



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA



PATRICIA SANTOS BARBOSA

**MARINOQUINOLINAS COMO UMA NOVA CLASSE DE COMPOSTOS
ANTIPLASMODIAIS: RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E
INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO**

CAMPINAS

2022

PATRICIA SANTOS BARBOSA

**MARINOQUINOLINAS COMO UMA NOVA CLASSE DE COMPOSTOS
ANTIPLASMODIAIS: RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E
ESTUDOS INICIAIS DE INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO**

Tese de Doutorado apresentada
ao Instituto de Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia.

ESTE EXEMPLAR NÃO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ESTUDANTE PATRICIA SANTOS BARBOSA, ORIENTADA PELO PROF. DR.
CARLOS ROQUE DUARTE CORREIA.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

B234m Barbosa, Patricia Santos, 1991-
Marinoquinolinas como uma nova classe de compostos antiplasmodiais :
relação estrutura-atividade e investigação do mecanismo de ação / Patricia
Santos Barbosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Carlos Roque Duarte Correia.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Marinoquinolinas. 2. Planejamento racional de fármacos. 3. Malária. I.
Correia, Carlos Roque Duarte, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Marinoquinoline as a new class of antiplasmodial compounds :
structure-activity relationship and investigation of the mechanism of action

Palavras-chave em inglês:

Marinoquinolines

Rational drug design

Malaria

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Carlos Roque Duarte Correia [Orientador]

Julio Cezar Pastre

Ronaldo Aloise Pilli

Daniela Barretto Barbosa Trivella

Anna Caroline Campos Aguiar

Data de defesa: 23-05-2022

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0138-3520>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2783774324318805>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia (Orientador)

Profa. Dra. Anna Caroline Campos Aguiar (UNIFESP)

Dra. Daniela Barretto Barbosa Trivella (LNBio-CNPq)

Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Julio Cezar Pastre (IQ-UNICAMP)

A ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado a ser defendida pelo(a) estudante **PATRICIA SANTOS BARBOSA** e examinada pela Comissão Julgadora em 23 de maio de 2022.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não seria possível sua conclusão e pelos quais eu serei eternamente grata.

Aos colegas e amigos do IQ

Ao Prof. Carlos Roque, por sua total disponibilidade e excelente orientação, pelas opiniões e críticas sempre construtivas e precisas, além de me ajudar a solucionar os eventuais problemas que surgiram durante toda a jornada deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, em especial a Ju, Mimi, Christian, Aretuza, Val, Henrique, Allanbique, Shiva, Ismat, Leo, Tomaz, Ingredy e Rica, pelo companheirismo, força e assistência durante a minha trajetória no LASSO. Aos amigos e colegas de outros laboratórios, em especial a Amanda, Joaquim, Paulo, Taciano e ao Lucas. Vocês são os responsáveis por tornar mais leve toda essa caminhada do doutorado.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela infraestrutura e apoio institucional. Aos funcionários, professores e técnicos do IQ/UNICAMP. Em especial, aos técnicos: Ricardo (HPLC), Anderson (RMN) e Rita (LIEM), pela constante ajuda na realização do meu trabalho.

A todas as pessoas que ajudaram a desenvolver a linha de pesquisa de marinoquinolinas. O esforço de vocês foi essencial para que eu pudesse realizar o meu trabalho.

Às agências de fomento

Gostaria de agradecer à CAPES e à FAPESP, pelas bolsas concedidas, e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo número 2018/0343-0). As

opiniões, hipóteses e conclusões expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

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

À minha família

Gostaria de agradecer aos meus pais, Dilson e Gildete, pela sólida base familiar e por me ensinarem desde pequena que a educação é capaz de criar oportunidades e transformar vidas.

Gostaria de agradecer à minha irmã, Juliana, que sempre me aconselhou a tomar as melhores decisões, seguindo o caminho do bem e do amor.

Gostaria de agradecer à Maninha que me guia do céu, aos meus avôs (*in memoriam*) e avós, tios e tias, primos e primas, e a todo restante da família, por todo o apoio.

Gostaria de agradecer, em especial, ao meu primo Daniel, pelo apoio aos meus pais em um dos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e colegas

Gostaria de agradecer aos meus amigos-irmãos, Carlos André, Piero, Amanda, Malena, José Carlos e Ana Luiza. Muitas vezes fui guiada pelas mãos de vocês na caminhada. Não tenho dúvidas de que quem anda bem acompanhado, com certeza vai mais longe. Gostaria de agradecer a todos os outros amigos que fiz e que, de certa forma, me apoiaram.

À empresa Selvita S.A.

Pela oportunidade de realizar o que mais amo.

Pela ajuda com as predições descritas nesse trabalho. Em especial, aos diretores e ao time da química computacional, pelas autorizações de uso e cálculos realizados, respectivamente.

A Deus

Por trilhar o meu caminho e sempre colocar pessoas especiais em minha vida, além de me fornecer condições para que eu pudesse me dedicar a este trabalho, pois sei que cada pequeno esforço meu como cientista contribuirá para grandes conquistas, auxiliando a tornar o mundo um lugar melhor.

„Remember that wherever your heart is, there you will find your treasure. You've got to find the treasure, so that everything you have learned along the way can make sense.“

(Paulo Coelho, em *O Alquimista*)

RESUMO

A malária, uma doença parasitária causada por diferentes espécies do gênero *Plasmodium*, foi responsável em 2020, por aproximadamente 627 mil mortes e 240 milhões de casos no mundo. Venezuela, Bolívia e Brasil são responsáveis por 77% dos casos na região das Américas. Devido aos casos de resistência aos principais fármacos antimalariais, incluindo derivados da artemisinina, a terapia da malária é, atualmente, um desafio. Uma das estratégias utilizadas para solucionar esse problema é a descoberta de fármacos com alvos terapêuticos não envolvidos nos mecanismos de resistência já desenvolvidos pelas espécies de *Plasmodium*.

Dentro desse contexto, as marinoquinolinas, alcaloide contendo o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina, surgem como uma alternativa na descoberta de novos fármacos antimalariais. A aplicação do planejamento de fármacos baseado no ligante resultou na descoberta de um novo composto *hit*, chamado de MQ-30, com alta potência e seletividade. A presença do carbamato na estrutura da MQ-30 foi associada à potência em escala nanomolar. Dando continuidade a esse estudo, esse trabalho de doutorado demonstra o potencial de marinoquinolinas como uma nova classe de compostos antiplasmodiais, por meio de estudos de relação estrutura-atividade qualitativos e investigações do mecanismo de ação.

Em um primeiro momento, foi desenvolvido um estudo sobre a importância do carbamato na estrutura da MQ-30 através da síntese de novos derivados, utilizando as técnicas clássicas de química medicinal de variação do substituinte alquílico, alongamento da cadeia e bioisosterismo. Novos derivados marinoquinolínicos foram obtidos sinteticamente empregando carbamatos com diferentes cadeias alquílicas e ureias, apresentando desde a ausência de atividade inibitória até alta potência. Assim, foram obtidas evidências sobre a importância da estrutura presente no carbamato *terc*-butílico para a potência do composto *hit* MQ-30, resultando na descoberta de quatro novas estruturas marinoquinolínicas com promissora atividade antiplasmodial.

Em seguida, novos derivados marinoquinolínicos foram obtidos a fim de se empregar a autofluorescência dessa classe de compostos na investigação do mecanismo de ação. Utilizando o bioisosterismo entre carbamatos e amidas, foram obtidos novos derivados através do acoplamento no núcleo marinoquinolínico com

aminoácidos. Essa série forneceu dez novos derivados com atividade inibitória submicromolar, sendo um desses análogos escolhido como composto-sonda para os estudos de imageamento e bioquímicos. O composto escolhido apresentou características farmacológicas adequadas, bem como similaridade estrutural com a MQ-30. Como resultado desse estudo, foi possível obter *insights* de que a classe de marinoquinolinas pode estar atuando como agentes antiplasmodiais através da inibição de cisteíno-proteases, num mecanismo de ação secundário.

A ferramenta empregada na investigação do alvo terapêutico foi a docagem molecular reversa num modelo de inteligência artificial. Os estudos *in silico* realizados internamente pela empresa Selvita S.A. indicaram que a proteína PfPKG pode ser um alvo terapêutico importante para a classe de marinoquinolinas. Dessa forma, estudos bioquímicos devem ser realizados para investigação desse alvo.

Ressalta-se que toda a parte biológica descrita nessa tese foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Rafael Guido (IFSC/USP) e seus colaboradores. A colaboração do Prof. Carlos Correia com o Prof. Rafael Guido faz parte do CEPID-CIBFar (projeto número 2013/07600-3).

ABSTRACT

Malaria, a parasitic disease caused by species of the genus *Plasmodium*, was responsible, in 2020, for approximately 627 thousand deaths and 240 million cases worldwide. Venezuela, Bolivia and Brazil account for 77% of cases in South America. Due to cases of resistance to the main antimalarial drugs, including artemisinin derivatives, malaria therapy is currently a challenge. A strategy used to solve this problem is the discovery of new drugs with therapeutic targets not involved in the resistance mechanisms already developed by *Plasmodium* species.

In this regard, marinoquinolines, alkaloids containing the 3*H*-pyrrolo[2,3-]quinoline nucleus, emerge as an alternative in the discovery of new antimalarial drugs. The application of ligand-based drug design resulted in the discovery of a new lead compound, the MQ-30, with high potency and selectivity. The presence of carbamate in the structure of MQ-30 was associated with the potency at the nanomolar scale. Continuing this study, this doctoral thesis demonstrates the potential of marinoquinolines as a new class of antiplasmodial compounds, through qualitative structure-activity relationship studies and investigations of the mechanism of action.

Initially, a study was carried out on the importance of carbamate in the structure of MQ-30 through the synthesis of new derivatives, using the classical techniques of medicinal chemistry of alkyl substituent variation, chain elongation and bioisosterism. New marinoquinoline derivatives containing the carbamate group with different alkyl substituent or urea group were synthetically obtained, presenting from the absence of inhibitory activity to high potency. Thus, insights into the importance of *tert*-butyl carbamate for potency of the hit compound MQ-30 were gained, resulting in the discovery of four new promising derivatives presenting promising antiplasmodial activity.

In sequence, new marinoquinoline derivatives were obtained in order to use the autofluorescence of this class of compounds in the investigation of the mechanism of action. Using bioisosterism between carbamates and amides, new derivatives were obtained by coupling the marinoquinoline nucleus with amino acids. This series provided ten new derivatives with submicromolar inhibitory activity, from which one of those derivatives was chosen as a probe compound for imaging and biochemical

studies. The chosen compound showed adequate pharmacological characteristics, as well as structural similarity with MQ-30. As a result of this study, it was possible to obtain insights that the class of marinoquinolines may be acting as antiplasmodial agents through the inhibition of cysteine proteases, in a secondary mechanism of action.

The tool employed in the investigation of the therapeutic target was the reverse molecular docking in an artificial intelligence model. The *in silico* studies carried out internally by the company Selvita S.A. indicated the *Pf*PKG protein may be an important therapeutic target for the marinoquinoline class. Thus, biochemical studies should be performed to investigate this target.

All the biological part described in this thesis was carried out in collaboration with the research group of Prof. Rafael Guido (IFSC/USP) and his collaborators. The collaboration of Prof. Carlos Correia with Prof. Rafael Guido is part of a project involved in the CEPID-CIBFar (FAPESP grant number 2013/07600-3).

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

[α] – rotação óptica

ACN – acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

ACT – terapia combinada com artemisinina

AMP – adenosina monofosfato

ART – artesunato

ATO – naftoquinona

ATP – adenosina trifosfato

Bn – benzil

Boc – *tert*-butóxicarbonil

Bu – butil

BuLi – Butil lítio

CCD – cromatografia em camada delgada

CG – cicloguanila

CI₅₀ – concentração inibitória média

CIM – concentração inibitória mínima

Cpt – ciclopentil

CQ – cloroquina

CYP2C9 – citocromo P450 2C9

CYP2D6 – citocromo P450 2D6

CYP450 – citocromo P450

Da – Daltons

DAD – detector de matriz de fotodiodos

DCM – diclorometano

DMSO-*d*₆ – dimetilssulfóxido hexadeuterado

ECCS – sistema de classificação de clearance estendido

EL – eficiência do ligante

ESI – ionização por eletrospray

Et – etil

EWG – grupos retiradores de eletrons

FDHFR-TS – dihidrofolato redutase-timidilato sintase

FP – ferriprotoporfirina

G6PD – glicose-6-fosfato desidrogenase

GMPc – monofosfato cíclico de guanosina

α – alfa

H2L – *hit-to-lead*

HepG2 – células de hepatocarcinoma humano

HepG2 – células de hepatocarcinoma humano

HPLC – cromatografia líquida de alto desempenho

HRMS – espectrometria de massa de alta resolução

***i*Bu** – isobutil

IBX – ácido iodo-benzóico

IMDAO – cicloadição intramolecular de DielsAlder oxazol

***i*Pr** – isopropil

IS – índice de seletividade

J – constantes de acoplamento

L – baixa

LBDD – planejamento de fármacos baseado no ligante

LipE – eficiência lipofílica

Log D – coeficiente de distribuição

Log S – coeficiente de solubilidade

LogP – coeficiente de partição

M – média

Me – metil

MoA – mecanismo de ação

MQ – marinoquinolina

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NBS – *N*-bromosuccinimida

NHA – átomo diferente de hidrogênio

Npt – neopentil

PbEEF – cepa de *Plasmodium berghei* na forma exo-eritrocítica

Pf3D7 – cepa de *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina

PfCRT – transportador de resistência à cloroquina em *P. falciparum*

PfCytB – complexo bc1 de *Plasmodium falciparum*

PfDd2 – cepa de *Plasmodium falciparum* com multirresistencia

PfK1 – cepa de *Plasmodium falciparum* com multirresistência aos principais fármacos antimalariais

PfK13 – proteína Kelch 13 de *P. falciparum*

Pgp – glicoproteína-P

PKG – proteína quinase dependente de GMPc

Ph – fenil

PI4K – inibidores de fosfatidilinositol 4-quinase

PN – pionitrinas

PQ – primaquina

PRN – pirrolnitrina

PYR – pirimetamina

REA – relação estrutura-atividade

Rf – fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SEAr – substituição eletrofílica aromática

t-Bu – *terc*-butil

THF – tetrahidrofurano

TIPS – triisopropilsilil

TMS – tetrametilsilano

TosMiC – isocianeto de tosilmetila

TPSA – área de superfície polar topológica

TsOH – ácido *p*-toluenossulfônico

UV – ultravioleta

δ – deslocamentos químicos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marinoquinolinas selecionadas e atividade antituberculose, reportadas por Akula et al. (2014).	47
Tabela 2. Equação e valores de referência para cálculo de eficiência do ligante (EL) e eficiência lipofílica (LipE).	50
Tabela 3. Estrutura química e atividade biológica do composto-líder reportado por Aguiar e col. (2018).	53
Tabela 4. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade dos derivados marinoquinolínicos contendo grupos carbamatos.	61
Tabela 5. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade dos derivados marinoquinolínicos contendo grupos carbamatos <i>N</i> -etilados.	64
Tabela 6. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade dos derivados marinoquinolínicos contendo grupos ureias alquílicas.	66
Tabela 7. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e propriedades físico-químicas calculadas para marinoquinolinas selecionadas.	68
Tabela 8. Propriedades ADMET calculadas para marinoquinolinas selecionadas. ..	70
Tabela 9. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade de marinoquinolinas derivadas de aminoácidos contendo o grupo <i>N</i> -Boc.	76
Tabela 10. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade de marinoquinolinas derivadas de L-aminoácidos.	79
Tabela 11. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade da marinoquinolina derivada do DL-neopentilglicina.	80
Tabela 12. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade dos compostos enantiomericamente enriquecidos derivados do aminoácido DL-NptGli.	81
Tabela 13. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e seletividade de marinoquinolinas derivadas de D-aminoácidos.	82
Tabela 14. Atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> e propriedades físico-químicas calculadas para marinoquinolinas derivadas de (<i>S</i>)-aminoamidas.	84

Tabela 15. Propriedades ADMET calculadas para marinoquinolinas derivadas de (S)-aminoamidas.	85
Tabela 16. Cepas de <i>P. falciparum</i> resistentes aos principais fármacos antimalariais e seus perfis de resistência.	88
Tabela 17. Proteínas com probabilidade maior que 75 % de serem o alvo terapêutico de marinoquinolinas.	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do parasito causador da malária.	25
Figura 2. Exemplos de fármacos quinolínicos e suas classificações.	28
Figura 3. Estrutura química da artemisinina e seus derivados.	30
Figura 4. Exemplos de fármacos classificados como (a) naftoquinonas e (b) pirimidinas e biguanidas.	31
Figura 5. Função do transportador <i>PfCRT</i> em cepas de <i>P. falciparum</i> resistentes à cloroquina.	33
Figura 6. Estrutura química e numeração do núcleo 3 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>c</i>]quinolina.	34
Figura 7. Estrutura química das marinoquinolinas naturais.	35
Figura 8. Outros produtos naturais contendo o núcleo 3 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>c</i>]quinolina. ...	35
Figura 9. Estrutura química de dois produtos naturais isolados da bactéria deslizante marinha <i>Rapidithrix thailandica</i>	36
Figura 10. Estruturas selecionadas de marinoquinolinas isoladas como produtos naturais reportadas na literatura com atividade biológica promissora.	45
Figura 11. Seleção de marinoquinolinas e suas atividades biológicas reportadas por Aguiar e col. (2018).	46
Figura 12. Marinoquinolinas com atividade antituberculose reportadas por Panciera e col. (2022).	47
Figura 13. Estudo iterativo de “hit-to-lead” em química medicinal.	48
Figura 14. Modificações estruturais propostas para análise de relação-estrutura atividade da MQ-30.	55
Figura 15. Estruturas expandidas das marinoquinolinas MQ-30 e 89	61
Figura 16. Comparação entre a estrutura química dos derivados marinoquinolínicos 107 , 108 e 110	77

Figura 17. Cromatogramas obtidos após resolução quiral utilizando HPLC analítico do composto (110).	78
Figura 18. (a) Valores de CI_{50} para o composto (113) entre as cepas sensível e resistentes de <i>P. falciparum</i> ; (b) Índices de resistência calculados para as cepas sensível 3D7 e para as cepas resistentes K1, DD2, TM90C6B, IPC4912 e PI4K.	89
Figura 19. Avaliação qualitativa da degradação do composto (113) frente à procedimentos da rotina experimental.	90
Figura 20. Microscopia confocal de células vivas de eritrócitos infectados com cepas de <i>P. falciparum</i> 3D7 tratadas com o composto (113). O composto (113) (10 μ M) foi visualizado por sua autofluorescência a 405 nm (excitação)/450-490 nm (emissão). As imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal TCS SP5 X (Leica Microsystems, Alemanha) equipado com uma lente de imersão em óleo de abertura numérica de $60 \times 1,4$. Barra de escala: 10 μ m.	91
Figura 21. Microscopia confocal de células vivas de HepG2 incubado com composto (113). Composto (113) (10 μ M) foi visualizado por sua autofluorescência a 405 nm (excitação)/450-490 nm (emissão). As imagens foram adquiridas usando microscópio confocal TCS SP5 X (Leica Microsystems, Alemanha). Barra de escala: 10 μ m.	92
Figura 22. Atividade proteolítica do composto (113).	93
Figura 23. Principais conclusões obtidas com o estudo de relação estrutura-atividade.	100

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese proposta para a pirrolnitrina e isopirrolnitrina.	36
Esquema 2. Rota biossintética para (a) a aplidiopsamine A e a família de pirrolnitrinas A-D, e (b) trigonoina B.	37
Esquema 3. Primeiros exemplos de construção do núcleo 3 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>c</i>]quinolina.	39
Esquema 4. Construção do núcleo marinoquinolínico reportada por Molina e colaboradores (1993).	39
Esquema 5. Exemplos de reações clássicas de síntese de pirrol aplicadas na síntese de marinoquinolinas.	41
Esquema 6. Exemplos de rotas sintéticas empregando reações de acoplamento cruzado na síntese de marinoquinolinas.	42
Esquema 7. Mecanismo proposto para a reação de Pictet-Spengler.	43
Esquema 8. Ciclo catalítico proposto para a reação de Suzuki-Miyaura.	44
Esquema 9. Análise retrossintética para obtenção do intermediário avançado de marinoquinolina.	56
Esquema 10. Rota sintética para obtenção dos intermediários-chave A1 e A2	57
Esquema 11. Rota sintética empregada na obtenção do intermediário avançado marinoquinolínico A3	58
Esquema 12. Mecanismo plausível para a reação de Pictet-Spengler empregada na síntese de marinoquinolinas.	59
Esquema 13. Obtenção das novas marinoquinolinas contendo variações na cadeia lateral do grupo carbamato.	60
Esquema 14. Obtenção do derivado marinoquinolínico contendo o grupo carbonato.	63
Esquema 15. Rota sintética para obtenção de marinoquinolinas <i>N</i> -etiladas de maneira divergente.	64

Esquema 16. Reação de obtenção de novas marinoquinolinas substituídas com grupos ureia.	65
Esquema 17. Rota sintética para obtenção de marinoquinolinas derivadas de aminoácidos.	75
Esquema 18. Mecanismo proposto para genotoxicidade do núcleo quinolínic.	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Malária	24
1.2. Principais fármacos disponíveis para o tratamento da malária	27
1.3. Marinoquinolinas	34
1.3.1. <i>Marinoquinolinas como produtos naturais</i>	34
1.3.2. <i>Principais estratégias sintéticas para obtenção de marinoquinolinas</i>	38
1.3.3. <i>Atividade biológica de marinoquinolinas</i>	45
1.4. Química medicinal	47
2. OBJETIVOS	52
3. ANÁLISE DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE MARINOQUINOLINAS: AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO CARBAMATO <i>TERC</i>-BUTÍLICO	53
3.1. Aspectos gerais	53
3.2. Resultados e discussão	55
3.2.1. <i>Síntese do material de partida</i>	55
3.2.2. <i>Influência do volume estérico</i>	59
3.2.3. <i>Investigação da importância do NH</i>	62
3.2.4. <i>Troca bioisostérica do carbamato por ureias</i>	65
3.2.5. <i>Perfil farmacêutico das séries de marinoquinolinas contendo os grupos carbamatos e ureias</i>	67
3.3. Conclusão	71
4. INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE MARINOQUINOLINAS	73
4.1. Aspectos gerais	73

4.2. Resultados e discussão	74
4.2.1. <i>Seleção do composto-sonda</i>	74
4.2.2. <i>Perfil farmacêutico da série de marinoquinolinas contendo os grupos (R)-aminoamidas</i>	83
4.2.3. <i>Investigação do mecanismo de ação</i>	87
4.3. Conclusão	98
5. CONCLUSÃO GERAL	100
6. PARTE EXPERIMENTAL	102
6.1. Considerações gerais	102
6.2. Síntese dos materiais de partida	103
6.2.1. <i>Síntese de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (A1)</i>	103
6.2.2. <i>Síntese de 3-(4-metóxi-2-nitrofenil)-1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (A2)</i>	105
6.2.3. <i>Síntese de 7-metóxi-4-(4-nitrofenil)-3H-pirrólo[2,3-c]quinolina (A3)</i>	107
6.3. Procedimento geral para síntese de marinoquinolinas contendo grupos carbamatos alquílicos, fenílico ou benzílico (85-92)	108
6.5. Síntese do derivado N-(4-{7- metóxi -3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il}fenil)carbonato de terc-butila (94)	113
6.6. Procedimento geral para síntese de marinoquinolinas contendo grupos carbamatos N-alquilados (96-98)	114
6.7. Procedimento geral para síntese de marinoquinolinas contendo grupos ureias alquílicas (99-102)	116
6.8. Procedimentos gerais para obtenção das marinoquinolinas contendo os grupos α-aminoamidas (103-120)	119
7. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	132
8. REFERÊNCIAS	170

1. INTRODUÇÃO

1.1. Malária

A malária humana é uma doença protozoária causada por espécies do gênero *Plasmodium* e transmitida pelas fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. As seis espécies transmitidas de pessoa para pessoa são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* (duas espécies), *P. malariae* e *P. knowlesi*.¹

A malária é uma doença infecciosa febril aguda. A maioria dos casos, incluindo os casos de infecção em mulheres grávidas, é causada pelo *P. falciparum* e pelo *P. vivax*. A malária na gravidez é especialmente perigosa por ser responsável indiretamente pelo aumento da mortalidade infantil devido ao aborto e retardo do crescimento intrauterino.²

Acredita-se que a malária placentária cause até 100 mil mortes infantis por ano, as quais ocorrem devido às complicações da doença, como nascimento prematuro, baixo peso de nascimento e anemia neonatal. Em adição, a malária placentária é atrelada aos riscos para grávidas, incluindo anemia materna e mortalidade.³

Em 2020, estima-se que ocorreram 627 mil mortes e 241 milhões de casos de malária no mundo, sendo 228 milhões desses casos somente no continente africano. Já na região das Américas, estima-se que ocorreram 650 mil casos de malária, sendo os países Venezuela, Bolívia e Brasil responsáveis por 77 % dos casos nessa região.⁴ No território brasileiro, a grande área endêmica de malária é formada pelos estados amazônicos, localizados na Região Norte do país e das regiões oeste do Maranhão e norte do Mato Grosso.⁵

Pacientes infectados com *P. vivax* na região amazônica são assintomáticos, porém podem ser portadores do parasito por até seis meses. Isso dificulta a detecção de pessoas infectadas, visto que seria necessário um diagnóstico laboratorial em massa para a população.⁶ Além disso, pacientes que apresentem níveis submicroscópicos de parasito sanguíneo e assintomáticos não realizam o tratamento, sendo assim um reservatório de parasito para transmissão contínua na região.⁷

O ciclo de vida do parasito da malária (Figura 1) envolve dois hospedeiros: o ser humano e a fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*.⁸ No ser humano, o ciclo é dividido em duas fases: pré-eritrocítica e eritrocítica. A fase pré-eritrocítica se inicia com a picada do mosquito *Anopheles* infectado, injetando parasitos na forma de esporozoítos na circulação sanguínea de um ser humano. Em seguida, os esporozoítos circulam pela corrente sanguínea do hospedeiro, até chegar ao fígado. Após invasão dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, os quais sofrem reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes e posteriormente aos merozoítos. No ciclo de *P. vivax* e *P. ovale*, o parasito pode permanecer em estágio adormecido no fígado, como hipnozoítos, causando recaídas tempos depois.⁹⁻¹⁰

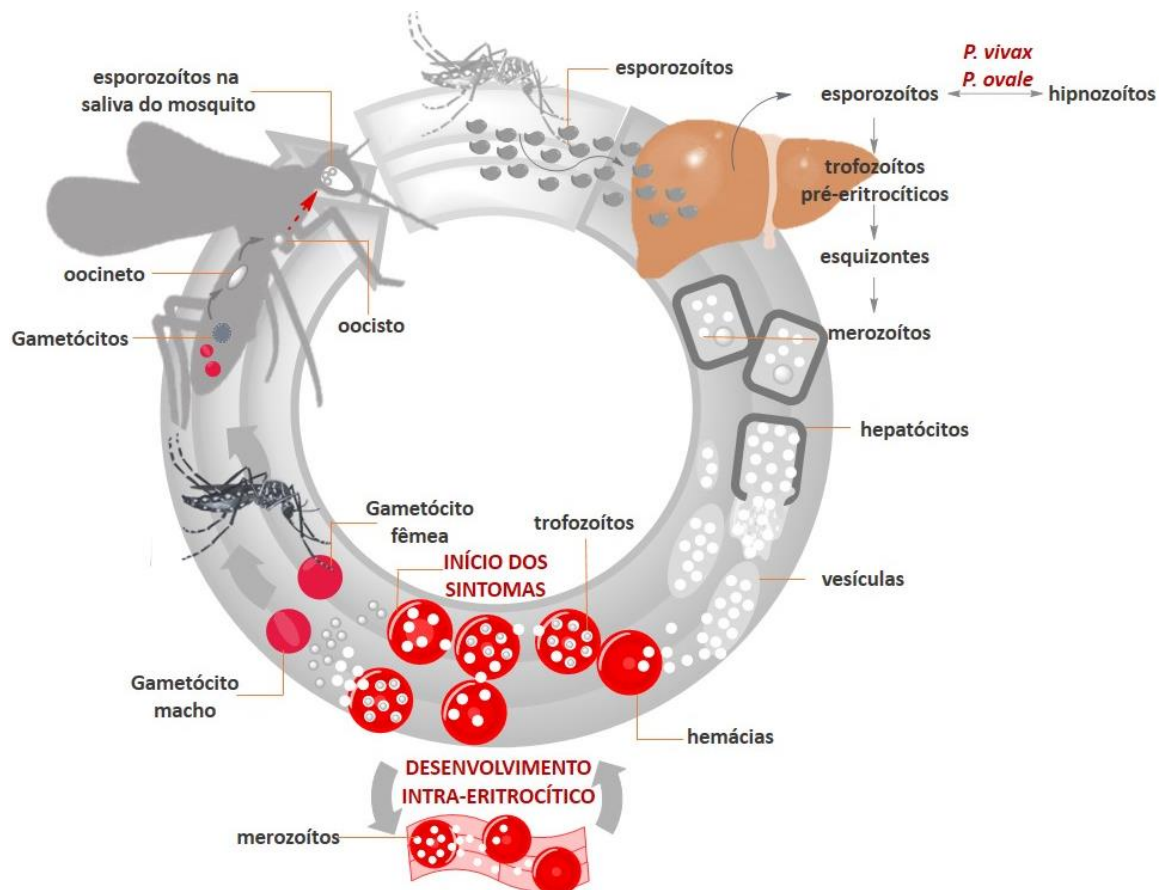


Figura 1. Ciclo de vida do parasito causador da malária. Adaptado de <https://www.malariavaccine.org/>.

Em seguida, os merozoítos são liberados dos hepatócitos em vesículas, as quais se rompem, liberando os merozoítos na circulação sanguínea. Na fase

eritrocítica, os merozoítos invadem as hemácias e se reproduzem assexuadamente, se desenvolvendo em trofozoítos em estágio de anel. Os trofozoítos podem então seguir dois caminhos: (1) amadurecer para esquizontes, que se rompem liberando merozoítos; ou (2) se diferenciar em gametócitos (macho ou fêmea), que vão infectar novos mosquitos *Anopheles*. Na fase esporogônica, os microgametas (gametócitos macho) penetram nos macrogametas (gametócitos fêmea) dando origem aos gametas. Por sua vez, os gametas se diferenciam em oocinetos, que invadem a parede do intestino do mosquito e se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem e se rompem, liberando novos esporozoítos, que se deslocam até as glândulas salivares do mosquito. Um novo ciclo de vida se inicia com a inoculação de esporozoítos em outros seres humanos.⁹⁻¹⁰

O estágio de desenvolvimento intra-eritrocítico está intimamente relacionado à alimentação do parasito. Para obter aminoácidos essenciais para seu crescimento, o parasito degrada a hemoglobina (presente nas hemácias) dentro do seu vacúolo digestivo (também conhecido como compartimento ácido devido ao pH ser aproximadamente igual a 5). Nesse processo, há a formação do grupo β -hematina (água/hidroxoferriprotoporfirina IX ou $H_2O/HO-Fe(III)PPIX$), sendo bastante solúvel e tóxico ao parasito. Em um processo de detoxificação, o parasito cristaliza o grupo heme em uma molécula insolúvel chamada hemozoína, reduzindo a capacidade pro-oxidante desse grupo. A cada ciclo intra-eritrocítico que o parasito completa, a hemozoína é liberada na corrente sanguínea do hospedeiro.¹¹

Além dos sintomas clínicos, a malária também está associada a efeitos socioeconômicos negativos. Nos casos de malária infantil, a morbidade da doença resulta em absentismo escolar, resultando no aumento de taxas de reprovação, repetição dos anos escolares e aumento das taxas de abandono escolar. Em adição, a malária em crianças pode causar desnutrição, afetando o desenvolvimento cerebral e cognitivo.¹² Entre os casos graves, temos como exemplo a malária placentar. A anemia severa na gravidez está fortemente associada a um alto grau de morbidade física e psicossocial, causando sintomas como tonturas, falta de ar e palpitações com frequência, impedindo o indivíduo de ter uma vida normal.¹³

Mesmo com todos os esforços e investimentos, ainda existem áreas nas quais a malária é endêmica. Diversas intervenções eficazes vem sendo aplicadas visando reduzir a mortalidade, de maneira geral, em regiões endêmicas. O uso de

redes mosquiteiras tratadas com inseticida e a pulverização residual interna reduzem as chances de um indivíduo ser picado pelo mosquito transmissor da doença. Essas duas estratégias são bem estabelecidas na prevenção da malária em crianças. Nos casos de mulheres grávidas, ainda existe a estratégia de terapia preventiva intermitente, a qual consiste na administração de medicamentos antimaláricos eficazes de maneira profilática.¹⁴

As vacinas fazem parte de outra estratégia preventiva da malária que tem estado em evidência. De maneira geral, as vacinas são uma das ferramentas preventivas mais bem-sucedidas na saúde pública, no entanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz para prevenção de *P. falciparum* em humanos tem sido um desafio durante décadas.¹⁵

1.2. Principais fármacos disponíveis para o tratamento da malária

O tratamento correto dos casos de malária é essencial para o sucesso na redução do agravamento e letalidade da infecção. Até o final dos anos 50, a cloroquina era o fármaco de escolha para o tratamento de todas as formas infectantes do *Plasmodium*. Atualmente, devido aos casos de resistência à cloroquina e a outros fármacos antimalariais, a terapia da malária é um desafio para os profissionais de saúde.¹⁶

O tratamento da malária deve atingir o parasito em pontos-chave de seu ciclo de vida, visando (1) reduzir a patogenia e a manifestação clínica da infecção, através da interrupção da esquizogonia sanguínea, (2) evitar recaídas tardias em casos de *P. vivax*, destruindo os hipnozoítos, (3) bloquear a transmissão do parasito. Dessa forma, os fármacos antimalariais podem atuar em mais de uma forma do parasito, bem como serem usados em combinações.¹⁷

Os fármacos antimalariais podem ser divididos quimicamente em: (1) quinolinas, (2) lactonas sesquiterpênicas, (3) álcoois derivados do fenantreno, antraceno e fluoreno, (4) pirimidinas e bisguanidas, (5) naftoquinonas e (6) antimicrobianos. Os fármacos quinolínicos podem ainda ser divididos em 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas e álcoois quinolínicos (Figura 2).

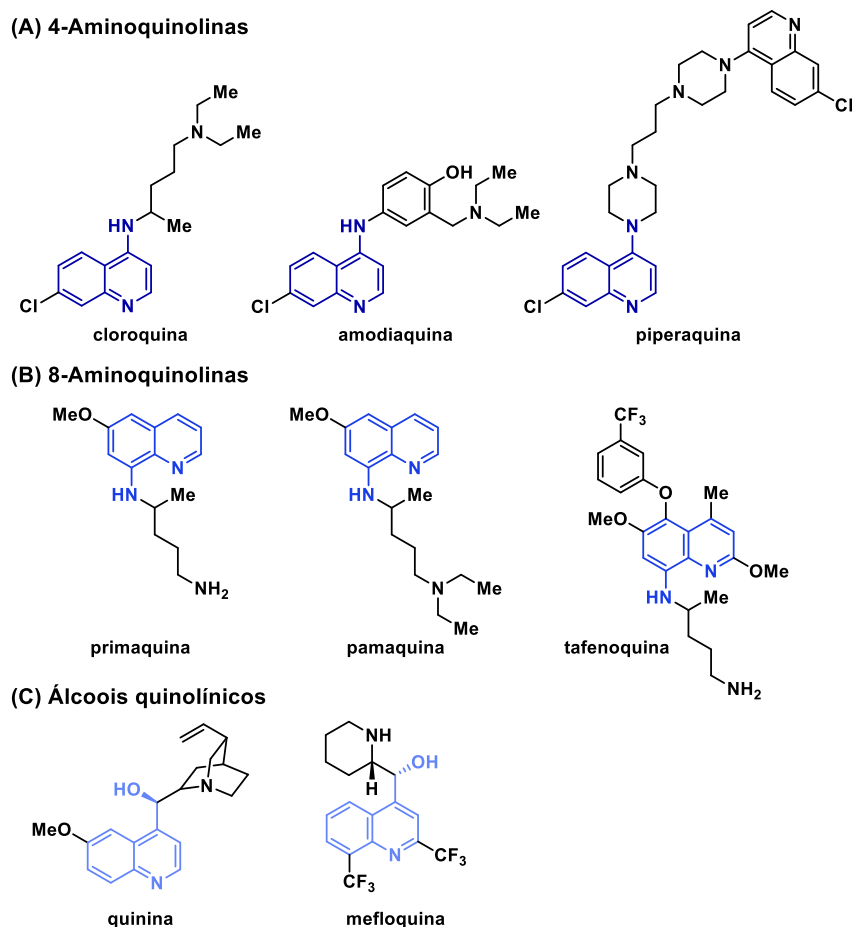


Figura 2. Exemplos de fármacos quinolínicos e suas classificações.

