCMS da reação de bromação de 498PFTol.

Com base nesses resultados, decidiu-se que a adição do espaçante deveria ser realizada em etapas iniciais da síntese de análogos de 498P, pois a bromação dos materiais de partida da síntese de 498 já está bem descrita (BARAGANA et al., 2016)

4.6.25. Síntese de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona



Esquema 46: bromação de 4-metilacetofenona por NBS.

A síntese de análogos de 498 e 498P utiliza diferentes acetofenonas 4-substituídas na reação com análogos de isatina, formando quinolinas com ácidos carboxílicos na posição 4 e com grupo aromático 4-substituído na posição 2 (BARAGANA et al, 2016), conforme exemplificado no esquema 5.

Assim, para a síntese desses diferentes análogos de acetofenona, pode-se realizar a bromação da metila de 4-metilacetofenona, formando 4-bromometilacetofenona. O bromo adicionado é um bom grupo de partida e permite que reações de substituição nucleofílica sejam realizadas na posição (VOLLHARDT, SHORE, 2007) e, portanto, análogos podem ser produzidos pela reação de 4-bromometilacetofenona com algum nucleófilo de interesse. Com base nisso, 4-bromometilacetofenona foi sintetizada pela reação de 4-metilacetofenona com NBS na presença de peróxido de benzoíla e em refluxo de clorobenzeno (BARAGANA et al., 2016).

A reação foi acompanhada por LCMS após 20h, observando-se a formação de produto (Figura 81 - TR = 2,27 min; M/z = 213 e 215; positivo). Ressalta-se que o espectro de massas obtido do produto (Espectro 18a) possui dois picos de intensidade similar e com uma diferença de 2 u, o que está de acordo com com a diversidade isotópica do átomo de Br e fornece mais uma evidência da formação de produto.

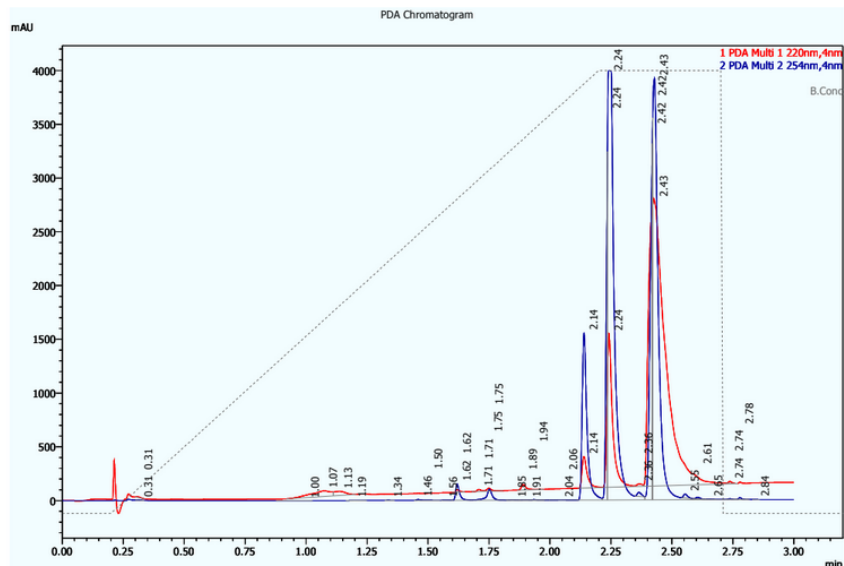
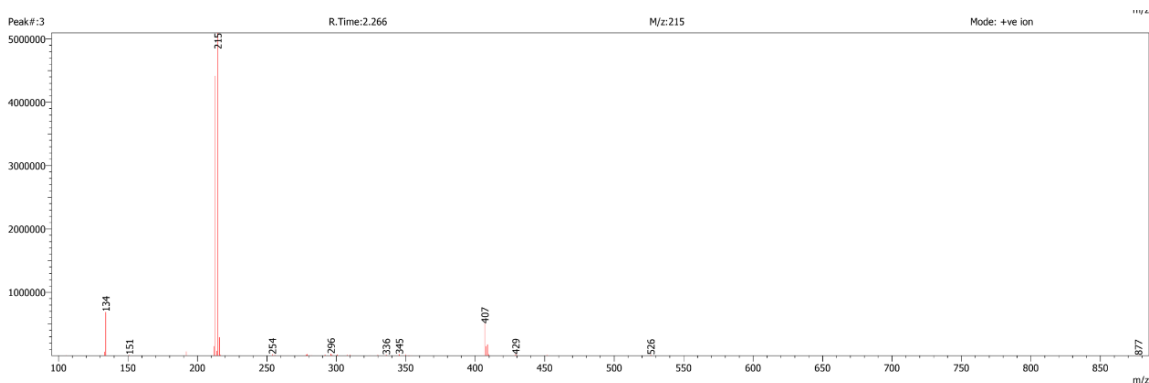
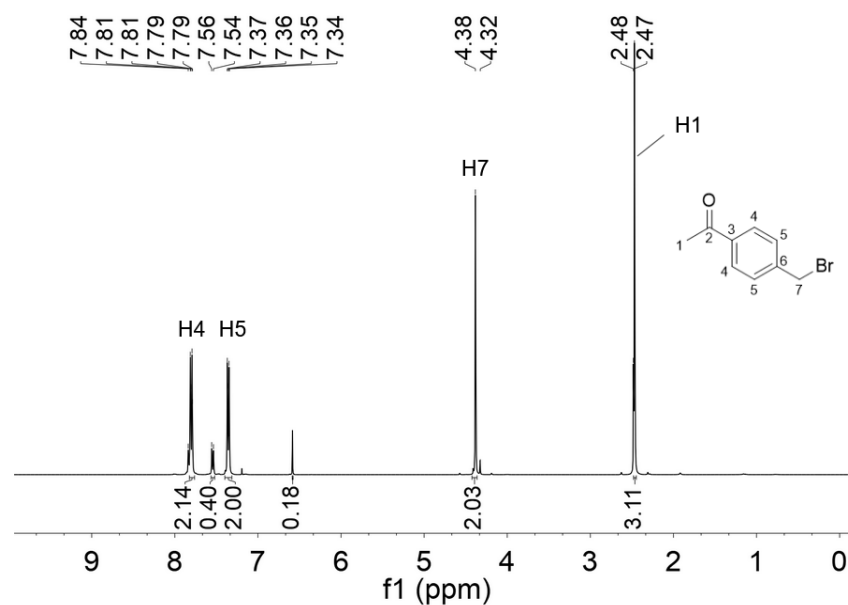
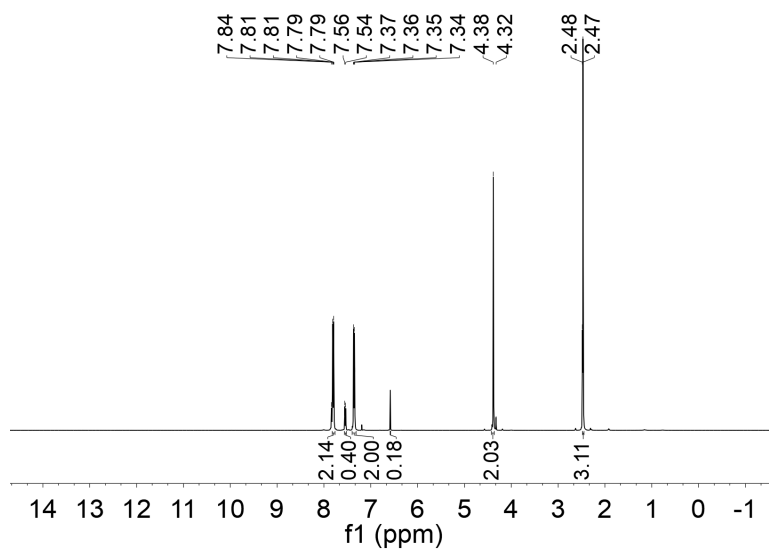


Figura 81: cromatograma da análise de LCMS da bromação de 4-metilacetofenona. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

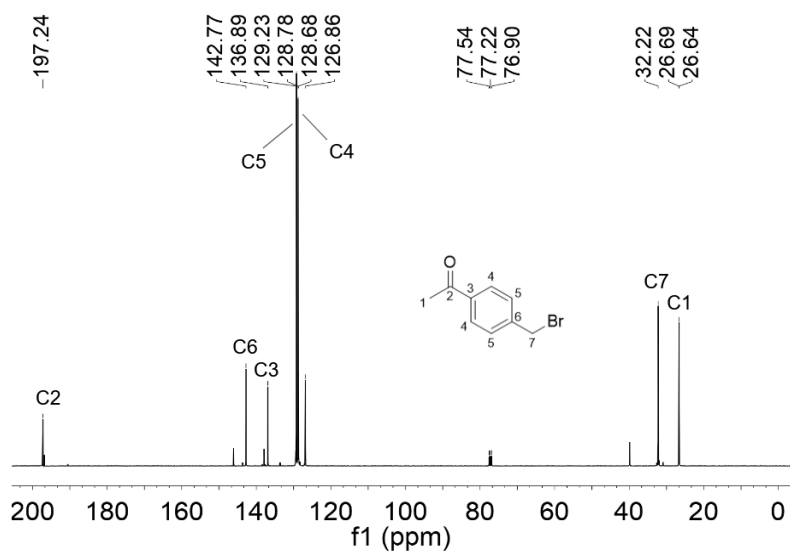
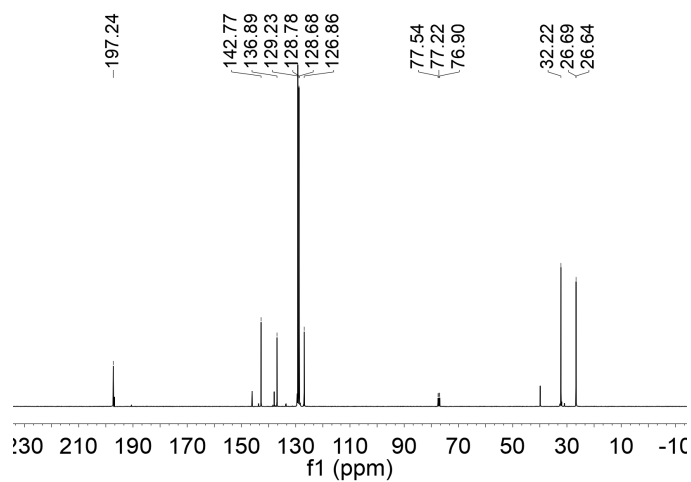


Espectro 18a: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

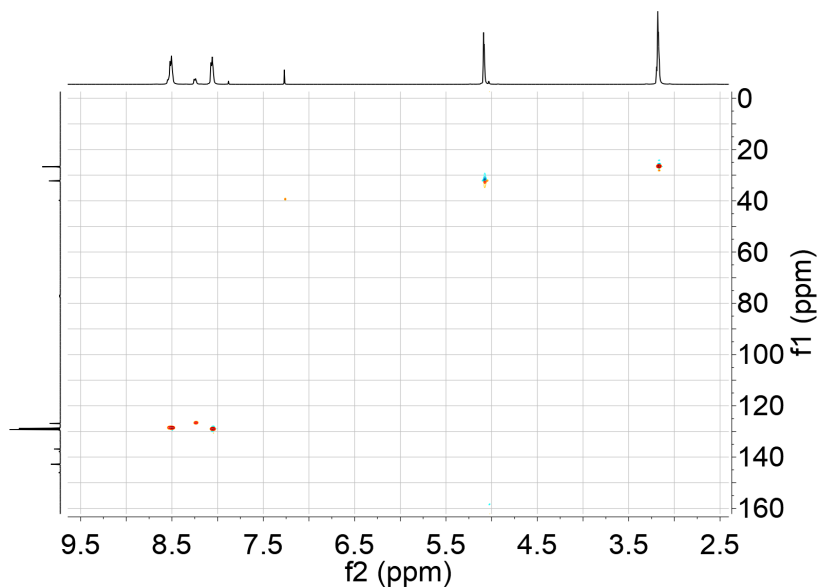
Por fim, a formação do produto foi confirmada por RMN (^1H , ^{13}C HMBC e HSQC). No espectro de ^1H (espectro 18b), são observados sinais aromáticos para 4 H além de um simpleto com integral para 2 H e um com integral para 3 H. Também é possível observar que impurezas estavam presentes na amostra, porém em baixa quantidade, o que é evidenciado pelos sinais em 7,84, 7,56, 7,54, 4,32 e 2,48 ppm. No espectro de ^{13}C , é observado um sinal 197,24 ppm, indicativo de uma cetona, além de sinais em região aromática (próximos a 130 ppm) e sinais em região alifática (região acima de 35 ppm). A atribuição dos H aromáticos e dos C foi realizada com o auxílio do HSQC (Espectro 18c) e HMBC (Espectro 18d).



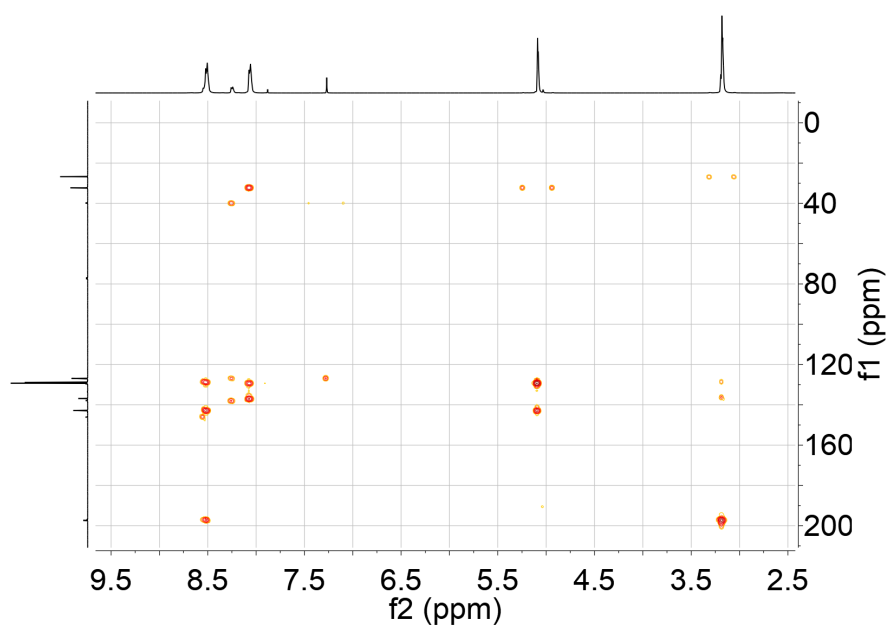
Espectro 18b: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 4-bromometilacetofenona. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 18b: espectro de RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) de 4-bromometilacetofenona. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



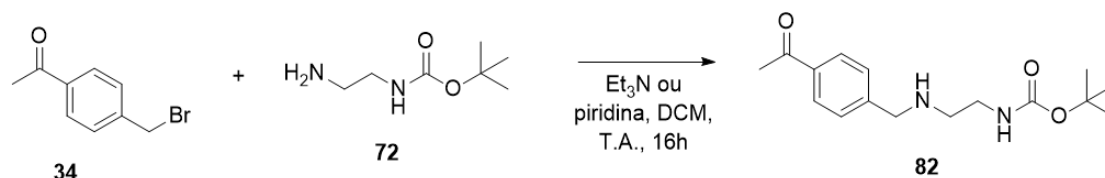
Espectro 17d: espectro HSQC de RMN de 4-bromometilacetofenona. Em laranja estão indicados H ímpares (CH e CH₃) e, em azul, H pares (CH₂).



Espectro 17c: espectro HMBC de RMN de 4-bromometilacetofenona

O sucesso dessa reação, incluindo seu rendimento favorável, permitiu a obtenção de um intermediário reativo para adição de diferentes grupos e síntese dos análogos de interesse.

4.6.26. *Substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e tert-butil(2-aminoetil)carbamato*



Esquema 47: reação de substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato

Conforme discutido previamente, análogos de 498P sem a morfolina (como 498PTole 498PFTol) são compostos semelhantes ao *hit* inicial que levou à descoberta de 498 (BARAGANA et al., 2016). Baseando-se nisso e no estudo de REA realizado com análogos de 498 (BARAGANA et al., 2016), pode-se esperar que análogos sem a morfolina ainda sejam ativos, ainda que com menor atividade antimalárica. Assim, a adição de espaçantes no carbono metílico de análogos toluênicos de 498P, como 498PTol, parece ser uma alternativa possível para ligação posterior com PAMAM G0.

Nesse contexto, após a falha da bromação de 498PTol e 498PFTol já discutida, a adição do espaçante *tert*-butil(2-aminoetil)carbamato poderia ser realizada nas etapas iniciais de síntese através de uma substituição nucleofílica da amina e de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona. Portanto, essa reação foi tentada utilizando-se condições análogas às utilizadas na substituição nucleofílica realizada na síntese de 4-(morfolinometil)benzônitrila (BARAGANA et al., 2016).

Na primeira tentativa, utilizou-se Et₃N como base na reação, conforme o descrito na literatura (BARAGANA et al., 2016). Após 16h de reação, uma análise por LCMS (Figura 82) indicou a formação de dois produtos diferentes: um com M/z = 293 (TR = 1,54 min), que corresponde ao produto desejado, e um com M/z = 234 (TR = 0,76 min), o qual estava em concentração significativamente maior. Em função disso, o composto com M/z foi isolado e analisado por RMN, que indicou que se tratava da reação da 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona com a Et₃N, formando a amina quaternária apresentada na Figura 80.

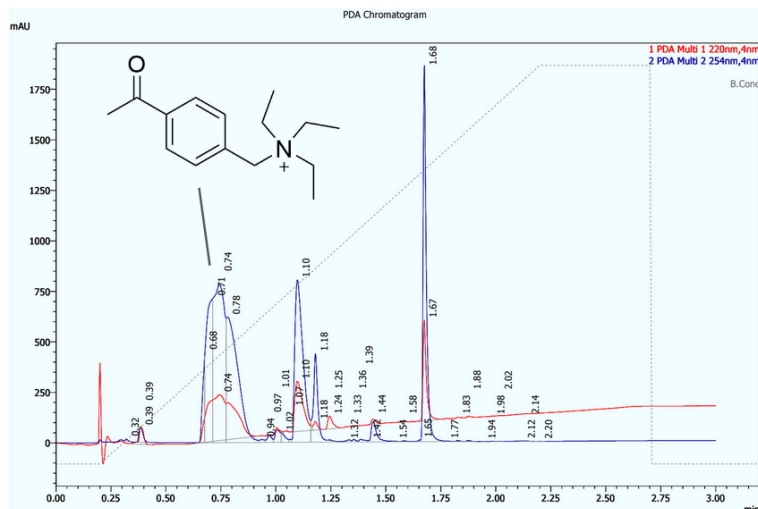
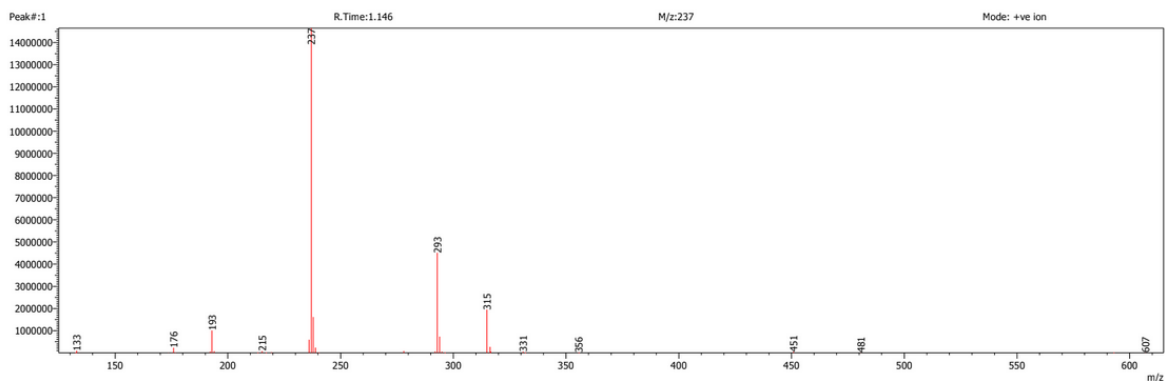


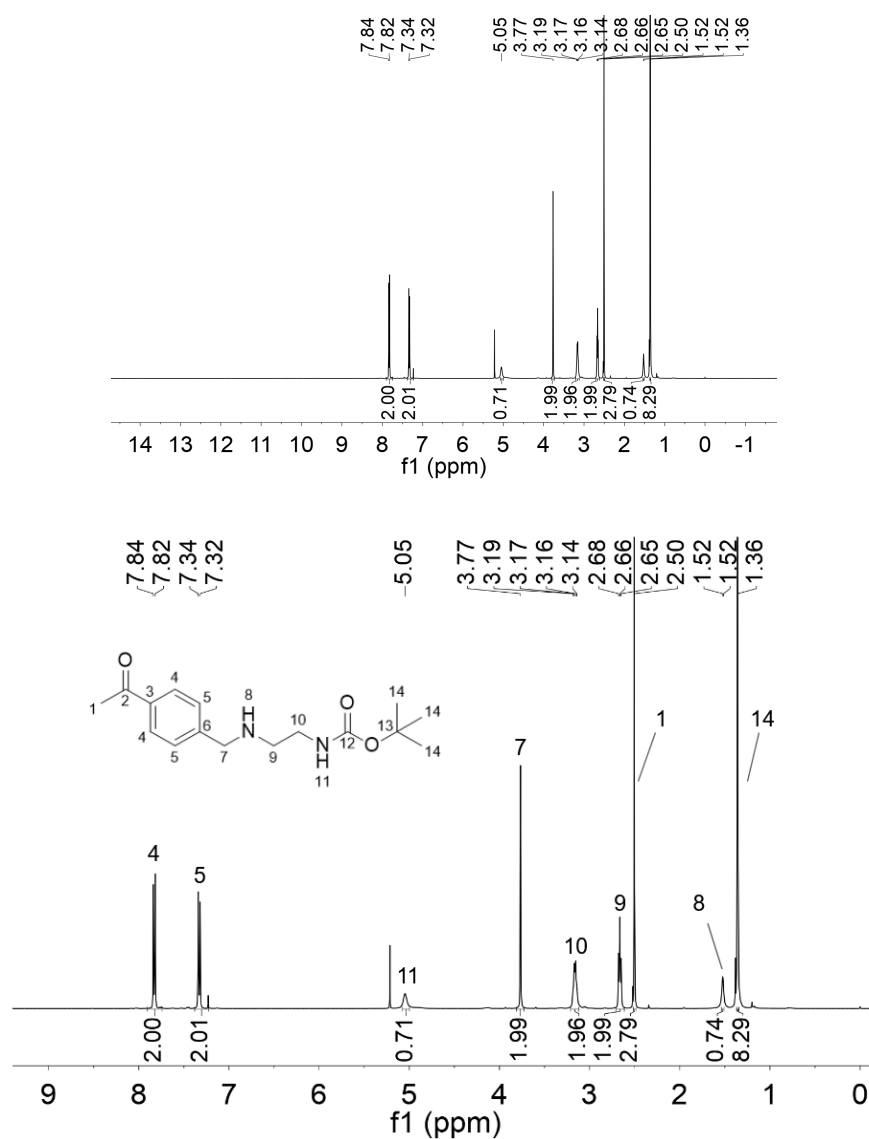
Figura 82: cromatograma da análise de LCMS da substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona. A molécula desenhada corresponde à estrutura da amina quaternária formada na reação como subproduto. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Como a reação inicial teve um rendimento de ~50% após o isolamento do material desejado e reações subsequentes em maior escala tiveram um rendimento ao redor de 20%, tentou-se trocar a base utilizada com o intuito de diminuir a formação do subproduto e aumentar o rendimento reacional. Assim, optou-se pela utilização de piridina na mesma proporção de Et₃N. Entretanto, ao analisar-se a reação por LCMS, encontrou-se um sinal significativo com M/z = 212, que é a massa da amina quaternária formada com piridina, e o rendimento final foi de 14%. Portanto, a troca da base não foi efetiva para evitar a formação do subproduto.

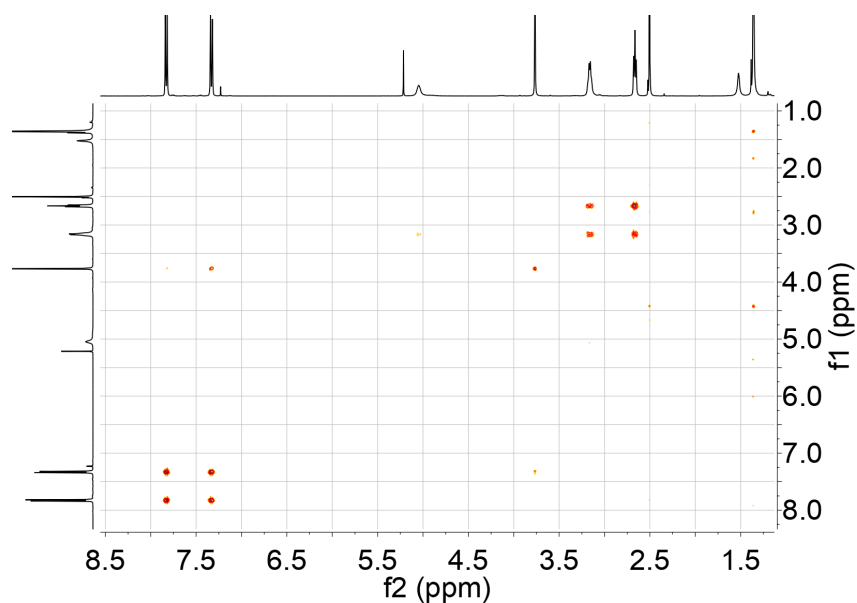
De qualquer forma, apesar da formação das diferentes aminas quaternária, foi obtido o produto desejado, que foi confirmado por RMN e espectrometria de massas (Espectro 19a). O RMN de ¹H (Espectro 19b) permitiu a atribuição de todos os hidrogênios com auxílio de RMNs 2D: COSY (Espectro 19c), HSQC (Espectro 19d), HMBC (Espectro 19f). Os sinais para os hidrogênios amínicos (H8 e H11) foram atribuídos com base no HSQC, uma vez que ambos os sinais não possuíam correlação com nenhum e, portanto, só poderiam ser os amínicos. Além disso, o simpleto em 1,36 ppm com integral para 9 H é correspondente às metilas do grupo protetor boc, que evidencia a adição do espaçante.



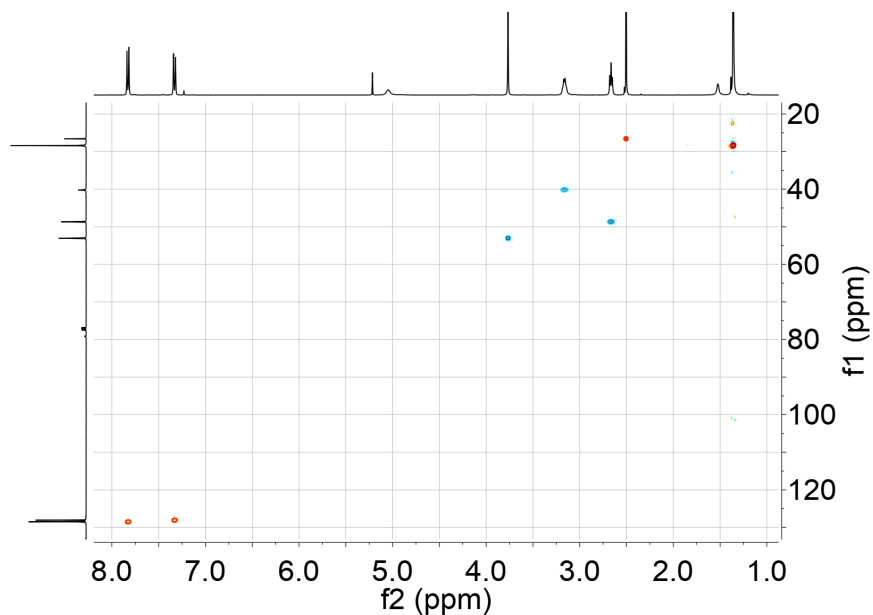
Espectro 19a: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo. 293 corresponde à $(M+H)^+$, enquanto que 315 corresponde a $(M+Na)^+$.



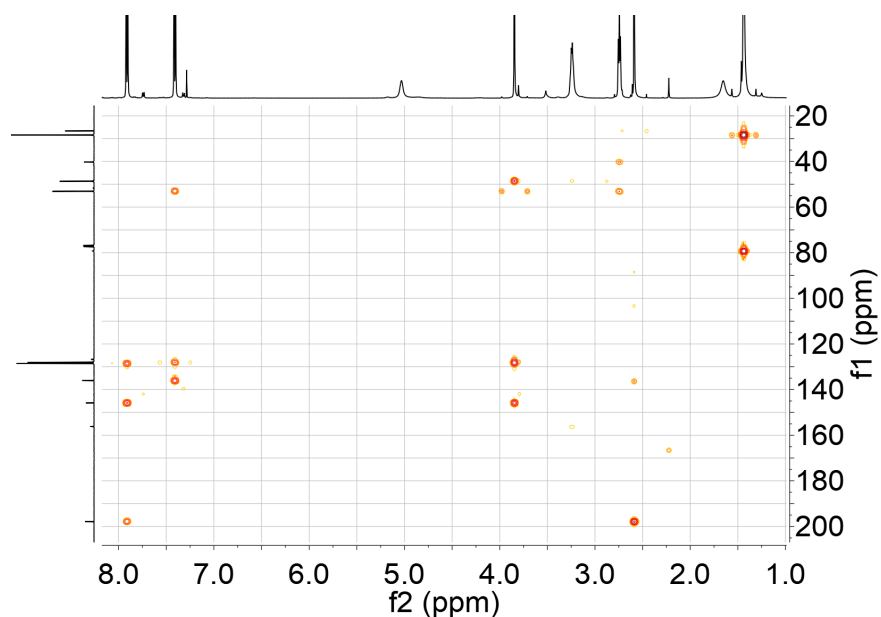
Espectro 19b: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de *tert*-butil (2-((4-acetilbenzil)amino)etil)carbamato. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 19c: espectro COSY de RMN de *tert*-butil (2-((4-acetilbenzil)amino)etil)carbamato.

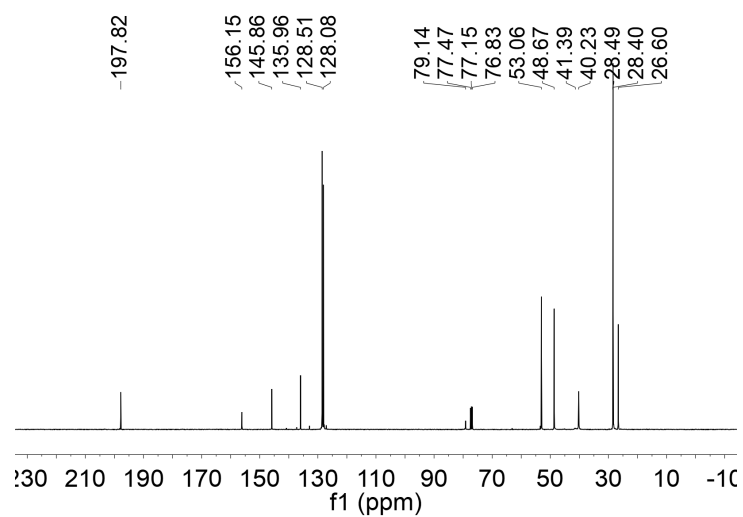


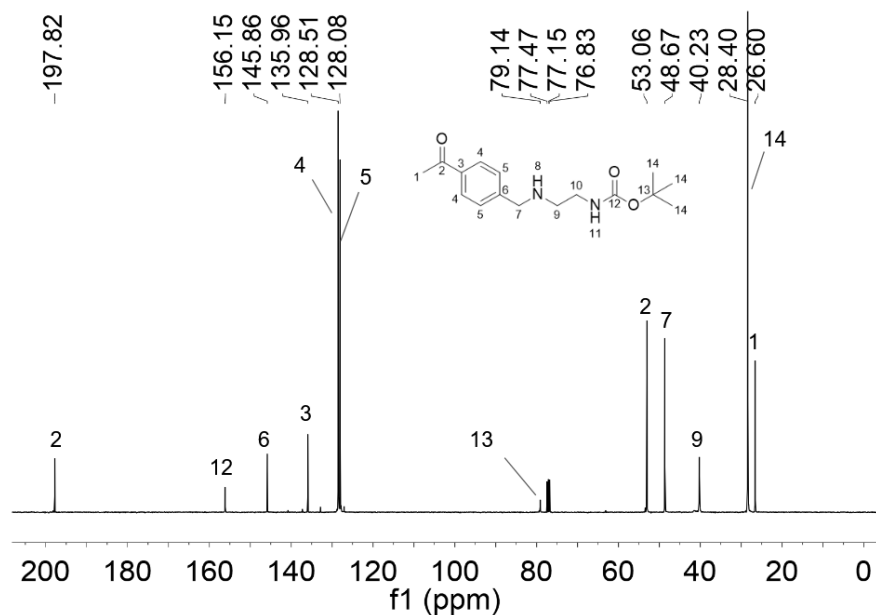
Espectro 19d: espectro HSQC de RMN de *tert*-butil (2-((4-acetilbenzil)amino)etil)carbamato. Em laranja estão indicados H ímpares (CH e CH_3) e, em azul, H pares (CH_2).



Espectro 19e: espectro HMBC de RMN de *tert*-butil (2-((4-acetilbenzil)amino)etil)carbamato.

No espectro de ^{13}C , destacam-se os sinais em 197,82 e 156,15 ppm, que correspondem, respectivamente, à carbonila cetônica e ao carbamato. Além disso, todos os outros sinais puderam ser atribuídos ao produto de interesse.

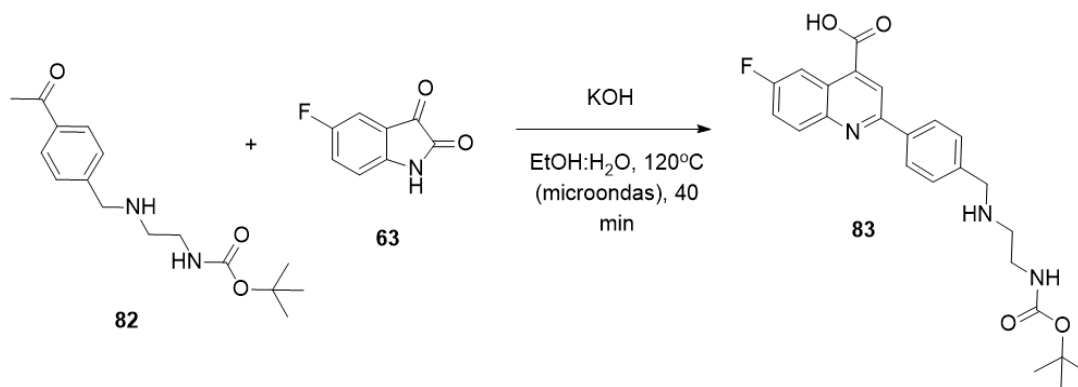




Espectro 19f: espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de *tert*-butil(2-((4-acetilbenzil)amino)etil)carbamato. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Obtido o produto de interesse, havia material de partida para a síntese do ácido quinolínico de interesse, que será discutida na próxima sessão.

4.6.27. Síntese de ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico.



Esquema 48: reação de expansão de anel para síntese de ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico.

A obtenção de *tert*-butil(2-((4-acetilbenzil)amino)etil)carbamato permitiu que fosse realizada a síntese de ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico pela reação do material de partida com 5-fluorisatina. Essa reação foi

realizada em um reator de microondas de maneira análoga às realizadas previamente. No entanto, após o período de 20 min, observou-se por LCMS a presença de material de partida ainda presente no meio reacional e, portanto, a reação foi aquecida uma segunda vez a 120 °C por 20 min no reator de microondas, o que levou a um maior consumo do reagente cetônico (TR = 1,40 min) reagentes e formação do produto de interesse (TR = 1,58 min; M/z = 440) (Figura 83).

