



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VICTOR MATHEUS KEMMER

**SÍNTESE DE 3-ALQUILPIRIDINAS DIMÉRICAS, AVALIAÇÃO
DE AFINIDADE PELO GRUPO HEME E DO POTENCIAL
ANTIPLASMODIAL**

Londrina
2021

VICTOR MATHEUS KEMMER

**SÍNTESE DE 3-ALQUILPIRIDINAS DIMÉRICAS, AVALIAÇÃO
DE AFINIDADE PELO GRUPO HEME E DO POTENCIAL
ANTIPLASMODIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora:

Profa. Dra. Anna Paola Butera (Universidade Estadual de Londrina)

Co-Orientador:

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana (Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

V644 Kemmer, Víctor Matheus .
Síntese de 3-alquilpiridinas diméricas, avaliação de afinidade pelo heme e do
potencial antiplasmodial / Víctor Matheus Kemmer. - Londrina, 2021.
100 f.

Orientador: Anna Paola Butera.

Coorientador: Renato Márcio Ribeiro Viana.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Malária - Tese. 2. Dímeros - Tese. 3. 3-alquilpiridinas - Tese. 4. titulação UV-
vis - Tese. I. Butera, Anna Paola. II. Ribeiro Viana, Renato Márcio. III. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em
Química. IV. Título.

CDU 54

VICTOR MATHEUS KEMMER

**SÍNTESE DE 3-ALQUILPIRIDINAS DIMÉRICAS, AVALIAÇÃO
DE AFINIDADE PELO GRUPO HEME E DO POTENCIAL
ANTIPLASMODIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Anna Paola Butera
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gustavo Henrique Ribeiro Viana
Universidade Federal de São João del-Rei -
UFSJ

Londrina, 19 de junho de 2021

KEMMER, Victor Matheus. **Síntese de 3-alkilpiridinas diméricas, avaliação de atividade pelo grupo heme e do potencial antiplasmodial**. 2021. 99 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que afeta principalmente as regiões tropicais do planeta. Estima-se que ocorreram 220 milhões de casos ao redor do mundo em 2018. O surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes aos fármacos utilizados no tratamento da malária pode agravar o quadro atual, fazendo-se urgente a busca de novos compostos ativos com vistas a descoberta de fármacos antimaláricos. No presente trabalho, descreve-se a síntese de seis derivados 3-alkilpirídicos e o estudo de interação destes compostos com o grupo heme (hematina) por titulação espectroscópica de absorção no UV-vis, tendo em vista a identificação de substâncias que atuem potencialmente como inibidores da formação de hemozoína, polímero supramolecular de heme. A formação de hemozoína desempenha um papel fundamental durante um estágio da infecção por *Plasmodium*, sendo o grupo heme um alvo bioquímico relevante na ação de antimaláricos. Dentre os compostos sintetizados, quatro apresentam estrutura dimérica bifuncional, tendo sido planejados com vistas a avaliação da estratégia de dimerização molecular na construção de eficientes inibidores da formação de hemozoína. De maneira consonante à proposta, dois dos dímeros obtidos e avaliados se mostraram bons ligantes de heme. As constantes de dissociação do complexo ligante-heme foram determinadas para esses compostos, encontrando-se os valores de $71,17 \pm 28,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o composto **1** e $88,79 \pm 30,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o composto **4**, sendo esses resultados promissores.

Palavras-chave: malária; dímeros; dimerização; alcalóides 3-alkilpiridínicos; grupo heme; titulação UV-vis.

KEMMER, Victor Matheus. **Synthesis of dimeric 3-alkylpyridines, evaluation of activity with the heme group and antiplasmodial potential.** 2021. 99 p. Dissertation (Master's degree) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, which mainly affects tropical regions of the planet. It is estimated that 220 million cases occurred worldwide in 2018. The emergence of *Plasmodium* strains resistant to the drugs used in the treatment of malaria may aggravate the current situation, making it urgent to search for new active compounds aiming the discovery of antimalarial drugs. In this work, we describe the synthesis of six 3-alkylpyridines derivatives and the study of the interaction of these compounds with the heme group (hematin) by spectroscopic absorption titration in UV-vis, aiming the identification of substances that act potentially as inhibitors of the formation of hemozoin, supramolecular polymer of heme. The formation of hemozoin plays a fundamental role during a stage of *Plasmodium* infection, with the heme group being a relevant biochemical target in the action of antimalarials. Among the synthesized compounds, four have a bifunctional dimeric structure, having been planned aiming at the evaluation of the molecular dimerization strategy in the construction of efficient inhibitors of hemozoin formation. In line with the proposal, two of the obtained and evaluated dimers proved to be good heme ligands. The dissociation constants of the ligand-heme complex were determined for these compounds, with values of $71,17 \pm 28,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ for compound **1** and $88.79 \pm 30,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ for compound **4**, being promising results.

Key words: malaria; dimers; dimerization; 3-alkylpyridine alkaloids; heme group; UV-vis titration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da incidência de malária a cada mil habitantes, em 2018 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).	15
Figura 2. Mapa de risco de infecção de malária no Brasil, de acordo Ministério da Saúde, em 2018 (BRASIL, 2020).....	16
Figura 3. Ciclo de vida geral de espécies de <i>Plasmodium</i> causadoras de malária em seres humanos	17
Figura 4. Estruturas químicas dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária (cores das estruturas estão relacionadas às respectivas classes química, de acordo com a legenda).	20
Figura 5. Estrutura de dímeros obtidos a partir da artemisinina descritos por Hadden e Blagg (2008) e Poster et al. (2007) (em vermelho, destaca-se o fragmento estrutural correspondente à artemisinina),.....	26
Figura 6. Estrutura da viscosalina, alcaloide marinho com atividade antimicrobiana isolado de esponjas do gênero <i>Haliclona</i> (em vermelho, grupos 3-alkilpiridínicos).....	27
Figura 7. Estrutura do grupo heme e do polímero supramolecular hemozoína.....	29
Figura 8. Interações entre o grupo heme e a quinina (adaptado de FONG; WRIGHT, 2013).....	30
Figura 9. Estrutura de análogos sintéticos de alcaloides 3-alkilpiridínicos V-X e suas respectivas atividades antiplasmodiais frente cepa W2 de <i>P. falciparum</i> resistente à cloroquina (RIBEIRO-VIANA et al., 2016)..	33
Figura 10. Modos de interação propostos por Ribeiro-Viana et. al. (2016) para os complexos supramoleculares entre VI (em preto) e o grupo heme (em azul).....	34
Figura 11. Planejamento da série de dímeros 3-alkilpiridínicos.	36
Figura 12. Estrutura de derivados 3-alkilpiridínicos não dimérico propostos.....	37
Figura 13. Rota sintética para obtenção do composto 5 proposta por Gonçalves e colaboradores (2014).....	40
Figura 14. Proposta de obtenção dos dímeros 1-4 a partir de álcoois contendo o fragmento estrutural 3-alkilpiridína e ácidos dicarboxílicos.	42

Figura 15. Proposta de obtenção dos derivados não-diméricos 9 e 10	42
Figura 16. Condições e rendimento da reação de formação do acetal 6 a partir do 1,6-hexanodiol.....	44
Figura 17. Mecanismo proposto para a reação de formação do acetal 6 a partir do 1,6-hexanodiol.....	45
Figura 18. Atribuição parcial dos sinais de RMN de 6	45
Figura 19. Condições da reação de mesilação da hidroxila livre do composto 6 , para obtenção de 7	46
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H do composto 7 (CDCl ₃ , 400 MHz) com atribuição dos sinais.....	47
Figura 21. Condições e rendimento da reação de eterificação por catálise de transferência de fase para obtenção de 8	48
Figura 22. Mecanismo proposto para a reação de eterificação sob condições de catálise de transferência de fase de acordo com Starks (1971).....	49
Figura 23. Estrutura do co-produto obtido na reação de catálise de transferência de fase para obtenção do composto 8	49
Figura 24. Atribuição parcial dos sinais de RMN de ¹ H de 8	50
Figura 25. Condições da reação de hidrólise ácida do acetal 8 , para obtenção do composto 5	50
Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H do composto 5 (CDCl ₃ , 400 MHz) com atribuição dos sinais.....	51
Figura 27. Metodologia de esterificação empregada para a obtenção dos dímeros 1-4	52
Figura 28. Mecanismo proposto para reação de formação dos dímeros 1-4 (BERNHARD; WOLFGANG, 1978).....	53
Figura 29. Espectro de RMN de ¹ H do dímero 1 (CDCl ₃ , 400 MHz) com atribuição dos sinais.....	55
Figura 30. Espectro de RMN de ¹³ C do dímero 1 (CDCl ₃ , 100 MHz) com atribuição dos sinais.....	56
Figura 31. Condições e rendimentos das reações para a obtenção dos compostos 9 e 10	56
Figura 32. Mecanismo da reação substituição nucleofílica à carbonila envolvido na formação dos compostos 9 e 10	57
Figura 33. Atribuição parcial dos sinais de RMN de 9 e de 10	58

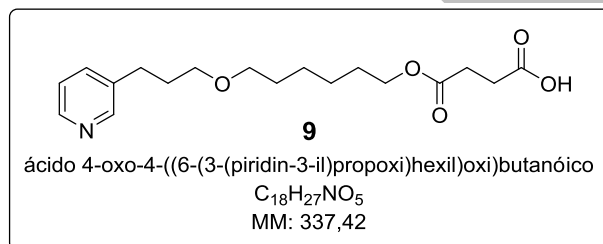
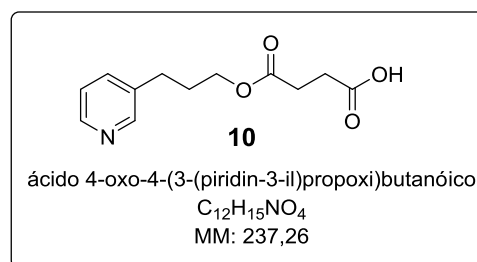
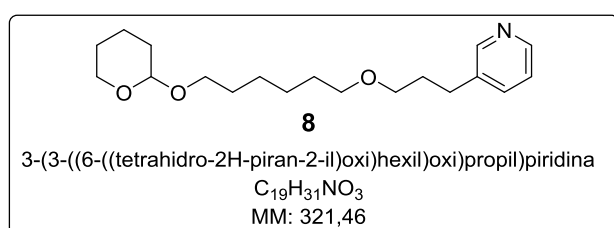
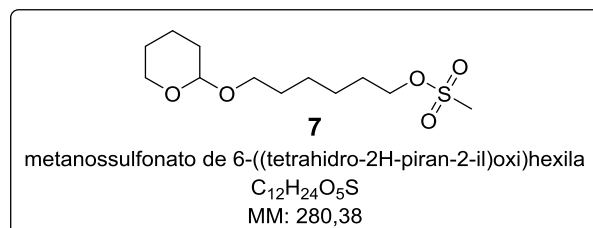
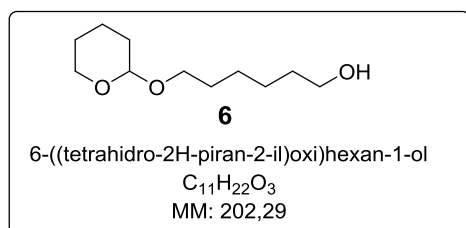
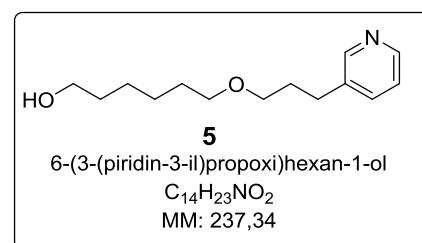
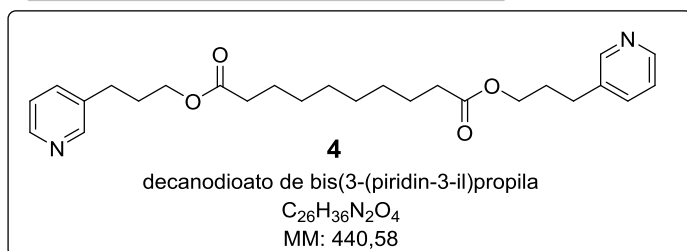
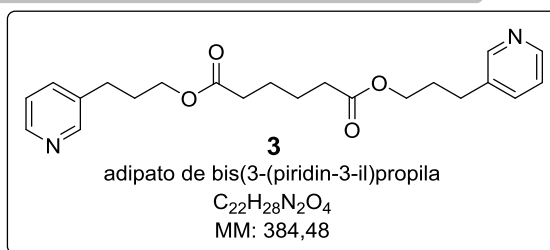
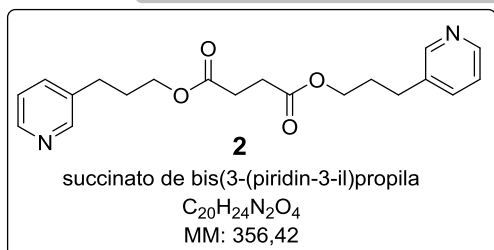
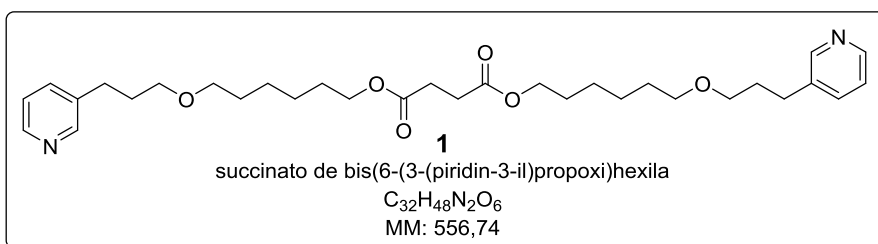
Figura 34. Gráficos de dispersão XY de absorvâncias <i>versus</i> concentrações resultantes de titulação no UV-vis das substâncias 1-4 e 9-10 com hematina.....	60
Figura 35. Gráfico de dispersão XY hipotético com tendências paralelas no eixo X (região de plateau).	62
Figura 36. Equilíbrios da formação dos complexos 1:1 e 2:1 entre hematina (receptor) e os ligantes.....	63
Figura 37. Gráfico de absorvâncias <i>versus</i> concentrações resultantes da titulação UV-vis da cloroquina com a hematina.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3-APA:	Alcalóides 3-alquilpiridínicos
δ :	Deslocamento químico
ΔG :	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH :	Variação de entalpia
ΔS :	Variação de entropia
ϵ :	Absortividade molar
λ :	Comprimento de onda
ACTs:	Terapias combinadas baseadas em artemisinina (<i>Artemisinin-based combination therapy</i>)
ADMET:	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ALH:	Aceptores de ligação de Hidrogênio
Bu ₄ NBr:	Brometo de tetrabutilamônio
CCD:	Cromatografia em camada delgada
cLogP:	Coeficiente de partição calculado (octanol/água)
CTF:	Catálise de transferência de fase
DHP:	3,4-dihidro-2H-pirano
DIC:	Diisopropilcarbodimida
DLH:	Doadores de ligação de Hidrogênio
DMAP:	Dimetilaminopiridina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
Et ₃ N:	Trietilamina
FDA:	<i>Food and Drug Administration – United States of America</i>
FTIR:	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformação de Fourier
K _a :	constante de associação
K _d :	Constante de dissociação
K _{d11} :	constante de dissociação do complexo 1:1
K _{d12} :	constante de dissociação do complexo 1:2
MsCl:	Cloreto de mesila (cloreto de metassulfonila)
m/v:	Massa por volume
nm:	Nanômetros
nrot:	Número de ligações rotacionáveis

OMS:	Organização Mundial da Saúde
OPAS:	Organização Pan-Americana da Saúde
ppm:	Partes por milhão
py:	piridina/anel piridínico
RMN de ^1H :	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C :	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13
t. a.:	Temperatura ambiente
THP:	tetrahidropiranoil
TMS:	Tetrametilsilano
TPSA:	Superfície total de área polar (<i>Total Polar Surface Area</i>)
UV-vis:	Espectroscopia de absorção eletrônica na faixa do ultravioleta-visível

LISTA DE SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS



SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	MALÁRIA: ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA	15
1.2	CICLO BIOLÓGICO DO <i>PLASMODIUM</i>	17
1.3	MALÁRIA: PROFILAXIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	18
1.4	ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	23
1.5	ALCALOIDES 3-ALQUILPIRIDÍNICOS.....	26
1.6	FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE SUA INIBIÇÃO.....	28
1.7	TITULAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA- VISÍVEL	31
1.8	PLANEJAMENTO E PROPOSTA DE ESTUDO	32
2.	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3.	PROPOSTA DE SÍNTESE	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1	SÍNTESE.....	44
4.1.1	Síntese do Precursor 5	44
4.1.1	Síntese dos Dímeros 1-4	51
4.1.2	Síntese dos Compostos 9 e 10	56
4.2	ENSAIOS DE TITULAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE ABSORÇÃO NO UV- vis.....	58
5.	CONCLUSÃO	65
6.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	67
6.1	CARACTERIZAÇÃO POR RMN DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS	67
6.2	SÍNTESE.....	67
6.2.1	Procedimentos Gerais.....	67

6.2.2	Síntese do 6-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)hexan-1-ol (6) (NISHIGUCHI <i>et al.</i> , 2000).....	68
6.2.3	Síntese do Metanossulfonato de 6-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)hexila (7) (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014).....	69
6.2.4	Síntese do 3-(3-((6-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)hexil)oxi)propil)piridina (8) (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014)	70
6.2.5	Síntese do 6-(3-(piridina-3-il)propoxi)hexan-1-ol (5) (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014).....	71
6.2.6	Síntese do Succinato de bis 6-(3-(piridina-3-il)propoxi)hexila (1)	73
6.2.7	Procedimento Geral para Síntese do Dímeros 2 , 3 e 4	74
6.2.8	Síntese do Ácido 4-oxo-4-(6-(3-(piridin-3-il)propoxi)hexil)oxi)butanóico (9)	76
6.2.9	Síntese do Ácido 4-oxo-4-(3-(piridin-3-il)propoxi)butanóico (10)	77
6.3	TITULAÇÕES ESPECTROSCÓPICAS UV-vis	77
6.3.1	Preparo das Soluções	77
6.3.1.1	Solução tampão DMSO/HEPES (40%)	77
6.3.1.2	Solução estoque de hematina (2,6 mmol L ⁻¹) (SEhm).....	78
6.3.1.3	Solução análise de hematina (5 µmol L ⁻¹) (SAhm)	78
6.3.1.4	Soluções estoque dos ligantes (SE).....	78
6.3.1.5	Solução estoque do dímero 1 (24,70 mmol L ⁻¹) (SEd1)	78
6.3.1.6	Solução estoque do dímero 2 (56,81 mmol L ⁻¹) (SEd2)	79
6.3.1.7	Solução estoque do dímero 3 (57,54 mmol L ⁻¹) (SEd3)	79
6.3.1.8	Solução estoque do dímero 4 (85,40 mmol L ⁻¹) (SEd4)	79
6.3.1.9	Solução estoque do ácido 9 (82,19 mmol L ⁻¹) (SEa9).....	79
6.3.1.10	Solução estoque do ácido 10 (82,98 mmol L ⁻¹) (SEa10).....	79
6.3.1.11	Solução estoque de cloroquina (17,64 mmol L ⁻¹)	80
6.3.1.12	Soluções de Análise dos ligantes (SA)-Procedimento Geral.....	80
6.3.1.13	Solução análise do dímero 1 (8,10 mmol L ⁻¹) (SAd1).....	80
6.3.1.14	Solução análise do dímero 2 (8,10 mmol L ⁻¹) (SAd2).....	80
6.3.1.15	Solução análise do dímero 3 (8,10 mmol L ⁻¹) (SAd3).....	80
6.3.1.16	Solução análise do dímero 4 (8,10 mmol L ⁻¹) (SAd4).....	81
6.3.1.17	Solução análise do ácido 9 (8,10 mmol L ⁻¹) (SAa9)	81
6.3.1.18	Solução análise do ácido 10 (8,10 mmol L ⁻¹) (SAa10)	81
6.3.1.19	Solução análise da cloroquina (10 mmol L ⁻¹)	81

6.3.2	Titulações Espectroscópicas UV-vis	81
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8.	APÊNDICE	90
8.1	Espectros utilizados para a caracterização dos compostos sintetizados	90

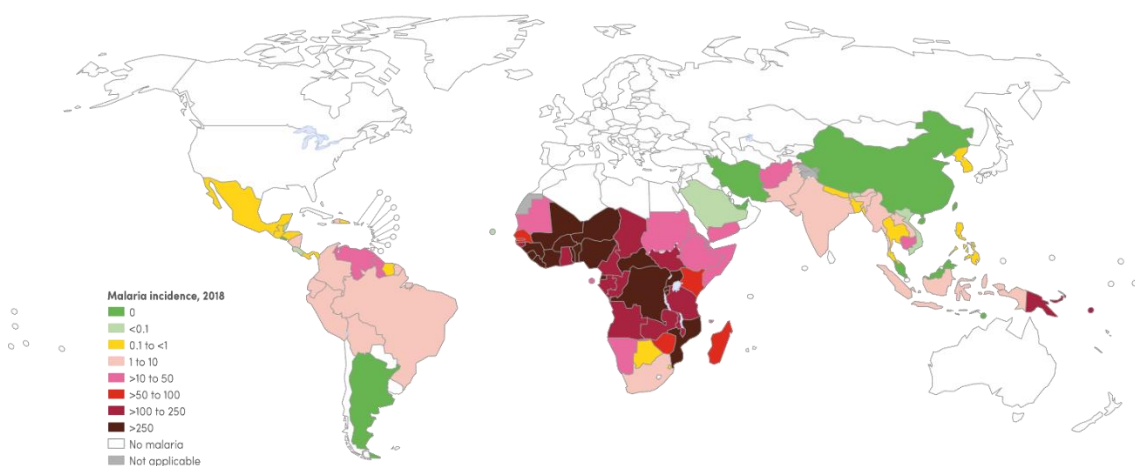
1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária: Aspectos gerais da doença

A malária é uma doença que afeta a humanidade desde a antiguidade, tendo sido alguns de seus sintomas historicamente registrados desde 2700 a.C. (COX, 2010). Essa doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e afeta principalmente populações em regiões tropicais e subtropicais sendo que as regiões mais impactadas são o sudeste asiático, a região amazônica sul-americana e a região subsaariana do continente africano (GOMES *et al.*, 2011).

Estima-se que ocorreram aproximadamente 228 milhões de casos de malária ao redor do mundo em 2018, sendo 93% desses casos no continente africano e 3,4% no sudeste asiático. A Figura 1. Mapa da incidência de malária a cada mil habitantes, em 2018 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). mostra a incidência de malária a cada mil habitantes no mundo em 2018. Em 2018, relatou-se 405 mil mortes (67% dessas mortes foram de crianças com menos de 5 anos) e os gastos em esforços para controle ou eliminação da doença foram em torno de 2,7 bilhões de dólares neste mesmo ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

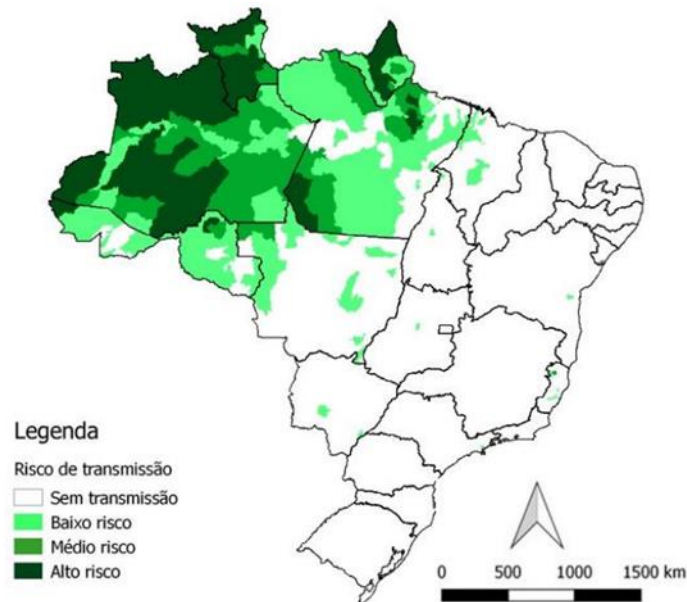
Figura 1. Mapa da incidência de malária a cada mil habitantes, em 2018 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).



O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de malária na América Latina, sendo que esses casos se encontram majoritariamente na região norte, nos estados do Amazonas, Acre, Pará, Amapá, Rondônia e

Roraima, como pode-se observar na Figura 2 (GOMES *et al.*, 2011). Em 2018, houve 194.271 casos de malária no Brasil, sendo 193.534 na região amazônica (BRASIL, 2020).

Figura 2. Mapa de risco de infecção de malária no Brasil, de acordo Ministério da Saúde, em 2018 (BRASIL, 2020)



A malária é uma doença infecciosa causada por cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (HAHN; POTTINGER, 2015). Pode causar graves problemas renais, anemia severa, disfunção hepática, infecção intravascular, como também, pode afetar o sistema nervoso central (GOMES *et al.*, 2011). Sua transmissão ocorre em seres humanos através da picada do mosquito *Anopheles* (HAHN; POTTINGER, 2015).

A forma mais grave e mortífera desta doença é causada pelo *P. falciparum*. Os sintomas de estresse respiratório, acidose metabólica, hipoglicemia e as complicações associadas a malária cerebral são atribuídos à infecção causada por essa espécie. Isso se deve a algumas razões, como a capacidade que o *P. falciparum* possui de invadir um grande percentual de glóbulos vermelhos e às modificações que gera na superfície dessas células para que possa aderir ao endotélio (MILLER *et al.*, 2002). Deve-se ressaltar que há também uma preocupação emergente com a malária causada pelo *P. vivax*,

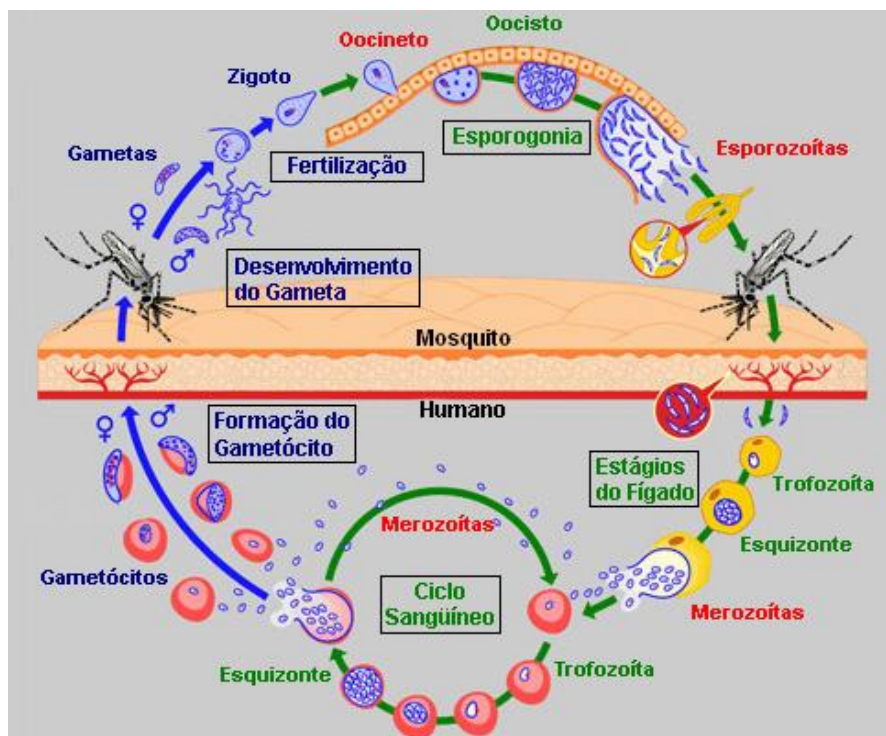
sendo que este parasito ainda é bastante negligenciado e tem apresentado uma crescente resistência à fármacos antimaláricos (FERREIRA *et al.*, 2021).

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium*

Os estudos científicos sobre a malária iniciaram-se pela descoberta dos parasitas causadores, feita por Charles Louis Alphonse Laveran em 1880, como também pela identificação dos mosquitos do gênero *Anopheles* como seus vetores de propagação, feita por Ronald Ross em 1897 (COX, 2010).

A malária é transmitida para seres humanos pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectada. A infecção se inicia quando esporozoítas depositados a partir da picada, circulantes na corrente sanguínea, acessam os hepatócitos onde irão passar por uma etapa de multiplicação assexuada que resultará em células merozoítas uninucleadas (Figura 3) (COX, 2010; BRASIL, 2020).

Figura 3. Ciclo de vida geral de espécies de *Plasmodium* causadoras de malária em seres humanos (Fonte: https://www.qieducacao.com/2013/04/doencas-causadas-por-protozoarios_4165.html; acesso em 27/05/2021).



As formas merozoítas invadem as hemácias e iniciam uma segunda etapa de reprodução assexuada, multiplicando os merozoítos sanguíneos. Essa etapa de multiplicação em hemácias é denominada fase eritrocitária, em que o parasito digere a hemoglobina, para aquisição de nutrientes, que resulta na liberação do grupo heme livre em seu vacúolo digestivo. O grupo heme livre é tóxico às formas esquizontes do parasita, o que faz com que esse, como mecanismo de defesa, provoque a polimerização de heme em hemozoína, que por sua vez é um polímero supramolecular insolúvel e atóxico para o plasmódio. Ainda durante essa etapa, aproximadamente 1% dos merozoítos presentes na corrente sanguínea se desenvolvem e se diferenciam em gametócitos. Os gametócitos maduros se diferenciam sexualmente, formando microgametócitos e macrogametócitos que evadem das hemácias e passam a circular no corrente sanguínea, onde poderão infectar novos mosquitos através de suas picadas (CHUGH *et al.*, 2013; COX, 2010; DELVES *et al.*, 2012). No mosquito, os gametócitos se desenvolvem em gametas masculino e feminino. Ocorre, então, a fertilização e forma-se um zigoto com boa mobilidade (ocineto), que migra até o intestino onde se inicia a fase esporogônica. O oocineto penetra na parede intestinal e forma o oocisto, que iniciará uma nova fase de multiplicação que resultará em esporozoítos. Esses, por sua vez, irão migrar até as glândulas salivares e estarão aptos a infectar seres humanos (BRASIL, 2020; COX, 2010).