As 4-aminoquinolinas são a classe de fármacos mais bem-sucedidos no tratamento da malária (Figura 2a). O fármaco mais conhecido desse grupo é a cloroquina, a qual age exclusivamente em formas presentes no estágio intra-eritrocítico da doença. O modo de ação da cloroquina como fármaco antimalárico ainda não é completamente elucidado, entretanto, devido ao estágio intra-eritrocítico da doença estar relacionado ao processo de digestão, a hipótese mais aceita é que a cloroquina interfira no processo de alimentação do parasito, mais especificamente na inibição da formação da hemozoína.¹⁸⁻¹⁹

A atividade antimalárica da cloroquina depende de sua captação e concentração nos eritrócitos infectados com o parasito. Acredita-se que a entrada da cloroquina no parasito seja devido ao mecanismo de captura de prótons: a cloroquina é uma base fraca que, na sua forma não carregada, difunde-se livremente em

compartimentos ácidos (incluindo o vacúolo digestivo), onde é protonada e impedida de sair.²⁰

A maneira pela qual a cloroquina inibe a formação de hemozoína ainda não foi completamente elucidada e diversas hipóteses foram formuladas. Uma hipótese é que a cloroquina forma um complexo com a ferriprotoporfirina IX (FP), impedindo sua incorporação na β -hematina. Acredita-se que o complexo cloroquina-FP seja tóxico e isso resulte na morte do parasito. Outra possibilidade é a cloroquina inibir o crescimento do cristal de hemozoína ao atracar na face de crescimento do cristal, levando ao acúmulo de β -hematina no parasito.²¹⁻²²

Outra hipótese considera as duas primeiras. Nesse modelo, a cloroquina forma o complexo cloroquina-FP e é esse complexo que interage com o cristal de β -hematina, impedindo o seu crescimento. Uma quarta hipótese leva em consideração a HRP-II, uma proteína que contém duas repetições de aminoácidos (His-His-Ala-His-His-Ala-Ala-Asp-Ala e His-His-Ala-Ala-Asp) e que se liga entre 20 – 50 moléculas de FP. Acredita-se que a proteína HRP-II esteja envolvida na formação da hemozoína e que a cloroquina substitua a FP, inibindo a formação do cristal.²¹⁻²²

As 8-aminoquinolinas são empregadas contra as formas teciduais e nos estágios sexuais do parasito (Figura 2b). A primaquina é amplamente utilizada contra os hipnozoítos em infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*.⁶ Acredita-se que o modo de ação no estágio hepático da primaquina envolva um mecanismo bioquímico de retransmissão em duas etapas. Na primeira etapa, a primaquina é metabolizada em seus derivados hidroxilados (HO-PQm) pelo complexo CPR/CYP2D6, no fígado. Na etapa seguinte, os HO-PQm sofrem uma oxidação espontânea à quinonaiminas (O=PQm) com geração de H_2O_2 . As HO-PQm são reduzidas às HO-PQm por elétrons provenientes de um processo envolvendo o complexo CPR, NADH e FAD/FMN. Dessa forma, um ciclo catalítico é estabelecido envolvendo metabólitos da primaquina e com a geração espontânea de H_2O_2 . O acúmulo de H_2O_2 é responsável pela morte dos parasitos no local.²³

A primaquina é o principal fármaco utilizado em infecções por *P. vivax*, visto que tem sua ação em hipnozoítos, formas latentes do parasito responsáveis pelo retorno periódico da infecção. A dose total da primaquina é administrada entre 7 e 14 dias e é responsável por evitar recaídas em mais de 90% dos casos por infecção por

P. vivax. O grande desafio do emprego clínico desse fármaco é que ele tem efeitos adversos severos, como hemólise intravascular grave com urina escura e icterícia leve, em contrapartida aos sintomas leves da infecção. Isso acaba resultando no abandono do tratamento pelo paciente, aumentando o risco de desenvolvimento de resistência.²⁴

Dessa forma, a tafenoquina foi aprovada para uso humano sendo desenvolvida para melhorar o tratamento em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*. O grande diferencial da tafenoquina em relação às 8-aminoquinolinas é que ela é utilizada em dose única, não havendo risco do paciente abandonar o tratamento. A grande desvantagem dos fármacos primaquina e tafenoquina é que eles causam hemólise em pessoas com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma deficiência genética comum em áreas tropicais.²⁵

O principal representante do grupo dos álcoois quinolínicos é a quinina, um alcaloide natural encontrado na casca da Chinchona (Figura 2c). A quinina age nos esquizontes presentes no estágio intra-eritrocítico e também possui ação gametocida para infecções causadas por *P. vivax* e *P. malarie*. Em adição, a quinina é um fármaco com baixo índice terapêutico e grandes efeitos adversos.²⁶ Assim como a cloroquina, acredita-se que a quinina exerça sua ação antiplasmodial através da inibição da formação da hemozoína. No entanto, o modo com o qual isso acontece ainda não foi completamente elucidado.²²

As lactonas sesquiterpênicas incluem a artemisinina e seus derivados (Figura 3). A artemisinina foi encontrada inicialmente na planta *Artemisia annua* (Qinghao) pela farmacologista Youyou Tu, a qual ganhou o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2015 pela sua descoberta.²⁷ Esse fármaco e seus derivados constituem a base da terapia combinada em artemisinina (ACT), tratamento de primeira escolha para casos de malária não complicada.²⁸

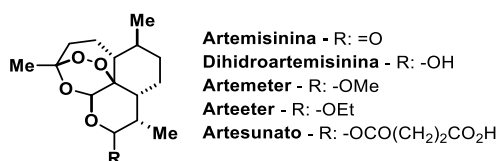


Figura 3. Estrutura química da artemisinina e seus derivados.

A reação de redução da artemisinina deu origem à dihidroartemisinina, um composto mais potente, e permitiu a obtenção de pro-fármacos, como o artemeter e o artesunato, através da funcionalização da hidroxila. As lactonas sesquiterpênicas são ativas nas formas do parasito presentes no estágio eritrocítico, além de serem responsáveis pela redução da transmissão através de sua ação gametocida.²⁹⁻³⁰

Os mecanismos pelos quais as lactonas sesquiterpênicas exercem sua ação antimalarial ainda não foram completamente elucidados. No entanto, acredita-se que a atividade das lactonas sesquiterpênicas resultem da cisão redutiva da ponte de peróxido pelo átomo de ferro da FP reduzido, produzido no vacúolo digestivo à medida que o parasito digere a hemoglobina.³¹

A associação entre atovaquona, uma naftoquinona, e proguanil, um pro-fármaco da classe dos antifolatos é amplamente empregada como tratamento preventivo de infecções por *P. falciparum* (Figura 4). Acredita-se que a atovaquona exerça seu mecanismo de ação através da competição com a ubiquinona, inibindo especificamente o complexo bc1 (*PfCytB*) e levando a perda da função mitocondrial.³²

As pirimidinas e biguanidas (Figura 4b) possuem mecanismo de ação semelhante, exercendo ação antagonista do folato. Os fármacos dessa classe ligam-se seletivamente à enzima dihidrofolato redutase-timidilato sintase (FDHFR-TS) do parasito, sendo agentes esquizonticidas e agindo sobre a forma assexuada do parasito.^{1,16}

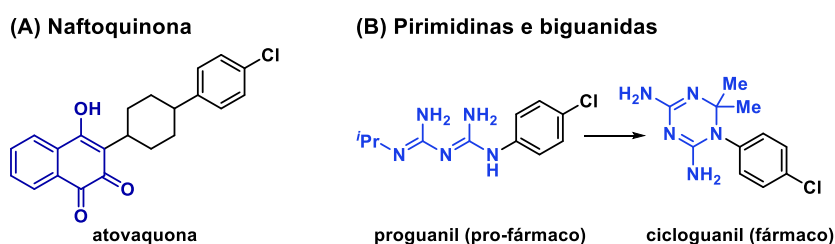


Figura 4. Exemplos de fármacos classificados como (a) naftoquinonas e (b) pirimidinas e biguanidas.

A monoterapia com a atovaquona resulta rapidamente no desenvolvimento de resistência em cepas de *P. falciparum*. No entanto, a terapia deste fármaco em

combinação com o proguanil resulta no aprimoramento de seu efeito, através do sinergismo entre os dois fármacos, que resulta na redução da probabilidade de desenvolvimento de resistência.³³

Existem diversos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da malária, além de diversas estratégias terapêuticas. Entretanto, o surgimento de cepas resistentes é uma barreira na erradicação da doença. A resistência aos fármacos quinolínicos já é bem conhecida e, infelizmente, disseminada nas regiões endêmicas. O uso de quinolinas tem sido realizado somente na terapia com ACT.^{34,35}

A terapia com ACT tem sido o sucesso do tratamento antimalarial desde o início do seu uso, nos anos 90. No entanto, desde 2015, a redução da morbidade e da mortalidade por malária tem desacelerado, mesmo com investimentos em saúde pública.³⁶ Uma das causas disso é o surgimento e propagação da resistência aos fármacos antimalariais. A monoterapia e a dosagem incompleta constituem os principais motivos para o desenvolvimento de resistência.^{34,36}

A resistência à cloroquina já é bastante conhecida. Mutações no transportador de resistência à cloroquina em *P. falciparum* (PfCRT) constituem a principal causa de resistência à cloroquina conhecida. Um exemplo bastante conhecido é a mutação K76T (Figura 5). Nos parasitos sensíveis à cloroquina, o PfCRT, responsável por exportar substratos naturais de dentro do vacúolo digestivo, possui uma carga positiva no aminoácido lisina⁷⁶. Nesse caso, a cloroquina não é exportada, ou é pouco exportada, porque está protonada dentro do vacúolo e ocorre uma repulsão de cargas.³⁷⁻³⁸

Nos parasitos resistentes à cloroquina, há uma mutação no gene K67T, trocando o aminoácido lisina por treonina. O resultado é a perda da carga positiva nessa posição e ambos substratos naturais e a cloroquina protonada são exportadas do vacúolo digestivo. Assim, o parasito se torna resistente à cloroquina, pois a mesma não consegue atuar na inibição da hemozoína no vacúolo digestivo.³⁷⁻³⁸

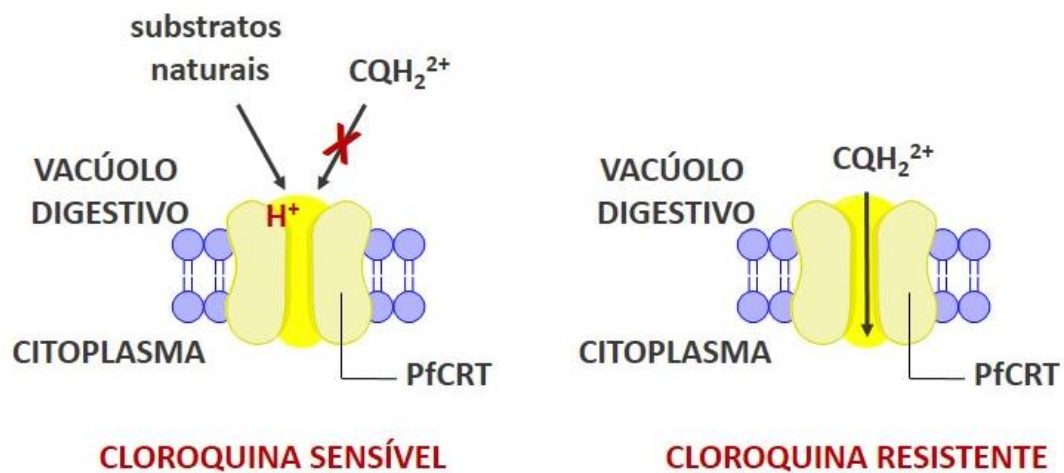


Figura 5. Função do transportador *PfCRT* em cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina.

Mutações na proteína *PfCRT* também conferem resistência a outros fármacos 4-aminoquinolínicos e aos álcoois quinolínicos, como a quinina e halofantrina. No caso da atovaquona, mutações no citocromo B do *P. falciparum* *PfCytB* que levam à modificação em sua atividade catalítica conferem resistência a esse fármaco. Recentemente, foram encontradas cepas resistentes à artemisinina e seus derivados no Sudeste Asiático.³⁹

Mutações na proteína Kelch 13 de *P. falciparum* (*PfK13*) estão fortemente associadas com a resistência à artemisinina. *PfK13* é uma proteína essencial para o desenvolvimento eritrocítico assexuado do parasito localizada no retículo endoplasmático, porém sua função ainda é desconhecida. Também não está claro como a mutação nessa proteína permite que o parasito tolere o estresse oxidativo e o dano celular causado pela artemisinina.⁴⁰

O desenvolvimento da resistência à artemisinina é bastante preocupante, pois as lactonas sesquiterpênicas constituem um dos fármacos para a terapia com ACT, que tem sido o sucesso do tratamento da malária. A resistência aos fármacos disponíveis é o fator central na necessidade do desenvolvimento de fármacos antimalariais com novos alvos terapêuticos.⁴¹

1.3. Marinoquinolinas

Heterociclos são compostos orgânicos que contêm um ou mais heteroátomos, como nitrogênio, oxigênio e enxofre, como partes de um ciclo. Essa classe de compostos tem uma grande importância nas químicas orgânica, medicinal e biológica e representam mais da metade dos compostos orgânicos conhecidos. Além disso, muitos produtos naturais e de origem biológica apresentam partes heterocíclicas em sua estrutura. Alcaloides são exemplos conhecidos de compostos heterociclos.⁴²

Dentre os heterociclos, podemos destacar os indóis e as quinolinas. Os indóis foram descritos inicialmente em 1806, por Bayer and Knop e desde então tem sido encontrados em diversos produtos naturais e sintéticos. Assim como os indóis, os compostos quinolínicos também são considerados estruturas privilegiadas devido ao seu amplo potencial farmacológico e biológico.⁴³⁻⁴⁴ Compostos quinolínicos, em especial, são populares devido ao seu potencial farmacológico e à sua aplicação como fármacos antimalariais.⁴⁵

Dentro desse contexto, marinoquinolinas são alcaloides, descobertos inicialmente como produtos naturais, que possuem o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina (Figura 6). Esse núcleo foi inicialmente reportado em 1924 por Robinson e Robinson ao estudar o mecanismo da reação de Fischer, na síntese de indóis.⁴⁶ No entanto, somente após a descoberta da primeira marinoquinolina, em 2006, o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina passou a ser amplamente estudado.⁴⁷

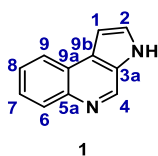


Figura 6. Estrutura química e numeração do núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina.

1.3.1. Marinoquinolinas como produtos naturais

As marinoquinolinas foram descobertas como produtos naturais em 2006, através do isolamento da **MQ A** (Figura 7a) de uma bactéria deslizando marinha *Rapidithrix thailandica*, encontrada no mar de Andaman, na costa tailandesa.⁴⁷⁻⁴⁸ Em 2011, os derivados **MQ B-F** foram isolados da bactéria deslizando *Ohtaekwangia*

kribbensis, encontrada em Kukrail Reserva Florestal e Crocodile Centro de Pesquisa, no estado de Uttar Pradesh, na Índia (Figura 7a).⁴⁹

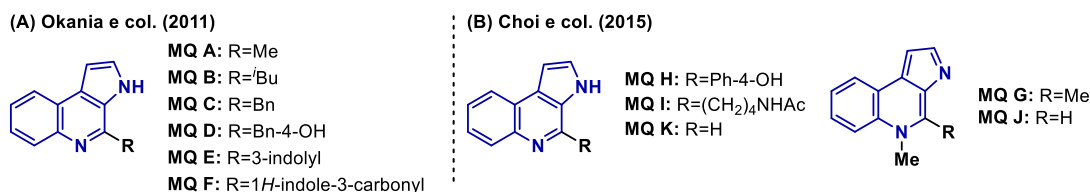


Figura 7. Estrutura química das marinoquinolinas naturais.

Em 2015, novas cinco marinoquinolinas **MQ G-K** foram isoladas das bactérias Gram-negativas *Mooreia alkaloidigena* and *Catalinimonas alkaloidigena*, encontradas no Atol Palmyra, localizado na Ilha Catalina (Estados Unidos) (Figura 7b).⁵⁰ Além de marinoquinolinas, outros produtos naturais também apresentam o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina (Figura 8).

A aplidiopsamina A foi isolada da ascídia colonial *Aplidiopsis confluata*, encontrada na Tasmânia, sudoeste australiano. Esse composto possui o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina conjugado com uma adenina, através de uma ponte de metileno. É raro encontrar produtos naturais não-glicosídeos conjugados com bases nitrogenadas púricas.⁵¹

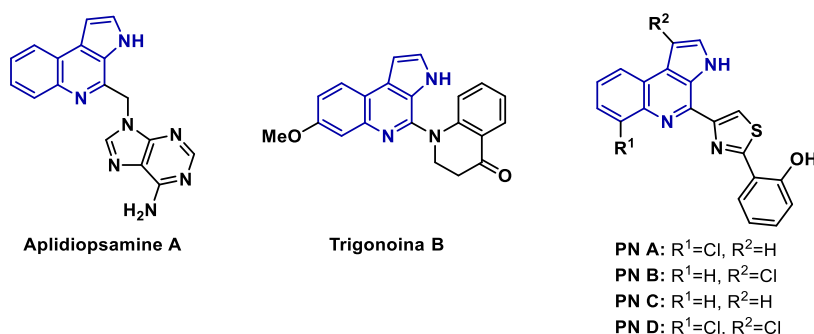


Figura 8. Outros produtos naturais contendo o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina.

Outro produto natural que contém o mesmo núcleo pirroloquinolínico é a trigonoina B, a qual foi isolada de folhas da planta *Trigonostemon lii*, encontrada na província chinesa de Yunnan.⁵² Por sua vez, a família de pionitrinas **PN A-D** foi isolada

recentemente da pupa de um inseto coletado em campo, o qual foi encontrado em um tronco podre no Parque Estadual de Devil's Lake, nos Estados Unidos.⁵³

Um estudo anterior com a bactéria marinha *R. thailandica* reportou o isolamento, através da técnica de fermentação em larga escala, de duas estruturas relacionadas com as marinoquinolinas (Figura 9). O composto **2**, em específico, está estruturalmente relacionado com as marinoquinolinas e é considerado um intermediário para a biossíntese desses compostos.⁵⁴

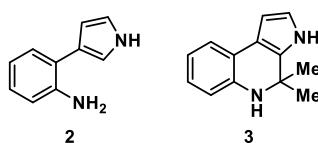
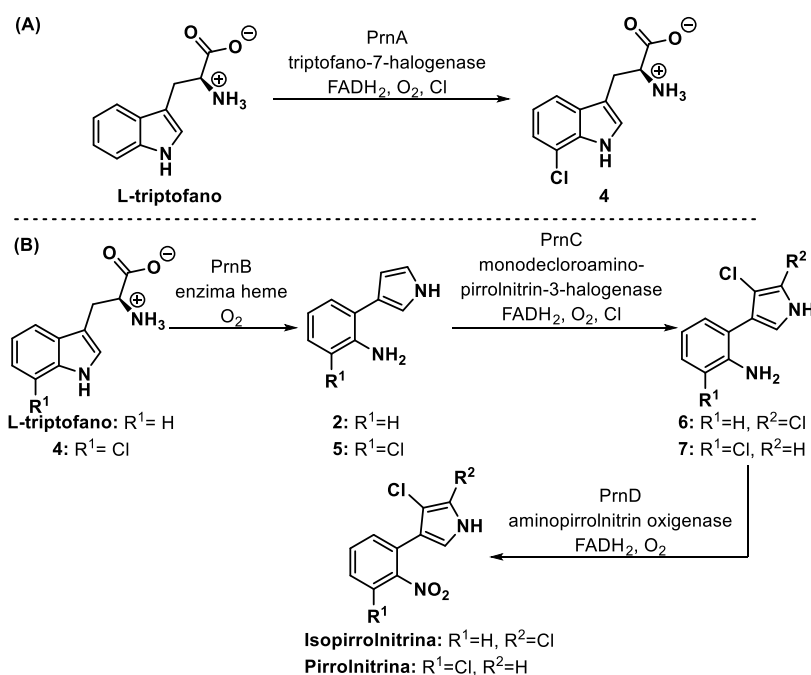


Figura 9. Estrutura química de dois produtos naturais isolados da bactéria deslizante marinha *Rapidithrix thailandica*.

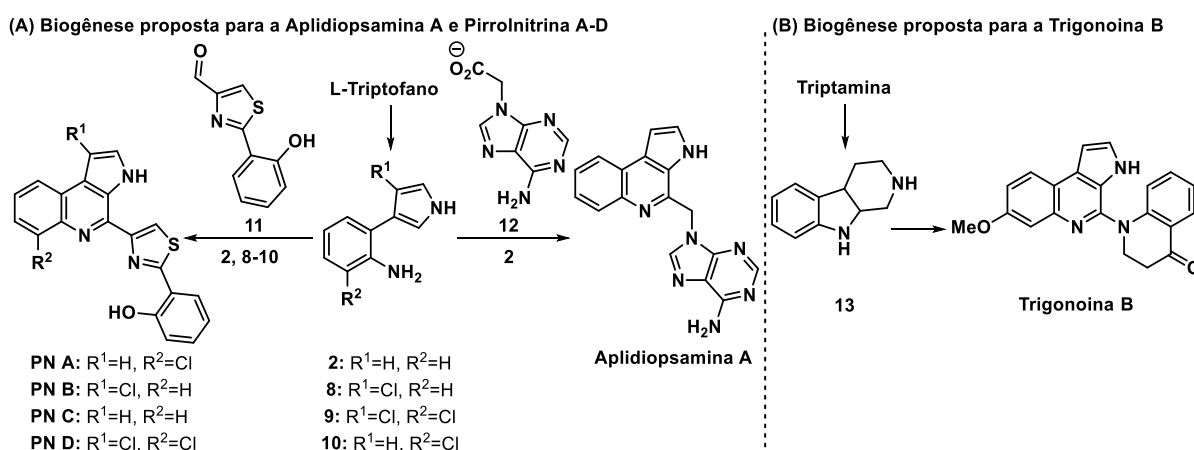
O composto **2** se assemelha ao antibiótico pirrolnitrina (PRN) e seus intermediários biossintéticos (Esquema 1b). O produto natural PRN foi isolado de diversas cepas de *Pseudomonas*, *Myxococcus*, *Cystobacter*, *Enterobacter*, entre outros e possui atividade antibiótica.⁵⁵ Estudos investigativos propuseram que a PRN e seu análogo isopirrolnitrina são biossintetizados a partir do aminoácido L-triptofano, apresentando o composto **2** e derivados como intermediários (Esquema 1).⁵⁶



Esquema 1. Biossíntese proposta para a pirrolnitrina e isopirrolnitrina.

A primeira enzima envolvida na rota biogênica da PRN é a PrnA (Esquema 1a). Essa enzima participa apenas da biossíntese da PRN e realiza uma cloração na posição 7 do triptofano. As demais enzimas PRN B-D estão envolvidas na biossíntese de ambos PRN e isopirrolnitrina. A etapa seguinte é o rearranjo oxidativo do triptofano e seu derivado clorado, catalisado pela PrnB, uma dioxigenase contendo grupo heme, dando origem aos intermediários pirroloanilinas **2** e **5**. Em seguida, a PrnC catalisa uma cloração regioseletiva, seguida pela oxidação da anilina para o grupo nitro, catalisada pela PrnD, dando origem aos compostos isopirrolnitrina e PRN.⁵⁶

Assim como as marinoquinolinas, os produtos naturais aplidiopsamina e **PN A-D** também possuem sua biogênese a partir da pirroloanilina **2** (Esquema 2). É proposto que a aplidiopsamina seja biossintetizada a partir da condensação do composto **2** com o ácido 6-amino-9*H*-purina-9-acético **12**, seguida de uma ciclização intramolecular. Por sua vez, o composto **12** seria sintetizado a partir da reação entre a adenina e o ácido hidroxiacético.⁵¹



Esquema 2. Rota biossintética para (a) a aplidiopsamina A e a família de pirroloanilinas A-D, e (b) trigonoina B.

Os compostos **PN A-D** seriam sintetizados a partir da reação de Pictet-Spengler espontânea entre os intermediários **2**, **8-10** e o aeruginaldeído **11**, um intermediário encontrado na biossíntese do aeruginol e sintetizado a partir do ácido

di-hidroaerugenóico.⁵³ Por sua vez, o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina na trigonoina B seria formado a partir do rearranjo do esqueleto da β -carbolina **13**.⁵²

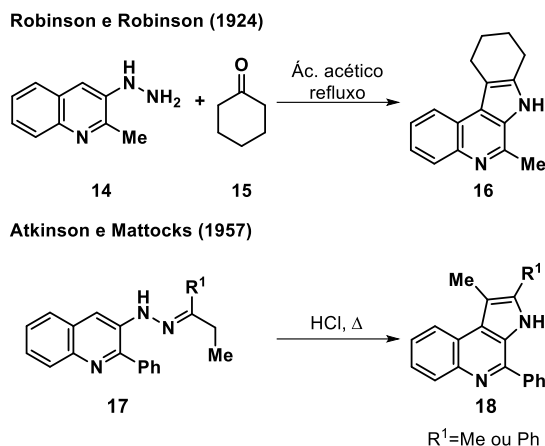
De maneira geral, a descoberta do composto **2** e seus derivados como intermediário da biossíntese de marinoquinolinas foi um marco na síntese total de marinoquinolinas. Diversas rotas sintéticas buscaram inspiração na natureza e utilizaram o composto **2** e/ou seus derivados como intermediário-chave para construção do núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina, como veremos no próximo tópico.

1.3.2. Principais estratégias sintéticas para obtenção de marinoquinolinas

A complexidade dos organismos vivos dificulta a obtenção de produtos naturais. Em relação aos compostos de origem marinha, normalmente a quantidade obtida é bem pequena, o que torna inviável estudos mais aprofundados e aplicações biológicas.⁵⁷ Assim, uma alternativa a esse problema é a obtenção sintética desses compostos.

A descoberta de produtos naturais contendo o núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina alavancou o interesse dos químicos orgânicos em desenvolver rotas sintéticas para obtenção de maneira fácil e direta as marinoquinolinas naturais e novos derivados sintéticos. Diversas rotas já foram publicadas na literatura empregando estratégias clássicas, como a reação de Fischer, e/ou modernas, como catálise por paládio, para obtenção desse núcleo.

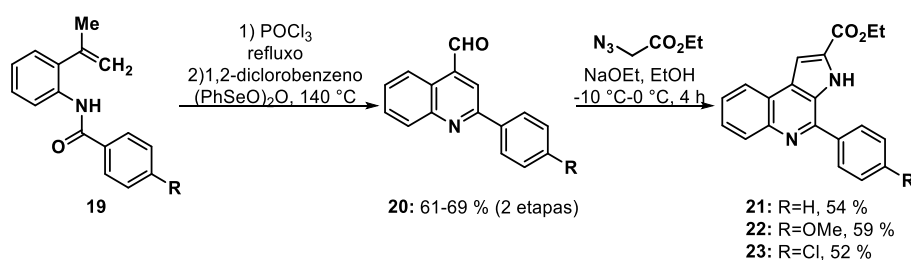
As marinoquinolinas podem ser vistas, do ponto de vista sintético, como um benzo-aza-indóis. Dessa forma, algumas estratégias empregadas usualmente na síntese de indóis foram empregadas na construção desse núcleo. A primeira síntese desse núcleo foi reportada em 1924 por Robison e Robison ao estudar o mecanismo da reação de indolização de Fischer (Esquema 3).⁴⁶



Esquema 3. Primeiros exemplos de construção do núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina.

Alguns anos depois, Atkinson e Mattocks publicaram uma versão intramolecular, partindo da hidrazona **18** em meio ácido, da reação de Fischer na construção do mesmo núcleo (Esquema 3).⁵⁸ Outros autores realizaram modificações nessa versão da reação de Fischer para obter o núcleo marinoquinolínico a partir de quinolilhidrazonas.⁵⁹⁻⁶⁰

A segunda estratégia clássica envolveu a condensação de Claisen-Schmidt seguida pela ciclização de Hemetsberger-Knittel (Esquema 4). Molina e colaboradores (1993) se basearam no mecanismo da reação de Hemetsberger-Knittel, na qual a decomposição térmica de 3-*aryl*- ou 3-*heteroaryl*-2-azido leva à formação do núcleo indólico.⁶¹



Esquema 4. Construção do núcleo marinoquinolínico reportada por Molina e colaboradores (1993).

Outras estratégias de construção do núcleo marinoquinolínico empregaram a síntese de derivados da pirroloanilina **2** como intermediários-chave da rota sintética. Reações clássicas de síntese de pirrol, como a reação de van Leusen e Barton-Zard,

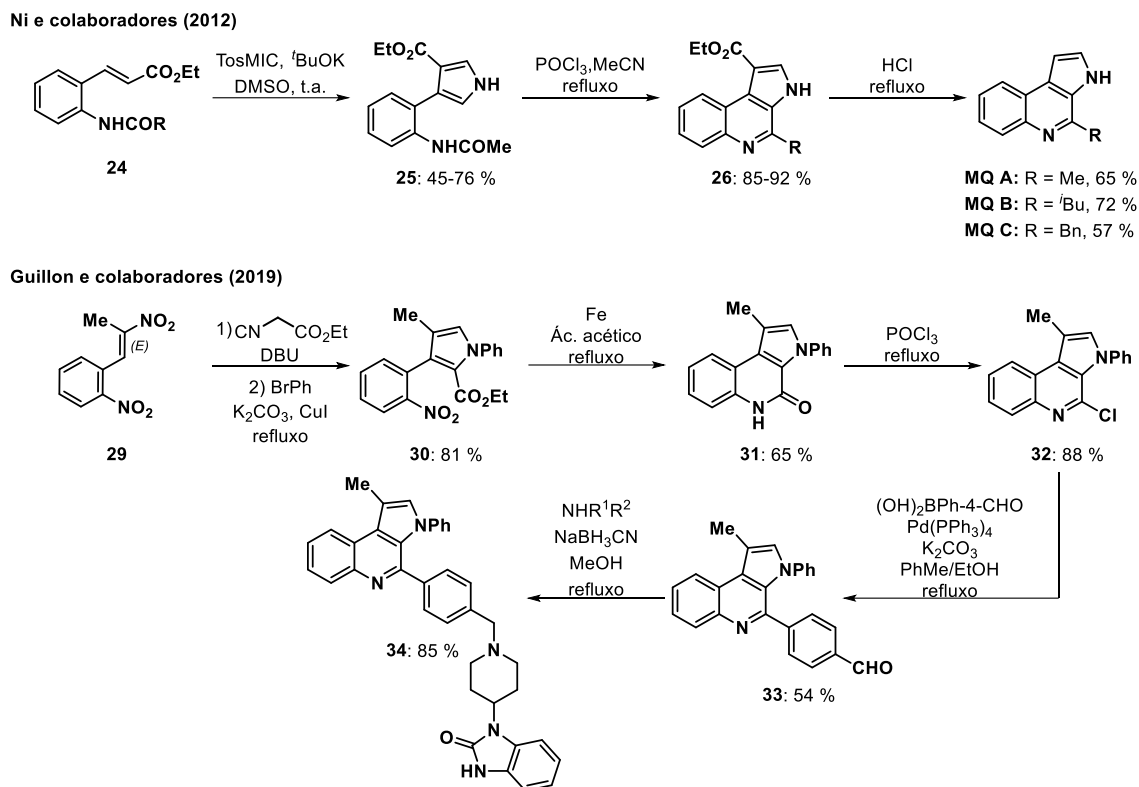
foram empregadas na síntese dos intermediários arilpirróis **25** e **30**, respectivamente (Esquema 5).

Na rota sintética desenvolvida por Ni e colaboradores (2012), o aril pirrol **25** é sintetizado a partir da reação de Van Leusen entre o acrilato **24**, um acceptor de Michael, e o isocianeto de tosilmetila (TosMiC).⁶² A reação de Van Leusen é empregada na síntese de pirróis 3,4-dissubstituídos e consequentemente, o produto é formado substituído com a função éster na posição 3. Caso seja necessário, o pirrol formado pode ser submetido à uma reação de descarboxilação.⁶³

O núcleo marinoquinolínico foi construído a partir da ciclização intramolecular de **25** via reação de Morgen-Walls, empregando cloreto de fosforila (POCl_3). Para obtenção das marinoquinolinas naturais **MQ A-C**, o intermediário **26** foi submetido à uma etapa adicional de descarboxilação.⁶²

Na rota sintética reportada por Guillon e colaboradores (2019), o arilpirrol **30** foi sintetizado em duas etapas a partir da reação de Barton-Zard entre o nitroalceno **29** e o 2-isocianoacetato de etila em meio básico, seguido da substituição nucleofílica com bromobenzeno. A reação de ciclização redutiva empregando ferro e ácido acético levou à formação do intermediário **31**, o qual foi convertido à marinoquinolina **32** após a reação de clorodehidroxilação empregando POCl_3 . Após a construção do núcleo marinoquinolínico, os autores ainda realizaram funcionalizações através das reações de Suzuki-Miyaura e de aminação redutiva.⁶⁴

Entre os métodos modernos, as reações de acoplamento cruzado foram empregadas na síntese de derivados da pirroloanilina **2**. O Esquema 6 apresenta três rotas sintéticas para obtenção de núcleos marinoquinolínicos a partir da síntese de intermediários derivados da pirroloanilina **2**, os quais levam à construção do núcleo marinoquinolínico após uma etapa de ciclização.

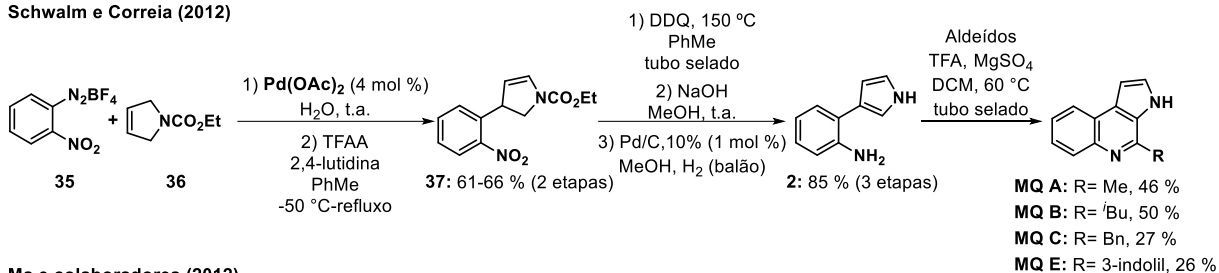


Esquema 5. Exemplos de reações clássicas de síntese de pirrol aplicadas na síntese de marinoquinolinas.

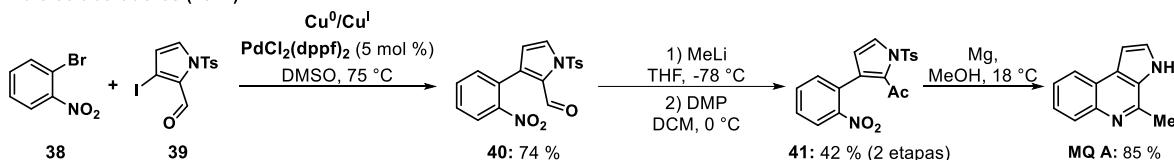
Schwalm e Correia utilizaram a reação de Heck-Matsuda para formação da ligação C-C entre o sal de arenodiazônio **35** e a olefina **36**, obtendo como produto um lactamol que é então desidratado *in situ* com anidrido trifluoroacético e 2,4-lutidina. As etapas seguintes são a aromatização para obtenção da estrutura pirrólica do substrato, desproteção do carbamato etílico em meio básico e redução do grupo nitro via hidrogenação catalítica, dando origem ao intermediário-chave da rota sintética (**2**).⁶⁵

O intermediário **2** é empregado com diversos aldeídos na reação de Pictet-Spengler. Essa rota sintética permitiu a obtenção das marinoquinolinas naturais **MQ A-E** e novas marinoquinolinas de origem sintética. Em especial, a rota sintética reportada por Schwalm e Correia (2012) permite a obtenção divergente dos compostos finais, o que a torna interessante frente às outras rotas desenvolvidas.⁶⁵ O problema encontrado nessa rota sintética é que a etapa da reação de Heck-Matsuda não tolerou bem a dupla substituição com grupos retiradores de elétrons (EWG) nos sais de arenodiazônio. Assim, tornou-se inviável sintetizar marinoquinolinas substituídas com EWG em seu núcleo quinolíneo utilizando essa estratégia.⁶⁶

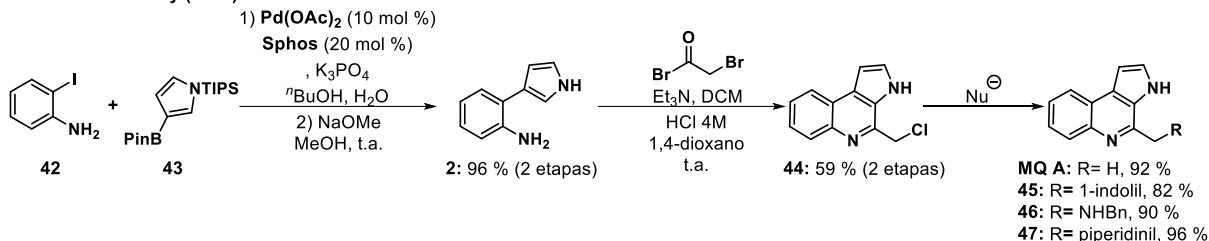
Schwalm e Correia (2012)



Ma e colaboradores (2012)



Panarese e Lindsey (2012)

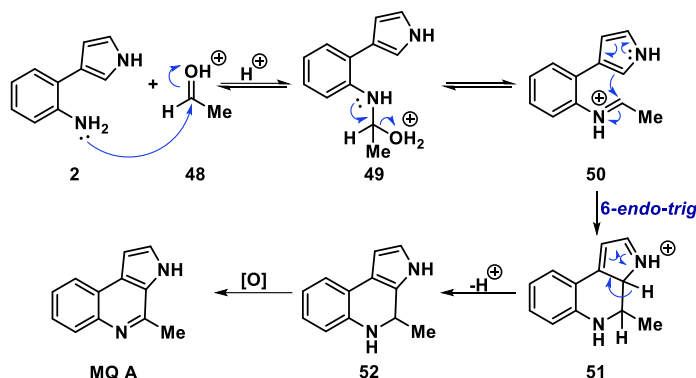


Esquema 6. Exemplos de rotas sintéticas empregando reações de acoplamento cruzado na síntese de marinoquinolinas.

A reação de Heck-Matsuda é uma variante da reação de Heck que utiliza sais de arenodiazônio e olefinas para formar ligações C-C. O ciclo catalítico se dá pelo mecanismo catiônico devido à labilidade da ligação Pd-N₂, a qual ioniza após a etapa de adição oxidativa e origina a espécie de paládio catiônica.⁶⁷

A segunda etapa-chave da rota sintética desenvolvida por Schwalm e Correia (2012) é a reação de Pictet-Spengler, a qual é amplamente utilizada na construção de núcleos quinolínicos. A reação de Pictet-Spengler envolve a condensação entre uma amina ou anilina e um composto carbonílico, podendo ser um aldeído ou uma cetona, seguida de uma etapa de ciclização.⁶⁸

Para ilustrar o mecanismo da reação de Pictet-Spengler, foi utilizada a **MQ A** como exemplo (Esquema 7). A primeira etapa do mecanismo consiste na condensação entre a anilina **2** e o acetaldeído **48**, em condições ácidas, seguida de uma etapa de transferência de próton. A desidratação do intermediário **49** leva à formação do imínio **50**, o qual sofre uma ciclização 6-*endo-trig* intramolecular. A etapa final da reação de Pictet-Spengler é a restauração do sistema aromático pirrólico através, formando o composto **52**.⁶⁸



Esquema 7. Mecanismo proposto para a reação de Pictet-Spengler.