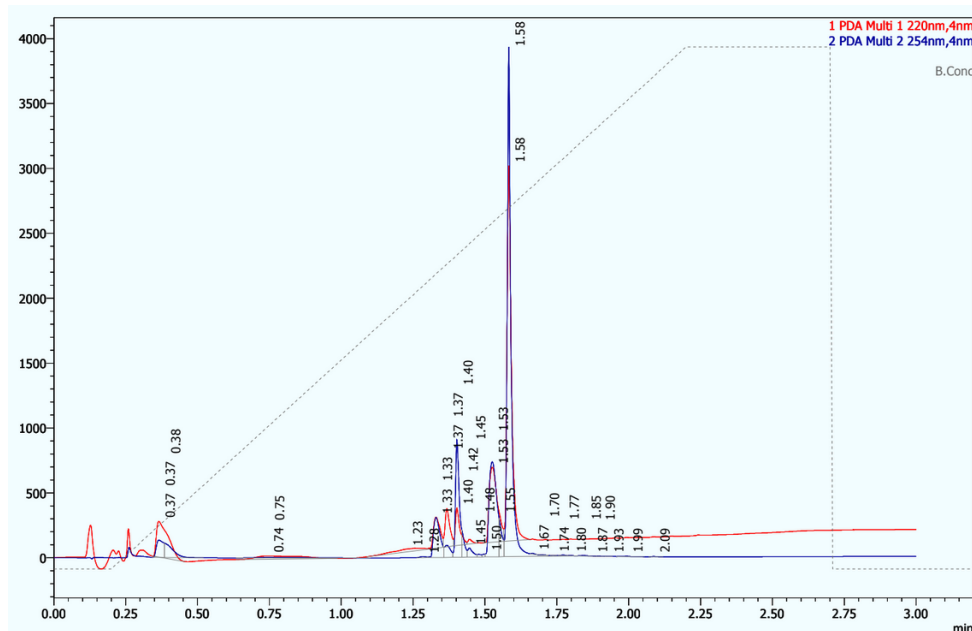
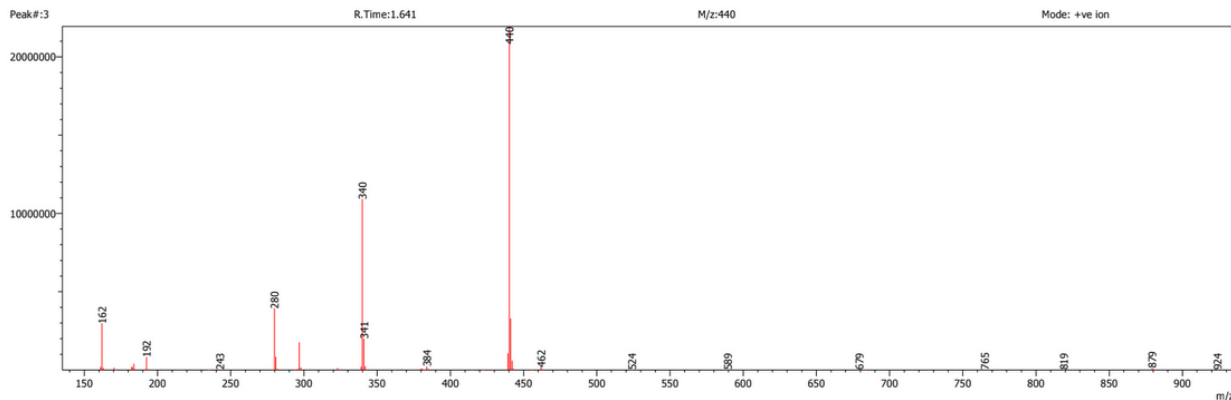


Figura 83: cromatograma da análise de LCMS da reação de síntese do ácido quinolinóico após o segundo período no reator de microondas. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

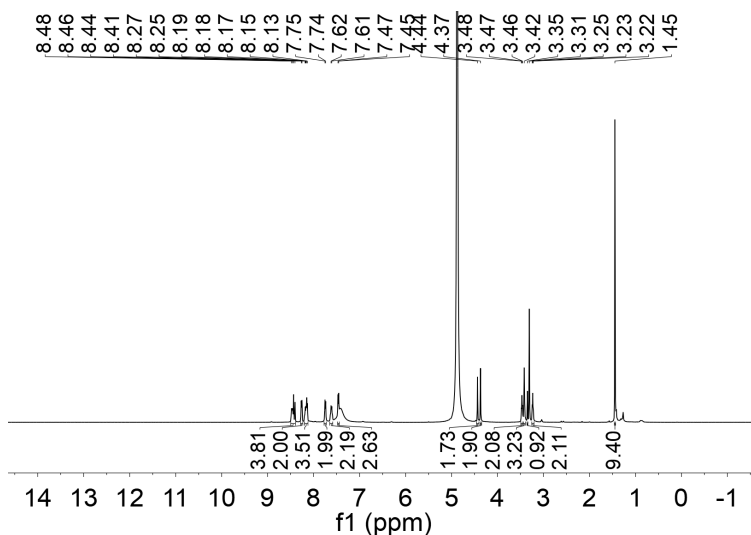
A purificação do produto se mostrou particularmente desafiadora. Em geral, a purificação dos ácidos obtidos da reação de acetofenonas diversas com 5-fluorissatina ou isatina foi realizada por precipitação com pH ácido seguida de cromatografia *flash* com fase estacionária de sílica, caso a precipitação não fosse suficiente para obtenção de pureza adequada (em geral, >90% por LCMS). Entretanto, a acidificação do meio reacional poderia levar a quebra do grupo protetor boc e, portanto, o meio reacional foi levemente acidificado com solução saturada de NH_4Cl e extraído com EtOAc. Entretanto, grande parte do produto persistiu na fase aquosa. A parcela que foi extraída foi purificada 2 vezes por cromatografia em sílica. A fração aquosa que ainda continha produto foi acidificada até pH 5 e novamente extraída com EtOAc, o que permitiu a coleta de mais produto na fase orgânica. Esse novo produto extraído também foi purificado 2 vezes por cromatografia em sílica. Ao final, os materiais purificados foram combinados, porém, ao analisá-los por LCMS, foi notada uma baixa pureza (~50%) e uma terceira purificação foi realizada, porém ela não resultou em um aumento de pureza.

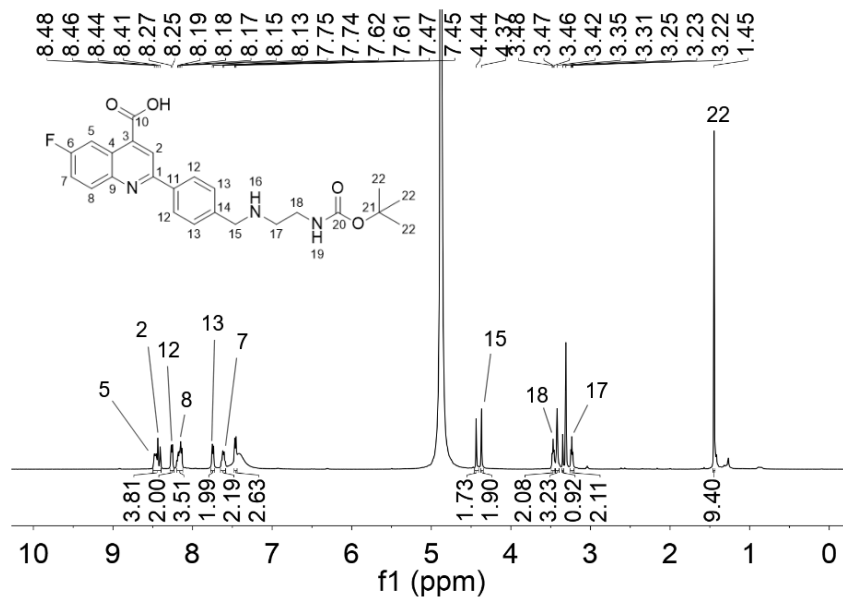
Apesar disso, a análise do material obtido por espectrometria de massas (espectro 20a) indicou uma massa de 440, correspondente a $(M+H)^+$. Análises por RMN sugerem a obtenção do produto, no entanto, devido à grande quantidade de impurezas, não foi possível a correta atribuição de todos os H e C.



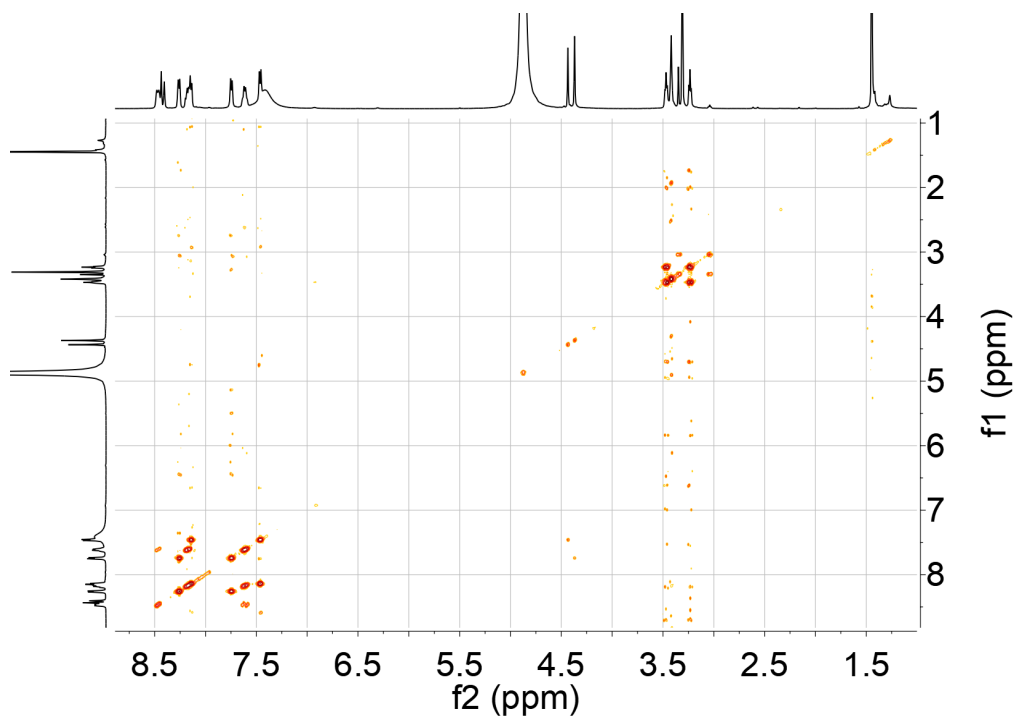
Espectro 20a: espectro de massas por LCMS do produto obtido com o detector no modo positivo.

No espectro de ^1H (Espectro 20b), com auxílio dos espectros 2D de COSY (Espectro 20c), HSQC (Espectro 20d) e HMBC (Espectro 20e), tentou-se uma atribuição dos H pertencentes ao produto, porém ela não é inequívoca. Destacam-se o sinal em 1,45 ppm, correspondente às metilas do grupo protetor boc e os sinais em campo abaixo de 7,0 ppm, que correspondem aos sinais dos hidrogênios aromáticos do produto. Já no espectro de ^{13}C (Espectro 20f), com auxílio do HMBC, foi possível determinar o sinal em 170,99 ppm, correspondente à carboxila e o sinal em 158,80 ppm, que corresponde ao carbono do carbamato.

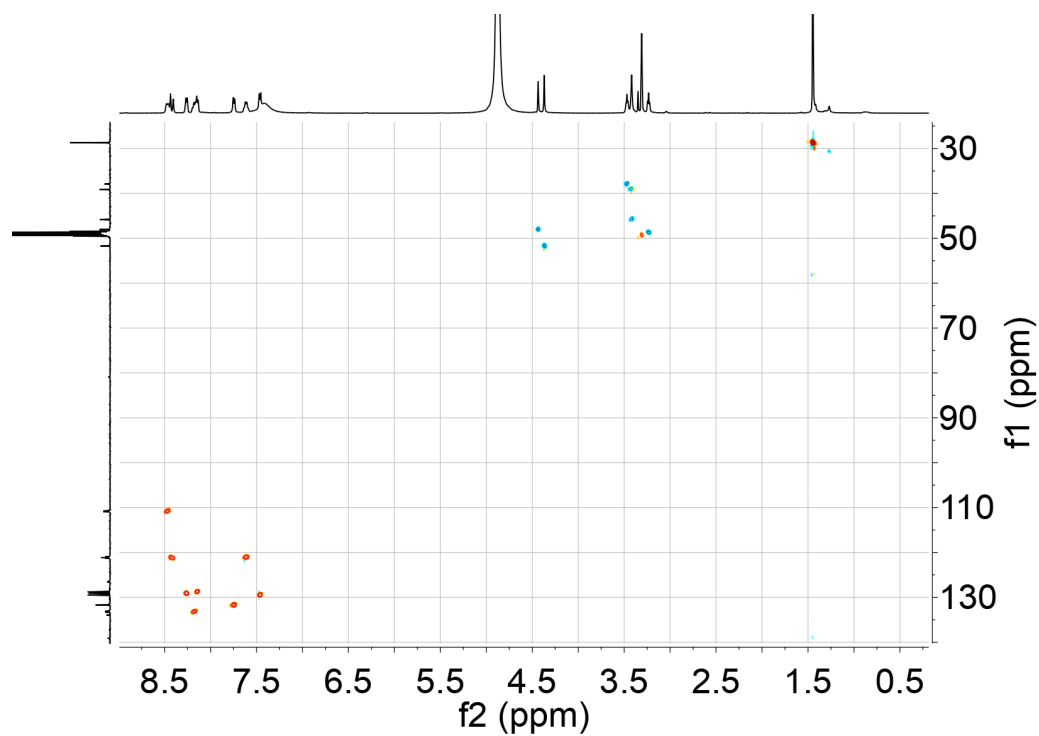




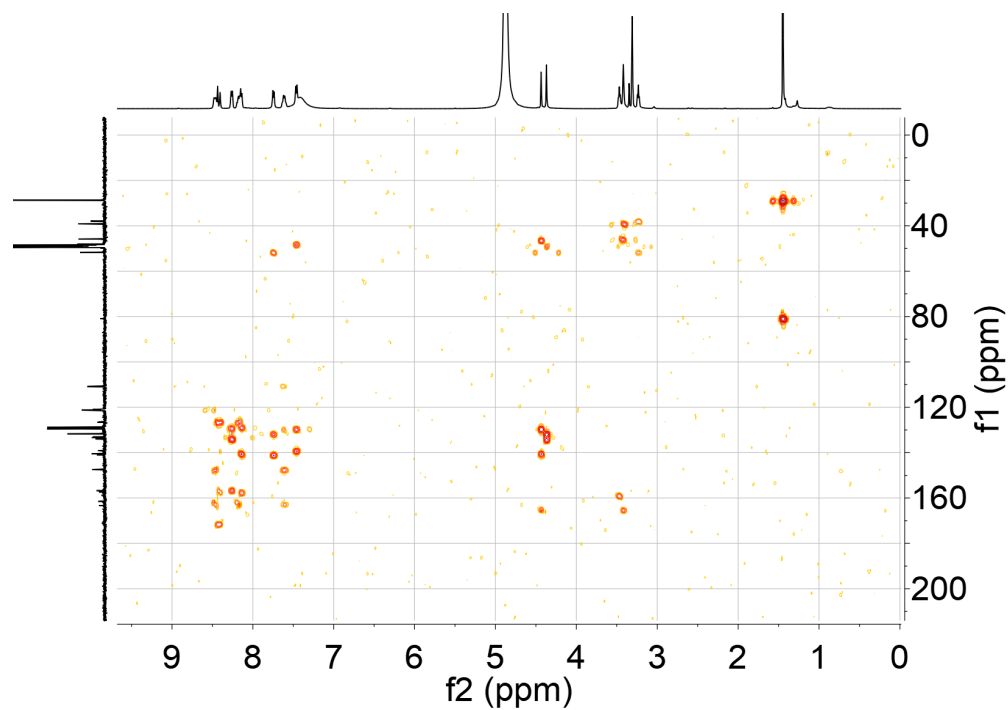
Espectro 19b: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de ácido 2-(4-(((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



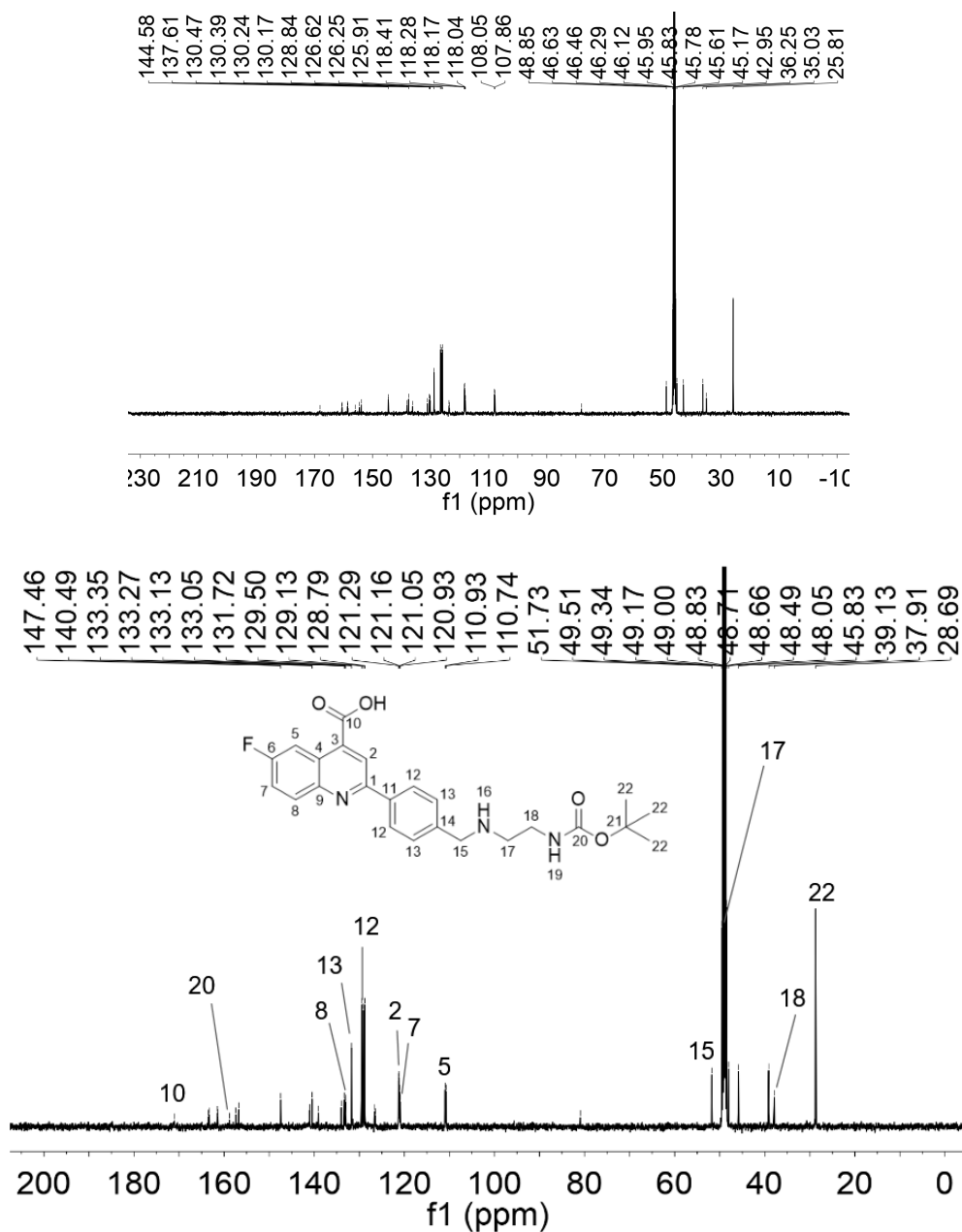
Espectro 19c: espectro COSY de RMN de ácido 2-(4-(((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico.



Espectro 19d: espectro HSQC de RMN de ácido 2-(4-(((2-((tert-butoxicarbonil)amino)etil) amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico. Em laranja estão indicados H ímpares (CH e CH_3) e, em azul, H pares (CH_2).



Espectro 19e: espectro HMBC de RMN de ácido 2-(4-(((2-((tert-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico.

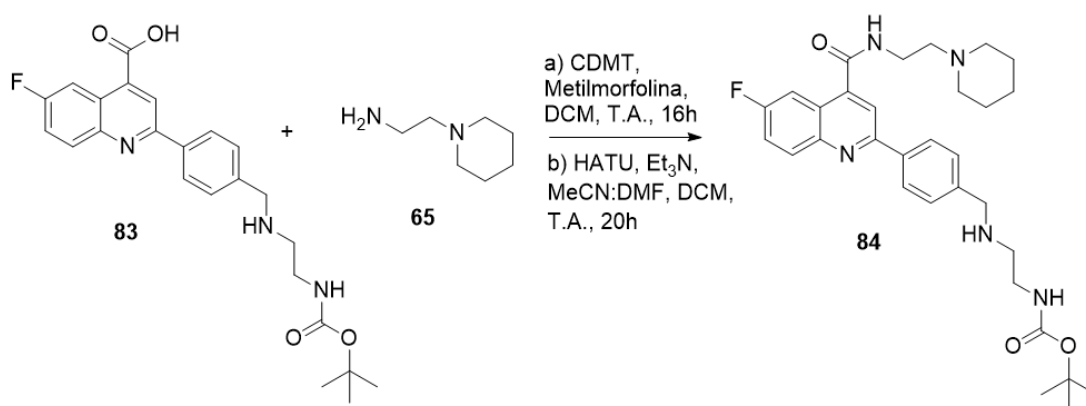


Espectro 19f: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, MeOD) de ácido 2-(4-(((2-((tert-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Pela dificuldade na purificação, em repetições dessa síntese, foi realizada apenas uma cromatografia para purificação e o produto não foi avaliado por RMN, confiando-se no resultado do LCMS para determinação de obtenção do produto. Assim, material com baixa pureza teve que ser utilizado como material de partida, pois um método adequado não foi encontrado.

Espera-se que o produto da próxima reação seja de purificação mais simples, pois, ao longo dos trabalhos, observou-se que *tailing* tende a ocorrer com ácidos carboxílicos, o que prejudica a purificação. Assim, o produto obtido foi levado para a amidação com 1-(2-aminoetil)-piperidina.

4.6.28. Amidação de ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico - síntese de 498PTdiA



Esquema 49: reação de amidação de ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico para síntese de 498PTdiA

Inicialmente a amidação do ácido 2-(4-(((2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)amino)metil)fenil)-6-fluoroquinolin-4-óico foi tentada utilizando-se o mesmo método das outras amidações de análogos de 498P, assim, o ácido, 4-metilmorfolina e DCM foram adicionados a um tubo de ensaio e agitados, porém, diferentemente dos outros ácido utilizados, o utilizado nessa síntese não se dissolveu nessas condições e, por conta disso, uma alíquota de MeCN foi adicionada, porém observou-se que não houve solubilização total do sistema. Ainda assim, CDMT e 1-(2-aminoetil)-piperidina foram adicionados e a reação foi acompanhada por LCMS após 16 h. Entretanto, nenhum indicativo de formação de produto foi observado.

Em outra tentativa de síntese de 498PTdiA, tentou-se realizar a amidação com o uso de HATU como agente condensante e Et₃N como base. Além disso, foi utilizado DMF como solvente reacional. Após 20h de reação, a análise por LCMS (Figura 84) indicou o consumo do ácido de partida (TR ~ 1,6 min), porém nenhum dos sinais apresentados no cromatograma possuía a massa correta do produto. Dessa forma, optou-se por realizar uma purificação de todos os produtos formados na reação por cromatografia *flash* utilizando-se uma coluna de sílica. No entanto, a análise dos materiais coletados indicou que nenhum deles era o produto desejado.

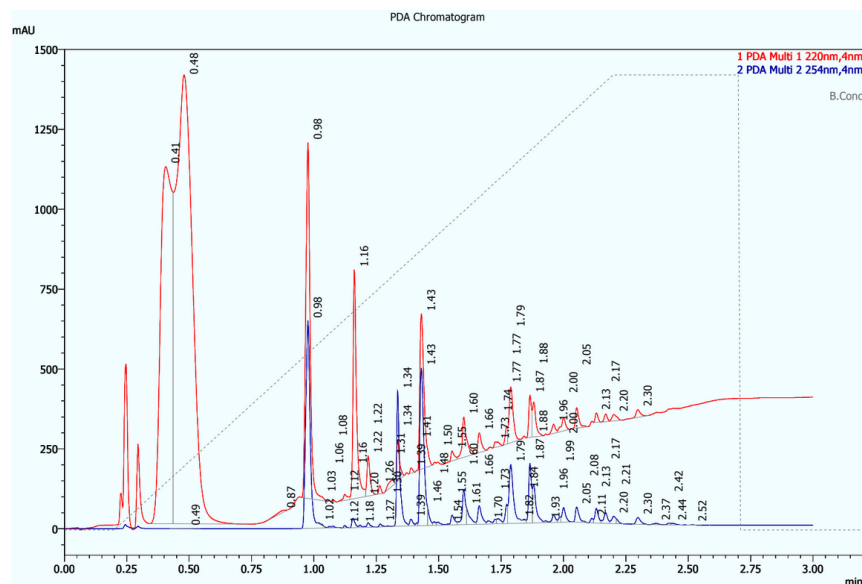
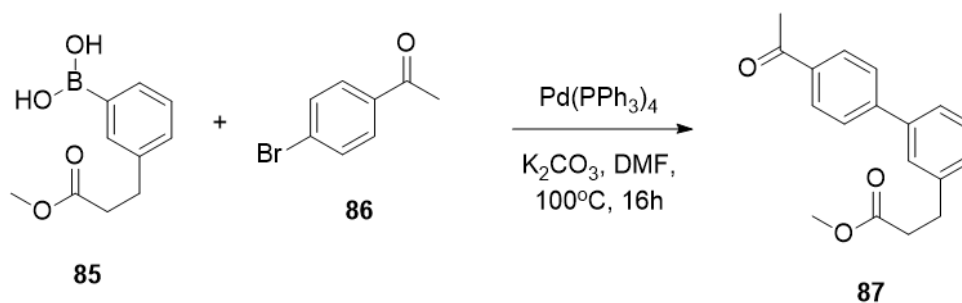


Figura 84: cromatograma da análise de LCMS da reação de síntese do ácido quinolinóico após o segundo período no reator de microondas. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Dessa forma, a síntese do produto 498PTdiA não foi possível nas condições testadas durante o período em Dundee e não houve tempo para o teste de novas condições que pudessem levar à obtenção do produto.

4.6.29. Síntese de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila



Esquema 50: reação de Suzuki para síntese de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila

Outra cetona cogitada para a síntese de análogos de 498 foi 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila, uma vez que possui um éster que poderia ser desprotegido posteriormente para formação de uma amida com PAMAM G0. Interesse também foi dado a esse intermediário, pois a síntese poderia ser realizada via acoplamento de

Suzuki-Miyaura (MIYAUURA e SUZUKI, 1979), expandindo a variedade de reações químicas realizadas na Universidade de Dundee.

Com base nesse racional, e paralelamente as reações para a síntese de 498PTdiA, 3-(3-boronofenil)propionato de metila foi reagido com 1-(4-bromofenil)etanona na presença do catalisador tetrakis(trifenilfosfina)paládio(0) à 100 °C por 16 h. Uma análise por LCMS (Figura 85) indicou conversão completa do material de partida, sendo formado o produto de interesse no processo (TR = 2,35; M/z = 283; positivo).

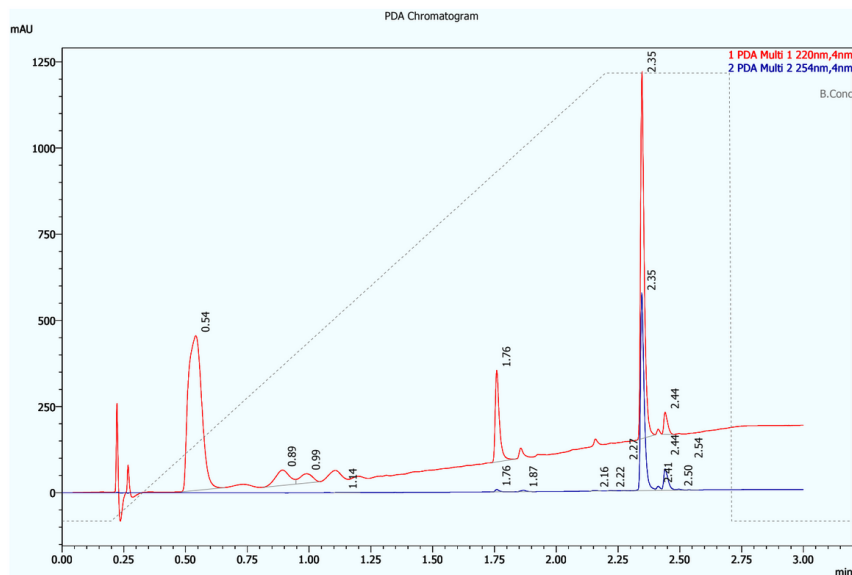
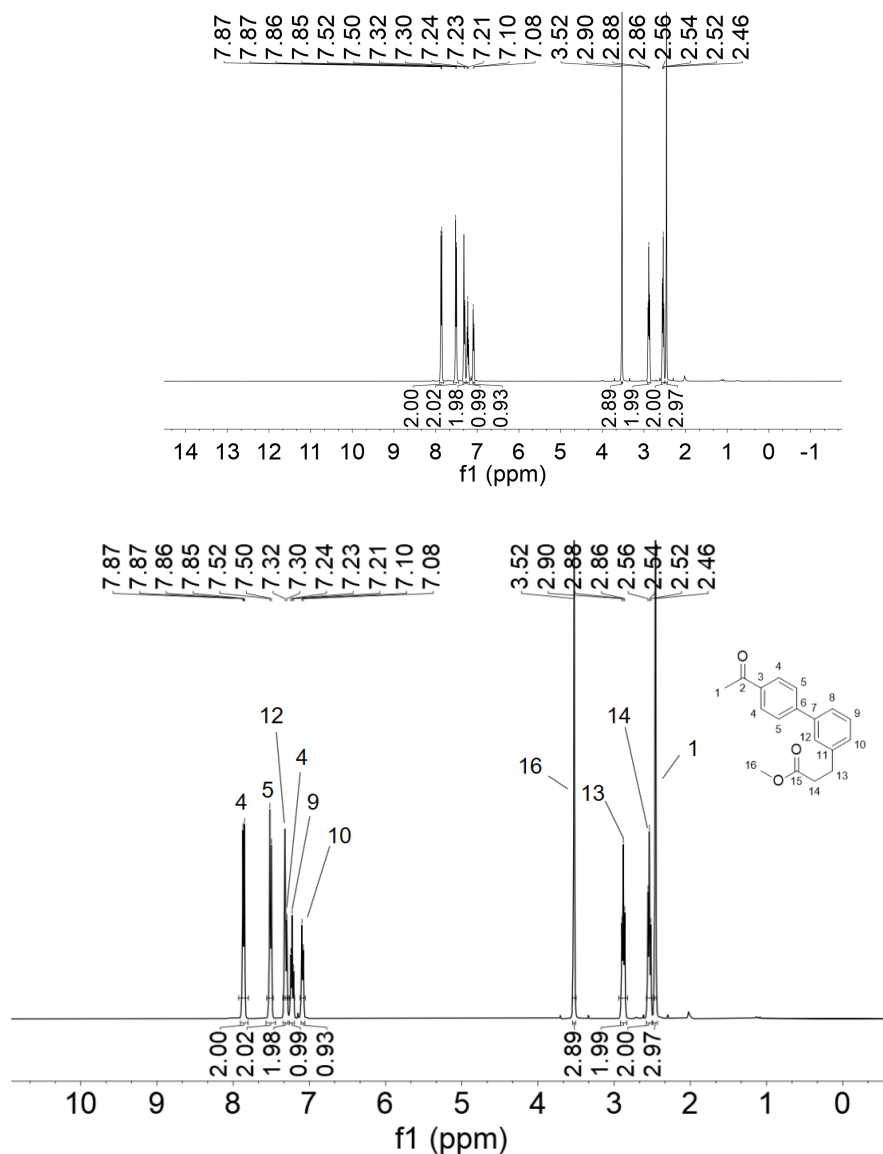


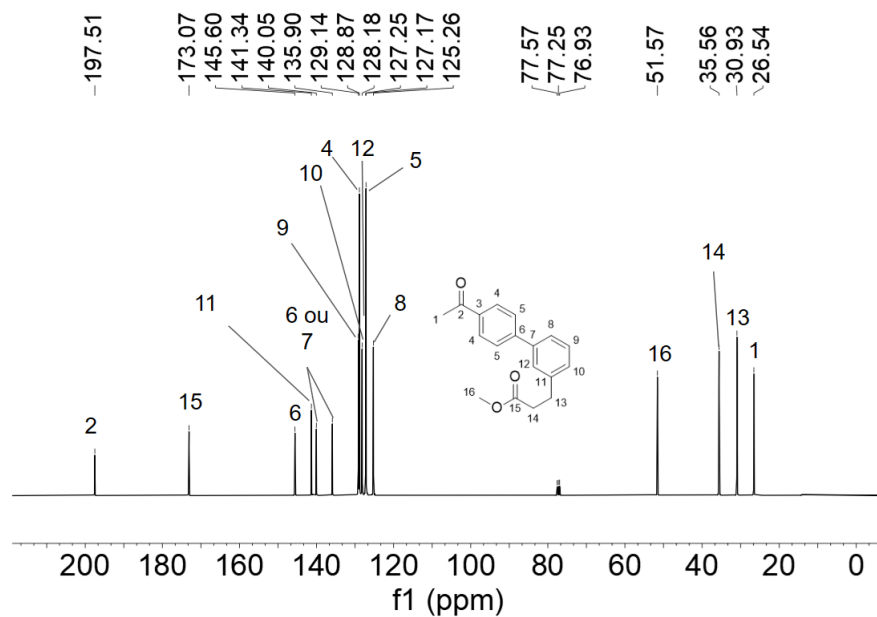
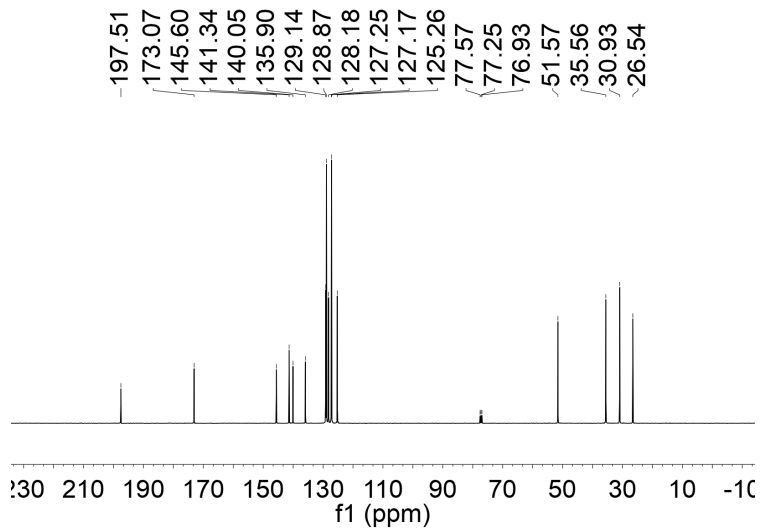
Figura 85: cromatograma da análise de LCMS da reação de Suzuki-Miyaura. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Após a purificação, a estrutura do produto foi confirmada por RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC). Pelo espectro de ^1H (Espectro 21a), é possível observar a presença de duas metilas, correspondentes a H1 2,46 (s, 3H, H1) e a H16 3,52 (s, 3H, H16), bem como os hidrogênios dos CH_2 da cadeia lateral contendo o éster (H13 e H14). Todos os hidrogênios aromáticos também puderam ser atribuídos. A sobreposição do sinal de H12 (7,32, s, 1H) e H8 (7,30, s, 1H, H8) impede que o dubleto esperado para H8 seja observado, sendo que um dos sinais do dubleto provavelmente possui o mesmo deslocamento do H12.

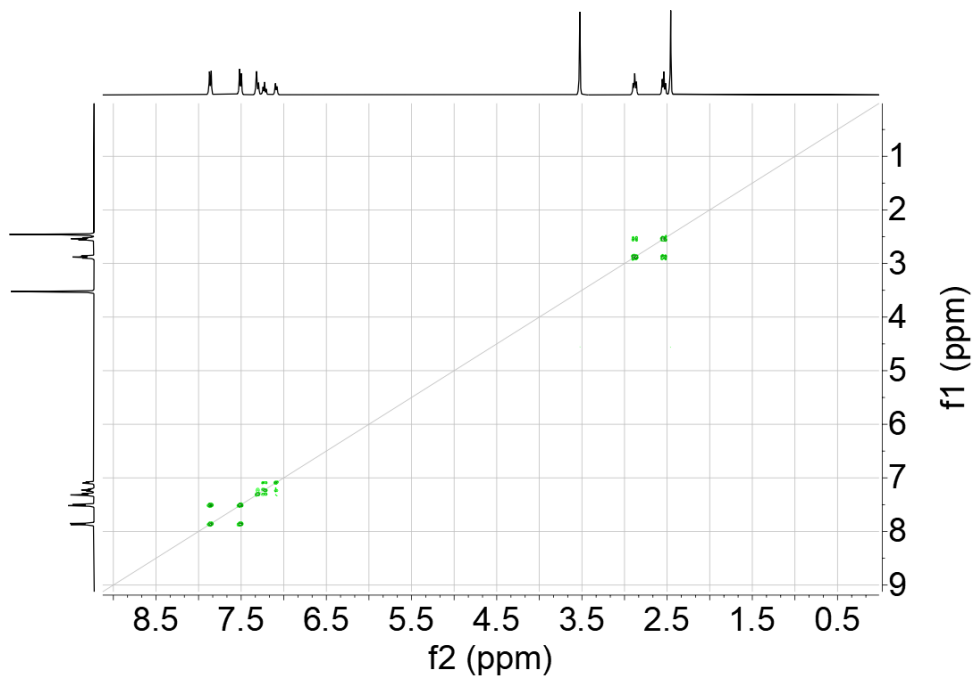


Espectro 21a: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il) propanoato de metila. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

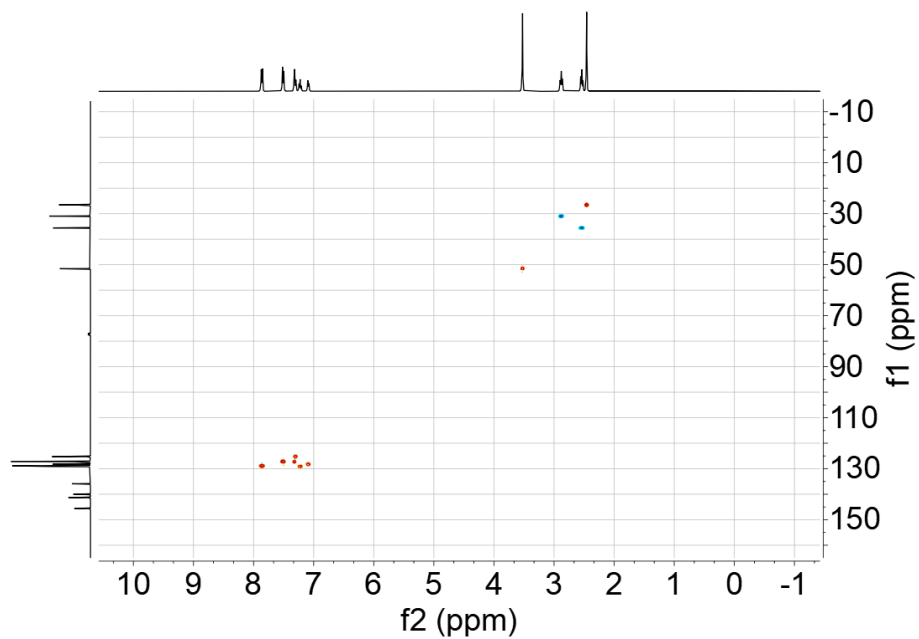
No espectro de ^{13}C (Espectro 21b), destacam-se os sinais em 197,51, correspondente à carbonila cetônica e o sinal em 173,07, correspondente à carbonila do éster, o que indica que os dois anéis aromáticos dos materiais de partida foram acoplados. A análise do COSY (Espectro 21c), HSQC (Espectro 21d) e HMBC (Espectro 21e) permitiu a atribuição de todos hidrogênios e carbonos, exceto C3 e C7, que permanecem ambíguos pelos dados obtidos. Por fim, o espectro de massas (Espectro 21f) obtido pelo LCMS teve como pico principal o valor de 283, que é correspondente a $(\text{M} + \text{H})^+$.