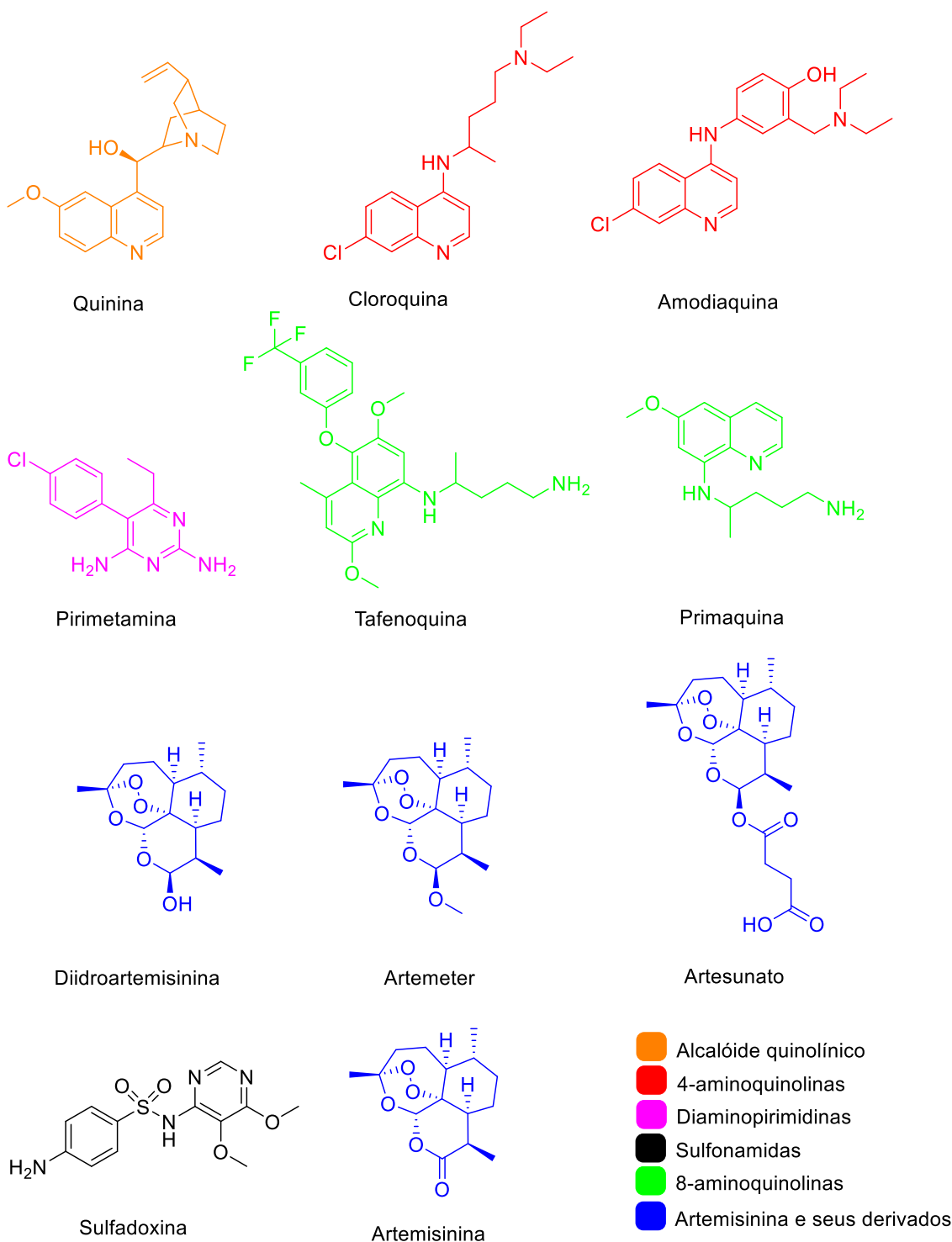
1.3 Malária: Profilaxia, diagnóstico e tratamento

A prevenção da malária pode ser realizada através de duas principais estratégias, de acordo com a OMS e com a OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde): o controle do vetor (que irá diminuir as chances de uma pessoa ser picada pelo mosquito infectante) e a quimioprofilaxia (utilização de medicamentos para suprimir a infecção em casos específicos). Para o controle do vetor, recomenda-se que as populações em risco de serem infectadas durmam no interior de mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração, sendo necessária boas estratégias de conscientização da população e, para se atingir uma maior eficiência, é importante que esse material seja fornecido gratuitamente pela Saúde Pública de forma que toda a população tenha acesso a ele com as mesmas condições. Essa intervenção reduz de

maneira muito significativa a transmissão da malária, sendo que estudos mostraram que essa estratégia funciona num período entre 3 e 6 meses, e que a eficiência máxima ocorre quando no mínimo 80% das casas da área a ser protegida são atendidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; OPAS, 2016).

A quimioprofilaxia é uma estratégia de prevenção que se baseia em manter medicamentos antimaláricos no sangue em concentrações suficientes para suprimir a infecção em períodos de alto risco de exposição a doença, é utilizada para casos específicos e mostra ótimos resultados. Na África subsaariana, tratamentos preventivos intermitentes na gravidez utilizando sulfadoxina-pirimetamina mostraram uma redução significativa em anemia materna, mortalidade perinatal e baixo peso do recém-nascido, sendo que esse mesmo tratamento em crianças reduziu também a anemia. A quimioprofilaxia sazonal de malária utilizando-se os agentes terapêuticos sulfadoxina, pirimetamina e amodiaquina mostrou redução de 75% de casos de malária severa em crianças entre 3 meses e 5 anos que vivem em áreas com alto risco de transmissão. A OMS recomenda a quimioprofilaxia sazonal de malária para crianças nessa faixa etária em regiões que apresentam epidemia desde 2012 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). As estruturas de fármacos utilizados no tratamento da malária se encontram na Figura 4. Vale destacar a tafenoquina, uma 8-aminoquinolina análoga da primaquina que foi aprovada para uso como antimalárico pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2018 ((FDA), 2018; NOVITT-MORENO *et al.*, 2017).

Figura 4. Estruturas químicas dos principais fármacos utilizados no tratamento da malária (cores das estruturas estão relacionadas às respectivas classes químicas, de acordo com a legenda).



O diagnóstico da malária é essencial para seu controle e para a utilização e desenvolvimento de estratégias de prevenção. O diagnóstico

precoce pode ajudar a reduzir o número de indivíduos que favorecerão a transmissão da doença, além de prevenir que essa ocorra em seus casos mais severos, o que acaba por reduzir o número de mortos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Todos os casos suspeitos de malária devem ser submetidos a testes parasitológicos, seja de microscopia ou testes de diagnóstico rápido, sendo que este se baseia na imunocromatografia, que detecta antígenos ou enzimas específicas do parasita. Caso o resultado do teste seja positivo, deve-se iniciar o tratamento adequado imediatamente. Em regiões que apresentam endemia de malária e baixa disponibilidade de testes, deve-se iniciar o tratamento imediato de indivíduos que apresentam os sintomas clínicos da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015, 2019).

O tratamento da malária recomendado pela OMS é adequável a cada situação, dependendo de vários fatores: a gravidade da doença, a espécie de *Plasmodium* que causou a infecção e se a região do caso se encontra em estado de endemia ou não.

Em casos mais simples de malária causada por *P. falciparum*, deve-se utilizar como tratamento terapias combinadas baseadas em artemisinina (ACT: *Artemisinin-based combination therapy*), como o uso de artesunato combinado com amodiaquina, por três dias, sendo que a dose diária varia dependendo da combinação terapêutica escolhida e do peso corporal do infectado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Em casos de malária causadas por *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* ou *Plasmodium knowlesi*, recomenda-se o tratamento baseado em cloroquina. Caso a área apresente histórico de infecções com resistência a cloroquina, deve-se utilizar as ACT. Para evitar reincidência e ajudar no controle da transmissão, infectados por *P. vivax* e *P. ovale*, devem se submeter a um tratamento baseado em primaquina (VI). Caso não se saiba com certeza qual tipo de protozoário causou a infecção, deve-se tratar como se causada por *P. falciparum*. Em casos severos de malária, onde o infectado apresenta anemia severa, hipoglicemia, edemas pulmonares, sangramento excessivo, dificuldades em manter a consciência, fraqueza extrema ou convulsões recorrentes, além dos sintomas comuns (febre, dor de cabeça, calafrios e vômito), deve-se administrar artesunato por via intravenosa ou

intramuscular por 24 horas antes de começar o tratamento via ACT por via oral (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; OPAS, 2016).

Um dos principais problemas para o controle da malária ao longo da história é o surgimento de cepas que apresentam resistência aos fármacos de escolha clínica, sendo que três espécies de *Plasmodium* que causam a infecção em seres humanos apresentaram cepas resistentes: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. A OMS define resistência a fármacos como “a habilidade de uma cepa parasita de sobreviver e se multiplicar apesar da administração e absorção de um fármaco fornecido em doses iguais ou superiores às recomendadas, mas dentro da tolerância do sujeito” sendo que “a forma ativa do fármaco contra o parasita precisa ganhar acesso ao parasita ou ao eritrócito infectado pela duração de tempo necessária para sua ação normal”. A OMS também realiza o trabalho de monitoramento da eficácia de fármacos antimaláricos e do surgimento de resistência a esses fármacos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Na década de 1990, áreas com endemia de malária passaram a apresentar infecções resistentes aos fármacos utilizados como primeira linha de tratamento na época, sendo estes cloroquina, sulfadoxina e pirimetamina (Figura 4). Dessa forma, houve um grande aumento no número de mortes decorrentes de infecções de malária, atingindo principalmente crianças na região da África subsaariana. Assim, durante esta mesma década, iniciou-se o uso das ACT, visando principalmente o tratamento de casos de malária no sudeste asiático, onde já havia se observado resistência aos outros fármacos antimaláricos disponíveis. Em 2005, a OMS passou a recomendar as ACT como primeira linha de tratamento para infecções por *P. falciparum* em países que apresentavam malária de forma endêmica. Porém, já há estudos mostrando o surgimento de cepas resistentes à artemisinina e a ACT, em geral (ASHLEY *et al.*, 2014).

A resistência que parasitas desenvolvem aos fármacos antimaláricos são monitoradas e estudadas através de marcadores genéticos (ANTONY; PARIJA, 2016).

Estudos realizados em laboratório e em campo, mostraram que mutações no gene transportador de resistência a cloroquina do *P. Falciparum*

(*Pfcr*t) estão associados ao comportamento resistente de cepas. A proteína transportadora de cloroquina do *P. falciparum* (*PfCRT*), tanto da cepa resistente à cloroquina, quanto da cepa sensível, consegue realizar o transporte dessa molécula. Porém, notou-se que as cepas resistentes essa proteína têm uma atividade transportadora maior, conseqüentemente gera menor acúmulo do fármaco no vacúolo digestivo do parasita, conferindo assim, resistência. Dessa forma, pode-se observar que a resistência que o parasito desenvolve a um determinado fármaco está diretamente relacionada com o mecanismo de ação pelo qual atua (ANTONY; PARIJA, 2016).

Um dos principais problemas ligados ao surgimento de resistência aos fármacos utilizados no tratamento de malária é a possibilidade de resistência cruzada, quando a resistência a um fármaco específico confere ao parasito resistência a todos os fármacos pertencentes à mesma classe ou que apresentem mecanismos de ação similares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Há estudos que mostram que mutações em diferentes pontos específicos do gene da proteína 1 resistente à múltiplos fármacos do *P. falciparum* (*Pfndr1*) são responsáveis por determinar o quão suscetível/resistentes cepas são frente a diferentes fármacos, como a quinina, cloroquina, amodiaquina e artemisinina (ANTONY; PARIJA, 2016).

Tendo em vista o cenário do atual quanto ao tratamento utilizado e recomendado pela OMS e suas problemáticas, é notável a necessidade de se desenvolver novos compostos candidatos a fármacos com atuação antimalárica.

1.4 Estratégias de desenvolvimento de novos fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo bastante complexo e demorado que requer o trabalho conjunto e sinérgico de diversas áreas do conhecimento. Atualmente, existem diversos parâmetros e até ferramentas computacionais que podem ser utilizados para favorecer químicos medicinais no processo de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos (NICOLAOU, 2014).

Historicamente, um parâmetro muito importante a ser utilizado para guiar o planejamento de fármacos foram as regras de Lipinski (também chamada de regra dos cinco) (NICOLAOU, 2014). As regras de Lipinski são utilizadas para prever se um composto candidato a fármaco possui absorção oral e permeabilidade potencialmente adequadas, estimando que para isso, o composto deve apresentar $MM \leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$, números de aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10, números de doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 e coeficiente de partição calculado (octanol/água) menor ou igual a 5 (LIPINSKI *et al.*, 1997). É necessário ressaltar que ao longo dos anos, várias extensões e modificações à essas regras foram desenvolvidas de forma a melhorar a previsão do comportamento de uma substância, como por exemplo, a extensão proposta por Veber, onde a superfície total de área superficial polar seja menor ou igual a 140 \AA^2 e número de ligações rotacionáveis menor ou igual a 10 (VEBER *et al.*, 2002).

Há estudos mais específicos que sugerem critérios para o planejamento de novos compostos visando atuação contra doenças infecciosas em países em desenvolvimento, como a tuberculose, doença de Chagas, leishmaniose e malária. Em relação ao desenvolvimento de antimaláricos, alguns desses critérios são (KATSUNO *et al.*, 2015):

- Não haver conflito de interesses em relação a propriedade intelectual;
- Moléculas devem ser sintetizadas em cinco etapas ou menos;
- Deve-se conhecer a relação estrutura-atividade do composto;
- Não apresentar uma toxicidade aguda em ensaios *in vivo*;
- Obedecer às regras de Lipinsk (LIPINSKI *et al.*, 1997);
- Apresentar índice de seletividade superior a 10 vezes;
- Apresentar IC_{50} entre 1-2 μM ;
- Apresentar ED_{90} menor que 50 mg/kg (sendo ED_{90} a dose necessária para erradicar 90% do patógeno alvo).

Entretanto, é necessário ressaltar que estes parâmetros propostos com o intuito de auxiliar o planejamento de novos fármacos, principalmente em relação ao custo-benefício das pesquisas de desenvolvimento, não devendo ser seguidos como regras rigorosas, tendo em vista que estes podem causar o

descarte de moléculas com bons potenciais, como a artemisinina, caso fosse avaliada sob este escopo (KATSUNO *et al.*, 2015).

Além desses parâmetros, a química computacional é outra importante ferramenta que vêm sendo desenvolvida e utilizada ao longo dos anos para o auxílio no desenvolvimento de fármacos, sendo combinada com o estudo de parâmetros (como o de Lipinski e Veber já citados acima) para a previsibilidade de propriedades ADMET, e também para o estudo da relação entre ligantes e alvos biológicos, como modelagem molecular e também ancoramento molecular (*molecular docking*), possuindo já diversos softwares aptos para a realização de tais estudos (BARREIRO; RODRIGUES, 1997; NICOLAOU, 2014).

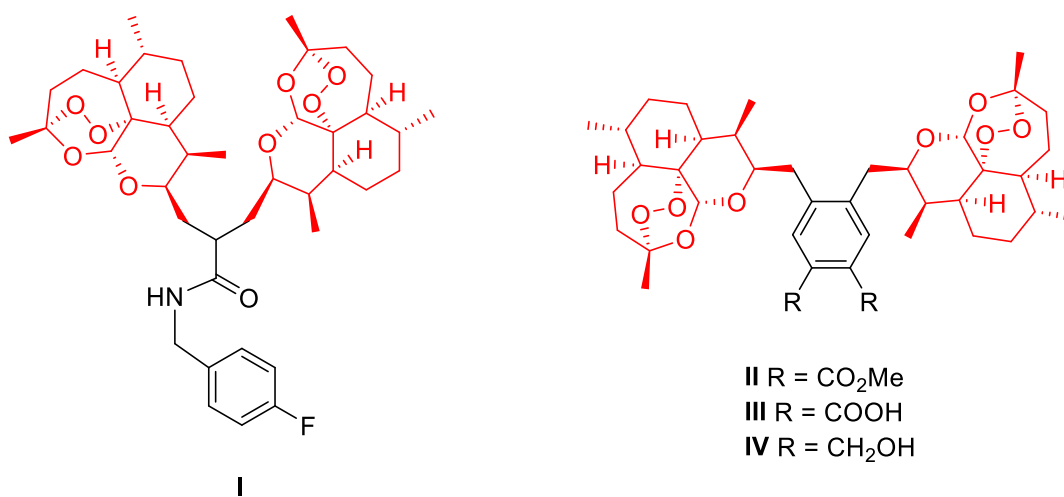
Existem vários caminhos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos. Pode-se partir da triagem de produtos naturais (como compostos originários de plantas, de animais, de microorganismos, fontes marinhas, venenos ou toxinas, por exemplo) ou pode-se partir da triagem de compostos sintéticos (analisando e testando moléculas disponíveis em acervos de grupos de pesquisa ou da indústria farmacêutica) (BARREIRO, 2002; PATRICK, 2013; SANGI, 2016). A partir deste processo, chega-se a um composto-líder (ou seja, que apresenta a atividade farmacológica desejada) que, por sua vez, irá ser submetido a uma etapa de otimização estrutural, de forma a melhorar suas propriedades, como atividade, seletividade e redução de efeitos colaterais. Para que se alcance análogos com perfis otimizados, podem ser adotadas diversas estratégias de modificação estrutural, como bioisosterismo, simplificação estrutural, restrição conformacional, variações em anéis, latenciação, homologação e dimerização (BARREIRO, 2002; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; PATRICK, 2013; SANGI, 2016; WERMUTH, 2008).

A dimerização é uma estratégia útil para o planejamento racional de candidatos a fármacos. Possuindo dois grupos farmacofóricos, o dímero possui potencial de se ligar ao seu alvo biológico interagindo em dois sítios ativos diferentes, ou ainda, tratando-se de um ligante que interage de forma monovalente com seu alvo biológico, o dímero, possuindo dois grupos farmacofóricos em posições espaciais específicas, pode se orientar em uma

conformação que permita com que interaja com duas unidades distintas do alvo molecular (HADDEN; BLAGG, 2008).

A estratégia da dimerização foi utilizada para a síntese de derivados da artemisinina (Figura 5) que resultou na identificação de substâncias com atividade antimalárica. Dentre esses, o composto I apresentou 99,9% de supressão da parasitemia *in vivo* após três dias sendo administrados junto a mefloquina (HADDEN; BLAGG, 2008; POSNER *et al.*, 2007).

Figura 5. Estrutura de dímeros obtidos a partir da artemisinina descritos por Hadden e Blagg (2008) e Poster *et al.* (2007) (em vermelho, destaca-se o fragmento estrutural correspondente à artemisinina),



1.5 Alcaloides 3-alkilpiridínicos

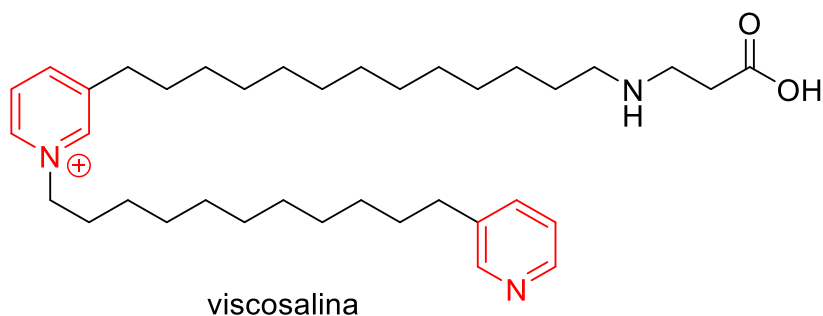
Há vários compostos isolados de produtos naturais que apresentam atividades biológicas muito interessantes, dentre as quais, a atividade antimalárica. Dentre os exemplos mais emblemáticos, pode-se destacar os fármacos artemisinina e a quinina. A primeira foi descoberta na década de 1960, sendo isolada da planta *Artemisia annua*, uma erva empregada na medicina tradicional chinesa, e hoje é uma das mais importantes substâncias empregadas no tratamento contra malária, além de ser usada na obtenção de derivados semissintéticos que também atuam no combate contra essa doença infecciosa, como diidroartemisinina e o artesunato. A quinina, por sua vez, é uma substância encontrada na casca de árvores do gênero *Cinchona* (nativas da América do Sul), e seu uso no tratamento da malária é considerado como a primeira vez na

história em que um composto químico foi utilizado no tratamento de uma doença infecciosa. A quinina ainda é utilizada nos dias de hoje no tratamento da malária (J. *et al.*, 2011; WANG, JIGANG *et al.*, 2019).

Outra excelente fonte de compostos bioativos é o meio ambiente marinho, devido à grande biodiversidade e consequente diversidade de compostos químicos que apresenta. Esses compostos podem ser extraídos e isolados de várias fontes da flora e da fauna marinha, como plantas marinhas, micro-organismos, animais e, principalmente, esponjas (SULERIA *et al.*, 2016). A grande diversidade de compostos químicos que o ambiente marinho apresenta promove uma grande variedade de atividades biológicas e ações terapêuticas, sendo descritos compostos com atividades antifúngicas, anti-inflamatórias, anti-tuberculose, antivirais e antimaláricas, dentre outras. Compostos originados de fontes marinhas já foram aprovados como fármacos pela FDA norte-americana (*United States Food and Drug Administration*) e existem diversos outros em estudos clínicos em fases I, II e III. A maior parte desses são provenientes de esponjas e urocordados (FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2009; MAYER *et al.*, 2013).

Os alcaloides alquilpiridínicos constituem uma classe de compostos, originados de fontes naturais marinhas com ampla bioatividade. As estruturas desses compostos contêm ao menos um anel piridínico (em alguns compostos, o nitrogênio do heterocíclico se encontra na forma quaternária) e, no carbono 3 do anel, uma cadeia alquila funcionalizada como a viscosalina, um antimicrobiano isolado a partir de esponjas do gênero *Haliclona* (Figura 6 (VOLK; KÖCK, 2004)).

Figura 6. Estrutura da viscosalina, alcaloide marinho com atividade antimicrobiana isolado de esponjas do gênero *Haliclona* (em vermelho, grupos 3-alquilpiridínicos).



A partir dessa classe de produtos naturais, vários análogos sintéticos foram obtidos e analisados quanto a atividade antiparasitária frente a *P. falciparum*, *Leishmania spp.* e *Trypanosoma brucei*, dentre os quais, foram identificados compostos com atividade antiparasitária (na faixa de nanomolar) e com bons índices de seletividade (RODENKO *et al.*, 2011). Sendo assim, derivados 3-alquilpiridínicos sintéticos são promissores agentes antiplasmodiais e devem ser investigados quanto a seus potenciais no tratamento da malária.

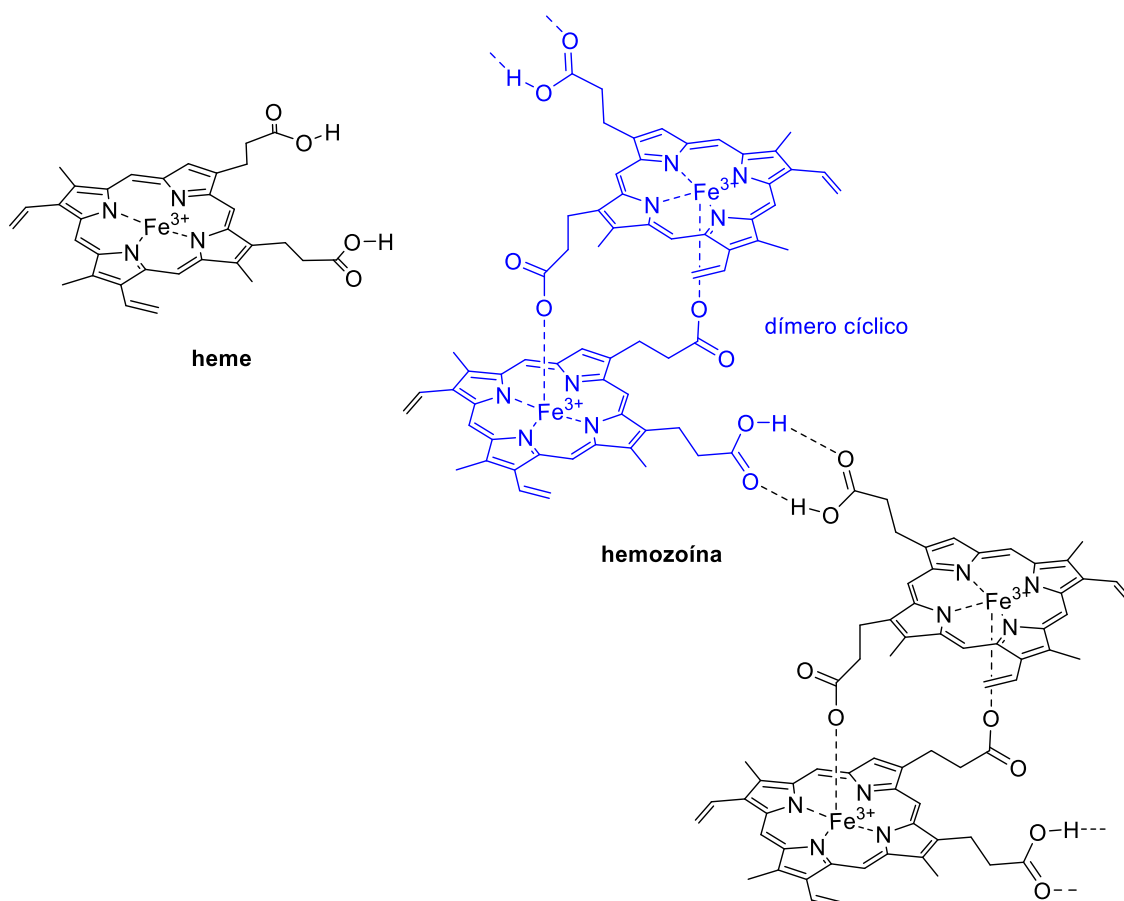
O provável mecanismo de ação antiplasmodial frente ao *P. falciparum* de derivados 3-alquilpiridínicos se dá pela inibição da formação de hemozoína, no vacúolo digestivo do parasita, uma propriedade muito atrativa para substâncias antimaláricas (GUIGUEMDE *et al.*, 2010). A interação de derivados 3-alquilpiridínico com o grupo heme livre é mediada pela ligação de hidrogênio entre o oxigênio na posição 3 da cadeia lateral e o hidrogênio carboxílico do resíduo de glutamina do grupo heme, e principalmente pela ligação do nitrogênio heterocíclico do grupo piridínico com o ferro do grupo heme (RIBEIRO-VIANA *et al.*, 2016). A atividade antimalárica de fármacos consolidados na clínica, como a quinina, a cloroquina e possivelmente a artemisinina (Figura 4), também dependem do mecanismo de inibição da formação da hemozoína (O'NEILL; BARTON; WARD, 2010; SLATER, 1993).

1.6 Formação de hemozoína e métodos de avaliação de sua inibição

Como já descrito anteriormente, a formação da hemozoína é uma etapa fundamental no ciclo de vida do *Plasmodium*. Isso porque os trofozoítos utilizam a hemoglobina como fonte de nutrientes, promovendo assim sua degradação durante o estágio intraeritrocítico. Este processo de degradação faz com que ocorra a liberação de moléculas de heme no vacúolo digestivo do parasito, sendo que estas moléculas são altamente tóxicas pois podem induzir a formação de radicais livres e a oxidação do DNA e de proteínas. Assim, como mecanismo de defesa, o parasito promove um processo de biocristalização que vai converter o grupo heme livre em hemozoína (também chamada de β -hematina ou pigmento malárico), um polímero atóxico, inerte e insolúvel em meio aquoso (CHUGH *et al.*, 2013; FONG; WRIGHT, 2013). A hemozoína é um dímero cíclico de

ferritoproporfirina IX onde cada grupo propionato se coordena com o átomo de ferro III da outra unidade, e esses dímeros formados interagem entre si através de ligações de hidrogênio (CHUGH *et al.*, 2013). A Figura 7 mostra as estruturas do grupo heme em sua forma livre e do polímero hemozoína.

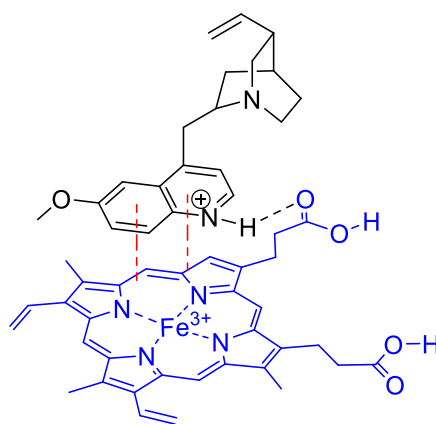
Figura 7. Estrutura do grupo heme e do polímero supramolecular hemozoína



Vários fármacos utilizados no tratamento da malária possuem o mecanismo de ação baseado na inibição da formação de hemozoína. As quinolinas por exemplo, constituem uma das classes mais representativas de antimaláricos de uso clínico e o mecanismo de ação dessas substâncias se baseia na inibição da formação de hemozoína. A classe foi desenvolvida com base na estrutura da quinina, que foi uma das primeiras substâncias utilizadas para o tratamento da malária. Outras quinolinas, como a cloroquina e a primaquina, por exemplo (Figura 4), ainda são utilizadas para o tratamento da infecção (FONG; WRIGHT, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Devido ao caráter básico, os derivados quinolínicos sofrem um trapeamento iônico no vacúolo digestivo do parasita (sendo esse um meio ácido, com o pH variando entre 4,7 e 5,2), o que faz com que essas substâncias se acumulem e interajam com o heme livre, de modo a inibir a formação de hemozoína. Essas interações ocorrem por empilhamento- π entre os anéis quinolínicos e os anéis pirrólicos do heme, e por ligações de hidrogênio entre o nitrogênio piridínico protonado das quinolinas e o grupo propionato do heme, sendo que podem impedir a formação de dímeros do heme logo após a degradação da hemoglobina ou dentro da nanoesfera lipídica, com a hemozoína já pré-formada, o que impede o alongamento e, portanto, a cristalização do polímero (Figura 8) (FONG; WRIGHT, 2013).