A **MQ A** é formada após uma etapa adicional de desidrogenação. Em contraste com a síntese do intermediário-chave **2**, na qual foi necessária a adição de DDQ para restauração da aromaticidade da parte pirrólica, nessa etapa apenas o oxigênio molecular presente no ar foi suficiente para oxidação do intermediário **52** à **MQ A**.⁶⁵ Algumas vezes a etapa de desidrogenação requer a adição de algum composto oxidante, como DDQ, iodo molecular (I_2), ácido 2-iodóxibenzóico (IBX), entre outros.⁶⁹

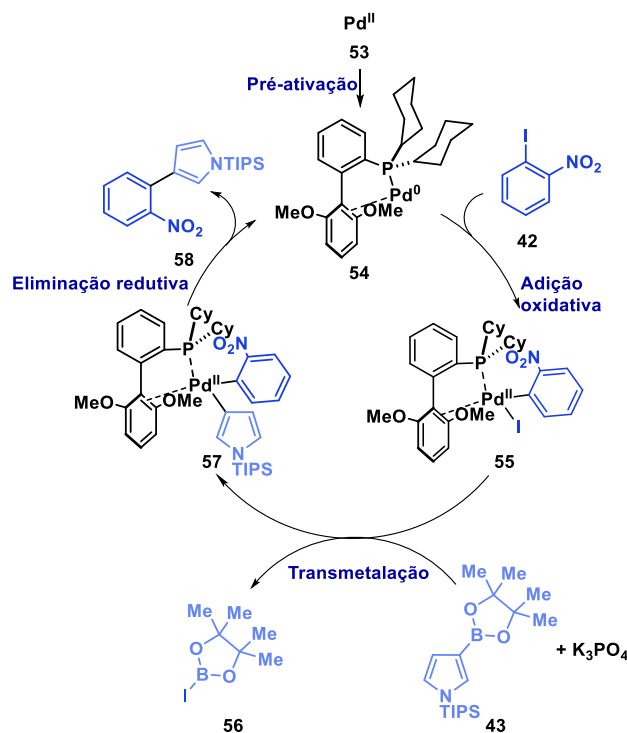
Outras estratégias empregando reações de acoplamento cruzado em sua rota sintética envolveram as reações de Ullmann, reportada por Ma e col. (2012)⁷⁰, e de Suzuki-Miyaura, reportada por Panarese e Lindsley (2012)⁷¹.

Em especial, a rota sintética reportada por Panarese e Lindsley (2012) foi baseada na biogênese da aplidiopsamina (Esquema 2a) e utilizou a reação de Suzuki-Miyaura como etapa-chave para síntese da pirroloanilina, enquanto a reação de Bischler-Napieralski permitiu a construção do núcleo marinoquinolínico.

A reação de Suzuki-Miyaura é um dos métodos mais eficientes para a construção de biarilas, heteroarilas ou aromáticos substituídos. Entre as razões que a tornam uma das ferramentas sintéticas mais empregadas em química medicinal, estão o emprego de condições amenas, alta tolerância a grupos funcionais, disponibilidade comercial e estabilidade de ácidos ou ésteres borônicos empregados como material de partida.⁷²

Para ilustrar como ocorre a formação da ligação C-C na reação de Suzuki-Miyaura, foi proposto um ciclo catalítico para a formação do produto **58**, com base no ciclo geral da reação (Esquema 8). Inicialmente, ocorre a formação *in situ* do complexo

de Pd^0 . Em seguida, há uma adição oxidativa do iodeto de arila **42**, formando a espécie de aril- Pd^{II} **55**.⁷²⁻⁷³



Esquema 8. Ciclo catalítico proposto para a reação de Suzuki-Miyaura.

Uma etapa de transmetalacão leva à formação do complexo de aril-heteroaril- Pd^{II} **57**. Por fim, a etapa de eliminação redutiva resulta na liberação do produto desejado **58** e restaura o complexo de Pd^0 **54**.⁷²

Estratégias mais recentes para síntese de núcleos marinoquinolínicos envolvem a (1) heterociclização-trifluorometilação eletrofílica, empregando o reagente de Togni⁷⁴, ciclização de areno-inamida promovida por ácido de Brønsted⁷⁵, cicloadição 1,3-dipolar de íletos de azometina⁷⁶, anulação [5 + 1] de 2-isocianochalconas⁷⁷, ciclização sequencial promovida por I_2 /reação de Staudinger/aza-Wittig/desidroaromatização⁷⁸, cicloadição intramolecular de Diels-Alder oxazol (IMDAO)⁷⁹, entre outras. Atualmente, existem duas revisões de literatura reportando as diversas estratégias sintéticas para construção do núcleo marinoquinolínico.⁸⁰⁻⁸¹

1.3.3. Atividade biológica de marinoquinolinas

Produtos naturais sempre foram uma importante fonte de descoberta de novos fármacos. A natureza permanece sendo, ao longo dos anos, fonte de inspiração e uma das principais fontes de moléculas bioativas, sejam elas produtos naturais propriamente ditos ou suas variações sintéticas.⁸²

A partir do isolamento de marinoquinolinas como produtos naturais gerou-se o interesse na descoberta de suas possíveis aplicações biológicas. A Figura 10 mostra uma seleção de produtos naturais contendo o núcleo marinoquinolínico e suas atividades biológicas reportadas na literatura. Foram selecionados os compostos marinoquinolínicos mais promissores, de acordo com a atividade biológica reportada na literatura.^{49,51,54}

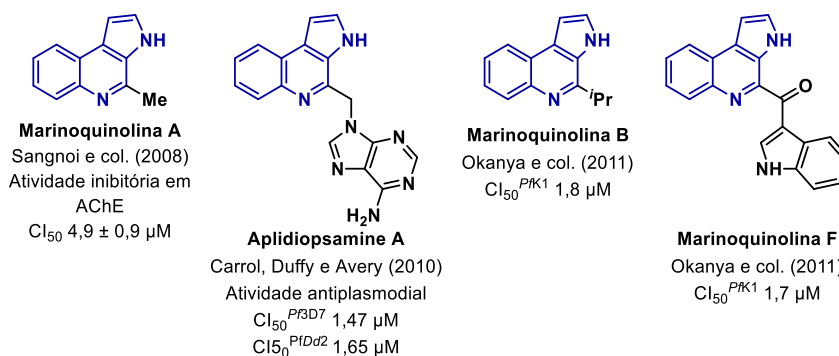


Figura 10. Estruturas selecionadas de marinoquinolinas isoladas como produtos naturais reportadas na literatura com atividade biológica promissora.

Dentre as atividades biológicas triadas empregando marinoquinolinas isoladas como produtos naturais, destaca-se a atividade antiplasmodial. Três marinoquinolinas representadas na Figura 10 apresentaram atividade inibitória em cepas de *P. falciparum*. A aplidiopsamina A mostrou atividade comparável em cepas sensível à cloroquina (*Pf3D7*) e com multirresistência (*PfDd2*), enquanto as marinoquinolinas **MQ B** e **F** apresentaram atividade inibitória em cepas com multirresistência aos principais fármacos antimalariais (*PfK1*).^{49,51}

Dentre as aplicações biológicas descritas na literatura de marinoquinolinas obtidas de forma sintética, destacam-se as atividades antiplasmodial e

antituberculose. Aguiar e col. (2018) reportaram a síntese e avaliação antiplasmodial de uma série de marinoquinolinas. Os autores realizaram um estudo de relação estrutura-atividade (REA), com o auxílio de ferramentas computacionais, que resultou na descoberta de diversas novas entidades químicas com atividade inibitória em cepas de *Pf3D7* e boa seletividade. O estudo de REA observou que compostos substituídos com o grupo metóxi na posição 7 do núcleo marinoquinolínico foram mais ativos que os não substituídos (Figura 11). Além disso, esse estudo reportou a descoberta de diversos compostos com atividade inibitória promissora, dentre eles, um composto-líder (**MQ-30**) com atividade moderada *in vivo*.⁸³

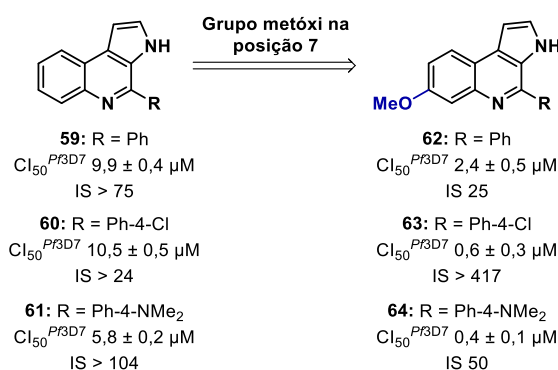
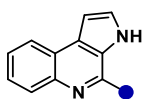


Figura 11. Seleção de marinoquinolinas e suas atividades biológicas reportadas por Aguiar e col. (2018).

Dois estudos reportaram a atividade antituberculose de marinoquinolinas. Akula e col. (2014) reportaram a síntese e a avaliação biológica de marinoquinolinas em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Dentre a série avaliada, seis derivados apresentaram concentração mínima inibitória CIM < 10 μ M (Tabela 1).⁸⁴

Tabela 1. Marinoquinolinas selecionadas e atividade antituberculose, reportadas por Akula *et al.* (2014).



#	●	MtH37Rv CIM/ μ M	Citotoxicidade (% inibição)
65	^t Bu	6,9	17,6
66	2-imidazolil	3,3	8,6
67	1-pirrolil	3,3	24,6
68	4-nitrofenil	6,0	16,4
69	4-trifluorometilfenil	5,6	18
70	2-cloro-3-piridinil	5,5	15,6

Por sua vez, Panciera e col. (2022) exploraram o potencial terapêutico de marinoquinolinas como novos agentes antituberculose. Foi reportada a síntese e avaliação biológica em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de 26 derivados marinoquinolínicos. Dentre eles, duas novas marinoquinolinas (Figura 12) apresentaram CIM < 5 μ M. Estudos enzimáticos e de docagem molecular demonstraram que os compostos **71** e **72** são inibidores alostericos não-competitivos de glutamato-5-kinase, uma enzima essencial para o desenvolvimento da bactéria causadora da tuberculose.⁸⁵

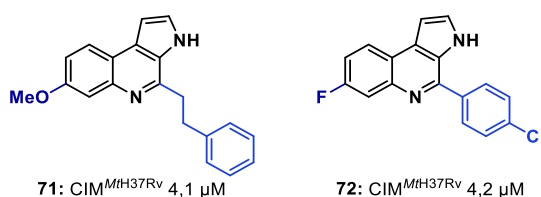


Figura 12. Marinoquinolinas com atividade antituberculose reportadas por Panciera e col. (2022).

1.4. Química medicinal

Diversas estratégias podem ser utilizadas como pontos de partida na descoberta de novos fármacos, como por exemplo a triagem fenotípica *in vitro* de

produtos naturais.⁸⁴ Uma vez descoberto um novo composto *hit* ou uma classe de compostos promissora, inicia-se um estudo investigativo na área de química medicinal (Figura 13).

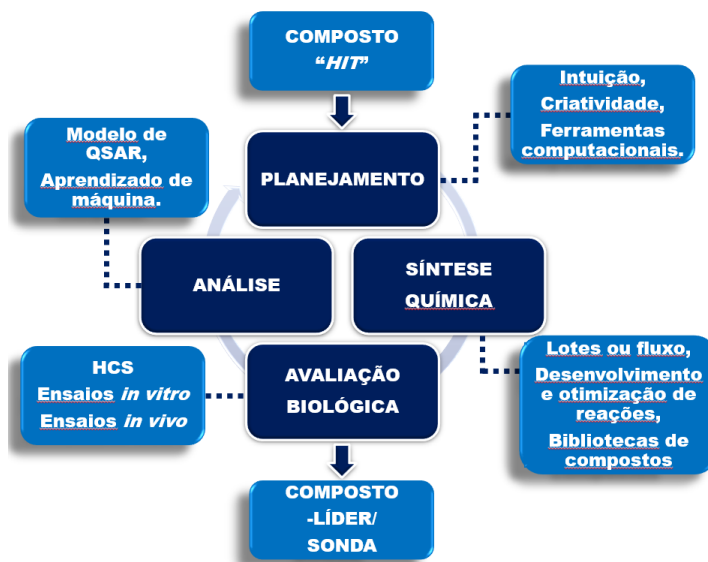


Figura 13. Estudo iterativo de “*hit-to-lead*” em química medicinal.

A partir desse composto “*hit*” inicia-se então a etapa de “*hit-to-lead*” (H2L). O processo de otimização de um composto “*hit*”, através da melhora de suas propriedades físico-químicas e farmacológicas, visa a obtenção de novos compostos-“*hit*” ou líderes. O estágio de H2L passa por um processo de expansão da biblioteca de compostos, através da geração de novos análogos, que permite a realização de estudos de REA. Nesse estágio, almeja-se a obtenção de compostos com desejáveis propriedades farmacológicas e físico-químicas.⁸⁶

O entendimento da REA é construído a partir dos dados gerados pelo estudo iterativo composto pelas etapas de planejamento dos compostos-alvo, síntese química e avaliação biológica das novas entidades químicas. Por sua vez, o estudo de REA pode ter diversos objetivos na área de química medicinal, como a descoberta de sondas químicas e compostos-líderes para alvos biológicos, demonstrar a drogabilidade de um determinado alvo biológico, entre outros.⁸⁷

Durante o estudo de química medicinal, as características físico-químicas dos compostos em investigação são indicadores-chave para que haja o desenvolvimento de um novo fármaco com qualidade. Desde 1997, com a publicação da regra dos

cinco, por Lipinski e colaboradores, as propriedades físico-químicas vem ganhando notoriedade e atualmente, a análise dessas propriedades em conjunto com os dados farmacológicos é parte da rotina dos químicos medicinais.⁸⁸

A regra dos cinco foi criada através de abordagens experimentais e computacionais que estimaram a solubilidade e permeabilidade de aproximadamente 2500 fármacos e candidatos a fármacos em fase clínica II administrados por via oral. Essa regra diz que candidatos a fármacos com boa permeabilidade e solubilidade devem possuir até cinco átomos doadores de hidrogênio, até dez átomos aceptores de hidrogênio, peso molecular de até 500 Da e LogP menor ou igual a cinco. O nome regra dos cinco se refere aos parâmetros serem múltiplos de cinco, porém vale ressaltar que são apenas quatro regras aplicadas especificamente para a classe de moléculas pequenas.⁸⁹

Dentre os parâmetros previstos na regra dos cinco, destaca-se a lipofilia, expressa pelo coeficiente de partição (LogP) ou pelo coeficiente de distribuição (LogD). O coeficiente de partição LogP é um valor constante e representa a lipofilicidade intrínseca de um composto, comumente medida em octanol e água. Por sua vez, o coeficiente de distribuição (LogD) em um pH determinado, comumente expresso em pH 7,4 na química medicinal, é a hidrofobicidade efetiva de um composto e mede a distribuição de todas as espécies. Outras propriedades físico-químicas importantes e que não são citadas na regra dos cinco são o pKa e a solubilidade em água.⁹⁰

A regra dos cinco correlaciona as propriedades físico-químicas com características farmacocinéticas desejáveis para os fármacos. De maneira geral, as novas entidades químicas devem ser pequenas o suficiente para permitir sua absorção, devem possuir solubilidade em água para serem distribuídas, devem apresentar certa lipofilia para permear membranas. Em adição, há uma limitação no número de grupos polares para que não haja rápida metabolização e eliminação do fármaco, permitindo que o mesmo exerça seu efeito terapêutico.⁹¹

O controle das propriedades físico-químicas e parâmetros farmacocinéticos está intimamente relacionado com o alvo terapêutico, mecanismo de ação e a série de novas entidades químicas em desenvolvimento. Para tal, faz-se o emprego de métricas de ligação.⁹² Existem diversas métricas que normalizam as propriedades

farmacológicas em relação às propriedades físico-químicas, sendo a eficiência do ligante (EL) e eficiência lipofílica (LipE) as mais importantes.⁹³

As equações para cálculo das métricas EL e LipE, bem como seus valores de referência, estão descritos na Tabela 2. A EL pode ser definida como a média da energia livre de ligação (Kcal/mol) por átomo diferente de hidrogênio (NHA). A LipE, por sua vez, correlaciona, de maneira simples, a potência com a lipofilia. Em ambas as métricas, a potência é expressa em termos de pCl₅₀, que é o valor logaritmo da Cl₅₀ quando convertida para molar.⁹³

Tabela 2. Equação e valores de referência para cálculo de eficiência do ligante (EL) e eficiência lipofílica (LipE).

Métricas do ligante	Equação	Valores de referência
Eficiência do ligante (EL)	$EL = \frac{1,37}{NHA} pCl_{50}$	≥ 0,3
Eficiência lipofílica (LipE).	$LipE = pCl_{50} - LogP$	≥ 5,0

NHA – átomos diferentes de hidrogênio.

O primeiro aspecto a ser determinado na descoberta de novos fármacos é o perfil do candidato alvo (TCP do inglês, *target candidate profile*), isto é, as características desejadas para o candidato pré-clínico. O TCP abrange as principais características desejadas para os compostos *hit*, *lead* e/ou *sonda* e tem a função de orientar o estudo a ser desenvolvido.⁹⁴

Em relação a descoberta de novos fármacos antimalariais, é importante que o candidato alvo apresente potência em cepas sensíveis e resistentes do parasito, preferencialmente através de um novo mecanismo de ação, ação em mais de um estágio do ciclo de vida do parasito. É importante que o candidato apresente também menor toxicidade e um maior tempo de meia-vida.⁹⁵

Após a seleção dos melhores compostos da série em questão, o estudo de química medicinal passa para a etapa de otimização do composto-líder. Em geral, as etapas envolvidas na descoberta de um novo composto “*hit*” até o início dos estudos

pré-clínicos duram em média 5 anos, com um custo de aproximadamente £ 436 milhões e são testados, em média, entre 5-10 mil candidatos a fármacos para cada medicamento aprovado.⁹⁶

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Descoberta de novos derivados marinoquinolínicos com atividade antiplasmodial em fase assexuada ($CI_{50}^{Pf3D7} < 1 \mu M$), alta seletividade ($IS > 10$) e melhores propriedades físico-químicas (lipofilia e solubilidade);
- Descoberta do alvo terapêutico de marinoquinolinas.

2.2. Objetivos específicos

- Planejamento e síntese de novos análogos marinoquinolínicos;
- Estudo de relação estrutura-atividade, empregando o composto-*hit* **MQ-30** como ponto de partida;
- Obtenção de um composto-sonda para investigação do mecanismo de ação através de ensaios bioquímicos e imageamento;
- Uso de ferramentas *in silico* de docagem reversa para descoberta do alvo terapêutico de marinoquinolinas como agentes antiplasmodiais.

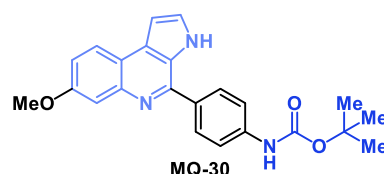
3. ANÁLISE DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE MARINOQUINOLINAS: AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO CARBAMATO *TERC*-BUTÍLICO

3.1. Aspectos gerais

Existem diversas ferramentas disponíveis para auxiliar químicos medicinais na descoberta e otimização de novos compostos-líderes. A aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado no ligante (do inglês, *ligand based drug design* – LBDD) resultou na descoberta de um novo composto-líder. A MQ-30, como é chamado esse novo composto-líder, possui características importantes para a descoberta de novas entidades químicas com atividade antiplasmodial promissora.⁸³

A Tabela 3 apresenta a estrutura da MQ-30 e sua atividade antiplasmodial reportada na literatura. Além de apresentar potência em escala nanomolar e alta seletividade ($IS > 6410$), a MQ-30 apresentou CI_{50} comparável em cepas de formas eritrocítica do parasito, sensível (*Pf3D7*) e resistente (*PfK1*), bem como hepática (*PbEEF*). Em relação à atividade sanguínea do parasito, a MQ-30 também apresentou CI_{50} comparável em todas as formas eritrocíticas do parasito.⁸³

Tabela 3. Estrutura química e atividade biológica do composto-líder reportado por Aguiar e col. (2018).



Aguiar e colaboradores (2018)	
Cepa de <i>Plasmodium</i>	CI_{50} (nM)
<i>Pf3D7</i>	39
<i>PfK1</i>	41
<i>PbEEF</i>	50

As desvantagens da MQ-30 como composto-líder incluem, principalmente, suas propriedades físico-químicas. A baixa solubilidade desse composto impede a

continuidade dos estudos farmacológicos e a presença do carbamato *terc*-butílico, importante para a atividade antiplasmodial, o que limita a possibilidade de transformá-la em um sal estável e de alta pureza.

Em adição, o LogD_{7.4} calculado para a MQ-30 utilizando o programa SeeSAR (BioSolveIT®) foi de 5,7387, um valor considerado alto para um entidade química não otimizada. O interessante seria obter um composto-líder inicial com valor de LogD_{7.4} ≤ 3 .⁹⁷

O sucesso da atividade antiplasmodial e as limitações causadas pelas propriedades físico-químicas foram atribuídas, principalmente, à presença do grupo carbamato na MQ-30. A presença de grupos carbamatos em fármacos e novas entidades químicas é controversa devido ao seu potencial toxicológico.

Em relação aos alertas estruturais no planejamento de novos fármacos, os grupos carbamatos são classificados como subestruturas moleculares que podem ser responsáveis por efeitos tóxicos. De maneira geral, fármacos e novas entidades químicas contendo grupos carbamatos em sua estrutura apresentam alertas estruturais para genotoxicidade.⁹⁸⁻⁹⁹

Por sua vez, já existem fármacos contendo grupos carbamatos em sua estrutura, como o ritonavir e o irinotecano, por exemplo. Muitas vezes, os efeitos benéficos da presença dos carbamatos se sobressaem aos efeitos indesejáveis. Os grupos carbamatos podem conferir estabilidade química e proteolítica, melhorar a permeabilidade em membranas, bem como modular interações intra e intermoleculares, entre outros.¹⁰⁰ Dessa forma, cabe aos químicos medicinais a avaliação, de acordo com os parâmetros farmacológicos e toxicológicos, do custo-benefício da presença do carbamato na estrutura química da entidade em desenvolvimento.

Em relação ao estudo de descoberta de marinoquinolinas como uma nova classe de agentes antiplasmodiais, a presença do carbamato na estrutura da MQ-30 foi associada à potência em escala nanomolar. Dando continuidade a esse estudo, esse trabalho tem como objetivo avaliar, através de uma análise de REA qualitativa, a importância do carbamato na MQ-30 para a atividade antiplasmodial de marinoquinolinas.

O estudo qualitativo de REA envolveu a variação de substituintes alquílicos e arílicos, alongamento de cadeia, bem como a substituição bioisostérica, sendo todas abordagens clássicas de química medicinal. Novas entidades químicas foram sintetizadas e avaliadas quanto à sua atividade antiplasmodial com o objetivo de aumentar a nossa compreensão sobre três aspectos principais da estrutura do carbamato: a influência do volume estérico causado pelo grupo *terc*-butila, bem como a importância do NH e do O para atividade biológica (Figura 14).

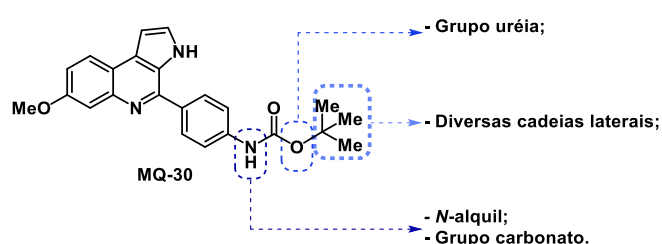


Figura 14. Modificações estruturais propostas para análise de relação-estrutura atividade da MQ-30.

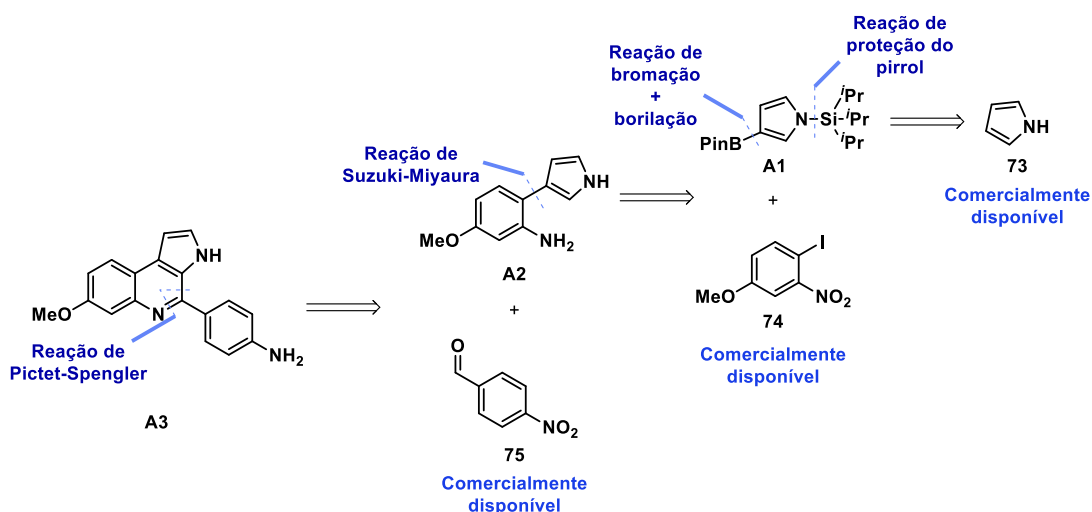
A análise de REA de marinoquinolinas como uma nova classe de agentes antiplasmodiais envolveu um estudo iterativo e colaborativo. Os ensaios biológicos discutidos neste trabalho foram realizados e coordenados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rafael Guido (IFSC – USP). A atividade antiplasmodial *in vitro* foi avaliada em cepas de *P. Falciparum*, através do método SYBR green I,¹⁰¹ enquanto a citotoxicidade foi realizada em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), através do método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT).¹⁰²

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Síntese do material de partida

A rota sintética pré-estabelecida no grupo de pesquisa do Prof. Dr. Correia envolve a obtenção de três intermediários-chave, conforme o Esquema 2. O intermediário **A1**, pode ser sintetizado em três etapas a partir do pirrol **73**, comercialmente disponível. Por sua vez, o intermediário **A2** pode ser obtido a partir da reação entre intermediário **A1**, previamente sintetizado, e o iodeto de arila **74**,

comercialmente disponível, em três etapas, sendo a reação de formação de ligação C-C a etapa-chave. Por fim, o intermediário avançado de marinoquinolina **A3** pode ser obtido em duas etapas a partir do intermediário **A2**, previamente sintetizado, e o 4-nitrobenzaldeído **75**, comercialmente disponível. O intermediário avançado **A3** foi então empregado na obtenção divergente de novas marinoquinolinas.



Esquema 9. Análise retrossintética para obtenção do intermediário avançado de marinoquinolina.

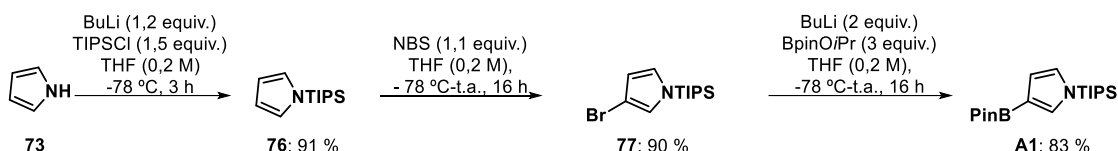
O Esquema 10 mostra a obtenção dos intermediários-chave **A1** e **A2**. O éster borônico **A1** foi preparado em três etapas (Esquema 10a). As duas primeiras etapas fazem parte da estratégia de Muchowski para obtenção de pirróis β -halogenados.¹⁰³⁻¹⁰⁵ A primeira etapa envolveu a *N*-proteção do pirrólio **73** com o grupo triisopropilsilil (TIPS), um grupo volumoso que tem a função de bloquear a posição α do pirrólio e garantir regioseletividade na etapa de bromação.¹⁰⁵

A etapa seguinte envolveu uma bromação seletiva da posição β de **10**, realizada especificamente com *N*-bromosuccinimida (NBS) recém-recristalizada (1-2 dia anterior à reação), tetraidrofurano (THF) anidro e temperatura controlada de -78°C por 4 horas.¹⁰⁵ Nessa etapa, o pirrólio **73** reage com o NBS via reação de substituição eletrofílica aromática ($\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$).¹⁰⁶

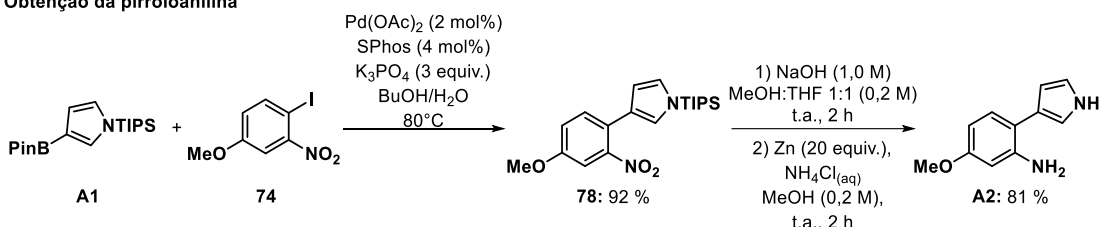
A participação do par de elétrons do nitrogênio na ressonância do anel pirrólico faz com que os carbonos sejam mais nucleofílicos. Além disso, a posição α é mais reativa devido à maior estabilidade do intermediário de Wheland formado.¹⁰⁷ Dessa

forma, o bloqueio estérico da posição α se faz necessário para que a bromação ocorra com alta regioseletividade na posição β . Por fim, uma metalação direta utilizando butil lítio (BuLi), seguida de uma borilação¹⁰⁸, resultou na obtenção rápida e eficiente de **A1**, em 68% de rendimento para 3 etapas.

(A) Obtenção do composto orgânico de boro



(B) Obtenção da pirroloanilina



Esquema 10. Rota sintética para obtenção dos intermediários-chave **A1** e **A2**.

Em sequência, a reação de Suzuki-Miyaura entre **A1** e iodeto de arila **74** resultou na obtenção do composto **78**.¹⁰⁹ Essa reação é considerada a etapa-chave da rota sintética de obtenção da pirroloanilina **A2**, visto que permite a formação da ligação C-C entre o sistema arílico **74** e o sistema heteroarílico **A1** de maneira direta e eficaz.

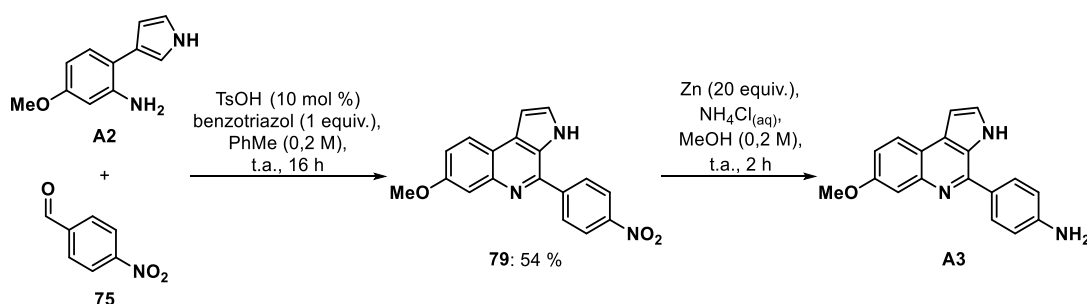
Essa reação faz parte do grupo de reações de acoplamento cruzado por paládio que revolucionaram a síntese orgânica. Nesse contexto, o prêmio Nobel de Química de 2010 foi entregue à Richard F. Heck, Ei-chi Negishi e Akira Suzuki, por suas contribuições no desenvolvimento dessa química.¹¹⁰

Devido à sua robustez, a reação de Suzuki-Miyaura é uma das reações mais utilizadas em química medicinal.¹¹¹⁻¹¹² Dentre suas vantagens, podemos destacar o emprego de condições brandas, alta tolerância à presença de grupos funcionais e fácil isolamento do produto desejado.¹¹³

Após a obtenção do produto de Suzuki **78**, as etapas de desproteção do grupo TIPS em meio básico e a redução do grupo nitro levaram à formação da pirroloanilina

A2 em rendimentos de 88 % para 2 etapas. Com isso, foi possível partir para a construção do núcleo marinoquinolínico e obtenção do intermediário avançado **A3**.

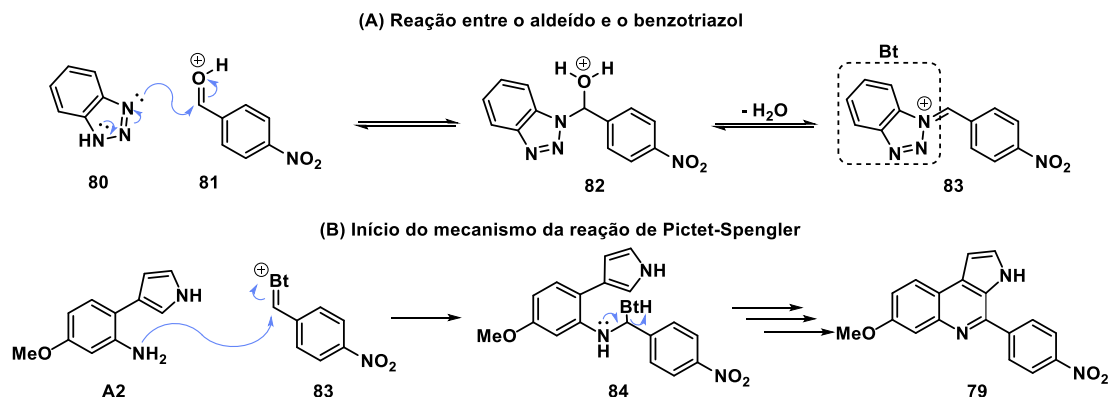
O núcleo 3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolínico foi construído a partir da reação de Pictet-Spengler entre a pirroloanilina previamente preparada **A2** e o 4-nitro-benzaldeído **75**, obtido comercialmente (Esquema 11).¹¹⁴ A reação de Pictet-Spengler é conhecida há mais de 100 anos, sendo uma ferramenta direta e eficiente na obtenção de núcleos quinolínicos.¹¹⁵



Esquema 11. Rota sintética empregada na obtenção do intermediário avançado marinoquinolínico **A3**.

No método escolhido para a reação de Pictet-Spengler, há inicialmente uma reação entre o benzotriazol **80** e o aldeído **81**, em meio ácido, resultando na formação do hemiaminal **82** (Esquema 12a). Em seguida, o hemiaminal **82** sofre uma desidratação, resultando no intermediário imínium **83**.¹¹⁶ O início do mecanismo da reação de Pictet-Spengler ocorre com o ataque nucleofílico da pirroloanilina **A2** no intermediário imínium **83** previamente formado. Em seguida, espera-se que a reação proceda com um mecanismo similar ao descrito no Esquema 7.¹¹⁷

Em seguida, o intermediário **79** foi submetido à etapa de redução do grupo nitro empregando zinco e solução aquosa de cloreto de amônio, em metanol. Assim, o intermediário avançado **A3** foi obtido em conversão total e utilizado, sem purificação prévia, como substrato para a obtenção dos derivados marinoquinolínicos a serem estudados.



Esquema 12. Mecanismo plausível para a reação de Pictet-Spengler empregada na síntese de marinoquinolinas.

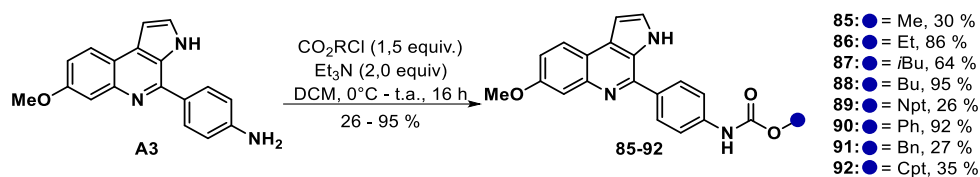
3.2.2. Influência do volume estérico

O reconhecimento de um ligante por um receptor depende da existência de interações moleculares no sítio de ligação. As cadeias carbônicas contribuem, principalmente, na formação de interações hidrofóbicas entre o ligante e seu sítio de ligação no alvo terapêutico.¹¹⁸

A ocupação otimizada de um bolsão hidrofóbico garante ganhos energéticos que refletem na melhora da potência e seletividade de um fármaco ou entidade química. A potência ideal é normalmente alcançada com o enchimento parcial do bolsão, numa razão de 55 ± 9 % do volume para complexos sintéticos hospedeiro-hóspede.¹¹⁹ Isso ressalta a importância da investigação da influência do volume estérico do carbamato através de um estudo de relação estrutura-atividade.

Para isso, novos derivados marinoquinolínicos foram planejados contendo diferentes carbamatos alquílicos, fenílico ou benzílico. As cadeias laterais presentes nos carbamatos foram desenhadas considerando a disponibilidade comercial dos cloroformatos.

Os novos análogos marinoquinolínicos contendo os grupos carbamatos foram obtidos de maneira divergente, a partir do intermediário avançado **A3** (Esquema 13). Os derivados **85-92** foram obtidos em rendimentos satisfatórios (27-95 %) a partir do tratamento da anilina **A3** com diferentes cloroformatos comercialmente disponíveis, em meio básico.¹²⁰



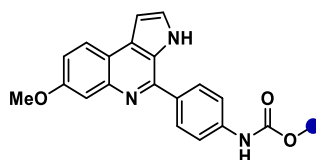
Esquema 13. Obtenção das novas marinoquinolinas contendo variações na cadeia lateral do grupo carbamato.

Nesta etapa, foram obtidas oito marinoquinolinas inéditas **85-92** com variações na cadeia lateral do carbamato. Em adição aos novos derivados obtidos, o composto-líder **MQ-30** foi sintetizado novamente, a partir do tratamento da anilina **A3** com o dicarbonato de di-*terc*-butila, em meio básico. Os derivados obtidos sinteticamente **85-92** e **MQ-30** foram submetidos à avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* em cepas de *Pf3D7* e citotoxicidade em células mamárias HepG2, pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rafael Guido (IFSC/USP).