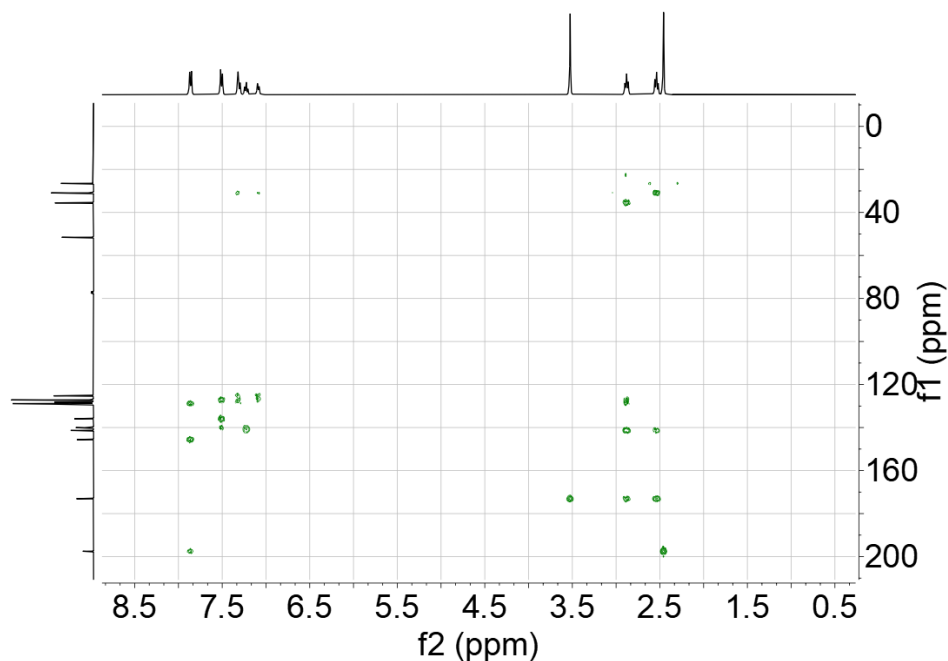
Espectro 21a: espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il) propanoato de metila. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



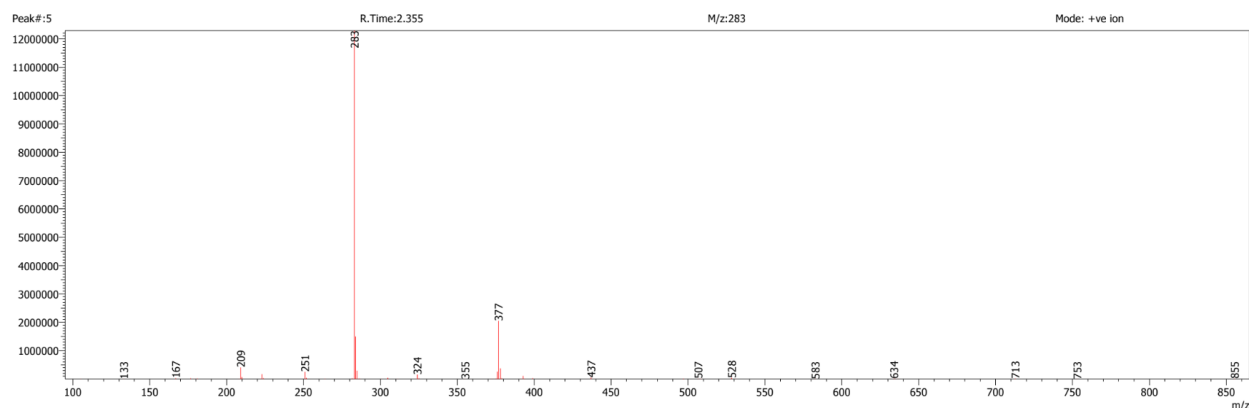
Espectro 21c: espectro de RMN COSY de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila.



Espectro 21d: espectro de RMN HSQC de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila. Laranja indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e azul indica hidrogênios pares (CH₂).



Espectro 21e: espectro de RMN HMBC de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila.

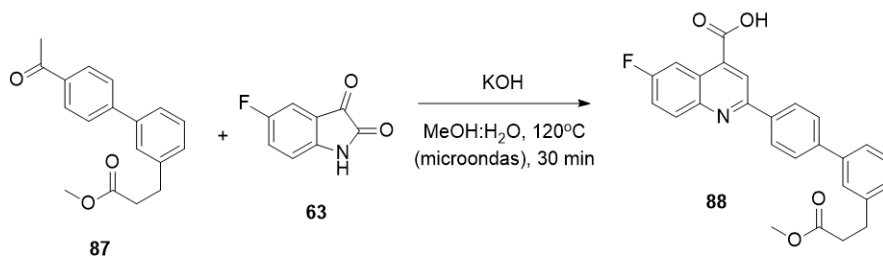


Espectro 21f: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

Após a confirmação estrutural, o rendimento foi calculado, resultando em 90% com pureza de 99% por LCMS.

Com a síntese dessa cetona, foi possível prosseguir com as próximas etapas de síntese para obtenção de análogos 498, pois seriam sintetizados análogos suficientes para as primeiras tentativas de acoplamento com PAMAM G0.

4.6.30. Síntese de ácido 6-fluoro-2-(3'-(3-metoxi-3-oxopropil)-[1,1'-bifenil]-4-il)quinolin-4-óico



Esquema 51: reação de expansão de anel para síntese de ácido 6-fluoro-2-(3'-(3-metoxi-3-oxopropil)-[1,1'-bifenil]-4-il)quinolin-4-óico

Após a síntese de 3-(4'-acetil-[1,1'-bifenil]-3-il)propanoato de metila pelo acoplamento de Suzuki, foi realizada a formação do anel quinolínico pela reação do produto obtido com 5-fluorouracil em reator de microondas. Após 30 min de reação, a análise do meio reacional por LCMS (Figura 86) indicou a formação de um produto com $M/z = 416$ (TR = 1,03 min), que corresponde ao ácido de interesse, porém sem a metila do éster, resultando em um produto com dois grupos ácido carboxílico livres e representado na Figura 86

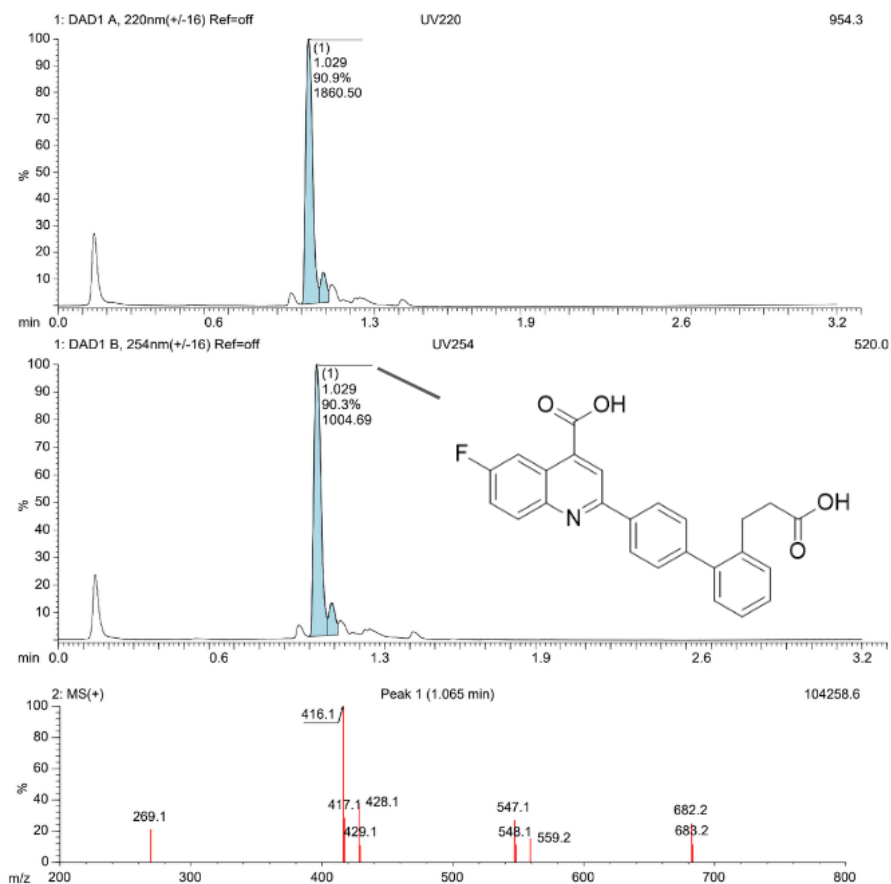


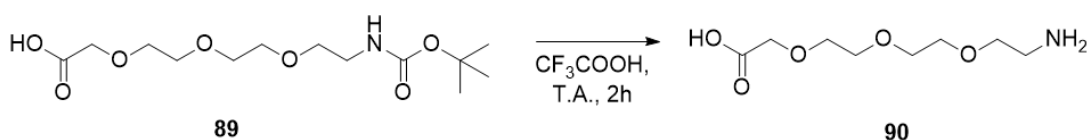
Figura 86: cromatograma e espectro de massas da análise de LCMS da reação entre o produto obtido pelo acoplamento de Suzuki e 5-fluorouracil. A molécula desenhada

corresponde à estrutura do produto obtido. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (cromatograma superior: 220nm; inferior: 254 nm).

Esse resultado não foi surpreendente, dado que ésteres são facilmente clivados em meio básico e o aquecimento do reator de microondas facilita essa reação (VOLLHARDT, SCHORE, 2007). Porém, a presença de dois ácidos carboxílicos dificulta a reação de amidação do ácido na posição 4 da quinolina, uma vez que existem dois ácidos disponíveis para reagir com 1-(2-aminoetil)-piperidina, o que aumentaria a quantidade de subprodutos a serem retirados no processo de purificação. Além disso, caso o ácido propílico do espaçante reaja com a amina, ele não estará disponível para o acoplamento da molécula final com o dendrímero.

Portanto, os trabalhos com esse análogo foram interrompidos, pois seriam onerosos. Mesmo assim, a reação foi considerada bem sucedida do ponto de vista pedagógico, expandindo o repertório reacional realizado durante este doutorado.

4.6.31. Desproteção de *espaçante de PEG3-boc*



Esquema 52: reação de desproteção de PEG3-boc

Em conjunto com as tentativas utilizando-se o espaçante etilenodiaminico e espaçante por acoplamento de Suzuki, tentou-se utilizar um derivado de polietilenoglicol (PEG). Para isso, buscou-se um derivado de PEG com uma terminação amínica, a qual poderia reagir com 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona por substituição nucleofílica, formando a cetona necessária para a reação com 5-fluorissatina. Além disso, a presença de um ácido carboxílico na outra terminação do PEG permitiria a reação final do análogo de 498P com PAMAM G0, gerando o dendrímero de interesse. Assim, decidiu-se utilizar ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-óico (PEG3-boc), reagente já disponível no laboratório da Universidade de Dundee.

Para a reação com 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona, foi necessário, no entanto, a desproteção da amina de PEG3-boc, a qual foi realizada pela adição do reagente protegido em ácido trifluoroacético por 2h (BLONDELLE, HOUGHTEN, 1993). Após o período, observou-se a formação do produto de interesse por LCMS (TR = 0,37 min; M/z = 208; positivo) (Figura 87) e uma análise de RMN de ^1H (Espectro 22) após evaporação do ácido trifluoroacético indicou a perda do grupo Boc pela ausência do simpleto característico com integral para 9 H entre 1 e 2 ppm. Entretanto, a atribuição de cada hidrogênio não foi realizada, pois o material foi enviado sem qualquer tipo de purificação e o objetivo era apenas confirmar a perda do grupo boc.

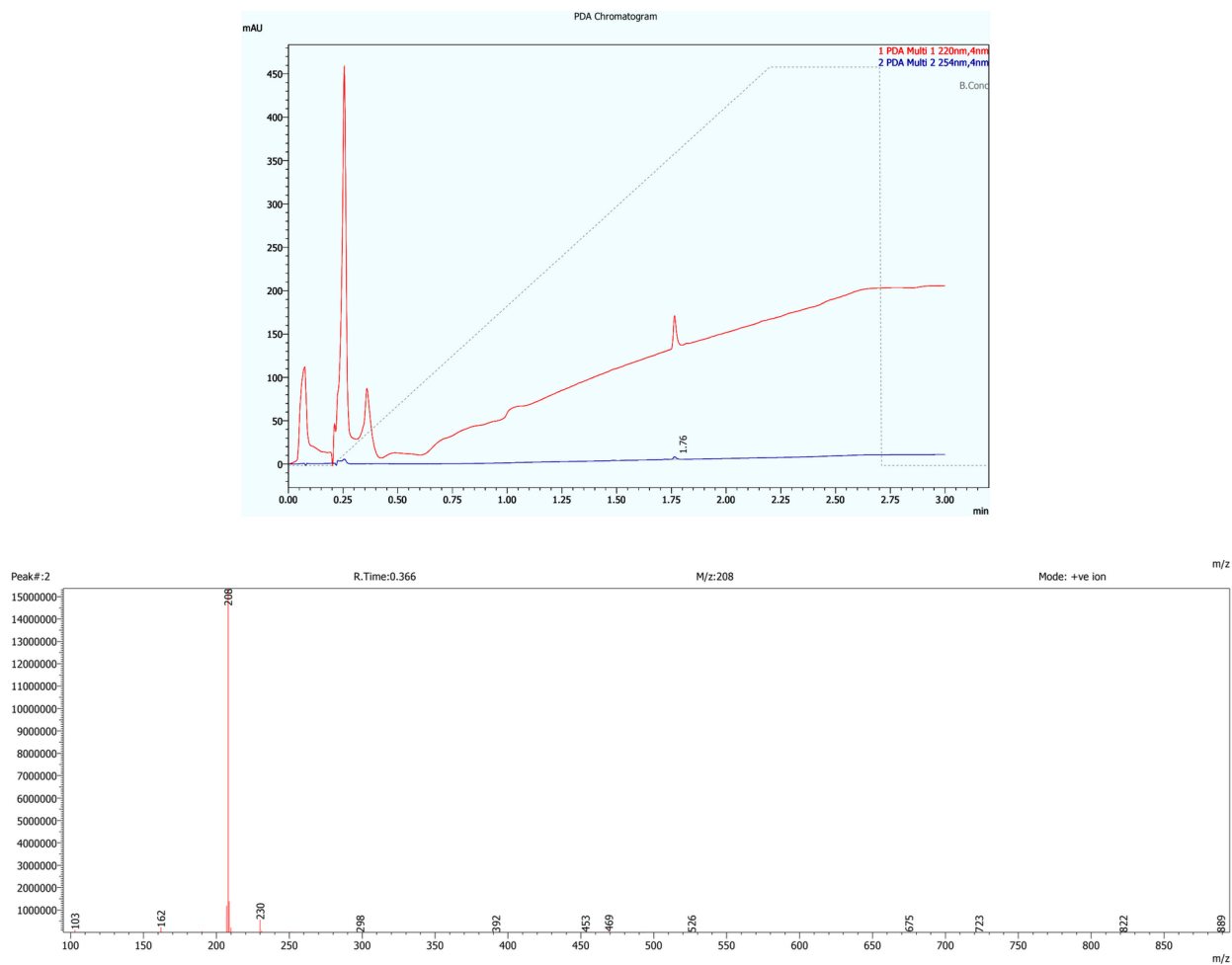
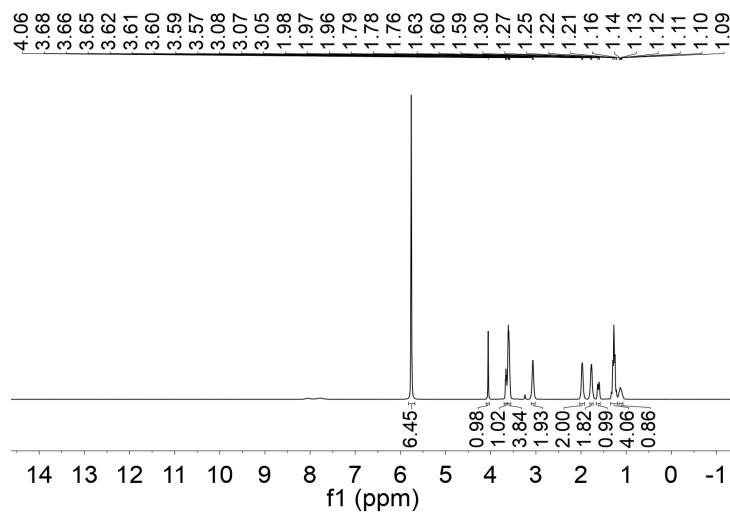
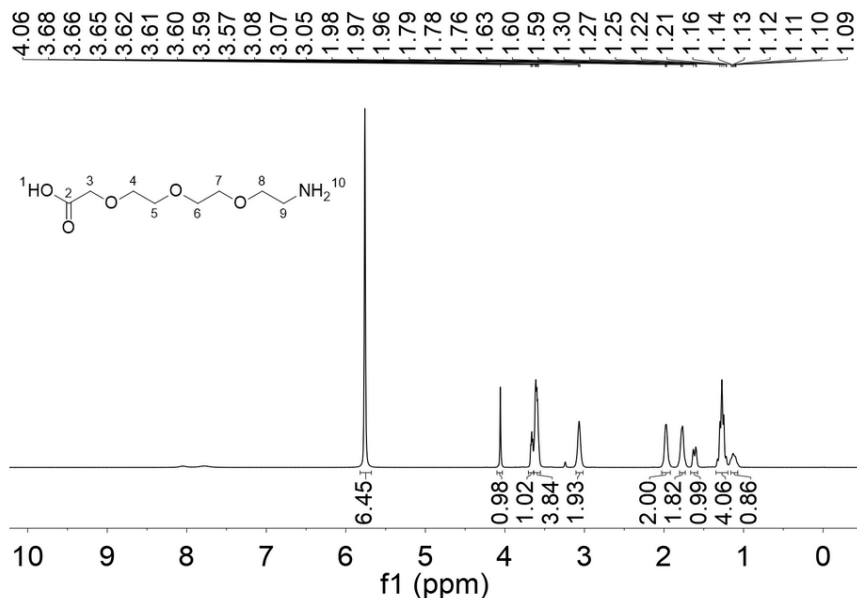


Figura 87: na parte superior, cromatograma da análise de LCMS da reação de Suzuki-Miyaura. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm). Na parte inferior, espectro de massas do produto com o detector no modo positivo.

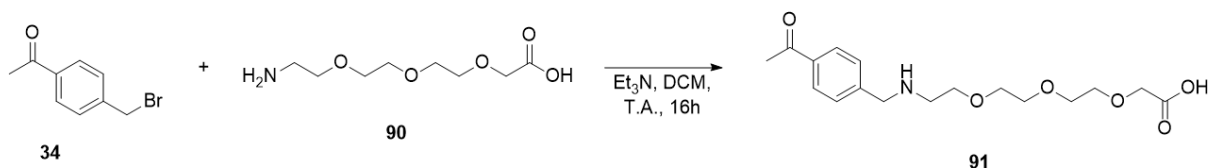




Espectro 22: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PEG3-boc desprotegido sem purificação. Acima encontra-se o espectro sem expansão e, abaixo, focando na região com os sinais.

Dessa forma, considerou-se que o produto desejado foi obtido e utilizado para a reação de substituição nucleofílica com 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona, gerando uma cetona aromática com o espaçante desejado.

4.6.32. Substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e PEG3



Esquema 53: reação de substituição nucleofílica de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e PEG3.

A reação de PEG3-boc desprotegido foi realizada de maneira análoga às outras substituições nucleofílicas de espaçantes com 1-(4-(bromometil)fenil)etanona. Assim PEG-3-boc desprotegido, 1-(4-(bromometil)fenil)etanona, Et_3N e DCM foram adicionados a um tubo e deixados sob agitação por 16 h. Ao acompanhar-se a reação por LCMS (Figura 88), foi observada a formação de produto com $M/z = 234$ ($\text{RT} = 1,04$ min, modo positivo), o que indica a substituição do bromo pela trietilamina, conforme discutido previamente na reação de 1-(4-(bromometil)fenil)etan-1-ona e tert-butil(2-aminoetil)carbamato (seção 4.6.26.). Apesar disso, o material foi purificado, porém apenas frações contendo o subproduto indesejado foram coletadas e a estrutura do subproduto foi confirmada por RMN.

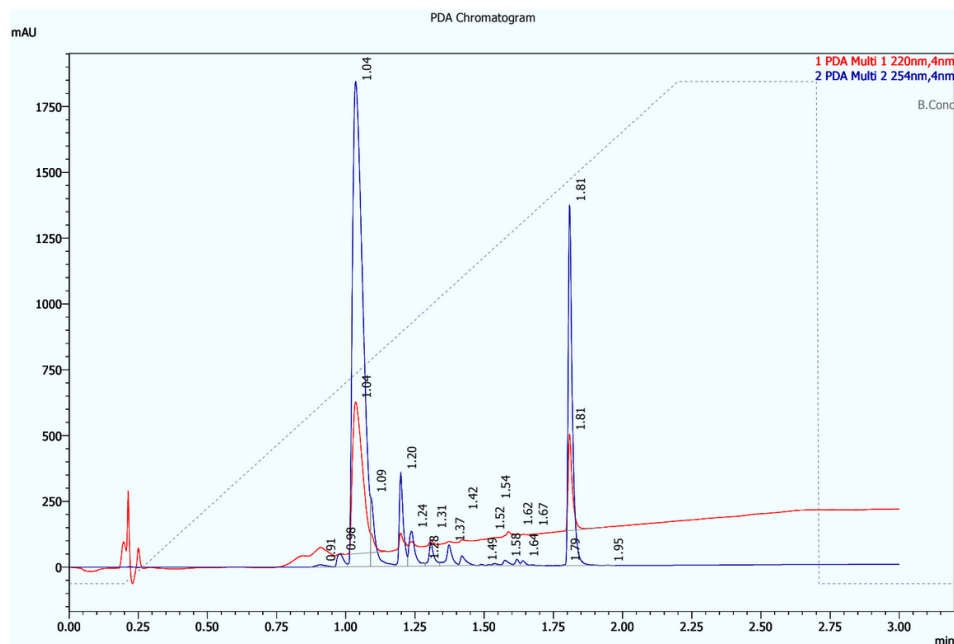
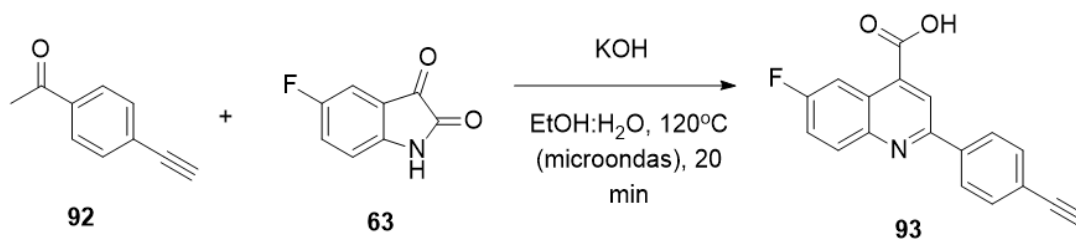


Figura 88: cromatograma da análise de LCMS da reação de substituição nucleofílica com o espaçante de PEG. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Com base nesse resultado, foi decidida pela interrupção dos trabalhos com este espaçante e outras alternativas para a adição de um espaçante de PEG foram buscadas.

4.6.33. Síntese de ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico



Esquema 54: reação de expansão de anel para síntese de ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico.

Para a adição de um espaçante PEG em um derivado de 498P, cogitou-se a utilização de *click chemistry*, pois esta metodologia é bastante eficaz na conexão de diferentes entidades moleculares. Dentre as opções reacionais disponíveis, a ligação azida-alcino pareceu adequada para as moléculas envolvidas e, portanto, foi escolhida. Assim, bastaria a síntese de um análogo de 498P com um alcino ou uma azida, o qual seria reagido com um espaçante de PEG contendo o grupo químico complementar (DEVARAJ, FINN, 2021). Dada a disponibilidade comercial de 1-(4-etinilfenil)etanona e a disponibilidade de derivados de PEG com azidas no

inventário do laboratório da Universidade de Dundee, a síntese de um derivado alcínico de 498P foi a mais favorável.

A partir disso, foi realizada a reação entre 5-fluorisatina e 1-(4-etilfenil)etanona em reator de microondas a 120°C, de forma análoga ao realizado com outras cetonas aromáticas e isatina/5-fluorisatina. A análise por LCMS após 20 min de reação (Figura 89) sugeriu a obtenção do produto de interesse (TR = 1,78; M/z = 292; positivo), então o material foi purificado.

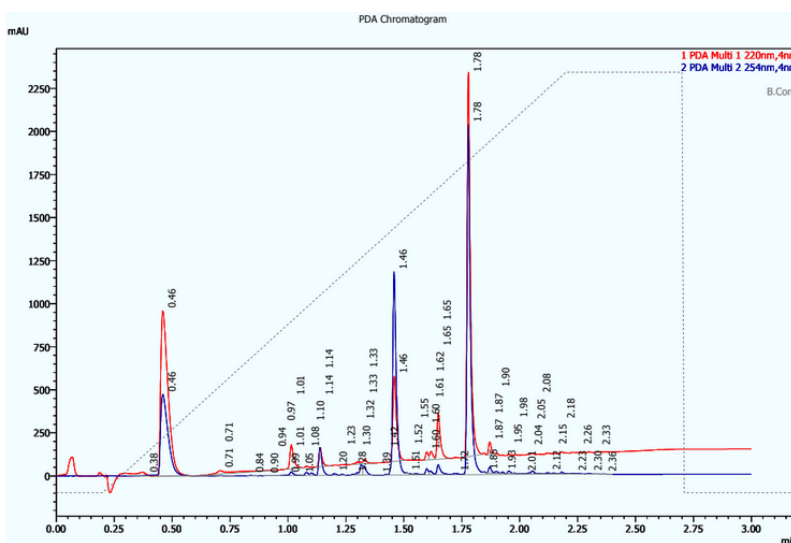
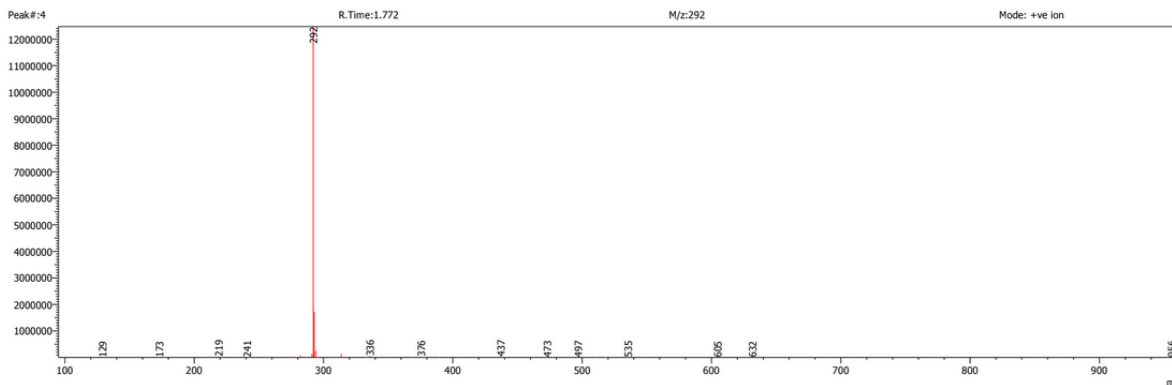


Figura 89: cromatograma da análise de LCMS da reação de formação de ácido 2-(4-etilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

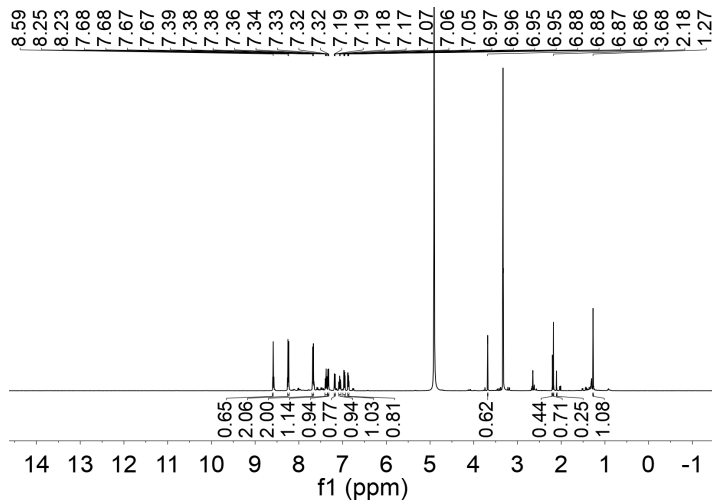
Não foi possível a determinação estrutural inequívoca do produto por conta da baixa pureza (10% por LCMS), entretanto, o espectro de massas (espectro 23a) e os RMN de ^1H (espectro 23b) e ^{13}C (espectro 23c) sugerem a obtenção da molécula de interesse.

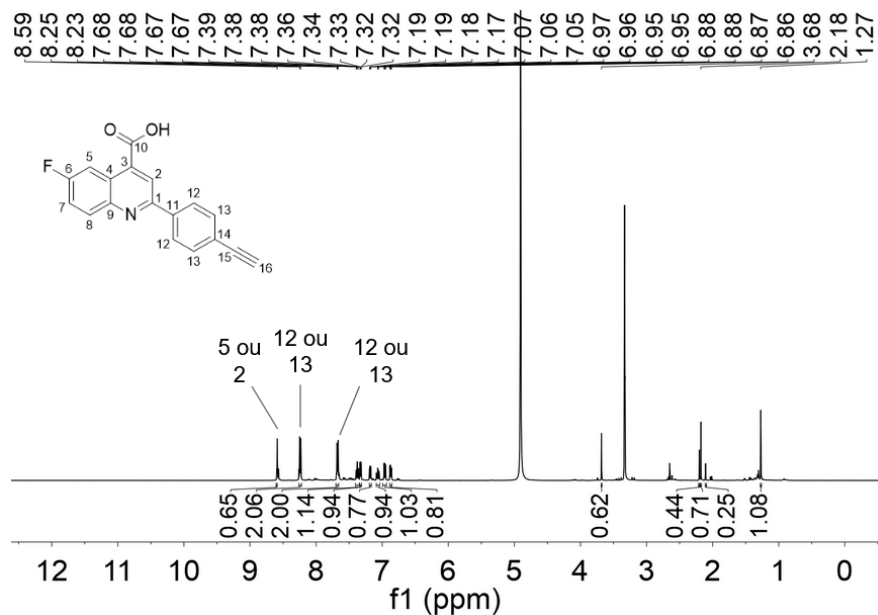
No espectro de massas (espectro 23a), é possível ver um material com $M/z = 292$, que corresponde a $(M+H)^+$.



Espectro 23a: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

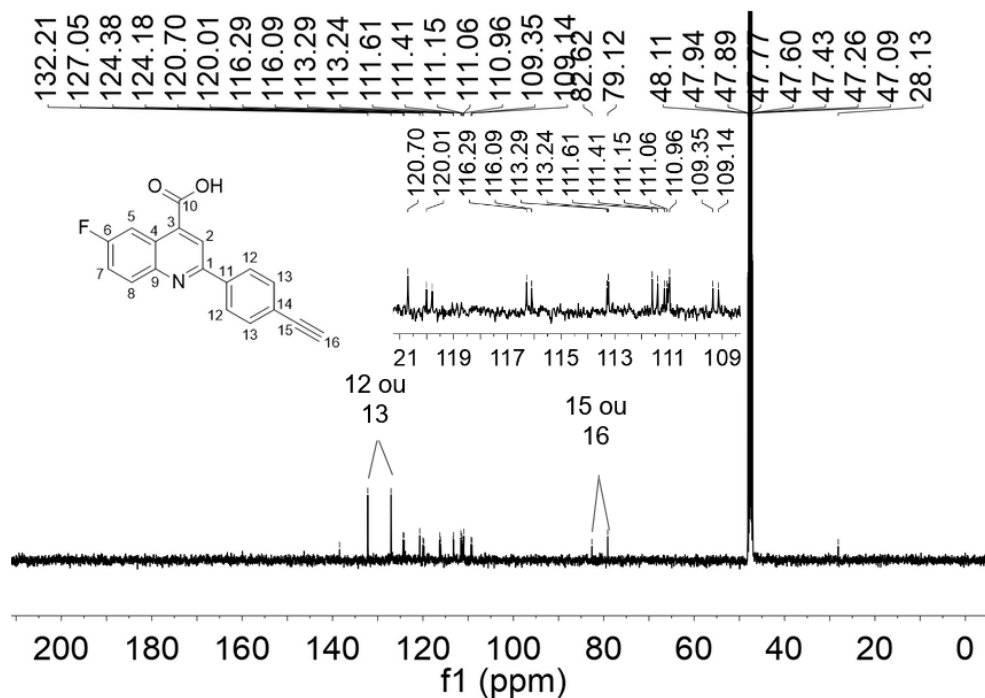
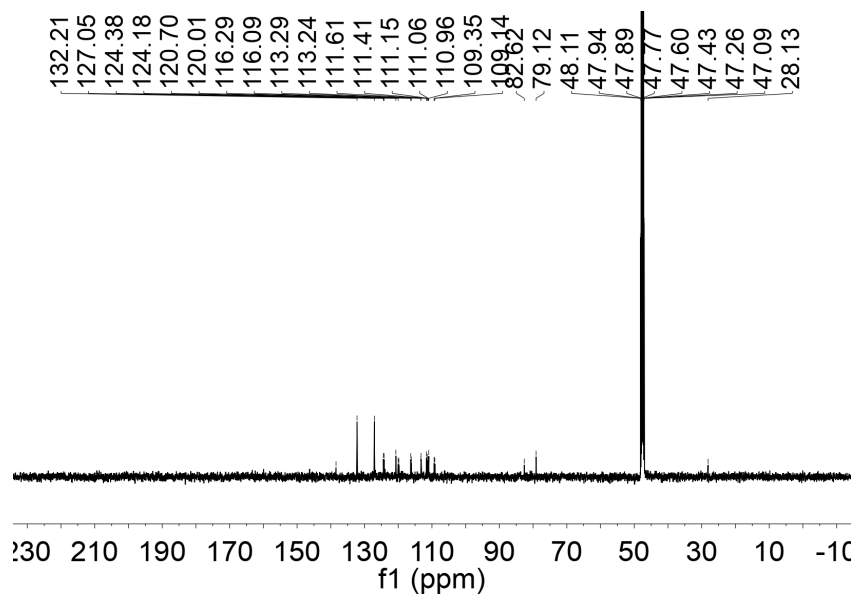
No espectro de ^1H (espectro 23b), é possível observar diversos sinais em região aromática, vários deles com integral para 1 H e 2 com integral para 2 H (8,24 e 7,69-7,66 ppm). Os sinais com integral para 2 H devem corresponder aos hidrogênios aromáticos da cadeia lateral do núcleo quinolínic (H12 e H13), enquanto que alguns dos outros sinais com integral para 1 H devem corresponder aos hidrogênios da quinolina. Com base nas outras quinolinas sintetizadas, o sinal em 8,59 ppm provavelmente deve ser atribuído ao H2 ou H5. Também foram observados sinais com integral próxima a 1 H entre 1 e 4 ppm e um deles deve corresponder ao hidrogênio do alcino (H16).