Figura 8. Interações entre o grupo heme e a quinina (adaptado de FONG; WRIGHT, 2013).



Há vários métodos para avaliar se a ação antiplasmodial que um composto específico apresenta decorre pelo mecanismo de inibição da formação de hemozoína, sendo que esses buscam determinar se há interação entre o composto e a hematina (forma sintética do heme). Alguns métodos fornecem evidências qualitativas, enquanto que em outros pode-se quantificar esta interação (NCOKAZI; EGAN, 2005).

Um método que pode ser empregado é a análise via FT-IR, onde pode-se inferir a inibição da formação de hemozoína pelo desaparecimento de bandas em 1662 cm^{-1} e 1209 cm^{-1} , que correspondem a ligações entre o átomo de ferro e o grupo carboxilato, características da hemozoína. Entretanto, este método

não é muito utilizado atualmente, já que não permite quantificar a interação entre o composto e a hematina e por necessitar de 48h de secagem antes da realização do espectro (NCOKAZI; EGAN, 2005; SINGH *et al.*, 2014).

O método mais utilizado para determinar a afinidade de um composto específico com o grupo heme é a titulação UV-vis.

1.7 Titulação espectroscópica de absorção no ultravioleta-visível

A titulação é uma técnica muito utilizada quando se trata de química supramolecular, sendo que permite quantificar as interações entre as moléculas de estudo. Caracteriza-se por ser uma técnica simples, baseando-se em adições consecutivas de uma solução do ligante estudado a uma solução do receptor específico. Monitora-se através de mudanças em alguma propriedade física que seja sensível a interação supramolecular, podendo ser utilizado RMN, espectroscopia de absorção na faixa do ultravioleta-visível (UV-vis), fluorescência ou outras técnicas para este monitoramento (THORDARSON, 2011).

Em titulações empregando-se em RMN de ^1H , em um primeiro momento obtém-se o espectro do composto analisado, e em seguida adiciona-se hematina dissolvida em DMSO deuterado para se obter um novo espectro. As mudanças nos picos relativos a hidrogênios aromáticos e alifáticos indicam a interação entre os compostos. Porém, a adição excessiva de hematina leva a um alargamento dos picos e conseqüente perda de resolução do espectro, sendo que isso pode ser causado devido ao paramagnetismo característico do átomo de ferro (SINGH *et al.*, 2014).

A espectroscopia de absorção na faixa do comprimento de onda do ultravioleta-visível (UV-vis) é uma técnica quantitativa, de baixo custo operacional, de fácil utilização, de boa sensibilidade e de baixo custo de análise. Quando empregada nos estudos de interação por titulação supramolecular, permite o cálculo da constante de dissociação (K_d) entre as espécies químicas estudadas, a estequiometria da interação e valores energéticos, como ΔG , ΔH e ΔS (GALO; COLOMBO, 2009; KANDAGAL *et al.*, 2006; THORDARSON, 2011).

Esta técnica apresenta limitações quando se trata de determinações quantitativas de amostras com concentrações muito baixas e que não absorvam tanta radiação, ou seja, apresentam uma baixa absorvidade molar (ϵ) no comprimento de onda (λ) a ser analisado (GALO; COLOMBO, 2009).

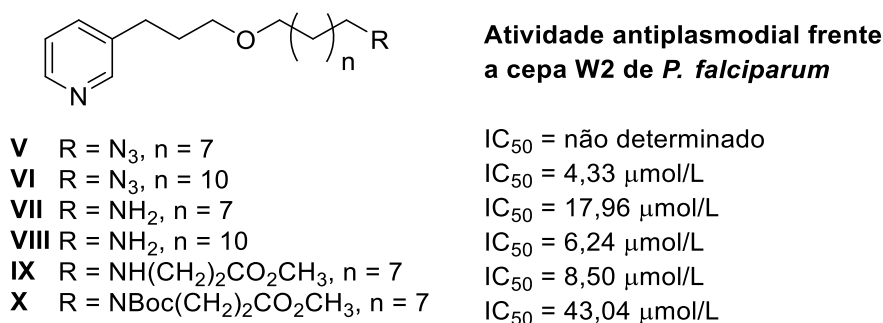
Assim, a titulação supramolecular por meio da espectroscopia de absorção UV-vis se mostra um método muito útil para a análise de interação entre espécies químicas e para a determinação de constantes que mensuram essa interação, sendo que essa interação pode ser inferida por mudanças nas bandas de absorção enquanto a titulação é realizada e, portanto, adiciona-se o ligante de forma gradativa ao meio, ou ainda mudanças na intensidade de absorção em comprimentos de onda específicos, já que o complexo formado possuirá absorvidade molar diferente do receptor em sua forma livre (COLLIER *et al.*, 1979; RIBEIRO-VIANA *et al.*, 2016).

A titulação espectroscópica de absorção UV-vis aplicada a ensaios de análise de potenciais inibidores de formação de hemozoína ocorre em temperatura constante (tratando-se de uma isoterma) e pH constante (entre 4,8 e 7,5), e monitora-se a banda de máxima absorção do heme em sua forma livre, em 401 nm. Assim, conforme adiciona-se o potencial ligante ocorre mudanças na absorbância da solução nesse comprimento de onda, sendo que, tratando-se de um ligante com boa afinidade, irá se atingir um platô que corresponde a saturação do complexo ligante-heme formado. Esta interação entre ligante e heme é o que inviabiliza a polimerização do heme para a formação da hemozoína. Essa análise normalmente é realizada em uma solução aquosa contendo DMSO, já que isso garante a viabilidade do método por manter o heme em sua forma livre (GUIMARÃES, D.S.M. *et al.*, 2019; RIBEIRO-VIANA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2014).

1.8 Planejamento e proposta de estudo

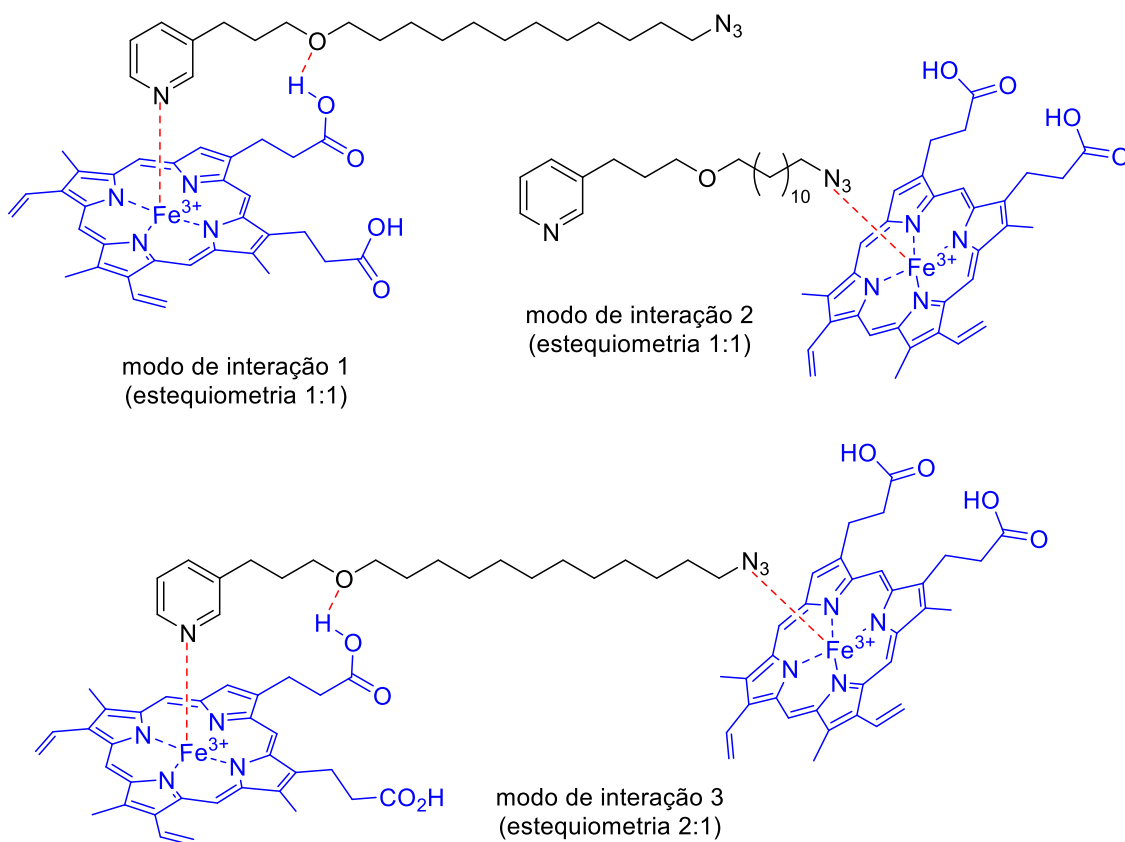
Em trabalhos anteriores, identificou-se a atividade antiplasmodial dos análogos sintéticos de alcaloides 3-alkilpiridínicos **V-X** (Figura 9), frente a cepa W2 de *P. falciparum* (resistente à cloroquina), sendo encontrado valores de IC₅₀ entre 4,33 e 43,04 $\mu\text{mol/L}$ (RIBEIRO-VIANA *et al.*, 2016).

Figura 9. Estrutura de análogos sintéticos de alcaloides 3-alkilpiridínicos **V-X** e suas respectivas atividades antiplasmodiais frente cepa W2 de *P. falciparum* resistente à cloroquina (RIBEIRO-VIANA et al., 2016)



Os estudos de interação desses compostos com o grupo heme livre, que envolveram cálculos teóricos *ab initio* baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e, complementarmente, titulação supramolecular por UV-vis, demonstraram que o processo de interação entre os compostos **V-X** e o grupo heme ocorre em razões molares 1:1 e 2:1 (Figura 10), sendo que o complexo 2:1 (modo de interação 3) é mais estável que os complexos 1:1. Os complexos 1:1, de estabilidades semelhantes, podem assumir duas orientações diferentes entre si, uma envolvendo principalmente a interação do nitrogênio piridínico como o ferro do grupo heme (modo de interação 1) e outra envolvendo a interação de um grupo nucleofílico da cadeia alifática com o íon metálico do heme (modo de interação 2).

Figura 10. Modos de interação propostos por Ribeiro-Viana et. al. (2016) para os complexos supramoleculares entre VI (em preto) e o grupo heme (em azul).



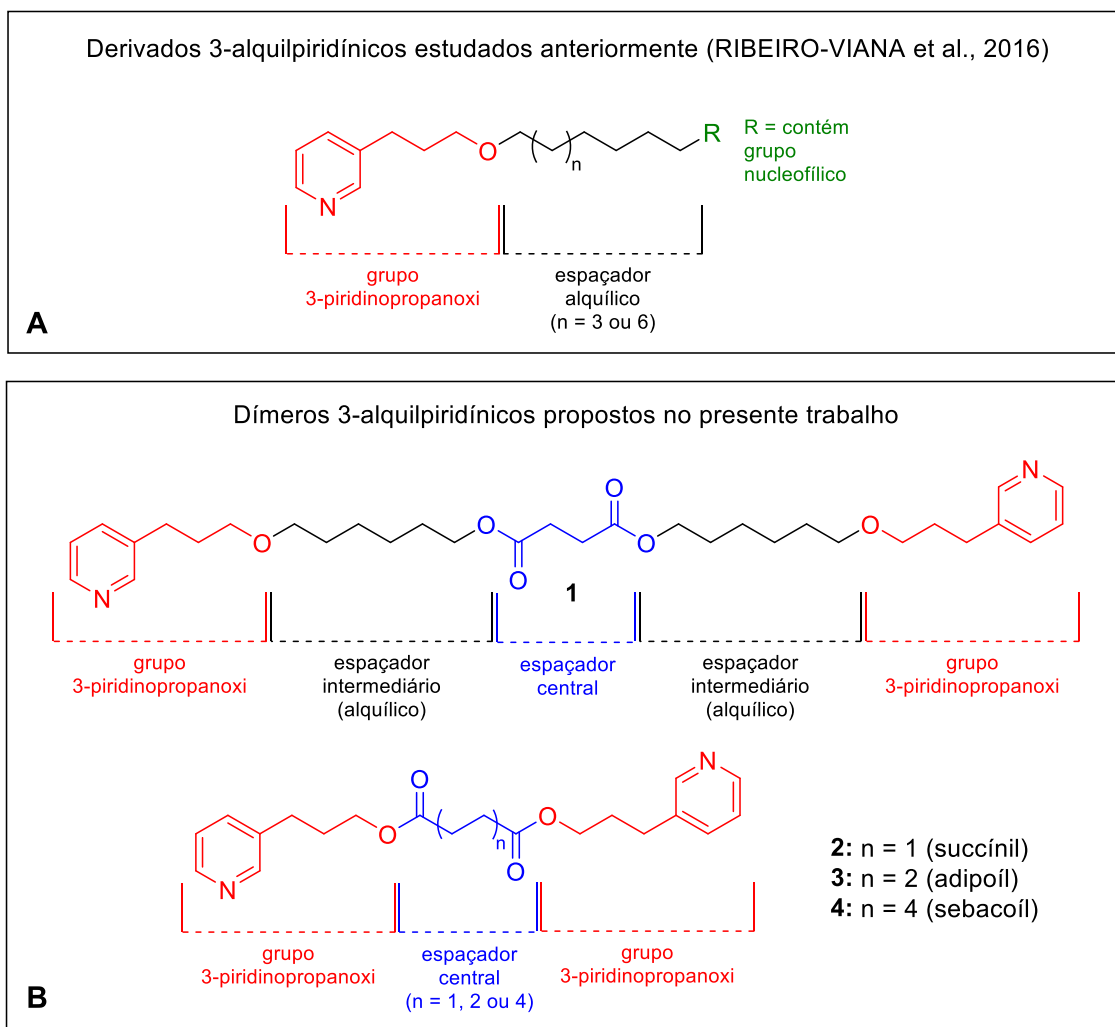
No presente trabalho, propõe-se a investigação do potencial antiplasmodial de uma série de dímeros homólogos derivados do 3-piridinopropanol (1-4, Figura 11) estruturalmente baseados nas evidências teóricas e experimentais dos estudos descritos por Ribeiro-Viana *et. al.* (2016) indicadas abaixo:

- O nitrogênio piridínico participa de interação importante com o ferro do grupo heme para formação dos complexos entre derivados 3-alkilpiridínicos estudados;
- Os complexos 2:1 (heme/ligante) são os modos de complexação mais favoráveis no equilíbrio termodinâmico;
- O comprimento da cadeia alifática do ligante é importante para permitir a formação do complexo 2:1.

Dessa forma, tendo em vista que a dimerização da porção 3-piridinopropanoxi pode favorecer a formação do complexo 2:1, de modo que os dímeros promovam potencialmente a inibição de formação de hemozoína e, por consequência, apresentem atividade antiplasmodial, os dímeros **1-4** foram propostos (Figura 11, A). De modo geral, suas estruturas são constituídas de duas unidades 3-piridinopropanoxi (em vermelho, na Figura 11) espaçadas por uma cadeia alifática e linear. Os dímeros **1** e **2** apresentam como espaçador central o grupo succínico (em azul). O primeiro constitui-se, adicionalmente, de cadeia espaçadora intermediária de seis carbonos (em preto), que deverá contribuir para manter o maior distanciamento entre as unidades 3-piridinopropanoxi (18 átomos), em relação aos demais componentes da série. De certa forma, o dímero **1**, dentre os quatro dímeros propostos, carrega maior identidade estrutural com as substâncias do estudo precursor (Figura 11, B), ao preservar o oxigênio da unidade 3-piridinopropanoxi constituindo grupo éter com cadeia alquílica e por isso, poderá validar a importância desse grupo na formação de associações complementares com o heme, com base nos resultados de estudos de interação. O dímero **2**, por outro lado, corresponde ao componente da série em que as unidades funcionais se apresentam mais próximas (4 átomos) e, assim como em seus homólogos (dímeros **3** e **4**), mas distintamente de **1**, em sua estrutura o oxigênio da unidade 3-piridinopropanoxi forma grupo éster, cuja relevância na interação com grupo heme poderá ser avaliada. A série homóloga (dímeros **2**, **3** e **4**), poderá permitir a avaliação de como diferentes extensões dos grupos espaçador central afetam a formação de complexos 2:1.

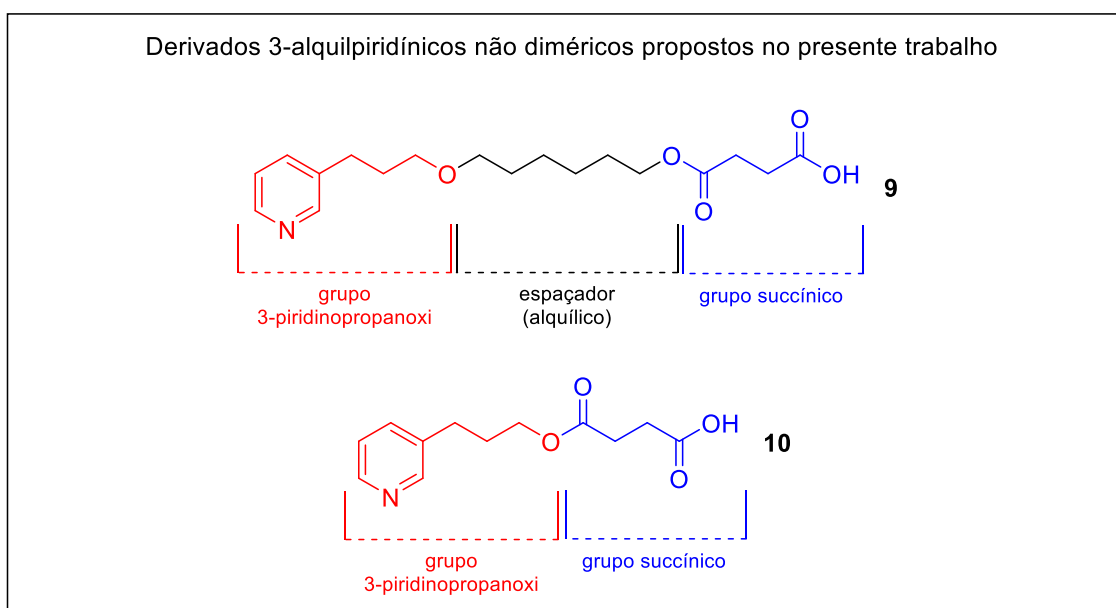
Dessa forma, os dímeros sintetizados devem ser avaliados, em primeiro momento quanto a capacidade de interação e afinidade com a hematina (heme livre), por meio de ensaios de titulação espectroscópica de absorção no UV-vis e, futuramente, quanto suas atividades antiplasmodiais frente a *P. falciparum*.

Figura 11. Planejamento da série de dímeros 3-alquilpiridínicos.



Complementarmente, dois derivados não diméricos do 3-piridinopropanol, os compostos **9** e **10** (Figura 12), foram também planejados com vista a sua avaliação frente a ensaios de interação e afinidade com a hematina. As estruturas desses compostos contêm unidades estruturais presentes nos dímeros **1** e **2**, respectivamente, e apresentam terminalmente grupo succínico, com uma carboxila livre. A comparação da atividade inibitória da agregação de hematina desses compostos e dos dímeros correspondentes, permitirá identificar a relevância da proposta de dimerização na aquisição de substâncias com potencial antimalárico.

Figura 12. Estrutura de derivados 3-alkilpiridínicos não dimérico propostos.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa a síntese de uma série de dímeros derivados do 3-piridinopropanol e a avaliação destes em relação ao potencial de inibir a formação de hemozoína e em relação as suas atividades antiplasmodiais frente ao *Plasmodium falciparum*.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar estruturalmente dímeros derivados de 3-piridinopropanol e de derivados não diméricos, contendo os grupos succínil, adípoil e sebacoil como espaçadores.
- Avaliar a interação dos dímeros com o grupo heme, a partir da determinação das respectivas constantes de dissociação e da estequiometria destas interações através da titulação espectroscópica de absorção UV-vis.

3. PROPOSTA DE SÍNTESE

Os dímeros **1**, **2**, **3** e **4**, compostos inéditos na literatura, podem ser obtidos em única etapa, por esterificação, a partir de um álcool e diferentes diácidos carboxílicos. O álcool precursor do dímero **1** é o 3-piridinopropoxiexanol (**5**), enquanto os dímeros **2-4** podem ser obtidos a partir do 3-piridinopropanol, disponível comercialmente. As estruturas dos dímeros planejados estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estruturas dos dímeros **1**, **2**, **3** e **4** e seus precursores sintéticos.

Dímero	Grupo espaçador*	Precursor álcool	Precursor ácido dicarboxílico
1	succinil	3-piridinopropoxiexanol (5)	Ácido succínico (ácido 1,4-butanodióico)
2	succinil	3-piridinopropanol	Ácido succínico (ácido 1,4-butanodióico)
3	adipoil	3-piridinopropanol	Ácido adípico (ácido 1,6-hexanodióico)
4	sebacoil	3-piridinopropanol	Ácido sebásico (ácido 1,10-decanodióico)

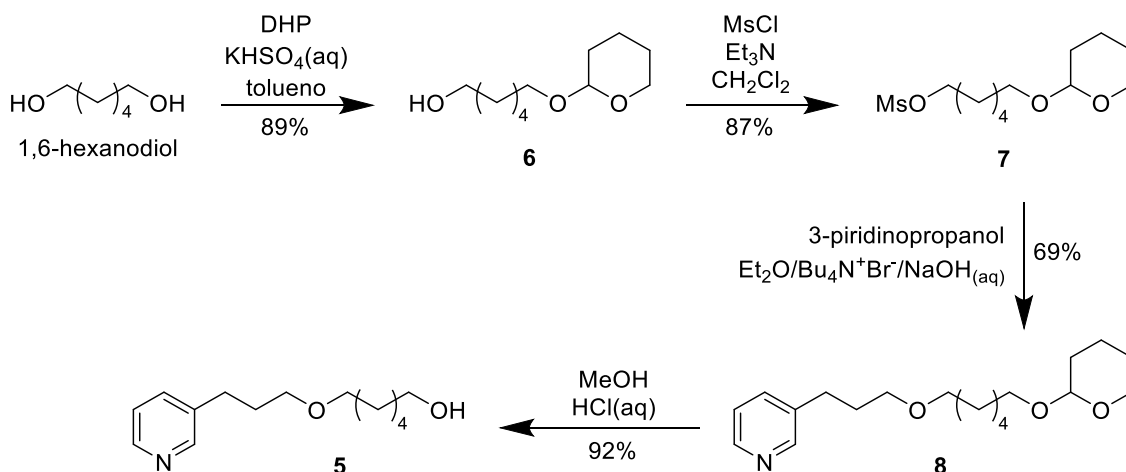
1
2 n = 1
3 n = 2
4 n = 4

*Grupo espaçador em azul

O álcool **5** pode ser obtido pela metodologia descrita por Gonçalves e colaboradores (2014), que envolve uma rota sintética de quatro etapas, partindo-se do 1,6-hexanodiol e do 3-piridinopropanol (

Figura 13).

Figura 13. Rota sintética para obtenção do composto **5** proposta por Gonçalves e colaboradores (2014).



Diversas metodologias podem ser empregadas para a obtenção de ésteres a partir de álcoois. Desde a reação desenvolvida por Fischer em 1895 (FISCHER; SPEIER, 1895) em que ácidos carboxílicos são aquecidos com álcoois sob catálise ácida, muitas metodologias foram desenvolvidas, que utilizam diferentes ácidos próticos ou ácidos de Lewis. A obtenção de ésteres pela reação de Fischer exige um bom controle sobre o equilíbrio químico. A reação produz, além do éster, água, que em meio ácido pode causar a hidrólise do éster, levando a sua deposição aos reagentes originais. Dessa forma, é comum que se utilize peneiras moleculares ou um sistema de destilação acoplado ao meio, visando a remoção de água (CHEN; MUNOT, 2005; KOMURA *et al.*, 2008).

Dentre as metodologias mais usuais, estão as que envolvem haletos de acila (principalmente cloretos de acila). Além dos haletos de acila disponíveis comercialmente, podem ser utilizados aqueles preparados a partir de ácidos carboxílicos por reação com tricloreto ou pentacloreto de fósforo (PCl₃ ou PCl₅), cloreto de tionila (SOCl₂) ou de oxalila (C₂O₂Cl₂), o que torna o processo bastante versátil. Uma desvantagem dessas metodologias, no entanto, é que os reagentes envolvidos na conversão dos ácidos carboxílicos a haletos de acila são bastante tóxicos. Ésteres também podem ser obtidos a partir de anidridos, em presença de base. No entanto, os anidridos são menos reativos que os haletos de acila e, por serem formados a partir de do acoplamento de dois ácidos

carboxílicos, as reações que os empregam desperdiçam um equivalente de ácido carboxílico como grupo abandonador. Por razão disso, as esterificações que partem de anidridos mais comumente empregam anidrido acíclicos de baixo custo, como o anidrido acético e o anidrido benzóico, ou os cíclicos, formados a partir de ácidos dicarboxílicos, como o anidrido succínico e o anidrido maléico (MCMURRAY, 2021).

São também utilizadas amplamente as metodologias que derivam da esterificação de Steglich (BERNHARD; WOLFGANG, 1978), que utilizam carbodiimidas como agente de acoplamento e, nas quais usualmente são empregadas quantidades catalíticas de DMAP (*N,N*-4-dimetilaminopiridina). Esses métodos são de fácil execução e, de forma geral, apresentam bons rendimentos na conversão direta de ácidos carboxílicos em ésteres. Além da DCC (1,3-dicicloexilcarbodiimida), uma das primeiras carbodiimidas desenvolvida como reagente de esterificação e relacionada à metodologia de Steglich, outras carbodiimidas são disponíveis comercialmente, sendo as mais comuns a EDC (*N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e a DIC (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida). A DCC é o reagente de menor custo dentre todos, no entanto, fornece como produto de hidrólise uma ureia (DCU, *N,N'*-dicicloexilureia) que é em maior parte removida por filtração, mas que permanece em alguma quantidade no bruto reacional, sendo de difícil separação. Em relação a DCC, a DIC apresenta como produto de hidrólise, a *N,N'*-diisopropylurea que é bastante solúvel em solventes orgânicos e favorece os processos de purificação do produto desejado (GILLES *et al.*, 2015).

Ainda, de modo mais específico, outros agentes de acoplamento não pertencentes à classe das carbodiimidas também podem ser empregados em esterificação direta de ácidos carboxílicos e álcoois, tais como o 2-ditienilcarbonato (2-DTC), o *N,N'*-carbonildiimidazol (CDI) e o anidrido trifluoroacético (TFAA) (GILLES *et al.*, 2015).

Dessa forma, com base nas considerações acima, visando o uso de um método eficiente e seguro, a síntese dos dímeros **1-4** foi planejada como um processo *one-pot*, em que ácidos dicarboxílicos seriam diesterificados com álcoois contendo o fragmento estrutural 3-alkilpiridína, em presença de DIC e DMAP (Figura 14).

O desenvolvimento e o resultado das propostas de síntese para os compostos **1-5** e **9-10**, os mecanismos das reações envolvidas, bem como a caracterização dos compostos obtidos, apresentam-se discutidos na seção seguinte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

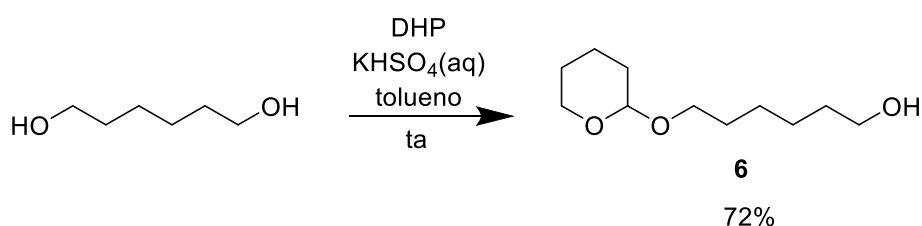
4.1 Síntese

4.1.1 Síntese do precursor **5**

Uma etapa prévia fundamental para funcionalização seletiva de dióis terminais é a diferenciação da reatividade dos grupos hidroxilas, sendo que a estratégia de monoproteção permite a preservação de um desses grupos, enquanto o outro grupo continua disponível a reagir.

Sendo assim, a síntese do precursor **5**, foi iniciada pela proteção de uma das hidroxilas do 1,6-hexanodiol por reação com 3,4-diidro-2*H*-pirano (DHP), em tolueno, formando um acetal (**6**), com rendimento de 72% (Figura 16). O meio reacional se caracterizou por ser um sistema bifásico, constituído por uma fase aquosa ácida (devido a dissolução do hidrogenossulfato de potássio, KHSO₄) e por uma fase orgânica (tolueno). O diol se encontra majoritariamente concentrado na fase aquosa, onde irá reagir com o DHP em presença do íon hidrônio (H₃O⁺) e formar o monoéter **6**, sendo que esse irá migrar para a fase orgânica e, assim, não irá mais reagir, devido a ausência das espécies catalíticas na fase orgânica (essas se encontram presentes na fase aquosa). Dessa forma, há a formação seletiva da espécie monoprotetida (NISHIGUCHI *et al.*, 2000).