O método SYBR green I possui potencial para triagens rápidas em laboratório para detecção de novas entidades químicas biologicamente ativas. Nesse ensaio, os compostos podem ser divididos qualitativamente em inativos ($\text{CI}_{50} > 10 \mu\text{M}$), moderadamente ativos (CI_{50} entre $1\text{-}10 \mu\text{M}$) e ativos ($\text{CI}_{50} < 1 \mu\text{M}$). Assim, compostos ativos podem ser rapidamente identificados e submetidos a ensaios bioquímicos adicionais para melhor comprovação científica de sua atividade biológica.¹²¹

Os resultados biológicos dos derivados marinoquinolínicos **85-92** e **MQ-30** estão descritos na Tabela 4. Os compostos **85-87**, substituídos com os grupos metila, etila e butila, respectivamente, apresentaram atividade inibitória moderada. Por sua vez, os compostos **88** e **MQ-30**, substituídos com os grupos isobutila e *terc*-butila apresentou boa atividade inibitória. Na reavaliação do composto-líder **MQ-30**, o valor de CI_{50} divergiu do valor reportado anteriormente por Aguiar et al (2018).⁸³ Uma hipótese para essa divergência é a baixa solubilidade desse composto. Também vale ressaltar que, inicialmente, a **MQ-30** era sintetizada a partir de uma rota sintética diferente.

Tabela 4. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade dos derivados marinoquinolínicos contendo grupos carbamatos.



#	●	Cl ₅₀ Pf3D7 (μM)	pCl ₅₀	Cl ₅₀ HepG2 (μM)	IS
85	Me	5,29 ± 0,09	5,28	n.d.	-
86	Et	4,40 ± 0,80	5,35	n.d.	-
87	Bu	1,80 ± 0,40	5,75	> 12,5	> 7
88	<i>i</i> Bu	1,50 ± 0,40	5,82	19,0 ± 4,0	12 ± 4
MQ-30	<i>t</i> -Bu	1,06 ± 0,05	5,97	23,0 ± 2,0	22 ± 1
89	Npt	0,50 ± 0,30	6,30	146,5 ± 58,7	293 ± 147
90	Ph	11,00 ± 2,00	4,96	230,0 ± 30,0	22 ± 4
91	Bn	1,50 ± 0,40	5,82	19,5 ± 0,7	13 ± 4
92	Cpt	5,00 ± 2,00	5,30	70,0 ± 30,0	14 ± 8

Npt – neopentila; Cpt – ciclopentila.

O composto **89**, substituído com o grupo neopentila, foi considerado o melhor composto da série, apresentando atividade inibitória submicromolar. Comparando as estruturas do grupo terc-butila **MQ-30** e neopentila **89** (Figura 15), pode-se observar um alongamento de cadeia através de uma ponte metilênica no composto **89**. Essa característica estrutural garante uma maior flexibilidade nessa região da molécula. É conhecido que a flexibilidade intrínseca de ligantes pode ajudar na adoção de conformações favoráveis para reconhecimento pelo receptor, resultando na melhora na potência.¹²²

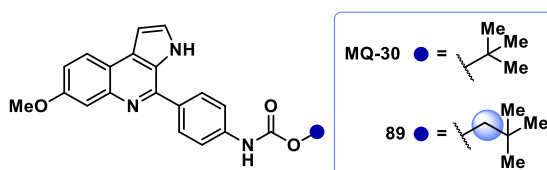


Figura 15. Estruturas expandidas das marinoquinolinas **MQ-30** e **89**.

Substituições com cadeias laterais cíclicas se mostraram desfavoráveis para a atividade inibitória. Os compostos **90** e **92**, substituídos com os grupos fenila e ciclopentila, foram considerados inativo e moderadamente ativo, respectivamente. Por outro lado, o derivado **91**, substituído com o grupo benzila, se mostrou ativo. De maneira similar ao composto **89**, o derivado **91** também apresenta uma ponte metilênica que garante uma maior flexibilidade na adoção de conformações.¹²¹

De maneira geral, pode-se observar que o aumento do volume estérico na cadeia lateral do carbamato causa uma melhora na atividade inibitória antiplasmodial, sendo o derivado contendo o grupo neopentila **89** o melhor composto da série. Substituições com grupos maiores, como fenila ou benzila, e cadeia cíclica, como ciclopentila, resultaram na perda de potência.

Essa análise é facilmente observada quando se compara os valores de pCl₅₀. Quanto maior o valor de pCl₅₀ melhor a potência do derivado marinoquinolínico. Dessa forma, compostos substituídos com cadeias laterais menores, como metila **85** e etila **86**, apresentam menores valores de pCl₅₀ (5,28 e 5,35, respectivamente). O melhor composto da série, substituído com a neopentila **89** apresentou o maior valor de pCl₅₀ (6,30). Para os compostos **90-92**, observamos o declínio dos valores de pCl₅₀.

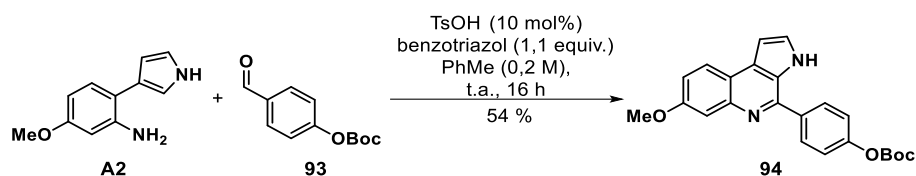
Em relação à seletividade, o composto **87** (R = Bu) não apresentou citotoxicidade na concentração máxima testada, enquanto os compostos **88** (R = *i*Bu) e **MQ-30** (R = *t*-Bu) apresentaram citotoxicidade em células HepG2. Os compostos **89** (R = Npt), **90** (R = Ph) e **92** (R = Cpt) não apresentaram citotoxicidade. Dentre eles, o composto **89**, substituído com o grupo neopentila, destacou-se, apresentando IS 293 ± 147, valor desejável para compostos-líderes.¹²³

3.2.3. Investigação da importância do NH

Dentre as interações intermoleculares responsáveis pela formação do complexo fármaco-receptor, as interações de hidrogênio são consideradas as mais importantes. Elas são interações fortes e com alta especificidade que levam a alterações consideráveis na potência e seletividade de compostos biologicamente ativos.¹²⁴

O grupo NH é conhecido pela sua dualidade como doador ou acceptor de prótons. Entretanto, no grupo carbamato, o par de elétrons do nitrogênio não está disponível para atuar como acceptor de prótons.⁹⁸⁻⁹⁹ Assim, nessa parte do trabalho, o objetivo foi verificar a importância do NH presente no carbamato. Para tal, marinoquinolinas foram planejadas através da troca isostérica do nitrogênio pelo oxigênio e de *N*-alquilações.

A síntese dos análogos planejados se iniciou com a obtenção do carbonato *tert*-butílico. A marinoquinolina **94** foi obtida através da reação de Pictet-Spengler entre o intermediário **A2** e o aldeído **93** em 54 % de rendimento (Esquema 14).

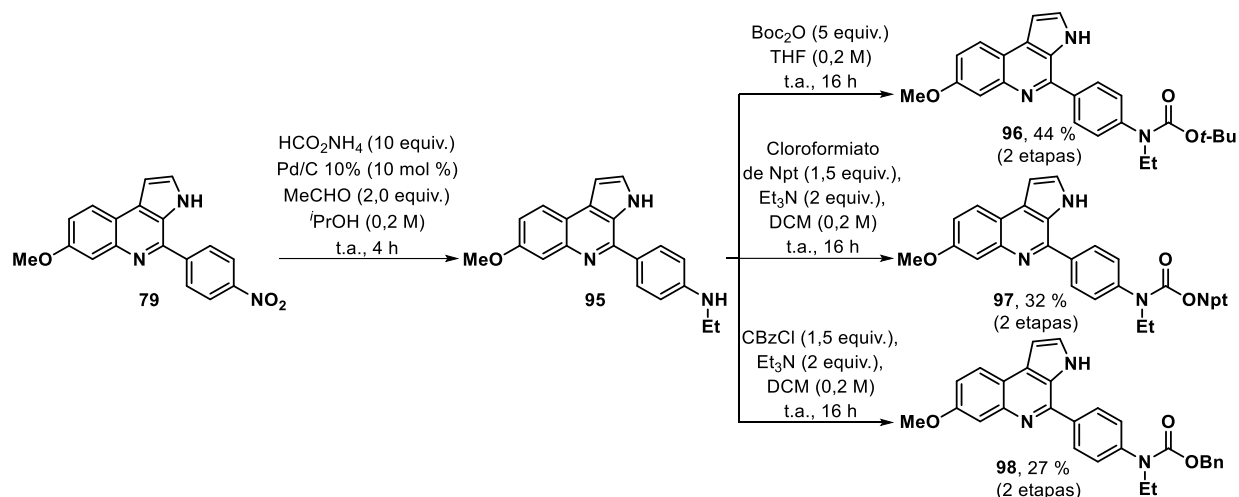


Esquema 14. Obtenção do derivado marinoquinolínico contendo o grupo carbonato.

Para a síntese dos carbamatos *N*-etilados, empregou-se a reação *one-pot* de mono-*N*-alquilação redutiva,¹²⁵ partindo da marinoquinolina nitrada **79** (Esquema 15). Foi escolhida a estratégia de aminação redutiva, afim de evitar a obtenção de produtos multialquilados. Assim, na reação de aminação redutiva, cada anilina irá formar apenas um grupo imina, o qual será reduzido e dará origem ao produto desejado.

Existem diversos métodos para obtenção de anilinas *N*-alquiladas via aminação redutiva empregando catalisadores metálicos.¹²⁶ A estratégia escolhida realiza duas etapas da rota sintética de maneira *one-pot*. Após a *N*-alquilação via aminação redutiva, **95** foi empregado na obtenção dos carbamatos *tert*-butílico, neopentílico e benzílico, obtendo as marinoquinolinas *N*-etiladas **96-98**, respectivamente.

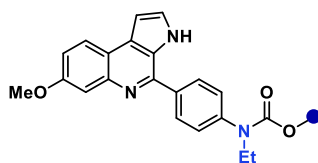
As marinoquinolinas *N*-alquiladas foram planejadas de acordo com o resultado biológico dos carbamatos reportados na seção 2.2.2. Foram selecionados os três derivados que apresentaram as melhores atividades inibitórias e seus análogos *N*-alquilados foram obtidos e avaliados quanto às suas atividades antiplasmodiais, empregando o mesmo ensaio biológico.



Esquema 15. Rota sintética para obtenção de marinoquinolinas *N*-etiladas de maneira divergente.

Nesta etapa, foram obtidas sinteticamente quatro novos derivados marinoquinolínicos. O composto **94**, substituído com o carbonato *tert*-butílico, apresentou atividade inibitória moderada, com valor de Cl_{50}^{Pf3D7} de $2,1 \pm 0,3 \mu M$. Por sua vez, os resultados das marinoquinolinas *N*-etiladas estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade dos derivados marinoquinolínicos contendo grupos carbamatos *N*-etilados.



#	●	Cl_{50} Pf3D7 (μM)	Cl_{50} HepG2 (μM)	IS
96	<i>t</i> -Bu	$8,2 \pm 0,7$	38 ± 1	$4,7 \pm 4$
97	Npt	7 ± 1	39 ± 5	5 ± 1
98	Bn	> 10	n.d.	-

Npt – neopentila.

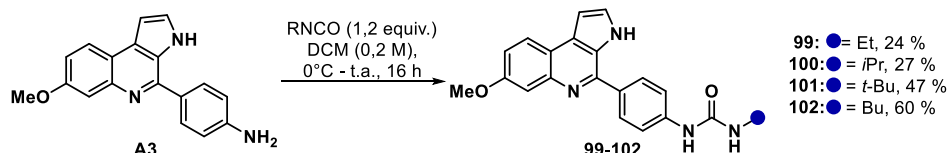
Os compostos **96** e **97**, substituídos com os carbamatos *terc*-butílico e neopentílico, apresentaram atividade inibitória moderada, respectivamente. O composto **98**, substituído com o carbamato benzílico, não apresentou atividade inibitória.

Para todos os compostos dessa série, foi observado que a remoção do hidrogênio lábil nessa região da molécula resultou na perda de potência. Tanto o carbonato *terc*-butílico **93** quanto os carbamatos *N*-etilados **96-98** se mostraram menos potentes em comparação com seus análogos não-alquilados. Esse resultado demonstra que o NH é importante, de certa forma, para a atividade antiplasmodial de marinoquinolinas, sugerindo uma importante interação de hidrogênio para estabilização do complexo fármaco-receptor.

3.2.4. Troca bioisostérica do carbamato por ureias

Dentre as possibilidades bioisostéricas do grupo carbamato, uma delas é o grupo ureia.¹²⁷ Em particular, a substituição do carbamato nas marinoquinolinas por ureias apresenta como vantagem a presença de dois NH próximos, o que pode potencializar ou criar interações importantes para a estabilização do complexo fármaco-receptor.

Dessa forma, novos análogos marinoquinolínicos contendo os grupos ureia **99-102** foram obtidas de maneira divergente, a partir do intermediário avançado **A3** (Esquema 16). As marinoquinolinas contendo os grupos ureias **99-102** foram obtidas a partir do tratamento de **A3** com os respectivos isocianatos alquílicos obtidos comercialmente, em rendimentos satisfatórios (24-60 %).¹²⁸

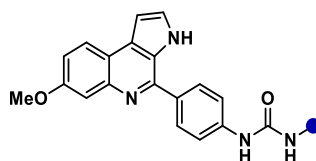


Esquema 16. Reação de obtenção de novas marinoquinolinas substituídas com grupos ureia.

Assim, quatro novos derivados marinoquinolínicos, contendo diferentes ureias alquílicas, foram sintetizados e avaliados quanto as suas atividades antiplasmodiais, empregando o ensaio biológico descrito anteriormente.

A atividade inibitória dos derivados marinoquinolínicos substituídos com ureias alquílicas está descrita na Tabela 6. Nessa série, todos os derivados avaliados **99-102** apresentaram atividade inibitória. Os compostos **99** e **100**, substituídos com os grupos etila e isopropila, apresentaram atividade inibitória moderada e boa, respectivamente. Os compostos **101** e **102**, substituídos com os grupos *terc*-butila e butila, respectivamente, foram ativos, apresentando atividade inibitória comparável na faixa submicromolar.

Tabela 6. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade dos derivados marinoquinolínicos contendo grupos ureias alquílicas.



#	●	Cl ₅₀ Pf3D7 (μM)	pCl ₅₀	Cl ₅₀ HepG2 (μM)	IS
99	Et	2,3 ± 0,8	5,64	> 98,7	> 43
100	<i>i</i> Pr	0,8 ± 0,4	6,10	94 ± 6	120 ± 50
101	<i>t</i> -Bu	0,5 ± 0,1	6,30	96,7 ± 4,7	193 ± 24
102	Bu	0,3 ± 0,2	6,52	> 12,5	> 28

Em relação à seletividade da série das ureias **99-102**, os compostos substituídos com os grupos etila **99**, isopropila **100** e *terc*-butila **101** não apresentaram citotoxicidade. A avaliação da citotoxicidade do composto substituído com o grupo butila **102** não foi totalmente conclusivo devido a problemas de solubilidade, apresentando o valor de Cl₅₀^{HepG2} > 12,5 μM. Os compostos 100 e 101 apresentaram os melhores índices de seletividade, com valores de SI > 100, desejável para compostos-líderes.¹²²

3.2.5. Perfil farmacêutico das séries de marinoquinolinas contendo os grupos carbamatos e ureias

Após análise de REA, duas séries de novas marinoquinolinas foram submetidas à uma predição de suas propriedades físico-químicas, fármacocinéticas e toxicológicas (ADMETox), bem como análise de eficiência do ligante. As predições descritas nesta parte foram realizadas pelo cientista Tomasz Frączek utilizando os softwares SeeSAR® (BiosolveIT) e ADMET Predictor® (SimulationsPlus), membro do grupo de química computacional da empresa Selvita S.A.. Para cálculo de eficiência do ligante, foram considerados os dados biológicos descritos nas Tabelas 5 e 6 e a atividade antiplasmodial *in vitro* está expressa em termos de pCl₅₀.

A primeira série submetida à análise computacional foram as marinoquinolinas contendo grupos carbamatos **85-92** e **MQ-30** (Tabela 7). Em relação às métricas de ligação, nenhum composto atendeu aos critérios de eficiência do ligante e eficiência lipofílica. O carbamato neopentílico **89**, que apresentou a melhor atividade inibitória da série (Cl₅₀^{PfD7} 500 ± 300 nM), apresentou o valor de EL = 0,29 e LipE = 1,47. Isso sugeriu que as propriedades físico-químicas da série ainda seriam passíveis de otimização em termos de propriedades fármacodinâmicas.

Analisando os dados de solubilidade (LogS @pH7,4) e volume molecular (MolVol), pode-se observar que a redução da solubilidade acompanha o aumento do volume molecular. Esse resultado sugeriu que o aumento da cadeia lateral contribui para a redução da solubilidade. A substituição com grupos alquílicos, arílico ou benzílico não foi favorável em termos de drogabilidade. Interessante que o melhor composto da série **89** apresentou menor valor de LogS @pH7,4 e maior valor de volume molecular.

A segunda série analisada, composta por marinoquinolinas substituídas com o grupo ureia **99-102**, apresentou melhores características físico-químicas, de maneira geral. A substituição isostérica do oxigênio dos carbamatos **85-92** pelo nitrogênio das ureias **99-102** resultou na melhora da área de superfície polar topológica (TPSA) de 76,24 para 79,04 Å².

Tabela 7. Atividade antiplasmodial *in vitro* e propriedades físico-químicas calculadas para marinoquinolinas selecionadas.

#	pCl ₅₀	LogP	LogS @pH _{7,4}	LE	LipE	TPS A	S+Basic _pKa	MolVol
85	5,28	3,25	0,8218	0,28	2,03	76,24	4,77	343
86	5,35	3,67	0,5838	0,27	1,68	76,24	4,84	364
87	5,75	4,44	0,3160	0,27	1,31	76,24	4,95	406
88	5,82	4,27	0,3674	0,28	1,55	76,24	4,95	406
MQ-30	5,97	4,33	0,2973	0,28	1,64	76,24	4,95	406
89	6,30	4,83	-0,0578	0,29	1,47	76,24	4,99	427
90	4,96	4,54	-0,4254	0,23	0,42	76,24	4,52	406
91	5,82	4,60	-0,3837	0,26	1,22	76,24	4,54	427
92	5,30	4,60	0,0884	0,24	0,7	76,24	4,91	406
99	5,64	3,50	0,7503	0,29	2,14	79,04	4,93	371
100	6,10	3,89	0,5792	0,30	2,22	79,04	4,99	392
101	6,30	4,14	0,4976	0,30	2,16	79,04	5,04	413
102	100	4,23	0,4797	0,31	2,29	79,04	5,03	413

A TPSA está relacionada com toxicidade e permeabilidade. Um valor de TPSA baixo está associado com toxicidade, especialmente se o composto apresentar um alto valor de Log P (> 4).¹²⁹

Compostos biologicamente ativos que apresentam TPSA $< 80 \text{ \AA}^2$ normalmente apresentam permeabilidade na barreira hematoencefálica. Por outro lado, o limite superior para uma boa absorção oral é de $140 \text{ \AA}^2$. Assim, especificamente para os compostos descritos neste trabalho, se faz necessário otimizar a TPSA para valores entre $80\text{-}140 \text{ \AA}^2$.¹²⁹

Em relação às métricas de ligação, a série de ureias apresentou resultados mais promissores do que seus análogos anteriores. Os compostos **100** (R = Et), **101** (R = t-Bu) e **102** (R = Bu) apresentaram valores de EL $\geq 0,3$. Já os valores de LipE ficaram entre 2,14-2,29, sugerindo que esses compostos ainda seriam passíveis de otimização da lipofilia.⁸⁶⁻⁸⁷

Em relação à solubilidade, os derivados **99-102** apresentaram melhores valores de LogS @pH_{7,4} do que seus derivados carbamatos **85-92**. Os resultados discutidos até aqui sugerem que a troca bioisotérica do grupo carbamato pelo grupo ureia resultou na melhora das propriedades físico-químicas associada à melhora da atividade biológica.

Outros dados interessantes expostos na Tabela 7 são os valores de pKa. Para ambas as séries de marinoquinolinas **85-92** (carbamatos) e **99-102** (ureias) foram encontrados valores de pKa básicos para o nitrogênio quinolínico. Isso sugere que essas marinoquinolinas possuem caráter básico.

Em seguida, foram analisados os dados obtidos com as predições das propriedades ADMETox. Todos os compostos receberam os alertas “Kow + Sw + Fu”, significando alertas de lipofilia, solubilidade e fração livre, respectivamente. Em adição, os compostos **90** (carbamato fenílico) e **91** (carbamato benzílico) apresentaram o alerta de “Size”, que significa peso molecular. Esses alertas são características que devem ser monitoradas durante o estudo de química medicinal.

Em relação à permeabilidade (**S+MDCK**), os carbamatos **85-92** apresentaram valores preditos entre 354,41 – 130,70 x10⁻⁶ cm/s, enquanto as ureias apresentaram valores que sugerem uma menor permeabilidade, entre 30,09-75,50 x10⁻⁶ cm/s (Tabela 8). No sistema de classificação de clearance estendido (ECCS), todos os compostos apresentaram classe 2.

Compostos de ECCS classe 2 normalmente são básicos ou neutros com alta lipofilia e permeabilidade de membrana, o que corrobora com o resultado anterior. Essa classe também indica uma eliminação via metabolismo (> 70 %), principalmente pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450).¹³⁰ Por outro lado, a predição da probabilidade de clearance calculada (**S+Cl_{met}**) indica que os carbamatos seriam metabolizados dessa forma e as ureias não.

Dessa forma, foram preditas a potencial inibição dessas duas séries para os CYP2D6 e CYP2C9. O primeiro citocromo (CYP2D6) foi predito de forma qualitativa e os compostos apresentaram probabilidade de inibição de média (M) a alta (H). Já a predição do CYP2C9 está expressa em termos de pK_i, com valores calculados entre 5,44 e 6,20. Esses valores significam Cl₅₀ entre 3,5-0,63 µM. Após o CYP3A4, os CYP2D6 e CYP2C9 são as enzimas mais importantes para o metabolismo de

fármacos. Especificamente o CYP2C9 é o principal citocromo responsável pelo metabolismo de fármacos com índice terapêutico estreito.¹³¹

Tabela 8. Propriedades ADMET calculadas para marinoquinolinas selecionadas.

#	S+MDCK (x 10 ⁻⁶ cm/s)	CYP2D6	2C9 p <i>K_i</i>	hERG pCl ₅₀	Pgp_ sub (%)	S+Cl_ Metab (%)
85	354,41	M	5,84	5,08	88	Sim (99)
86	296,92	M	5,88	5,21	90	Sim (99)
87	257,74	M	5,81	5,53	93	Sim (99)
88	258,70	H	5,90	5,38	97	Sim (99)
MQ-30	130,70	H	5,96	5,37	88	Sim (55)
89	202,69	M	5,87	5,46	93	Sim (87)
90	259,19	M	6,20	5,52	86	Sim (99)
91	226,67	M	6,17	5,55	93	Sim (99)
92	226,22	H	5,44	5,58	93	Sim (99)
99	75,50	M	5,81	5,10	97	Não (44)
100	50,35	H	5,80	5,19	97	Não (49)
101	30,09	H	5,82	5,31	97	Não (74)
102	65,48	M	5,70	5,42	97	Não (78)

O gene humano ether-a-go-go codifica uma subunidade formadora de poros do canal controlado por voltagem de potássio. A inibição da subunidade α desse canal, conhecida por hERG, está associada a cardiotoxicidade. Esse ensaio ganhou notoriedade no final da década de 90 com a remoção da terfenadina e da grepafloxacina do mercado por causarem cardiotoxicidade.¹³² A partir de então, a inibição da hERG, seja por ensaios biológicos ou por predição, passaram a fazer parte da rotina dos químicos medicinais.¹³³⁻¹³⁴ Para as duas séries avaliadas, os compostos apresentaram valores de pCl₅₀ para hERG entre 5,08-5,58, o que significa Cl₅₀ entre 8,3-2,6 μ M. Isso sugere fortemente que os compostos podem apresentar cardiotoxicidade.

O último parâmetro a ser discutido nesta etapa é a predição da probabilidade das marinoquinolinas aqui discutidas serem substratos da glicoproteína-P (Pgp). A Pgp funciona como uma bomba de efluxo transmembrana que bombeia seus substratos de dentro para fora da célula. A Pgp está localizada nos principais locais de entrada de xenobióticos do organismo humano e, conseqüentemente, influencia na captação e no efluxo de fármacos.¹³⁵ Todas as marinoquinolinas descritas nessa etapa apresentaram > 88 % de probabilidade de serem substratos da Pgp.

3.3. Conclusão

De maneira geral, marinoquinolinas se apresentam como uma nova classe de compostos com atividade antiplasmodial. O ponto de partida para o desenvolvimento desse trabalho foi o composto-líder **MQ-30**, obtido em um estudo anterior. A **MQ-30** possui em sua estrutura um carbamato *terc*-butílico e este capítulo se dedicou a avaliar a importância e influência deste carbamato presente na estrutura marinoquinolínica para a atividade inibitória.

Este capítulo reportou a síntese e avaliação antiplasmodial *in vitro* de 17 análogos marinoquinolínicos. Dentre os compostos submetidos à análise, foram encontrados compostos inativos até ativos na faixa submicromolar, indicando o potencial antimalarial desta nova classe de compostos. O resultado da atividade inibitória desses análogos permitiu a obtenção de um estudo de relação estrutura-atividade qualitativo, bem como a descoberta de novas marinoquinolinas com atividade inibitória antiplasmodial na faixa submicromolar.

A primeira série reportada foi baseada em alterações na cadeia lateral do carbamato. Foram exploradas cadeias alquílicas de diversos tamanhos, bem como fenílica e benzílica, a fim de obter informações sobre a influência do volume estérico nessa região. Como resultado, foi observado que a marinoquinolina substituída com o carbamato neopentílico **89** apresentou melhor atividade inibitória, na faixa submicromolar, bem como melhor índice de seletividade. Entre os análogos **85-89**, foi possível observar que o aumento do volume estérico na cadeia lateral do carbamato foi favorável para a atividade inibitória. Substituições com cadeias laterais mais volumosas e menos flexíveis **90-92** resultaram em perda de potência.

A etapa seguinte foi a avaliação da importância do NH do carbamato para a atividade inibitória. Para tal, foram sintetizados 3 novos análogos *N*-alquilados **96-98** e um análogo de marinoquinolina contendo o grupo carbonato *terc*-butílico **94**. Como resultado, foi observada a redução até perda total de atividade inibitória em comparação com seus análogos carbamatos não-alquilados. Essa nova série de marinoquinolinas demonstrou que a presença do nitrogênio doador de prótons naquela região do núcleo marinoquinolínico é importante para a atividade antiplasmodial.

A última série avaliada foi a substituição bioisostérica de carbamatos por ureias alquílicas **99-102**. Essa série apresentou os compostos mais promissores, em termos de atividade inibitória. Todas as marinoquinolinas sintetizadas apresentaram atividade inibitória, sendo o derivado contendo a ureia *terc*-butílica **101** o melhor composto da série. O composto **101** é um bioisóstero do composto-líder **MQ-30**. Assim como na série dos carbamatos, nessa série também foi observada a melhora da atividade inibitória com o aumento do volume estérico na cadeia lateral das ureias.

Assim, o estudo iterativo da avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* das marinoquinolinas descritas neste capítulo permitiu compreender as características estruturais presentes na região do carbamato da **MQ-30** importantes para a atividade antiplasmodial *in vitro*. Também foi possível descobrir novos compostos com atividade inibitória na faixa submicromolar com propriedades físico-químicas e farmacocinéticas otimizadas. Assim, os derivados promissores descritos neste capítulo podem servir de ponto de partida para a descoberta de novos análogos, dando continuidade ao estudo iterativo de química medicinal.

4. INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE MARINOQUINOLINAS

4.1. Aspectos gerais

No campo da química medicinal e biológica, uma sonda química é um composto utilizado para estudar um sistema biológico. Diversas estratégias podem ser empregadas na compreensão dos fenômenos biológicos, dentre elas as técnicas de imagens baseadas em fluorescência. Essas técnicas permitem a visualização e caracterização desses fenômenos em nível molecular.¹³⁶

O desenvolvimento bem sucedido de um estudo de química medicinal e biológica envolvendo sondas fluorescentes depende da combinação de estratégias sintéticas eficientes, instrumentação de imagem suficiente para estudos *in cellulo* e *in vivo*, métodos bioquímicos *in vitro* eficientes, bem como métodos *in silico*. Esse estudo interdisciplinar permite a obtenção de ensaios sofisticados a partir de imagens de sistemas biológicos em tempo real.¹²⁸

Em estudos de investigação do mecanismo de ação de fármacos e/ou novas entidades químicas, faz-se necessário que o composto-sonda possua algumas características farmacológicas. É desejável que o composto-sonda possua alta potência ($CI_{50} < 500$ nM), seletividade ($IS > 10$), solubilidade em água e permeabilidade. Essas características são importantes para que a sonda mimetize ao máximo o fármaco ou candidato a fármaco em estudo.¹³⁷⁻¹³⁹

Dessa forma, esta etapa aborda a síntese de derivados marinoquinolínicos com autofluorescência e propriedades físico-químicas otimizadas, como lipofilia e solubilidade. Um composto representativo dessa série foi escolhido para uma investigação inicial do mecanismo de ação de marinoquinolinas, empregando a combinação de técnicas de imageamento e estudos bioquímicos.

Os ensaios biológicos descritos neste capítulo foram realizados em colaboração e com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rafael Guido (IFSC/USP), Prof. Dra. Anna Caroline Campos Aguiar (UNIFESP) and Prof. Marcos Gazarini (UNIFESP). A atividade antiplasmodial *in vitro* foi avaliada em cepas de *P. Falciparum*, através do método SYBR green I,¹⁰¹ enquanto a citotoxicidade foi realizada em células de

hepatocarcinoma humano (HepG2), através do método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT).¹⁰²

4.2. Resultados e discussão

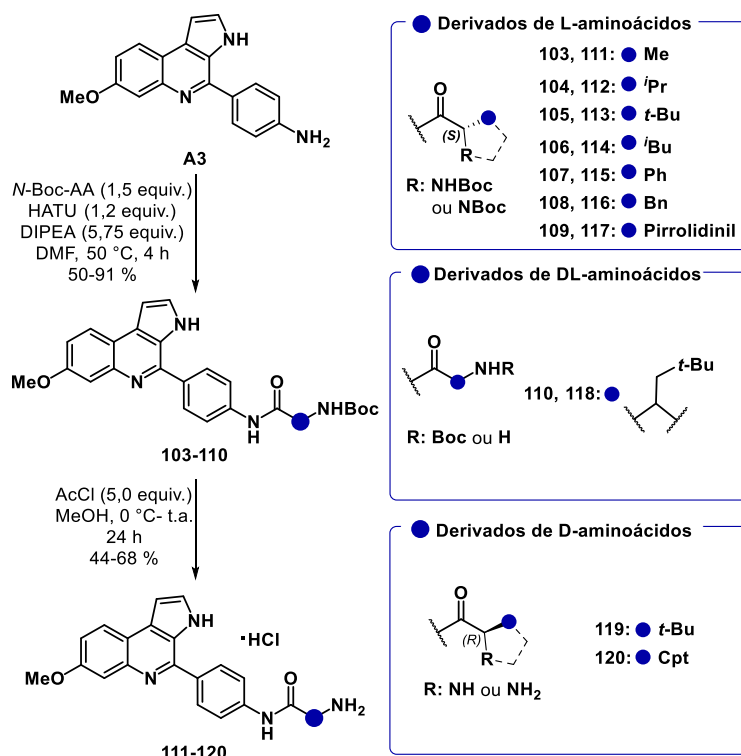
4.2.1. Seleção do composto-sonda

Foi reportado em estudos preliminares de REA de marinoquinolinas que o grupo metóxi na posição 7 é importante para a atividade antiplasmodial de marinoquinolinas,⁸³ enquanto o carbamato, como visto no capítulo anterior, pode ser substituído por bioisósteros. Dessa forma, novas marinoquinolinas foram planejadas substituindo o grupo carbamato por amidas, derivadas de aminoácidos.

O preparo dessa série de compostos **103-120** iniciou-se através da reação de acoplamento entre o intermediário avançado **A3** com diversos aminoácidos *N*-protegidos com o grupo Boc (Esquema 17). Foram empregados aminoácidos naturais e não-naturais na síntese dessa série de compostos, utilizando sempre o agente de acoplamento HATU. Após a reação de formação da amida em rendimentos satisfatórios (50-91 %), os derivados **103-110** foram utilizados como substratos na reação de remoção do grupo protetor Boc.

Para remoção do grupo Boc, foi empregada a estratégia de preparo *in situ* de ácido clorídrico, através do tratamento de cloreto de acetila em metanol. Essa estratégia forneceu os derivados marinoquinolínicos **111-120** como hidrocloreidratos, em rendimentos moderados a bons.

Em seguida, os novos derivados de MQ **103-120** foram submetidos à avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* em cepas de *P. falciparum* 3D7 e citotoxicidade utilizando células HepG2. Foram empregados aminoácidos naturais e não naturais na etapa de formação do grupo amida, afim de avaliar o efeito do volume estérico da cadeia lateral, bem como a presença do centro estereogênico, ambos presentes no aminoácido. A escolha dos aminoácidos foi baseada na estratégia de bioisosterismo entre carbamatos e amidas e permitiu a obtenção de novos análogos com intensa autofluorescência.



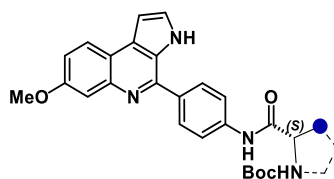
Esquema 17. Rota sintética para obtenção de marinoquinolinas acopladas com aminoácidos.

Para discussão dos resultados, essa série de marinoquinolinas foi dividida em três subséries de acordo com os aminoácidos de origem. Os resultados dos intermediários de marinoquinolina *N*-protegidos empregando L-aminoácidos **103-109** são mostrados na Tabela 9.

Os compostos **103-105**, sintetizados empregando a L-Ala, L-Val e L-Tle, respectivamente, apresentaram atividade inibitória moderada. Por sua vez, os compostos **107** e **108**, substituídos com os grupos fenila e benzila, respectivamente, apresentaram atividade inibitória submicromolar. Esse resultado sugeriu que entre os derivados **103-109**, o volume estérico presente na cadeia lateral do aminoácido é favorável para a atividade inibitória.

Em relação à seletividade, todos os compostos avaliados **103-109** não apresentaram citotoxicidade na concentração máxima testada. Dentre os compostos da série, os derivados **106-108**, substituídos com os grupos isobutila, fenila e benzila, destacaram-se, apresentando IS > 100, desejável para compostos-líderes.¹²²

Tabela 9. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade de marinoquinolinas derivadas de aminoácidos contendo o grupo *N*-Boc.



#	<i>N</i> -Boc-AA	●	Cl ₅₀ Pf3D7 (μM)	Cl ₅₀ HepG2 (μM)	IS	LogD _{7,4} ^a
103	L-Ala	Me	7,40 ± 0,10	> 400	> 53	3,72
104	L-Val	ⁱ Pr	4,00 ± 1,00	> 200	> 38	4,23
105	L-Tle	<i>t</i> -Bu	5,00 ± 1,00	> 400	> 67	4,71
106	L-Leu	ⁱ Bu	1,20 ± 1,00	> 400	> 300	4,54
107	L-Phg	Ph	0,70 ± 0,30	> 400	> 400	4,60
108	L-Phe	Bn	0,41 ± 0,03	> 400	> 930	4,91
109	L-Pro	2- pirrolidinil	> 10,00	ND	ND	4,44

^aSeeSAR foi utilizado para calcular o LogD_{7,4}; ND = não determinado.

O destaque dessa série foi para os compostos **107** (R = Ph) e **108** (R = Bn). Ambos apresentaram potência na faixa desejada para compostos-sonda, bem como seletividade adequada. No entanto, ambos os compostos **107** e **108** são substituídos com cadeias laterais volumosas, que elevam a lipofilia do composto. Isso pode ser observado comparando os valores de LogD_{7,4} para os compostos **103-109**. Essa elevação da lipofilia é indesejada, visto que a otimização da permeabilidade é importante em estudos de investigação do mecanismo de ação de fármacos.

Nesse sentido, procurou-se uma cadeia lateral cíclica alifática como alternativa. O composto **109**, substituído com um ciclo de 5 membros derivado da L-prolina, foi avaliado quanto à sua atividade inibitória e mostrou-se inativo. Esse dado sugere que a flexibilidade nessa região da molécula é importante para a atividade antiplasmodial.

A estratégia seguinte foi a aplicação dos *insights* obtidos através da REA dos carbamatos **85-92**, discutidas anteriormente neste trabalho. Um novo derivado marinoquinolínico derivado de aminoácido foi planejado empregando a técnica de

bioisosterismo no carbamato neopentílico **89**, considerado o composto com melhor atividade inibitória da série dos carbamatos **85-92**.

Para tal, empregou-se o aminoácido não-quiral DL-neopentilglicina *N*-protegido na reação de formação do grupo amida. O composto **110** (Esquema 17) apresenta um centro estereogênico em C- α , no entanto, o mesmo foi sintetizado em sua forma racêmica. Como resultado da avaliação biológica, o derivado **110** mostrou-se inativo ($Cl_{50} > 10 \mu M$), sugerindo que esta modificação é desfavorável para a atividade inibitória.

Esse resultado não era esperado, visto que foi observado que o aumento do volume estérico era favorável para a atividade biológica da série de α -aminoamidas *N*-protegidas **103-109**. Analisando a REA entre os compostos **107** (R = Ph), **108** (R = Bn) e **110** (R = Npt) (Figura 16), podemos observar que existem dois fatores estruturais que podem influenciar a atividade antiplasmodial *in vitro*.

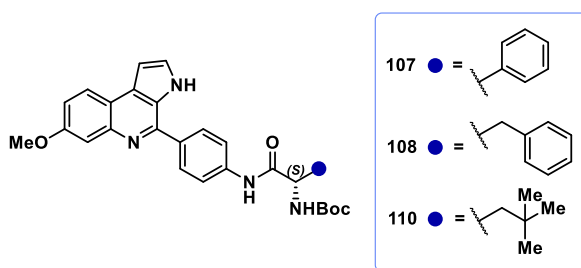


Figura 16. Comparação entre a estrutura química dos derivados marinoquinolínicos **107**, **108** e **110**.