Espectro 23b: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de ácido 2-(4-etilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

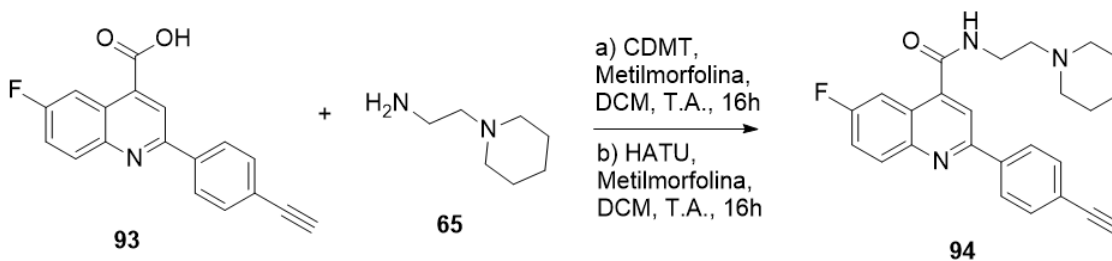
O espectro de ^{13}C não foi muito conclusivo devido à baixa quantidade de amostra, o que dificultou a diferenciação de alguns picos em relação à linha de base. Assim, não foi possível ver o sinal característico de carboxila (C10) ao redor de 180 ppm para ácidos carboxílicos (PAVIA et al., 2009). Entretanto, os sinais em 82,62 e 79,12 ppm devem corresponder aos carbonos do alcino (C15 e C16), enquanto que os sinais mais intensos em 132,21 e 127,05 provavelmente podem ser atribuídos a C12 e C13. De qualquer forma, foram observados diversos sinais duplicados com deslocamento muito próximo e com valor de carbonos aromáticos, o que pode ser indicativo de dupletos formados pelo acoplamento C-F no núcleo quinolínico (PAVIA et al., 2009).



Espectro 23c: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, MeOD) de ácido 2-(4-etilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico. Os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

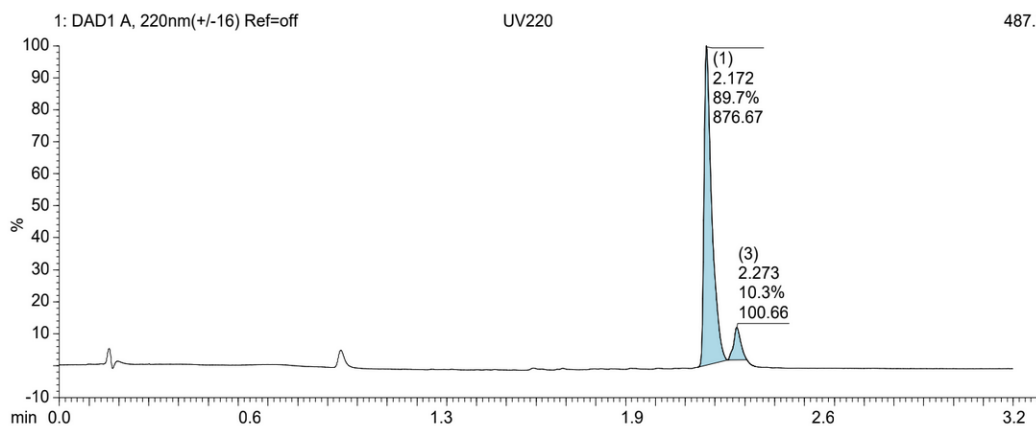
Assim, apesar de não ter sido possível a atribuição de todos os sinais dos RMN ao produto por conta da baixa pureza, há evidências suficientes indicando que ele foi obtido. Devido às diversas tentativas de purificação que não resultaram em um aumento de pureza, decidiu-se seguir com a próxima etapa de amidação do ácido impuro obtido, com o intuito de obter outra molécula que pudesse ter um processo de purificação mais simples.

4.6.34. Amidação de ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluoroquinolin-4-óico - síntese de 498PIno



Esquema 55: reação de amidação de ácido 2-(4-etinilfenil)-6- fluoroquinolin-4-óico para síntese de 498PIno.

Dois agentes acoplantes diferentes foram utilizados na formação de amida entre ácido 2-(4-etinilfenil)-6-fluor-quinolin-4-óico e 1-(2-aminoetil)-piperidina: HATU e CDMT. Ambas opções foram bem-sucedidas, porém o rendimento utilizando-se HATU (60%) foi superior ao rendimento com CDMT (27%). Ambas reações foram acompanhadas por LCMS após 16 h, que indicou a formação do produto de interesse ($RT_{\text{Shimadzu}} = 1,45 \text{ min}$; $RT_{\text{Agilent}} = 2,17 \text{ min}$; $M/z = 402$). Após a purificação, foi possível observar uma pureza adequada pelo LCMS (Figura 90) e M/z de 402, o que corresponde a $(M+H)^+$.



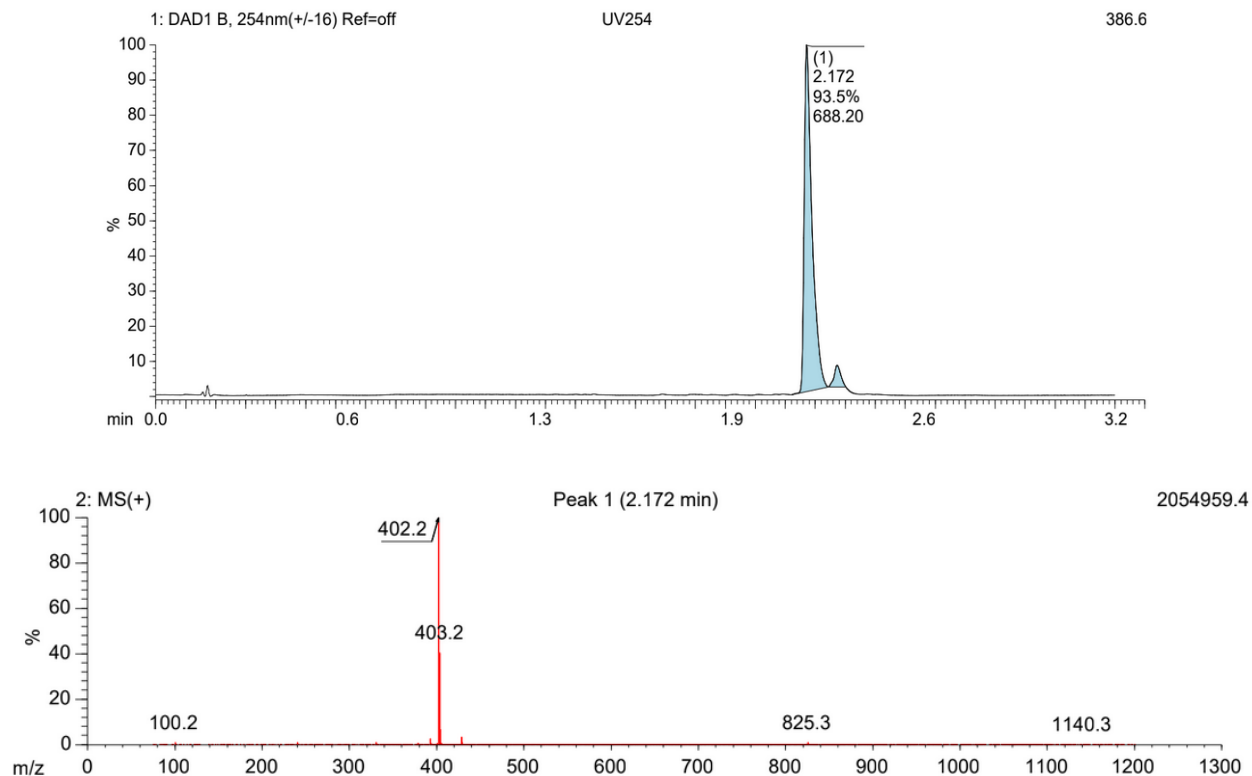
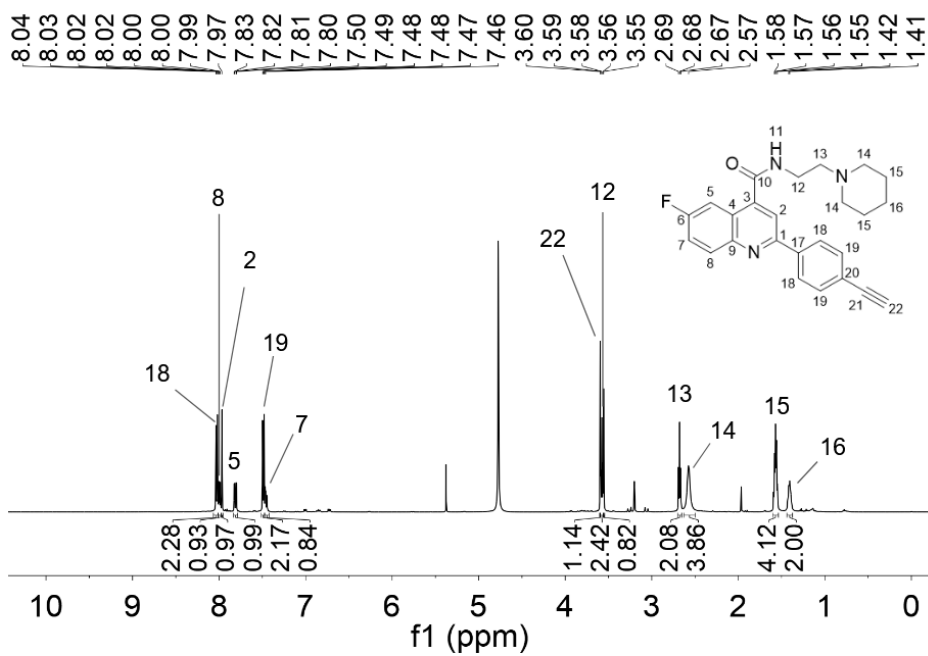
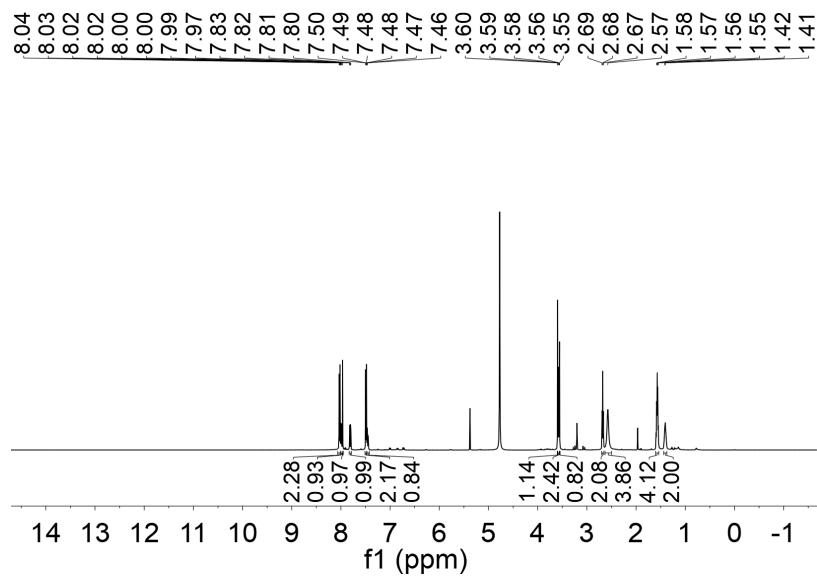
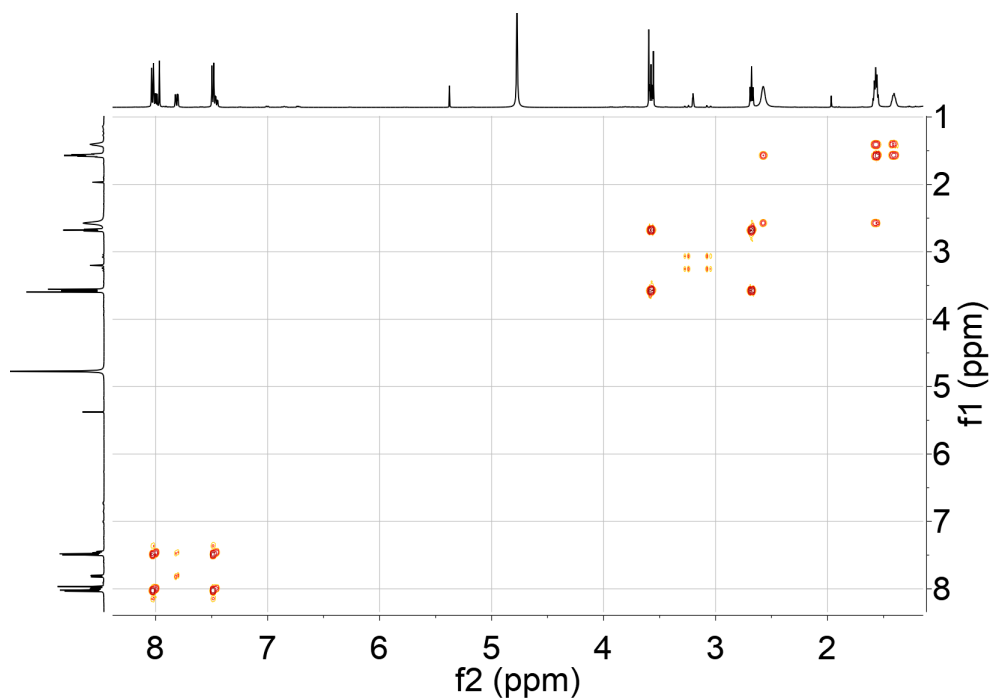


Figura 90: cromatograma e espectro de massas da análise de LCMS de 498PIno. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (cromatograma superior: 220nm; inferior: 254 nm).

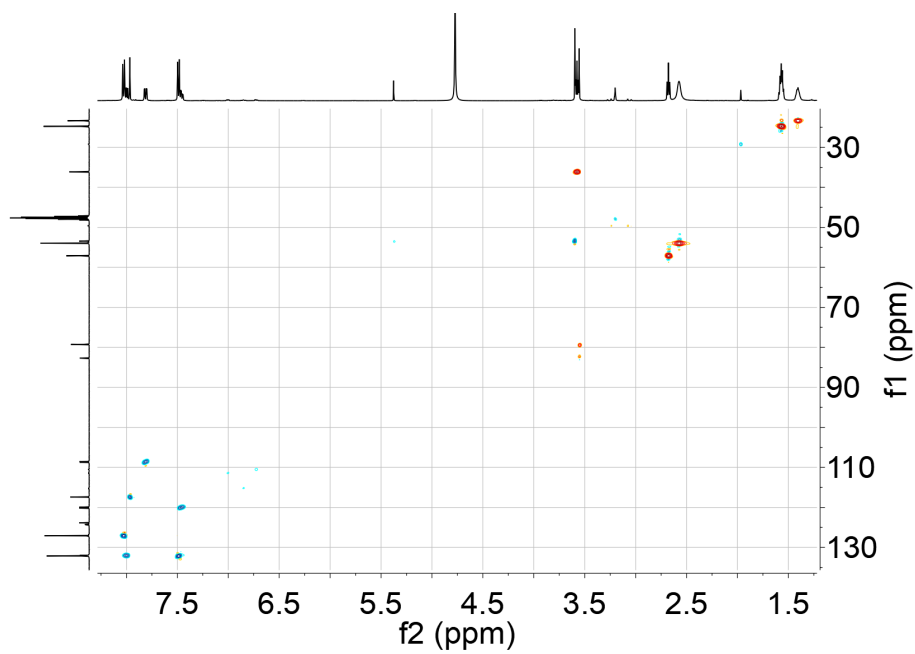
A estrutura do produto foi então confirmada por RMN. A atribuição de todos os H foi possível no espectro de ^1H (Espectro 24a) com auxílio de espectros 2D: COSY (Espectro 24b), HSQC (Espectro 24c) e HMBC (Espectro 24d). Foi observado apenas um sinal em 3,55 ppm com integral para 1 H que não pode ser atribuído à molécula e que provavelmente é oriundo de alguma impureza, dado que o HSQC indicou que esse sinal provém de um CH_2 . De qualquer forma, destacam-se os sinais em 3,58 (t, 2H), 2,68 (t, 2H), 2,57 (s, 4H), 1,57 (p, 4H) e 1,41 (m, 2H), correspondentes a H12, H13, H14, H15 e H16, respectivamente, indicando a adição da 1-(2-aminoetil)-piperidina. O sinal com integral para 1 H em 3,60 ppm e indicado como CH_3 ou CH pelo HSQC confirma a presença do alcino. Por fim, os sinais em região aromática confirmam o anel quinolínico.



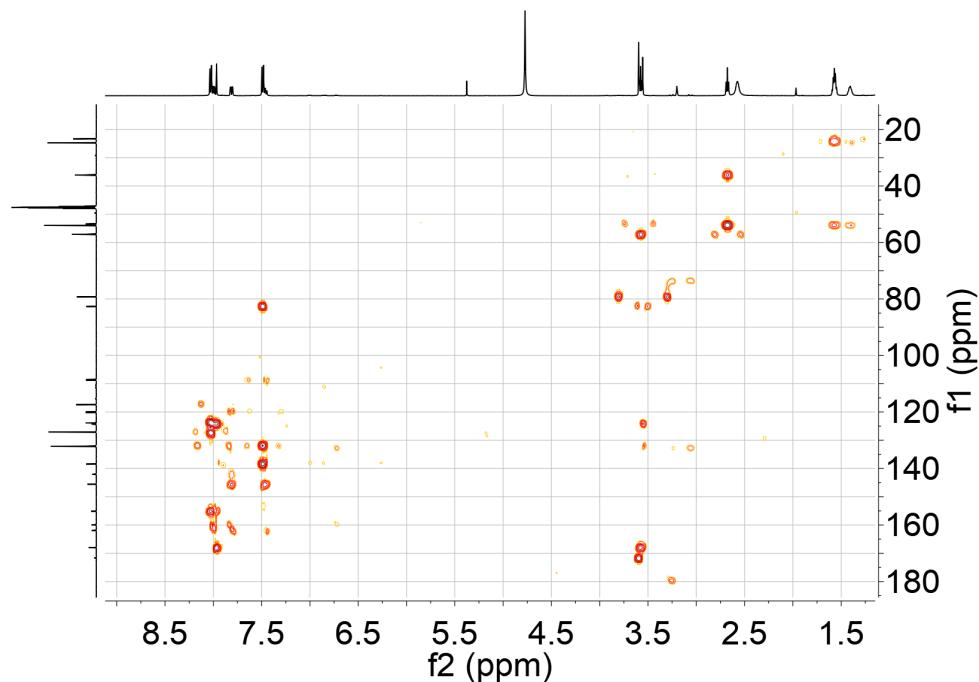
Espectro 24a: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de 498PIno. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 24b: espectro de RMN COSY de 498PIno

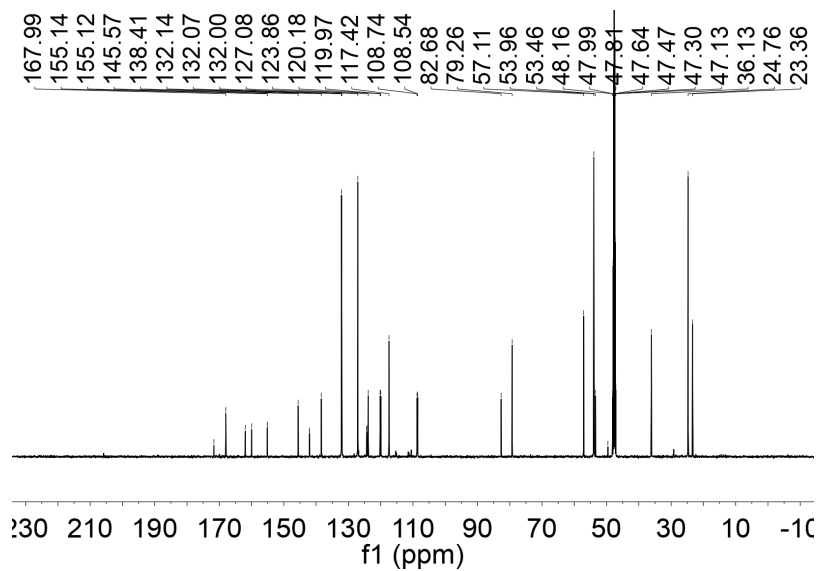


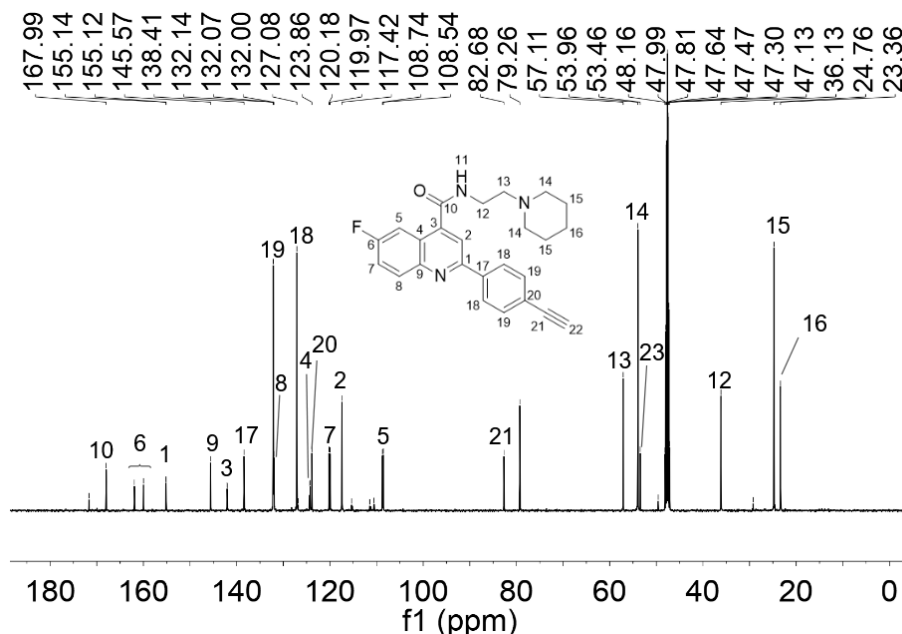
Espectro 24c: espectro de RMN HSQC 498PIno. Azul indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e laranja indica hidrogênios pares (CH₂).



Espectro 24d: espectro de RMN HMBC de 498PIno.

No RMN de ^{13}C (Espectro 24e), também foi possível a atribuição de todos os sinais. Observa-se um sinal em 171,67 ppm, que pode ser oriundo de resquícios do ácido utilizado como material de partida e um sinal em 79,26 ppm, que corresponde ao carbono da impureza com sinal em 3,55 ppm do espectro de ^1H . No mais, destaca-se o sinal em 167,99 ppm, correspondente à carboxila da amida e os dupletos observados em região aromática, que são causados pelo acoplamento C-F no anel quinolínico.

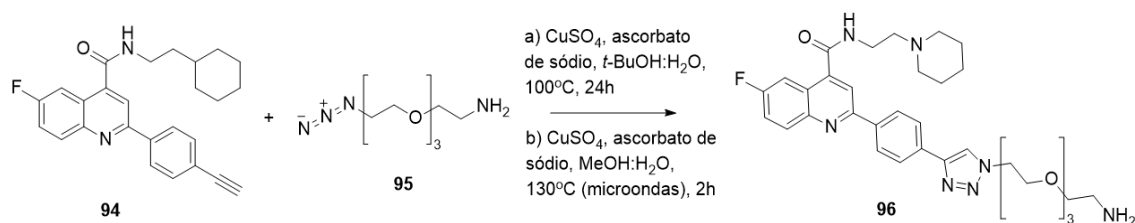




Espectro 24e: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, MeOD) de 498PIno. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

Os resultados confirmam a obtenção do produto desejado e foi possível seguir com a adição de um derivado azídico de PEG como espaçante, que será discutida na próxima sessão.

4.6.35. Adição de espaçante de PEG azídico por click chemistry a 498PIno



Esquema 56: reação de *click chemistry* para adição de espaçante de PEG e síntese de 498PPEGMS

Para o acoplamento de um espaçante PEG ao 498PIno, é necessário que o espaçante possua um grupo azídico em sua estrutura, de modo a formar um 1,2,3-triazol (DEVARAJ, FINN, 2021; HIMO et al., 2005). Assim, 1-amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecano foi utilizado, por conter o grupo necessário para a ligação com o alcino e por possuir um grupo amina na outra extremidade da molécula que permitiria a sua ligação posterior com um diácido para a ligação final com o dendrímero.

Escolhido o espaçante, a reação com a molécula potencialmente ativa foi realizada em escala teste (Método A) seguindo-se protocolo descrito na literatura (HIMO et al., 2005). A reação foi inicialmente realizada à temperatura ambiente e acompanhada por LCMS, porém após 2 dias, não houve a formação de produto. Por conta disso, uma nova carga de azida PEG, CuSO_4 e ascorbato de sódio foi adicionada. Com isso, foi possível observar a formação do produto de interesse (Shimadzu; TR = 1,34 min; M/z = 620, positivo) após 4h e, para acelerar a reação, a temperatura foi aumentada para 60 °C. Passadas 16 h, ainda era possível observar a presença de 498PIno (Shimadzu - TR = 1,62 min; M/z = 402; positivo),então a reação foi aquecida a 100 °C por 24 h, entretanto, não houve mais conversão. A reação foi então interrompida e o produto purificado. Após a reação teste, uma reação em maior escala foi realizada (Método B), trocando-se *t*-BuOH por MeOH, pois este solvente possui menor custo e é comumente usado nesse tipo de reação (FANTONI, EL-SAGHEER, BROWN, 2021), e aquecendo-se a reação à 120 °C em um reator de microondas. Tais mudanças levaram a um consumo completo de 498PIno e reduziram o tempo de reação para 2 h (avaliação por LCMS: Agilent - TR = 1,81 min; M/z = 620, positivo, Figura 91).

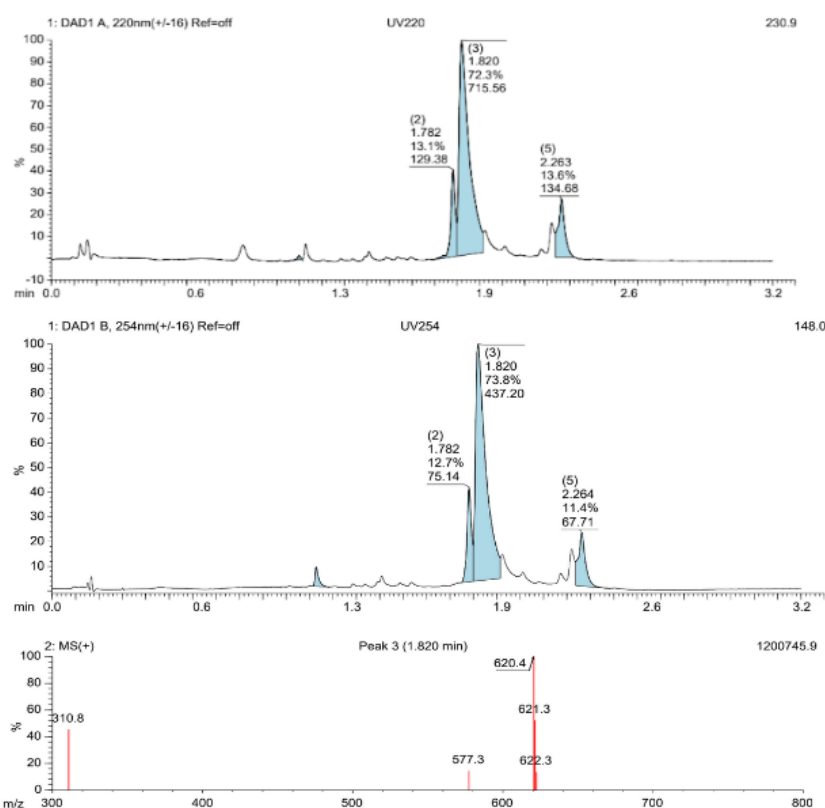
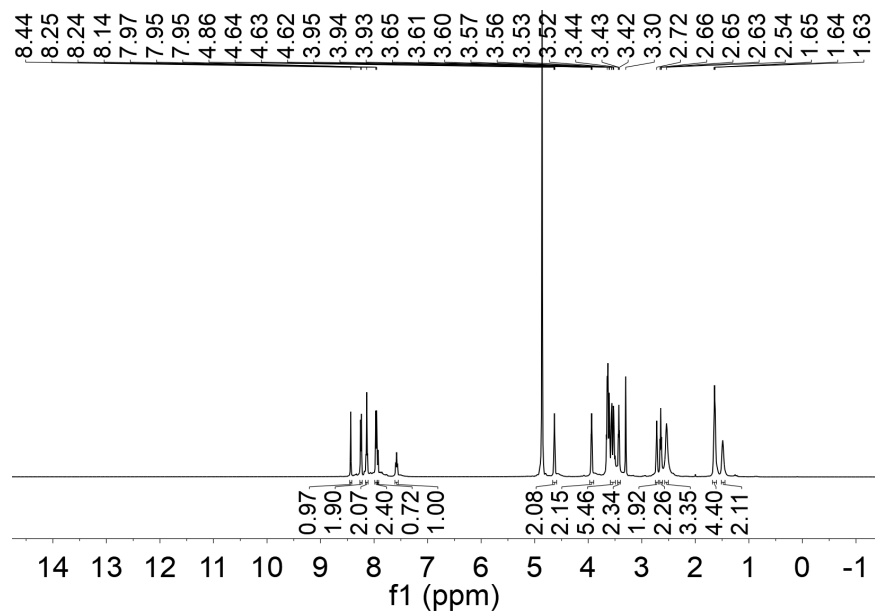
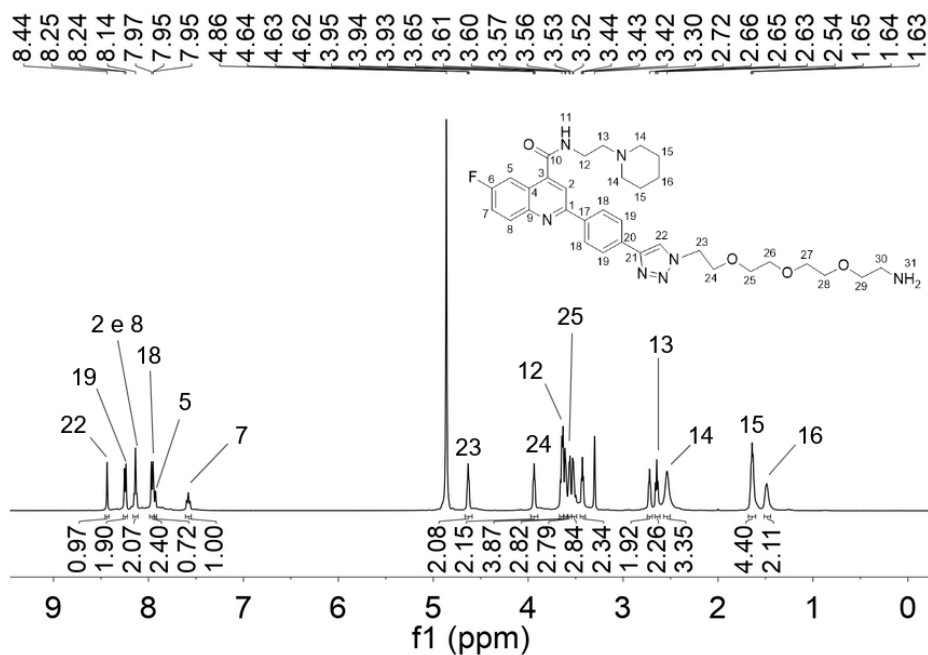


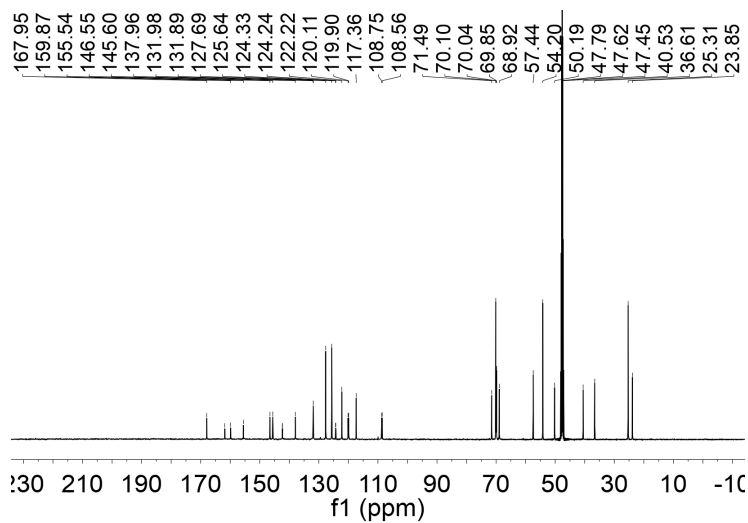
Figura 91: cromatograma e espectro de massas da análise de LCMS da reação de 498PIno com derivado azídico de PEG após 2 h em reator de microondas. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (cromatograma superior: 220nm; inferior: 254 nm).

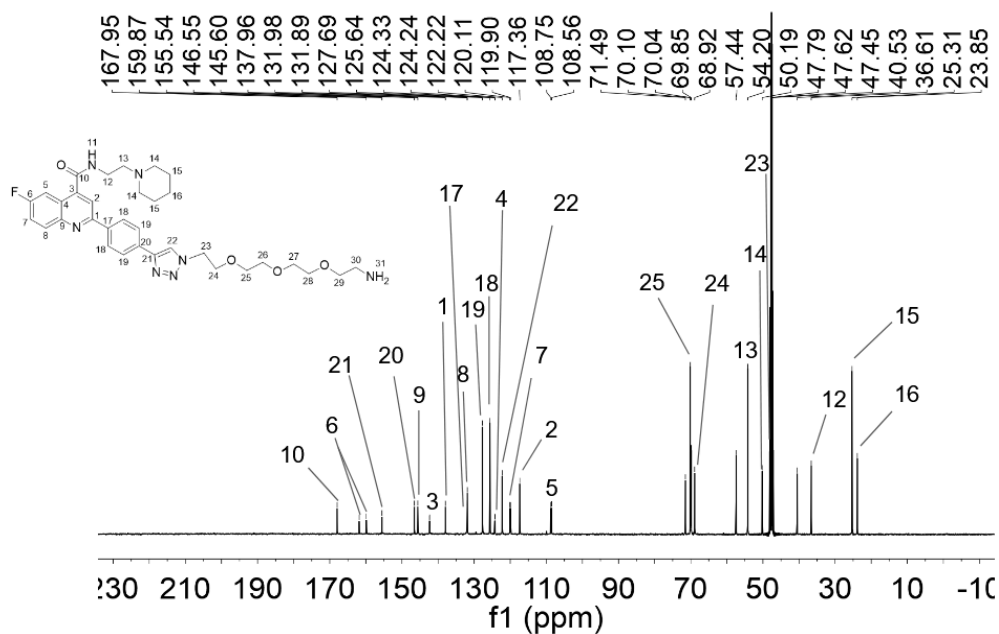
Após a purificação, o produto (498PPEG) foi confirmado por RMN, entretanto, não foi possível a atribuição exata dos H e C nos espectros de ^1H (Espectro 25a) e ^{13}C (Espectro 25b), respectivamente, mesmo com o auxílio de espectros 2D (COSY - Espectro 25c, HSQC - Espectro 25d, HMBC - Espectro 25e). Isso se deve à sobreposição dos sinais do espaçante. No espectro de ^1H , não foi possível a atribuição dos sinais de H26, H27, H28, H29 e H30, pois estes sinais se sobrepõem entre 3,63 e 3,36 ppm. O sinal em 2,72 também pertence a um desses hidrogênios. De qualquer forma, a ligação do agente espaçante é confirmada pelo aparecimento desses sinais, bem como o sinal em 8,44 ppm, que pertence ao H22 do anel triazólico e confirma a reação de *click chemistry*. De maneira similar, todos os sinais no espectro de ^{13}C puderam ser atribuídos, exceto C26, C27, C28, C29 e C30, que correspondem a qualquer um dos seguintes sinais: 71,49, 70,04, 69,85, 57,44 e 40,53 ppm.



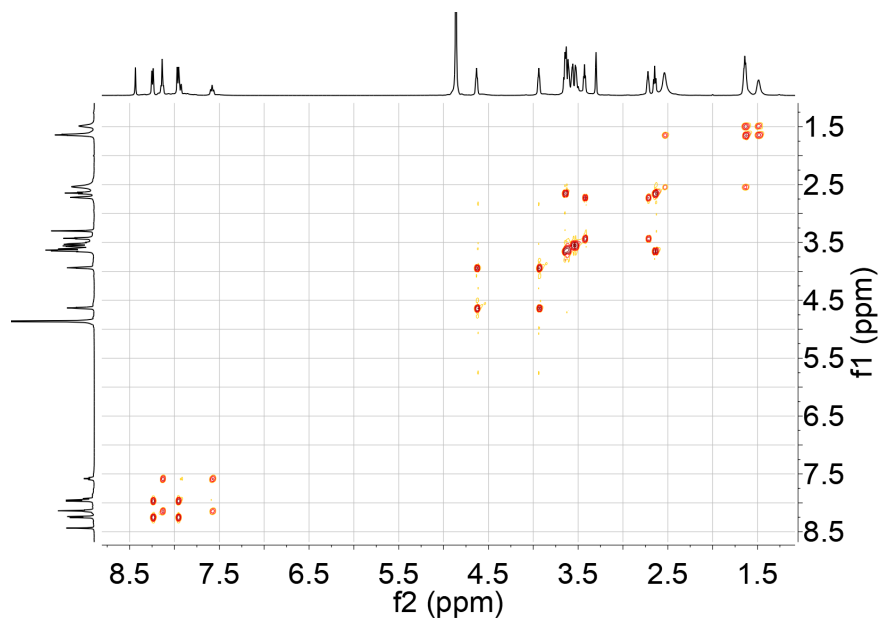


Espectro 25a: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de 498PPEG. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.