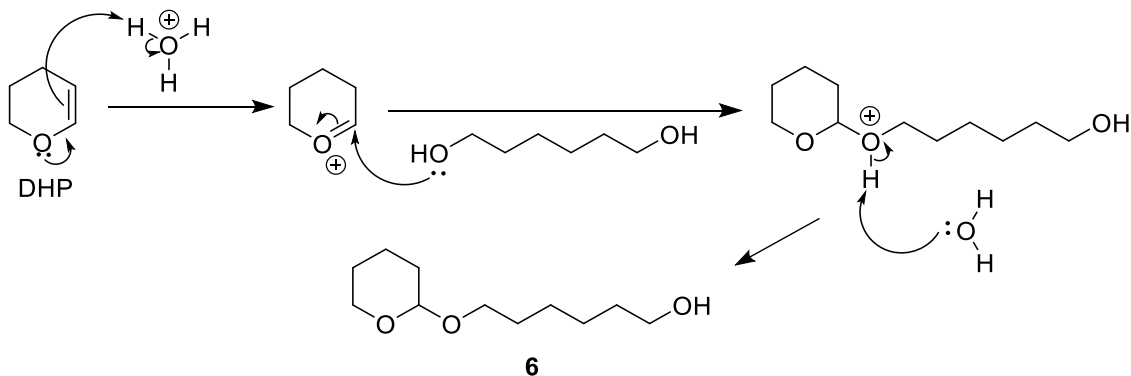
Figura 16. Condições e rendimento da reação de formação do acetal **6** a partir do 1,6-hexanodiol.



A formação do acetal **6**, em meio ácido, decorre da reação entre uma das hidroxilas do 1,6-hexanodiol (empregado em excesso, de modo a favorecer a formação do derivado mono-THP, **6**) e o DHP protonado, seguida da desprotonação do intermediário formado, de acordo com o esquema ilustrado na Figura 16. A reação foi interrompida após 2h, sem que fosse observado o

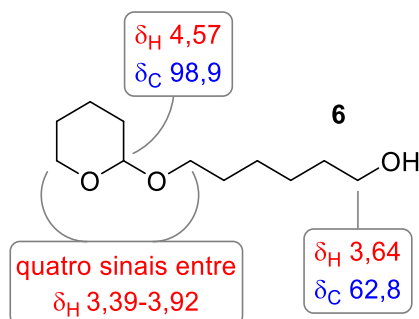
consumo total do material de partida (1,6-hexanodiol), com o intuito de se evitar a formação do diacetal correspondente.

Figura 17. Mecanismo proposto para a reação de formação do acetal **6** a partir do 1,6-hexanodiol.



O composto **6** foi purificado por coluna cromatográfica e sua caracterização foi realizada comparando-se os dados experimentais de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C com os disponíveis na literatura (GONÇALVES *et al.*, 2014). Em seu espectro de RMN de ^1H , observa-se o sinal em δ_{H} 4,57, atribuído ao hidrogênio acetálico, caracterizando a presença do grupo THP, o tripleto em δ_{H} 3,64 atribuído aos hidrogênios carbinólicos (CH_2OH), além de quatro sinais entre δ_{H} 3,39 e δ_{H} 3,92, atribuídos aos hidrogênios diasterotópicos dos carbonos metilênicos ligados oxigênios do grupo THP. No espectro de RMN de ^{13}C , o sinal em δ_{C} 98,86 foi atribuído ao carbono acetálico e o sinal em δ_{C} 62,80 foi atribuído ao carbono ligado a hidroxila (Figura 18).

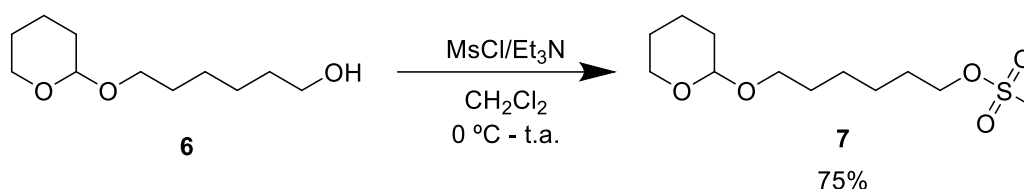
Figura 18. Atribuição parcial dos sinais de RMN de **6**.



Com vistas à obtenção do composto **5**, um éter derivado do reagente comercial 3-piridinopropanol, o álcool **6** foi previamente submetido à reação de

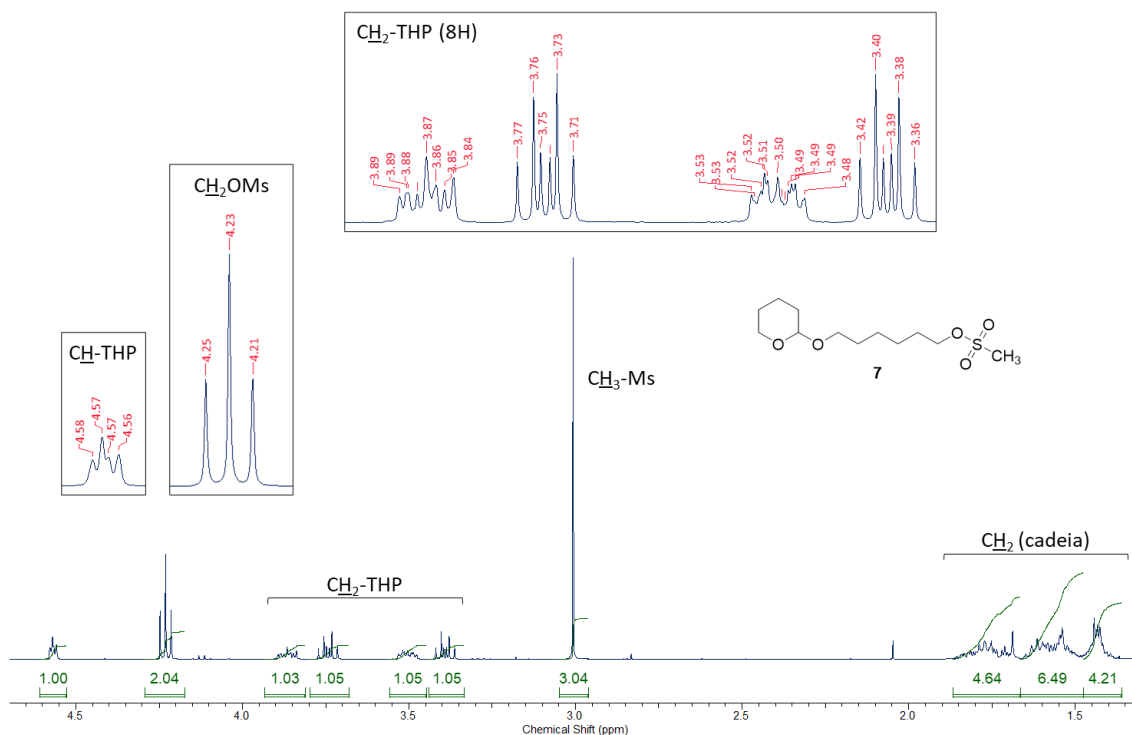
mesilação pela reação com cloreto de mesila em diclorometano seco, em presença de trietilamina (Figura 19). A reação de mesilação ocorre por meio do mecanismo de substituição nucleofílica, onde o ataque nucleofílico provoca a saída do grupo abandonador (cloreto, nesse caso).

Figura 19. Condições da reação de mesilação da hidroxila livre do composto **6**, para obtenção de **7**.



O composto **7** foi obtido como um óleo incolor com um rendimento de 75%. A caracterização do composto **7** foi feita comparando-se os dados dos espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C com os dados disponíveis na literatura (GONÇALVES *et al.*, 2014). No espectro de RMN de ^1H (Figura 20), destacam-se o sinal em δ_{H} 4,57, atribuído ao hidrogênio metínico do grupo THP, o tripleto em δ_{H} 4,23, atribuído aos hidrogênios do carbono ligado ao oxigênio do grupo mesilato e o simpleto em δ_{H} 3,05 respectivo à metila do grupo mesilato.

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H do composto **7** (CDCl_3 , 400 MHz) com atribuição dos sinais.



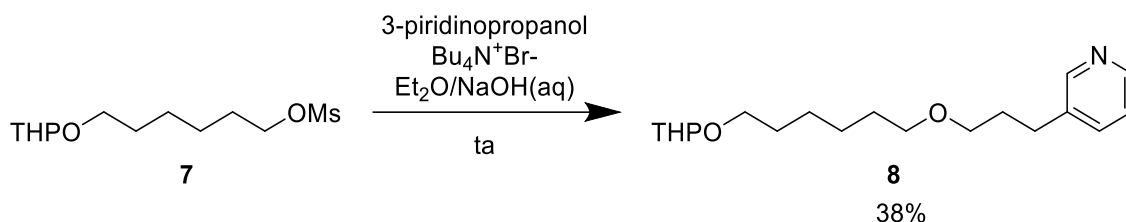
O composto **7** foi submetido à eterificação por reação com 3-piridinopropanol em meio básico, mediada por catálise de transferência de fase, para formar o derivado **8**, precursor direto do composto **5**.

A catálise de transferência de fase aplica-se em reações de sistema bifásico e se baseia na atuação de um agente transferidor, sendo esse um composto com capacidade de permear entre os meios aquoso e orgânico, além de formar par iônico com ânions e fazer com que esses também possuam essa capacidade de permeação, o que possibilita a interação entre espécies químicas dos diferentes meios e aumenta a velocidade reacional. Os catalisadores de transferência de fase mais comuns são os sais de amônio quaternários (LUCHESE; MARZORATI, 2000). A catálise de transferência de fase foi escolhida, nesse caso, visando-se maior facilidade operacional, já que a reação clássica de Williamsom requer solventes anidros e baixas temperaturas (LUCHESE; MARZORATI, 2000; WILLIAMSOM, 1852).

Para a obtenção do composto **8** (Figura 21), o catalisador de transferência de fase utilizado foi o brometo de tetrabutilamônio. O sistema

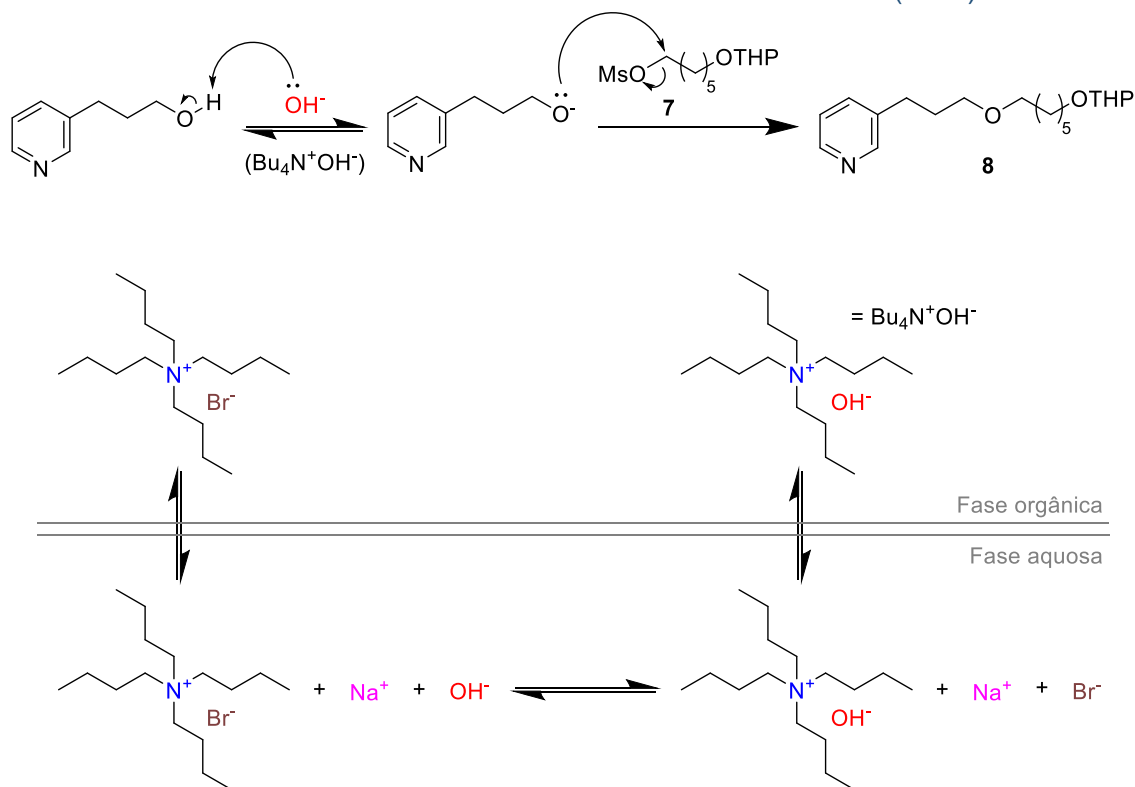
bifásico foi constituído de éter etílico e solução aquosa de hidróxido de sódio 50% (m/v). O composto **8** foi obtido com 38% de rendimento.

Figura 21. Condições e rendimento da reação de eterificação por catálise de transferência de fase para obtenção de **8**.



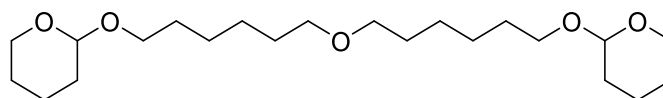
De acordo com o mecanismo proposto por Starks para reações de catálise de transferência de fase (Figura 22) (STARKS, 1971; STARKS; OWENS, 1973) o brometo de tetrabutilamônio interage com o íon hidróxido, formando assim o par iônico que possibilita sua passagem para o meio orgânico. Na fase orgânica, o hidróxido deve desprotonar a hidroxila do 3-piridinopropanol, gerando o alcóxido correspondente. Esse alcóxido, por sua vez, realiza um ataque nucleofílico no composto **7**, promovendo assim uma S_N2 que resultará na formação do composto **8**.

Figura 22. Mecanismo proposto para a reação de eterificação sob condições de catálise de transferência de fase de acordo com Starks (1971)



Especula-se, com base nas placas de CCD desenvolvidas durante o curso da reação e no espectro de RMN de ^1H , a formação de um co-produto no bruto reacional, e que o baixo rendimento da síntese do composto **8** se deve à ocorrência de hidrólise do grupo mesilato de **7**, que resulta na formação de **6**. O co-produto isolado corresponde ao éter formado pela reação entre **7** e o álcool **6** (Figura 23).

Figura 23. Estrutura do co-produto obtido na reação de catálise de transferência de fase para obtenção do composto **8**.

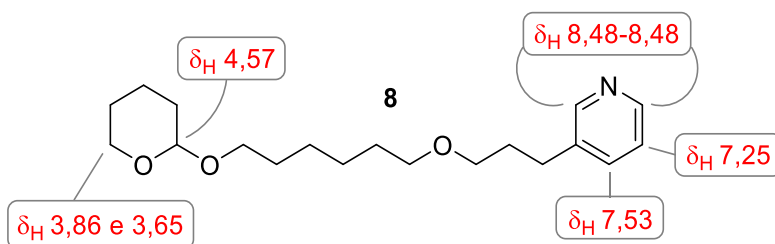


co-produto da reação de obtenção do composto **8**

A caracterização do composto **8**, obtido como um líquido incolor, foi realizada através da análise dos dados obtidos por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , que se mostraram de acordo os dados disponíveis na literatura (GONÇALVES *et al.*, 2014). Pela análise de seu espectro de RMN de ^1H , atribuiu-se os sinais

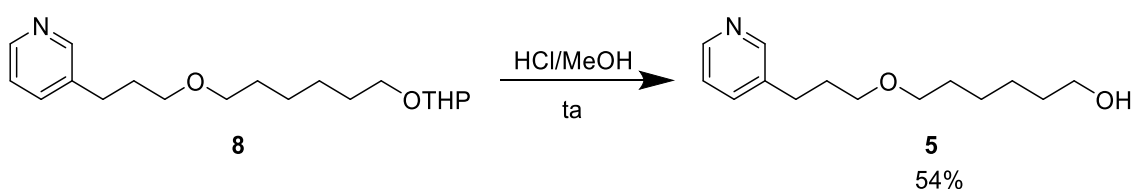
em δ_H 8,48, 7,53 e 7,25 aos hidrogênios do anel piridínico, enquanto o sinal em δ_H 4,57 foi atribuído ao metino do grupo THP. Os sinais δ_H 3,86 e 3,65 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos adjacentes ao oxigênio do grupo THP (Figura 24). Os demais sinais são referentes aos demais grupos metilênicos presentes em sua estrutura.

Figura 24. Atribuição parcial dos sinais de RMN de 1H de **8**.



A desproteção da hidroxila do composto **8**, pela remoção do grupo tetraidropiranoil (THP), para formação de do álcool **5** (Figura 25) foi alcançada com 54% de rendimento. Para isso, tratou-se o composto **8** com solução metanólica de ácido clorídrico, à temperatura ambiente.

Figura 25. Condições da reação de hidrólise ácida do acetal **8**, para obtenção do composto **5**.

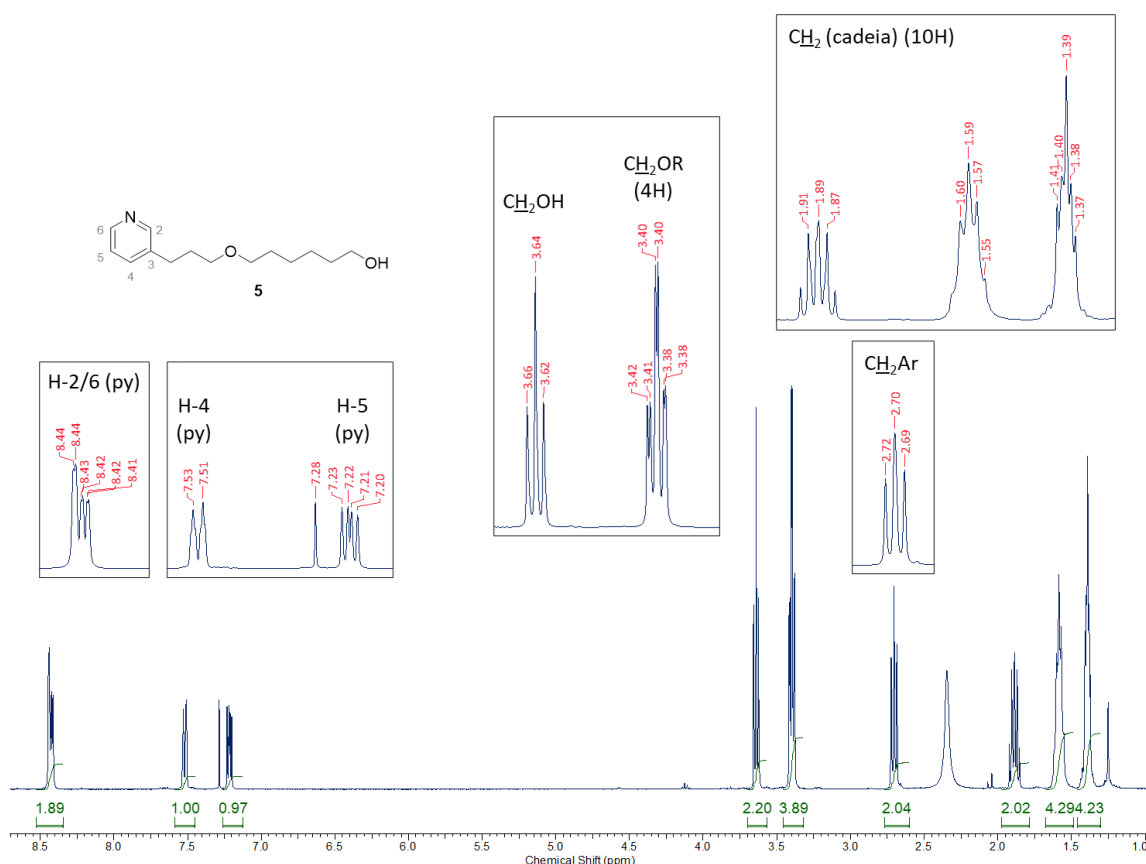


A hidrólise do grupo acetal ocorre por mecanismo reverso ao de sua formação. A protonação do oxigênio acetálico favorece a eliminação de DHP e formação do álcool **5**.

O composto **5** foi caracterizado por RMN de 1H e RMN de ^{13}C . Comparou-se esses dados com os disponíveis na literatura (GONÇALVES *et al.*, 2014). No espectro de RMN de 1H de **5** (Figura 26), o sinal em δ_H 8,44 foi atribuído a H-2 e H-6 (sinais sobrepostos) e o sinal δ_H 7,22 atribuído ao H-5 do anel piridínico. O sinal em δ_H 7,52 foi atribuído a H-4 do anel piridínico, sendo

este último um duplete com constante de acoplamento de 7,7 Hz, resultante de acoplamento 3J . O sinal em δ_H 3,65 foi atribuído aos hidrogênios do metileno ligado à hidroxila, e o sinal em δ_H 3,40 aos hidrogênios dos metilenos ligados ao oxigênio do grupo éter.

Figura 26. Espectro de RMN de 1H do composto **5** ($CDCl_3$, 400 MHz) com atribuição dos sinais.

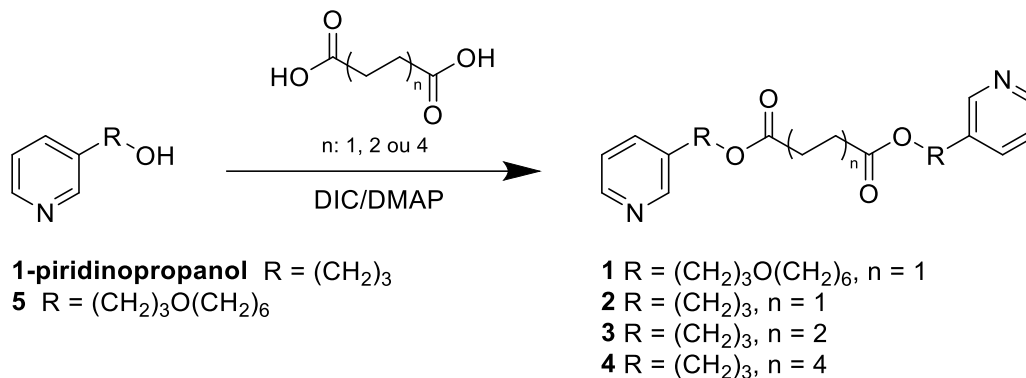


4.1.1 Síntese dos dímeros **1-4**

Os dímeros **1-4** foram obtidos em etapa única a partir da reação entre ácidos dicarboxílicos e álcoois correspondentes, empregando como agentes de acoplamento a diisopropilcarbodiimida (DIC), em presença de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), por adaptação da metodologia de Steglich (KUSAKA *et al.*, 2003) (Figura 27). As carbodiimidas são compostos caracterizados pelas ligações duplas acumuladas entre um átomo de carbono e átomos de nitrogênio ($RN=C=NR$) e destacam-se como agentes de acoplamento

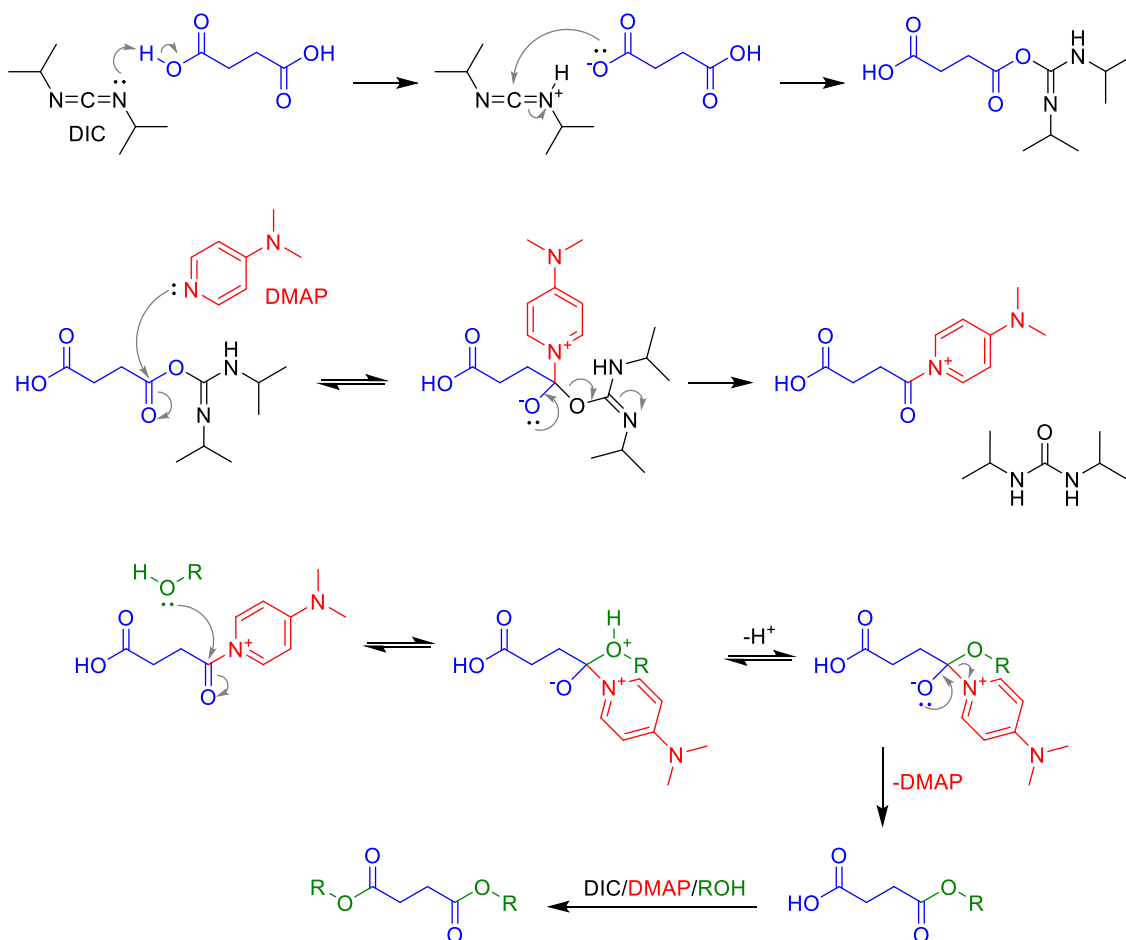
principalmente na química de polímeros e na síntese de peptídeos, amidas e ésteres (KHORANA, 1953; WANG, YANG; ZHANG; XI, 2020).

Figura 27. Metodologia de esterificação empregada para a obtenção dos dímeros **1-4**.



O mecanismo proposto para reação que levou à formação dos dímeros **1-4**, está apresentado na Figura 28 (BERNHARD; WOLFGANG, 1978). As esterificações mediadas por carbodiimida (DIC, no caso), envolvem a formação de um intermediário O-acilisoureia (I), cuja reatividade é similar a de um anidrido de ácido. O DMAP, nesse contexto, desempenha catálise nucleofílica, reagindo com o intermediário O-acilisoureia e formando um intermediário reativo (II) que sofre substituição nucleofílica ao reagir com o álcool, para formar o éster correspondente.

Figura 28. Mecanismo proposto para reação de formação dos dímeros 1-4 (BERNHARD; WOLFGANG, 1978).



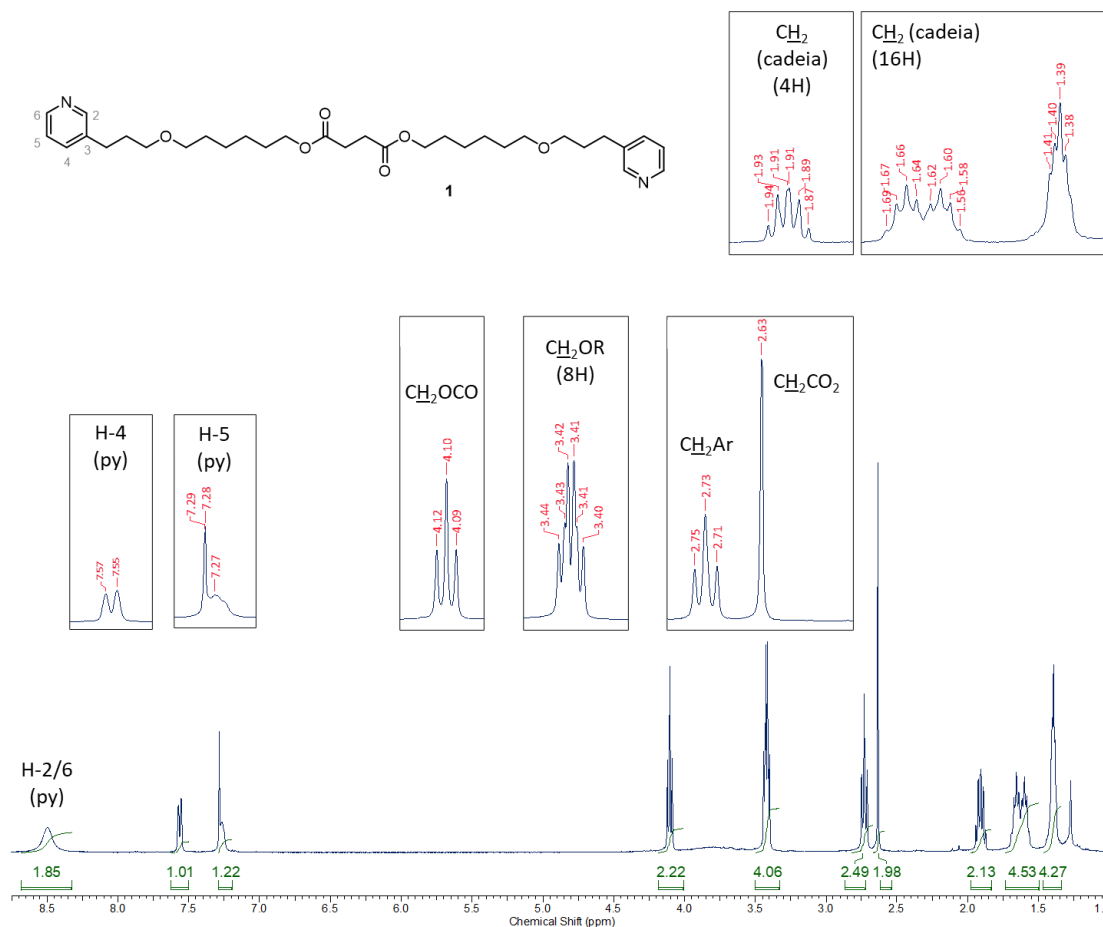
O dímero **1**, inédito na literatura, foi obtido com um rendimento global baixo (0,62%) principalmente devido ao baixo rendimento da etapa de final. O dímero **1** foi obtido a partir do álcool **5**, com apenas 4% de rendimento (resultando em apenas 17 mg de **1**). As placas de CCD desenvolvidas durante o curso reacional e a partir do produto bruto, evidenciaram a conversão completa dos reagentes no produto desejado, no entanto, houve dificuldades de se retomar esse composto na quantidade esperada após submetê-lo à coluna cromatográfica.