Um deles é a presença do centro estereogênico em C- α . Os compostos **107** e **108** foram sintetizados empregando L-aminoácidos e, portanto, possuem um centro estereogênico (S). Por outro lado, o composto **110** foi obtido empregando um DL-aminoácido, sendo um racemato.

A fim de analisar a influência do centro estereogênico, o composto **110** foi submetido à uma resolução quiral por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) analítica. Para tal, empregou-se uma coluna Daicel CHIRALPAK® IB e 20% de isopropanol em hexano como fase móvel (1,0 mL/min) (Figura 16).

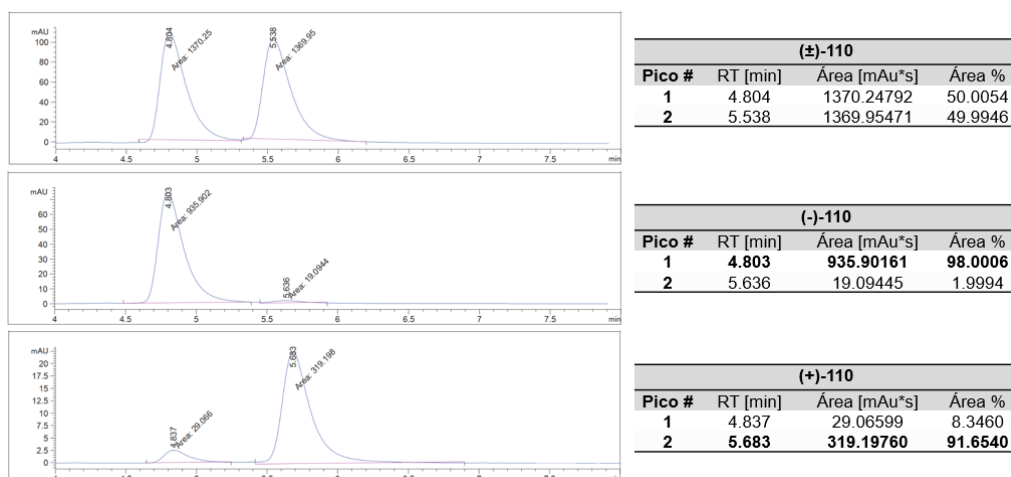


Figura 17. Cromatogramas obtidos após resolução quiral utilizando HPLC analítico do composto (**110**).

Os enantiômeros do composto (±)-**110** foram obtidos em excesso enantiomérico de 96 % e 84 % para os compostos (-)-**110** e (+)-**110**, respectivamente. Ambos enantiômeros foram submetidos à avaliação antiplasmodial *in vitro* e não apresentaram atividade inibitória em cepas de *Pf3D7*. Com esse experimento, foi possível obter informações de que o centro estereogênico não estaria causando grande influência na atividade antiplasmodial para essa série de compostos.

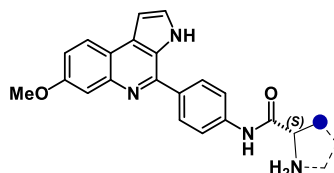
O segundo fator seria a natureza da cadeia lateral dos aminoácidos. Os compostos **107** e **108** são substituídos com grupos aromáticos, enquanto o derivado **110** é substituído com uma cadeia alifática (Figura 16). Dessa forma, é possível que haja uma interação do tipo empilhamento π , favorecendo a atividade inibitória em **107-108**.

Com a obtenção dos resultados biológicos da série de marinoquinolinas α -aminoamidas *N*-protegidas **103-110**, percebeu-se que os melhores inibidores de *Pf3D7* apresentaram valores de $\text{LogD}_{7,4}$ acima do limite recomendado ($\text{LogD}_{7,4} > 3$). Diante disso, esforços foram direcionados para transformação do grupo carbamato em aminas.

Após a reação de remoção do grupo protetor, marinoquinolinas contendo os grupos α -aminoamidas **111-120** foram obtidas e enviadas para avaliação inibitória

antiplasmodial. A primeira série avaliada foi derivada de L-aminoácidos **111-117** e as atividades inibitórias são mostradas na Tabela 10.

Tabela 10. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade de marinoquinolinas derivadas de L-aminoácidos.



#	N-Boc-AA	●	Cl ₅₀ Pf3D7 (μM)	Cl ₅₀ HepG2 (μM)	IS	LogD _{7,4} ^a
111	L-Ala	Me	1.11 ± 0.02	80 ± 30	70 ± 30	1.83
112	L-Val	ⁱ Pr	0.63 ± 0.08	70 ± 20	112 ± 44	2.49
113	L-Tle	<i>t</i> -Bu	0.28 ± 0.08	53 ± 9	190 ± 20	2.73
114	L-Leu	ⁱ Bu	1.2 ± 0.2	80 ± 30	70 ± 40	2.64
115	L-Phg	Ph	1.19 ± 0.07	180 ± 10	154 ± 18	2.99
116	L-Phe	Bn	0.31 ± 0.01	20 ± 8	60 ± 30	2.81
117	L-Pro	2- pirrolidinil	0.33 ± 0.02	50 ± 10	170 ± 20	2.24

^aSeeSAR foi utilizado para calcular o LogD_{7,4}; ND = não determinado.

Nessa série, todos os compostos apresentaram boa atividade inibitória. Em adição, também é possível observar que o volume da cadeia lateral influencia positivamente na atividade inibitória. A substituição do grupo metila (**111**) pelo grupo isopropila (**112**) resultou em um aumento de potência de 1,8 vezes.

Continuando com o aumento do volume da cadeia lateral, o composto substituído com o grupo *terc*-butila (**113**) apresentou uma atividade inibitória na faixa submicromolar. Esse é um excelente resultado e o composto **113** apresenta grande similaridade estrutural com o composto-líder **MQ-30**.

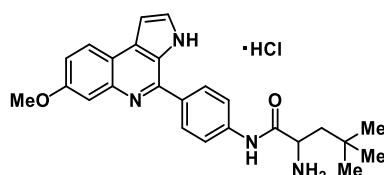
Substituições com grupos mais volumosos, como isobutila (**114**) e fenila (**115**) foram toleradas e resultaram em compostos com atividade inibitória boa, porém com potência inferior ao composto **113**. Por sua vez, o composto **116**, substituído com o

grupo benzil, apresentou atividade inibitória na faixa submicromolar, similar ao composto **113** (R = *t*-Bu). Esse resultado sugeriu que o tamanho do substituinte não é o único fator que interfere na atividade antiplasmodial.

Surpreendentemente, o composto **117**, derivado de L-prolina, apresentou atividade inibitória na faixa submicromolar ($Cl_{50} = 0,33 \mu M$). Esse resultado foi inesperado, visto que na análise de REA anterior, seu análogo *N*-Boc **109** foi inativo ($Cl_{50} > 10 \mu M$). Este resultado sugeriu que a remoção do grupo carbamato *tert*-butila foi favorável para a atividade inibitória.

Em seguida, o composto **118**, derivado do aminoácido DL-neopentilglicina foi avaliado (Tabela 11). Em contradição com o seu derivado carbamato **110**, que não apresentou atividade inibitória, o composto **118** apresentou potência na faixa submicromolar. O derivado **118** é um exemplo adicional de melhora na atividade inibitória após a remoção do grupo Boc.

Tabela 11. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade da marinoquinolina derivada do DL-neopentilglicina.



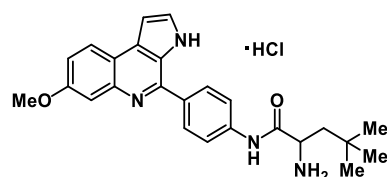
#	<i>N</i> -Boc-AA	Cl_{50} Pf3D7 (μM)	Cl_{50} HepG2 (μM)	IS	LogD _{7,4} ^a
118	DL-NptGly ^b	0,63 ± 0,02	18 ± 5	28 ± 7	2.87

^aSeeSAR foi utilizado para calcular o LogD_{7,4}; ^cAbreviação para ácido 2-Amino-4,4-dimetilpentanóico.

Como o composto **118** foi avaliado em sua forma racêmica, decidiu-se avaliar seus enantiômeros separadamente. Não foi possível encontrar uma condição de resolução quiral por HPLC analítico com os recursos disponíveis no laboratório de pesquisa do Prof. Dr. Correia. Como alternativa, aproveitamos a condição encontrada para a resolução quiral por HPLC analítico de seu intermediário, o composto **110**. Após

obtenção dos compostos enantiomericamente enriquecidos, ambos foram submetidos separadamente à etapa de remoção do grupo Boc. Os compostos enantiomericamente enriquecidos de **118** foram submetidos à avaliação biológica e o resultado está descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade dos compostos enantiomericamente enriquecidos derivados do aminoácido DL-NptGli.



Composto	Cl ₅₀ Pf3D7 (μ M)	Cl ₅₀ HepG2 (μ M)	IS
(-)- 118	0,31 $\pm$ 0,04	24 $\pm$ 4	130 $\pm$ 40
(+)- 118	0,99 $\pm$ 0,06	54,8 $\pm$ 0,8	55 $\pm$ 4

Ambos os compostos enantiomericamente enriquecidos foram ativos, com potência submicromolar. O composto (-)-**118** se mostrou mais potente do que seu derivado (+)-**118**. Por outro lado, o composto (-)-**118** é mais citotóxico do que seu enantiômero.

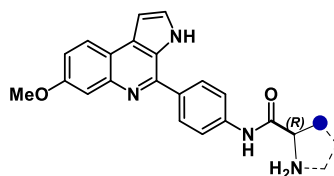
Esse resultado sugeriu que o centro estereogênico pode interferir na atividade antiplasmodial da série de marinoquinolinas substituídas com α -aminoamidas. Assim, duas novas marinoquinolinas foram planejadas a fim de investigar a influência do centro estereogênico na atividade antiplasmodial.

Os melhores derivados marinoquinolínicos da série de L-aminoácidos foram selecionados para síntese de seus enantiômeros, partindo dos D-aminoácidos. Dessa forma, os enantiômeros (R) substituídos com os grupos *terc*-butila (**119**) e 2-pirrolidinil (**120**) foram obtidos sinteticamente e avaliados quanto a sua atividade antiplasmodial (Tabela 13).

Ambos os compostos derivados de D-aminoácidos apresentaram atividade inibitória antiplasmodial, apresentando potência na mesma faixa submicromolar.

Comparando a atividade inibitória entre os compostos **119** e **120** (Tabela 13), derivados de D-aminoácidos, com os seus respectivos enantiômeros **113** e **117** (Tabela 10), observa-se que a atividade antiplasmodial permaneceu na mesma faixa submicromolar. Esse resultado sugere que a configuração do centro estereogênico não é determinante para a atividade antiplasmodial de marinoquinolinas contendo os grupos α -aminoamidas.

Tabela 13. Atividade antiplasmodial *in vitro* e seletividade de marinoquinolinas derivadas de D-aminoácidos.



#	N-Boc-AA	●	Cl ₅₀ Pf3D7 (μ M)	Cl ₅₀ HepG2 (μ M)	IS
119	D-Tle	<i>t</i> -Bu	0,31 $\pm$ 0,04	24 $\pm$ 4	80 $\pm$ 20
120	D-Pro	2-pirrolidinil	0,38 $\pm$ 0,02	9 $\pm$ 3	24 $\pm$ 7

A mudança de configuração do centro estereogênico afetou principalmente a citotoxicidade e a seletividade dos compostos marinoquinolínicos substituídos com grupos α -aminoamidas. Os compostos **119** (R = *t*-Bu) e **120** (R = 2-pirrolidinil) apresentaram citotoxicidade em células HepG2 e, conseqüentemente, o índice de seletividade desses derivados foi inferior do que o de seus enantiômeros **113** e **117**.

Após avaliação da atividade inibitória em cepas de *Pf3D7* e a determinação da seletividade de toda a série de marinoquinolinas acopladas com aminoácidos, foi possível analisar a REA e selecionar o composto-sonda para a posterior investigação do mecanismo de ação.

Os derivados substituídos com os grupos α -aminoamidas *N*-protegidos não foram considerados na seleção do composto-sonda devido à alta lipofilia de toda a série. Dentre os compostos α -aminoamidas **111-120**, dois derivados se mostraram promissores como compostos-sonda. Os compostos **113** e **117** apresentaram

potência na faixa desejada, não foram citotóxicos, apresentaram alta seletividade e lipofilia adequada.

O composto **113** é um bioisótero do composto-líder **MQ-30**, sendo ambos os compostos substituídos com o grupo *terc*-butila. Dessa forma, devido à similaridade estrutural com o composto-líder reportado anteriormente, o derivado **113** foi selecionado como composto-sonda nos estudos de investigação do MoA.

4.2.2. Perfil farmacêutico da série de marinoquinolinas contendo os grupos (R)-aminoamidas

Após análise da REA para seleção do composto-sonda, a série de marinoquinolinas substituídas com os grupos α -aminoamidas **111-118** foram submetidas à uma predição de seu perfil farmacêutico. As predições descritas nesta parte foram realizadas pelo cientista Tomasz Frączek, membro do grupo de química computacional da empresa Selvita S.A., utilizando os softwares SeeSAR® (BiosolveIT) e ADMET Predictor® (SimulationsPlus). Para cálculo de eficiência do ligante, foram considerados os dados biológicos descritos nas Tabelas 10 e 11 e a atividade antiplasmodial *in vitro* está expressa em termos de pCl₅₀.

Em relação às métricas de ligação, os compostos **111** (R = Me), **113** (R = *t*-Bu) e **117** (R = 2-pirrolidinil) apresentaram valores de EL $\geq 0,3$ (valor de referência) (Tabela 14). A eficiência lipofílica, por sua vez, apresentou valores melhores do que as séries anteriores.⁹⁰⁻⁹¹ Isso demonstra que a substituição bioisostérica dos carbamatos pelos derivados de aminoácidos foi benéfica em termos de potência e lipofilia. O composto **113** (R = *t*-Bu), selecionado como sonda para os estudos de mecanismo de ação, apresentou EL = 0,3 e LipE = 3,17.

Analisando os dados de solubilidade (LogS @pH7,4) e volume molecular (MolVol), pode-se observar que a solubilidade é alta independente do volume molecular. A substituição com grupos volumosos não afetou significativamente a solubilidade da série.

A área de superfície polar topológica (TPSA) também foi melhorada, estando agora dentro dos limites desejados (80-140 Å²).¹²⁹ A TPSA para a série de

marinoquinolinas derivadas de aminoácidos foi de 94,65 Å², exceto para o composto **117**, derivado da L-prolina, o qual apresentou valor de 83,62 Å².

Outro dado obtido importante foi o pKa. Especificamente na série de MQ derivadas de aminoácidos **111-118**, os compostos apresentam dois centros básicos: o nitrogênio quinolínico, presente em todas as estruturas marinoquinolínicas, e a amina primária, proveniente da estrutura do aminoácido.

Tabela 14. Atividade antiplasmodial *in vitro* e propriedades físico-químicas calculadas para marinoquinolinas derivadas de (S)-aminoamidas.

#	pCl ₅₀	LogP	LogS @pH _{7,4}	LE	LipE	TPSA	S+Basic pKa	MolVol
111	5,96	2,18	2,47	0,30	3,78	94,65	8.01; 4.55	371
112	6,20	2,80	2,25	0,29	3,40	94,65	7.97; 4.65	413
113	6,55	3,38	2,10	0,30	3,17	94,65	7.91; 4.70	434
114	5,92	3,13	2,20	0,27	2,79	94,65	8.07; 4.66	434
115	5,93	3,09	1,96	0,25	2,84	94,65	7.08; 4.35	434
116	6,51	3,41	1,99	0,27	3,1	94,65	7.39; 4.38	455
117	6,48	2,99	2,30	0,31	3,49	83,62	7.86; 4.58	392
118	6,20	3,69	2,05	0,27	2,51	94,65	8.14; 4.68	455

Continuando com a análise, os dados obtidos com as predições das propriedades ADMET foram analisados. Os compostos **115** (R = Ph) e **116** (R = Bn) receberam os alertas “ Kow + Sw + Fu + Size”, significando alertas de lipofilia, solubilidade, fração livre e peso molecular, respectivamente. Já o composto **118** (R = Npt) apresentou apenas o alerta Size relativo ao peso molecular. Os demais compostos não receberam alertas.

Em relação à permeabilidade (**S+MDCK**), as MQ's **111-118** apresentaram valores preditos baixos, entre 16,08 - 93,01 x10⁻⁶ cm/s (Tabela 15). No sistema de classificação de clearance estendido (ECCS), todos os compostos permaneceram na

classe 2, sendo compostos básicos ou neutros com alta lipofilia e permeabilidade em membranas.¹³⁰

Tabela 15. Propriedades ADMET calculadas para marinoquinolinas derivadas de (S)-aminoamidas.

#	S+MDCK x 10 ⁻⁶ cm/s	CYP2D6	2C9 pK _i	hERG pCl ₅₀	Pgp_sub (%)	S+Cl_ Metab (%)
111	31,46	H	5,54	4,47	99	Não (52)
112	24,32	M	5,80	4,65	99	Não (44)
113	18,27	M	5,86	4,73	99	Não (49)
114	21,70	M	5,67	4,76	99	Não (46)
115	22,00	H	6,01	4,84	99	Não (49)
116	21,07	H	5,88	4,95	99	Não (49)
117	93,01	L	5,58	5,30	93	Sim (48)
118	16,08	M	5,74	4,79	99	Não (74)

A predição da probabilidade de *clearance* (**S+Cl_{met}**) indica que as marinoquinolinas **111-116** e **118** não seriam metabolizadas pelo fígado, mas somente eliminadas pelos rins. Apenas o composto **117**, derivado da L-prolina, seria passível de metabolismo hepático. Ainda sobre o composto **117**, este foi o único que apresentou baixa (L) probabilidade na afinidade pelo CYP2D6. Todas as outras marinoquinolinas apresentaram probabilidade média (M) ou alta (H).

A predição do CYP2C9, expressa em termos de pK_i, apresentou valores entre 5,54 e 6,01, valores próximos das séries de marinoquinolinas derivadas de carbamatos e ureias. Os valores calculados de pCl₅₀ para inibição da hERG foram menores para a série de marinoquinolinas derivadas de α-aminoamidas, sugerindo que essa série apresenta uma probabilidade menor de cardiotoxicidade.¹³²

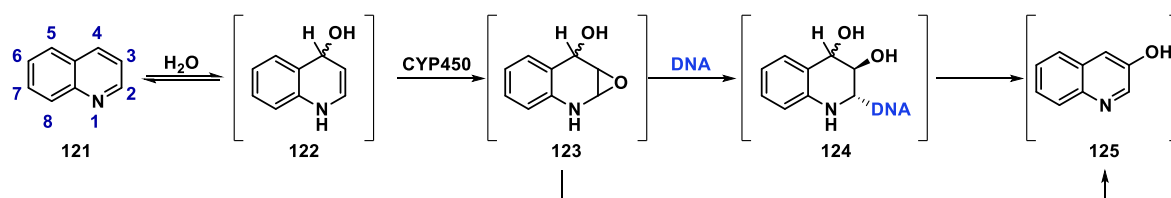
Em relação a probabilidade de serem substratos da Pgp, os compostos **111-118** apresentaram probabilidade acima de 90 %. Isso sugere que o efluxo pela Pgp pode afetar a absorção de marinoquinolinas, de maneira geral.¹³⁵

Comparando os perfis farmacêuticos do composto-líder **MQ-30** e do composto **113**, pode-se observar que o composto selecionado como sonda apresentou um melhor perfil farmacêutico, de maneira geral. Essa análise é importante afim de

garantir que a sonda tenha uma maior drogabilidade e possa mimetizar a ação do fármaco a ser desenvolvido.

Em seguida, foi analisado o perfil toxicológico do composto-líder **MQ-30** e do composto-sonda **113**. Os relatórios de perfil toxicológico foram emitidos pelo cientista Jörg Wichard, líder da equipe de química computacional da empresa Selvita S. A..

A teoria mais aceita de mutagenicidade de núcleos quinolínicos diz que o mecanismo acontece através de uma epoxidação (**123**), com posterior formação de uma ligação covalente com o DNA (**124**) (Esquema 18). Esse mecanismo ocorre durante o processo de metabolização de quinolinas (**121**) pelo CYP450 em 3-hidroxiquinolinas (**125**).¹⁴⁰



Esquema 18. Mecanismo proposto para genotoxicidade do núcleo quinolínico.

Outro alerta de segurança reportado para fármacos quinolínicos é a hepatotoxicidade. Esse tipo de toxicidade pode se iniciar causando estresse celular, inibição mitocondrial ou uma reação imune celular. Esses três principais mecanismos podem resultar na disfunção mitocondrial, levando a uma transição de permeabilidade mitocondrial e que resulta em hepatotoxicidade.¹⁴¹ Existem relatos na literatura de diagnóstico de hepatoesplenomegalia e hepatite aguda após administração de fármacos como quinidina e tacrina, respectivamente.¹⁴²

Os relatórios toxicológicos dos compostos **MQ-30** e **113** não apresentam alertas estruturais para mutagenicidade. A presença da estrutura pirrólica fundida ao núcleo quinolínico, bem como a substituição em C-4 (Figura 6), impedem o mecanismo de epoxidação via enamina, descrito no Esquema 18. Isso sugere que marinoquinolinas, além de se apresentarem como uma nova classe de agentes antiplasmodiais, surgem como uma nova classe de compostos quinolínicos com menor toxicidade.

O composto **MQ-30** apresentou um alerta para hepatotoxicidade, devido a presença do carbamato *terc*-butílico. Entretanto, esse alerta foi removido com a substituição bioisostérica do carbamato (**MQ-30**) pela α -aminoamida (**113**).

O alerta de toxicidade mais preocupante foi a cardiotoxicidade. Ambos os compostos (**MQ-30** e **113**) apresentaram predição plausível para inibição da hERG. As predições dos valores de pCl₅₀ descritas nas Tabelas 8 e 15 para a **MQ-30** e para o composto **113**, respectivamente, indicam que a substituição bioisostérica resultou na redução de probabilidade de inibição da hERG, passando de 5,37 para 4,73. Um valor de pCl₅₀ de 4,73 significa um valor de Cl₅₀ de aproximadamente 20 μ M, bem acima da potência encontrada em cepas de *Pf3D7*. Isso sugere que o composto **113** apresenta certa segurança em termos de cardiotoxicidade.

4.2.3. Investigação do mecanismo de ação

O composto-líder **MQ-30** foi descoberto em um ensaio fenotípico e até o presente momento não se sabe seus possíveis mecanismos de ação como agente antiplasmodial, bem como seu alvo terapêutico.⁸³ Foi verificado que os derivados marinoquinolínicos com atividade antiplasmodial possuem ação rápida, o que é benéfico em termos de eficiência como composto antiplasmodial. No entanto, essa característica limitou as possibilidades de investigação do MoA.

A descoberta dos possíveis MoA e mecanismos de resistência de novos compostos bioativos através do estudo das mudanças metabólicas de uma população celular após perturbação pelo composto em estudo não é indicada para agentes de ação rápida.¹⁴³ A alternativa encontrada para obter *insights* sobre o MoA de marinoquinolinas com atividade inibitória antiplasmodial foi a combinação entre estudos de imageamento, ensaios bioquímicos e uma busca *in silico* utilizando redes de interação fármaco-alvo.

Inicialmente, realizou-se a análise do perfil de resistência cruzada do composto-sonda **113**. Esse ensaio foi realizado empregando um painel de cepas resistentes aos principais fármacos antimalariais. O painel de cepas foi estrategicamente composto por cepas resistentes a diversas classes de medicamentos utilizados clinicamente, como endoperóxidos (ART), naftoquinona

(ATO), antifolatos (PYR e CG) e 4-aminoquinolina (CQ), além dos inibidores de fosfatidilinositol 4-quinase (PI4K). A cepa *P. falciparum* 3D7 é sensível a todos os antimaláricos convencionais e é utilizada como um padrão nesse ensaio. As demais cepas resistentes e seus perfis de resistência são descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Cepas de *P. falciparum* resistentes aos principais fármacos antimalariais e seus perfis de resistência.

Cepas de <i>P. falciparum</i>	Perfis de resistência
K1	Cepas multirresistentes aos antimaláricos padrões, incluindo CQ, CG e PYR.
Dd2	
TM90C6B	Resistente a ATO.
IPC4912	Parcialmente resistente aos derivados da Artemisinina.
PI4KR	Resistência aos inibidores de PI4K.

CQ – cloroquina; CG – cicloguanil; PYR – pirimetamina; ATO – atovaquona, PI4K – fosfatidilinositol 4-quinase.

Nesse estudo, é importante determinar o índice de resistência (IR) para os controles utilizados, bem como para o composto em estudo. O índice de resistência é a razão entre os valores de IC_{50} obtidos para a cepa resistente e para a cepa sensível, o que significa que o valor de RI aumenta com o nível de resistência.¹⁴⁴ Normalmente, um IR de 100 indica um alto nível de resistência, entretanto, em casos especiais, esse valor pode ser inferior a 10.

Para verificar o perfil de resistência das cepas, fármacos antimaláricos padrões foram avaliados e utilizados como controle positivo para inibição. Os fármacos PYR e CQ apresentaram maiores valores de IC_{50} na cepa *PfK1*, com IR de 63,5 e 7,2, respectivamente. Da mesma forma, ATO mostrou um valor de $IC_{50} > 1 \mu M$ e RI > 769 na cepa TM90C6B.

Como esperado, o artesunato (ART) não exibiu diferenças no valor de IC_{50} quando testado na cepa IPC4912. Dessa forma, os valores de IC_{50} avaliados estavam de acordo com o perfil de resistência esperado e indicaram que o painel é útil para análises de resistência cruzada.

Em seguida, a atividade inibitória do composto **113** no painel de cepas resistentes foi avaliada. Conforme descrito na Figura 18, o derivado **113** mostrou valores de IC₅₀ comparáveis em todas as cepas de *P. falciparum* resistentes presentes no painel avaliado. Os valores de IR variaram de 0,7 a 1,5, o que é visivelmente menor do que os valores de IR observados para os controles positivos. É considerada resistência cruzada sempre que o composto em investigação apresentar um deslocamento superior a 5 vezes no IC₅₀.¹⁴⁵

Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas potências avaliadas nas cepas sensível e resistentes. O resultado desse ensaio sugeriu que não há resistência cruzada entre o derivado marinoquinolínico **113** e os antimaláricos padrões, indicando assim que os possíveis MoAs de marinoquinolinas estão envolvidos em vias bioquímicas alternativas.

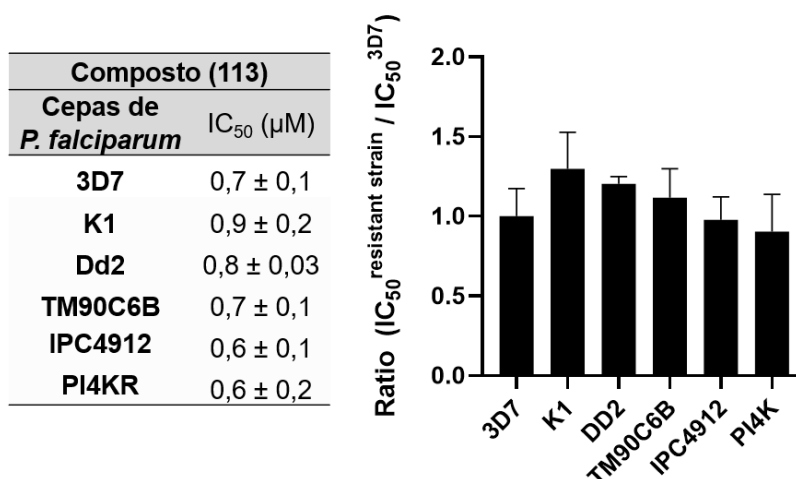


Figura 18. (a) Valores de IC₅₀ para o composto (**113**) entre as cepas sensível e resistentes de *P. falciparum*; (b) Índices de resistência calculados para as cepas sensível 3D7 e para as cepas resistentes K1, DD2, TM90C6B, IPC4912 e PI4K.

Esse achado corroborou com a hipótese de que os marinoquinolinas, apesar de sua semelhança com os fármacos quinolínicos antimalariais, surgem como uma nova classe de compostos antiplasmodiais, apresentando um novo mecanismo de ação. Aguiar *et al.* (2018) reportaram a dupla ação do composto **MQ-30** nas formas assexuada e hepática do parasito. No mesmo estudo, o composto **MQ-30** interferiu no

sequestro da espécie heme com uma potência 100 vezes menor que a apresentada em cepas 3D7. Esse resultado sugeriu que o metabolismo da hemozoína não é a principal via bioquímica de ação de marinoquinolinas. Em adição, esse resultado corroborou com o resultado da dupla ação para o composto **MQ-30**, uma vez que o metabolismo da hemozoína não está presente nas formas hepáticas do parasito.⁸³

No estudo de resistência cruzada, foi observada uma menor potência para o composto **113** quando comparado com o valor observado na análise de REA. Para avaliar uma possível degradação, foi realizada uma avaliação de degradação para verificar a estabilidade do composto **113** através de várias etapas de congelamento e descongelamento, conforme efetivado na rotina experimental (Figura 19).

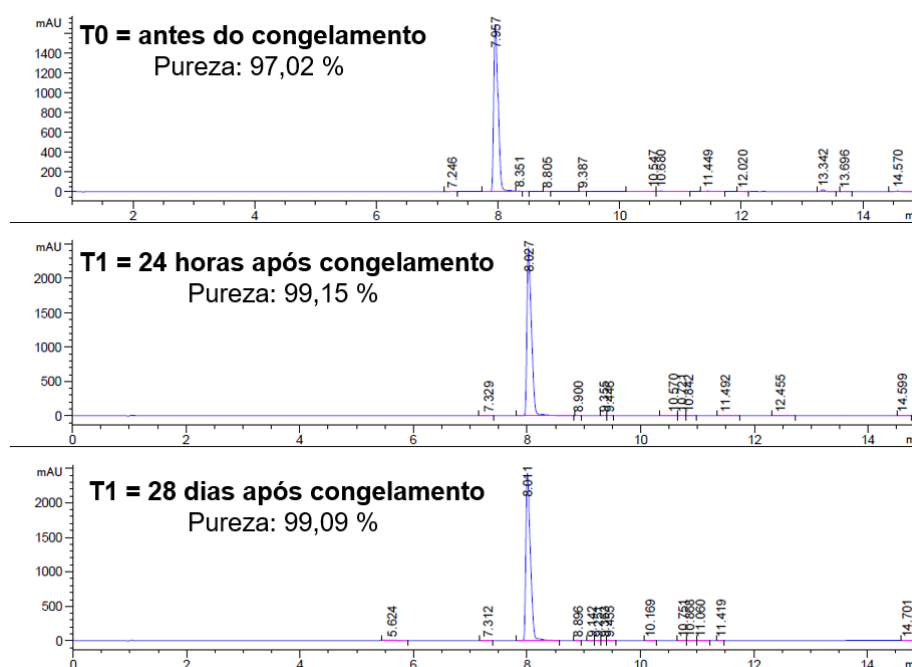


Figura 19. Avaliação qualitativa da degradação do composto (**113**) frente à procedimentos da rotina experimental.

Este teste teve como objetivo entender por que o composto **113** apresentou variação de potência antiplasmodial em função do tempo, uma vez que observamos esse comportamento em todas as séries de marinoquinolinas. Como resultado, as análises de HPLC não puderam detectar degradação significativa que pudesse interferir na pureza até 28 dias após o primeiro congelamento.

Em seguida, foi realizado um estudo de imageamento utilizando microscopia confocal. Esse estudo preliminar foi realizado pela Dra. Sarah Maluf, na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A autofluorescência do composto-sonda **113** permitiu estudar sua distribuição intracelular em eritrócitos vivos infectados com cepas de *P. falciparum* 3D7 por microscopia de fluorescência.

Para realizar este estudo, os eritrócitos infectados foram incubados com o composto **113** na concentração única de 10 μ M. Imagens 24 horas após o tratamento mostraram o rápido acúmulo do composto **113** em *P. falciparum* e uma fluorescência citoplasmática difusa em todos os estágios sanguíneos assexuados do parasito (Figura 20). Esse resultado sugeriu que os compostos marinoquinolínicos devem atuar em alguma via bioquímica presente no citoplasma de todos os estágios sanguíneos assexuados do parasito.

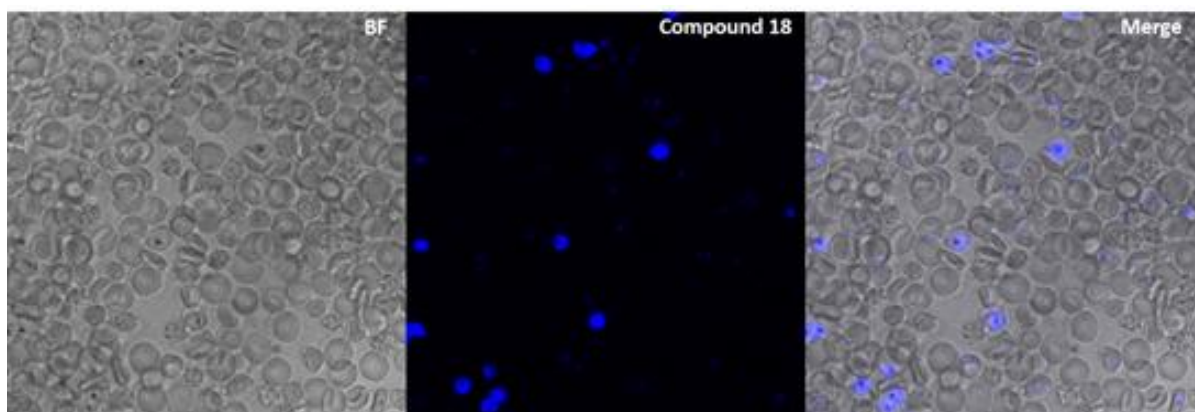


Figura 20. Microscopia confocal de células vivas de eritrócitos infectados com cepas de *P. falciparum* 3D7 tratadas com o composto (**113**). O composto (**113**) (10 μ M) foi visualizado por sua autofluorescência a 405 nm (excitação)/450-490 nm (emissão).

As imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal TCS SP5 X (Leica Microsystems, Alemanha) equipado com uma lente de imersão em óleo de abertura numérica de $60 \times 1,4$. Barra de escala: 10 μ m.

Surpreendentemente, nenhuma marcação foi detectada em hemácias não infectadas. Isso demonstrou a especificidade do acúmulo do composto-sonda **113** por cepas do *P. falciparum* 3D7.

O emprego da microscopia confocal também permitiu investigar a seletividade de marinoquinolinas para eritrócitos infectados com *Pf3D7* em comparação com células mamíferas. Assim, células do tipo HepG2, empregadas nos ensaios de citotoxicidade, foram tratadas com o composto-sonda **113** na concentração de 10 μM .

Nas imagens obtidas, é evidente a captação deste composto pelas células HepG2, mostrando forte intensidade de fluorescência intracelular por célula (Figura 21). Embora seja observada a sua captação pelas células HepG2, o composto **113** não apresentou citotoxicidade nos ensaios fenotípicos (CI_{50} $53 \pm 9 \mu\text{M}$) e o IS calculado para este composto foi de 190 ± 20 , acima da seletividade desejada para um composto-líder.¹⁴⁶

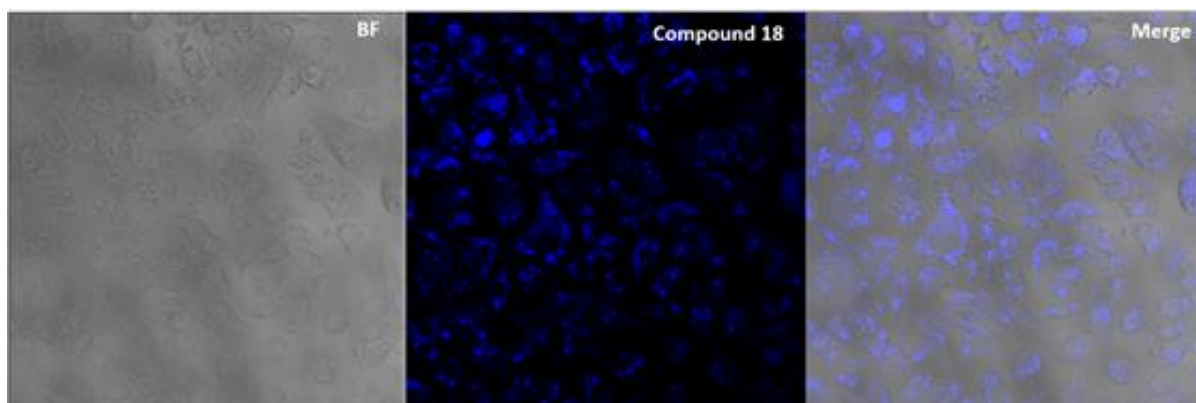


Figura 21. Microscopia confocal de células vivas de HepG2 incubado com composto (**113**). Composto (**113**) (10 μM) foi visualizado por sua autofluorescência a 405 nm (excitação)/450-490 nm (emissão). As imagens foram adquiridas usando microscópio confocal TCS SP5 X (Leica Microsystems, Alemanha). Barra de escala: 10 μm .

A captação do composto **113** por todos os estágios sanguíneos assexuados do parasito sugeriu que um dos mecanismos de ação poderia estar acontecendo por uma via bioquímica presente em todos esses estágios. Em adição, a ausência de resistência cruzada no painel de cepas resistentes sugeriu que os MoA devem acontecer por vias bioquímicas distintas dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas cepas em estudo.

Uma das vias bioquímicas importantes para a descoberta de fármacos com novos mecanismos de ação é a atividade proteolítica. Proteases foram encontradas participando de vários estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*. Dessa forma, decidiu-se investigar a atividade proteolítica de marinoquinolinas.

Apenas enzimas proteolíticas envolvidas em vias bioquímicas cruciais são consideradas interessantes como alvos terapêuticos e as cisteíno proteases desempenham bem esse papel.¹⁴⁷ No *P. falciparum*, as cisteíno proteases metabolizam a hemoglobina em um processo essencial para o crescimento e sobrevivência do parasito.