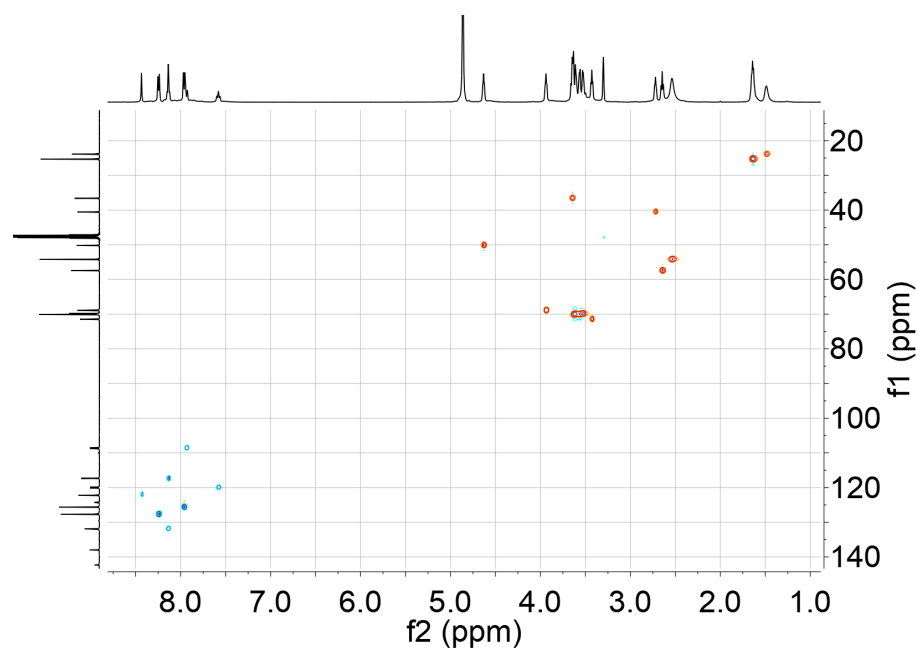




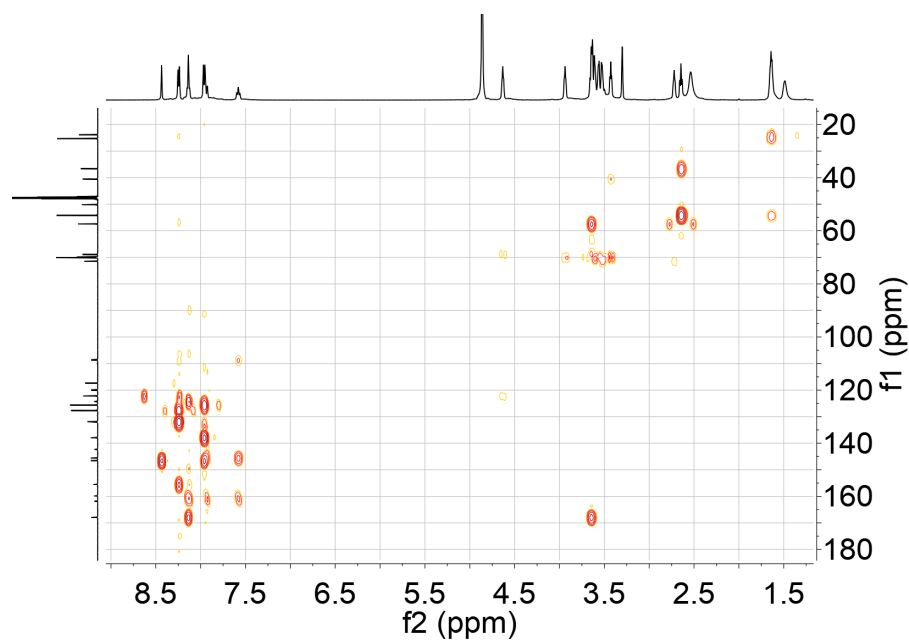
Espectro 25b: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, MeOD) de 498PPEG. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 25c: espectro de RMN COSY de 498PPEG



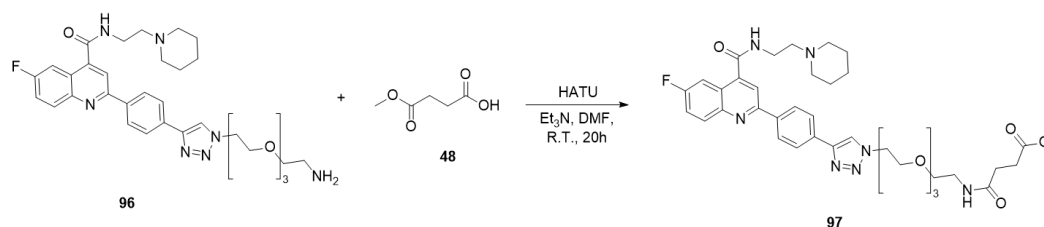
Espectro 25d: espectro de RMN HSQC 498PPEG. Azul indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e laranja indica hidrogênios pares (CH₂).



Espectro 25e: espectro de RMN HMBC de 498PPEG.

Com base nos RMN e no espectro de massas da Figura 91, confirma-se a obtenção do produto desejado, sendo necessária, então, a adição de um segundo espaçante diácido (ácido succínico) para formação de uma amida entre o ácido e a amina do PEG de 498PPEG e, em seguida, uma segunda amida com o dendrímero.

4.6.36. Amidação de ácido metil succínico com 498PPEG



Esquema 57: reação amidação de 498PPEG com succinato de monometila.

Após a obtenção de 498PPEG, é necessária a adição de um grupo funcional à molécula de forma a permitir sua ligação com o PAMAM G0. Como tanto o dendrimero como a molécula potencialmente ativa possuem aminas primárias em sua estruturação, uma opção é uni-las com um espaçante diácido carboxílico, como o ácido succínico. Assim, optou-se pela amidação de 498PPEG utilizando-se succinato de monometila, pois esse espaçante possui um de seus ácidos carboxílicos protegidos na forma de éster, o que evita a formação de dímeros de 498PPEG. HATU foi utilizado como agente condensante por ser adequado para sistemas com impedimento estérico (DUNETZ, MAGANO, WEISENBURGER, 2016) e pelo sucesso na síntese de MQSuc.

Dessa forma, a reação foi realizada à temperatura ambiente, utilizando-se HATU e Et₃N como base. Após 20 h de reação, a formação do produto (498PPEGMS) foi observada por LCMS pelo aparecimento de um pico com M/z = 734, que corresponde a (M+H)⁺ (Figura 92 - TR = 1,86min, M/z = 734, positivo).

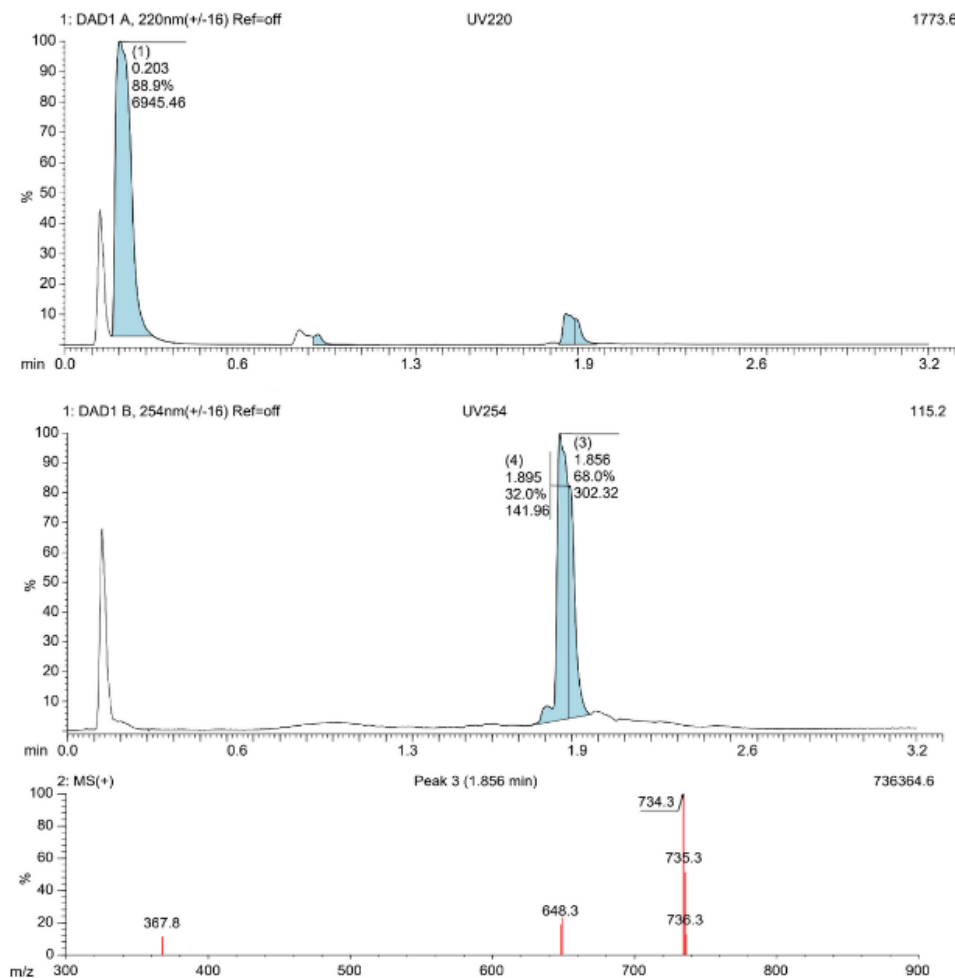
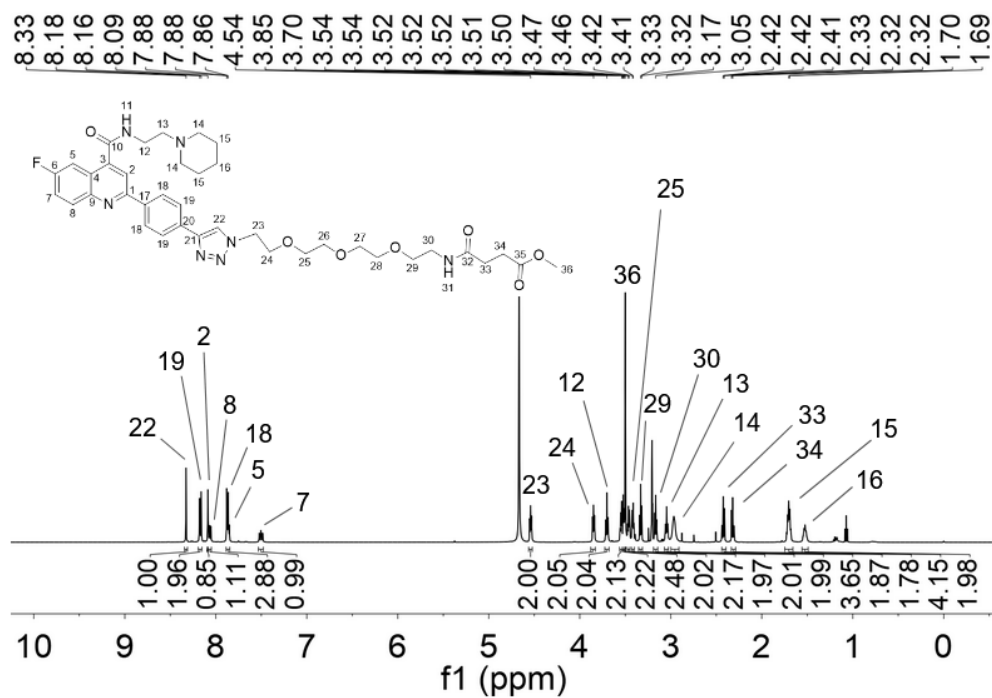
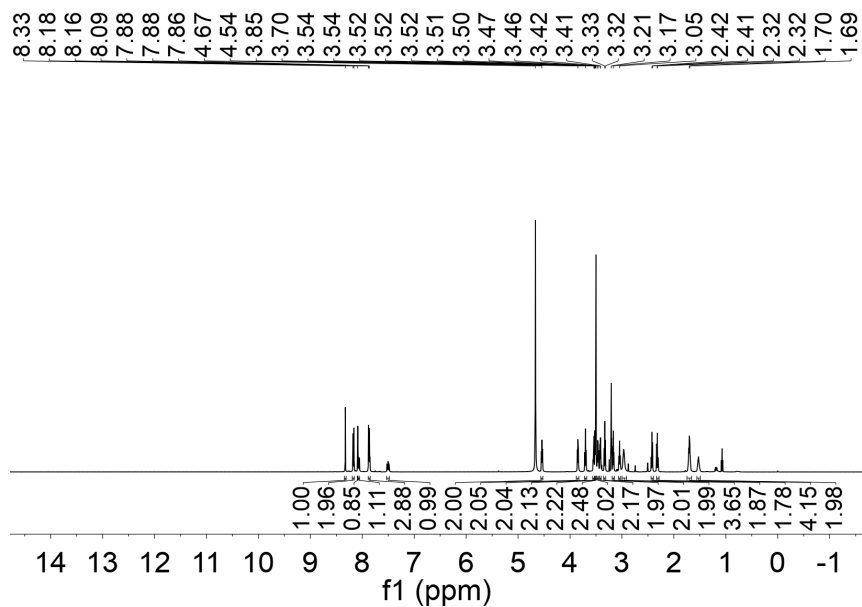
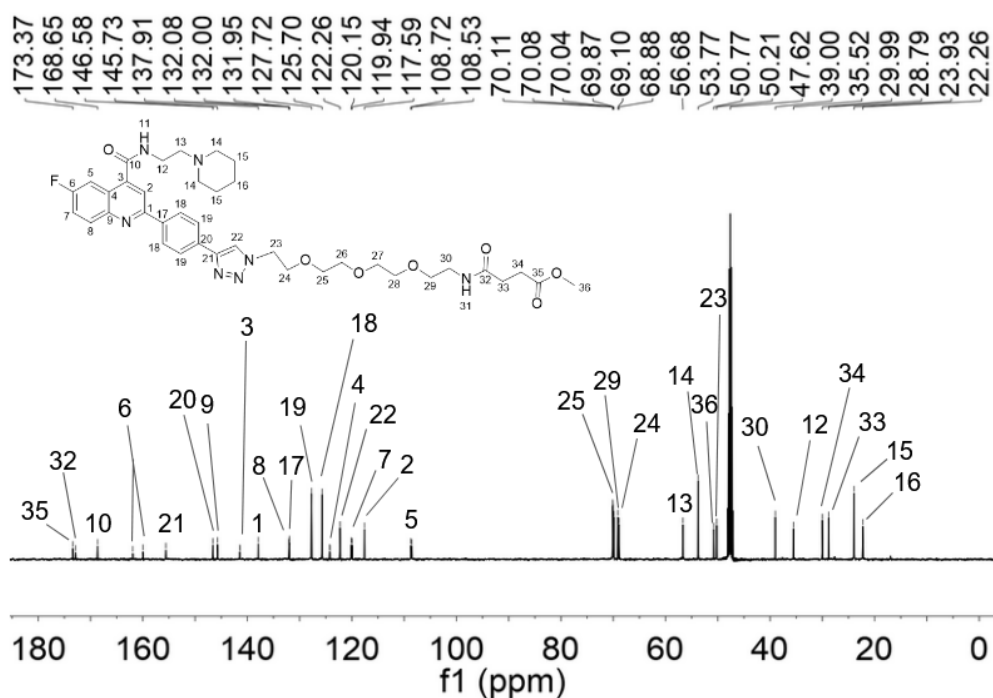
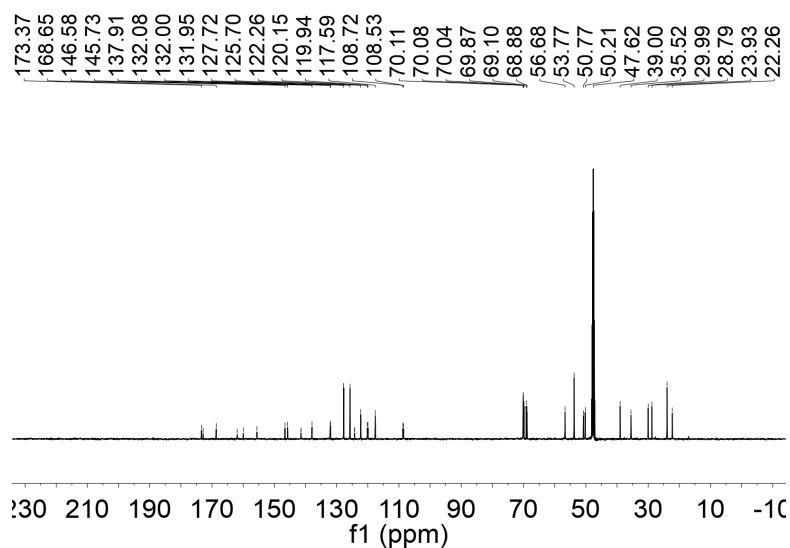


Figura 92: cromatograma e espectro de massas da análise de LCMS da reação de 498PIno com derivado azídico de PEG após 2 h em reator de microondas. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (cromatograma superior: 220nm; inferior: 254 nm).

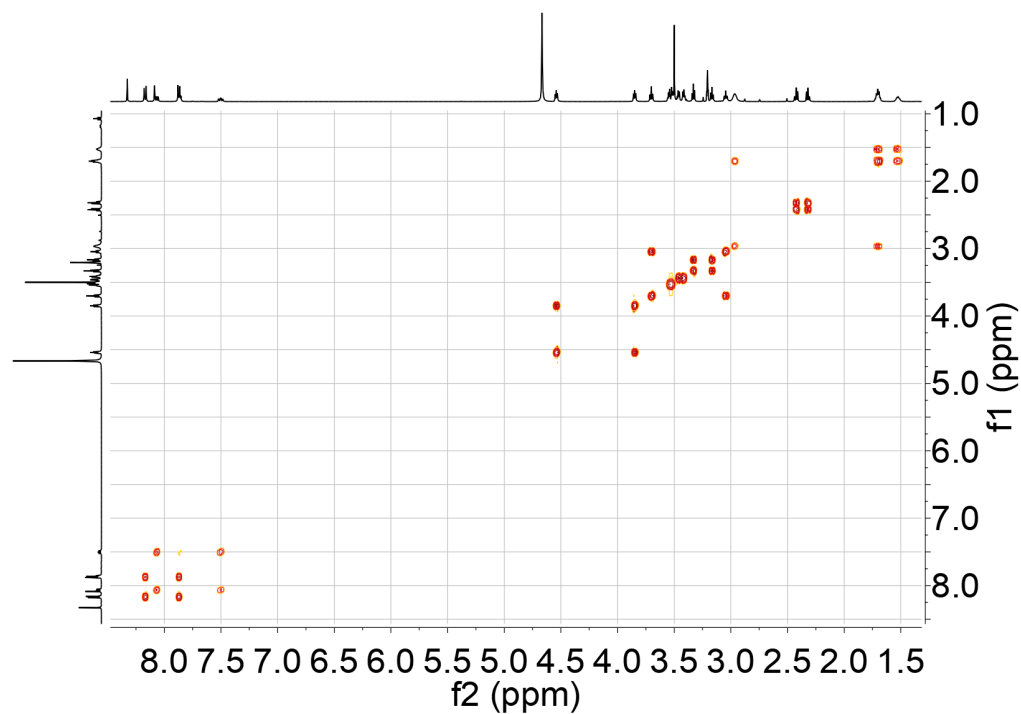
A formação do produto de interesse também foi confirmada por RMN. O RMN de ^1H de 498PPEGMS (Espectro 26a) é muito semelhante ao de 498PPEG, diferindo pelo aparecimento de um simpleto em 3,50 ppm com integral para 3 H e 2 tripletos, um em 2,42 e um em 2,32 ppm, ambos com integral para 2 H. Tais sinais correspondem, respectivamente, aos H36, H33 e H34, sugerindo a ligação do monometil succinato. No RMN de ^{13}C (Espectro 26b), observa-se o aparecimento de dois sinais de carbonila: um em 173,37 e um em 172,85 ppm. Esses dois sinais, associados aos sinais em 29,99 e 28,79 ppm também confirmam a adição do succinato. A atribuição dos sinais teve o auxílio de RMNs 2D: COSY (Espectro 26c), HSQC (Espectro 26d) e HMBC (Espectro 26e).



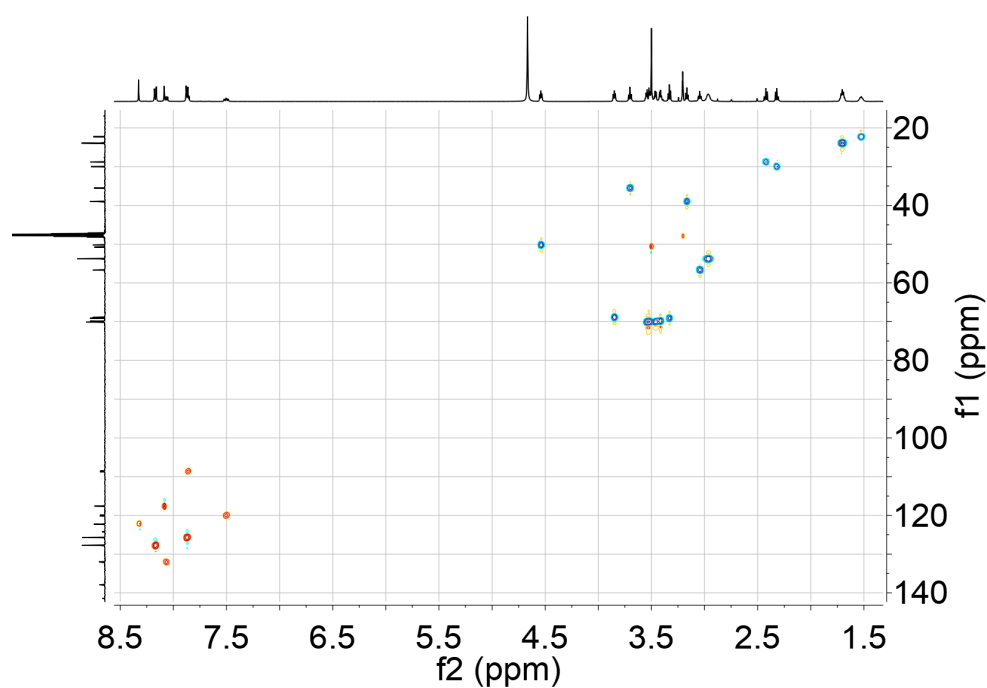
Espectro 26a: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de 498PPEGMS. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



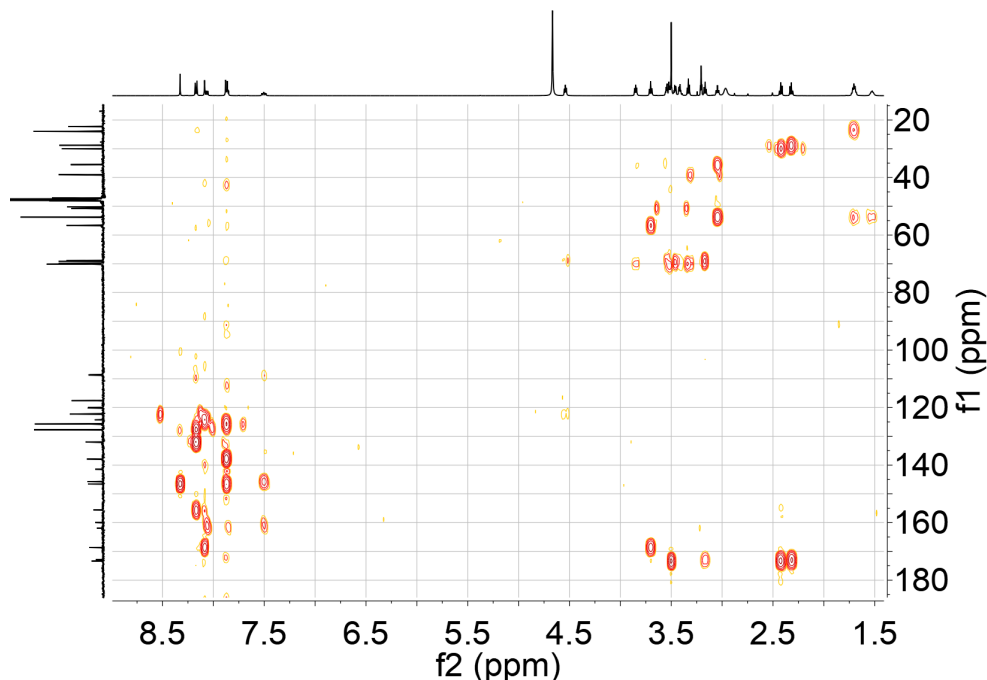
Espectro 25b: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, MeOD) de 498PPEGMS. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 25c: espectro de RMN COSY de 498PPEGMS.



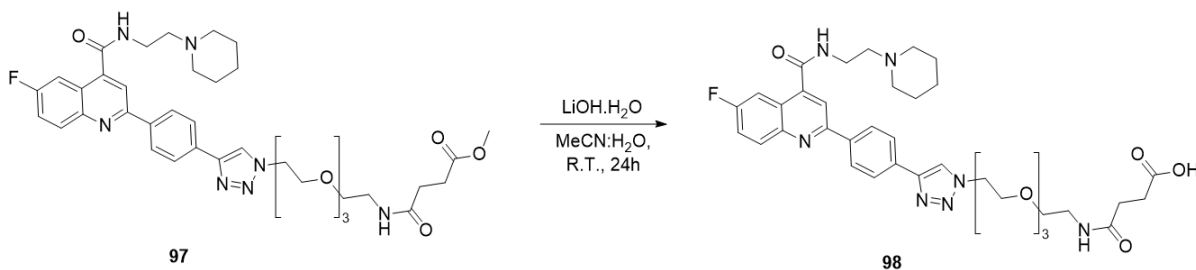
Espectro 25d: espectro de RMN HSQC 498PPEGMS. Laranja indica hidrogênios ímpares (CH e CH_3) e azul indica hidrogênios pares (CH_2).



Espectro 25e: espectro de RMN HMBC de 498PPEGMS.

A partir de então, é necessária a desproteção do éster da porção succínica da molécula, de modo a obter um ácido carboxílico para reação com as aminas do dendrímero.

4.6.37. Desproteção do éster de 498PPEGMS



Esquema 58: reação de desproteção de éster de 498PPEGMS para síntese de 498PPEGS.

A desproteção do éster de 498PPEGMS para formação de 498PPEGS foi realizada com LiOH, de maneira análoga ao realizado com MQMS. Após 24 h de reação, foi observada, por LCMS (Figura 93), a formação de um pico com $M/z = 702$, sendo que $(M+H)^+$ possui um M/z de 720. Essa diferença de 18 u pode ser explicada pela perda de uma molécula de água durante o processo de ionização da molécula, a qual pode ocorrer com a formação de uma succinimida na porção terminal, conforme apresentado na Figura 93.

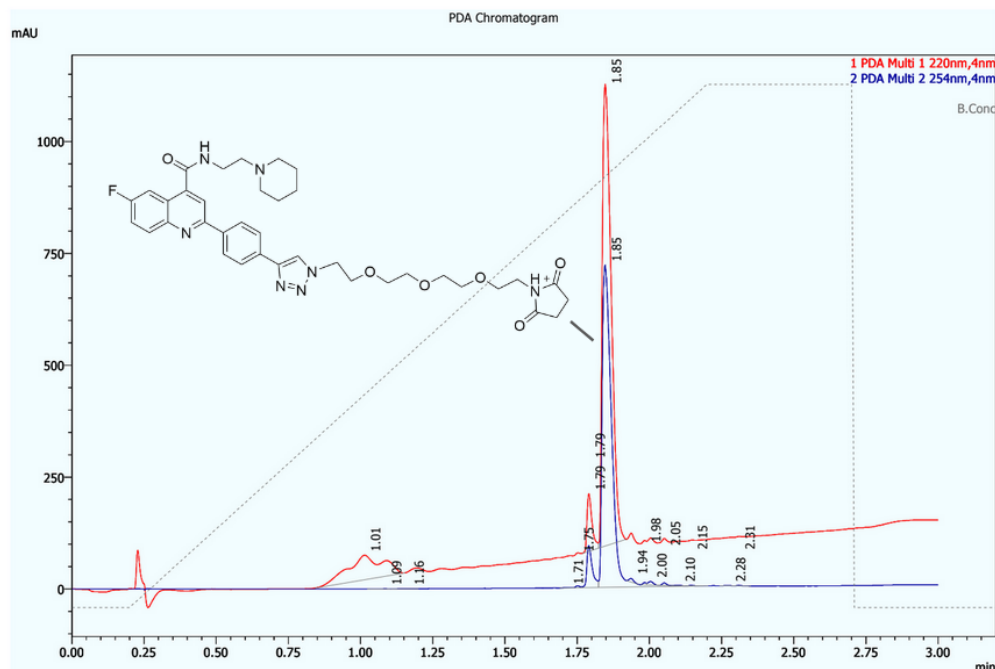
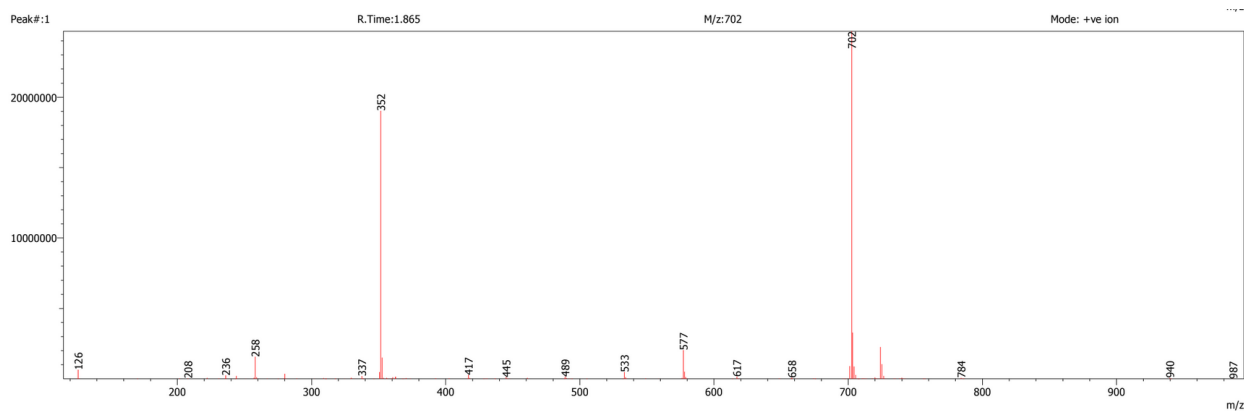


Figura 93: cromatograma da análise de LCMS da deproteção de 498PPEGMS. A molécula desenhada corresponde à estrutura do possível produto formado após a ionização, em que é possível observar a perda de uma molécula de água. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

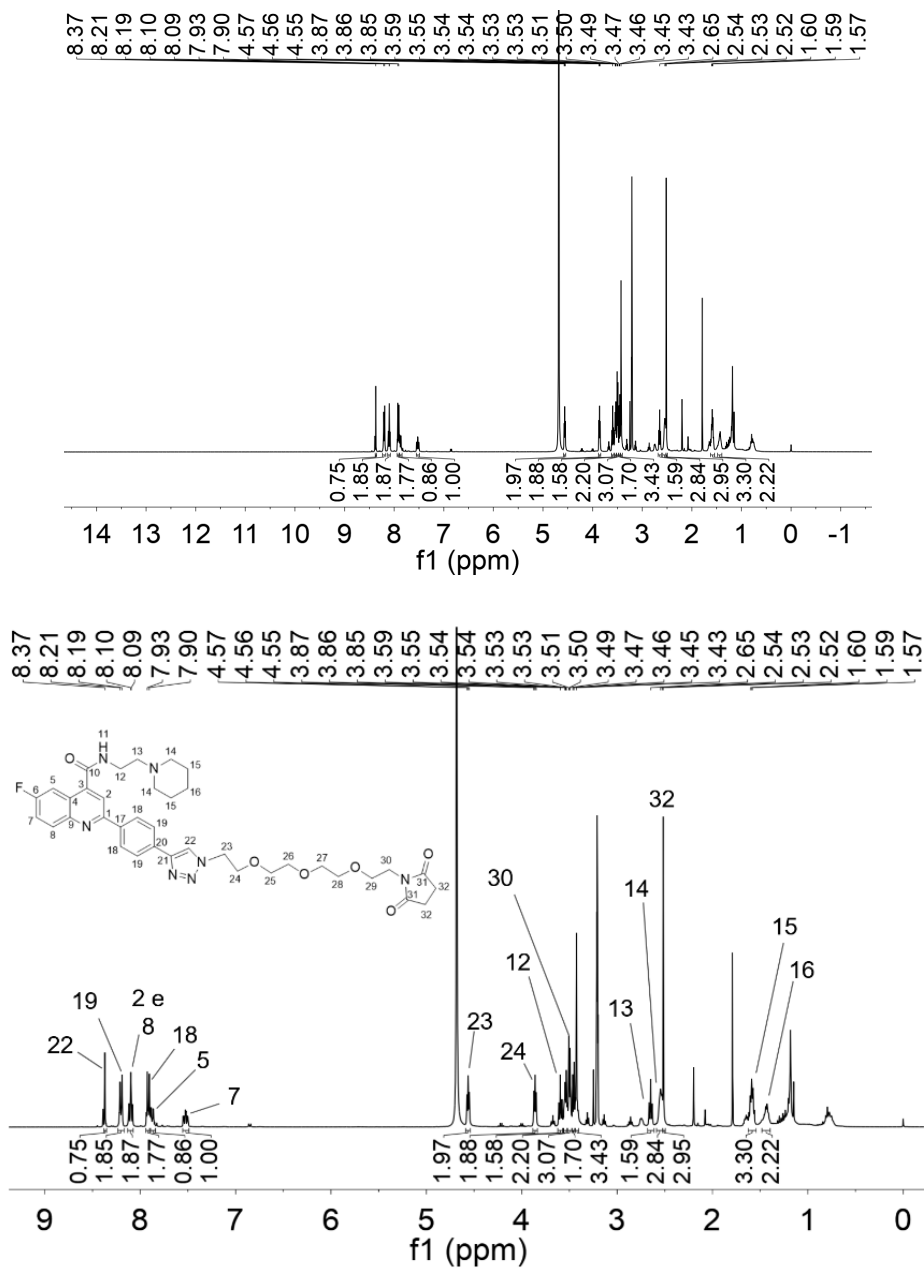
O espectro de massas de produto (Espectro 26a) sugere, então, que foi formado o produto desejado, levando-se em conta essa possível reação intramolecular durante o processo de ionização.



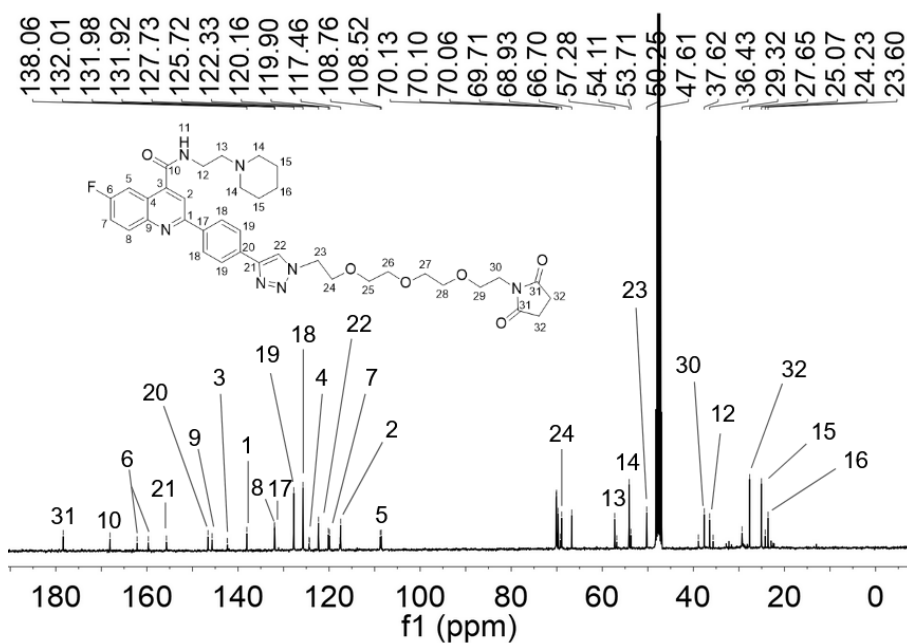
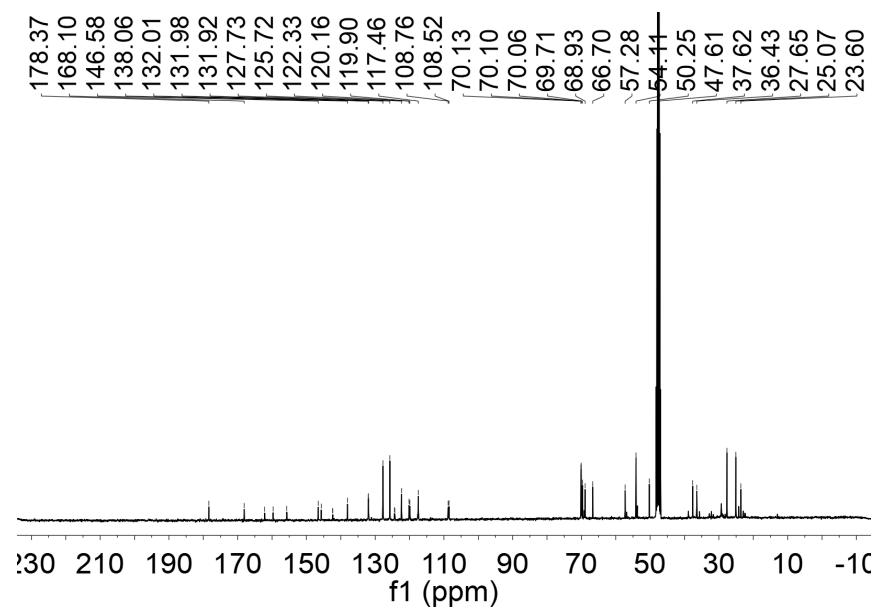
Espectro 26a: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

Para a confirmação estrutural do produto, espectros de RMN foram obtidos. Nos espectros de ^1H (Espectro 26b) e ^{13}C (Espectro 26c), a presença de impurezas impediu a

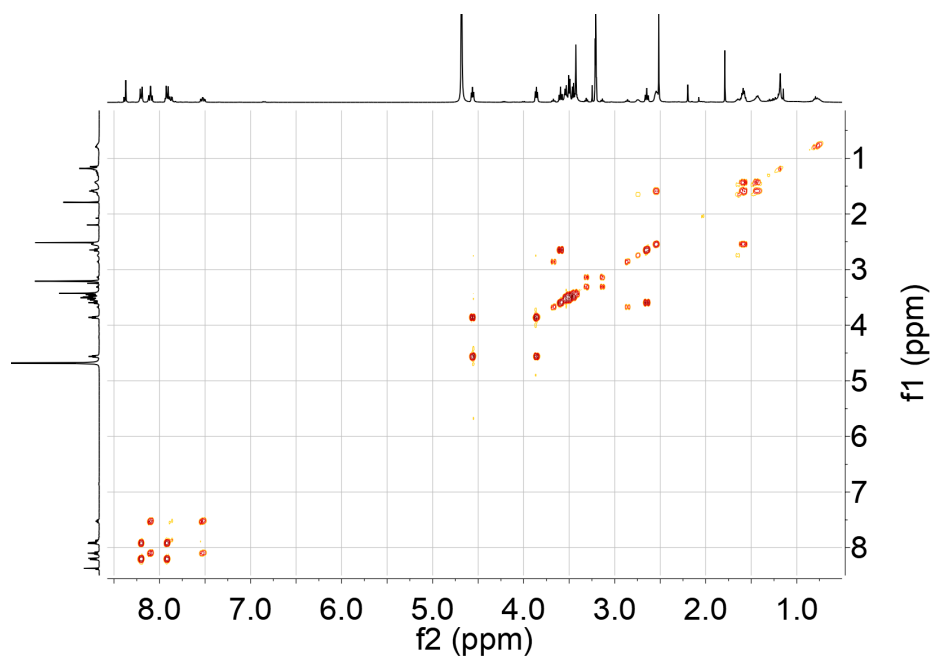
atribuição exata dos sinais, mesmo com auxílio de espectros COSY (Espectro 26d), HSQC (Espectro 26e) e HMBC (Espectro 26f). Ainda assim, a ausência do simpleto em 3,50 ppm no espectro de ^1H e a ausência de sinais nessa região originados por CH e CH_3 (conforme demonstrado pelo HSQC) sugere que o éster foi clivado. No espectro de ^{13}C , entretanto, observou-se que foi formada a succinimida e não o ácido livre esperado. Isso é observado pelo único sinal de carbonila em 178,37 ppm (excluindo-se a carbonila C10 em 168,10 ppm), deslocamento que está de acordo com a literatura (GRASSI et al, 2017). Com esse resultado, foi possível determinar que o sinal em 2,52 ppm no espectro de ^1H corresponde a H32, enquanto que o sinal em 27,45 ppm corresponde ao C32.