Os dímeros **2**, **3** e **4**, também inéditos na literatura, foram obtidos em única etapa a partir do 3-piridinopropanol e dos ácidos dicarboxílicos succínico, adípico e sebásico, respectivamente, com rendimentos entre 60 e 100%, a partir da mesma metodologia que permitiu a obtenção do dímero **1**.

Os dímeros **1-4** foram caracterizados por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os dados espectrais estão nos itens 6.2.6 e 6.2.7 e os espectros estão apresentados no Apêndice 8.1. Nessa seção, representativamente, segue descrita a atribuição dos dados de RMN do dímero **1** (Figura 29 e Figura 30).

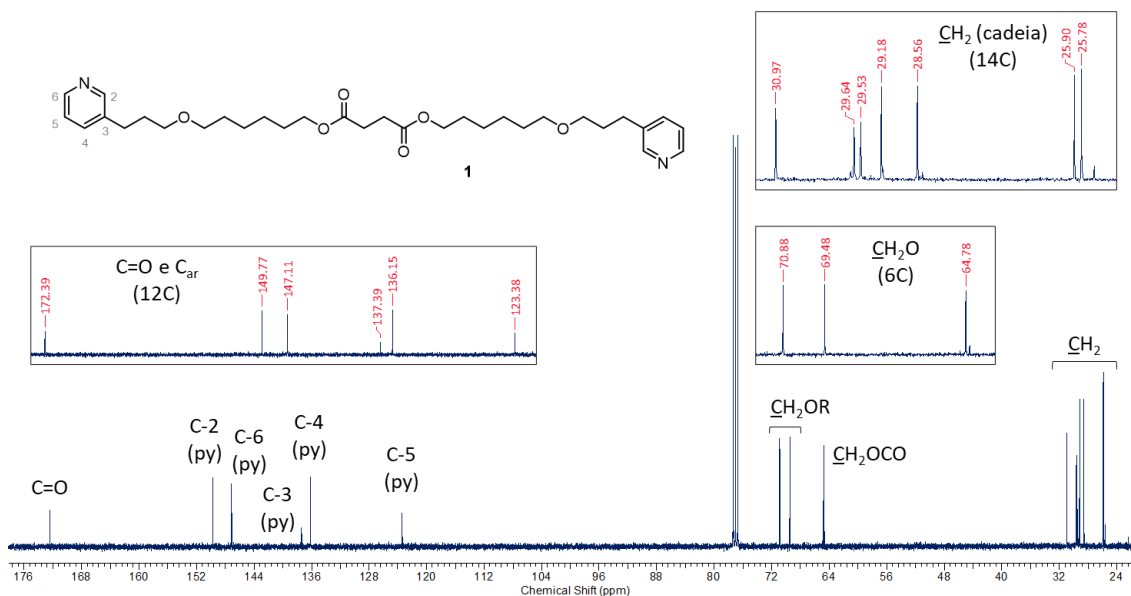
No espectro de RMN de ^1H de **1** (Figura 29), os hidrogênios do grupo piridino foram observados em δ_{H} 8,47 (H-2/H-6), δ_{H} 7,55 (H-4) e δ_{H} 7,27 (H-5). O tripleto em δ_{H} 4,10 ($^3J = 6,4$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios dos grupos metilenos ligados a oxigênio da carboxila de éster (CH_2OCO). Os hidrogênios dos grupos metilenos ligados a oxigênio do grupo éter (CH_2OR) foram evidenciados pelo sinal em δ_{H} 3,41, enquanto os hidrogênios metilênicos adjacentes ao grupo piridínico (CH_2Ar) forneceram o tripleto em δ_{H} 2,73. O simpleto em δ_{H} 2,63 caracteriza os grupos metilenos constituintes da porção succinil (CH_2CO_2). Os sinais em δ_{H} 1,91 e δ_{H} 1,63 e o multiplete em δ_{H} 1,41-1,32 são referentes aos demais hidrogênios metilênicos (20H).

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do dímero **1** (CDCl_3 , 400 MHz) com atribuição dos sinais.



Dentre os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C de **1** (Figura 30), foram atribuídos aos carbonos do anel piridínico, os sinais em δ_{C} 149,47 (C-2), δ_{C} 147,07 (C-6), δ_{C} 137,35 (C-3), δ_{C} 136,11 (C-4) e δ_{C} 132,24 (C-5). O grupo succínico foi caracterizado pelo sinal em δ_{C} 172,35, referente aos carbonos carbonílicos (C=O) e por um dos sinais entre δ_{C} 30,97 e δ_{C} 25,78. Em δ_{C} 70,88 e δ_{C} 69,48 foram observados os sinais referentes aos metilenos ligados ao oxigênio do grupo éter ($\text{C}\text{H}_2\text{OR}$) e em δ_{C} 64,78 o sinal atribuído ao metileno ligado ao oxigênio da carboxila de éster ($\text{C}\text{H}_2\text{OCO}$). Os outros seis sinais entre δ_{C} 30,97 e δ_{C} 25,78 são referentes aos demais grupos metilênicos da cadeia alifática.

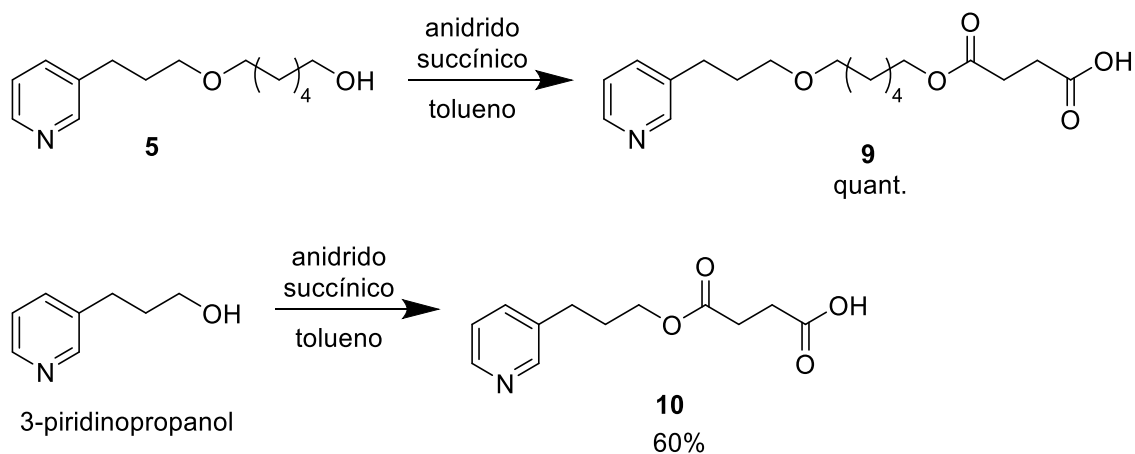
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C do dímero **1** (CDCl_3 , 100 MHz) com atribuição dos sinais.



4.1.2 Síntese dos compostos **9** e **10**

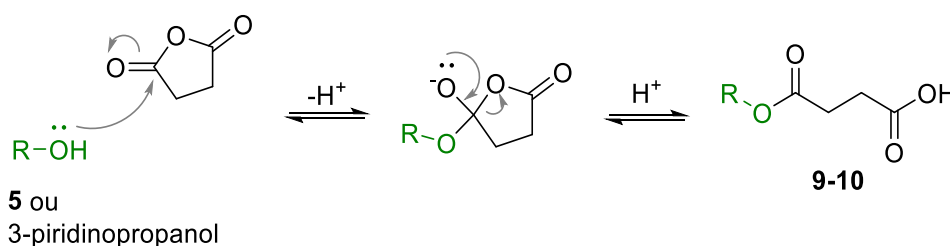
Os ácidos **9** e **10** foram obtidos em única etapa a partir da reação dos álcoois 3-piridinopropoxiexanol (**5**) e 3-piridinopropanol, respectivamente, com anidrido succínico, em tolueno, de acordo com metodologia adaptada de Catry e Maddre (2007) e ilustrada nos esquemas apresentados na Figura 31. O composto **9** foi obtido com rendimento quantitativo e o composto **10** como 60% de rendimento.

Figura 31. Condições e rendimentos das reações para a obtenção dos compostos **9** e **10**.



A reação ocorre por mecanismo de substituição a carbonila. Na primeira etapa, a hidroxila primária do álcool ataca nucleofílicamente uma das carbonilas do anidrido succínico. O intermediário formado se decompõe espontaneamente pela reconstituição da carbonila (formação de éster) e saída da carboxila, o que resulta na abertura do ciclo de cinco membros (Figura 32).

Figura 32. Mecanismo da reação substituição nucleofílica à carbonila envolvido na formação dos compostos **9** e **10**.



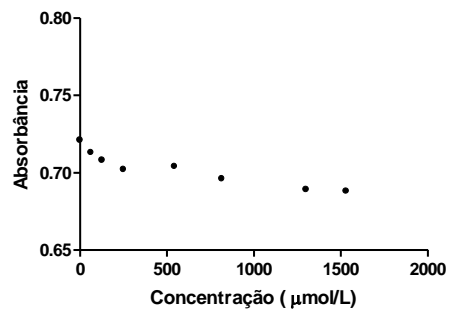
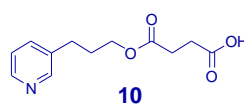
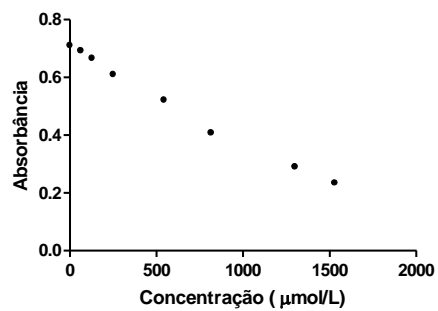
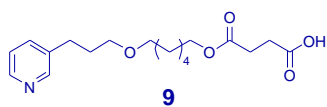
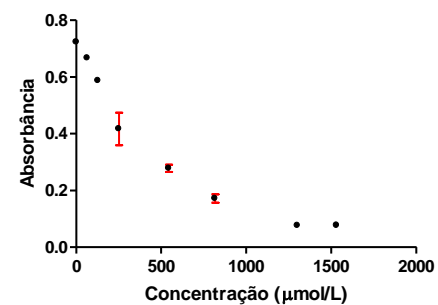
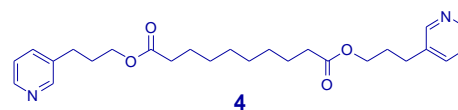
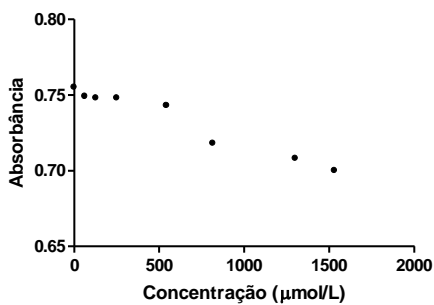
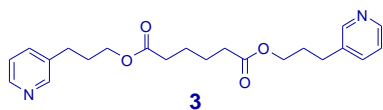
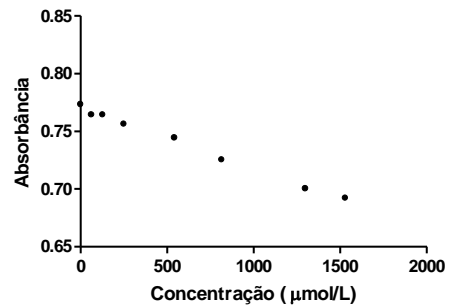
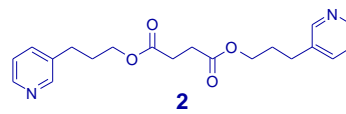
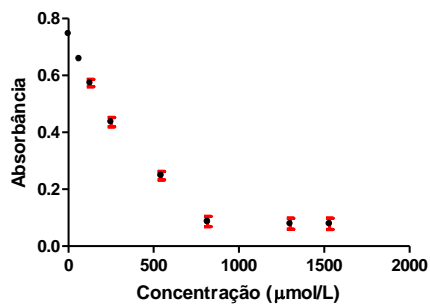
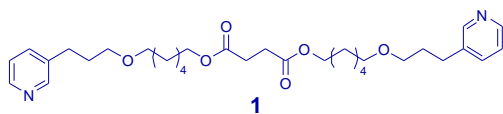
Os compostos **9** e **10** foram caracterizados por RMN de 1H e de ^{13}C . A Figura 33 apresenta a atribuição dos sinais que caracterizam suas estruturas. Os dados espectrais completos estão nos itens 6.2.8 e 6.2.9 e os espectros estão apresentados no Apêndice 8.1. Nessa seção, representativamente, segue descrita a atribuição dos dados de RMN que caracterizam o derivado carboxílico **9**.

No espectro de RMN de 1H de **9**, os sinais em δ_H 8,52-8,41 (H-2/H-6), δ_H 7,64 (H-4) e δ_H 7,35-7,25 (H-5) foram atribuídos aos hidrogênios piridínicos. O tripleto em δ_H 4,15 ($^3J = 6,40$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios do metileno ligado ao átomo de oxigênio da carboxila de éster. Os metilenos ligados ao oxigênio do grupo éter foram observados em δ_H 3,39-3,20. O sinal em δ_H 2,77 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos adjacentes ao anel piridínico. Os metilênicos do grupo succinil foram observados em δ_H 2,59-2,72. No espectro de RMN de ^{13}C de **9**, destaca-se a presença dos sinais em δ_C 175,1 (CO ácido) e δ_C 172,7 (CO éster) referentes aos carbonos carbonílicos e o sinal em δ_C 64,3 referente ao carbono metilênico ligado ao oxigênio do grupo éster.

ocorrência de interação ligante-receptor, como quantitativo, como o cálculo da constante de dissociação (COLLIER *et al.*, 1979).

Os experimentos de titulação espectrofotométrica foram realizados para os dímeros **1-4** e para os compostos **9** e **10**. Suas respectivas absorbâncias *versus* concentrações foram inseridas em gráfico de dispersão XY, conforme mostra a Figura 34.

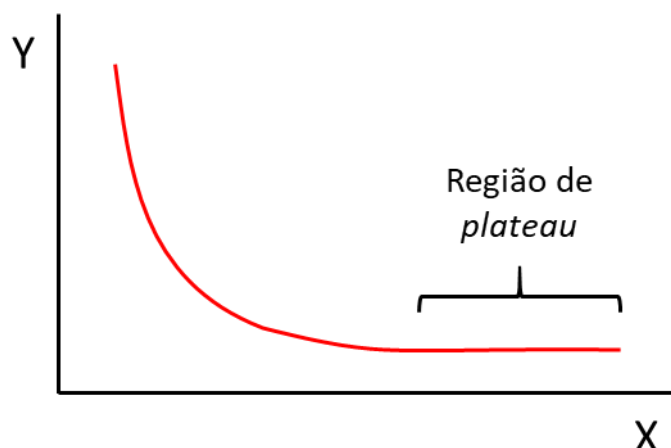
Figura 34. Gráficos de dispersão XY de absorvâncias *versus* concentrações resultantes de titulação no UV-vis das substâncias **1-4** e **9-10** com hematina.



O primeiro ponto a se destacar é que, para as substâncias avaliadas, os complexos formados entre hematina e cada um dos ligantes apresentam coeficiente de absorvidade molar menor que o da hematina na forma livre. Portanto, ao se adicionar o ligante na solução do receptor, existem duas ou mais espécies em solução que absorvem a luz em 401 nm: a hematina na forma livre e suas formas associadas ao ligante, que por possuírem menor absorvidade molar, contribuem para diminuição de absorbância nesse comprimento de onda. Entretanto, além desse, outros fatores podem contribuir para diminuição da absorção, como a agregação induzida por adição de outras substâncias (neste caso os ligantes), o que resultaria em precipitação das espécies responsáveis pela absorção da radiação no comprimento de onda observado (BASILICO *et al.*, 1998).

É importante salientar que a avaliação de interação supramolecular entre ligantes e receptores deve considerar a forma da curva do gráfico de dispersão XY. A associação reversível entre duas substâncias em solução ocorre conforme um equilíbrio entre as formas associadas e não-associadas e ao se adicionar mais ligantes ao meio, o equilíbrio desloca-se levando a maior formação do complexo. Como o complexo apresenta menor absorvidade molar, com o aumento da concentração do ligante, ocorre progressivamente a diminuição da absorbância do sistema. Porém, por mais que se adicione grande excesso do ligante frente ao receptor, a formação do complexo é limitada pela constante de associação/dissociação e pela concentração do receptor no meio. Ou seja, após um determinado ponto, mesmo com aumento da concentração de ligante, existe uma variação mínima na concentração do complexo formado e, portanto, da variação da absorbância observada. Equilíbrios de associação supramolecular apresentam curvas do tipo não-linear, respondendo a modelos matemático como de equações quadráticas e cúbicas. Gráfico com tendências paralelas ao eixo X, ou *plateau* (Figura 35) é um dado qualitativo importante que informa que existe associação supramolecular entre duas substâncias (GUIMARÃES, DANIEL SILQUEIRA MARTINS *et al.*, 2019; RIBEIRO-VIANA *et al.*, 2016; THORDARSON, 2011; VON KRBEK; SCHALLEY; THORDARSON, 2017).

Figura 35. Gráfico de dispersão XY hipotético com tendências paralelas no eixo X (região de plateau).



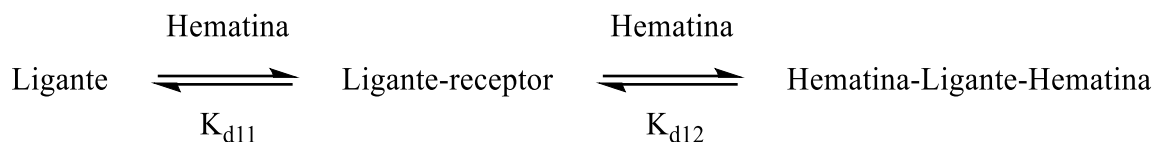
Observando-se os gráficos apresentados na Figura 34, identificou-se que apenas as substâncias **1** e **4** promoveram claramente a formação de um *plateau* e, portanto, apresentam uma interação substancial com a hematina. Gráficos sem definição clara de região paralela ao eixo X indica, também, que estes ligantes são fracos, e a inflexão da curva é muito suave devido à baixa constante de associação entre ambas.

Os dados quantitativos de afinidade foram calculados apenas para os compostos **1** e **4**, usando-se a plataforma Bindfit (Thordarson, 2015). As afinidades são calculadas em termos de constante de associação (K_a), porém serão apresentadas nesse trabalho como constante de dissociação ($K_d = 1/K_a$) devido ao significado prático que essa medida apresenta. A constante de dissociação (K_d) representa a metade da concentração necessária de ligante para se atingir a ocupação total dos receptores. Para os compostos **1** e **4** foram encontrados valores de K_d iguais a $71,17 \pm 2,87$ e $88,79 \pm 3,01 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Considerando que ambas as substâncias são diméricas e simétricas e, portanto, os grupos expostos nas extremidades são os mesmos, um modelo matemático para modos de interação 2:1 (heme/ligante) de não-cooperatividade foi utilizado para cálculo dos respectivos K_d . Esse modelo considera que a ligação de um primeiro grupo não interfere, positiva ou negativamente, na ligação do segundo (VON KRBEK; SCHALLEY; THORDARSON, 2017). Portanto, as duas constantes de dissociação, K_{d11} (constante de dissociação do complexo

1:1) e K_{d12} (constante de dissociação do complexo 2:1), apresentam valores iguais (Figura 36).

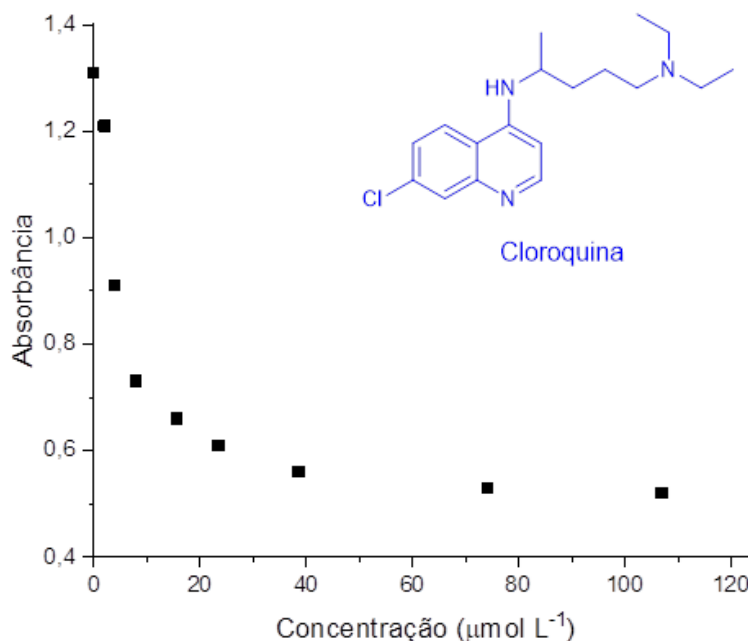
Figura 36. Equilíbrios da formação dos complexos 1:1 e 2:1 entre hematina (receptor) e os ligantes.



Essa abordagem mostrou-se válida, uma vez que os grupos químicos ativos (anel piridinico) não devem apresentar afinidades diferentes frente a moléculas de hematina, e também, considerando que para os ligantes **1** e **4**, que apresentam espaçadores longos, existe distanciamento mínimo para que não ocorra impedimento estérico para formação do complexo ternário hematina-ligante-hematina. Outros dados, resultantes de análise dos complexos por método *in silico* serão necessários para confirmação do arranjo estérico e energético considerado e serão obtidos futuramente.

De forma a se obter dados comparativos, realizou-se também o estudo da interação entre o grupo heme (ferriprotoporfirina IX) e a cloroquina, sendo que já é conhecido que essa substância é um ligante de alta afinidade, possui atividade antimalárica e que essa se dá através da interação com o grupo prostético em questão. Os dados obtidos na titulação espectrofotométrica da cloroquina com o heme são mostrados na Figura 37.

Figura 37. Gráfico de absorvâncias *versus* concentrações resultantes da titulação UV-vis da cloroquina com a hematina



Pode-se observar que a curva obtida nesse experimento segue o mesmo comportamento que as obtidas para os dímeros **1** e **4**, apresentando tendência paralela ao eixo das abcissas e atingindo o *plateau*. Os dados fornecidos nesse estudo foram tratados também pela plataforma Bindfit (Thordarson, 2015) utilizando o modelo de interação UV 1:1, sendo que se encontrou para o complexo formado cloroquina-heme o valor de K_d igual a $0,3 \pm 0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esse valor mostra que a cloroquina realmente é um ligante muito eficiente em relação ao grupo heme, sendo o valor de K_d encontrado para o complexo cloroquina-heme menor que os valores encontrados para os complexos formados entre o heme e os dímeros **1** e **4**. Porém, isso não diminui o valor dos dímeros **1** e **4** como ligantes do heme ou como potenciais antiplasmodiais, só mostra que essas espécies interagem com o alvo em questão na mesma ordem de grandeza que um ligante já bem estabelecido.

5. CONCLUSÃO

Com vistas a aportar contribuições para quimioterapia da Malária, doença endêmica no Brasil e em outras áreas tropicais do planeta, com altas taxas de morbidade e mortalidade, o presente trabalho foi movido pela intenção de se avaliar o perfil de novas substâncias sintéticas constituídas pela unidade 3-piridinopropanoxi, especialmente dímeros, quanto ao potencial de inibição da formação de hemozoína. A inibição da formação de hemozoína é um mecanismo de ação antimalárica. Para esse fim, seis derivados do 3-piridinopropanol inéditos na literatura – quatro dímeros (compostos **1-4**) e dois derivados não diméricos (compostos **9** e **10**) – foram sintetizados e submetidos à titulação espectroscópica no UV-vis com hematina (ferriprotoporfirina IX). Considerou-se, de antemão, que substâncias que se associam à hematina livre em solução, a depender da afinidade, potencialmente desfavorecem a formação do polímero supramolecular hemozoína.

O composto **1** foi obtido em cinco etapas, com rendimento global baixo (0,62%) por razão de dificuldades no seu isolamento, a partir do bruto reacional da última etapa. Contudo, a metodologia empregada nessa etapa, que para a formação do diéster **1** envolveu a reação do 3-piridinopropoxiexanol (**5**) com ácido succínico, em única etapa, foi adequada para a obtenção dos demais dímeros **2**, **3** e **4**, partindo-se do 3-piridinopropanol e de ácidos dicarboxílicos homólogos. Os rendimentos obtidos variaram entre 60 e 62%.

Os derivados succínicos **9** e **10** foram igualmente obtidos em etapa única, pela esterificação dos álcoois primários (**5** e 3-piridinopropanol, respectivamente) por reação com anidrido succínico, com rendimentos satisfatórios.

Os resultados das titulações no UV-vis dos compostos **1-4** e **9-10** evidenciaram que os dímeros **1** e **4** interagem de maneira importante com a hematina (heme). Os demais compostos, no entanto, representam ligantes fracos da hematina, com baixas constantes de associação.

Dessa forma, as constantes de dissociação (K_d) do complexo ligante-hematina foram determinadas apenas para os compostos **1** e **4**, sendo

encontrados valores de K_d iguais a $71,17 \pm 2,87$ e $88,79 \pm 3,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Ao que tudo indica, sendo os composto **1** e **4** os ligantes de maior afinidade pela hematina dessa série, a estrutura bifuncional, nesse caso dimérica, constituída por espaçadores lineares longos (10 a 18 átomos) entre as unidades funcionais (3-piridinopropanoxi), é vantajosa para formação de complexos com a hematina. Presume-se que os espaçadores permitem o distanciamento adequado para que não ocorra impedimento estérico que desfavoreça a formação do complexo ternário hematina-ligante-hematina.

Outros dados, resultantes de análise dos complexos por método *in silico* serão necessários para confirmação.

Uma descrição mais precisa do arranjo estérico do complexo, bem como o perfil energético para sua formação requerem estudos futuros por métodos *in silico*. Além disso, de modo a validar o potencial das substâncias como antimaláricos, prevê-se, também, a avaliação da atividade antiplasmodial dos compostos descritos nesse trabalho frente ao *Plasmodium falciparum* e a determinação do índice de seletividade citotóxica em relação a células humanas.

6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

6.1 Caracterização por RMN dos compostos sintetizados

Os compostos foram caracterizados através de espectros de RMN de ^1H (400,13 MHz) e de RMN de ^{13}C (100,61 MHz) obtidos em um espectrômetro Bruker Advance III operando com uma sonda de detecção direta de 5 mm (BBO) a 298 K, sendo que a multiplicidade dos sinais de RMN de H^1 foram denominadas simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), duplo-triplete (dt) e multiplete (m), enquanto que as constantes de acoplamento (J) foram expressas em hertz (Hz). A calibração dos espectros de RMN de ^1H foram realizadas através do sinal do TMS, enquanto nos espectros de RMN de ^{13}C foram realizadas através do sinal do solvente (no caso, CDCl_3).

6.2 Síntese

6.2.1 Procedimentos gerais

As reações foram acompanhadas através de placas de cromatografia em camada delgada (CCD) Alugram, sílica gel 60 mesh. Os reveladores utilizados foram:

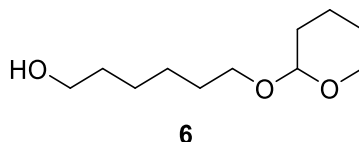
- Ácido fosfomolibdico (preparado a partir da dissolução de 10 g de ácido fosfomolibdico em 100 g de etanol a 0 °C);
- Verde de bromocresol (preparado pela dissolução de 40 mg de verde de bromocresol em 100 mL de etanol, com adição de gotas de uma solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} até que a solução do revelador se tornasse azulada);
- Dragendorff (obtido através da mistura e diluição com 100 mL de água de duas soluções, a primeira contendo 170 mg de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 2 mL de ácido acético e 8 mL de água, e a segunda contendo 4 g de KI , 10 mL de ácido acético e 20 mL de água).

Para as reações em atmosfera inerte, utilizou-se gás nitrogênio (N_2).

Os solventes, quando necessário, foram secos previamente pelo tratamento com peneira molecular de 3 Å ativada.

As colunas cromatográficas usadas na purificação de compostos foram realizadas utilizando sílica gel 40-63 μm (sílica *flash*, Merck®) como fase estacionária.

6.2.2 Síntese do 6-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)hexan-1-ol (**6**) (NISHIGUCHI *et al.*, 2000).

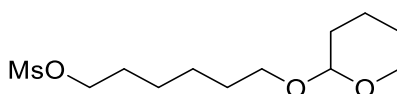


Adicionou-se 1,6-hexanodiol (0,120 g; 0,59 mmol) a um balão de reação de 25 mL de capacidade. Em seguida, adicionou-se 34,2 mL de tolueno e 2,4 mL de uma solução de hidrogenossulfato de potássio (KHSO_4) a 2,5 mol.L⁻¹. Então, adicionou-se lentamente 0,3 mL de DHP (3,29 mmol). O sistema reacional foi condicionado a agitação magnética e temperatura ambiente. Acompanhou-se o andamento da reação através de placas de CCD (eluente: acetato de etila/hexano 1:1; revelador: ácido fosfomolibdico). Após 2 h de reação, sem que o consumo total do material de partida tenha sido observado, fez-se a extração com água destilada e diclorometano até que se neutralizasse o meio (três lavagens, aproximadamente 30 mL de água/lavagem). Adicionou-se sulfato de magnésio (MgSO_4) anidro a fase orgânica, sendo em seguida filtrada e o solvente retirado por destilação a pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (sílica flash; 20 mm de diâmetro e aproximadamente 16 cm de altura), utilizando-se uma mistura de hexano/acetato de etila 7:3 como eluente. O composto **6** foi obtido como um óleo incolor (72% de rendimento).