Assim, a inibição da atividade proteolítica pelo composto **113** foi avaliada em parasitos isolados através do monitoramento da hidrólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC, usando o inibidor de protease de cisteína E64 como controle positivo (Figura 22).¹⁴⁸

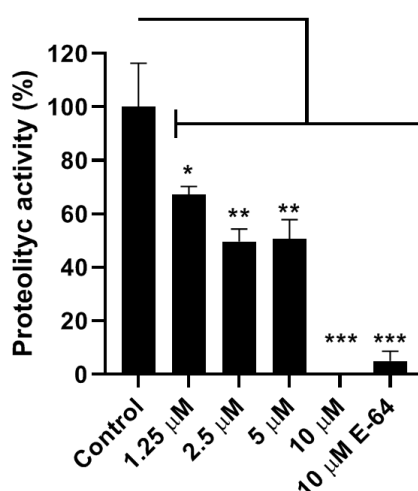


Figura 22. Atividade proteolítica do composto (**113**).

Esta abordagem é vantajosa porque o inibidor foi testado contra as proteases em seu ambiente natural, o citoplasma do parasito. Dessa forma, este ensaio garantiu que o composto **113** pudesse acessar as proteases endógenas.

O composto **113** foi avaliado em quatro concentrações. Concentrações menores do composto **113** inibiram entre 50-70 % da atividade proteolítica. O

composto **113** aboliu a atividade proteolítica intracelular na concentração de 10 μ M, mostrando um resultado comparável com o controle E-64, um potente inibidor irreversível de cisteíno proteases.¹⁴⁹

Nesse ensaio, foi possível observar uma interferência significativa na atividade proteolítica pelo composto **113**, sendo necessário uma concentração maior que a potência avaliada anteriormente para causar esse efeito. Esse resultado sugeriu que as marinoquinolinas podem estar atuando como inibidores de proteases em um mecanismo de ação secundário.

Cisteíno proteases já são descritas como alvos terapêuticos adequados para a descoberta de novos fármacos antimalariais. Enquanto as falcipainas têm a maior contribuição para a atividade de cisteíno protease no compartimento ácido das fases eritrocitárias de *P. falciparum* e vem sendo bem estudadas, outras proteases como as dipeptidil peptidases (DPAP) e as proteínas SERA também desempenham papel importante em uma ampla gama de vias bioquímicas.¹⁵⁰⁻¹⁵¹

Em geral, possíveis cisteíno-proteases como alvos terapêuticos estão presentes em diferentes estágios do parasito e estão envolvidas na degradação da hemoglobina (vacúolo alimentar), saída de gametócitos (corpos osmiofílicos), saída de esporozoítos (vacúolo parasitóforo) e invasão (organela apical) ou egresso (vacúolo parasitóforo) da célula hospedeira.¹⁵⁰⁻¹⁵¹

Afim de obter maiores informações sobre o mecanismo de ação principal de marinoquinolinas, empregou-se uma nova estratégia, dessa vez *in silico*, na busca do alvo terapêutico. A docagem molecular é uma ferramenta importante da química medicinal empregada para entender as interações intermoleculares entre um ligante e uma proteína e possui diversas aplicações, a depender da necessidade do estudo.¹⁵²

Na investigação do mecanismo de ação de marinoquinolinas como uma nova classe de agentes antiplasmodiais foi empregada a ferramenta de docagem molecular reversa. Dessa forma, tentou-se encontrar um ou mais alvos terapêuticos de marinoquinolinas empregando ligantes específicos.¹⁵³

Para tal, proteínas disponíveis no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) provenientes de *Plasmodium* cocristalizadas com algum ligante foram consideradas e

os compostos marinoquinolínicos líder (**MQ-30**) e sonda (**113**) foram escolhidos como ligantes. As predições foram realizadas pelo cientista Szymon Czaplak empregando um modelo de aprendizado de máquina desenvolvido internamente pela empresa Selvita S. A.. O resultado desse estudo é a probabilidade (escore entre 0-1) de cada proteína ser o alvo terapêutico do ligante em questão.

A Tabela 17 mostra as proteínas que apresentaram probabilidade maior que 75 % de serem o alvo de ambos os compostos. É possível observar que, de maneira geral, as proteínas descritas na Tabela 17 são proteínas quinases.

Tabela 17. Proteínas com probabilidade maior que 75 % de serem o alvo terapêutico de marinoquinolinas.

Proteína_Ligante	Escore (0-1)		Características*
	MQ-30	113	
2PMO_HMD	0,866681725	0,845439506	<i>Pf</i> PK7 em complexo com a himenialdisina; proveniente de <i>P. falciparum</i> ; proteína kinase 7.
2PML_ANP	0,837522691	0,849081796	<i>Pf</i> PK7 em complexo com um análogo do ATP; proveniente de <i>P. falciparum</i> ; proteína kinase 7.
5FET_1TR	0,830402827	0,851031864	PVX_084705 em complexo com um derivado de imidazopirimidina; proveniente de <i>P. vivax</i> ; proteína quinase dependente de GMPc; não publicada.
4QOX_DXR	0,793155956	0,772555506	CDPK4 em complexo com um derivado de pirazolopirimidina; proveniente de <i>P. falciparum</i> ; proteína kinase 4 dependente de cálcio.
6JWQ_AMP	0.788737124	0.758377844	HPPK-DHPS tipo selvagem em complexo com AMP; proveniente de <i>P. falciparum</i> ; 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfoquinase tipo selvagem.
5EZR_4ZS	0.762082577	0.802867907	PVX_084705 em complexo com um derivado de imidazopirimidina; proveniente de <i>P. vivax</i> ; proteína quinase dependente de GMPc; não publicada.

*Fonte: Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>).

Os melhores resultados foram atribuídos à mesma proteína co-cristalizada com dois ligantes diferentes. A proteína quinase 7 de *P. falciparum* (PfPK7) é uma quinase órfã, isto é, não possui ortólogos em células mamárias.

As proteínas quinases humanas mais semelhantes à PfPK7 são a proteína quinase 3 ativada por mitógeno de especificidade dupla (MAP2K3) e proteína serina-treonina quinase 6 apresentando 33 % e 26 % de homologia de sequência, respectivamente. Apesar da semelhança, a PfPK7 não é um ortólogo dessas enzimas.¹⁵⁴

A ferramenta de docagem molecular reversa associada ao aprendizado de máquina considerou a estrutura cristalográfica da proteína disponível no PDB co-cristalizada com um ligante. A importância desse ligante está em determinar o sítio ativo da proteína a ser considerado nas predições.¹⁵⁵

As estruturas cristalográficas com alta probabilidade de serem o alvo terapêutico de marinoquinolinas possuem ligantes no sítio ativo do ATP, sendo este o sítio ativo considerado nas predições. Dessa forma, considerando a PfPK7 como alvo, as marinoquinolinas seriam inibidores competitivos de ATP.¹⁵⁶ Apesar disso, poucas são as chances da PfPK7 ser um alvo importante para marinoquinolinas.

Acredita-se que esta proteína quinase esteja envolvida em uma via bioquímica que regula a proliferação e o desenvolvimento do parasito. Sua função ainda não foi totalmente esclarecida, entretanto, sabe-se que parasitos PfPK7⁻ apresentam proliferação reduzida durante esquizogonia e são incapazes de se desenvolverem de oocineto para oocisto no mosquito. A obtenção e cultivo em laboratório de *P. falciparum* PfPK7⁻ indica que essa proteína quinase não é essencial para a sobrevivência do parasito.¹⁵⁷

Uma segunda proteína quinase com alta probabilidade de ser o alvo terapêutico é a PVX_084705. Sabe-se que essa enzima é uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG) proveniente de *P. vivax*. As enzimas PKG possuem múltiplas funções essenciais nos diversos estágios parasito. Dessa forma, inibidores de PKG demonstraram potencial atividade antiplasmodial nas formas assexuada sanguínea e hepática, bem como bloqueadores de transmissão.¹⁵⁶

Assim como na *PfPK7*, as enzimas PKG provenientes de *P. falciparum* também possuem diferenças significantes nos mecanismos de ativação e especificidade dos sítios regulatórios quando comparadas com as PKG humanas, o que garante certa seletividade.¹⁵⁶ A enzima equivalente à PVX_084705 em *P. falciparum* seria a *PfPKG*, a qual possui um bolso hidrofóbico substancialmente diferente quando comparado com a sua versão humana. Isso ajuda a diferenciar as duas versões de proteína kinase, garantindo seletividade.¹⁵⁸

A terceira enzima com alta probabilidade de ser um alvo de marinoquinolinas é a proteína kinase 4 dependente de cálcio (CDPK4). A ausência da CDPK4 não afeta o desenvolvimento do estágio sanguíneo do parasito, o que sugere que essa enzima não é essencial neste estágio do parasito. Por outro lado, a CDPK4 é crítica para a gametogênese.¹⁵⁹ Esses dados sugerem que a CDPK4 não seria um alvo terapêutico de marinoquinolinas, visto que esses compostos apresentam atividade inibitória na fase intra-eritrocítica e não apresentam atividade gametocida.⁸³

Por fim, a última enzima com escore maior que 75 % para os compostos (**MQ-30**) e (**113**) foi a 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfoquinase (HPPK-DHPS). Essa proteína quinase está envolvida na via da síntese do folato, através de duas reações sequenciais: transferência de um pirofosfato, seguida de uma condensação.¹⁶⁰

DHPS é um alvo molecular conhecido da sulfadoxina, fármaco antimalarial empregado como prevenção durante a gravidez.¹⁶¹ A cepa de *P. falciparum* 3D7, empregada usualmente como cepa sensível à cloroquina, é resistente à sulfadoxina devido à sua capacidade de usar folato exógeno.¹⁶² Esse fato, entretanto, não interfere na possibilidade de a HPPK-DHPS ser um possível alvo de marinoquinolinas.

O resultado dessas predições indica que a proteína PKG e HPPK-DHPS podem ser alvos importantes de marinoquinolinas como uma nova classe de agentes antiplasmodiais. O resultado da predição do alvo de marinoquinolinas, juntamente com uma investigação da literatura corroborada pelos ensaios biológicos já realizados forneceram um novo ponto de partida. Dessa forma, novos ensaios bioquímicos devem ser realizados para uma investigação mais profunda.

4.3. Conclusão

A descoberta de novas entidades antimaláricas atuando contra o desenvolvimento intraeritrocitário é vantajosa em termos de uso clínico. Os principais sintomas da malária, decorrentes do ciclo eritrocitário do parasito, podem causar incapacidades periódicas. Em relação aos esforços feitos para encontrar novos medicamentos antimalariais com novos mecanismos de ação, a classe de marinoquinolinas surgem como alternativa promissora.

Uma breve análise da relação estrutura-atividade auxiliou na seleção de um composto-sonda de marinoquinolina para estudos de imageamento e ensaios bioquímicos. O composto **113** apresentou a melhor combinação de potência, seletividade, propriedades físico-químicas e de fluorescência, bem como a maior semelhança estrutural com o composto-líder **MQ-30**, reportado anteriormente.

Com os ensaios biológicos, foi possível obter *insights* de que o composto **113** apresenta mecanismos de ação diferentes dos fármacos antimalariais padrões, bem como foi possível visualizar o acúmulo de marinoquinolina exclusivamente em eritrócitos infectados. Ainda nos estudos preliminares de imagem, a sonda **113** mostrou um acúmulo difusivo em todo o citoplasma do parasito, bem como uma captação pelas células HepG2. A captação de composto pelas células HepG2 no estudo de imagem não foi preocupante, pois o derivado **113** não apresentou citotoxicidade, com grande IS no estudo fenotípico na mesma linhagem celular.

A etapa final desse estudo foi a seleção de um caminho para a investigação do mecanismo de ação. Como foi observado o acúmulo de marinoquinolinas por todo o citoplasma do parasito, o estudo de imageamento não foi decisivo para a escolha de qual via bioquímica investigar.

Considerando a inibição de proteases como uma via importante para a descoberta de novos fármacos antimalariais, decidiu-se investigar a atividade inibitória de marinoquinolinas. Dessa forma, ao investigar a atividade proteolítica da marinoquinolina **113** observou-se a abolição da atividade em concentrações maiores, o que indicou que os compostos marinoquinolínicos podem estar atuando como inibidores de proteases através de um mecanismo de ação secundário.

Como não foi possível descobrir o mecanismo de ação principal até o presente momento, partiu-se para o emprego de uma ferramenta *in silico* para a investigação do alvo terapêutico. A docagem molecular reversa empregada num modelo de aprendizado de máquina desenvolvido internamente pela Selvita S. A. permitiu obter predições sobre os possíveis alvos terapêuticos de marinoquinolinas.

Assim, foi possível selecionar quatro proteínas quinases como possíveis alvos terapêuticos de marinoquinolinas. Dentre elas, as proteínas PKG e HPPK-DHPS são possíveis alvos terapêuticos de marinoquinolinas e essenciais para a sobrevivência do parasito.

Esse resultado forneceu um novo ponto de partida para a investigação do mecanismo de ação. As vias bioquímicas envolvendo a *Pf*PKG e HPPK-DHPS devem ser investigadas, bem como a inibição dessas proteínas em ensaios enzimáticos.

5. CONCLUSÃO GERAL

Marinoquinolinas se apresentam como uma nova classe de compostos com atividade antiplasmodial. O desenvolvimento desse trabalho partiu do composto **MQ-30**, reportado na literatura como um novo composto-líder com atividade antiplasmodial. O interessante do derivado **MQ-30** é a presença do carbamato *terc*-butílico em sua estrutura química, responsável por fornecer interações moleculares desconhecidas que elevaram a potência para uma escala nanomolar.

Dessa forma, esta tese se dedicou a realizar uma análise da relação estrutura-atividade de marinoquinolinas, tendo como ponto de partida a MQ-30. Novos derivados foram planejados e avaliados quanto a sua atividade antiplasmodial.

A partir desse estudo iterativo e em colaboração de química medicinal, foi possível obter *insights* sobre a influência do carbamato *terc*-butílico na atividade antiplasmodial (Figura 23). Em adição, foi possível encontrar novos derivados marinoquinolínicos com atividade inibitória antiplasmodial e alta seletividade.

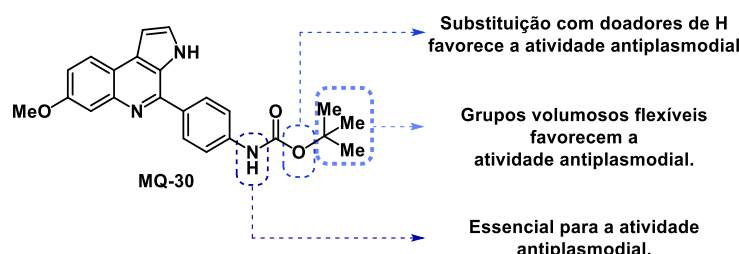


Figura 23. Principais conclusões obtidas com o estudo de relação estrutura-atividade.

A substituição bioisostérica de carbamatos por outros grupos funcionais, como ureias e amidas, resultou nos melhores compostos. Foram observadas melhores atividades inibitórias, seletividade, bem como propriedades físico-químicas.

Em adição, os compostos contendo os grupos α -aminoamidas apresentaram autofluorescência exarcebada, o que permitiu realizar uma breve investigação do mecanismo de ação dessa classe de compostos. O melhor composto da série (**113**)

foi selecionado como sonda, considerando as características farmacológicas, propriedades físico-químicas e similaridade estrutural com o composto-líder **MQ-30**.

Com os estudos preliminares de imageamento e ensaios bioquímicos, foi possível visualizar o acúmulo citoplasmático do composto-sonda **113** em todos os estágios intraeritrocíticos do parasito e concluir que marinoquinolinas possuem um mecanismo de ação diferente dos fármacos antimalariais empregados no painel de cepas resistentes. Além disso, marinoquinolinas podem estar atuando como inibidores de cisteíno proteases, através de um mecanismo de ação secundário.

O emprego de uma ferramenta *in silico* permitiu obter predições sobre os possíveis alvos terapêuticos de marinoquinolinas, sendo proteínas quinases como possíveis alvos terapêuticos de marinoquinolinas. O destaque foi para as proteínas PKG e HPPK-DHPS, essenciais para a sobrevivência do parasito e importantes alvos terapêuticos para a descoberta de novos agentes antiplasmodiais. Como perspectiva, novos ensaios bioquímicos devem ser realizados para investigar a inibição dessas proteínas por marinoquinolinas.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Considerações gerais

Os solventes utilizados para cromatografia foram de grau técnico e não foram destilados antes do uso. Produtos químicos comercialmente disponíveis foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. ou Oakwood Products Inc. e usados como recebidos.

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência F254 sobre placa de alumínio, da marca Merck. Os compostos foram visualizados sob radiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 254 nm ou 365 nm, e/ou utilizando iodo e soluções reveladoras de vanilina ou ninhidrina, seguidas de aquecimento.

As purificações por cromatografia flash foram realizadas utilizando-se sílica gel 230-400 mesh como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila ou diclorometano e metanol como eluentes, seguindo o procedimento de cromatografia flash descrito por Still, Khan e Mitra (1978).¹⁶³

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos nos espectrômetros: (a) Bruker, modelo Avance DPX-250, operando a 250 MHz para as análises de ^1H e a 62,5 MHz para as análises de ^{13}C ; (b) Bruker, modelo Avance 400, operando a 400 MHz para as análises de ^1H e a 100 MHz para as análises de ^{13}C ; ou (c) Bruker, modelo Avance 500, operando a 500 MHz para as análises de ^1H , 125 MHz para as análises de ^{13}C ; em solventes deuterados, conforme indicado.

Os deslocamentos químicos (δ) para os espectros de ^1H e ^{13}C NMR são dados em ppm em relação aos deslocamentos químicos do solvente residual convertidos para a escala TMS (CDCl_3 : $\delta\text{H} = 7,26$ ppm, $\delta\text{C} = 77,16$ ppm, $\text{DMSO}-d_6$: $\delta\text{H} = 2,50$ ppm, $\delta\text{C} = 39,52$ ppm, MeOD : $\delta\text{H} = 3,31$ ppm, $\delta\text{C} = 49,00$ ppm). Os dados são relatados da seguinte forma: deslocamento químico (δ), multiplicidade, constantes de acoplamento (J) em Hertz e intensidade integrada.

As análises de espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foram registradas em um sistema Agilent 6550 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS com tecnologia Agilent Jet Stream para ionização por eletrospray, em um espectrômetro

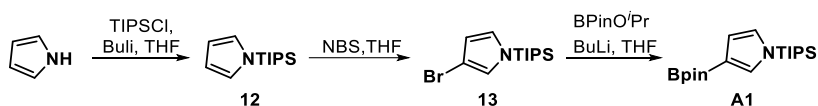
Thermo Scientific QExactive® Hybrid Quadrupole-Orbitrap trabalhando com ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo, ou em um espectrômetro de massa BRUKER Impact II no modo positivo.

Os pontos de fusão foram determinados usando um aparelho Stuart SMP30 e não foram corrigidos. A pureza dos compostos testados foi analisada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em um equipamento Shimadzu prominence HPLC LC-20AT com detector de matriz de fotodiodos (DAD), em um sistema ACQUITY™ UPLC equipado com DAD e detectores de fluorescência ou em um Agilent Tecnologias 1260 Infinity com detector DAD. A fase estacionária foi equipada com coluna de HPLC Ascentis Express® C-18 (tamanho de partícula de 5 µm, 10 cm × 4,6 mm); e misturas de ACN:H₂O (0,1% TFA) como fase móvel (método A: 5-85% de ACN em H₂O com 0,1% de TFA, 15 min, 1,0 mL/min) ou método B: 5-85% de ACN em H₂O com 0,1% TFA, 40 min, 1,0 mL/min). A análise de HPLC confirmou que todos os compostos finais possuíam purezas ≥ 90 %.

As rotações ópticas (α) foram medidas em um polarímetro Perkin Elmer modelo 341 a 20 °C usando uma célula de vidro de quartzo (comprimento de caminho de 10 mm). Rotações específicas e concentração das amostras são expressas em [degcm³g⁻¹dm⁻¹] e [g.100 mL⁻¹], respectivamente.

6.2. Síntese dos materiais de partida

6.2.1. Síntese de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (**A1**)^{103-105,108}



Síntese de 1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (**76**)

A uma solução de pirrol (60 mmol, 4,03 g) em THF anidro (100 mL) a - 78 °C e em atmosfera de N₂, BuLi (66 mmol, 41,3 mL, 1,6 M em hexano) foi adicionado gota a gota durante 30 minutos. Após uma hora de agitação, cloreto de triisopropilsilil (60 mmol, 12.9 mL) foi adicionado gota a gota e a mistura reacional foi mantida por três

horas adicionais a - 78 °C. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e a agitação foi mantida por 30 minutos adicionais. Após o fim da reação, a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida, adicionou-se água destilada (100 mL) e o produto foi extraído com éter etílico (3 x 100 mL). As fases orgânicas combinadas foram então lavadas com salmoura e a água residual foi removida através da adição de Na₂SO₄. O resíduo foi então concentrado e o material bruto foi purificado através de cromatografia flash utilizando uma mistura de 5 % de AcOEt em hexano como eluente para obtenção do produto correspondente (**76**) como um óleo incolor em 91 % de rendimento (12.2 g).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 6,86 (d, *J* = 1,6 Hz, 2H); 6,38 (d, *J* = 1,7 Hz, 2H); 1,61 – 1,40 (m, 3H); 1,16 (d, *J* = 7,4 Hz, 18H).

RMN ¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ 124,1; 110,2; 17,9; 11,9.

Síntese de 3-bromo-1-(triisopropilsilil)-1*H*-pirrol (**77**)

A uma solução de **12** (12,2 g, 54,6 mmol) em THF anidro (120 mL) a - 78 °C e atmosfera de nitrogênio adicionou-se *N*-bromosuccinimida recristalizada (54,6 mmol, 9,7 g) em porção única. A mistura reacional foi mantida a - 78 °C por três horas e deixada atingir a temperatura ambiente durante a noite. Após o fim da reação, a mistura reacional foi concentrada e o material bruto foi ressolubilizado em hexano, filtrado em uma plug de alumina neutra e concentrado para produzir **77** como um óleo incolor em 90 % de rendimento (14,9 g).

R_f 0,71 (100 % hex.).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 6,75 – 6,70 (m, 1H), 6,67 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 6,29 (dd, *J* = 2,8, 1,4 Hz, 1H), 1,48 – 1,33 (m, 3H), 1,09 (d, *J* = 7,4 Hz, 18H).

RMN ¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ 124,8; 123,5; 113,2; 98,0; 17,9; 11,7.

Síntese de 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (**A1**)

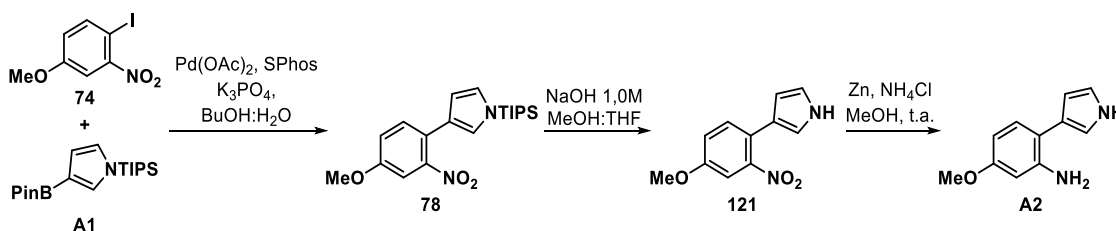
A uma solução de **13** (49,14 mmol, 14,9 g) em THF anidro (246 mL) a - 78 °C e atmosfera de nitrogênio, BuLi (98,3 mmol, 61,4 mL, 1,6 M em hexano) foi adicionado gota a gota durante 30 minutos. A mistura reacional foi agitada por 1 hora a - 78 °C e em seguida, 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolana (294,1 mmol, 60 mL) foi adicionada gota a gota por 20 minutos. A mistura resultante foi agitada por três horas a - 78 °C e então deixada vir à temperatura ambiente durante a noite. Em seguida, a reação foi finalizada através da adição de solução aquosa saturada de NH₄Cl (150 mL) e a mistura resultante foi extraída com eter dietílico (3 x 150 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com salmora e a água residual foi removida através da adição de Na₂SO₄. O solvente foi então removido sob pressão reduzida e o produto (**A1**) foi empregado na etapa seguinte sem purificação prévia.

Rf 0,56 (5 % de AcOEt em hex.).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 7,25 – 7,22 (m, 1H), 6,82 – 6,80 (m, 1H), 6,62 (dd, J = 2,6, 1,1 Hz, 1H), 1,46 (hept, J = 7,5 Hz, 3H), 1,32 (s, 12H), 1,09 (d, J = 7,5 Hz, 18H).

RMN ¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ 133,8; 125,1; 115,8; 82,9; 25,0; 18,0; 11,8.

6.2.2. Síntese de 3-(4-metóxi-2-nitrofenil)-1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (**A2**)^{109,83}



Síntese de 3-(4-metóxi-2-nitrofenil)-1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (**78**).

A um tubo de Schlenk adicionou-se Pd(OAc)₂ (0,276 mmol, 62,0 mg), SPhos (0,552 mmol, 226,6 mg), 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1-(triisopropilsilil)-1H-pirrol (**A1**) (20,7 mmol, 4,60 g), 1-iodo-4-metóxi-2-nitrobenzeno (**74**) (13,8 mmol, 3,85 g) e K₃PO₄ (27,6 mmol, 5,86 g). O tubo de Schlenk foi fechado com um septo de

borracha e então evacuado e preenchido com atmosfera de nitrogênio (3x). Butanol (19,7 mL) e água (7,9 mL) foram adicionados e a mistura reacional foi aquecida a 80 °C durante a noite. A mistura reacional foi arrefecida até a temperatura ambiente e foi então filtrada através de uma camada fina de sílica (eluindo com AcOEt). O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi purificado por cromatografia flash usando uma mistura de 10 % de AcOEt em hexano como eluente para fornecer o produto correspondente (**78**) como um óleo marrom escuro em 89 % de rendimento (4,61 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 7,06 (dd, *J* = 8,6, 2,7 Hz, 1H), 6,88 – 6,84 (m, 1H), 6,81 – 6,77 (m, 1H), 6,38 (dd, *J* = 2,7, 1,5 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 1,53 – 1,41 (m, 3H), 1,13 (d, *J* = 7,7 Hz, 18H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 157,78; 149,52; 131,96; 124,87; 122,60; 122,49; 120,74; 118,17; 110,53; 108,11; 55,83; 17,85; 11,71.

Síntese de 3-(4-metóxi-2-nitrofenil)-1*H*-pirrol (**121**).

Uma solução de NaOH (60 mL, 1,0 M) foi adicionada lentamente a uma solução contendo 3-(4-metóxi-2-nitrofenil)-1-(triaisopropilsilil)-1*H*-pirrol (**78**) (12,3 mmol, 4,61 g) em MeOH:THF (1:1, 120 mL) à temperatura ambiente. A mistura resultante foi mantida sob agitação por 16 horas. Após esse período, o solvente orgânico foi removido sob pressão reduzida. O pH da solução resultante foi neutralizado com a adição de ácido cítrico sólido e o produto bruto foi extraído da fase aquosa com AcOEt (3 x 60 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com salmora e a água residual foi removida com Na₂SO₄. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto bruto (**121**) foi obtido como um sólido marrom escuro (12 mmol, 2,62 g) e empregado na próxima etapa sem purificação prévia.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,36 (s, 1H), 7,41 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,07 (dd, *J* = 8,6, 2,7 Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 4,2, 1,9 Hz, 1H), 6,81 (dd, *J* = 4,8, 2,5 Hz, 1H), 6,27 (dd, *J* = 4,3, 2,6 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H).

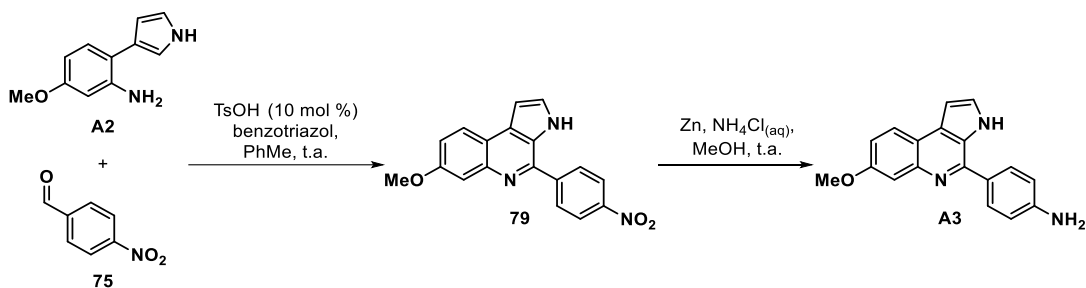
RMN ¹³C (63 MHz, CDCl₃) δ 158,1; 149,6; 132,2; 122,5; 119,1; 118,8; 118,4; 116,5; 108,6; 108,3; 56,0.

Síntese de 5-metóxi-2-(1*H*-pirrol-3-il)anilina (**A2**).

A uma solução de 3-(4-metóxi-2-nitrofenil)-1*H*-pirrol (**121**) (12 mmol, 2,62 g) em MeOH (200 mL) foi adicionada uma solução aquosa de NH₄Cl (1,09 g, 20,4 mmol em 6 mL de H₂O). A mistura de reação foi vigorosamente agitada e Zinco em pó (186 mmol, 12,16 g) foi adicionado. Após 3 horas, a mistura reacional foi filtrada através de uma camada fina de celite e lavada com AcOEt (1 x 100 mL) e MeOH (1 x 100 mL). O solvente foi então removido sob pressão reduzida e o material bruto foi purificado por cromatografia flash usando uma mistura de 50 % de AcOEt em hexano como eluente para fornecer a pirroloanilina (**A2**) como um sólido marrom em 93 % de rendimento (2,1 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,40 (s, 1H), 7,17 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 3,8, 1,8 Hz, 1H), 6,85 (dd, *J* = 4,8, 2,5 Hz, 1H), 6,44 – 6,38 (m, 2H), 6,35 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 3,99 (s, 2H), 3,80 (s, 3H).

6.2.3. Síntese de 7-metóxi-4-(4-nitrofenil)-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina (**A3**)⁸³



Síntese de 7-metóxi-4-(4-nitrofenil)-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina (**79**).

A uma solução da pirroloanilina **A2** (1 mmol, 188,2 mg) e benzotriazol (1 mmol, 119,1 mg) dissolvidos em tolueno anidro (4,0 mL) foram adicionados 4-nitrobenzaldeído (1,2 mmol, 181,3 mg) e ácido *p*-toluenossulfônico (0,1 mmol, 19,02 mg). A mistura reacional foi agitada durante 16 h à temperatura ambiente (atmosfera ambiente). Após este período, 30 mL de solução saturada de NaHCO₃ foram adicionados à reação e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 50 mL). A fase orgânica foi lavada com salmora e a água residual foi removida através da adição de Na₂SO₄. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o produto bruto foi então purificado por

cromatografia flash usando 20% de AcOEt em hexano como eluente para fornecer a marinoquinolina **79** como uma goma amarela em 54 % de rendimento (172,4 mg).

R_f 0,45 (30 % de AcOEt em hex.).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,78 (s, 1H), 8,46 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 8,19 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 8,15 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,49 (t, *J* = 2,8 Hz, 1H), 7,31 (dd, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 1H), 7,14 – 7,09 (m, 1H), 3,98 (s, 3H).

Síntese de 4-(7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il)anilina (**A3**).

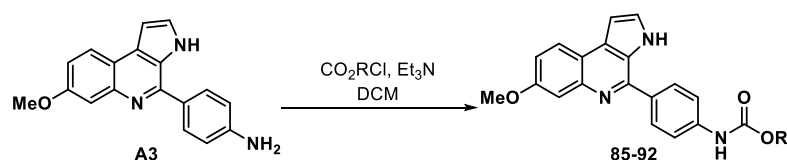
A uma solução de 7-metóxi-4-(4-nitrofenil)-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolina (**79**) (5,4 mmol, 1,72 g) em MeOH (92 mL) foi adicionada uma solução aquosa de NH₄Cl (0,49 g, 9,2 mmol em 2,7 mL de H₂O). A mistura de reação foi vigorosamente agitada e Zinco em pó (83,7 mmol, 5,47 g) foi adicionado. Após uma hora, a mistura reacional foi filtrada através de uma camada fina de celite e lavada com AcOEt (1 x 50 mL) e MeOH (1 x 50 mL). O solvente foi então removido sob pressão reduzida e o intermediário avançado de marinoquinolina **A3** foi obtido em conversão total e empregado na etapa seguinte sem purificação prévia.

¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,12 (dd, *J* = 8,9, 2,8 Hz, 1H), 7,71 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,51 (d, *J* = 2,6 Hz, 2H), 7,18 (dt, *J* = 8,9, 2,3 Hz, 1H), 7,04 (t, *J* = 2,8 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 3,94 (s, 3H).

HRMS (ESI⁺) *m/z* calculado para C₁₈H₁₆N₃O⁺ [M+ H]⁺: 290,12879, encontrado: 290,12838.

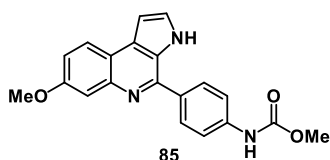
6.3. Procedimento geral para síntese de marinoquinolinas contendo grupos carbamatos alquílicos, fenílico ou benzílico (85-92)

Procedimento geral para obtenção dos derivados marinoquinolínicos contendo grupos carbamatos a partir dos respectivos cloroformatos



A uma solução contendo a anilina **A3** (0,20 mmol; 57,87 mg) e trietilamina anidra (0,43 mmol; 0,6 mL) em DCM anidro (1,0 mL) em atmosfera de nitrogênio e banho de gelo foi adicionado o respectivo cloroformiato (0,35 mmol, 1,5 equiv.) gota a gota. O banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Após este período, foram adicionados 5 mL de água e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura e a água residual foi removida através da adição de Na₂SO₄. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi então purificado por cromatografia flash usando um gradiente de 0-80 % de AcOEt em hexano como eluente para fornecer as marinoquinolinas correspondentes (**85-92**).

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de metila (**85**)**



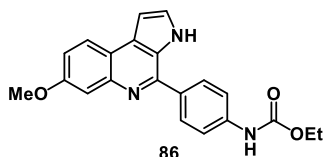
Obtido a partir do cloroformato de metila (27 μ L) como uma goma amarela em 30 % de rendimento (20,8 mg).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,74 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,99 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,71 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,57 (s, 1H), 7,48 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,19 (dd, *J* = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,72 (s, 3H).

RMN ¹³C (63 MHz, DMSO) δ 158,0; 154,4; 146,2; 143,9; 140,5; 132,7; 129,8; 129,6; 128,7; 126,3; 124,5; 118,5; 117,5; 117,1; 109,1; 101,0; 55,6; 52,2.

HRMS (ESI+) *m/z* calcd. para C₂₀H₁₈N₃O₃⁺ [*M*+ *H*]⁺: 348,13427, encontrado: 348,13388.

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de etila (**86**)**



Obtido a partir do cloroformato de etila (34 μ L) como uma goma amarela em 86 % de rendimento (62,2 mg).

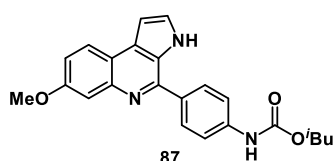
RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,73 (s, 1H), 9,90 (s, 1H), 8,18 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,99 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,72 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,58 (t, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,49 (d, *J* =

2,5 Hz, 1H), 7,19 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1H), 7,12 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 4,18 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 1,28 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO) δ 158,0; 154,0; 146,2; 144,0; 140,6; 132,6; 129,8; 129,6; 128,7; 126,3; 124,5; 118,4; 117,5; 117,1; 109,1; 101,0; 60,7; 55,6; 15,0.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 362,14992, encontrado: 362,14840.

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de *iso*-butila (87)**



Obtido a partir do cloroformato de *iso*-butila (45 μL) como uma goma amarela em 64 % de rendimento (49,9 mg).

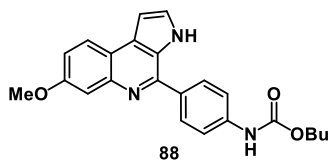
R_f 0,48 (50 % de AcOEt em Hex.).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,72 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 8,18 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,99 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,72 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,58 (t, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,19 (dd, $J = 8,9, 2,6$ Hz, 1H), 7,12 (dd, $J = 3,0, 1,5$ Hz, 1H), 3,93 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 2,02 – 1,89 (m, 1H), 0,96 (d, $J = 6,7$ Hz, 6H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO) δ 158,0; 154,1; 146,2; 143,9; 140,6; 132,6; 129,8; 129,6; 128,7; 126,3; 124,5; 118,5; 117,5; 117,1; 109,1; 101,0; 70,7; 55,6; 28,0; 19,3.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 390,18122, encontrado: 390,18043.

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de butila (88)**



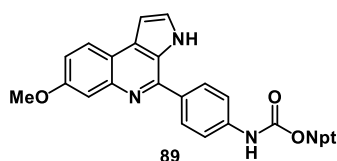
Obtido a partir do cloroformato de butila (45 μL) como uma goma amarela em 95 % de rendimento (74,0 mg).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,72 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 8,18 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,99 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,72 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,58 (t, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,19 (dd, $J = 8,9, 2,6$ Hz, 1H), 7,12 (dd, $J = 2,9, 1,4$ Hz, 1H), 4,13 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 1,70 – 1,58 (m, 2H), 1,48 – 1,33 (m, 2H), 0,93 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO) δ 158,0; 154,1; 146,2; 144,0; 140,6; 132,6; 129,8; 129,6; 128,7; 126,3; 124,5; 118,4; 117,5; 117,1; 109,1; 101,0; 64,5; 55,6; 31,0; 19,1; 14,0.

HRMS (ESI⁺) m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 390,18122, encontrado: 390,18128.

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de neopentila (89)**



Obtido a partir do cloroformato de neopentila (53 μL) como uma goma amarela em 39 % de rendimento (31,5 mg).

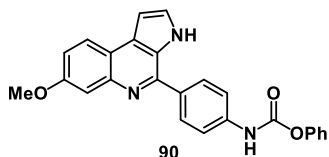
R_f 0,55 (50 % de AcOEt em Hex.).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,72 (s, 1H), 9,87 (s, 1H), 8,20 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,59 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,20 (dd, J = 8,9, 2,6 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 3,0, 1,6 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,86 (s, 2H), 0,99 (s, 9H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO- d_6) δ 158,0; 154,2; 146,2; 143,9; 140,6; 132,6; 129,8; 129,6; 128,7; 126,3; 124,5; 118,5; 117,5; 117,1; 109,1; 101,0; 73,7; 55,6; 31,9; 26,7.

HRMS (ESI⁺) m/z calcd. para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 404,19687, encontrado: 404,19574.