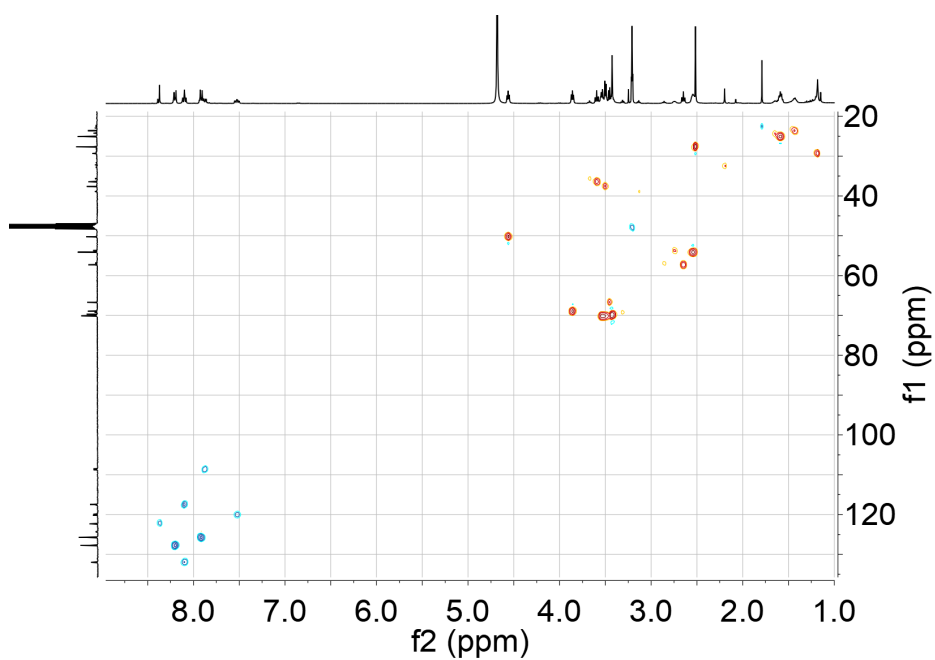
Espectro 26b: espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOH) de 498PPEGS. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



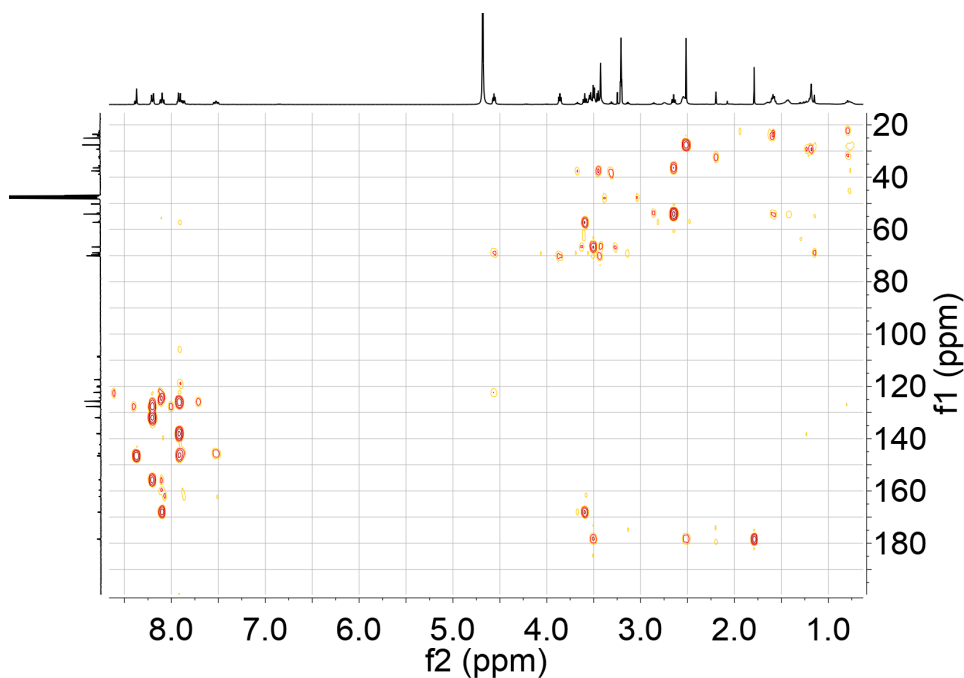
Espectro 26c: espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de 498PPEGS. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 26d: espectro de RMN COSY de 498PPEGS.



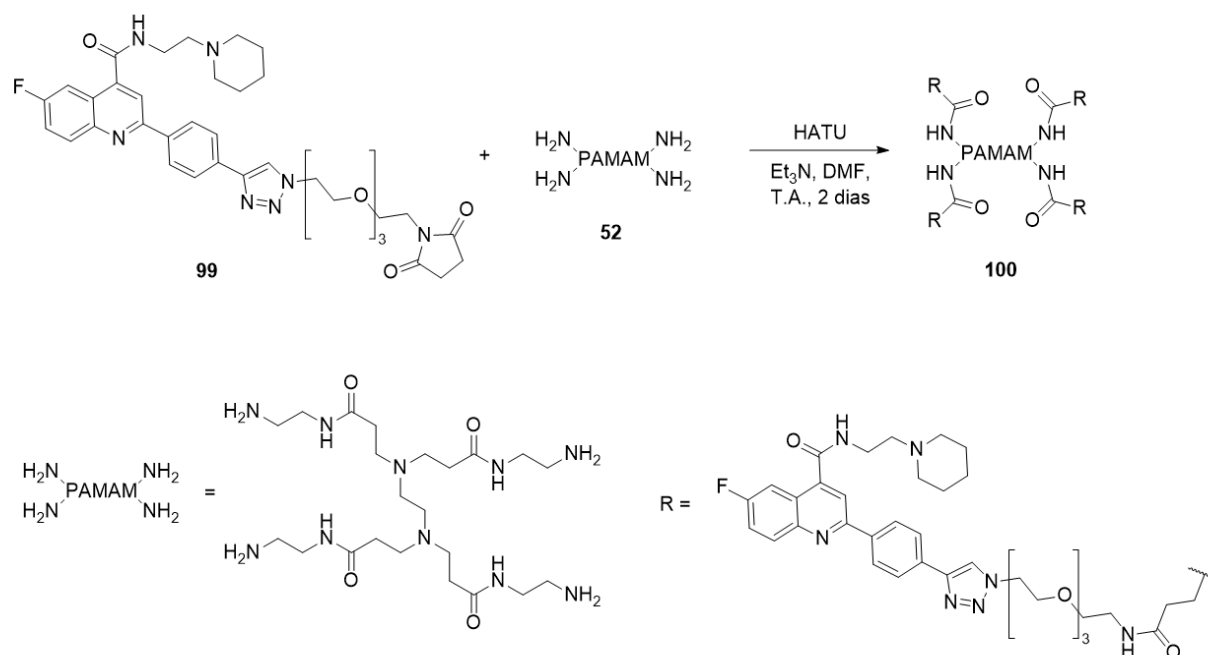
Espectro 26e: espectro de RMN HSQC de 498PPEGS. Azul indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e laranja indica hidrogênios pares (CH₂).



Espectro 26f: espectro de RMN HMBC de 498PPEGS.

Apesar da diferença estrutural entre o esperado e o obtido, a succinimida pode sofrer reações de hidrólise (YAKATAN e FAN, 1977) e aminólise (NAKANISHI et al., 2007) e, portanto, sua formação não deve ter um impacto negativo significativo na formação da amida entre 498PPEGS e PAMAM G0. Por conta disso, a etapa seguinte foi conduzida sem considerações particulares.

4.6.38. Amidação de PAMAM G0 e derivado de 498PPEGS



Esquema 59: reação acoplamento de 498PPEGS e PAMAM G0.

Por conta do sucesso na síntese de 498PPEGMS com HATU como agente condensante, este foi utilizado na reação de amidação entre 498PPEGS e PAMAM G0. DMF foi utilizado como solvente e permitiu a completa solubilização de todos os reagentes envolvidos. Entretanto, análises de LCMS (Figura 94) após 20 e 48 h não indicaram a formação de produto, sendo observada uma grande quantidade de material de partida. Como não houve nenhum indício da formação de produto, a reação foi interrompida e descartada.

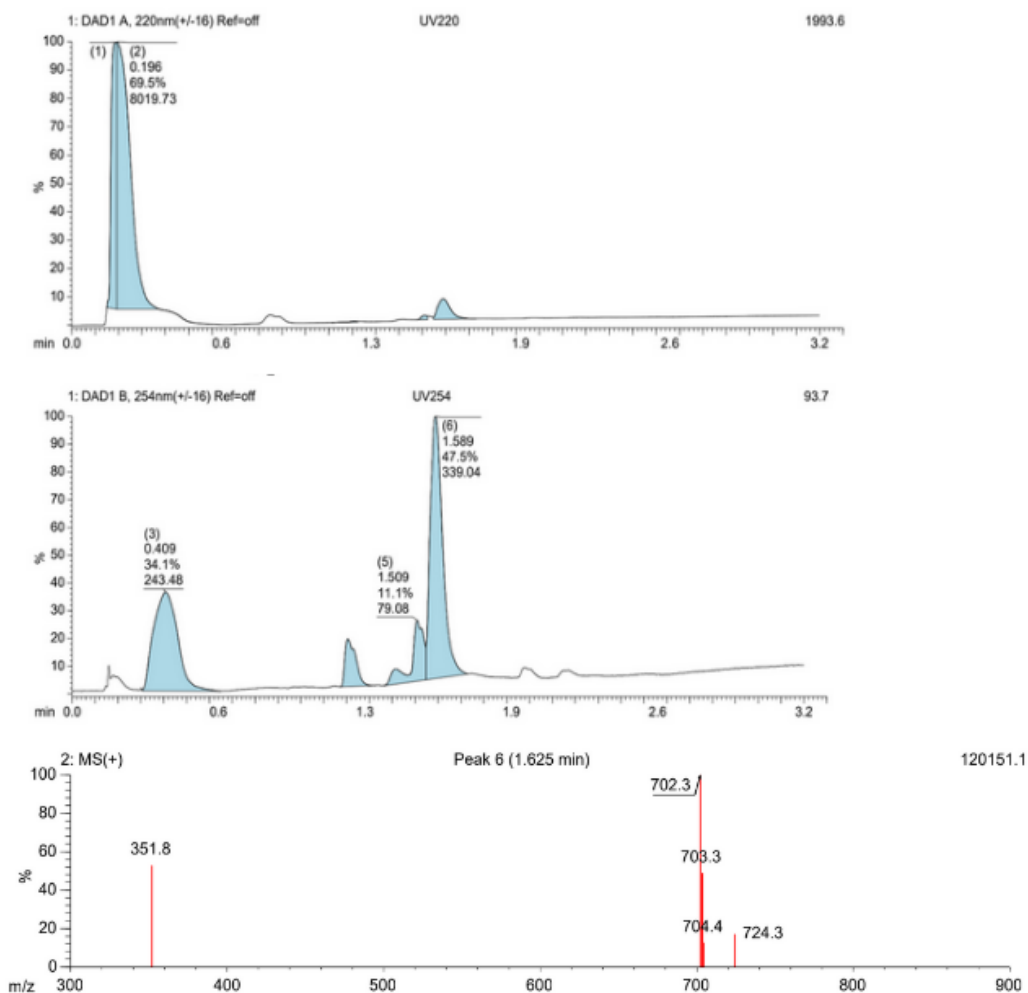


Figura 94: cromatograma e espectro de massas da análise de LCMS da reação de 498PPEGS com PAMAM G0 após 48h. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (cromatograma superior: 220nm; inferior: 254 nm).

Novamente, a etapa de ligação da molécula potencialmente ativa com o dendrímero se mostrou o principal empecilho para a síntese dos compostos de interesse/planejados. Como o período em Dundee estava no final e não havia quantidade suficiente de 498PPEGS para a avaliação de outras condições de síntese ou de outros agentes condensantes, decidiu-se seguir com o caminho reverso da adição do espaçante succínico, ou seja, realizar a succinoilação de PAMAM G0. Assim, poderia ser realizada a amidação de 498PPEG com o dendrímero funcionalizado, conforme apresentado na Figura 95.

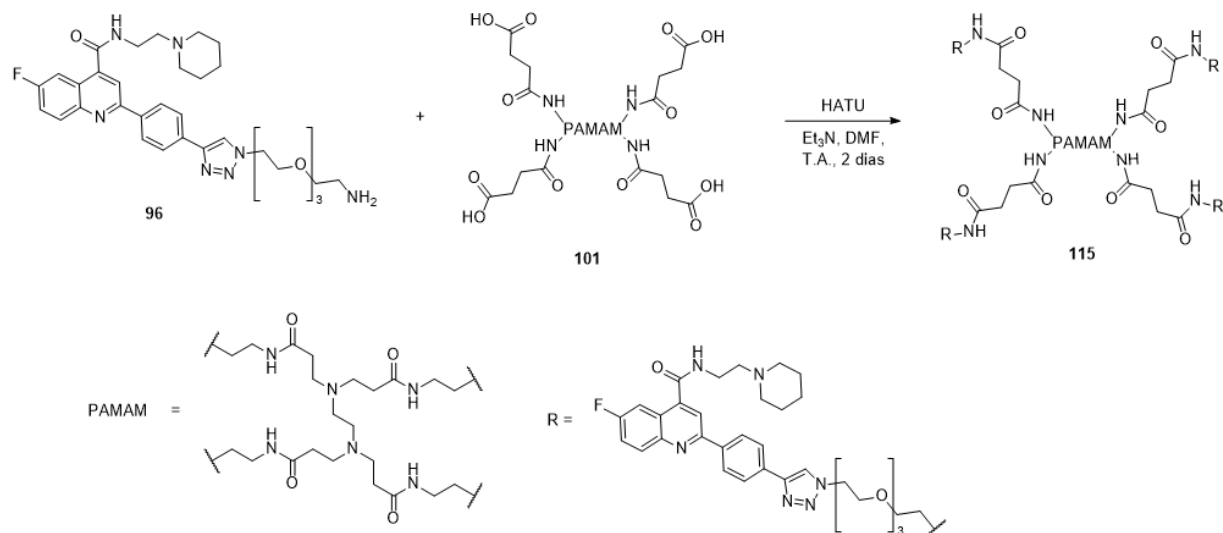
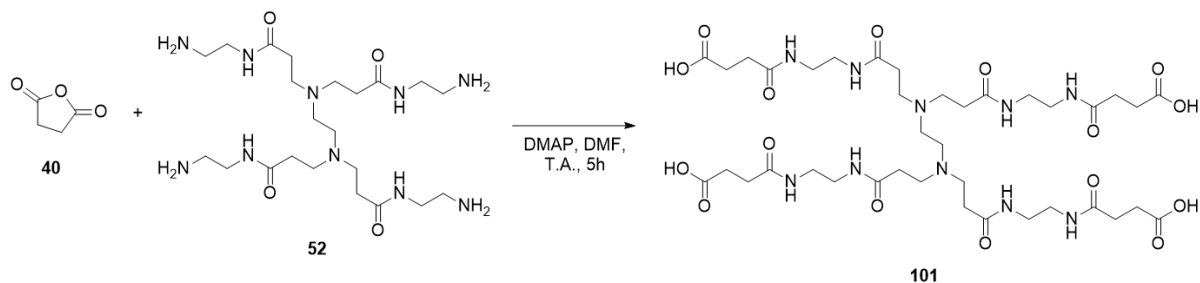


Figura 95: reação de acoplamento por amidação proposta entre derivado succinoilado de PAMAM G0 e 498PPEG

4.6.39. Succinoilação de PAMAM G0



Esquema 60: reação amidação de anidrido succínico e PAMAM G0.

Devido às dificuldades de ligação do dendrímero com moléculas potencialmente ativas e espaçantes, optou-se por seguir pela via contrária, adicionando o espaçante no dendrímero e seguindo com a reação do espaçante com a molécula potencialmente ativa. Assim, a funcionalização do dendrímero com grupos ácido carboxílico em suas extremidades permitiria a ligação de 498PPEG pela formação de uma ligação amida entre o ácido do dendrímero e a amina do espaçante PEG da molécula potencialmente ativa, conforme explicado na seção anterior e demonstrado na Figura 95.

Nesse contexto, uma opção para a adição de grupos ácidos nas porções terminais do dendrímero seria a sua reação com anidrido succínico, dessa forma, PAMAM G0 e um excesso de anidrido succínico foram adicionados a um tubo de ensaio junto com DMAP e DMF e mantidos sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 h, foi observada a formação de produto

em uma análise de LCMS (Figura 96 - TR = 0,75 min; M/z = 917, positivo) e, após 5 h, uma análise por CCD utilizando-se ninidrina como revelador indicou o consumo completo do dendrímero.

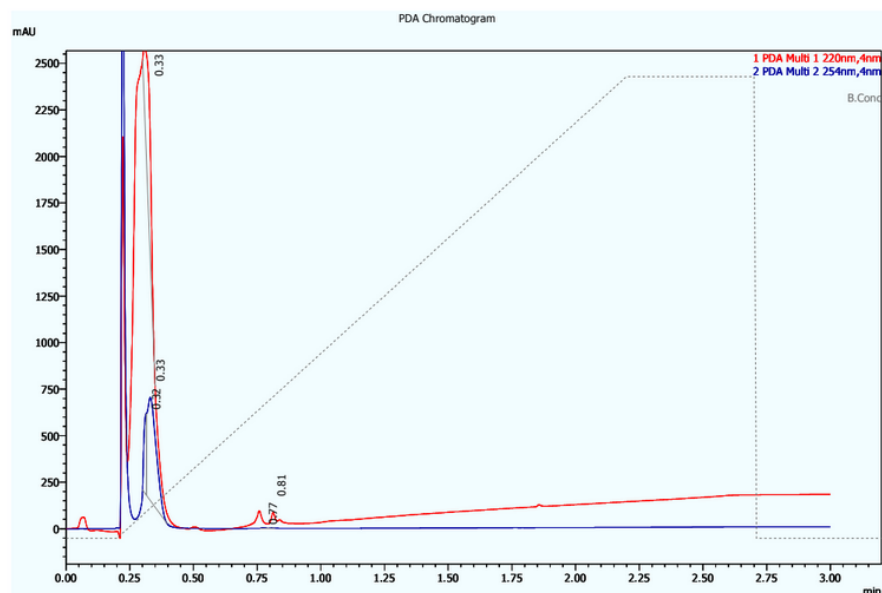
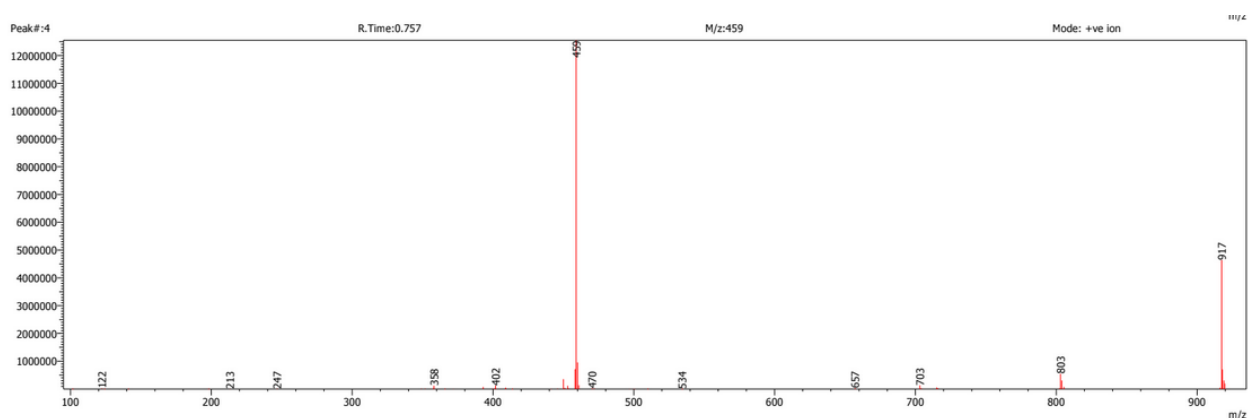


Figura 96: cromatograma da análise de LCMS da reação de succinilação de PAMAM G0. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

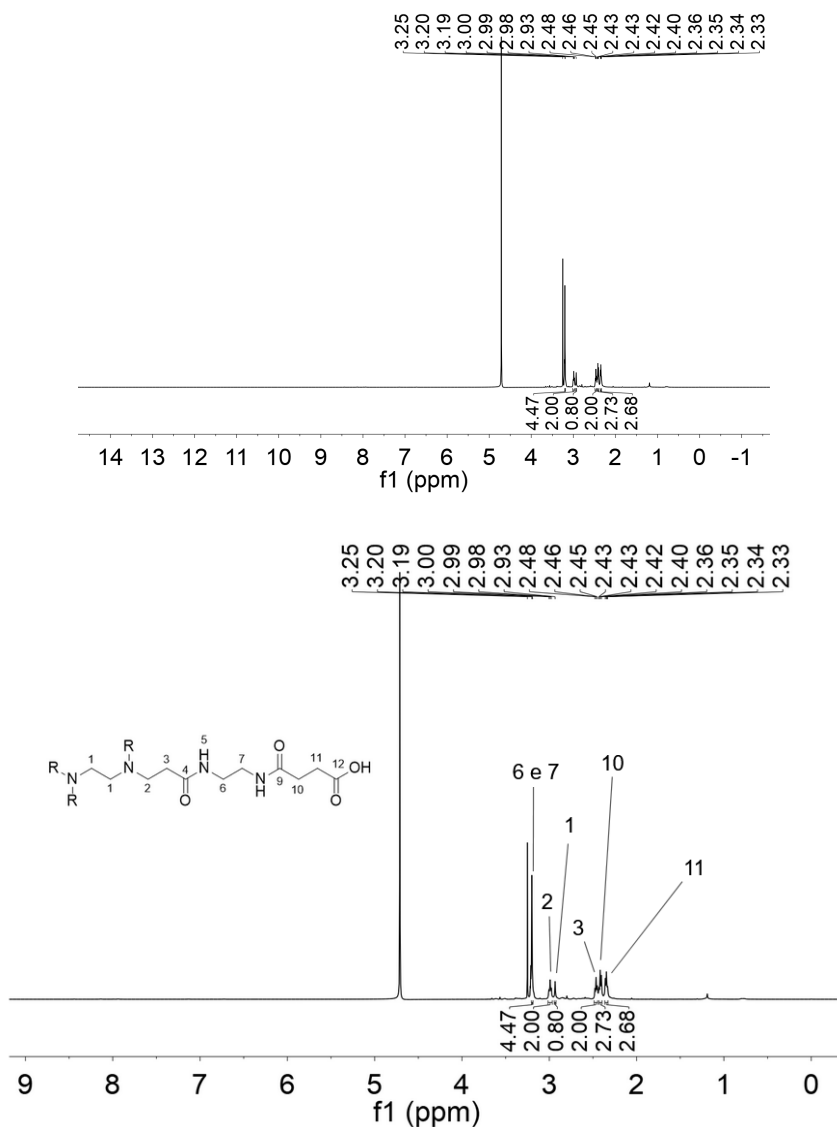
O material foi purificado e a estrutura foi confirmada por espectrometria de massas (Espectro 25a) e RMN. O espectro de massas mostra 2 picos principais: um com M/z = 917, que corresponde a $(M+H)^+$ e um com M/z = 459, que corresponde a $(M+2H)^{2+}$.



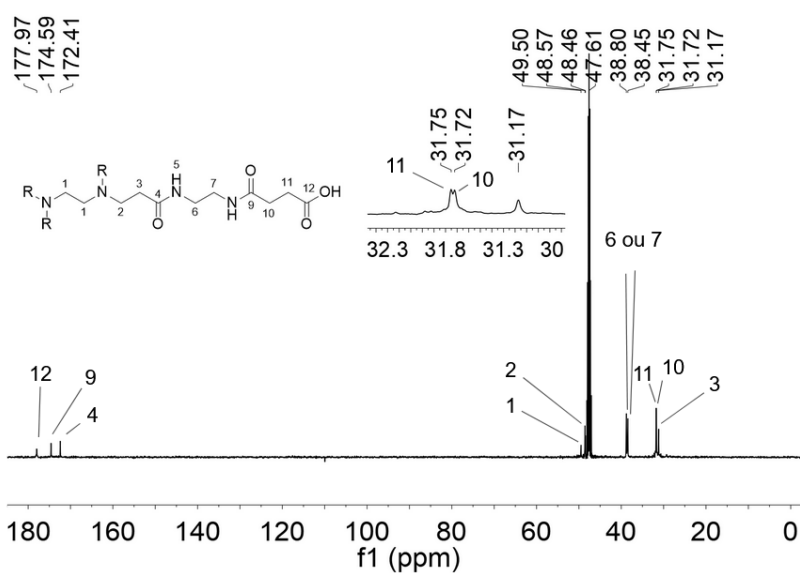
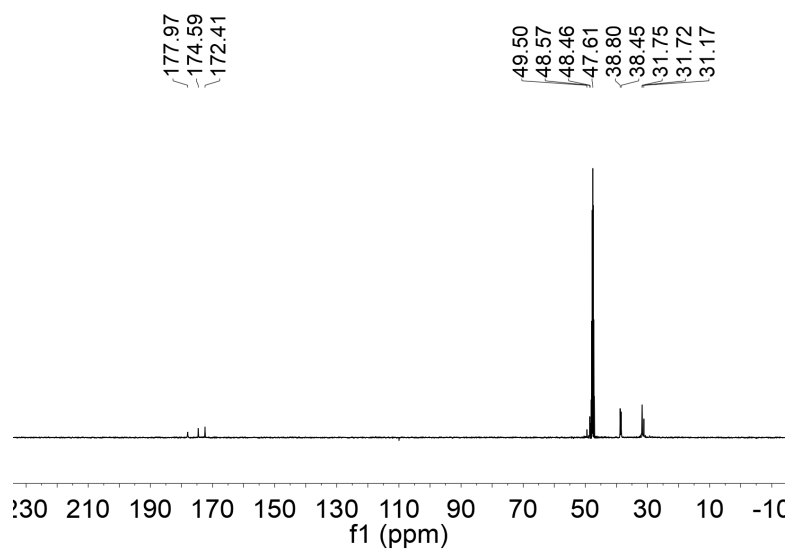
Espectro 30a: espectro de massas do produto obtido por LCMS com o detector no modo positivo.

A obtenção do produto também foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C , bem como espectros 2D (COSY, HSQC e HMBC). Assim, foi possível realizar a atribuição de todos os H do produto. Ressalta-se que as integrais indicadas no espectro foram normalizadas para

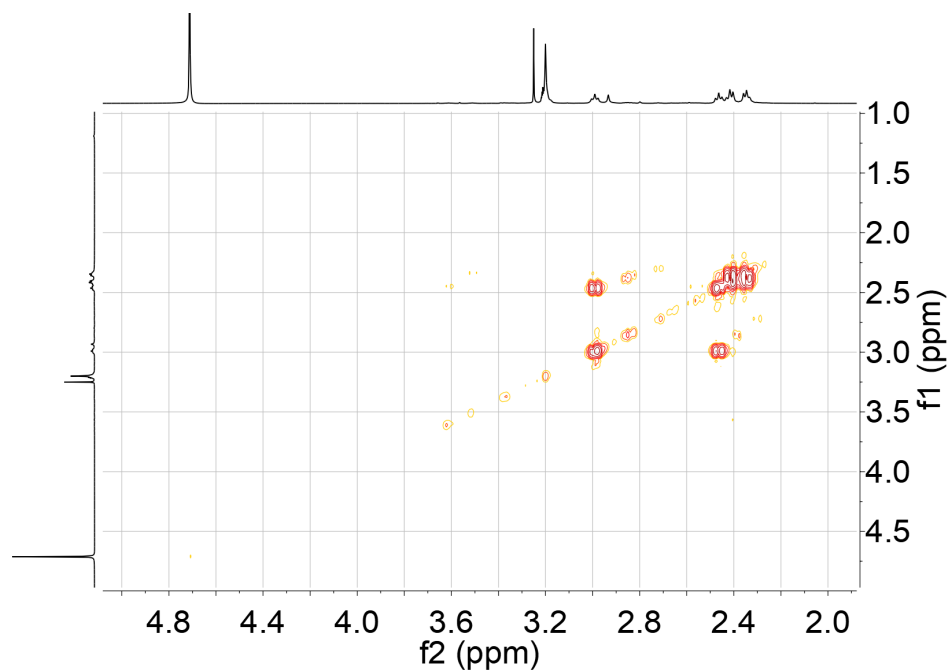
apenas um braço do dendrímtero e, assim, o valor da integral do sinal referente a H1 é 4 vezes menor do que o esperado (apenas 1 núcleo para 4 ramos). Analisando-se o espectro de C, destacam-se os sinais em 177,97, 174,59 e 172,41 ppm, que correspondem às carbonilas do produto. Em particular, o sinal em 177,97 ppm é característico de ácidos, enquanto que os sinais em maior campo (174,59 e 172,41 ppm) são característicos de ésteres e amidas. Além disso, foi observado um sinal em 48,46 ppm que deve ser de alguma impureza, uma vez que não foi possível correlacioná-lo com os outros átomos da molécula.



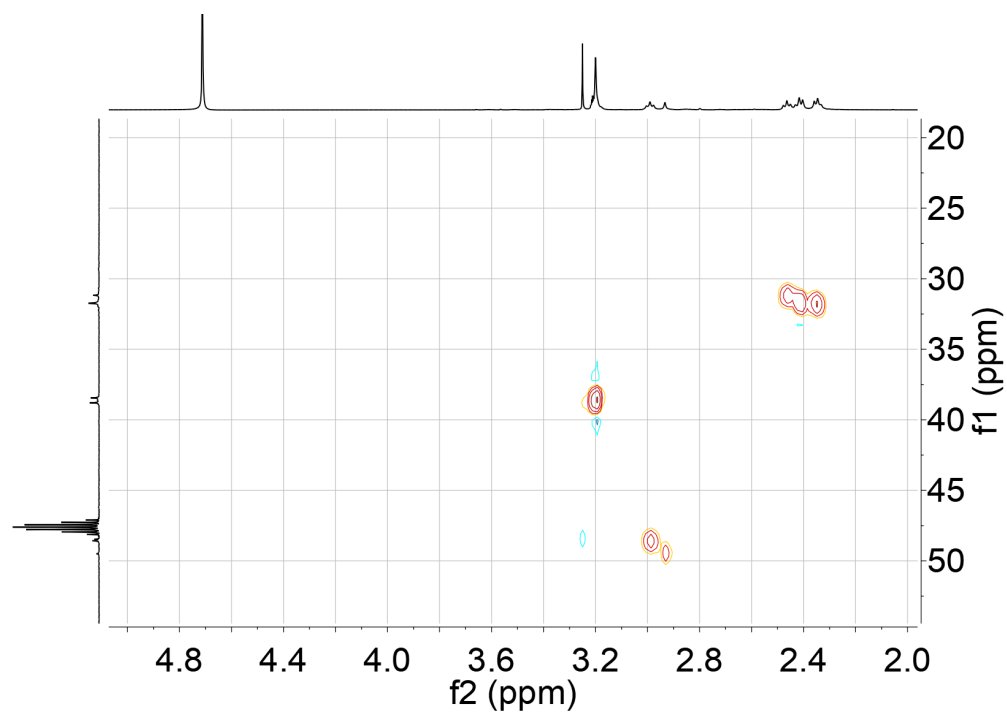
Espectro 27a: espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) de PAMAM G0 succinoilado. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



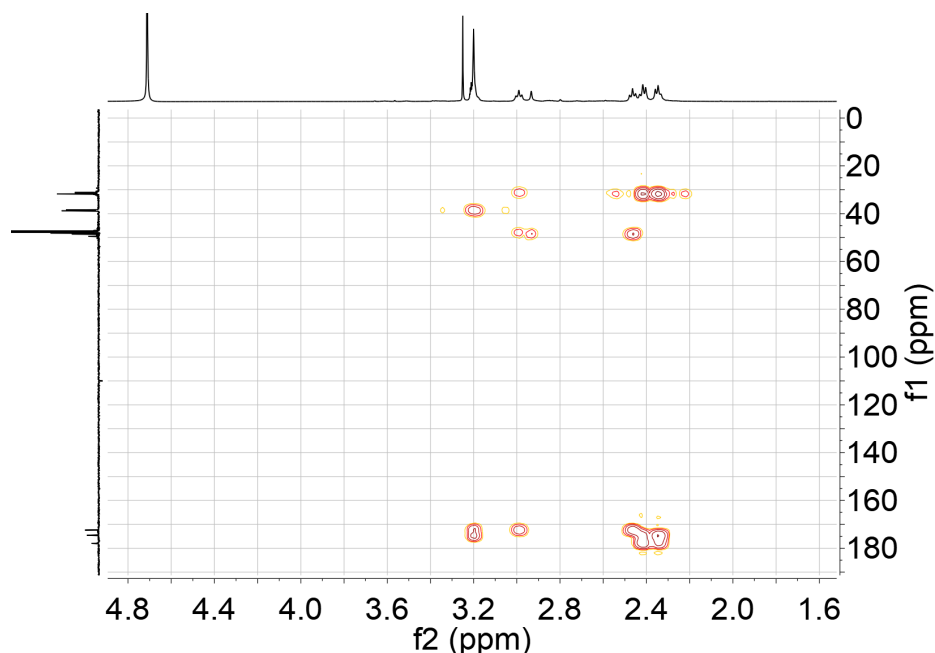
Espectro 27b: espectro de RMN de ^{13}C (126 MHz, MeOD) de PAMAM G0 succinoilado. Acima encontra-se o espectro sem expansão. Abaixo, os números acima dos sinais indicam suas atribuições.



Espectro 27c: espectro de RMN COSY de PAMAM G0 succinilado.



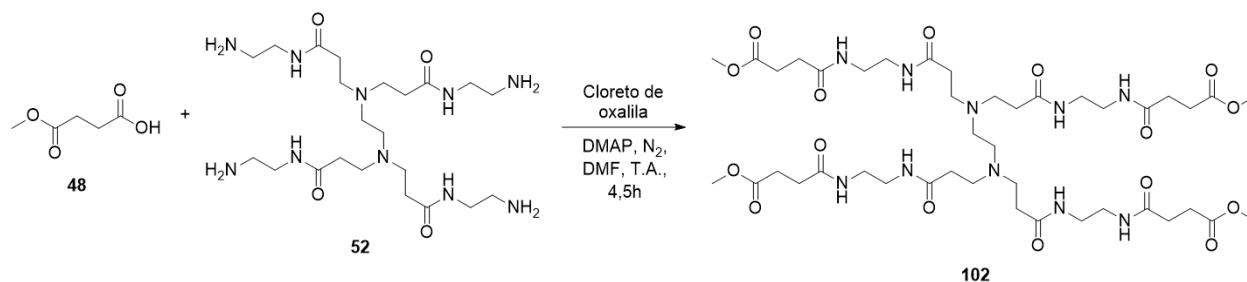
Espectro 27d: espectro de RMN HSQC de PAMAM G0 succinilado. Azul indica hidrogênios ímpares (CH e CH₃) e laranja indica hidrogênios pares (CH₂).