RMN de ¹H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 1,32-1,46 (m, 4H, CH_2); 1,47-1,65 (m, 8H, CH_2 e CH_2 -THP); 1,66-1,76 (m, 1H, CH_2); 1,78-1,90 (m, 1H, CH_2); 3,39 (dt, 1H, $J=9,6$ Hz, 6,6 Hz, CH_2O -THP); 3,46-3,55 (m, 1H, CH_2O); 3,64 (t, 2H, $J=6,6$ Hz, CH_2OH); 3,74 (dt, 1H, $J=9,6$ Hz, 6,8 Hz, CH_2O -THP); 3,81-3,92 (m, 1H, CH_2O); 4,55-4,59 (m, 1H, CH-THP). (lit.: RMN de ¹H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 1,33-1,42 (m, 4H); 1,50-1,61 (m, 8H); 1,69-1,75 (m, 1H); 1,79-1,87 (m, 1H); 3,39 (dt, 1H, $J=9,6$ Hz, 6,54 Hz); 3,48-3,53 (m, 1H); 3,64 (t, 2H, $J=6,6$ Hz); 3,74 (dt, 1H, $J=9,6$ Hz, 6,8 Hz); 3,84-3,90 (m, 1H); 4,57 (t, 1H, $J=2,6$ Hz) (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 19,66 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 25,44 (CH_2); 25,50 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 25,98 (CH_2); 29,63 (CH_2); 30,73 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 32,64 (CH_2); 62,35 (CH_2O); 62,80 (CH_2OH); 67,48 ($\text{CH}_2\text{O-THP}$); 98,86 (CH-THP). (lit.: RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 19,69; 25,45; 25,52; 26,00; 29,65; 30,75; 32,66; 62,16; 62,85; 67,49; 98,88.) (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

6.2.3 Síntese do metanossulfonato de 6-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)hexila (7) (GONÇALVES *et al.*, 2014)



7

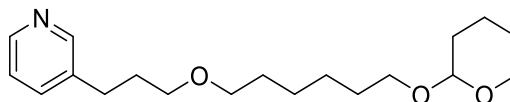
Adicionou-se o composto **6** (0,64 g; 3,16 mmol) a um balão de 125 mL. Em seguida, adicionou-se 10 mL de diclorometano seco e condicionou-se o meio reacional a agitação magnética. Então, em banho de gelo, adicionou-se lentamente 1,8 mL de trietilamina (12,93 mmol) e, gota-a-gota, 0,5 mL de cloreto de mesila (6,49 mmol). Após feita as adições, o meio reacional foi retornando lentamente a temperatura ambiente. Acompanhou-se o andamento da reação através de placas de CCD (eluente: acetato de etila/hexano 1:1; revelador: ácido fosfomolibdico). Após 18 h observou-se o consumo total do material de partida, então realizou-se uma extração com água destilada gelada e diclorometano (três lavagens, aproximadamente 30 mL de diclorometano/lavagem). Adicionou-se sulfato de magnésio anidro a fase orgânica, que em seguida foi filtrada e destilada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por coluna cromatográfica (sílica flash; 20 mm de diâmetro; aproximadamente 15 cm de altura), utilizando-se uma mistura hexano/acetato de etila 7:3 como eluente. O composto **7** foi obtido como um óleo amarelado (75% de rendimento).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 1,36-1,48 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-THP}$); 1,49-1,66 (m, 6H, CH_2 e $\text{CH}_2\text{-THP}$); 1,73-1,82 (m, 2H, CH_2); 3,05 (s, 3H, CH_3); 3,39 (dt, 1H, $J=9,6$ Hz, 6,5 Hz, $\text{CH}_2\text{O-THP}$); 3,45-3,55 (m, 1H, CH_2O); 3,74 (dt, 1H, $J=9,6$ Hz, 6,7 Hz, $\text{CH}_2\text{O-THP}$); 3,80-3,93 (m, 1H, CH_2O); 4,23 (t, 2H, $J=6,6$ Hz, CH_2OMs) 4,52-4,60 (m, 1H, CH-THP). (lit.: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 1,37-1,44 (m, 4H); 1,52-1,60 (m, 6H); 1,72-1,79 (m, 1H); 1,80-1,86 (m, 1H); 3,01 (s, 3H); 3,39 (dt,

1H, J=9,6 Hz, 6,4 Hz); 3,48-3,53 (m, 1H); 3,74 (dt, 1H, J=9,6 Hz, 6,7 Hz); 3,84-3,89 (m, 1H); 4,23 (t, 2H, J=6,56 Hz) 4,57 (t, 1H, J=2,6 Hz). (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 19,68 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 25,25 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 25,42 (CH_2); 25,70 (CH_2); 29,03 (CH_2); 29,48 (CH_2); 30,73 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 37,32 (CH_3); 62,40 (CH_2O); 67,30 ($\text{CH}_2\text{O-THP}$); 69,99 (CH_2OMs); 98,91 (CH-THP). (lit.: RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 19,71; 25,27; 25,44; 25,72; 29,05; 29,50; 30,74; 37,34; 62,44; 67,32; 70,01; 98,92.) (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

6.2.4 Síntese do 3-(3-((6-((tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)hexil)oxi)propil)piridina (**8**) (GONÇALVES *et al.*, 2014)



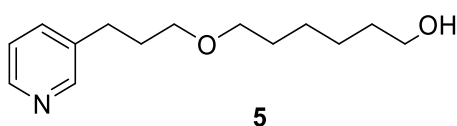
8

Adicionou-se 3-piridinopropanol (0,747 mL; 5,79 mmol) a um balão de reação de 125 mL. Em seguida, adicionou-se de éter dietílico (22 mL), brometo de tetrabutilamônio (1,092 g; 3,4 mmol) e solução de hidróxido de sódio 50% (m/v) (11,6 mL). O meio permaneceu sob agitação magnética, semi-aberto, por 15 min. Após esse período, adicionou-se o composto **7** (1,738 g; 6,20 mmol). O sistema foi condicionado a temperatura ambiente e agitação magnética. Acompanhou-se o andamento da reação através de placas de CCD (eluente: acetato de etila/hexano 3:7; revelador: ácido fosfomolibdico). Após 70 h, a fase aquosa foi extraída três vezes com éter etílico (aproximadamente 20 mL/lavagem). A fase orgânica foi agrupada e adicionou-se sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) para retirar a água residual. Em seguida, filtrou-se o meio e vaporizou-se o solvente por meio de pressão reduzida (rota-vapor seguido de alto vácuo). O resíduo foi purificado em uma coluna cromatográfica (sílica flash; 20 mm de diâmetro; aproximadamente 17 cm de altura) utilizando uma mistura hexano/acetato de etila 7:3 como eluente. O composto **8** foi obtido como um óleo amarelado (38% de rendimento).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 0,75-1,00 (m, 1H); 1,10-1,30 (m, 2H); 1,35-1,45 (m, 4H, CH_2); 1,45-1,70 (m, 14H, CH_2); 1,75-1,90 (m, 4H, CH_2); 2,65-2,75 (m, 2H, CH_2); 3,30-3,56 (m, 8H, CH_2O); 3,60-3,70 (m, 1H, CH_2O); 3,70-3,80 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{O-THP}$); 3,80-3,92 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{O-THP}$); 4,57 (m, 1H, CH-THP); 7,20-7,30 (m, 1H, H5py); 7,50-7,55 (m, 1H, H4py); 8,40-8,48 (m, 2H, H2py e H6py). (lit.: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 1,30-1,43 (m, 8H); 1,50-1,63 (m, 4H); 1,66-1,75 (m, 1H); 1,79-1,92 (m, 1H); 2,70 (t, 2H, $J=7,4$ Hz); 3,38-3,43 (m, 5H); 3,47-3,53 (m, 1H); 3,74 (dt, 1H, $J=9,6$ Hz; $J=6,8$ Hz); 3,84-3,90 (m, 1H); 4,58 (t, 1H, $J=2,6$ Hz); 7,19-7,23 (m, 2H); 7,52 (d, 2H, $J=7,8$ Hz); 8,43-8,46 (m, 2H) (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 19,68 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 25,43 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 25,51; 25,98 (CH_2); 26,05 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 26,10; 29,46 (CH_2); 29,66 (CH_2); 30,72 ($\text{CH}_2\text{-THP}$); 30,95 (CH_2); 32,65; 62,36; 62,86 (CH_2O); 67,54 ($\text{CH}_2\text{O-THP}$); 69,40 (CH_2O); 70,95 (CH_2O); 98,83; 98,87 (CH-THP); 123,28 (C3py); 135,96 (C4py); 137,24 (C3py); 147,20 (C6py); 149,88 (C2py). (lit.: RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 19,67; 25,45; 26,09; 29,48; 29,67; 30,74; 30,97; 62,33; 67,53; 69,40; 70,94; 98,83; 123,22; 135,84; 137,19; 147,27; 149,97 (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

6.2.5 Síntese do 6-(3-(piridina-3-il)propoxi)hexan-1-ol (**5**) (GONÇALVES *et al.*, 2014)

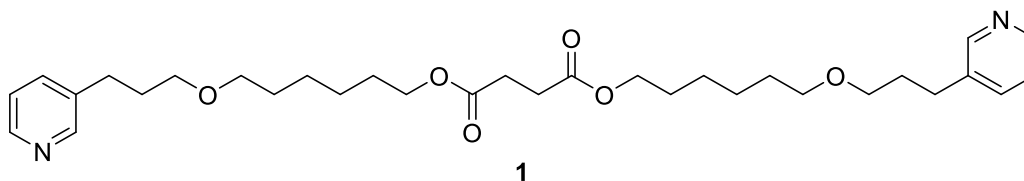


Adicionou-se o composto **8** (0,804 g; 2,5 mmol) a um balão de reação de 125 mL. Em seguida, adicionou-se 50 mL de metanol (CH_3OH) e condicionou-se o sistema a agitação magnética e temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 5 mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) com concentração de 1,0 mol.L⁻¹. Acompanhou-se o andamento da reação através de placas de CCD (eluente: acetato de etila; revelador: ácido fosfomolibdico). Após 24 h, removeu-se o solvente por destilação a pressão reduzida e, em seguida, adicionou-se quantidades iguais de acetato de etila e água destilada (30 mL). Então, alcalinizou-se o meio (adicionou-se 20 mL de uma solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹

¹) e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etila. Reuniu-se a fase orgânica e adicionou-se sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). Feito isso, realizou-se uma filtração simples e removeu-se o solvente por destilação a pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado por meio de uma coluna cromatográfica (sílica flash; 20 mm de diâmetro; aproximadamente 15 cm de altura) utilizando como eluente acetato de etila. O composto **5** foi obtido como um óleo amarelado (rendimento de 54%).

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 1,32-1,47 (m, 4H, CH₂); 1,50-1,67 (m, 4H, CH₂); 1,89 (m, 2H, CH₂); 2,71 (t, 2H, J=7,7 Hz, CH₂); 3,35-3,46 (m, 4H, CH₂O); 3,65 (t, 2H, J=6,5 Hz, CH₂OH); 7,16-7,31 (m, 1H, H₅py); 7,52 (d, 1H, J=7,7Hz, H₄py); 8,39-8,48 (m, 2H, H₂py e H₆py). (lit.: RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ_H 1,23-1,42 (m, 4H); 1,56-1,63 (m, 4H); 1,89 (m, 2H); 2,71 (t, 2H, J=7,4 Hz); 3,38-3,42 (m, 4H); 3,65 (t, 2H, J=6,5 Hz); 7,20-7,24 (m, 1H). 7,52 (d, 1H, J=7,8 Hz; 8,42-8,45 (m, 2H). (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

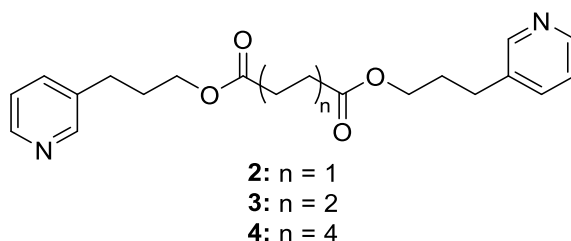
RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 25,50 (CH₂); 25,92 (CH₂); 29,37 (CH₂); 29,58 (CH₂); 30,81 (CH₂); 32,66 (CH₂); 62,59 (CH₂OH); 69,25 (CH₂O); 70,78 (CH₂O); 123,29 (C₅py); 135,99 (C₄py); 137,23 (C₃py); 147,05 (C₆py); 149,78 (C₂py). (lit.: RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 25,53; 25,95; 29,40; 29,61; 30,85; 32,70; 62,66; 69,28; 70,80; 123,30; 135,97; 137,22; 147,12; 149,86. (GONÇALVES *et al.*, 2014) ppm.

6.2.6 Síntese do succinato de bis 6-(3-(piridina-3-il)propoxi)hexila (**1**)

Adicionou-se o composto **5** (0,160 g; 0,67 mmol) e 20 mL de diclorometano (seco) a um balão de reação de 125 mL. Condicionou-se o sistema a atmosfera inerte, agitação magnética e temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se ácido succínico (0,060 g; 0,506 mmol), DMAP (0,013 g; 0,10 mmol) e DIC (0,19 mL, 1,21 mmol). Acompanhou-se o andamento da reação através de placas de CCD (eluente: acetato de etila; revelador: ácido fosfomolibdico, dragendorff e verde de bromocresol). Após 48 h, o meio reacional foi transferido para um funil de separação e adicionou-se aproximadamente 20 mL de água destilada, 30 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio e 40 mL de clorofórmio. A fase aquosa foi extraída três vezes com clorofórmio (aproximadamente 30 mL/lavagem). A fase orgânica foi então agrupada e adicionou-se sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) para a retirada de água residual. Então, realizou-se uma filtração simples e os solventes foram removidos à pressão reduzida. O resíduo foi purificado por meio de uma coluna cromatográfica (sílica flash; 20 mm de diâmetro; aproximadamente 16 cm de altura) utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila/metanol 99:1. O composto **1** foi obtido como um óleo incolor (rendimento: 4%).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 1,30-1,46 (m, 8H, CH_2); 1,50-1,76 (m, 8H, CH_2); 1,80-2,00 (m, 4H, CH_2); 1,55-1,62 (m, 4H, CH_2); 2,71 (t, 4H, $J=8,4$ Hz, CH_2); 3,30-3,52 (m, 8H, CH_2O); 4,09 (t, 4H, $J=6,4$ Hz, CH_2O); 7,10-7,25 (m, 2H, $\text{H}5_{\text{py}}$); 7,55 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, $\text{H}4_{\text{py}}$); 8,47 (s, 4H, $\text{H}2_{\text{py}}$ e $\text{H}6_{\text{py}}$) ppm.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 25,74 (CH_2); 25,86 (CH_2); 28,52 (CH_2); 29,14 (CH_2); 29,49 (CH_2); 29,60 (CH_2); 30,93 (CH_2); 64,74 (CH_2O); 69,45 (CH_2O); 70,84 (CH_2O); 123,34 ($\text{C}5_{\text{py}}$); 136,11 ($\text{C}4_{\text{py}}$); 137,35 ($\text{C}3_{\text{py}}$); 147,07 ($\text{C}6_{\text{py}}$); 149,74 ($\text{C}2_{\text{py}}$); 172,35 ($\text{C}=\text{O}$) ppm.

6.2.7 Procedimento geral para síntese do dímeros **2**, **3** e **4**

Adicionou-se 3-piridinopropanol (0,1785 mL; 1,38 mmol) e 20 mL de diclorometano seco a um balão de reação de 50 mL. Condicionou-se o sistema a atmosfera inerte, agitação magnética e temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o ácido dicarboxílico (1,02 mmol, sendo utilizado o ácido succínico para síntese do dímero **2**, ácido adípico para o dímero **3** e ácido sebácico para o dímero **4**), DMAP (0,025 g; 0,20 mmol) e DIC (0,382 mL, 2,44 mmol). Acompanhou-se o andamento da reação através de placas de CCD (eluente: acetato de etila; revelador: ácido fosfomolibdico, dragendorff e verde de bromocresol). Após 42-96h, o meio reacional foi transferido para um funil de separação e adicionou-se aproximadamente 20 mL de água destilada, 30 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e 40 mL de diclorometano. A fase aquosa foi extraída três vezes com diclorometano (aproximadamente 30 mL/lavagem). A fase orgânica foi então agrupada e adicionou-se sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) para a retirada de água residual. Então, realizou-se filtração simples e os solventes foram vaporizados por meio de pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado por meio de uma coluna cromatográfica

Succinato de *bis*-3-(piridina-3-il)propila (2)

Condições para a realização da coluna cromatográfica: sílica flash; 30 mm de diâmetro; 16 cm de altura, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila/metanol 95:5. O composto **2** foi obtido como um óleo incolor (rendimento de 62%)

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 1,93-2,05 (4H, m, CH₂); 2,60-2,74 (8H, m, CH₂); 4,13 (4H, t, 6,31 Hz, CH₂O); 7,19-7,30 (2H, m, H₅py); 7,49-7,53 (2H, m, H₄py); 8,42-8,50 (4H, m, H₂py e H₆py) ppm.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 28,94 (CH_2); 29,22 (CH_2); 29,76 (CH_2); 63,61 (CH_2O); 123,29 (C5py); 135,73 (C4py); 136,32 (C3py); 147,48 (C6py); 149,76 (C2py); 172,15 (C=O) ppm.

Adipato de *bis*-3-(piridina-3-il)propila (3)

Condições para a realização da coluna cromatográfica: sílica flash; 35 mm de diâmetro; 16 cm de altura, utilizando acetato de etila como eluente. O composto 3 foi obtido como um óleo incolor (rendimento: 60%)

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 1,64-1,72 (4H, m, CH_2); 1,91-2,06 (4H, m, CH_2); 2,28-2,47 (4H, m, CH_2); 2,66-2,76 (4H, m, CH_2); 4,11 (4H, t, 7,08 Hz, CH_2O); 7,17-7,32 (2H, m, H5py); 7,47-7,55 (2H, d largo, 7,98 Hz, H4py); 8,42-8,50 (4H, m, H2py e H6py) ppm.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 29,29 (CH_2); 29,31 (CH_2); 29,80 (CH_2); 33,74 (CH_2); 63,28 (CH_2O); 123,28 (C5py); 135,69 (C4py); 136,34 (C3py); 147,51 (C6py); 149,79 (C2py); 173,14 (C=O) ppm.

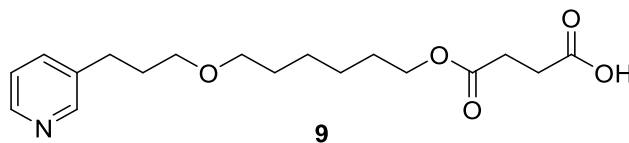
Decanodiodato de *bis*-3-(piridin-3-il)propila (4)

Condições para a realização da coluna: sílica flash; 25 mm de diâmetro; 16 cm de altura, utilizando acetato de etila/ hexano 7:3 como eluente. O composto 4 foi obtido como um óleo incolor (rendimento quantitativo).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 1,08-1,18 (4H, m); 1,19-1,44 (m, 14H); 1,54-1,84 (m, 12H, CH_2); 1,92-2,04 (m, 4H, CH_2); 2,30 (t, 4H, $J = 8,24$ Hz CH_2); 2,70 (t, 4H, $J = 7,46$ Hz, CH_2); 4,10 (t, 4H, $J = 6,46$ Hz, CH_2O); 7,20-7,25 (m, 2H, H5py); 7,49-7,53 (m, 2H, H4py); 8,43-8,49 (m, 4H, H2py e H6py) ppm.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 23,47 (CH_2); 24,91 (CH_2); 29,06 (CH_2); 29,40; 29,92 (CH_2); 34,24 (CH_2); 42,24; 63,20 (CH_2O); 123,37 (C5py); 135,84 (C4py); 136,50 (C3py); 147,53 (C6py); 149,83 (C2py); 173,78 (C=O) ppm.

6.2.8 Síntese do ácido 4-oxo-4-(6-(3-(piridin-3-il)propoxi)hexil)oxi)butanóico (9)

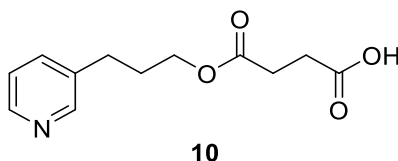


Adicionou-se o composto **5** (0,072 g; 0,3034 mmol), anidrido succínico (0,123 g; 1,23 mmol), DMAP (0,045 g; 0,37 mmol) 10 mL de diclorometano (seco) a um balão de reação de 50 mL. Então, condicionou-se o sistema reacional a agitação magnética, atmosfera inerte e temperatura ambiente. Acompanhou-se o andamento da reação por meio de placas CCD (eluente: acetato de etil/hexano 8:2, revelador: ácido fosfomolibdico e verde de bromocresol). Transcorridas 48h de reação, quando se observou o consumo total do material de partida, removeu-se o solvente do meio reacional por destilação sob pressão reduzida. O produto bruto foi levado para uma coluna filtrante (sílica flash; 20 mm de diâmetro; 7 cm de altura) e recolheu-se três frações: a primeira foi recolhido utilizando aproximadamente 40 mL de acetato de etila/hexano 8:2; a segunda foi recolhida com aproximadamente 45 mL de acetato de etila; e a terceira foi recolhida com metanol. O produto de interesse foi identificado na 2^o fração, com rendimento quantitativo.

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ_H 0,85-0,95 (m, 1H); 1,20-1,29 (m, 2H); 1,30-1,45 (m, 5H, CH₂); 1,50-1,59 (m, 5H, CH₂); 1,59-1,69 (m, 2H, CH₂); 1,84-1,94 (m, 2H, CH₂); 2,59-2,72 (m, 4H, CH₂); 2,77 (t, 2H, J=5,80 Hz, CH₂); 3,20-3,39 (m, 4H, CH₂O); 4,15 (t, 2H, J=6,09 Hz, CH₂O); 7,29-7,33 (m, 1H, H5py); 7,62 (d, 1H, J=7,64 Hz, H4py); 8,41-8,52 (m, 2H, H2py e H6py) ppm.

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ_C 25,40 (CH₂); 25,44 (CH₂); 28,45 (CH₂); 29,15 (CH₂); 29,33 (CH₂); 29,45 (CH₂); 29,67 (CH₂); 30,36 (CH₂); 64,28 (CH₂O); 68,26 (CH₂O); 70,65 (CH₂O); 123,86 (C3py); 137,49 (C4py); 138,03 (C3py); 145,23 (C6py); 148,47 (C2py); 172,66 (C=O); 175,15 (C=O) ppm.

6.2.9 Síntese do ácido 4-oxo-4-(3-(piridin-3-il)propoxi)butanóico (**10**)



Adicionou-se anidrido succínico (0,150 g; 1,5 mmol) a um balão de reação de 125 mL. Em seguida, adicionou-se 8 mL de tolueno seco e o sistema reacional foi condicionado a agitação magnética, atmosfera inerte e aquecimento em refluxo. Após total dissolução do anidrido succínico, adicionou-se 3-piridinopropanol (0,2 mL; 1,5 mmol) e manteve-se a temperatura em 100 °C. Não houve acompanhamento da reação através de placas CCD. Após 24h, o balão contendo o meio reacional foi levado ao rota-vapor de forma a se retirar excesso de solvente, e depois ficou armazenado na geladeira durante 2 dias. Então, houve a formação de um precipitado. Este precipitado foi filtrado a vácuo e, posteriormente, purificado por recristalização com tolueno, sendo o composto **10** obtido como um sólido de cor branco-avermelhada (rendimento de 60%).

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ_H 1,85-2,00 (m, 2H, CH₂); 2,40-2,60 (m, 2H, CH₂); 2,60-2,70 (m, 2H, CH₂); 4,10 (t, 2H, 6,4 Hz, CH₂O); 7,25-7,35 (m, 1H, H5py); 7,64 (d, 1H, 7,6 Hz, H4py); 8,38-8,52 (m, 2H, H2py e H6py); 12,26 (s_L, 1H, COOH) ppm.

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ_C 28,44 (CH₂); 28,71 (CH₂); 28,75 (CH₂); 29,48 (CH₂); 63,04 (CH₂O); 123,43 (C5py); 135,84 (C4py); 136,61 (C3py); 147,24 (C6py); 149,61 (C2py); 172,09 (C=O); 173,45 (C=O) ppm.

6.3 Titulações espectroscópicas UV-vis

6.3.1 Preparo das soluções

6.3.1.1 Solução tampão DMSO/HEPES (40%)

Dissolveu-se 1,1906g de HEPES em 5 mL de água. Esta solução HEPES foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL contendo 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Completou-se o volume para 250 mL e

homogeneizou-se a solução. O pH do tampão HEPES ajustado a 7,4. A solução foi armazenada na geladeira e ao abrigo da luz.

6.3.1.2 Solução estoque de hematina (2,6 mmol L⁻¹) (SEhm)

Foram pesadas 17,2 mg de hemina e em seguida essa massa foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL de capacidade. Então preencheu-se o balão até o menisco com solução tampão HEPES pH 7,4. A solução foi armazenada na geladeira ao abrigo da luz.

6.3.1.3 Solução análise de hematina (5 μmol L⁻¹) (SAhm)

A solução análise de hematina foi preparada a partir da transferência de 46 μL da solução estoque de hematina (SEhm), por meio de uma micropipeta, para um balão volumétrico de 25 mL de capacidade. Sendo que este balão foi completado até o menisco com a solução tampão HEPES pH=7,4. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.1.4 Soluções estoque dos ligantes (SE)

As soluções estoques dos ligantes foram preparadas pela dissolução de massas de cada composto que variaram entre 11,0 mg e 30,1 mg em 800 μL de DMSO.

6.3.1.5 Solução estoque do dímero 1 (24,70 mmol L⁻¹) (SEd1)

Primeiramente, pesou-se 11 mg do dímero 1 (succinato de bis(6-(3-(piridin-3-il)propoxi)hexila) em seguida adicionou-se 800 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então homogeneizou-se a solução. A solução foi guardada na geladeira e ao abrigo da luz.

6.3.1.6 Solução estoque do dímero **2** (56,81 mmol L⁻¹) (SEd2)

Primeiramente, pesou-se 16,2 mg do dímero **2** (succinato de bis(3-(piridina-3-il)propila) e em seguida adicionou-se 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então homogeneizou-se a solução. A solução foi guardada na geladeira e ao abrigo da luz.

6.3.1.7 Solução estoque do dímero **3** (57,54 mmol L⁻¹) (SEd3)

Primeiramente, pesou-se 17,7 mg do dímero **3** (adipato de bis(3-(piridin-3-il)propila) e em seguida adicionou-se 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então homogeneizou-se a solução. A solução foi guardada na geladeira e ao abrigo da luz.

6.3.1.8 Solução estoque do dímero **4** (85,40 mmol L⁻¹) (SEd4)

Primeiramente, pesou-se 30,1 mg do dímero **4** (decanodiodato de bis 3-(piridin-3-il)propila) e em seguida adicionou-se 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então homogeneizou-se a solução. A solução foi guardada na geladeira e ao abrigo da luz.

6.3.1.9 Solução estoque do ácido **9** (82,19 mmol L⁻¹) (SEa9)

Primeiramente, pesou-se 15,6 mg do ácido **1** (ácido 4-oxo-4(3-(piridin-3-il)propoxi)butanóico) e, em seguida adicionou-se 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então homogeneizou-se a solução. A solução foi guardada na geladeira e ao abrigo da luz.

6.3.1.10 Solução estoque do ácido **10** (82,98 mmol L⁻¹) (SEa10)

Primeiramente, pesou-se 22,4 mg do ácido **2** (ácido 4-oxo-4((6-(3-(piridin-3-il)propoxi)hexil)oxi)butanóico) e, em seguida adicionou-se 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então homogeneizou-se a solução. A solução foi guardada na geladeira e ao abrigo da luz.

6.3.1.11 *Solução estoque de cloroquina (17,64 mmol L⁻¹)*

Primeiramente, pesou-se 9,1 mg de cloroquina e, em seguida adicionou-se 800 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e então homogeneizou-se a solução. A solução foi guardada na geladeira e ao abrigo da luz

6.3.1.12 *Soluções de Análise dos ligantes (SA)-Procedimento Geral*

As soluções de análise foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque dos ligantes em meio a solução de análise de hematina (SAhm), de forma que os ligantes estivessem em uma concentração de 8,10 mmol L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas no dia da análise.

6.3.1.13 *Solução análise do dímero 1 (8,10 mmol L⁻¹) (SAd1)*

Adicionou-se a frasco 196,8 μL da solução estoque dímero 1 (SEd1) e, em seguida, adicionou-se 403,2 μL da solução de análise de hematina (SAhm). O meio foi então homogeneizado. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.1.14 *Solução análise do dímero 2 (8,10 mmol L⁻¹) (SAd2)*

Adicionou-se a um frasco 85,5 μL da solução estoque dímero 2 (SEd2) e, em seguida, adicionou-se 514,5 μL da solução de análise de hematina (SAhm). O meio foi então homogeneizado. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.1.15 *Solução análise do dímero 3 (8,10 mmol L⁻¹) (SAd3)*

Adicionou-se a um frasco 84,5 μL da solução estoque dímero 3 (SEd3) e, em seguida, adicionou-se 515,5 μL da solução de análise de hematina (SAhm). O meio foi então homogeneizado. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.1.16 Solução análise do dímero **4** (8,10 mmol L⁻¹) (SAd**4**)

Adicionou-se a um frasco 56,9 µL da solução estoque dímero **4** (SEd**4**) e, em seguida, adicionou-se 543,1 µL da solução de análise de hematina (SAhm). O meio foi então homogeneizado. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.1.17 Solução análise do ácido **9** (8,10 mmol L⁻¹) (SAa**9**)

Adicionou-se a um frasco 59,1 µL da solução estoque ácido **9** (SEa**9**) e, em seguida, adicionou-se 540,9 µL da solução de análise de hematina (SAhm). O meio foi então homogeneizado. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.1.18 Solução análise do ácido **10** (8,10 mmol L⁻¹) (SAa**10**)

Adicionou-se a um frasco 58,6 µL da solução estoque ácido **10** (SEa**10**) e, em seguida, adicionou-se 541,4 µL da solução de análise de hematina (SAhm). O meio foi então homogeneizado. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.1.19 Solução análise da cloroquina (10 mmol L⁻¹)

Adicionou-se a um frasco 352,9 µL da solução estoque de cloroquina e, em seguida, adicionou-se 247,1 µL da solução de análise de hematina (SAhm). O meio foi então homogeneizado. Esta solução foi preparada no dia da análise.