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de fenila (90)**



Obtido a partir do cloroformato de fenila (44 μL) como uma goma amarela em 32 % de rendimento (26,2 mg).

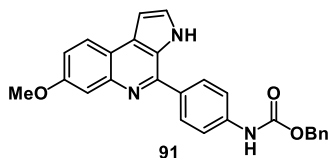
R_f 0,48 (30 % de AcOEt em Hex.).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,73 (s, 1H), 10,50 (s, 1H), 8,20 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 8,03 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,59 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 7,50 – 7,41 (m, 3H), 7,33 – 7,25 (m, 3H), 7,20 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 2,9, 1,5 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO) δ 157,4; 149,9; 146,7; 143,6; 139,3; 129,6; 129,3; 129,0; 128,1; 127,8; 125,7; 125,5; 124,9; 123,9; 118,7; 116,8; 115,9; 115,3; 113,7; 108,6; 100,4; 55,1.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{25}H_{20}N_3O_3^+$ $[M+ H]^+$: 410,14992, encontrado: 410,10706.

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de benzila (91)**



Obtido a partir do cloroformato de benzila (49 μ L) como um sólido amarelo em 27 % de rendimento (22,9 mg).

PF 67-68 °C.

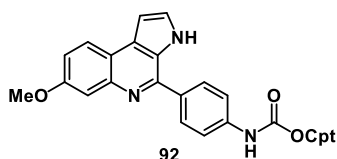
R_f 0,53 (50 % de AcOEt em Hex.).

RMN 1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,72 (s, 1H), 10,05 (s, 1H), 8,19 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,58 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 7,53 – 7,29 (m, 6H), 7,20 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 2,9, 1,5 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 3,90 (s, 3H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO) δ 157,5; 153,3; 145,7; 143,4; 139,9; 136,5; 132,3; 129,4; 129,2; 128,4; 128,4; 128,3; 128,1; 128,1; 128,0; 125,9; 124,0; 118,0; 117,1; 116,7; 108,6; 100,5; 65,9; 55,1.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{26}H_{22}N_3O_3^+$ $[M+ H]^+$: 424,16557, encontrado: 424,16418.

***N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de ciclopentila (92)**



Obtido a partir do cloroformato de ciclopentila (45 μ L) como uma goma castanho claro em 29 % de rendimento (23,3 mg).

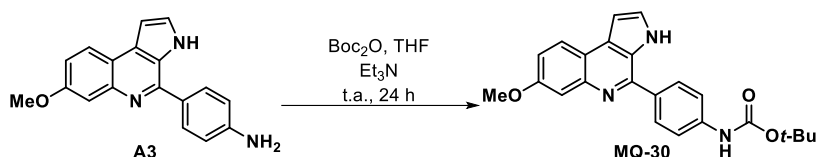
R_f 0,74 (50 % de AcOEt em Hex.).

RMN 1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,70 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 8,18 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,97 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,70 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,57 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,19 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 2,8, 1,5 Hz, 1H), 5,16 – 5,11 (m, J = 5,9, 3,1 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 1,96 – 1,60 (m, 8H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO- d_6) δ 157,6; 153,4; 145,8; 143,5; 140,2; 132,1; 129,4; 129,1; 128,2; 125,9; 124,1; 118,0; 117,1; 116,7; 108,7; 100,5; 76,9; 55,2; 32,3; 23,3.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{24}H_{25}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$: 401,19720, encontrado: 401,19595.

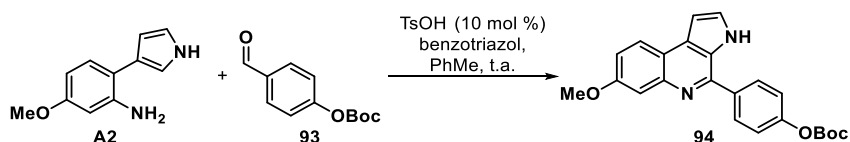
Síntese do derivado *N*-(4-{7- metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de *tert*-butila (**MQ-30**)



A uma solução contendo a anilina **A3** (0,20 mmol; 57,87 mg) e trietilamina anidra (0,43 mmol; 0,6 mL) em THF anidro (1,0 mL) foi adicionado o dicarbonato de di-*tert*-butila (1 mmol, 0,23 mL). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, foram adicionados 25 mL de água e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura e a água residual foi removida através da adição de Na_2SO_4 . O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi então purificado por cromatografia flash usando um gradiente de 0-80 % de AcOEt em hexano como eluente para fornecer o composto correspondente em 75 % de rendimento (58,4 mg).

RMN 1H (250 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11,79 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,20 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,96 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,63 (s, 1H), 7,50 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,21 (dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, 1H), 7,14 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 1,52 (s, 9H),

6.5. Síntese do derivado *N*-(4-{7- metóxi -3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbonato de *tert*-butila (94**)**



A uma solução da pirroloanilina **A2** (0,2 mmol, 37,6 mg) e benzotriazol (0,2 mmol, 24 mg) dissolvidos em tolueno anidro (0,8 mL) foram adicionados 4-formilfenil carbonato de *tert*-butila (**93**) (0,24 mmol, 53 mg) e TsOH (0,02 mmol, 3,8 mg). A

mistura reacional foi agitada durante 16 h à temperatura ambiente (atmosfera ambiente). Após este período, 10 mL de solução saturada de NaHCO_3 foram adicionados à reação e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com salmora e a água residual foi removida através da adição de Na_2SO_4 . O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o produto bruto foi então purificado por cromatografia flash usando um gradiente de 0-50 % de AcOEt em hexano como eluente para fornecer a marinoquinolina **94** como um sólido bege em 41 % de rendimento (32 mg).

PF 159 °C.

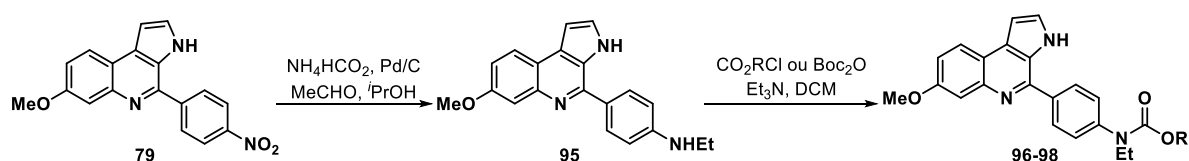
Rf 0,50 (50 % de AcOEt em Hex.).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO-d_6) δ 11,82 (s, 1H), 8,22 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 8,07 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,61 (t, $J = 2,7$ Hz, 1H), 7,50 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,42 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,23 (dd, $J = 8,9; 2,6$ Hz, 1H), 7,15 (d-ap, $J = 1,8$ Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 1,54 (s, 9H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO-d_6) δ 157,6; 151,2; 151,2; 145,2; 143,4; 135,9; 129,9; 129,6; 128,5; 125,9; 124,1; 121,6; 117,2; 117,1; 108,7; 100,7; 83,4; 55,2; 27,2.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 391,16523, encontrado: 391,16530.

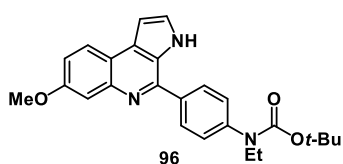
6.6. Procedimento geral para síntese de marinoquinolinas contendo grupos carbamatos *N*-alquilados (96-98)



A uma solução contendo a anilina **A3** (0,20 mmol; 57,9 mg) e Pd/C 10 % (0,02 mmol; 21,3 mg) em isopropanol (1,5 mL) foi adicionado uma solução de formato de amônio (2 mmol, 126 mg) em água (0,2 mL). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. Após este período, a mistura reacional foi filtrada em celite e o solvente foi concentrado sob pressão reduzida. Em seguida, a mistura reacional bruta foi diluída em DCM anidro (1,0 mL) e adicionou-se trietilamina anidra (0,43 mmol; 0,6 mL). A mistura reacional foi resfriada utilizando banho de gelo e, em

seguida, adicionou-se o respectivo cloroformiato (0,35 mmol) ou dicarbonato de di-*tert*-butila (1 mmol, 0,23 mL) gota a gota. O banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Após este período, foram adicionados 5 mL de água e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura e a água residual foi removida através da adição de Na₂SO₄. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi então purificado por cromatografia flash automatizada empregando um gradiente de 0-50 % de AcOEt em hexano como eluente para fornecer as marinoquinolinas correspondentes (**96-98**).

***N*-etil-*N*-(4-{7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de *tert*-butila (96)**



Obtido a partir do dicarbonato de di-*tert*-butila como um sólido amarelo em 44 % de rendimento (36,7 mg).

R_f 0,49 (40 % de AcOEt em Hex.).

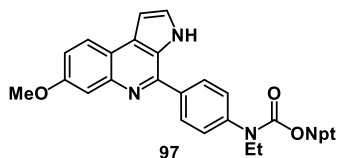
PF 62-63 °C.

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,79 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,60 (t, *J* = 2,9 Hz, 1H), 7,50 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,22 (dd, *J* = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,15 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,72 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,14 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN ¹³C (63 MHz, DMSO) δ 157,6; 153,4; 145,4; 143,5; 142,8; 135,4; 129,5; 128,9; 128,4; 126,6; 125,9; 124,1; 117,2; 117,0; 108,7; 100,6; 79,6; 55,2; 44,4; 28,0; 13,7.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₂₅H₂₈N₃O₃⁺ [*M*+ *H*]⁺: 418,21252, encontrado: 418,21183.

***N*-etil-*N*-(4-{7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de neopentila (97)**



Obtido a partir do cloroformato de neopentila (53 μL) como uma goma amarela em 41 % de rendimento (28,2 mg).

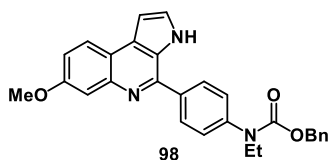
R_f 0,52 (40 % de AcOEt em Hex.).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,81 (s, 1H), 8,22 (dd, J = 8,9, 1,9 Hz, 1H), 8,07 (dd, J = 8,5, 1,9 Hz, 2H), 7,61 (q, J = 2,5 Hz, 1H), 7,56 – 7,44 (m, 3H), 7,23 (dt, J = 8,9, 2,3 Hz, 1H), 7,16 (dd, J = 2,9, 1,6 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,84 – 3,69 (m, 4H), 1,17 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 0,86 (s, 9H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO) δ 157,6; 154,5; 145,3; 143,5; 142,3; 136,0; 129,6; 129,0; 128,5; 127,0; 125,9; 124,1; 117,2; 117,1; 108,7; 100,6; 74,3; 55,2; 44,7; 31,3; 26,2; 13,7.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 432,22817, encontrado: 432,22696.

***N*-etil-*N*-(4-{7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)carbamato de benzila (98)**



Obtido a partir do cloroformato de benzila (49 μL) como uma goma amarela em 29 % de rendimento (26,2 mg).

R_f 0,48 (45 % de AcOEt em Hex.).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,72 (s, 1H), 10,05 (s, 1H), 8,19 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,58 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 7,50 – 7,32 (m, 7H), 7,20 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 2,9, 1,5 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 3,90 (s, 3H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO- d_6) δ 157,7; 154,3; 145,2; 143,2; 142,2; 136,7; 130,3; 129,7; 129,7; 129,2; 128,4; 127,8; 127,5; 127,1; 125,8; 124,2; 117,2; 117,1; 108,5; 100,7; 66,5; 55,2; 44,9; 13,5.

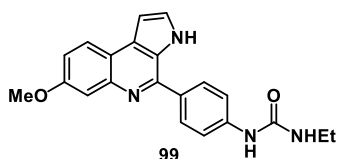
HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 452,19687, encontrado: 452,19567.

6.7. Procedimento geral para síntese de marinoquinolinas contendo grupos ureias alquílicas (99-102)

A uma solução contendo a anilina **A3** (0,20 mmol; 57,9 mg) em DCM anidro (1,0 mL) em banho de gelo foi adicionado o respectivo isocianato (0,24 mmol, 1,2 equiv.). O banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi agitada à temperatura

ambiente durante a noite. Após este período, o solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o material bruto foi então purificado por cromatografia flash usando um gradiente de 30-80 % de AcOEt em hexano como eluente, seguida de uma HPLC semi-preparativo em fase reversa (5-100 % de ACN em H₂O com 0,1 % de TFA) para fornecer as marinoquinolinas correspondentes (**99-71**).

3-Etil-1-(4-{7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il}fenil)urea (**99**)



Obtido a partir do isocianato de etila (19 μ L) como uma goma amarela em 24 % de rendimento (17,4 mg).

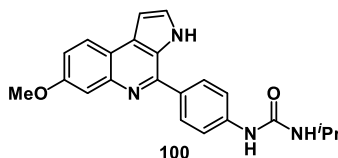
R_f 0,52 (80 % de AcOEt em Hex.).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,83 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 8,26 – 8,14 (m, 3H), 7,74 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,63 (t, *J* = 2,8 Hz, 1H), 7,51 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,23 (dd, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 1H), 7,16 (s, 1H), 6,29 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,61 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,28 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

RMN ¹³C (63 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,0; 155,5; 146,4; 143,9; 142,1; 129,8; 129,6; 128,7; 126,3; 124,5; 117,8; 117,4; 117,0; 112,6; 109,0; 101,0; 55,6; 34,4; 15,9.

HRMS (ESI+) *m/z* calcd. para C₂₁H₂₁N₄O₂⁺ [M+ H]⁺: 361,16590, encontrado: 361,16505.

1-(4-{7-Metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il}fenil)-3-(propan-2-il)urea (**100**)



Obtido a partir do isocianato de isopropila (24 μ L) como uma goma amarela em 27 % de rendimento (20,2 mg).

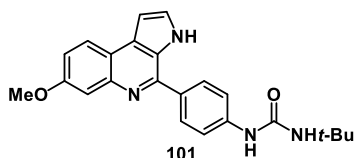
R_f 0,43 (70 % de AcOEt em Hex.).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,71 (s, 1H), 9,92 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,97 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,69 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,57 (t, *J* = 2,8 Hz, 1H), 7,47 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,19 (dd, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, *J* = 2,9, 1,5 Hz, 1H), 5,50 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,67 – 3,56 (m, 1H), 0,99 (d, *J* = 6,5 Hz, 6H).

RMN ¹³C (63 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,0; 154,5; 146,2; 143,9; 140,5; 132,7; 129,8; 129,6; 128,8; 126,3; 124,5; 118,5; 117,5; 117,2; 109,1; 101,0; 55,6; 52,2; 23,7.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{22}H_{23}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$: 375,18155, encontrado: 375,17846.

3-*Terc*-butil-1-(4-{7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)urea (101)



Obtido a partir do isocianato de *terc*-butila (27 μ L) como uma goma amarela em 47 % de rendimento (36,5 mg).

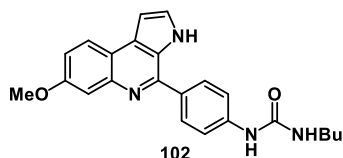
R_f 0,52 (80 % de AcOEt em Hex.).

RMN 1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,68 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,18 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,95 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,93 – 7,91 (m, 1H), 7,63 – 7,59 (m, 1H), 7,58 – 7,56 (m, 1H), 7,48 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,18 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,11 (dd, J = 2,9, 1,5 Hz, 1H), 6,08 (s, 1H), 3,90 (s, 3H), 1,33 (s, 9H),

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO- d_6) δ 157,5; 154,3; 146,0; 143,5; 141,6; 130,6; 129,3; 129,1; 128,1; 125,9; 124,0; 117,1; 117,0; 116,5; 108,6; 100,5; 55,1; 49,5; 29,0.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{23}H_{25}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$: 389,19720, encontrado: 389,19639.

3-Butil-1-(4-{7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il}fenil)urea (102)



Obtido a partir do isocianato de butila (27 μ L) como uma goma amarela em 60 % de rendimento (46,6 mg).

R_f 0,45 (70 % de AcOEt em Hex.).

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,69 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,18 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,94 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,62 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,57 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,18 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 6,22 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,12 (q, J = 6,5 Hz, 2H), 1,49 – 1,41 (m, 2H), 1,38 – 1,30 (m, 3H), 0,91 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 157,6; 155,1; 145,9; 143,5; 141,6; 130,7; 129,3; 129,1; 128,2; 125,8; 124,0; 117,3; 117,0; 116,5; 108,6; 100,5; 55,2; 38,7; 31,8; 19,5; 13,7.

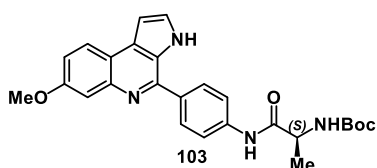
HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{23}H_{25}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$: 389,19720, encontrado: 389,19662.

6.8. Procedimentos gerais para obtenção das marinoquinolinas contendo os grupos α -aminoamidas (103-120)

Procedimento geral para o formação do grupo amida (103-110)

A uma solução contendo o respectivo *N*-Boc-aminoácido (0,3 mmol), a anilina **A3** (0,2 mmol, 57,9 mg) e DIPEA (1,15 mmol, 0,2 mL) em DMF anidro (1,0 mL) foi adicionado HATU (0,24 mmol, 91,3 mg). A mistura foi agitada a 50 °C durante 4 h. Após este período, foram adicionados 20 mL de água e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura e a água residual foi removida através da adição de Na₂SO₄. O solvente foi concentrado sob pressão reduzida e o produto bruto foi então purificado por cromatografia flash usando uma mistura de 50% de AcOEt em hexano ou 0-5 % de MeOH em DCM como eluente para fornecer as marinoquinolinas correspondentes 103-110.

(*S*)-(1-((4-(7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamato *terc*-butílico (103).



Obtido a partir de *N*-Boc-L-Ala-OH (56,8 mg) como uma goma amarela em 83 % de rendimento (76,5 mg).

R_f 0,53 (20 % de AcOEt em Hex.).

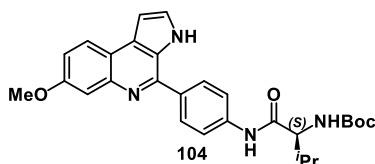
[α]_D²⁰ – 37 (1,0; MeOH).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,75 (s, 1H), 10,17 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,61 (t, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,50 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 1H), 7,14 (s, 1H), 4,28 – 4,08 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 1,40 (s, 9H), 1,31 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN ¹³C (63 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,2; 157,7; 155,3; 145,6; 143,2; 140,0; 129,6; 129,2; 125,9; 124,2; 119,1; 117,1; 116,9; 108,5; 100,7; 79,2; 78,1; 55,2; 50,6; 28,2; 18,0.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₂₆H₂₉N₄O₄⁺ [*M* + *H*]⁺: 461,21833, encontrado: 461,21836. **Pureza** 91 %.

(S)-(1-((4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato *terc*-butílico (104).



Obtido a partir de *N*-Boc-L-Val-OH (65,2 mg) como uma goma amarela em 91 % de rendimento (88,9 mg).

R_f 0,52 (60 % of AcOEt em hex.).

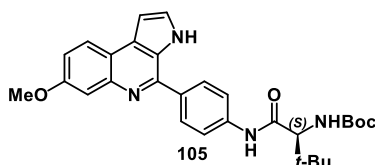
[α]_D²⁰ – 14 (1,0; MeOH).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,76 (s, 1H), 10,24 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,61 (s, 1H), 7,49 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,9, 2,2 Hz, 1H), 7,14 (s, 1H), 6,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 3,99 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 2,13 – 1,95 (m, 1H), 1,41 (s, 9H), 0,94 (d, *J* = 6,5 Hz, 6H).

RMN ¹³C (63 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171,1; 157,7; 155,7; 145,6; 143,2; 139,8; 132,8; 129,7; 129,3; 128,8; 125,9; 124,2; 119,2; 117,1; 116,9; 108,4; 100,7; 78,2; 60,8; 55,2; 28,2; 19,3; 18,6.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₂₈H₃₃N₄O₄⁺ [*M* + H]⁺: 489,24963, encontrado: 489,24954.

(S)-(1-((4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)amino)-3,3-dimetil-1-oxobutan-2-il)carbamato *terc*-butílico (105).



Obtido a partir de *N*-Boc-L-Tle-OH (69,4 mg) como uma goma amarela em 68 % de rendimento (68,4 mg).

R_f 0,57 (50 % AcOEt em hex.).

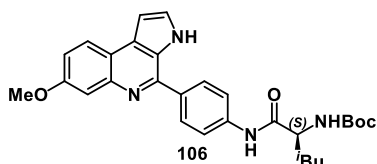
[α]_D²⁰ – 14 (1,0; MeOH).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,73 (s, 1H), 10,26 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,88 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,58 (t, *J* = 2,7 Hz, 1H), 7,50 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 6,70 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,15 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,01 (s, 9H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO- d_6) δ 170,0; 157,6; 155,6; 145,8; 143,6; 139,5; 133,3; 129,5; 129,2; 128,3; 126,0; 124,1; 119,3; 117,2; 116,8; 108,7; 100,6; 78,3; 62,7; 55,2; 34,3; 28,2; 26,6.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 503,26528, encontrado: 503,26528.

(S)-(1-((4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)carbamato *tert*-butílico (106).



Obtido a partir de *N*-Boc-L-Leu-OH (69,4 mg) como uma goma amarela em 91 % de rendimento (91,5 mg).

R_f 0,47 (50 % AcOEt em hex.).

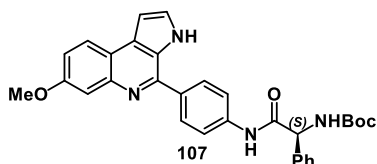
$[\alpha]_D^{20}$ – 22 (1,0; MeOH).

RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 11,72 (s, 1H), 10,21 (s, 1H), 8,19 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,86 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,59 (t, J = 2,8 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,20 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 2,7, 1,5 Hz, 1H), 7,09 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 4,24 – 4,15 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 1,76 – 1,47 (m, 3H), 1,40 (s, 9H), 0,93 (dd, J = 6,3, 1,0 Hz, 6H).

RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO- d_6) δ 172,2; 157,6; 155,6; 145,7; 143,5; 139,9; 133,0; 129,5; 129,2; 128,4; 126,0; 124,1; 119,2; 117,2; 116,8; 108,7; 100,6; 78,1; 55,2; 53,7; 28,2; 24,4; 23,0; 21,6.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 503,26528, encontrado: 503,26487.

(S)-(2-((4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)amino)-2-oxo-1-feniletil)carbamato *tert*-butílico (107).



Obtido a partir de *N*-Boc-L-Phg-OH (75,4 mg) como uma goma amarela em 88 % de rendimento (92,0 mg).

R_f 0,52 (40 % AcOEt em hex.).

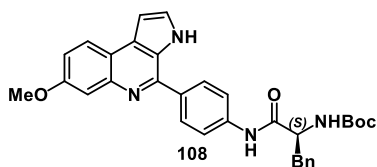
$[\alpha]_D^{20} + 6$ (1,0; MeOH).

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,69 (s, 1H), 10,49 (s, 1H), 8,19 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 8,00 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,83 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,58 (t, $J = 2,7$ Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,49 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,39 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,32 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,20 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1H), 7,12 (dd, $J = 2,5, 1,7$ Hz, 1H), 5,43 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 1,41 (s, 9H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169,4; 157,6; 155,2; 145,6; 143,5; 139,6; 138,0; 133,3; 129,5; 129,2; 128,5; 128,4; 127,9; 127,5; 126,0; 124,1; 119,1; 117,2; 116,9; 108,7; 100,6; 78,5; 55,2; 38,3; 28,2.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 523,23398, encontrado: 523,23373.

(S)-(1-((4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato *terc*-butílico (108).



Obtido a partir de *N*-Boc-L-Phe-OH (79,6 mg) como uma goma amarela em 60 % de rendimento (64,4 mg).

R_f 0,55 (40 % AcOEt em hex.).

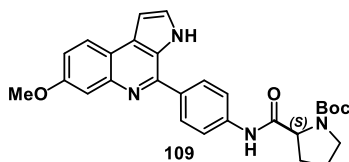
$[\alpha]_D^{20} + 48$ (1,0; MeOH).

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (mistura de rotâmeros) δ 11,73 (s, 1H), 10,25 (10,22) (s, 1H), 8,20 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 8,02 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,84 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,60 (t, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,36 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,23 – 7,19 (m, 2H), 7,17 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,15 – 7,11 (m, 1H), 4,42 – 4,38 (4,28 – 4,24) (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,05 (dd, $J = 13,7, 4,6$ Hz, 1H), 2,90 (dd, $J = 13,4, 10,2$ Hz, 1H), 1,34 (s, 9H).

RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 171,1; 157,6; 155,5; 145,7; 143,5; 139,8; 137,9; 133,1; 129,5; 129,3; 129,2; 128,4; 128,1; 126,4; 125,9; 124,1; 119,2; 117,1; 116,8; 108,7; 100,6; 78,2; 56,7; 55,2; 37,5; 28,2.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 537,24963, encontrado: 537,24963.

(S)-2-((4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)carbamoil)pirrolidina carboxilato de *terc*-butila (109).



Obtido a partir de *N*-Boc-L-Pro-OH (64,6 mg) como uma goma amarela em 86 % de rendimento (83,7 mg).

R_f 0.48 (85 % of AcOEt in hex.).

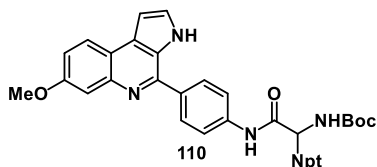
[α]_D²⁰ – 22 (1,0; MeOH).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) (mistura de rotâmeros 35:65) δ 11,80 (brs, 1H), 10,52 (brs, 0,61H), 10,49 (brs, 0,32H), 8,19 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,02 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,59 (t, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,48 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,19 (dd, *J* = 8,9, 2,5 Hz, 1H), 7,12 (s, 1H), 4,40 – 4,33 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,49 – 3,32 (m, 2H + H₂O), 2,36 – 2,13 (m, 1H), 2,00 – 1,75 (m, 3H), 1,41 (s, 3,13H), 1,31 (s, 5,86H),

RMN ¹³C (63 MHz, DMSO-*d*₆) (mistura de rotâmeros 35:65) δ 171,9 (171,4); 157,8; 153,2 (153,7); 145,4; 142,9; 140,2; 132,4 (132,3); 129,8; 129,3 (129,1); 125,8 (125,9); 124,2; 119,2 (119,1); 117,0 (116,9); 108,2; 100,8; 78,6 (78,7); 60,5 (60,1); 55,2; 46,6 (46,8); 31,1; 30,3; 28,0 (28,2); 24,0; 23,5.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₂₈H₃₁N₄O₄⁺ [*M* + *H*]⁺: 487,23398, encontrado: 487,23398.

(4-((4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)amino)-4,4-dimetil-1-oxopentan-2-il)carbamato *terc*-butílico (110).



Obtido a partir de *N*-Boc-NptGli-OH (73,3 mg) como uma goma amarela em 58 % de rendimento (59,9 mg).

R_f 0,48 (50 % de AcOEt em hex.).

RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,71 (s, 1H), 10,16 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,58 (t, *J* = 2,8 Hz, 1H), 7,48 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, *J* = 2,9, 1,6 Hz, 1H), 7,05 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 4,24 (q, *J* = 7,3 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 1,38 (d, *J* = 6,5 Hz, 11H), 0,96 (s, 9H).

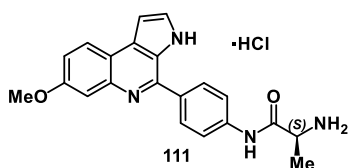
RMN ^{13}C (63 MHz, DMSO- d_6) δ 172,3; 157,6; 155,1; 145,7; 143,5; 139,9; 133,1; 129,4; 129,1; 128,3; 125,9; 124,9; 119,3; 117,1; 116,8; 108,7; 100,6; 78,2; 55,2; 53,0; 30,4; 30,3; 29,6; 28,2.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 517,28093, encontrado: 517,28128.

Procedimento geral para remoção do grupo Boc (111-120)

Cloreto de acetila recém-destilado (0,5 mmol, 36 μL) foi adicionado gota a gota a um vial com MeOH anidro (0,3 mL) em banho de gelo e a solução foi mantida sob agitação por 5 min. Uma solução do carbamato correspondente (**103-110**) (0,1 mmol) em metanol anidro (0,5 mL) foi então adicionada em gota a gota. A mistura foi deixada atingir a temperatura ambiente e mantida sob agitação durante 24 horas. Após este tempo, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi então solubilizado em metanol e o composto final precipitado após adição de éter dietílico. O precipitado foi então lavado novamente com éter etílico e o solvente residual removido em alto vácuo para fornecer os hidrocloreto correspondentes (**111-120**).

Hidrocloreto de (S)-2-amino-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)propanamida (**111**).



Obtido a partir da marinoquinolina **103** (46,1 mg) como um sólido amarelo em 46 % de rendimento (18,3 mg).

PF 258-259 $^{\circ}\text{C}$.

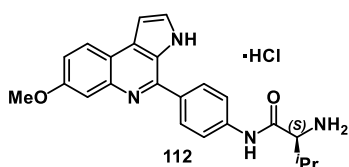
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 27$ (0,1; MeOH).

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) δ 8,44 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 8,18 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 8,05 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,63 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,48 (dd, $J = 9,1$, 2,4 Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 4,24 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,02 (s, 3H), 1,68 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (126 MHz, MeOD) δ 168,59; 161,2; 142,0; 141,9; 138,6; 135,6; 134,9; 131,1; 130,4; 125,5; 124,9; 120,3; 119,7; 116,1; 102,9; 99,8; 55,1; 49,7; 16,3.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{21}H_{21}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$: 361,1659, encontrado: 361,1661.

Hidrocloridrato de (S)-2-amino-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)-3-metilbutanamida (112).



Obtido a partir da marinoquinolina **104** (48,9 mg) como um sólido amarelo em 54 % de rendimento (23,0 mg).

PF 256-258 °C.

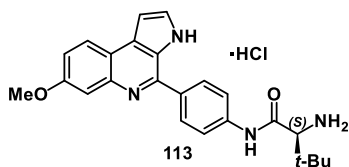
$[\alpha]_D^{20} + 50$ (0,1; MeOH).

RMN 1H (500 MHz, MeOD) δ 8,38 (dd, $J = 9,0, 3,0$ Hz, 1H), 8,17 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 8,13 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 8,04 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,65 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,45 – 7,40 (m, 1H), 7,39 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 4,07 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 3,99 (s, 3H), 2,42 (dp, $J = 13,5, 6,7$ Hz, 1H), 1,19 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,15 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (126 MHz, MeOD) δ 168,8; 162,4; 143,1; 143,1; 140,0; 136,8; 136,2; 131,8; 126,8; 126,2; 126,1; 121,7; 121,0; 117,4; 104,2; 101,2; 60,4; 56,5; 31,8; 19,1; 17,9.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $C_{23}H_{25}N_4O_2^+$ $[M+H]^+$: 389,19720, encontrado: 389,19695.

Hidrocloridrato de (S)-2-amino-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)-3,3-dimetilbutanamida (113).



Obtido a partir da marinoquinolina **105** (50,3 mg) como um sólido amarelo em 44 % de rendimento (19,3 mg).

PF 272 °C.

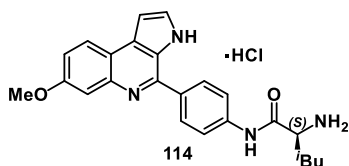
$[\alpha]_D^{20} + 52$ (0,1; MeOH).

RMN 1H (250 MHz, MeOD) δ 8,33 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 8,18 – 8,10 (m, 3H), 8,03 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,38 (dd, $J = 9,8, 2,4$ Hz, 2H), 4,01 (s, 1H), 3,97 (s, 3H), 1,22 (s, 9H),

RMN ^{13}C (63 MHz, MeOD) δ 168,2; 162,4; 143,0; 142,9; 140,0; 136,8; 136,1; 131,8; 126,8; 126,2; 126,0; 121,8; 121,0; 117,3; 104,2; 101,1; 63,4; 56,5; 34,8; 26,8.

HRMS (ESI⁺) m/z calcd. para C₂₄H₂₇N₄O₂⁺ [M⁺ H]⁺: 403,21285, encontrado: 403,21268.

Hidrocloridrato de (S)-2-amino-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrolo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)-4-metilpentanamida (114).



Obtido a partir da marinoquinolina **106** (50,3 mg) como um sólido amarelo em 45 % de rendimento (19,8 mg).

PF 259-260 °C.

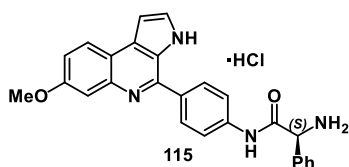
[α]_D²⁰ + 28 (0,1; MeOH).

RMN ¹H (500 MHz, MeOD) δ 8,41 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,18 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 8,13 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 8,05 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,64 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,45 (dd, *J* = 9,1, 2,4 Hz, 1H), 7,42 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 4,22 (dd, *J* = 8,0, 6,2 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H), 1,95 – 1,78 (m, 3H), 1,08 (dd, *J* = 6,4, 3,3 Hz, 6H).

RMN ¹³C (126 MHz, MeOD) δ 169,8; 162,5; 143,2; 143,2; 140,0; 136,9; 136,3; 131,8; 126,9; 126,3; 126,2; 121,8; 121,0; 117,4; 104,2; 101,2; 56,5; 53,9; 41,7; 25,6; 23,3; 22,1.

HRMS (ESI⁺) m/z calcd. para C₂₄H₂₇N₄O₂⁺ [M⁺ H]⁺: 403,21285, encontrado: 403,21289.

Hidrocloridrato de (S)-2-amino-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrolo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)-2-fenilacetamida (115).



Obtida a partir da marinoquinolina **107** (52,3 mg) como um sólido amarelo em 51 % de rendimento (21,6 mg).

PF 294 °C.

[α]_D²⁰ + 16 (1,0; MeOH).

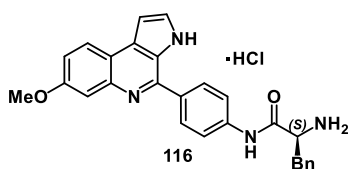
RMN ¹H (500 MHz, MeOD) δ 8,37 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,15 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 8,07 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 8,00 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,71 (m, 2H), 7,62 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H),

7,57 – 7,49 (m, 3H), 7,42 (dd, $J = 9,0, 2,4$ Hz, 1H), 7,38 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 5,33 (s, 1H), 3,99 (s, 3H).

RMN ^{13}C (126 MHz, MeOD) δ 167,8; 162,4; 143,3; 143,2; 139,9; 136,8; 136,3; 134,0; 131,7; 131,3; 130,6; 129,5; 126,8; 126,3; 126,1; 121,6; 121,0; 117,4; 104,2; 101,3; 58,5; 56,5.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 423,18155, encontrado: 423,18178.

Hidrocloridrato de (S)-2-amino-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)-3-fenilpropanamida (116).



Obtida a partir da marinoquinolina **108** (53,7 mg) como um sólido amarelo em 48 % de rendimento (22,7 mg).

PF 272-273 °C.

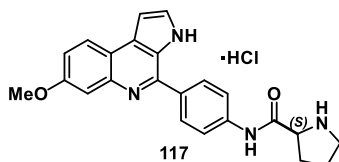
$[\alpha]_D^{20}$ + 96 (0,1; MeOH).

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) δ 8,46 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 8,18 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 8,06 – 7,99 (m, 4H), 7,63 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,50 (dd, $J = 9,1, 2,4$ Hz, 1H), 7,45 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,39 – 7,29 (m, 5H), 4,38 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 4,03 (s, 3H), 3,38 (dd, $J = 13,9, 6,9$ Hz, 1H), 3,24 (dd, $J = 13,9, 7,8$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (126 MHz, MeOD) δ 167,2; 161,2; 141,9; 141,6; 138,6; 135,6; 134,9; 134,0; 130,3; 129,2; 128,8; 127,6; 125,6; 125,1; 124,9; 120,3; 119,7; 116,1; 102,9; 99,8; 55,2; 55,1; 37,4.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 437,1972, encontrado: 437,1962.

Hidrocloridrato de (S)-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrólo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)pirrolidina-2-carboxamida (117).



Obtida a partir da marinoquinolina **109** (48,7 mg) como um sólido amarelo em 47 % de rendimento (19,9 mg).

PF 253-254 °C.

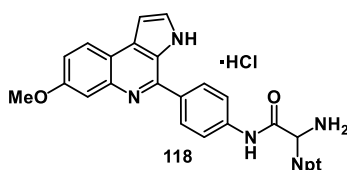
$[\alpha]_D^{20} -3$ (0,1; MeOH).

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) δ 8,44 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 8,19 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 8,10 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 8,05 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,63 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,48 (dd, $J = 9,1$, 2,4 Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 4,60 – 4,55 (m, 1H), 4,02 (s, 3H), 3,55 – 3,42 (m, 2H), 2,69 – 2,61 (m, 1H), 2,24 – 2,13 (m, 3H).

RMN ^{13}C (126 MHz, MeOD) δ 168,6; 162,6; 143,2; 140,0; 137,0; 136,3; 131,8; 126,9; 126,4; 126,2; 121,7; 121,1; 117,5; 104,3; 101,2; 62,0; 56,5; 47,6; 31,1; 25,1.

HRMS (ESI+) m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 387,18155, encontrado: 387,18152.

Hidrocloridrato de 2-amino-*N*-(4-(7-metóxi-3*H*-pirrolo[2,3-*c*]quinolin-4-il)fenil)-4,4-dimetilpentanamida (118).



Obtido a partir da marinoquinolina **110** (51,7 mg) como um sólido amarelo em 38 % de rendimento (16,1 mg).

PF 244-245 °C.

RMN ^1H (250 MHz, MeOD) δ 8,46 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 8,18 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 8,14 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 8,06 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,65 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,49 (dd, $J = 9,0$, 2,4 Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,21 (dd, $J = 8,8$, 4,5 Hz, 1H), 4,03 (s, 3H), 1,08 (s, 9H).

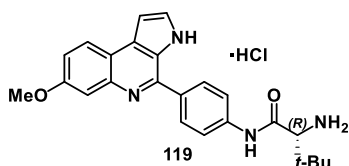
RMN ^{13}C (63 MHz, MeOD) δ 168,5; 161,1; 141,9; 141,6; 138,4; 135,5; 135,1; 130,3; 125,5; 125,3; 124,9; 120,4; 119,6; 116,1; 102,8; 99,9; 65,5; 55,1; 51,9; 44,9; 29,7; 28,5.