Espectro 27e: espectro de RMN HMBC de PAMAM G0 succinoilado.

Apesar da obtenção do produto de interesse, não houve tempo suficiente na Universidade de Dundee para as próximas etapas dessa síntese. Assim, os trabalhos com essa via foram interrompidos.

4.6.40. Metil-succinoilação de PAMAM G0



Esquema 61: reação amidização de succinato de monometila e PAMAM G0.

Paralelamente à succinoilação de PAMAM G0 com anidrido succínico, foi tentada a reação do dendrímero com succinato de monometila. Isso teve o objetivo de gerar um produto não ácido, o que poderia facilitar sua purificação. Para esta reação, utilizou-se cloreto de oxalila como agente condensante, pois este foi o melhor reagente nas tentativas de acoplamento do dendrímero com ácido BCP.

Após 4,5 h de reação, o conteúdo foi analisado por LCMS (Figura 97), que indicou a formação do composto de interesse (TR = 1,41 min, M/z = 973), e CCD, que sugeriu o consumo completo do dendrímero após ser revelada com ninidrina. Tentou-se purificar o

produto pela passagem em uma coluna com resina de troca aniônica e catiônica, porém ela não foi eficaz no processo.

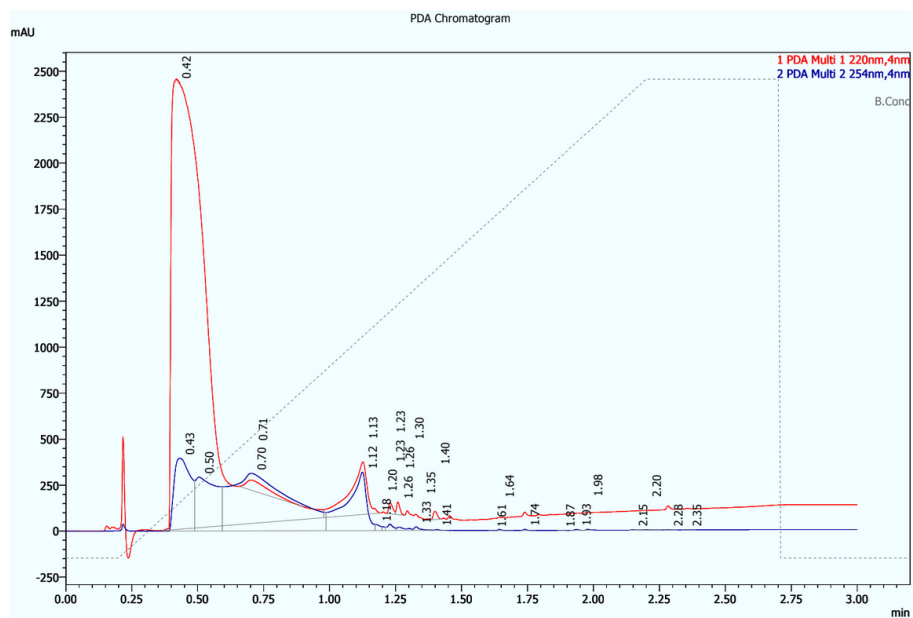
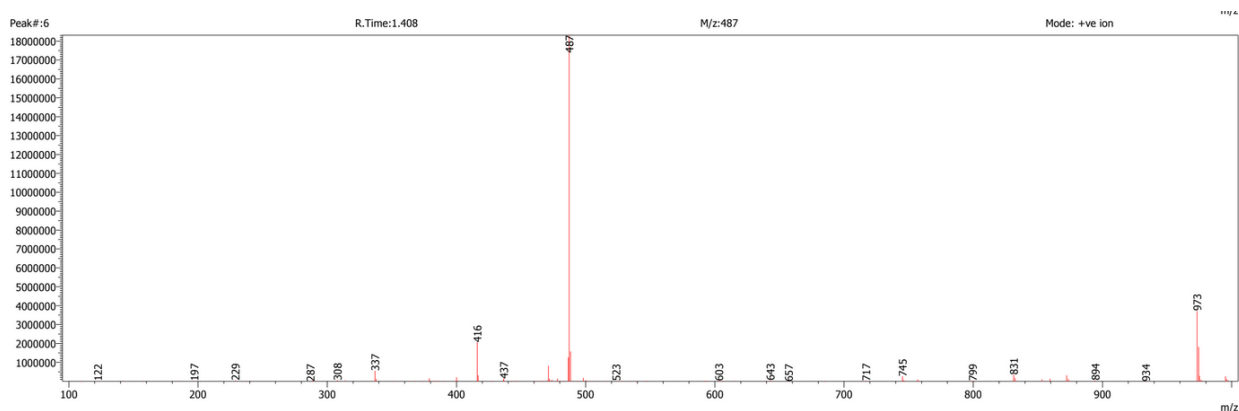


Figura 97: cromatograma da análise de LCMS da reação de succinilação de PAMAM G0. O cromatograma foi obtido por detecção com luz UV (linha vermelha: 220nm; linha azul: 254 nm).

Outras purificações não puderam ser realizadas com esse material, pois o período na Universidade de Dundee foi encerrado. De qualquer forma, acredita-se que o produto foi obtido pelo resultado espectro de massas obtido no LCMS (Espectro 28), o qual indicou a formação de produto com massa 973, que corresponde a $(M+H)^+$. O pico com massa de 487 no espectro corresponde a $(M+2H)^{2+}$.



Com essa reação, os trabalhos de síntese em Dundee foram encerrados, restando a análise das propriedades químicas e biológicas dos compostos, como solubilidade, atividade antiparasitária, toxicidade em células de mamífero, metabolização e permeabilidade.

4.6.41. Análise físico química e biológica de compostos sintetizados

Alguns dos compostos sintetizados foram selecionados e enviados para análises físico-químicas e biológicas. As seguintes propriedades foram avaliadas: atividade contra *P. falciparum*, toxicidade em células humanas (HepG2), *clearance* (CL) em microsomas hepáticos de comundongo, solubilidade aquosa (sol.) e permeabilidade em células renais caninas (MDCK). As moléculas escolhidas para análise foram 498P, 498PTol, 498PIno, 498PPEG e 498PPEGMS e os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: resultados dos ensaios físico químicos e biológicos dos compostos selecionados.

ID	Estrutura	<i>P. falciparum</i> pEC ₅₀	HepG2 pEC ₅₀	CL camundongo (mL/min/g)	Sol. (μM)	Permeabilidade MDCK	
						P _{app} A→B (nm/s)	P _{app} recup. (%)
498P		8,5	4,2	2,9	255	104,3	74,0
498PTol		5,9	4,4	6,2	55	121,5	55,7
498PIno		7,1	4,9	7,6	65	97,6	55,7
498PPEG		5,2	< 4	-	-	68,2	75,5
498PPEGMS		6,2	< 4	12,6	-	24,9	81,7

O primeiro composto avaliado foi 498P, uma vez que esse foi considerado o composto padrão para a comparação com os outros. Isso foi estabelecido pela sua grande similaridade

estrutural com 498, que foi a molécula de referência para as sínteses na Universidade de Dundee. Como esperado e assim como 498, a atividade antiparasitária da molécula é alta, com um pEC_{50} de 8,5 (EC_{50} de aproximadamente 3 nM), e o material também é bastante solúvel em água, com solubilidade $>100 \mu\text{M}$ (BARAGANA et al., 2016). Com um CL $<5 \text{ mL/min/g}$ e com um pEC_{50} em células HepG2 muito inferior ao pEC_{50} em *P. falciparum*, também pode-se dizer que o composto é estável ao metabolismo e que apresenta baixa toxicidade. Por fim, em relação à permeabilidade, esta foi superior a 80 nm/s e, portanto, considerada suficiente com base nas recomendações do WCAIR, onde o estágio foi realizado (WELLCOME CENTRE FOR ANTI-INFECTIVES RESEARCH, 2023). O P_{app} recuperado $>70\%$ indica que houve pouca retenção do composto na membrana celular das células MDCK, em lisossomos ou por outras ligações inespecíficas, o que valida o resultado obtido (BEDNARCZYK e SANGHVI, 2020; WELLCOME CENTRE FOR ANTI-INFECTIVES RESEARCH, 2023).

A remoção da morfolina no análogo 498PTol levou a uma queda drástica na solubilidade do composto, o que deve ser causado pelo aumento da lipofilicidade do composto. Provavelmente pelo mesmo motivo, foi observado um aumento no CL, de modo que a molécula não foi mais considerada metabolicamente estável (BARAGANA et al., 2016). Outro resultado importante foi a redução do *P. falciparum* pEC_{50} para 5,9 ($EC_{50} = 1259 \text{ nM}$), o que representa uma redução na potência de ~ 400 vezes em relação a 498P. Como o HepG2 pEC_{50} de 498PTol foi semelhante ao de 498P, a razão (*P. falciparum* pEC_{50})/(HepG2 pEC_{50}) diminuiu para apenas $\sim 1,34$ (correspondente a uma razão de ~ 30 vezes, considerando-se EC_{50}) e, assim, o composto não foi considerado como tendo toxicidade ótima. Esses dados sugerem que 498PTol não é adequado para ser bom candidato a fármaco. Apesar disso, a permeabilidade foi considerada muito boa, considerando-se, ainda, que ela pode estar subestimada, dado o valor de P_{app} recuperado $<70\%$ (BEDNARCZYK e SANGHVI, 2020).

Os resultados dos ensaios em 498PIno são semelhantes aos resultados de 498PTol. Novamente, o aumento da lipofilicidade gerou uma queda na solubilidade e um aumento ainda mais acentuado no CL, sendo que este último resultado pode estar relacionado com a maior reatividade dos alcinos (BARAGANA et al., 2016; MONS et al., 2019). 498PIno também apresentou boa permeabilidade, ainda mais considerando-se o P_{app} recuperado $<70\%$ (BEDNARCZYK e SANGHVI, 2020). A principal diferença entre 498Pino e 498PTol consiste no maior efeito antiparasitário daquele em relação a este, sendo que 498PIno teve um valor aceitável de pEC_{50} de 7,1 ($EC_{50} = 79 \text{ nM}$) (BARAGANA et al., 2016). Assim, apesar da maior toxicidade em relação a todos os análogos avaliados, o composto alcínico ainda apresentou baixa toxicidade relativa ($(P. falciparum \text{ } pEC_{50}) / (\text{HepG2 } pEC_{50}) = 1,45$, ou seja, HepG2 $EC_{50} \sim 160$ vezes maior do que *P. falciparum* EC_{50}). Acredita-se que a maior toxicidade deste composto possa estar relacionada a reações do alcino com proteínas inespecíficas (MONS et al. 2019). A conversão do alcino a um triazol por *click-chemistry* para síntese de 498PPEG fez com que os resultados de clearance e solubilidade não fossem preocupantes, pois a adição de um espaçante PEG tende a aumentar a solubilidade aquosa do composto e diminuir sua lipofilicidade, o que poderia solucionar os problemas apresentados (BANERJEE et al., 2012).

A adição do espaçante PEG em 498PPEG causou uma redução de 1,9 no *P. falciparum* pEC_{50} de 498PIno (~ 80 vezes considerando-se o EC_{50}) e o composto PEGilado não foi considerado ativo. A permeabilidade também foi considerada abaixo do aceitável (WELLCOME

CENTRE FOR ANTI-INFECTIVES RESEARCH, 2023). Quanto ao HepG2 pEC_{50} , este é menor do que o limite de detecção da metodologia utilizada e isso sugere uma baixa toxicidade do composto. Não foi possível a medição do CL do composto, pois ele não foi detectado no ensaio com a metodologia utilizada. A metodologia da medição da solubilidade também pareceu não ser adequada e não foi possível sua obtenção. De qualquer forma, a falta de atividade do composto e a baixa permeabilidade já inviabilizam seu uso como antimalárico.

O espaçante succínico em 498PPEGMS, que permitiria a ligação final entre 498PPEG e PAMAM G0, levou a um aumento da atividade antimalárica, porém a atividade permaneceu razoavelmente baixa ($pEC_{50} = 6,2$, ou seja, $EC_{50} = 631$ nM). Além disso, 498PPEGMS apresentou a menor permeabilidade e o maior CL de todos os análogos testados, sendo que essa última propriedade pode ser pela fácil metabolização de grupos éster (LAIZURE et al. 2013). Novamente por problemas com a metodologia de medição de solubilidade, essa característica não pode ser avaliada. A partir dos resultados obtidos, 498PPEGMS também não pode ser considerado um antimalárico viável.

Considerando-se as propriedades físico-químicas e biológicas dos compostos avaliados, apenas 498P possui características que o tornam um potencial antimalárico. Todas as outras moléculas avaliadas apresentaram propriedades que inviabilizam seu uso. Além disso, para essa série de compostos, o espaçante PEG parece não ser uma boa escolha pela sua redução na atividade antiparasitária e permeabilidade dos análogos. Também acredita-se que a ligação das moléculas avaliadas ao dendrímero não seria capaz de solucionar todos os problemas apresentados e, assim, essa série de compostos não deve ser uma boa candidata para formação de pró-fármacos dendriméricos.

5. CONCLUSÕES

A avaliação *in silico* da ligação de heparina a PvTRAg36.6, PvTRAg36.6-NS e PvTRAg56.2 trouxe resultados interessantes e promissores. Os *dockings* realizados sugerem uma interação favorável entre o glicosaminoglicano e as proteínas. Dessa forma, a heparina poderia atuar como grupo diretor para eritrócitos infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum*, que são as duas espécies mais prevalentes de malária no mundo (BATTLE et al., 2019; WHO, 2021). Além disso, a relevância do trabalho no contexto brasileiro aumenta, pois o *P. vivax* é o principal agente etiológico da malária no país (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). As dinâmicas moleculares também sugerem uma interação favorável da heparina com as proteínas avaliadas, exceto com os modelos produzidos pelo AlphaFold, uma vez que a energia total nesses casos foi muito superior à energia dos modelos produzidos pelo trRosetta. Além disso, os resultados desses ensaios não convergiram com os resultados do *docking*, particularmente quanto à região de interação entre os dois componentes. Isso pode indicar ligações inespecíficas da heparina com as proteínas, o que reduz sua capacidade como grupo diretor nesse caso. Assim, avaliações *in vitro* devem ser conduzidas para a determinação dessas proteínas como alvos para direcionamento por heparina.

Ao longo do doutorado, entraves nas vias sintéticas planejadas inicialmente foram encontrados, o que exigiu alterações de modo a simplificar a estrutura dos compostos formados. Dificuldades foram observadas especialmente nas etapas de desproteção do

BisMPAP ligado aos fármacos. Por conta disso, uma molécula simplificada, em que a parte dendrímica foi removida, foi planejada e apresentada no Esquema 4. O novo planejamento número reduzido de etapas sintéticas, o que facilita a obtenção do produto desejado, entretanto, não houve tempo suficiente para condução desse projeto por conta do período sanduíche.

Quanto ao período sanduíche, foi possível a adição de espaçante na molécula de mefloquina, porém sua ligação subsequente com o dendrímero de PAMAM se mostrou difícil. Isso levou a uma mudança de sistema e análogos de 498P foram sintetizados tentando incorporar espaçantes em suas estruturas. Dentre as moléculas sintetizadas, apenas a adição de espaçante do tipo PEG foi viável em um derivado alcínico de 498P (498PIno), formando a molécula 498PPEG. Em seguida para a ligação desse derivado com o dendrímero, utilizou-se um derivado succínico, porém, novamente, a ligação com o dendrímero não foi possível. De qualquer forma, a avaliação das características físico-químicas e da atividade biológica dos derivados de 498P mostrou que não são moléculas adequadas como anti-maláricos, seja por baixa atividade, solubilidade ou permeabilidade.

Com isso conclui-se que dendrímeros podem não ser plataformas adequadas para o direcionamento de fármacos a eritrócitos infectados por malária, especialmente por conta das dificuldades sintéticas encontradas ao longo do trabalho.

6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Durante o período, o capítulo escrito com o título *Advances in targeted dendrimers for cancer therapy and challenges for clinical translation* foi publicado no livro *Dendrimer-Based Nanotherapeutics* pela editora Elsevier e pode ser acessado com o seguinte DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821250-9.00003-2>. Outro capítulo de livro com o título “Outros antibióticos” foi publicado no livro *Fundamentos de Química Farmacêutica e Medicinal* pela editora Manole. Por fim, o artigo *Malaria and tuberculosis as diseases of neglected populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs* foi publicado na revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* e pode ser acessado com o DOI: 10.1590/0074-02760200229 .

7. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, J.B. Bonding energy models. *In*: BUSCHOW, K. H. J.; CAHN, R. W.; FLEMINGS, M. C.; ILSCHNER, B.; KRAMER, E. J., MAHAJAN, S., VEYSSIÈRE, P. (Eds.). *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Elsevier, 200. P. 763-767.

AGUIAR, A.C.; SANTOS, R.D.E.M.; FIGUEIREDO, F.J.; CORTOPASSI, W.A.; PIMENTEL, A.S.; FRANÇA, T.C.; MENEGHETTI, M.R.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity and mechanisms of action of two novel 4-aminoquinolines against chloroquine-resistant parasites. *PLoS One*, v.7, p.e37259, 2012.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* v.215, p.403-410, 1990.

ANGELETTI, D.; SANDALOVA, T.; WAHLGREN, M.; ACHOUR, A. Binding of subdomains 1/2 of PfEMP1-DBL1 α to heparan sulfate or heparin mediates *Plasmodium falciparum* rosetting. *PLoS One*, v.10, p. 1-15, 2015.

ANTONY, H.A.; PARIJA, S.C. Antimalarial drug resistance: An overview. *Tropical Parasitology*, v.6, p.30-41, 2016.

ARMAREGO, W.L.F.; CHAI, C. *Purification of laboratory chemicals*. 6 ed. Burlington: Elsevier, 2009.

ARTETA, M.Y.; AINALEM, M.L.; PORCAR, L.; MARTEL, A.; COKER, H.; LUNDBERG, D.; CHANG, D.P.; SOLTWEDEL, O.; BARKER, R.; NYLANDER, T. Interactions of PAMAM dendrimers with negatively charged model biomembranes. *Journal of Physical Chemistry B*, v.118, p.12892-12906, 2014.

ASHLEY, E.A.; RECHT, J.; WHITE, N.J. Primaquine: the risks and the benefits. *Malaria Journal*, v.13, p.418, 2014.

BANERJEE, S.S.; AHER, N.; PATIL, R.; KHANDARE, J. Poly(ethylene glycol)-prodrug conjugates: concept, design, and applications. *J Drug Deliv*, v.2012, p.103973, 2012.

BARAGAÑA, B.; HALLYBURTON, I.; LEE, M.C.; NORCROSS, N.R.; GRIMALDI, R.; OTTO, T.D.; PROTO, W.R.; BLAGBOROUGH, A.M.; MEISTER, S.; WIRJANATA, G.; RUECKER, A.; UPTON L.M.; ABRAHAM, T.S.; ALMEIDA, M.J.; PRADHAN, A.; PORZELLE, A.; LUKSCH, T.; MARTÍNEZ, M.S.; LUKSCH, T.; BOLSCHER, J.M.; WOODLAND, A.; NORVAL, S.; ZUCCOTTO, F.; THOMAS, J.; SIMEONS, F.; STOJANOVSKI, L.; OSUNA-CABELLO, M.; BROCK, P.M.; CHURCHER, T.S.; SALA, K.A.; ZAKUTANSKY, S.E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, M.B.; SANZ, L.M.; RILEY, J.; BASAK, R.; CAMPBELL, M.; AVERY, V.M.; SAUERWEIN, R.W.; DECHERING, K.J.; NOVIYANTI, R.; CAMPO, B.; FREARSON, J.A.; ANGULO-BARTUREN, I.; FERRER-BAZAGA, S.; GAMO, F.J.; WYATT, P.G.; LEROY, D.; SIEGL, P.; DELVES, M.J.; KYLE, D.E.; WITTLIN, S.; MARFURT, J.; PRICE, R.N.; SINDEN, R.E.; WINZELER, E.A.; CHARMAN, S.A.; BEBREVSKA, L.; GRAY, D.W.; CAMPBELL, S.; FAIRLAMB, A.H.; WILLIS, P.A.; RAYNER, J.C.; FIDOCK, D.A.; READ, K.D.; GILBERT, I.H. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature*, v.522, p.315-320, 2015.

BARAGAÑA, B.; NORCROSS, N.R.; WILSON, C.; PORZELLE, A.; HALLYBURTON, I.; GRIMALDI, R.; OSUNA-CABELLO, M.; NORVAL, S.; RILEY, J.; STOJANOVSKI, L.; SIMEONS, F.R.; WYATT, P.G.; DELVES, M.J.; MEISTER, S.; DUFFY, S.; AVERY, V.M.; WINZELER, E.A.; SINDEN, R.E.; WITTLIN, S.; FREARSON, J.A.; GRAY, D.W.; FAIRLAMB, A.H.; WATERSON, D.; CAMPBELL, S.F.; WILLIS, P.; READ, K.D.; GILBERT, I.H. Discovery of a quinoline-4-

carboxamide derivative with a novel mechanism of action, multistage antimalarial activity, and potent *in vivo* efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.59, p.9672-9685, 2016.

BARRAGAN, A.; FERNANDEZ, V.; CHEN, Q.; VON EULER, A.; WAHLGREN, M.; SPILLMANN, D. The duffy-binding-like domain 1 of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. *Blood*, v.95, p. 3594-3599, 2000.

BASAVARAJ, K.N.; BECHRA, H.M.; DERKAR, G.K.; MANVI, F.V.; NANJWADE, V.K. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.38, p.185-196, 2009.

BATTLE, K.E.; LUCAS, T.C.D.; NGUYEN, M.; HOWES, R.E.; NANDI, A.K.; TWOHIG, K.A.; PFEFFER, D.A.; CAMERON, E.; RAO, P.C.; CASEY, D.; GIBSON, H.S.; ROZIER, J.A.; DALRYMPLE, U.; KEDDIE, S.H.; COLLINS, E.L.; HARRIS, J.R.; GUERRA, C.A.; THORN, M.P.; BISANZIO, D.; FULLMAN, N.; HUYNH, C.K.; KULIKOFF, X.; KUTZ, M.J.; LOPEZ, A.D.; MOKDAD, A.H.; NAGHAVI, M.; NGUYEN, G.; SHACKELFORD, K.A.; VOS, T.; WANG, H.; LIM S.S.; MURRAY, C.J.L.; PRICE, R.N.; BAIRD, J.K.; SMITH, D.L.; BHATT, S.; WEISS, D.J.; HAY, S.I.; GETHING, P.W. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. *Lancet*, v.394, p.332-343, 2019.

BEDNARCZYK D, SANGHVI MV. The impact of assay recovery on the apparent permeability, a function of lysosomal trapping. *Xenobiotica*, v.50, p.753-760, 2020.

BEUTNER, G.L.; YOUNG, I.S.; DAVIES, M.L.; HICKEY, M.R.; PARK, H.; STEVENS, J.M.; YE, Q. TCFH-NMI: Direct access to N-Acyl imidazoliums for challenging amide bond formations. *Organic Letters*, v.20, p.4218-4222, 2018.

BEYKI, K.; MAGHSOODLOU, M.T.; HEYDARI, R. Reaction of hydroxyl-quinoline with pentafluoropyridin. *Springerplus*, v.5, p.1996, 2016.

BHAKUNI, R.S.; KAHOL, A.P.; SINGH, T.; KHANUJA, S.P.S. Single-pot conversion of artemisinin to artesunic acid. Estados Unidos da América, Int. Pat., 2004. 5p.

BISIO, A.; URSO, E.; GUERRINI, M.; DE WIT, P.; TORRI, G.; NAGGI, A. Structural characterization of the low-molecular-weight heparin dalteparin by combining different analytical strategies. *Molecules*, v.22, p. E1051, 2017.

BLOLAND, P.B. Drug resistance in malaria. World Health Organization. 2001. Disponível em <https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/drug_resistance/bloland_who2001.pdf>. Acessado em 10/01/2018.

BLONDELLE, S.E.; HOUGHTEN, R.A. Comparison of 55% TFA/CH₂Cl₂ and 100% TFA for Boc group removal during solid-phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide Protein Research*, v.41, p.522-7, 1993.

BOWIE, J.U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, v.253, p.164-170, 1991.

BROSSI, A.; VENUGOPALAN, B.; DOMINGUEZ GERPE, L.; YEY, H.J.; FLIPPEN-ANDERSON, J.L.; BUCHS, P.; LUO, X.D.; MILHOUS, W.; PETERS, W. Arteether, a new antimalarial drug: synthesis and antimalarial properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.31, p.645-50, 1988.

BRUNO, A.; COSTANTINO, G.; SARTORI, L.; RADÌ, M. The *in silico* drug discovery toolbox: applications in lead discovery and optimization. *Current Medicinal Chemistry*, v.26, p.3838-3873, 2019.

BUZZI, S., PRESSER, A., VON FREYHOLD, M. Determining a viable protocol for the derivatisation of artemisinin into dihydroartemisinin and into artesunate. A report commissioned by MMV. 2007. Disponível em <<https://www.mmv.org/newsroom/publications/determining-viable-protocols-derivatisation-artemisinin-dihydroartemisinin-and>>. Último acesso em 8/9/2019.

CAMINADE, A.M.; LAURENT, R.; DELAVAUUX-NICOTA, B.; MAJORAL, J.P. "Janus" dendrimers: syntheses and properties. *New Journal of Chemistry*, v.36, p.217-226, 2012.

CARLMARK, A.; MALMSTRÖM, E.; MALKOCH, M. Dendritic architectures based on bis-MPA: functional polymeric scaffolds for application-driven research. *Chemical Society Reviews*, v.42, p.5858, 2013.

CHAN, J.A.; FOWKES, F.J.; BEESON, J.G. Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.71, p.3633-3657.

CHEN, C. Development of antimalarial drugs and their application in China: a historical review. *Infection Diseases of Poverty*, v.3, p.1-10.9, 2014.

CHOI, Y.; AGARWAL, S.; DEANE, C.M. How long is a piece of loop? *PeerJ*, v.1, p.e1, 2013.

CHONG, W.L.; CHUPRADIT, K.; CHIN, S.P.; KHOO, M.M.; KHOR, S.M.; TAYAPIWATANA, C.; NIMMANPIPUG, P.; THONGKUM, W.; LEE, V.S. Protein-protein interactions: insight from molecular dynamics simulations and nanoparticle tracking analysis. *Molecules*, v.26, p.5696, 2021.

CHOO, K.H.; RANGANATHAN, S. Flanking signal and mature peptide residues influence signal peptide cleavage. *BMC Bioinformatics*, v.9, p.S15, 2008.

CHOTSIRI, P.; ZONGO, I.; MILLIGAN, P.; COMPAORE, Y.D.; SOMÉ, A.F.; CHANDRAMOHAN, D.; HANPITHAKPONG, W.; NOSTEN, F.; GREENWOOD, B.; ROSENTHAL, P.J.; WHITE, N.J.; OUÉDRAOGO, J.B.; TARNING, J. . *Nature Communications*, v.10, p.480, 2019.

CHUNG, M. C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.155-179, 2005.

CHUNG, Y.-I., KIM, J.C., KIM, Y.H., TAE, G., LEE, S.-Y., KIM, K., KWON, I. C. The effect of surface functionalization of PLGA nanoparticles by heparin- or chitosan-conjugated Pluronic on tumor targeting. *Journal of Controlled Release*, v.143, p.374–382, 2010.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

COLOVOS, C.; YEATES, T.O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, v.2, p.1511-1519, 1993.

COPPOLA, G. M. Amberlyst-15, a superior acid catalyst for the cleavage of acetals. *Synthesis*, v.12, p.1021-1023, 1984.

CORTOPASSI, W.A.; OLIVEIRA, A.A.; GUIMARÃES, A.P.; RENNÓ, M.N.; KRETTLI, A.U.; FRANÇA, T.C. Docking studies on the binding of quinoline derivatives and hematin to Plasmodium falciparum lactate dehydrogenase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v.29, p.2017-218,2018? ou 2218?? 2011.

COWMAN, A.F.; CRABB, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, v.12, p.755-766, 2006.

COWMAN, A.F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*, v.167, p.610-624, 2016.

CRABB, B.S.; DE KONING-WARD, T.F.; GILSON, P.R. Protein export in Plasmodium parasites: from the endoplasmic reticulum to the vacuolar export machine. *International Journal of Parasitology*, v.40, p.509-513, 2010.

DENG H, JIA Y, ZHANG Y. Protein structure prediction. *International Journal of Modeling Physics B*, v.32, p. 1840009, 2018.

DEVARAJ, N.K.; FINN, M. G. Introduction: click chemistry. *Chemical Reviews*, v.121, p.6697-8, 2021.

DIGENIS, G.A.; SWINTOSKY, J.V. Drug Latentiation. In: GILLETTE J.R.; MITCHELL J.R. *Concepts in Biochemical Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1975, p.86-112.

DOW, G.; SMITH, B. The blood schizonticidal activity of tafenoquine makes an essential contribution to its prophylactic efficacy in nonimmune subjects at the intended dose (200 mg). *Malaria Journal*, v.16, p.209, 2017.

DUNETZ, J.R.; MAGANO, J.; WEISENBURGER, G.A. Large-scale applications of amide coupling reagents for the synthesis of pharmaceuticals. *Organic Process Research & Development*, v.20, p.140-177, 2016.

ELLINGBOE, J.L.; RUNNELS, J.H. Solubilities of sodium carbonate and sodium bicarbonate in acetone-water and methanol-water mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v.11, p.323-324, 1966.

ESFAND, R.; TOMALIA, D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, v.6, p.427-436, 2001.

FALSAFI-ZADEH, S.; KARIMI, Z.; GALEHDARI, H. VMD DisRg: New User-Friendly Implement for calculation distance and radius of gyration in VMD program. *Bioinformatics*, v.8, p.341-3, 2012.

FANTONI, N. Z.; EL-SAGHEER, A. H.; BROWN, T. A hitchhiker's guide to click-chemistry with nucleic acids. *Chemical Reviews*, v.121, p.7122-7154, 2021.

FELIU, N.; WALTER, M.V.; MONTAÑEZ, M.I.; KUNZMANN, A.; HULT, A.; NYSTRÖM, A.; MALKOCH, M.; FADEEL, B. Stability and biocompatibility of a library of polyester dendrimers in comparison to polyamidoamine dendrimers. *Biomaterials*, v.33, p. 1970-81, 2012.

FISER, A. Template-based protein structure modeling. *Methods in Molecular Biology*. 2010;673:73-94. doi:10.1007/978-1-60761-842-3_6

FLEIGE, E.; QUADIR, M.A.; HAAG, R. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. *Advances in Drug Delivery Reviews*, v.64, p.866-884, 2012.

FORLI, S.; HUEY, R.; PIQUE, M.E.; SANNER, M.F.; GOODSELL, D.S.; OLSON, A.J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols* v.11, p.905-909, 2016.

FRAMPTON, J.E. Tafenoquine: first global approval. *Drugs*, v.78, p.1517-1523, 2018.

FULMER, G. R.; MILLER, A. J. M.; SHERDEN, N. H.; GOTTLIEB, H. E.; NUDELMAN, A.; STOLTZ, B. M.; BERCAW, J. E.; GOLDBERG, K. I. NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics*, v.29, p.2176-2179, 2010.

GAUDIN, K.; LANGLOIS, M.H.; BARBAUD, A.; BOYER, C.; MILLET, P.; FAWAZ, F.; DUBOST, J.P. Stability of artesunate in pharmaceutical solvents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, p.1019-24, 2007.

GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v.939, p.133-138, 2010.

GILBERT, I.H.; NORCROSS, N.; BARAGAÑA RUIBAL, B.; PORZELLE, A. Anti-malarial agents. Depositante: University of Dundee. Procurador: Harrisson Goodard Foote. WO 2013/153357 A1. Depósito: 14 de março de 2013. Concessão: 17 de outubro de 2013. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/WO2013153357A1/en>. Acesso em 11 de janeiro de 2023.

GOGTAY, N.; KANNAN, S.; THATTE, U.M.; OLLIARO, P.L.; SINCLAIR D. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v.10, 2013.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *Journal of Organic Chemistry*, v.62, p.7512-7515, 1997.

GRASSI, L.; REGL, C.; WILDNER, S.; GADERMAIER, G.; HUBER, C.G.; CABRELE, C.; SCHUBERT, M. (2017). Complete NMR Assignment of Succinimide and Its Detection and Quantification in Peptides and Intact Proteins. *Analytical Chemistry*, v.89, p.11962–11970, 2017.

GREGSON, A.; PLOWE, C.V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacological Reviews*, v.57, p.117-145, 2005.

GRELLEPOIS, F.; GRELLIER, P.; BONNET-DELPON, D.; BÉGUÉ, J.P. Design, synthesis and antimalarial activity of trifluoromethylartemisinin-mefloquine dual molecules. *ChemBiochem*, v.6, p. 648-52, 2005.

GUO, N.; JIANG, D.; WANG, L.; YOU, X.; TENG, Y.O.; YU, P. Synthesis and biological evaluation of novel water-soluble poly-(ethylene glycol)-10-hydroxycamptothecin conjugates. *Molecules*, v.20, p.9393-9404, 2015.

GUOQIAO, L.; YING, L.; ZELIN, L.; MEIYI, Z. Artemisinin chemical research. In: GUOQIAO, L.; YING, L.; ZELIN, L.; MEIYI, Z. (Eds.) *Artemisinin-based and other antimalarials*. 1. ed. Londres: Academic Press, 2018. P.129-175.

HAYDAR, M. A. *Degradation of artesunate in aqueous solution*. 2011. Tese de doutorado. School of Pharmacy, Curtin University, Perth, Austrália.

HAYNES, R.K.; CHAN, H.W.; LUNG, C.M.; NG N.C.; WONG, H.N.; SHEK, L.Y.; WILLIAMS, I.D.; CARTWRIGHT, A.; GOMES, M.F. Artesunate and dihydroartemisinin (DHA): unusual decomposition products formed under mild conditions and comments on the fitness of DHA as an antimalarial drug. *ChemMedChem*, v.2, p.1448-63, 2007.

HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTOVTSSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. (2005). Copper(i)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts

unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, v.127, p.210–216, 2005.

HIRANUMA, N.; PARK, H.; BAEK, M.; ANISHCHENKO, I.; DAUPARAS, J.; BAKER, D. Improved protein structure refinement guided by deep learning based accuracy estimation. *Nature Communications*, v.12, p.1340, 2021. P. final?

História DNDi. Disponível em <<https://www.dndi.org/about-dndi/history/>>. Acessado em 01/09/2019.

HOBBS, C.; DUFFY, P. Drugs for malaria: something old, something new, something borrowed. *F1000 Biology Reports*, v.3, p.1-9, 2011.

HOLLINGSWORTH, S.A.; KARPLUS, P.A. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. *Biomolecular Concepts*, v.1, p.271-283, 2010.

HOLLINGSWORTH SA, DROR RO. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, v. 99, p.1129-43, 2018.

HOUNKPATIN, A.B.; KREIDENWEISS, A.; HELD, J. Clinical utility of tafenoquine in the prevention of relapse of Plasmodium vivax malaria: a review on the mode of action and emerging trial data. *Infection and Drug Resistance*, v.12, p.553-570, 2019.

HUTTUNEN, K.M.; RAUNIO, H.; RAUTIO, J. Prodrugs-from serendipity to rational design. *Pharmacology Reviews*, v.63, p.750-771, 2011.

ISMAIL, H.M.; BARTON, V.; PHANCHANA, M.; CHAROENSUTTHIVARAKUL, S.; WONG, M.H.; HEMINGWAY, J.; BIAGINI, G.A.; O'NEILL, P.M.; WARD, S.A. Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites Plasmodium falciparum 3D7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.113, p.2080-2085, 2016.

ISMAIL, M. M.; ABASS, M. Chemistry of Substituted Quinolinones IV. Regioselective Nucleophilic Substitution of 1,3-Dichlorobenzo[f]quinoline. *Polycyclic Aromatic Compounds*, v.18, p.469-480, 2001.

JAYAPRAKASH, S.; ISO, Y.; WAN, B.; FRANZBLAU, S.G.; KOZIKOWSKI, A.P. Design, synthesis, and SAR studies of mefloquine-based ligands as potential antituberculosis agents. *ChemMedChem*, v.1, p.593-597, 2006.

JUILLERAT, A.; IGONET, S.; VIGAN-WOMAS, I.; GUILLOTTE, M.; GANGNARD, S.; FAURE, G.; BARON, B.; RAYNAL, B.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BENTLEY, G.A. Biochemical and biophysical characterisation of DBL1 α 1-varO, the rosetting domain of PfEMP1 from the VarO line of Plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.170, p.84-92, 2010.

JUILLERAT, A.; LEWIT-BENTLEY, A.; GUILLLOTTE, M.; GANGNARD, S.; HESSEL, A.; BARON, B.; VIGAN-WOMAS, I.; ENGLAND, P.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BENTLEY G.A. Structure of a *Plasmodium falciparum* PfEMP1 rosetting domain reveals a role for the N-terminal segment in heparin-mediated rosette inhibition. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.108, p.5243-5248, 2011.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S.A.A.; BALLARD, A.J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, A.W.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v.596, p.583-589, 2021.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E.L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, v.35, p.W429-W432, 2007.