6.3.2 Titulações espectroscópicas UV-vis

Foram preparadas duas cubetas para a análise de espectrofotometria UV-vis, uma para atuar como a solução branco e uma para a realização da análise em si. Na cubeta com o branco foram colocados aproximadamente 2,5 mL da solução de tampão HEPES. Enquanto na cubeta de análise foram colocados 2,5 mL da solução análise de hematina (SAhm). Sendo que foi realizado um controle térmico para que ambas as cubetas permanecessem a 25 °C, e a cubeta onde a análise foi realizada foi condicionada sob agitação magnética. Então, na cubeta

de análise, foram realizadas as adições das soluções de análise dos ligantes, sendo que as adições foram de + 20 μL , + 20 μL , + 40 μL , + 100 μL , + 100 μL , + 200 μL , + 100 μL , especificamente nessa ordem. Vale ressaltar que, após feita a adição das soluções de análise, esperou-se um minuto (1 min) até se iniciar a varredura, que por sua vez foi feita entre os comprimentos de onda de 200 nm e 500 nm. Em cada leitura determinou-se a absorbância em 401,40 nm. Os experimentos referentes aos dímeros **1** e **4** foram realizados em triplicata.

6.3.3 Determinação das constantes de dissociação (K_d) dos composto **1**, **4** e cloroquina

As constantes de dissociação foram calculadas por regressão não-linear pelo software online disponível na plataforma BindFit (<http://app.supramolecular.org/bindfit/>). Os parâmetros do cálculo envolvido para os dímeros **1** e **4** foram: Filtro: UV 2:1, Indicação de K11 = 1000 mol^{-1} , modo de interação não cooperativo (*non-cooperative*), método de Nelder-Mead, sem correção de fator de diluição e sem subtração de valores iniciais. Para a cloroquina, os parâmetros foram: Filtro: UV 1:1, Indicação de K11 = 1000 mol^{-1} , método de Nelder-Mead, sem correção de fator de diluição e sem subtração de valores iniciais

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONY, Hiasindh Ashmi; PARIJA, Subhash Chandra. Antimalarial Drug resistance: an overview. **Tropical Parasitology**. Puducherry, India, p. 30-41. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Malária**. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>>. Acesso em: 13 fev. 2020.

(FDA), United States Food and Drug Administration. Drug Trials Snapshots: KRINTAFEL. 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trials-snapshots-krintafel>>.

ASHLEY, Elizabeth A. *et al.* Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 5, p. 411–423, 2014. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1314981>>.

BARREIRO, Eliezer J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova*, v. 25, n. 6b, p. 1172–1180, 2002.

BARREIRO, Eliezer J; RODRIGUES, Carlos Rangel. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Química Nova*, v. 20, n. 1, p. 1–11, 1997.

BASILICO, Nicoletta *et al.* A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, n. 1, p. 55–60, 1998.

BERNHARD, Neises; WOLFGANG, Steglich. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 17, n. 7, p. 522–524, 1978.

BROWN, Stanley B.; HATZIKONSTANTINOUS, Haris; HERRIES, David G. The structure of porphyrins and haems in aqueous solution. *International Journal of Biochemistry*, v. 12, n. 5–6, p. 701–707, 1980.

CHEN, Chien Tien; MUNOT, Yogesh S. Direct atom-efficient esterification between carboxylic acids and alcohols catalyzed by amphoteric, water-tolerant TiO(acac)₂. *Journal of Organic Chemistry*, v. 70, n. 21, p. 8625–8627, 2005.

CHUGH, Monika *et al.* Protein Complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. *PNAS*, v. 110, n. 2, p. 5392–5397, 2013.

COLLIER, Grant S *et al.* Studies on Haemiin in Dimethyl Sulphoxide / Water Mixtures. *Biochemistry Journal*, v. 179, p. 281–289, 1979.

COX, Francis E G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasite&Vectors*, n. Figure 1, p. 1–9, 2010.

DELVES, Michael *et al.* The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of *Plasmodium* : A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. v. 9, n. 2, 2012.

FATTORUSSO, Ernesto; TAGLIALATELA-SCAFATI, Orazio. Marine Antimalarials. *Marine Drugs*, v. 7, p. 130–152, 2009.

FERREIRA, Marcelo U. *et al.* Monitoring *Plasmodium vivax* resistance to antimalarials: Persisting challenges and future directions. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 15, p. 9–24, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.12.001>>.

FISCHER, Emil; SPEIER, Arthur. B. *Dass. Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, p. 3252–3258, 1895.

FONG, Kim Y.; WRIGHT, David W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 12, p. 1437–1450, 2013.

GALO, André Luiz; COLOMBO, Márcio Francisco. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo feixe convencional: Uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 488–492, 2009.

GILLES, Vitor *et al.* A new, simple and efficient method of steglich esterification of juglone with long-chain fatty acids: Synthesis of a new class of non-polymeric wax deposition inhibitors for crude oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 1, p. 74–83, 2015.

GOMES, Andréia Patrícia *et al.* Severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, n. 3, p. 358–369, 2011.

GONÇALVES, Alessandra Mirtes Marques Neves *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel 3-alkylpyridine marine alkaloid analogs with promising anticancer activity. *Marine Drugs*, v. 12, n. 8, p. 4361–4378, 2014.

GUIDO, Rafael V.C.; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: Aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avancados*, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUIGUEMDE, W. Armand *et al.* Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, v. 465, n. 7296, p. 311–315, 2010.

GUIMARÃES, D.S.M. *et al.* Improvement of antimalarial activity of a 3-alkylpyridine alkaloid analog by replacing the pyridine ring to a thiazole-containing heterocycle: Mode of action, mutagenicity profile, and Caco-2 cell-based permeability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 138, 2019.

GUIMARÃES, Daniel Silqueira Martins *et al.* Improvement of antimalarial activity of a 3-alkylpyridine alkaloid analog by replacing the pyridine ring to a thiazole-containing heterocycle: Mode of action, mutagenicity profile, and Caco-2 cell-based permeability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 138, n. July, p. 105015, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105015>>.

HADDEN, M K; BLAGG, B S J. Dimeric Approaches to Anti-Cancer Chemotherapeutics. *Anti-cancer agents in Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 807–816, 2008.

HAHN, William O.; POTTINGER, Paul S. Malaria in the Traveler: How to Manage Before Departure and Evaluate Upon Return Malaria Prevention Chemoprophylaxis Plasmodium Fever in returning traveler. *Medical Clinics of North America*, 2015.

J., Achan *et al.* Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, v. 10, p. 1–12, 2011. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L51444620%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-10-144%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=14752875&id=doi:10.1186%2F1475-2875-10-144&atitle=Quinine%2C+an+old+anti-m>>.

KANDAGAL, P. B. *et al.* Study of the interaction of an anticancer drug with

human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, n. 2, p. 393–399, 2006.

KATSUNO, Kei *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd4683>>.

KHORANA, H. G. The chemistry of carbodiimides. *Chemical Reviews*, v. 53, n. 2, p. 145–166, 1953.

KOMURA, Kenichi *et al.* FeCl₃·6H₂O as a versatile catalyst for the esterification of steroid alcohols with fatty acids. *Synthesis*, n. 21, p. 3407–3410, 2008.

KUSAKA, Shin Ichi *et al.* Total synthesis of macrosphelide A by way of palladium-catalyzed carbonylative esterification. *Tetrahedron Letters*, v. 44, n. 49, p. 8857–8859, 2003.

LIPINSKI, Christopher A *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, v. 23, p. 3–25, 1997.

LUCCHESI, Angélica Maria; MARZORATI, Liliana. Catálise de transferência de fase. *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 641–652, 2000.

MAYER, Alejandro M S *et al.* Marine Pharmacology in 2009 – 2011 : Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms o. *Marine drugs*, v. 11, p. 2510–2573, 2013.

MCMURRAY. *Chemistry of Acid Anhydrides*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://chem.libretexts.org/@go/page/36402>>. , 27 maio 2021

MILLER, Louis H *et al.* The pathogenic basis of malaria. v. 415, n. February, p. 673–679, 2002.

NCOKAZI, Kanyile K.; EGAN, Timothy J. A colorimetric high-throughput β -hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Analytical Biochemistry*, v. 338, n. 2, p. 306–319, 2005.

NICOLAOU, K C. Advancing the Drug Discovery and Development Process. *Angewandte Essays*, v. 53, p. 2–15, 2014.

NISHIGUCHI, T. *et al.* Selective monotetrahydropyranylation of 1,n-diols catalyzed by aqueous acids. *Tetrahedron Letters*, v. 41, n. 50, p. 9843–9846, 2000.

NOVITT-MORENO, Anne *et al.* Tafenoquine for malaria prophylaxis in adults: An integrated safety analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 17, p. 19–27, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2017.05.008>>.

O'NEILL, Paul M.; BARTON, Victoria E.; WARD, Stephen A. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. *Molecules*, v. 15, n. 3, p. 1705–1721, 2010.

PATRICK, Graham L. *An introduction to Medicinal Chemistry*. [S.l: s.n.], 2013.

POSNER, Gary H *et al.* Malaria-Infected Mice Are Cured by a Single Dose of Novel Artemisinin Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, p. 2516–2519, 2007.

RIBEIRO-VIANA, Renato M. *et al.* Revealing the Binding Process of New 3-Alkylpyridine Marine Alkaloid Analogue Antimalarials and the Heme Group: An Experimental and Theoretical Investigation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 56, n. 3, p. 571–579, 2016.

RODENKO, Boris *et al.* Synthesis of Marine-Derived 3-Alkylpyridinium Alkaloids with Potent Antiprotozoal Activity. *Medicinal Chemistry Letters*, v. 2, p. 901–906, 2011.

SANGI, D. P. Estratégias De Síntese Na Descoberta De Fármacos: O Emprego Da Síntese Orientada Pela Diversidade Estrutural #. *Quim. Nova*, v. 39, n. 8, p. 995–1006, 2016.

SINGH, Kamaljit *et al.* Quinoline-pyrimidine hybrids: Synthesis, antiplasmodial activity, SAR, and mode of action studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 2, p. 435–448, 2014.

SLATER, Andrew F G. CHLOROQUINE : MECHANISM OF DRUG ACTION

AND RESISTANCE IN PLASMODIUM FALCIPARUM. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 57, p. 203–235, 1993.

STARKS, Charles M. Phase-Transfer Catalysis. I. Heterogeneous Reactions Involving Anion Transfer by Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts. *Journal of the American Chemical Society*, v. 93, n. 1, p. 195–199, 1971.

STARKS, Charles M.; OWENS, Robert M. Phase-Transfer Catalysis. II. Kinetic Details of Cyanide Displacement on 1-Halooctanes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 95, n. 11, p. 3613–3617, 1973.

SULERIA, Hafiz A R *et al.* Marine Bioactive Compounds and Health Promoting Perspectives; Innovation Pathways for drug discovery. *Trends in Food Science & Technology*, 2016.

THORDARSON, Pall. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, v. 40, p. 1305–1323, 2011.

VEBER, Daniel F *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. p. 2615–2623, 2002.

VOLK, Christian A; KÖCK, Matthias. Viscosaline : new 3-alkyl pyridinium alkaloid from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 2, p. 1827–1830, 2004.

VON KRBEK, Larissa K.S.; SCHALLEY, Christoph A.; THORDARSON, Pall. Assessing cooperativity in supramolecular systems. *Chemical Society Reviews*, v. 46, n. 9, p. 2622–2637, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c7cs00063d>>.

WANG, Jigang *et al.* Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine. *Engineering*, v. 5, n. 1, p. 32–39, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.011>>.

WANG, Yang; ZHANG, Wen Xiong; XI, Zhenfeng. Carbodiimide-based synthesis of N-heterocycles: Moving from two classical reactive sites to chemical bond breaking/forming reaction. *Chemical Society Reviews*, v. 49, n. 16, p. 5810–5849, 2020.

WERMUTH, Camille G. Lead Compound Discovery Strategies Strategies in the Search for New Lead Compounds or Original Working Hypotheses. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3. ed. [S.l: s.n.], 2008. p. 124–143.

WILLIAMSOM, Alexander W. On etherification. *Quarterly Journal of the Chemical Society of London*, p. 229–239, 1852.

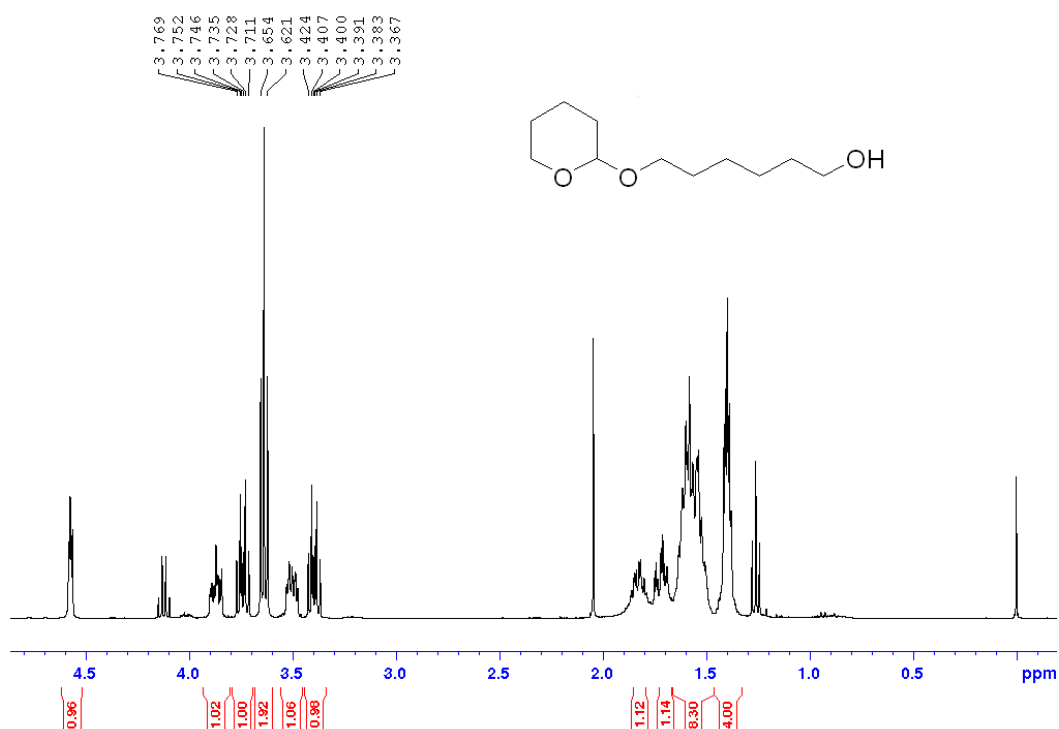
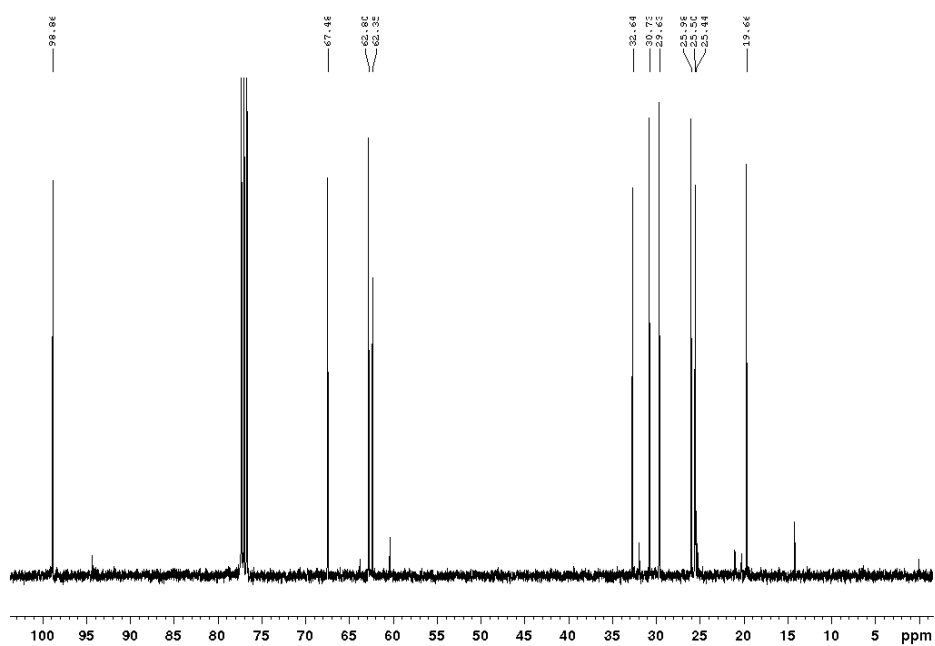
WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010*. [S.l: s.n.], 2010.

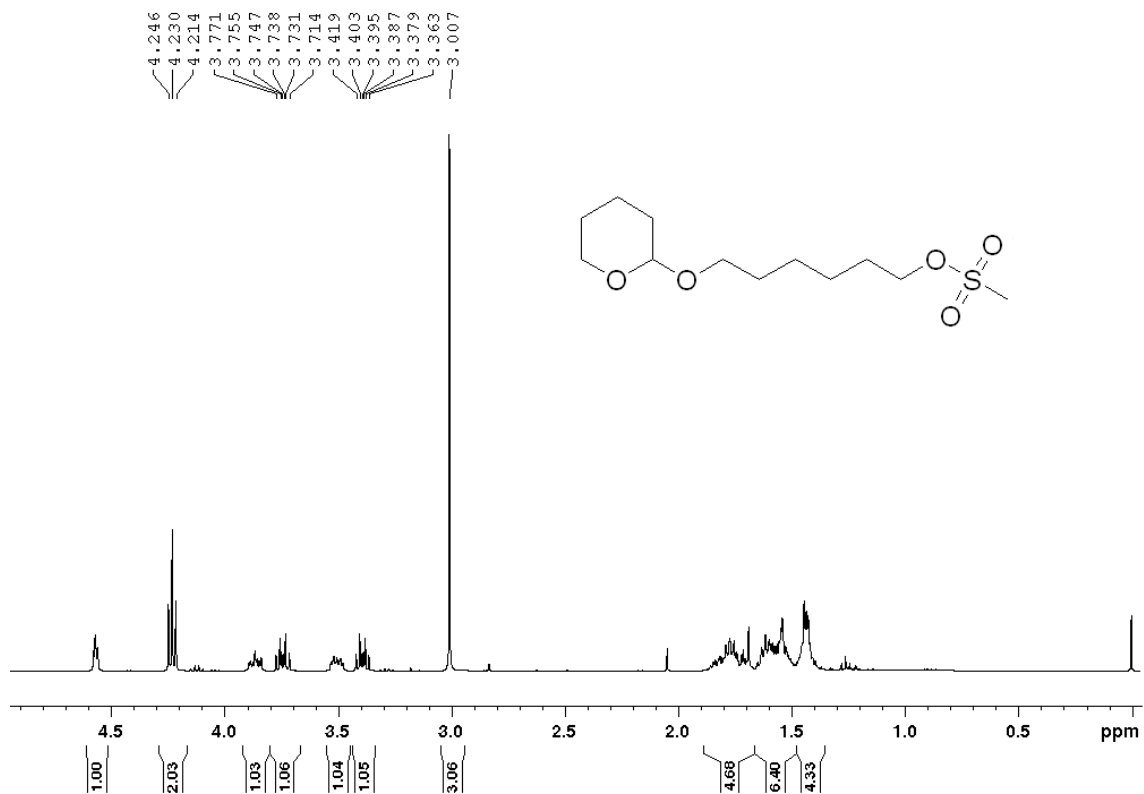
WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for the treatment of malaria*. 3. ed. [S.l: s.n.], 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World malaria report 2019*. [S.l: s.n.], 2019.

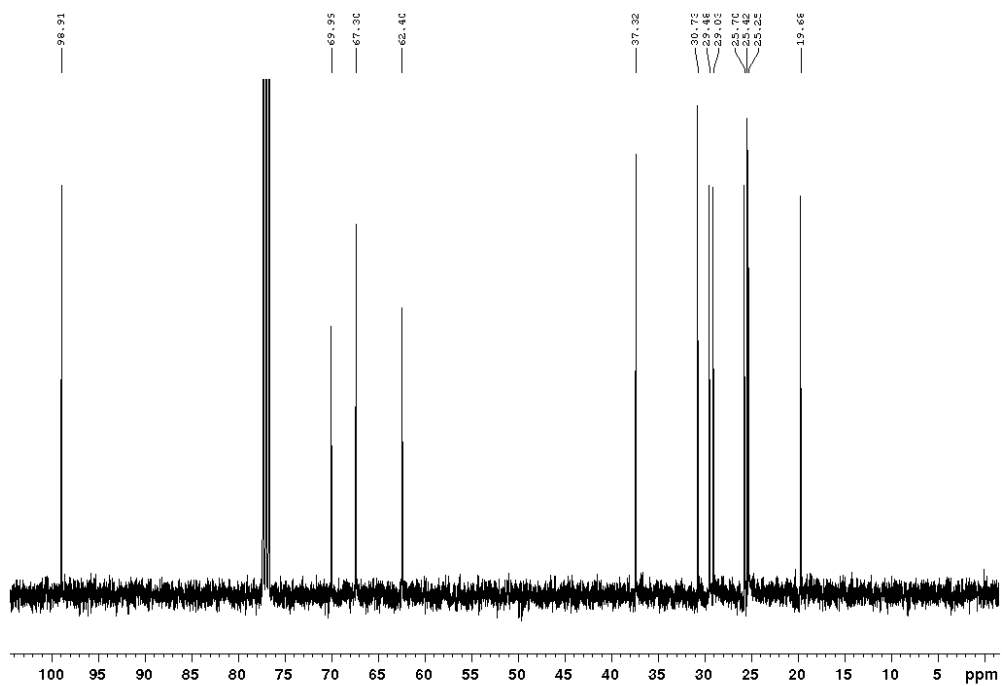
8. APÊNDICE

8.1 Espectros utilizados para a caracterização dos compostos sintetizados

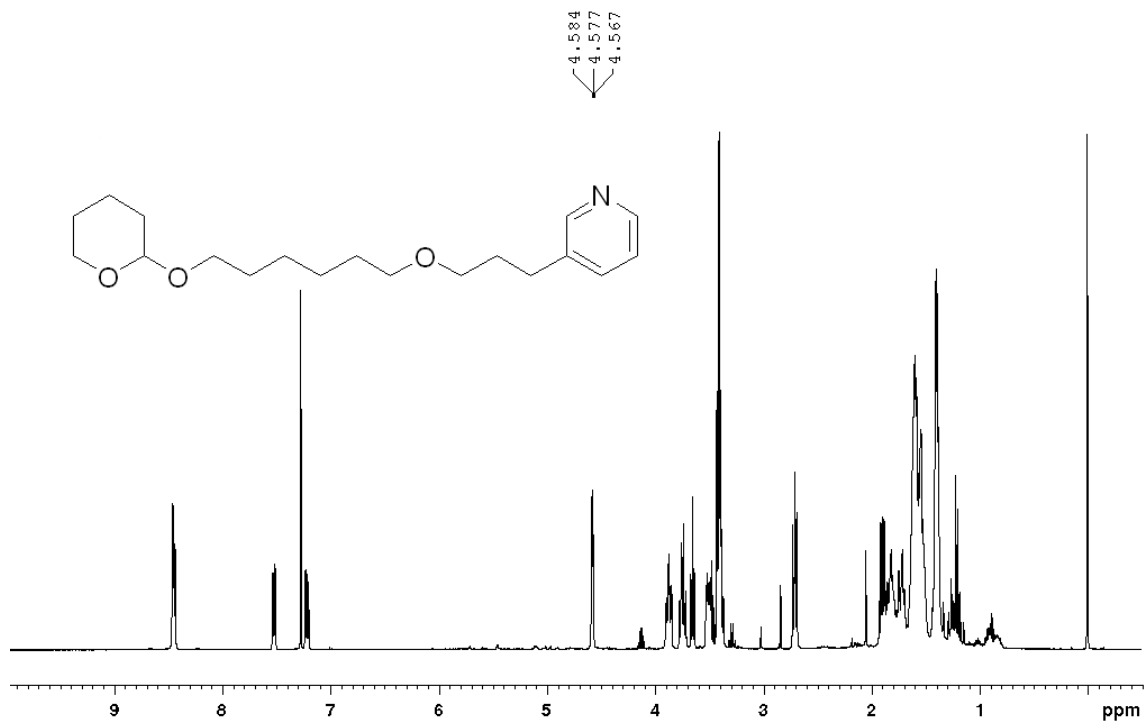
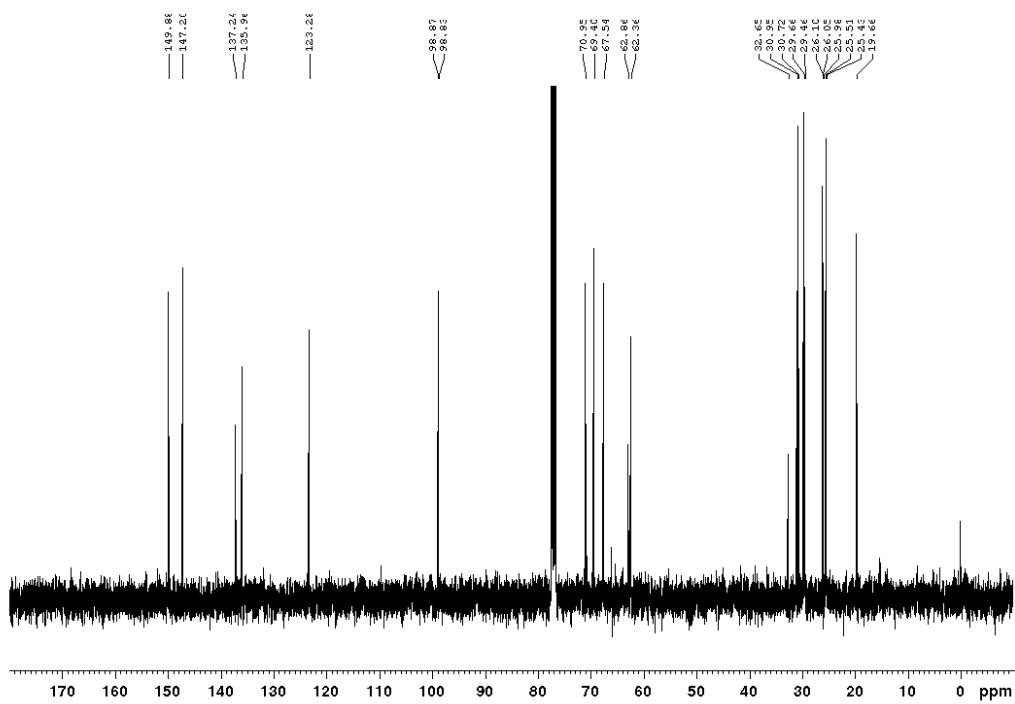
Espectro de RMN de ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 400 MHz)Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6** (CDCl_3 , 100 MHz)

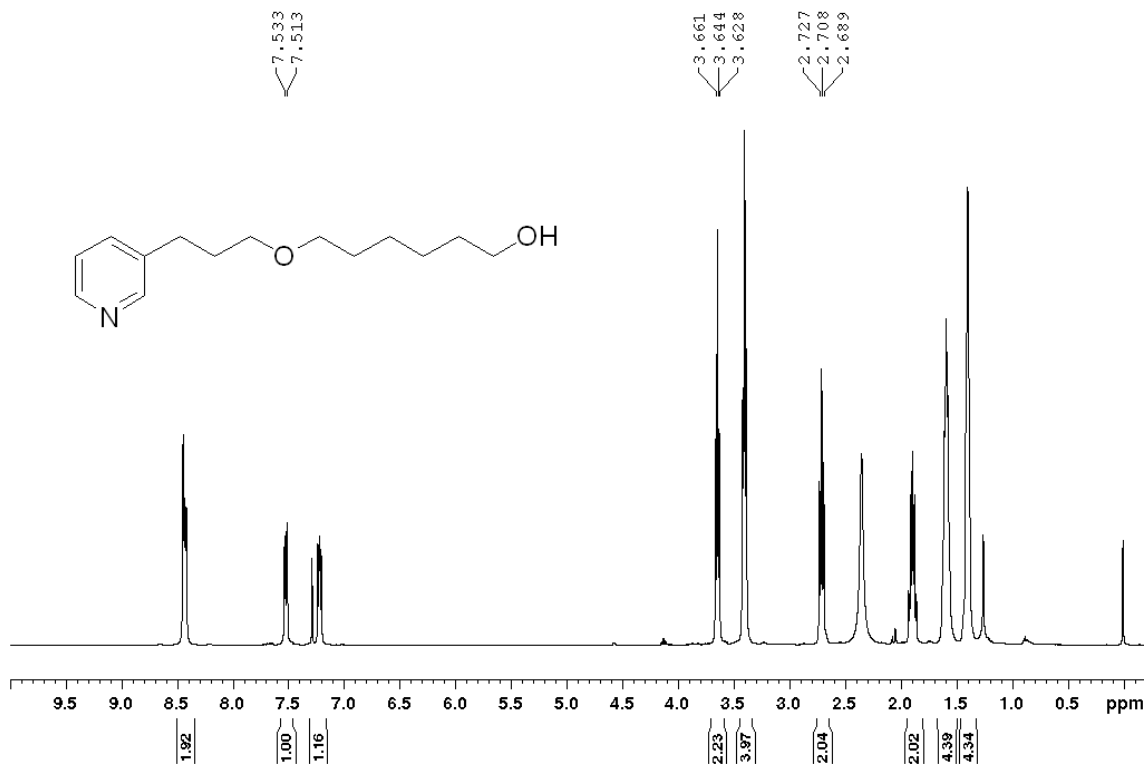
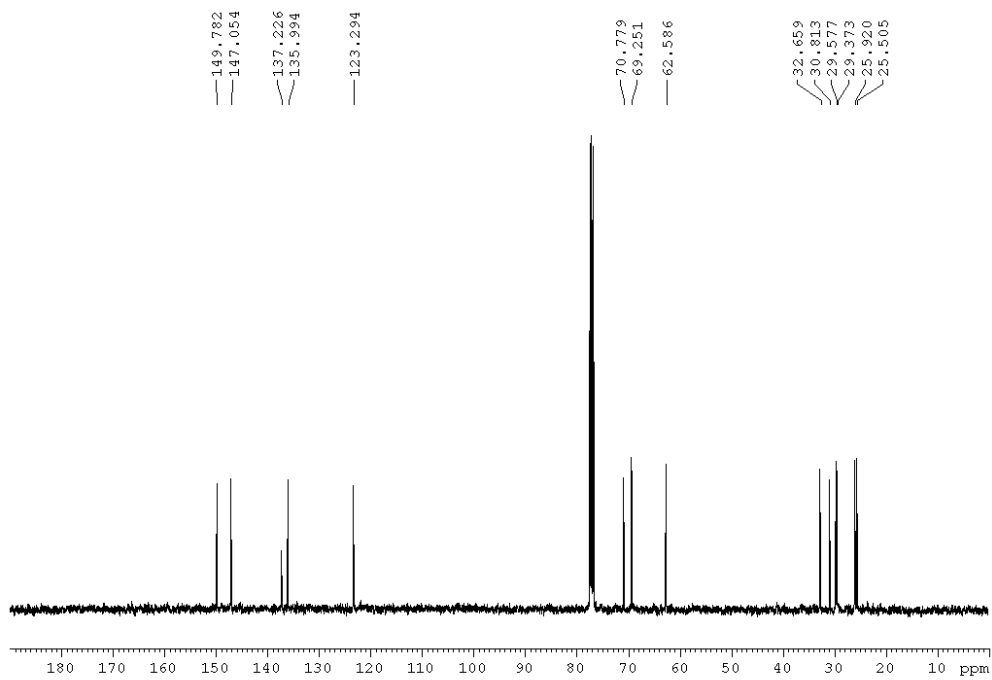


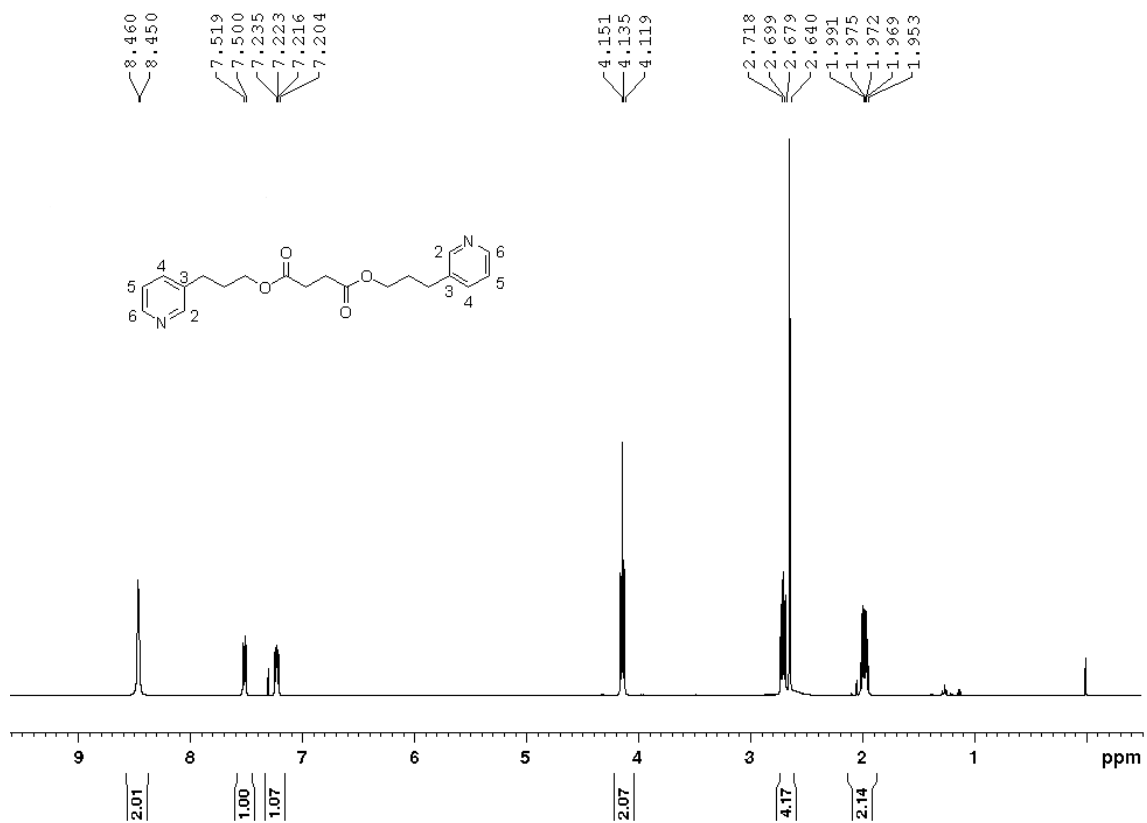
Espectro de RMN de ^1H do composto **7** (CDCl₃, 400 MHz)



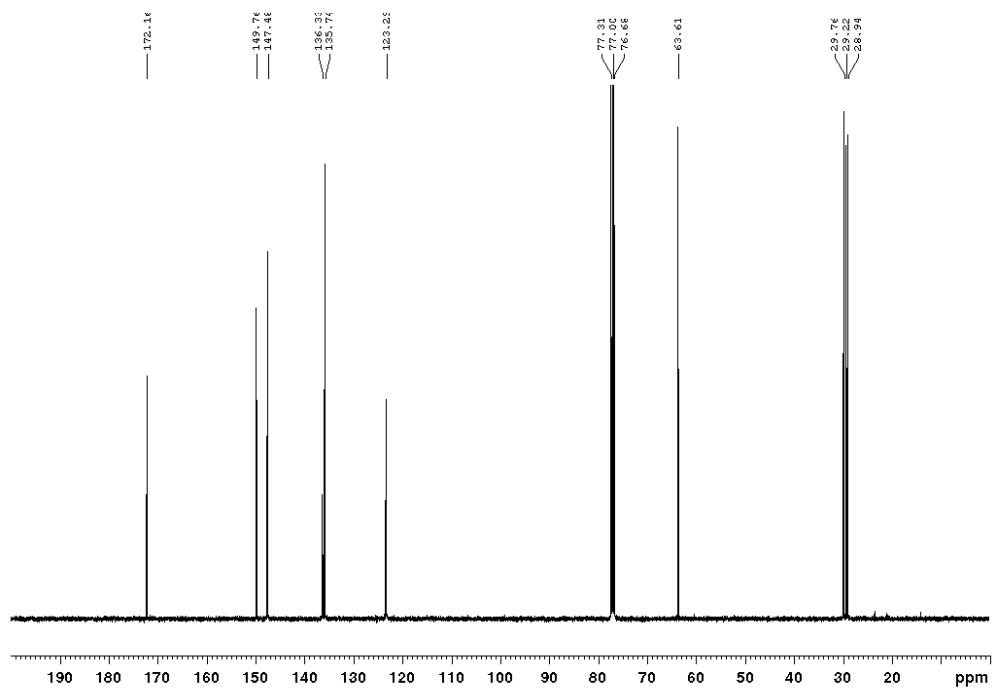
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7** (CDCl₃, 100 MHz)

Espectro de RMN de ^1H do composto **8** (CDCl₃, 400 MHz)Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8** (CDCl₃, 100 MHz)

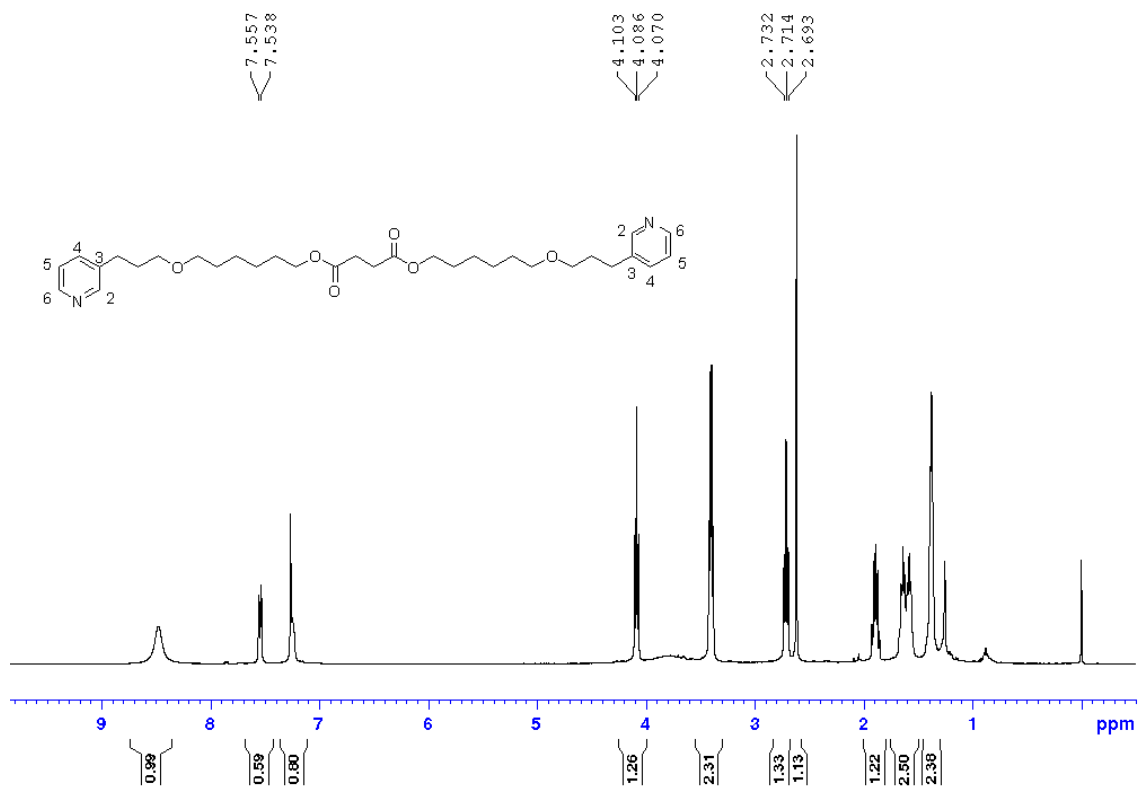
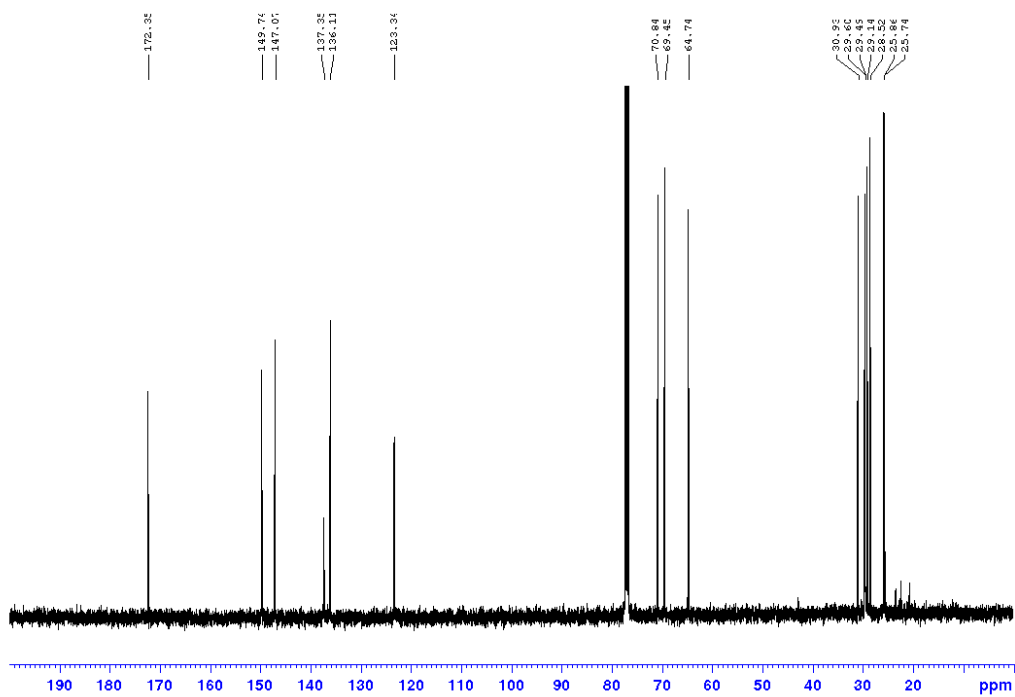
Espectro de RMN de ^1H do composto **5** (CDCl₃, 400 MHz)Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5** (CDCl₃, 100 MHz)

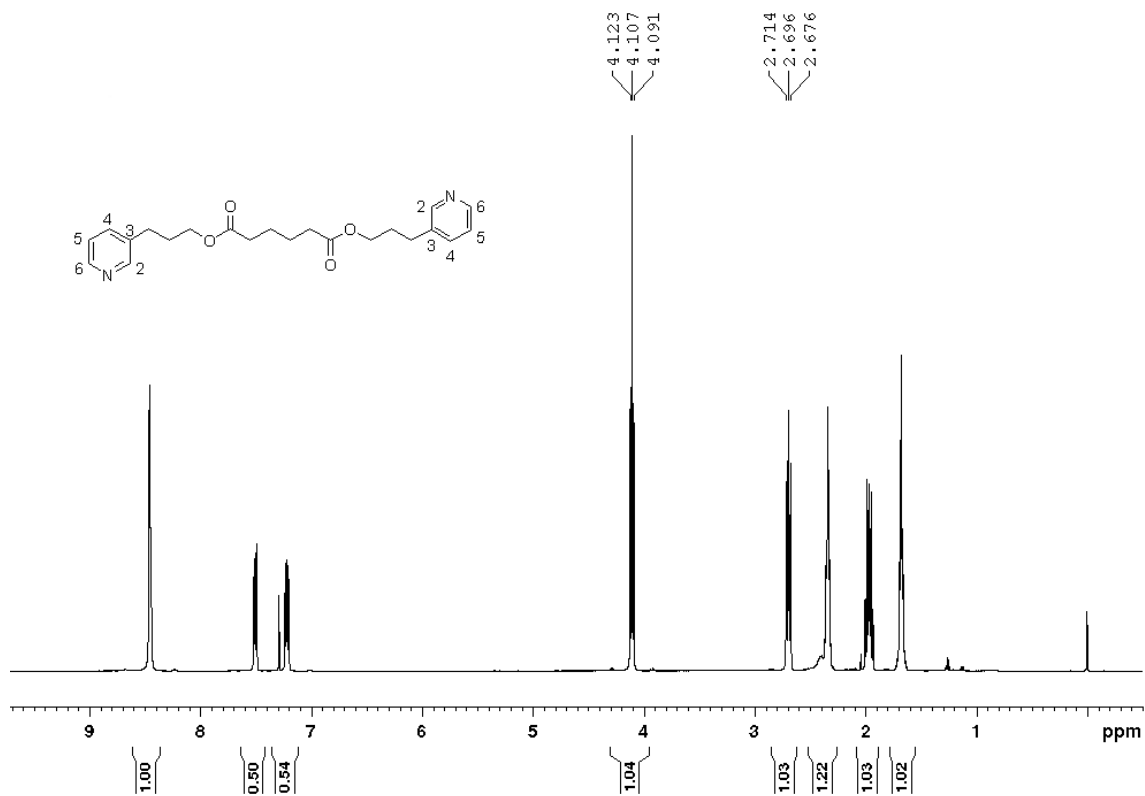


Espectro de RMN de ¹H do composto **2** (CDCl₃, 400 MHz)

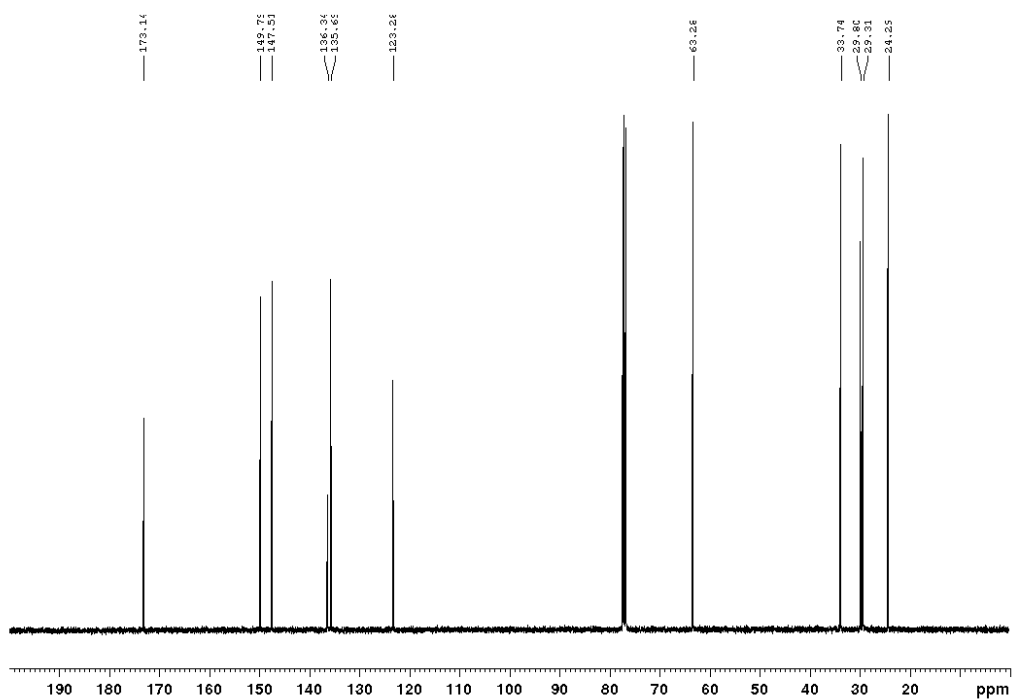


Espectro de RMN de ¹³C do composto **2** (CDCl₃, 100 MHz)

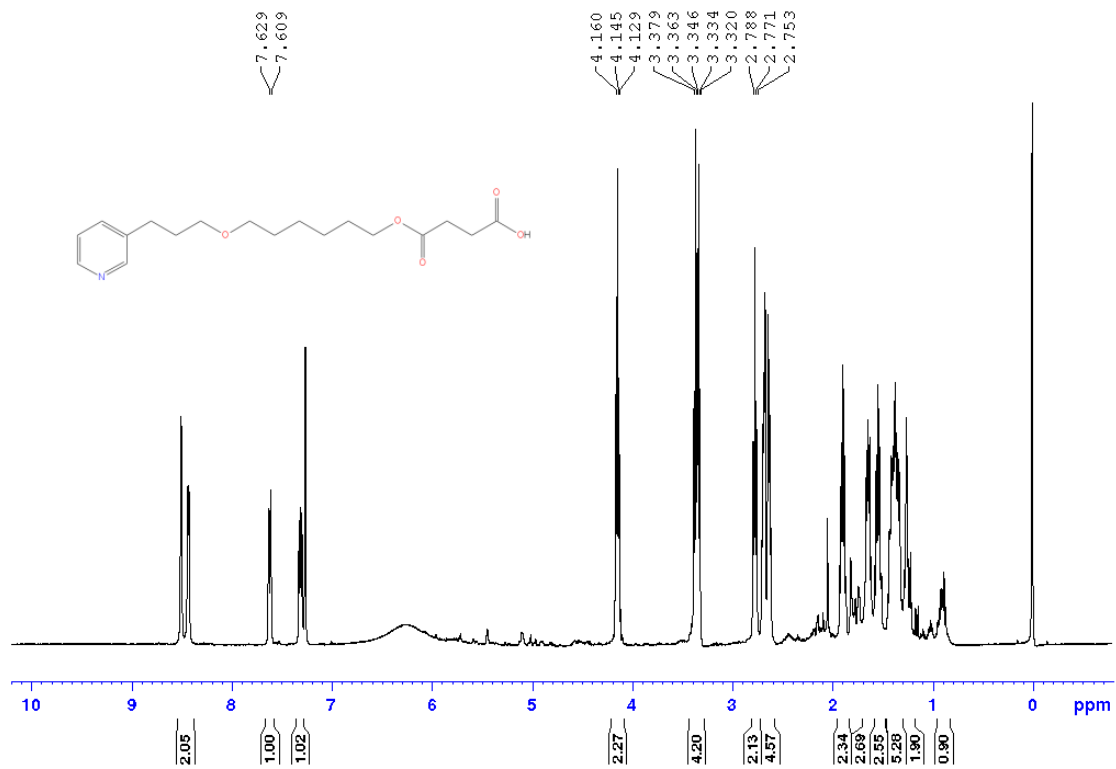
Espectro de RMN de ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 400 MHz)Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1 (CDCl_3 , 100 MHz)



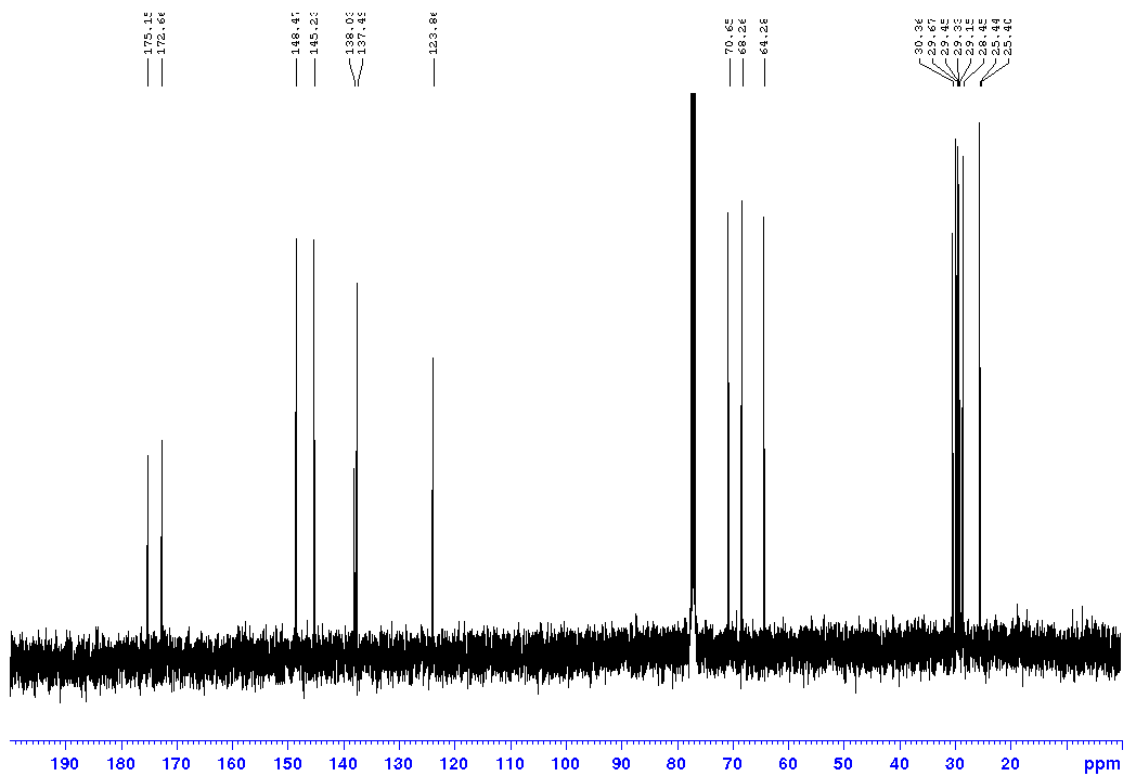
Espectro de RMN de ^1H do composto **3** (CDCl_3 , 400 MHz)



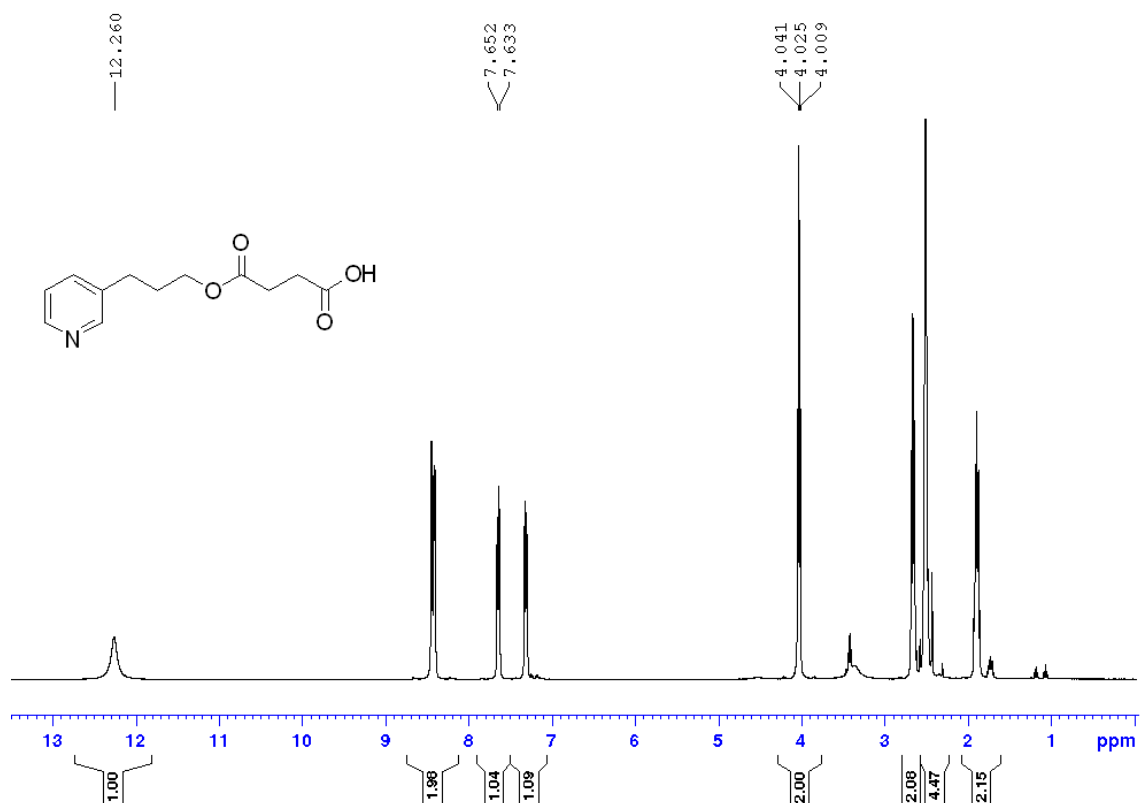
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** (CDCl_3 , 100 MHz)



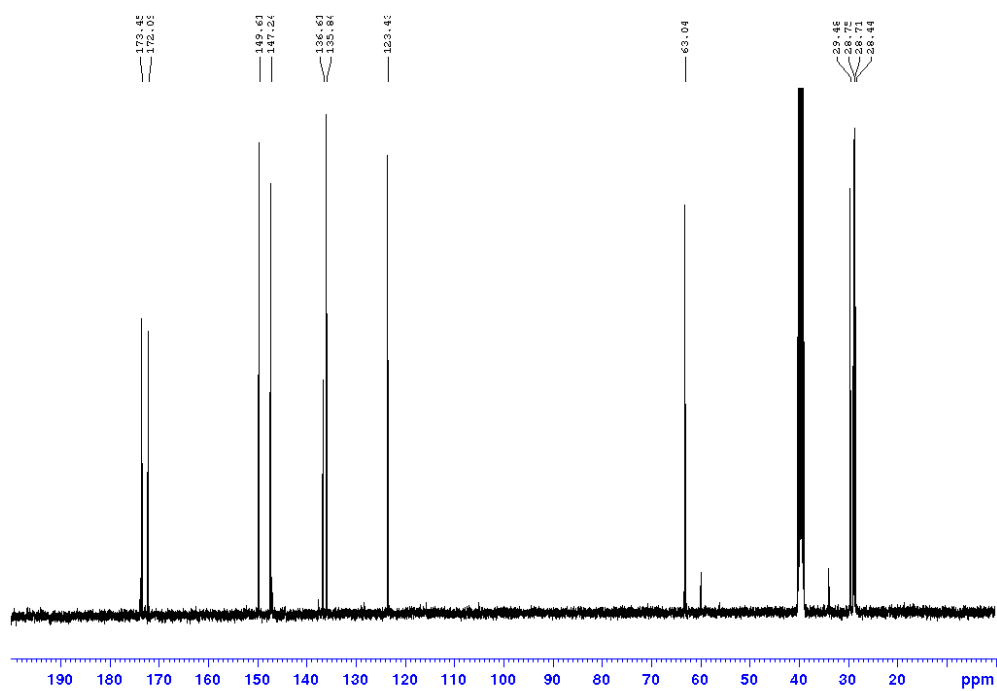
Espectro de RMN de ^1H do composto **9** (CDCl₃, 400 MHz)



Espectro de RMN de ^{13}C do composto **9** (CDCl₃, 100 MHz)



Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (DMSO- d_6 , 400 MHz)



Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (CDCl $_3$, 100 MHz)