KARAMAN R. Prodrugs design based on inter- and intramolecular chemical processes. *Chemical Biology & Drug Design*, v.82, p.643-668, 2013.

KIRSCHNER, K.N.; YONGYE, A.B.; TSCHAMPEL, S.M.; GONZÁLEZ-OUTEIRIÑO, J.; DANIELS, C.R.; FOLEY, B.L.; WOODS, R.J. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. Journal of Computational Chemistry*, v.29, p.622-655, 2008.

KLEYWEGT, G.J.; JONES, T.A. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, v.4, p.1395-1400, 1996.

KOVACS, H.; MOSKAU, D. Cryogenic NMR Probes. *In: ROBERTSs, G.C.K. (Eds.) Encyclopedia of Biophysics*. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013.

GUOQIAO, L.; YING, L.; ZELIN, L.; MEIYI, Z. Artemisinin chemical research. *In: GUOQIAO, L.; YING, L.; ZELIN, L.; MEIYI, Z. (Eds.) Artemisinin-based and other antimalarials*. 1. ed. Londres: Academic Press, 2018. P.129-175.

KUHLMAN, B.; BRADLEY, P. Advances in protein structure prediction and design. *Nature Review of Molecular Cell Biology*, v.20, p.681-697, 2019.

KRISTIANI, A.; PERTIWI, R.; ADILINA, I. B. Hydrogenation of artemisinin to dihydroartemisinin over heterogeneous metal catalysts. *AIP Conference Proceedings*, v.1803, 2017. doi:10.1063/1.4973174

LAIZURE, S.C.; HERRING, V.; HU, Z.; WITBRODT, K.; PARKER, R.B. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy*, v.33, p.210-222, 2013.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v.26, p.283-291, 1993.

LETSINGER, R.L.; OGILVIE, K.K. Use of p-nitrophenyl chloroformate in blocking hydroxyl groups in nucleosides. *Journal of Organic Chemistry* v.32, p.296-300, 1967.

LI, Y. Qinghaosu (artemisinin): chemistry and pharmacology. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.33, p.1141-1146, 2012.

LI, Z.; JAROSZEWSKI, L.; IYER, M.; SEDOVA, M.; GODZIK, A. FATCAT 2.0: towards a better understanding of the structural diversity of proteins. *Nucleic Acids Research*, v.48, p.W60-W64, 2020.

LUO, X.-D.; YEH, H.J.C.; BROSSI, A.; FLIPPEN-ANDERSON, J.L. GILLARDI, R. The chemistry of drugs part IV, Configurations of antimalarials derived from qinghaosu: Dihydroqinghaosu, artemether, and artesunic acid. *Helvetica Chimica Acta*, v.67, p.1515-1522, 1984.

LÜTHY, R.; BOWIE, J.U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, v.356, p.83-85, 1992.

MARCONI, W.; BENVENUTI, F.; PIOZZI, A. Covalent bonding of heparin to a vinyl copolymer for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 18, p. 885-890, 1997.

MARQUES, J.; VALLE-DELGADO, J.J.; URBÁN, P.; BARÓ, E.; PROHENS, R; MAYOR, A.; CISTERÓ, P.; DELVES, M.; SINDEN, R.E.; GRANDFILS, C.; DE PAZ J.L.; GARCÍA-SALCEDO, J.A.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. Adaptation of targeted nanocarriers to changing requirements in antimalarial drug delivery. *Nanomedicine*, v.13, p. 515-525, 2017.

MARTÍNEZ, L. Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. *PLoS One*, v.10, p.e0119264, 2015.

MAHTARIN, R.; ISLAM, S.; ISLAM, M.J.; ULLAH, M.O.; ALI, M.A.; HALIM, M.A. Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*, p.1-14, 2020.

MCQUEEN, A.; BLAKE, L.D.; AZHARI, A.; KEMP, M.T.; MCGAHA, T.W.JR.; NAMELIKONDA, N.; LARSEN, R.W.; MANETSCH, R.; KYLE, D.E. Synthesis, characterization, and cellular localization of a fluorescent probe of the antimalarial 8-aminoquinoline primaquine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.27, p.4597-4600, 2017.

MCCARTHY, J.S.; YALKINOGLU, Ö.; ODEDRA, A.; WEBSTER, R.; OEUVRAY, C.; TAPPERT, A.; BEZUIDENHOUT, D.; GIDDINS, M.J.; DHINGRA, S.K.; FIDOCK, D.A.; MARQUART, L.; WEBB, L.; YIN, X.; KHANDELWAL, A.; BAGCHUS, W.M. Safety, pharmacokinetics, and antimalarial activity of the novel plasmodium eukaryotic translation elongation factor 2 inhibitor

M5717: a first-in-human, randomised, placebo-controlled, double-blind, single ascending dose study and volunteer infection study. *Lancet Infectious Diseases*, v.21, p.1713-1724, 2021.

MEDICINES FOR MALARIA VENTURE. GSK submits US regulatory application for single-dose tafenoquine for *Plasmodium vivax* malaria, 2017. Disponível em <<https://www.mmv.org/newsroom/press-releases/gsk-submits-us-regulatory-application-single-dose-tafenoquine-plasmodium>>. Acesso em 06/02/2018.

MEDICINES FOR MALARIA VENTURE. MMV's pipeline of antimalarial drugs, 2022. Disponível em <<https://www.mmv.org/research-development/mmvs-pipeline-antimalarial-drugs>>. Acesso em 25/10/2022.

MICHEL F. SANNER. Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v.17, p.57-61, 1999.

MIURA, Y.; AOYAGI, S.; KUSADA, Y.; MIYAMOTO, K. The characteristics of anticoagulation by covalently immobilized heparin. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.14, p.619-630, 1980.

MIYAJIMA, N.; SUZUKI, A. Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, v.19, p.866-867, 1979.

MONS, E.; JANSEN, I.D.C.; LOBODA, J.; VAN DOODEWAERD, B.R.; HERMANS, J.; VERDOES, M.; VAN BOECKEL, C.A.A.; VAN VEELLEN, P.A.; TURK, B.; TURK, D.; OVAA, H. The alkyne moiety as a latent electrophile in irreversible covalent small molecule inhibitors of cathepsin K. *J Am Chem Soc*, v.141, p.3507-3514, 2019.

MURUGESAN, S.; XIE, J.; LINHARDT, R.J. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.8, p.80-100, 2008.

NAKANISHI, M.; PARK, J.-S.; JANG, W.-D.; OBA, M.; KATAOKA, K. Study of the quantitative aminolysis reaction of poly(β -benzyl L-aspartate) (PBLA) as a platform polymer for functionality materials. *Reactive and Functional Polymers*, v.67, p.1361-1372, 2007.

NDIAYE, J.L.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; SAGARA, I.; BRASSEUR, P.; NDIAYE, I.; FAYE, B.; RANDRIANASOLO, L.; RATSIMBASOA, A.; FORLEMU, D.; MOOR, V.A.; TRAORE, A.; DICKO, Y.; DARA, N.; LAMEYRE, V.; DIALLO, M.; DJIMDE, A.; SAME-EKOBO, A.; GAYE, O. Randomized, multicentre assessment of the efficacy and safety of ASAQ--a fixed-dose artesunate-amodiaquine combination therapy in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria Journal*, v.8, p.1-12, 2009.

NJOGU, P.M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; CHIBALE, K. Design, synthesis, and antiplasmodial activity of hybrid compounds based on (2R,3S)-N-Benzoyl-3-phenylisoserine. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v.4, p.637-41, 2013.

NOSTEN, F.; WHITE N.J. Artemisinin-based combination treatment of *Falciparum* malaria. In: BREMAN, J.G.; ALILIO, M.S.; WHITE, N.J. (Eds). Defining and defeating the intolerable burden of malaria III: progress and perspectives. Supplement to Volume 77(6) of *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Northbrook (IL): *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007.

NUDELMAN, N.S. SNAr Reactions of Amines in Aprotic Solvents. In: RAPPOPORT, Z.; PATAI, S. (Eds.) *The Chemistry of Amino, Nitroso, Nitro and Related Groups*. John Wiley & Sons, Ltd. 1996.

NUMMELIN, S.; SELIN, M.; LEGRAND, S.; ROPPONEN, J.; SEITSONEN, J.; NYKÄNEN, A.; KOIVISTO, J.; HIRVONEN, J.; KOSTIAINEN, M.A.; BIMBO, L.M. Modular synthesis of self-assembling Janus-dendrimers and facile preparation of drug-loaded dendrimersomes. *Nanoscale*, v.9, p7189-7198, 2017.

OLECHNOVIČ, K.; MONASTYRSKY, B.; KRYSHTAFOVYCH, A.; VENCLOVAS, Č. Comparative analysis of methods for evaluation of protein models against native structures. *Bioinformatics*, v.35, p.937-44, 2019.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUILL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v.9, p.115, 2010.

O'NEILL, P.M.; BARTON, V.E.; WARD, S.A. The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules*, v.15,1705-1721, 2010.

PARAPINI, S.; OLLIARO, P.; NAVARATNAM, V.; TARAMELLI, D.; BASILICO, N. Stability of the antimalarial drug dihydroartemisinin under physiologically relevant conditions: implications for clinical treatment and pharmacokinetic and in vitro assays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.59, p.4046-52, 2015.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S.; STOJANOVSKI, L.; PERRY, M.R.; SIMEONS, F.R.; NORVAL, S.; OSUNA-CABELLO, M.; DE RYCKER, M.; READ, K.D.; FAIRLAMB, A.H. The R enantiomer of the antitubercular drug PA-824 as a potential oral treatment for visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.57, p.4699-706, 2013.

PATHAK, K.A.; JAIN, D.C.; SHARMA, R.P. ¹³C NMR Assignments of α - and β -Dihydroartemisinin. *Indian Journal of Chemistry*, v.34B, p.992, 1995.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. *Introduction to spectroscopy*. 4. ed. Belmont: Brooks/Cole, 2009.

PHILLIPS, M.A.; BURROWS, J.N.; MANYANDO, C.; VAN HUIJSDUIJNEN, R.H.; VAN VOORHIS, W.C.; WELLS, T.N.C. Malaria. *Nat Rev Dis Primers*, v.3, p.17050, 2017.

PINZI L, RASTELLI G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci*, v.20, p.4331, 2019.

Portfolio DNDi December 2019. Disponível em <<https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/>>. Acessado em 03/05/2020.

PRESSER, A.; FEICHTINGER, A.; BUZZI, S. A simplified and scalable synthesis of artesunate. *Monatsh Chemistry*, v.148,p.63-68, 2017.

Protein Data Bank. Pairwise structure alignment, 2022. Disponível em <<https://www.rcsb.org/docs/tools/pairwise-structure-alignment>> Acesso em 13/12/2022.

PYBUS, B.S.; MARCSISIN, S.R.; JIN. X.; DEYE, G.; SOUSA, J.C.; LI, Q.; CARIDHA, D.; ZENG, Q.; REICHARD, G.A.; OCKENHOUSE, C.; BENNETT, J.; WALKER, L.A.; OHRT, C.; MELENDEZ, V. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malaria Journal*, v.12, p.212, 2013.

RAHIMI, B.A.; THAKKINSTIAN, A.; WHITE, N.J.; SIRIVICHAYAKUL, C.; DONDORP, A.M.; CHOKEJINDACHAI, W. Severe *vivax* malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malaria Journal*, v.13, p.481, 2014.

ROBERTS, L. Drug resistance triggers war to wipe out malaria in the Mekong region. 2016. *Science*. Disponível em <<http://www.sciencemag.org/news/2016/04/drug-resistance-triggers-war-wipe-out-malaria-mekong-region>>. Acessado em 17/01/2018.

SANCHES, B.M.A. *Pró-fármacos de rosuvastatina de maior solubilidade em água*. 2019. Dissertação de mestrado em Insumos Farmacêuticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SAITO, A.; HIZUKURI, Y.; MATSUO, E.; CHIBA, S.; MORI, H.; NISHIMURA, O.; ITO, K.; AKIYAMA, Y. Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. *Proceedings of National Academy of Science U S A*, v.108, p.13740-13745, 2011.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Frontiers in Pharmacology*, v.9, p.923, 2018

SAMMET, B. 4-Nitrophenyl chloroformate: a versatile coupling reagent. *Synlett*, v.2009, p.3050–3051, 2009.

SANTOS, S.S. *Antichagásicos e leishmanicidas potenciais: estudo das condições de síntese de pró-fármacos dendriméricos de 3-hidroxi-flavona*. 2016. Tese de doutorado em Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, S.S; FERREIRA, E.I.; GIAROLLA J. Dendrimer prodrugs. *Molecules*, v. 21, p. E686, 2016.

SETHI, A.; JOSHI, K.; SASIKALA, K.; ALVALA M. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. In: GAITONDE, V.; KARMAKAR, P.; TRIVEDI, A. (org.). *Drug discovery and development - new advances*. London, UK: IntechOpen; 2020. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/67939>. Acesso em 26 ago. 2021.

SICILIANO, G.; ALANO, P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent Plasmodium in fundamental and applied research. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.391, 2015.

SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. Advances in prodrug design. *Mini-Review in Medicinal Chemistry*, v.5, p.893-914, 2005.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X., KIEMLE, D.J. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

SINGH, C.; CHAUDHARY, S.; PURI, S.K. Orally active esters of dihydroartemisinin: Synthesis and antimalarial activity against multidrug-resistant *Plasmodium yoelii* in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, p.1436-41, 2008.

SHRIVER, Z.; CAPILA, I.; VENKATARAMAN, G.; SASISEKHARAN, R. Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handbook of experimental pharmacology*, v.207, p.159-176, 2012.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular Biochemistry Parasitology*, v.58, p.283-292, 1993.

ST JEAN, P.L.; XUE, Z.; CARTER, N.; KOH, G.C.; DUPARC, S.; TAYLOR, M.; BEAUMONT, C.; LLANOS-CUENTAS, A.; RUEANGWEERAYUT, R.; KRUDSOOD, S.; GREEN, J.A.; RUBIO, J.P. Tafenoquine treatment of Plasmodium vivax malaria: suggestive evidence that CYP2D6 reduced metabolism is not associated with relapse in the Phase 2b DETECTIVE trial. *Malaria Journal*, v.18, p.97, 2016.

STRICKER, T.; BONNER, R.; LISACEK, F.; HOPFGARTNER, G. Adduct annotation in liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry to enhance compound identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.413, p.503-517, 2021.

SUN, J.; DONG, Y.; CAO, L.; WANG, X.; WANG, S.; HU, Y. Highly efficient chemoselective deprotection of O,O-acetals and O,O-ketals catalyzed by molecular iodine in acetone. *The Journal of Organic Chemistry*, v.69, p.8932-8934, 2004.

SY, L-K; HUI, S-M; CHEUNG, K-K, BROWN G. D. A rearranged hydroperoxide from the reduction of artemisinin. *Tetrahedron*, v.53, p.7493-7500, 1997.

TARNING, J. Optimal dosing of dihydroartemisinin-piperaquine for seasonal malaria chemoprevention in young children. *Nature Communication*, v.10, p.480, 2019.

THANH, V.M.; NGUYEN, T.H.; TRAN, T.V.; NGOC, U.P.; HO M.N.; NGUYEN, T.T.; CHAU, Y.N.T.; LE, V.T.; TRAN, N.Q.; NGUYEN, C.K.; NGUYEN, D.H. Low systemic toxicity nanocarriers fabricated from heparin-mPEG and PAMAM dendrimers for controlled drug release. *Material Science and Engineering C*, v.82, p.291-298, 2018.

THU, A.M.; PHYO, A.P.; LANDIER, J.; PARKER, D.M.; NOSTEN, F.H. Combating multidrug--resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *The Febs Journal*, v.284, p.2569-2578, 2017.

TOMALIA, D.A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules*, v.19, p.2466-2468, 1986.

TSAKOS, M.; SCHAFFERT, E.S.; CLEMENT, L.L.; VILLADSEN, N.L.; POULSEN, T.B. Ester coupling reactions – an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products. *Natural Product Reports*, v.32, p.605-632, 2015.

TSE, E.G.; KORSIK, M; TODD, M.H. The past, present and future of anti-malarial medicines. *Malar J*, v.18, p.93, 2019.

TSHEPELEVITSH, S.; KÜTT, A.; LÖKOV, M.; KALJURAND, I.; SAAME, J.; HEERING, A.; PLIEGER, P.G.; VIANELLO, R.; LEITO, I. On the basicity of organic bases in different media. *European Journal of Organic Chemistry*, v.2019, p.6735-6748, 2019.

TYAGI, K.; HOSSAIN, M.E.; THAKUR, V.; AGGARWAL, P.; MALHOTRA, P.; MOHMMED, A.; SHARMA, Y.D. *Plasmodium vivax* Tryptophan Rich Antigen PvTRAg36.6 interacts with PvETRAP and PvTRAg56.6 interacts with PvMSP7 during erythrocytic stages of the parasite. *Plos One*, v.11, p.e0151065, 2016.

VALECHA, N.; SRIVASTAVA, B.; DUBHASHI, N.G.; RAO, B.H.; KUMAR, A.; GHOSH, S.K.; SINGH, J.P.; KIECHEL, J.R.; SHARMA, B.; JULLIEN, V.; DASH, A.P.; TAYLOR, W.R.; ANVIKAR, A.R. Safety, efficacy and population pharmacokinetics of fixed-dose combination of artesunate-mefloquine in the treatment of acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in India. *Journal of Vector Borne Diseases*, v.50, p. 258-264, 2013.

VALLE-DELGADO, J.J.; URBÁN, P.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. Demonstration of specific binding of heparin to *Plasmodium falciparum*-infected vs. non-infected red blood cells by single-molecule force spectroscopy. *Nanoscale*, v.7, p.3673-3680, 2013.

VARADI, M.; ANYANGO, S.; DESHPANDE, M.; NAIR, S.; NATASSIA, C.; YORDANOVA, G.; YUAN, D.; STROE, O.; WOOD, G.; LAYDON, A.; ŽÍDEK, A.; GREEN, T.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; PETERSEN, S.; JUMPER, J.; CLANCY, E.; GREEN, R.; VORA, A.;

LUTFI, M.; FIGURNOV, M.; COWIE, A.; HOBBS, N.; KOHLI, P.; KLEYWEGT, G.; BIRNEY, E.; HASSABIS, D.; VELANKAR, S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, v.50, p.D439-D444, 2022.

VOGT, A.M.; PETTERSSON, F.; MOLL, K.; JONSSON, C.; NORMARK, J.; RIBACKE, U.; EGWANG, T.G.; EKRE, H.P.; SPILLMANN, D.; CHEN, Q.; WAHLGREN, M. Release of sequestered malaria parasites upon injection of a glycosaminoglycan. *PLoS Pathogen*, v.2, e.100, 2006.

VOLLHARDT, K.P.C.; SCHORE, N.E. *Organic Chemistry - structure and function*. 5. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2007.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, v.38, p.606-631, 2009.

VSANTELL, A.C.; RIBEIRO, I.; DAHER, A.; BOULOS, M.; MARCHESINI, P.B.; DOS SANTOS, R.L.; LUCENA, M.B.; MAGALHÃES, I.; LEON, A.P.; JUNGER, W.; LADISLAU, J.L. Effect of artesunate-mefloquine fixed-dose combination in malaria transmission in Amazon basin communities. *Malaria Journal*, v.11, p.286, 2012.

WANG, J.; XU, C.; WONG, Y.K.; LI, Y.; LIAO, F.; JIANG, T.; TU, Y. Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine. *Engineering*, v.5, p.32-39, 2019.

WANG, J.; ZHANG, C.J.; CHIA, W.N.; LOH, C.C.; LI, Z.; LEE, Y.M.; HE, Y.; YUAN, L.X.; LIM, T.K.; LIU, M.; LIEW, C.X.; LEE, Y.Q.; ZHANG, J.; LU, N.; LIM, C.T.; HUA, Z.C.; LIU, B.; SHEN, H.M.; TAN, K.S.; LIN, Q. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, v.6, p.10111, 2015.

WELLCOME CENTRE FOR ANTI-INFECTIVES RESEARCH (WCAIR). How to perform the MDCK Permeability experiment in drug discovery. YouTube, 13 de fevereiro de 2023. Disponível em <<https://www.youtube.com/watch?v=YopZNE7pFKA&t=1667s>>. Acesso em 16 de março 2023

WHITE, N.J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical Infectious Diseases*, v.46, p.172-173, 2008.

WHITE, N.J.; HIEN, T.T.; NOSTEN, F.H. A brief history of Qinghaosu. *Trends in Parasitology*, v.31, p.607-610, 2015.

WOODROW, C.J.; WHITE, N.J. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread. *FEMS Microbiology Reviews*, v.41, p.34-48, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION MALARIA ACTION PROGRAM. Severe and complicated malaria. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, p.3-50, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for the treatment of malaria*. WHO; 3rd edition Geneva: 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for malaria*. WHO; v2.0, Geneva. 2021. Disponível em: <https://app.magicapp.org/#/guideline/5438>. Acessado em 26 ago. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World Malaria Report 2019*. WHO; Geneva: 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Information for travellers. Disponível em: <https://www.who.int/malaria/travellers/en/>. Acessado em 27/01/2020. a

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria fact sheet. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. Acessado em 09/03/2020. b

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disease information. Disponível em <http://www.who.int/ith/diseases/malaria/en/>. Acessado em 04/03/2020. c

WU, F.; XU, J. Deep template-based protein structure prediction. *PLoS Computational Biol*, v.17, p.e1008954, 2021.

XU, J; ZHANG, Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*, v.26, p.889-895, 2010.

YAKATAN, G.J.; FAN, T. Kinetics of Hydrolysis of Succinimides. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.3, p.315-338, 1977.

YANG, H.; KAO, W.J. Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, v.17, p. 3-19, 2006.

YANG, J.; ANISHCHENKO, I.; PARK, H.; PENG, Z.; OVCHINNIKOV, S.; BAKER, D. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations. *Proceedings of National Academy of Science U S A*, v.117, p.1496-1503, 2020.

YE, Y.; GODZIK, A. Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twists. *Bioinformatics*. v.19(Suppl 2), p.ii246-ii255, 2003.

YE, Y; GODZIK, A. FATCAT: a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching. *Nucleic Acids Res*, v.32, p.W582-5, 2004.

YOSHIDA, K.; DOI, Y.; IWAZAKI, N.; YASUHARA, H.; IKENAGA, Y.; SHIMIZU, H.; NAKADA, T.; WATANABE, T.; TATENO, C.; SANOH, S.; KOTAKE, Y. Prediction of human pharmacokinetics for low-clearance compounds using pharmacokinetic data from chimeric mice with humanized livers. *Clin Transl Sci*, v.15, p.79-91, 2022.

YOUSEFI, M.; NARMANI, A.; JAFARI, S.M. Dendrimers as efficient nanocarriers for the protection and delivery of bioactive phytochemicals. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.278, p.102125, 2020.

YUTHAVONG, Y. Basis for antifolate action and resistance in malaria. *Microbes and Infection*, v.4, p. 175-182, 2002.

ZAWILSKA, J.B.; WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, A.B. Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacology Reports*, v. 65, p.1-14, 2013.

ZEESHAN, M.; TYAGI, R.K.; TYAGI, K.; ALAM, M.S.; SHARMA, Y.D. Host-parasite interaction: selective Pv-fam-a family proteins of *Plasmodium vivax* bind to a restricted number of human erythrocyte receptors. *Journal of Infectious Diseases*, v.211, p.1111–1120, 2014.

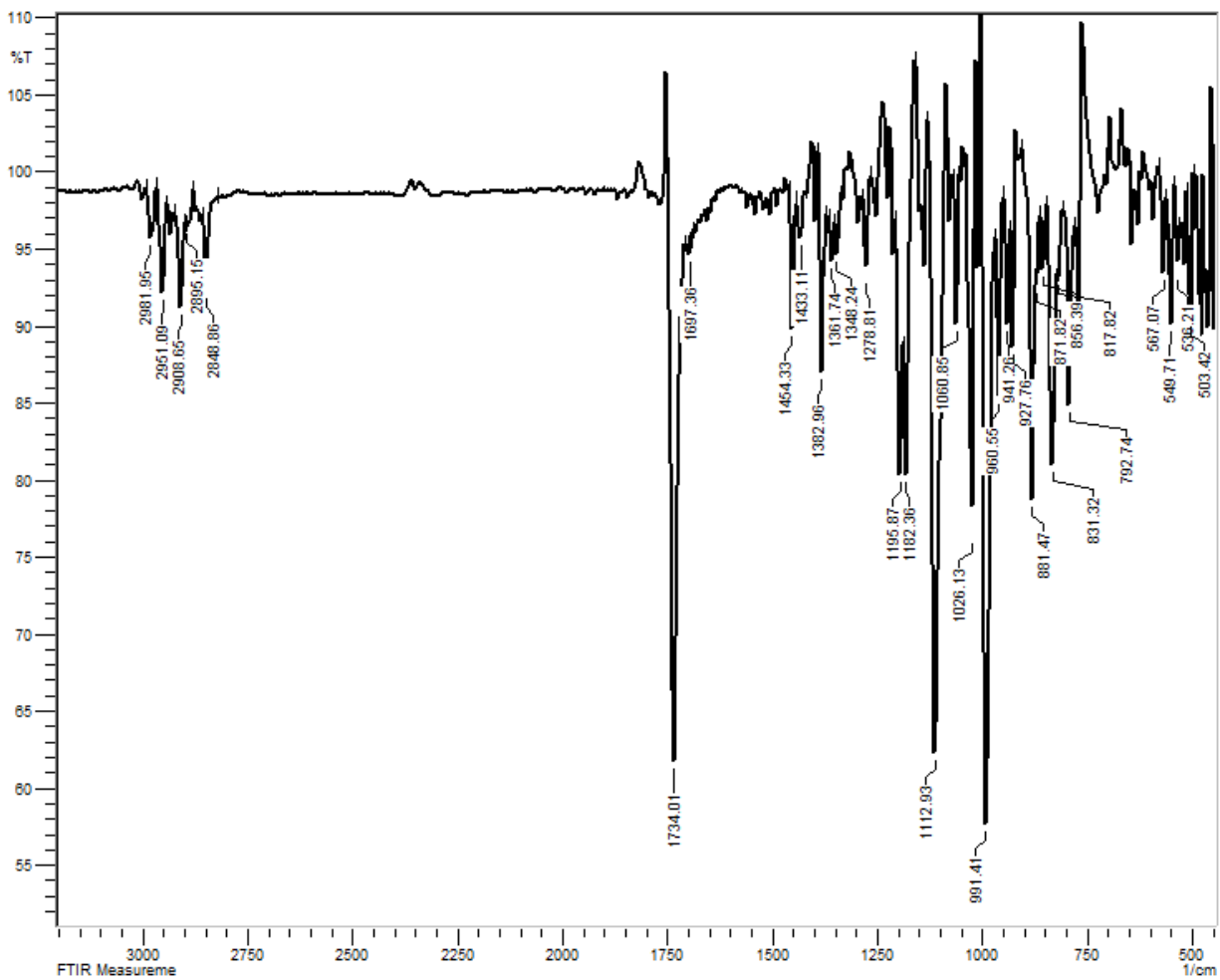
ZHANG, R.; LEE, W.C.; LAU, Y.L.; ALBRECHT, L.; LOPES, S.C.; COSTA, F.T.; SUWANARUSK, R.; NOSTEN, F.; COOKE, B.M.; RÉNIA, L.; RUSSELL, B. Rheopathologic consequence of *Plasmodium vivax* rosette formation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.10, p.e0004912, 2016.

ZHANG Y. Protein structure prediction: when is it useful? *Curr Opin Struct Biol*, v.19, p.145-55, 2009.

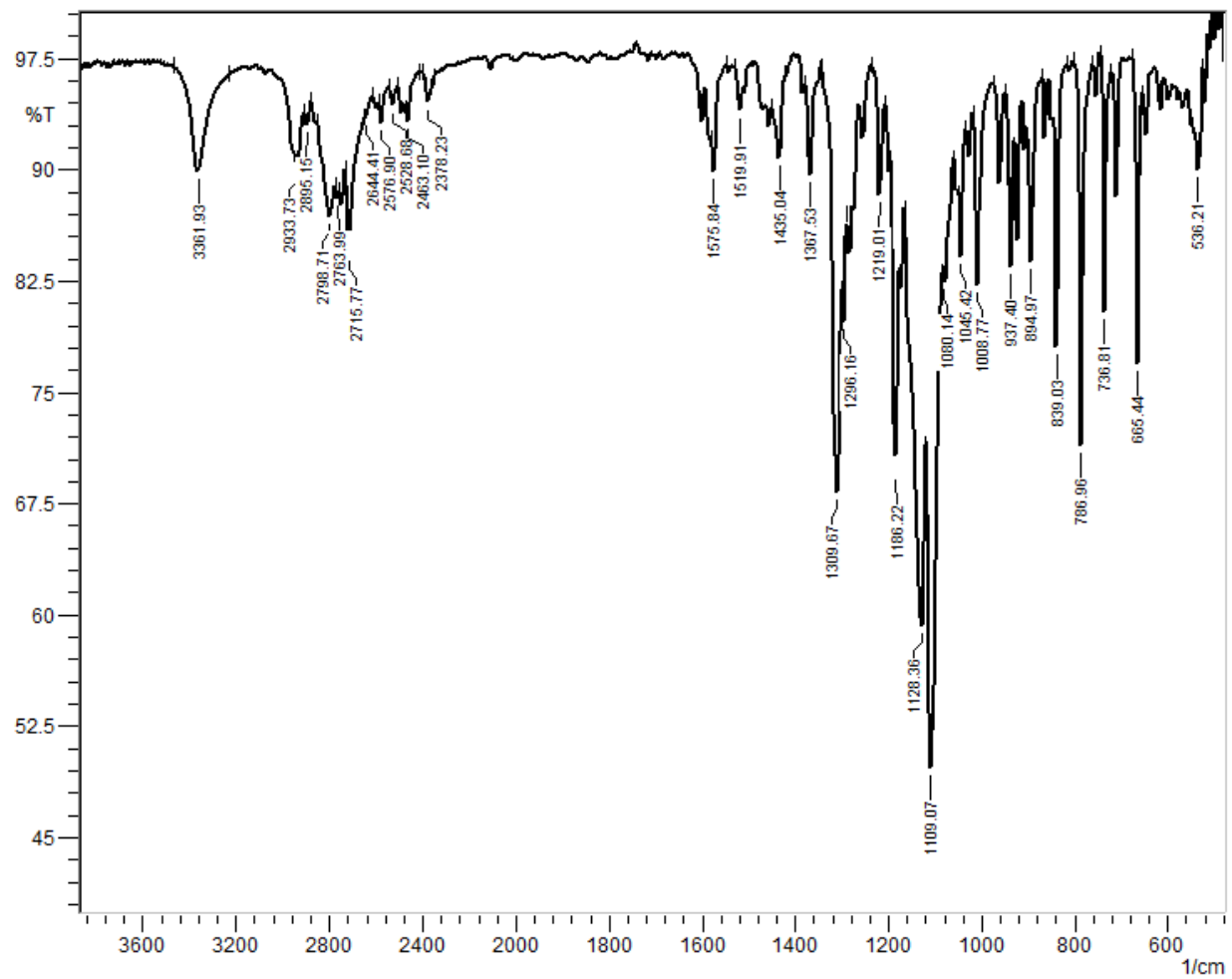
ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins*, v.57, p.702-10, 2004.

ZUMA, N.H.; SMIT, F.J.; DE KOCK, C.; COMBRINCK, J.; SMITH, P.J.; N'DA, D.D. Synthesis and biological evaluation of a series of non-hemiacetal ester derivatives of artemisinin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.122, p.635-646, 2016.

10. APÉNDICE



Espectro 1: Espectro de IV da artemisinina utilizada como material de partida.



Espectro 2: Espectro de IV da mefloquina utilizada como material de partida.

11. FICHA DO ALUNO

4/27/23, 4:02 PM

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9138 - 7189571/1 - Luccas Missfeldt Sanches

Email: luccas.sanches@usp.br
Data de Nascimento: 24/02/1993
Cédula de Identidade: RG - 37.663.512-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Moleculares - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2015
Graduação: Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2018

Curso: Doutorado Direto
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 08/05/2018
Início da Contagem de Prazo: 08/05/2018
Data Limite para o Depósito: 08/05/2023
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 08/05/2018 até o presente. Email: hajudan@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 08/05/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/06/2020
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 08/05/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2023

Impresso em: 27/04/2023 16:01:24

4/27/23, 4:02 PM

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9138 - 7189571/1 - Luccas Missfeldt Sanches

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-4/1	Tópicos Gerais de Fármacos e Medicamentos	02/08/2018	14/11/2018	45	3	92	A	N	Concluída
PEA5900-4/4	Tecnologia de Ensino de Engenharia (Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)	12/09/2018	19/12/2018	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5826-2/1	Relações entre Estrutura Química e Atividade Biológica de Compostos Bioativos e Fármacos	18/09/2018	13/12/2018	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5704-7/2	Análise Espectrométrica de Fármacos	11/03/2019	23/06/2019	150	10	100	A	N	Concluída
FBT5700-4/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	05/04/2021	06/06/2021	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	35
Estágios:			
Total:	0	25	35

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2023

Impresso em: 27/04/2023 16:01:24

about:blank

2/2

12. CURRÍCULO LATTES

4/27/23, 5:14 PM

Currículo Lattes

Imprimir
currículo**Luccas Missfeldt Sanches**Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/7106179963143092>

Última atualização do currículo em 27/04/2023

Resumo informado pelo autor

Bacharel pelo Curso de Ciências Moleculares da Universidade de São Paulo (2011-2015) e Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade de São Paulo (FCF-USP). Entre 2013 e 2016, conduziu iniciação científica no Laboratório de Biocolóides IQUSP, permitindo ganhar experiência na área de síntese e caracterização de nanopartículas antimicrobianas, além de microbiologia. O trabalho levou a desdobramentos que permitiram experiência na formação de filmes antimicrobianos. Atualmente é aluno de Doutorado Direto na área de Insumos Farmacêuticos do programa de Fármaco e Medicamentos da FCF-USP. O Projeto em andamento consiste na síntese de dendrímeros e dendrons direcionados a eritrócitos infectados por Plasmodium por derivados de heparina, moléculas que serão responsáveis por carregar mefloquina e/ou artesunato (fármacos atualmente utilizados no tratamento da malária), utilizando princípios de latência. Os resultados poderiam levar a um aumento da eficácia terapêutica do tratamento da malária e auxiliar no combate a resistência à fármacos pelo Plasmodium. Realizou entre jan/2022 e out/2022 um doutorado sanduíche no Wellcome Centre for Anti-Infective na Universidade de Dundee e no Reino Unido

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Luccas Missfeldt Sanches

Dados pessoais

Nascimento 24/02/1993 - Brasil

CPF 420.944.868-00

Formação acadêmica/titulação

- 2018** Doutorado em Fármaco e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
com período sanduíche em University of Dundee (Orientador: Cedric Stephan Graebin)
Título: Antimaláricos potencialmente ativos em resistência: planejamento e síntese de dendrons e dendrímeros dirigidos a eritrócitos infectados
Orientador: Elizabeth Igne Ferreira
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2015 - 2018** Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Nanopartículas híbridas de polimetacrilato (PMMA) e citoreto de poli(dialdimetilamônio) (PDDA) - síntese, caracterização, atividade antimicrobiana e formação de filmes
Orientador: Ana Maria Carmoã Ribeiro
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2011 - 2015** Graduação em Ciências Moleculares.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Nanopartículas híbridas de polimetacrilato (PMMA) e citoreto de poli(dialdimetilamônio) (PDDA) - síntese, caracterização, atividade antimicrobianas
Orientador: Ana Maria Carmoã-Ribeiro
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 - 2010** Ensino Médio (2o grau) .
Colégio Poliedro, CP, Brasil, Ano de obtenção: 2010

Atuação profissional

- Instituto de Química-USP - IQUSP

Vínculo Institucional

- 2013 - 2016** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de Iniciação Científica, Regime: Parcial
- Universidade de São Paulo - USP







**Vínculo
Institucional**

2018 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de doutorado, Regime: Dedicção exclusiva

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.  Araújo, R.V.; Santos, S. S.; SANCHES, L. M.; Glarolla, J.; Beoud, O. E.; Ferreira, E. I. Malaria and Tuberculosis as Diseases of Neglected Populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs. MEMORIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.  v.115, p.e200229 - , 2020.
2.  GALVÃO, CAROLINA; SANCHES, LUCCAS; MATHIAZZI, BEATRIZ; RIBEIRO, RODRIGO; PETRI, DENISE; CARMONA-RIBEIRO, ANA. Antimicrobial Coatings from Hybrid Nanoparticles of Biocompatible and Antimicrobial Polymers. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES.  v.19, p.2965 - , 2018.
3.  SANCHES, LUCCAS MISSFELDT; PETRI, DENISE FREITAS SIQUEIRA; DE MELO CARRASCO, LETÍCIA DIAS; CARMONA-RIBEIRO, ANA MARIA. The antimicrobial activity of free and immobilized poly (diallyldimethylammonium) chloride in nanoparticles of poly (methylmethacrylate). JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY.  v.13, p.58 - , 2015.

Capítulos de livros publicados

1. SILVA, J. V.; SANCHES, L. M. Capítulo 27. Outros antibióticos In: Fundamentos de Química Farmacéutica medicinal.1 ed.: Manole, 2022, p. 000-.
2. SILVA, J. V.; Santos, S. S.; SANCHES, L. M.; Ferreira, E. I.; Glarolla, J. Chapter 24 - Advances in targeted dendrimers for cancer therapy and challenges for clinical translation In: Dendrimer-Based Nanotherapeutics.1 ed.: Academic Press, 2021, p. 435-447.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 27/04/2023 às 17:14:36.