Resolução quiral por HPLC analítico do composto **110**, utilizando uma coluna Daicel CHIRALPAK® IB como fase estacionária e 20% de isopropanol em hexano como fase móvel (1,0 mL/min), seguido da etapa de desproteção forneceu (-)-**118** e (+)-**118**.

(-)-**118**: $[\alpha]_D^{20} - 3$ (0,23; MeOH).

(+)-**118**: $[\alpha]_D^{20} + 11$ (0,54; MeOH).

Hidrocloridrato de (R)-2-amino-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrolo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)-3,3-dimetilbutanamida (119).



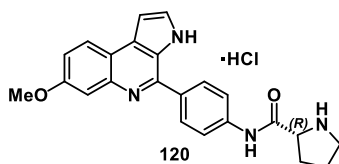
Obtido a partir de (R)-1-((4-(7-metóxi-3H-pirrolo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)amino)-3,3-dimetil-1-oxobutan-2-il)carbamato de *terc*-butila (0,05 mmol, 25,2 mg) como um sólido amarelo em 39 % de rendimento (10,5 mg).

$[\alpha]_D^{20} + 50$ (0,1; MeOH).

RMN ^1H (250 MHz, MeOD) δ 8,33 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 8,19 – 8,09 (m, 3H), 8,03 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,44 – 7,32 (m, 2H), 4,01 (s, 1H), 3,97 (s, 3H), 1,22 (s, 9H).

HRMS (ESI $^+$) m/z calcd. para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 403,21285, encontrado: 403,21147.

Hidrocloridrato de (R)-N-(4-(7-metóxi-3H-pirrolo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)pirrolidina-2-carboxamida (120).



Obtido a partir de (R)-2-((4-(7-metóxi-3H-pirrolo[2,3-c]quinolin-4-il)fenil)carbamoil)pirrolidina-1-carboxylato de *terc*-butila (0,05 mmol, 19,32 mg) como um sólido amarelo em 47 % de rendimento (9,9 mg).

$[\alpha]_D^{20} - 5$ (0,1; MeOH).

RMN ^1H (250 MHz, MeOD) δ 8,48 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 8,19 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 8,12 – 8,08 (m, 4H), 8,07 – 8,01 (m, 2H), 7,62 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,52 (dd, $J = 9,1, 2,5$ Hz, 1H), 7,46 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 4,59 – 4,49 (m, 1H), 4,03 (s, 3H), 3,55 – 3,38 (m, 2H), 2,71 – 2,55 (m, 1H), 2,29 – 2,08 (m, 3H),

HRMS (ESI $^+$) m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 387,18155, encontrado: 387,18093.

Ensaio de inibição SYBR green I para estágio assexuado de *P. falciparum*¹⁰¹

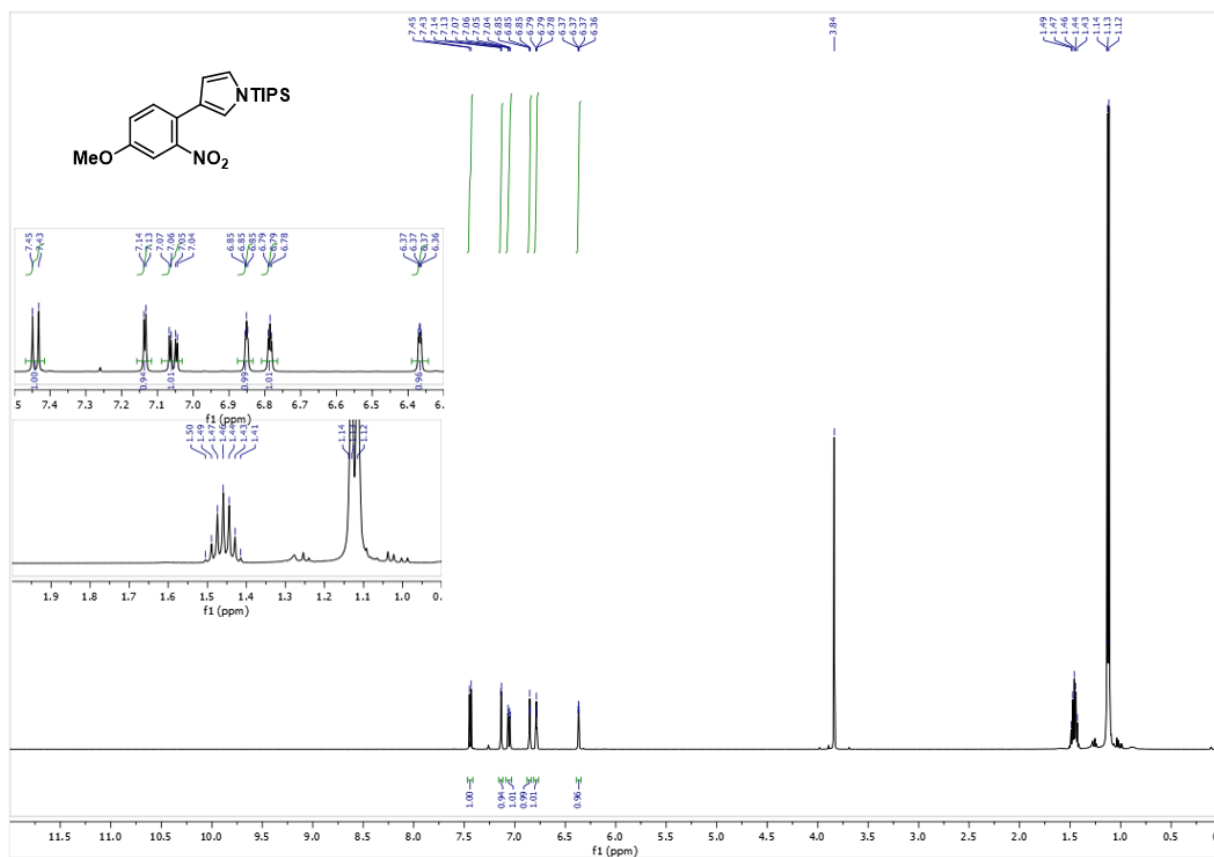
Os parasitos foram sincronizados através do tratamento com D-sorbitol 5% (m/v) estéril durante 5 minutos a 37 °C para enriquecimento dos parasitos em estágio de anel. As culturas de parasito foram peletizadas através de centrifugação a 600 × g por 5 minutos. A parasitemia foi acompanhada diariamente por meio de microscopia de esfregaços corados pelo método de panótico rápido. O cálculo da parasitemia foi feito a partir de 1.000 células, e as culturas foram diluídas a 0,5 % de parasitemia e 2 % de hematócrito através da adição de volumes apropriados de eritrócitos mantidos a um hematócrito de 50% em meio incompleto (meio de cultura sem Albumax II). Uma alíquota de 180 µL de parasitos foi distribuída em placas de 96 poços pré-preparadas com 20 µL de soluções de candidatos a antimaláricos 10× concentrados. Poços de controle negativo correspondentes a eritrócitos não parasitados e a cultivos de parasitos na ausência de antimaláricos foram montados paralelamente. As concentrações de DMSO foram mantidas sempre abaixo de 0,05 %. As placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5 % de CO₂. Após incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram ressuspensas com 100 µL de tampão PBS (NaCl 116 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 3 mM) e lisadas com 100 µL de tampão de lise (Tris-Base 20 mM, EDTA 5 mM, 0,0008 % (v/v) Triton X-100, 0,008 % (m/v) saponina, pH 8.0) adicionado de 0,002 % (v/v) SYBR green I. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min e a fluorescência correspondente à densidade de parasitos foi determinada usando-se um leitor de placas SpectraMAX Gemini EM (excitação a 485 nm e emissão a 535 nm). A concentração inibitória 50 % (CI₅₀) foi determinada por análise de regressão não-linear da curva de crescimento concentração-resposta resultante usando-se o programa *GraphPad Prism*.

6.10. Cultivo de células de hepatocarcinoma e avaliação de citotoxicidade¹⁰²

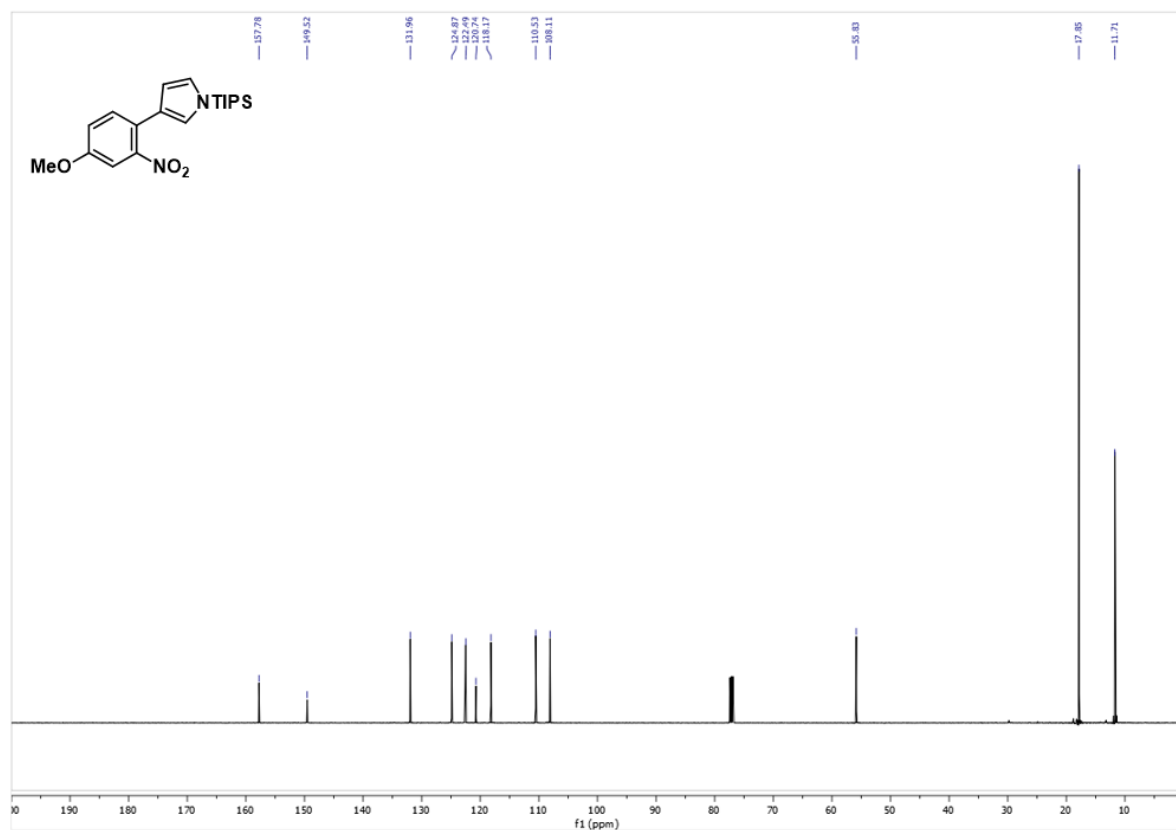
As células de hepatocarcinoma (HepG2) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) e penicilina/estreptomicina 0,2% (v/v). A adição de antibióticos ao meio foi feita visando-se eliminar potenciais interferências de contaminação microbiana. As células foram cultivadas a 37 °C e 5 % CO₂. O meio suplementado foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Para procedimentos experimentais, as células foram transferidas a uma placa de 96 poços a uma concentração de 10.000

células por poço, e incubadas a 37 °C por 24 h para adesão à placa. Procedeu-se à adição de uma diluição seriada dos candidatos a inibidores, com a primeira fileira da placa sendo mantida em ausência de inibidores, correspondendo ao controle positivo de crescimento. As concentrações de DMSO foram mantidas sempre abaixo de 2%. As placas foram incubadas na presença de diferentes concentrações de compostos (400 – 6.25 µM) por 72 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após incubação, a placa foi inspecionada por microscopia, para avaliação da maior concentração a ser considerada (ausência de precipitação do composto avaliado). A citotoxicidade foi avaliada em ensaio colorimétrico baseado na atividade metabólica celular na presença de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Brevemente, enzimas mitocondriais são capazes de converter o corante MTT ao composto insolúvel formazan, de coloração roxa.³⁶ Adicionou-se 20 µL de MTT a 5 mg/mL em cada poço da placa, seguido de 3 a 5 h de incubação a 37 °C. Após incubação, o sobrenadante foi removido, e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de DMSO. A absorbância, proporcional à quantidade de células viáveis, foi determinada no leitor de placas SpectraMAX Plus 384 (λ = 570 nm). A concentração inibitória 50% (IC₅₀HepG2) foi determinada por análise de regressão não-linear da curva de crescimento concentração-resposta resultante usando-se o software *GraphPad Prism*. O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da expressão: $IS = CI_{50}^{HepG2} / CI_{50}^{P3D7}$.

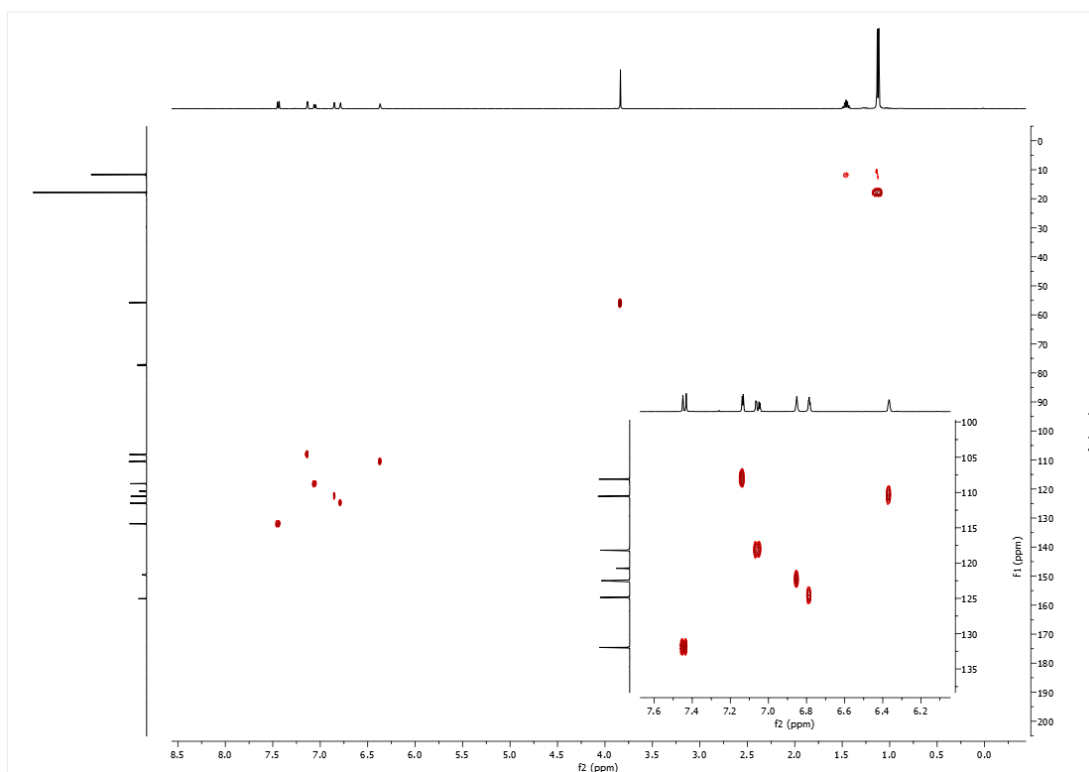
7. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR



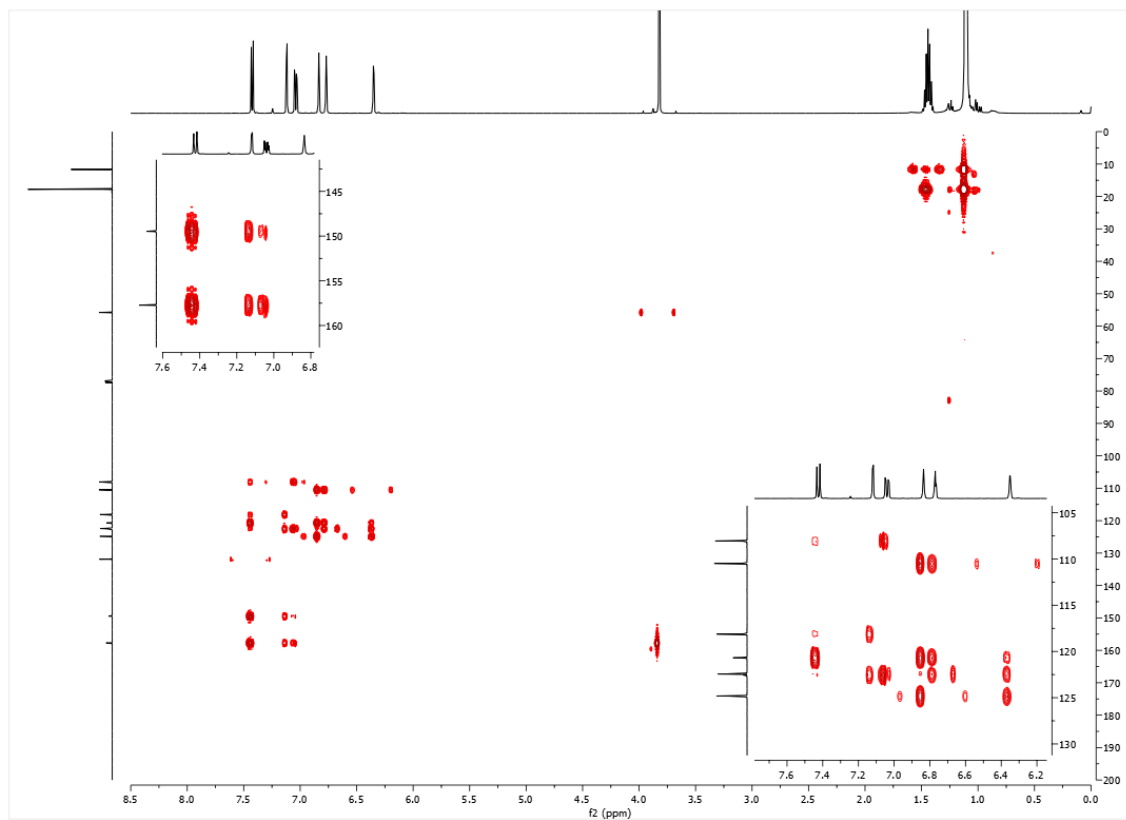
Espectro de RMN de ¹H do composto **78** (500 MHz, CDCl₃).



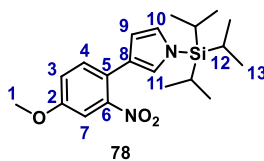
Espectro de RMN de ¹³C do composto **78** (125 MHz, CDCl₃).



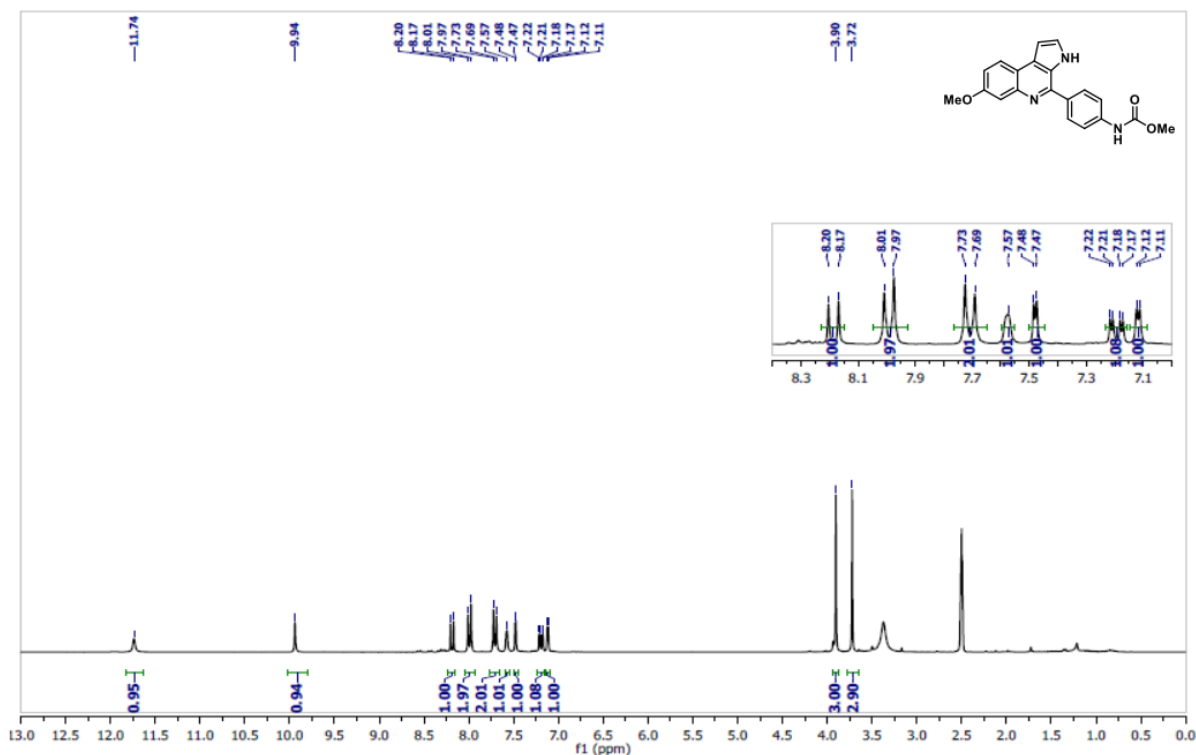
Mapa de contorno de HSQC do composto **78** (500 MHz, CDCl₃).



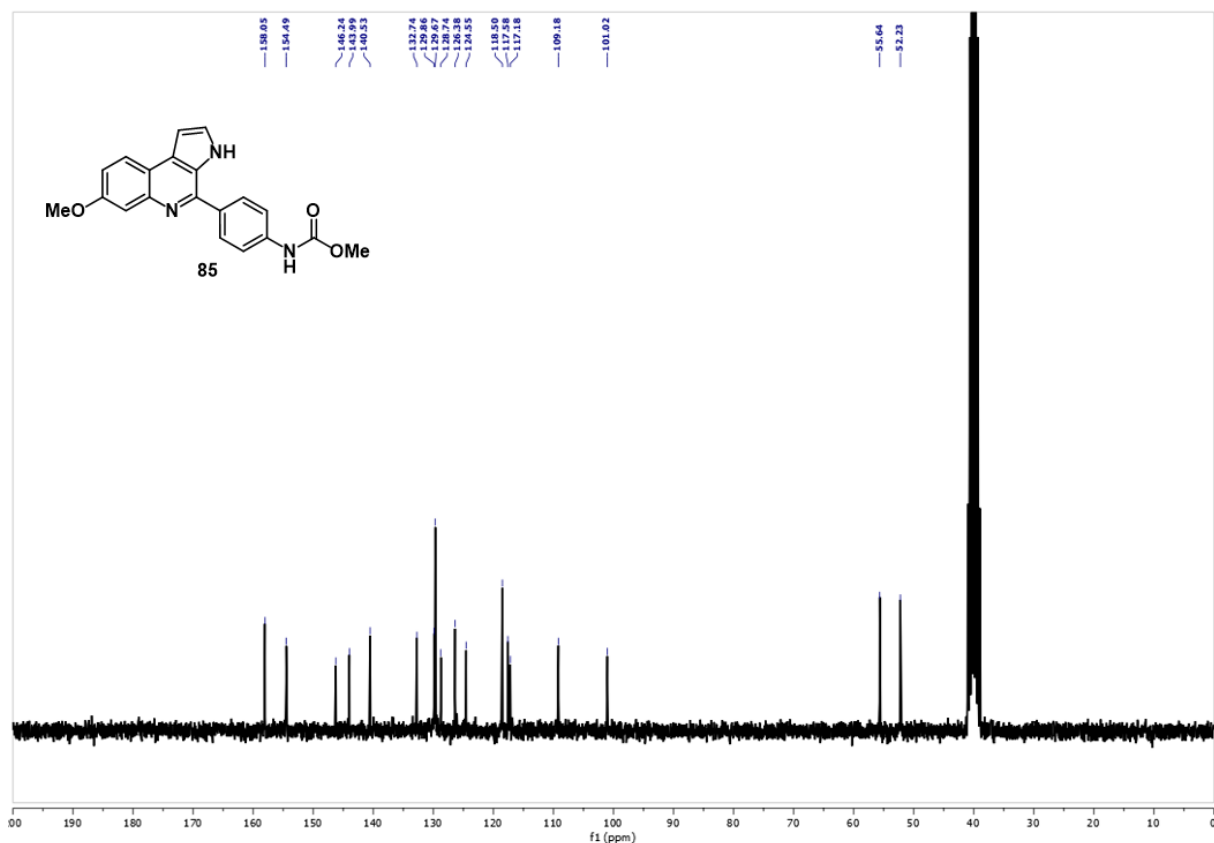
Mapa de contorno de HMBC do composto **78** (500 MHz, CDCl₃).



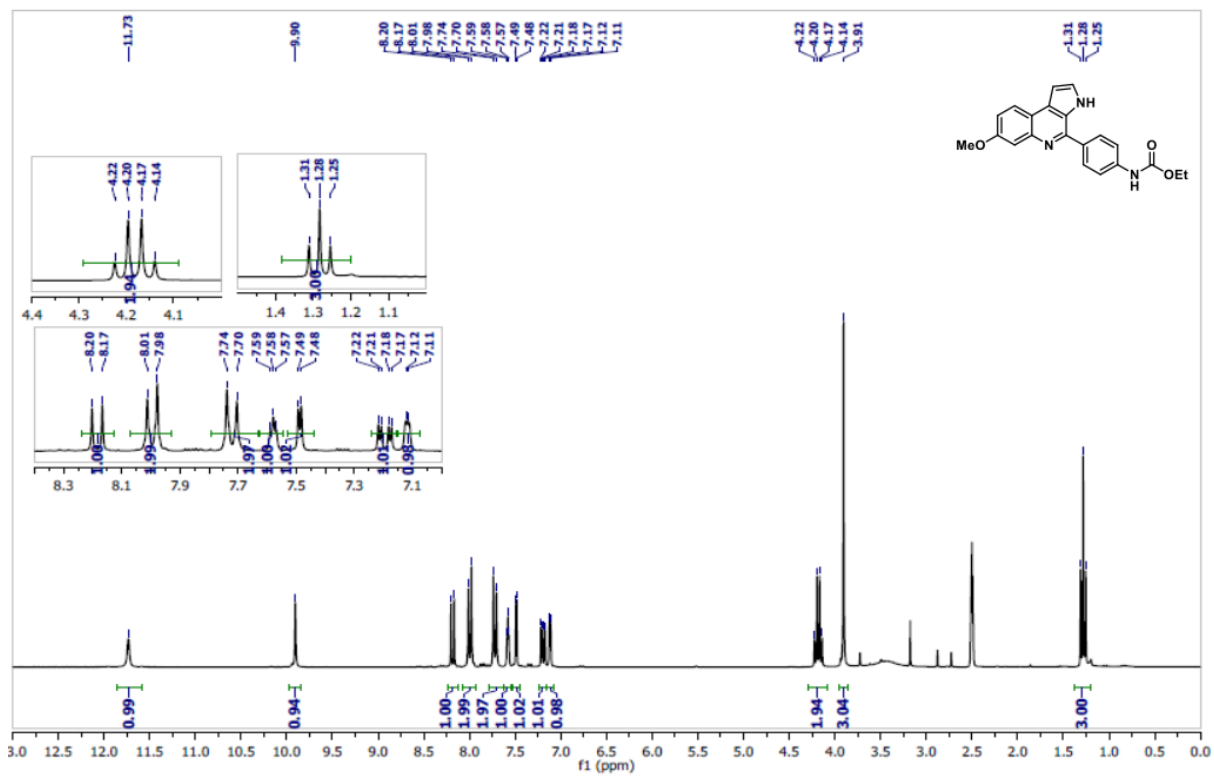
C/H	^1H δ (ppm) (m) (J in Hz)	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$ δ (ppm)	HMBC
1	3,84 (s)	55,83	-
2	-	157,78	H1, H3, H4, H7
3	7,06 (dd, J = 8,6, 2,7 Hz)	118,17	H4
4	7,14 (d, J = 2,7 Hz)	108,11	H3, H7
5	-	120,74	H7, H9, H10, H11
6	-	149,52	H3, H4, H7
7	7,45 (d, J = 8,7 Hz)	131,96	-
8	-	122,60	H3, H4
9	6,38 (dd, J = 2,7, 1,5 Hz)	110,53	H10, H11
10	6,88 – 6,84 (m)	122,49	-
11	6,81 – 6,77 (m)	124,87	H9, H10
12	1,53 – 1,41 (m)	11,71	H13
13	1,13 (d, J = 7,7 Hz)	17,85	H12



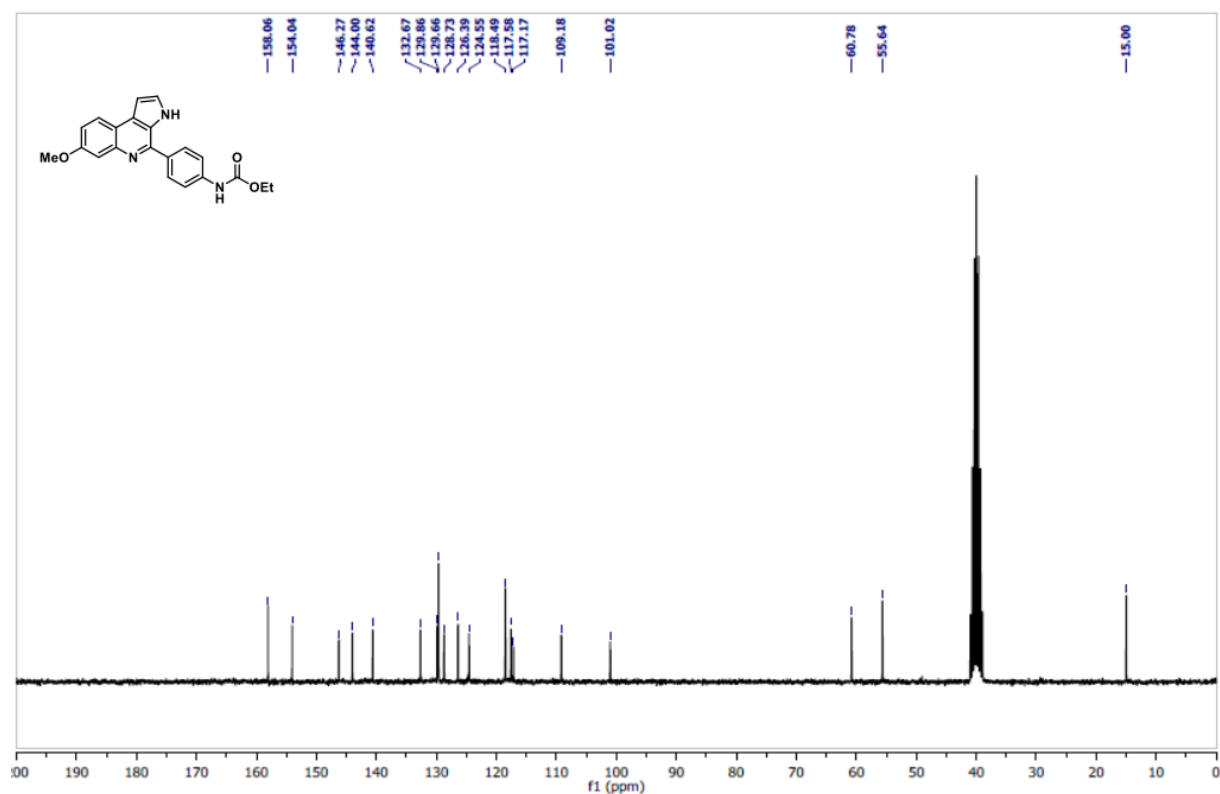
Espectro de RMN de ^1H do composto **85** (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



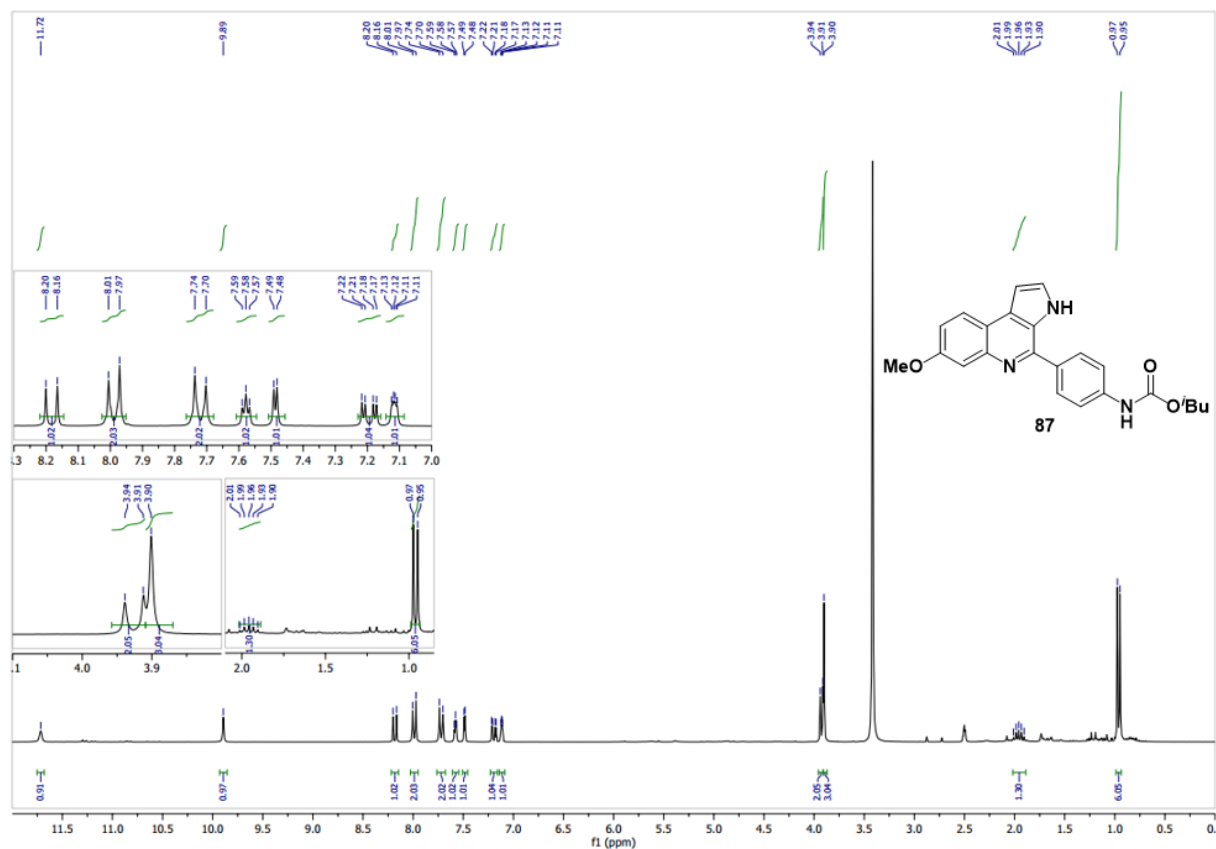
Espectro de RMN de ¹³C do composto **85** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



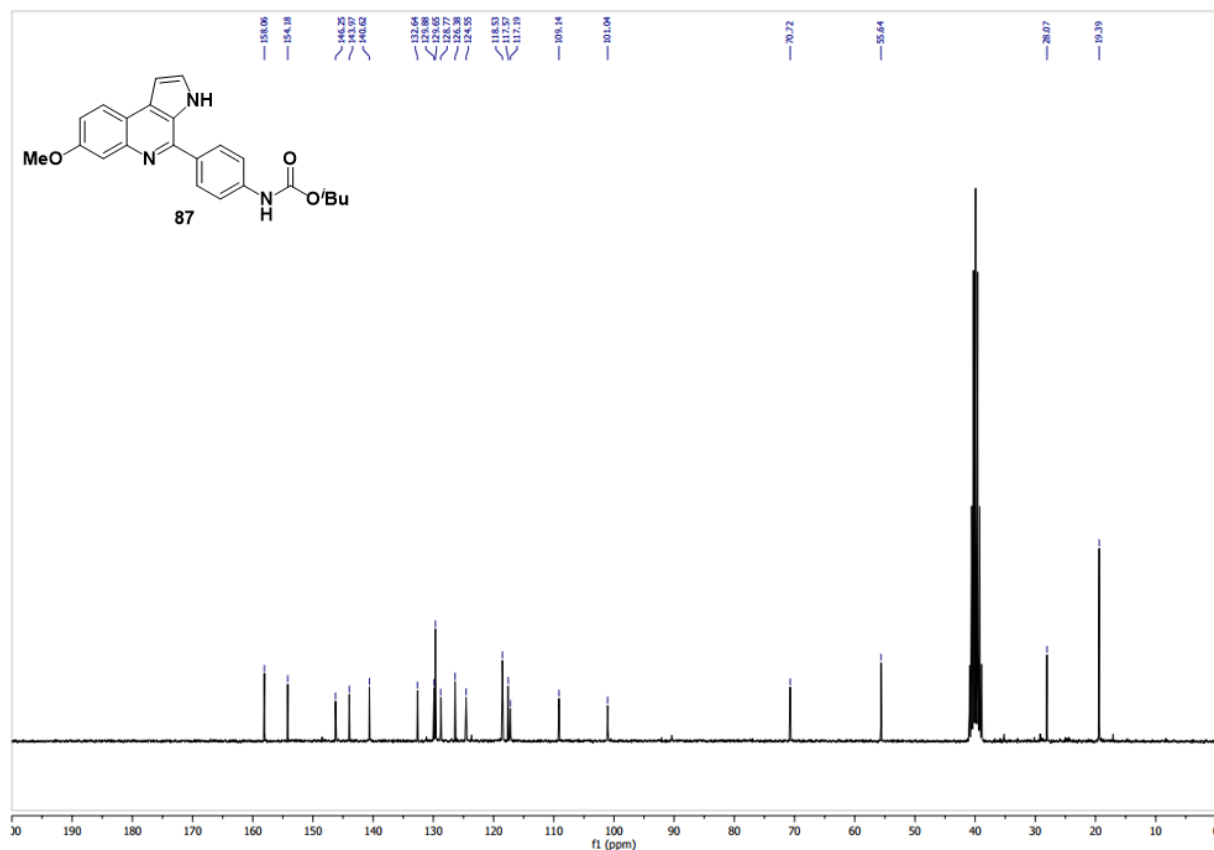
Espectro de RMN de ¹H do composto **86** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



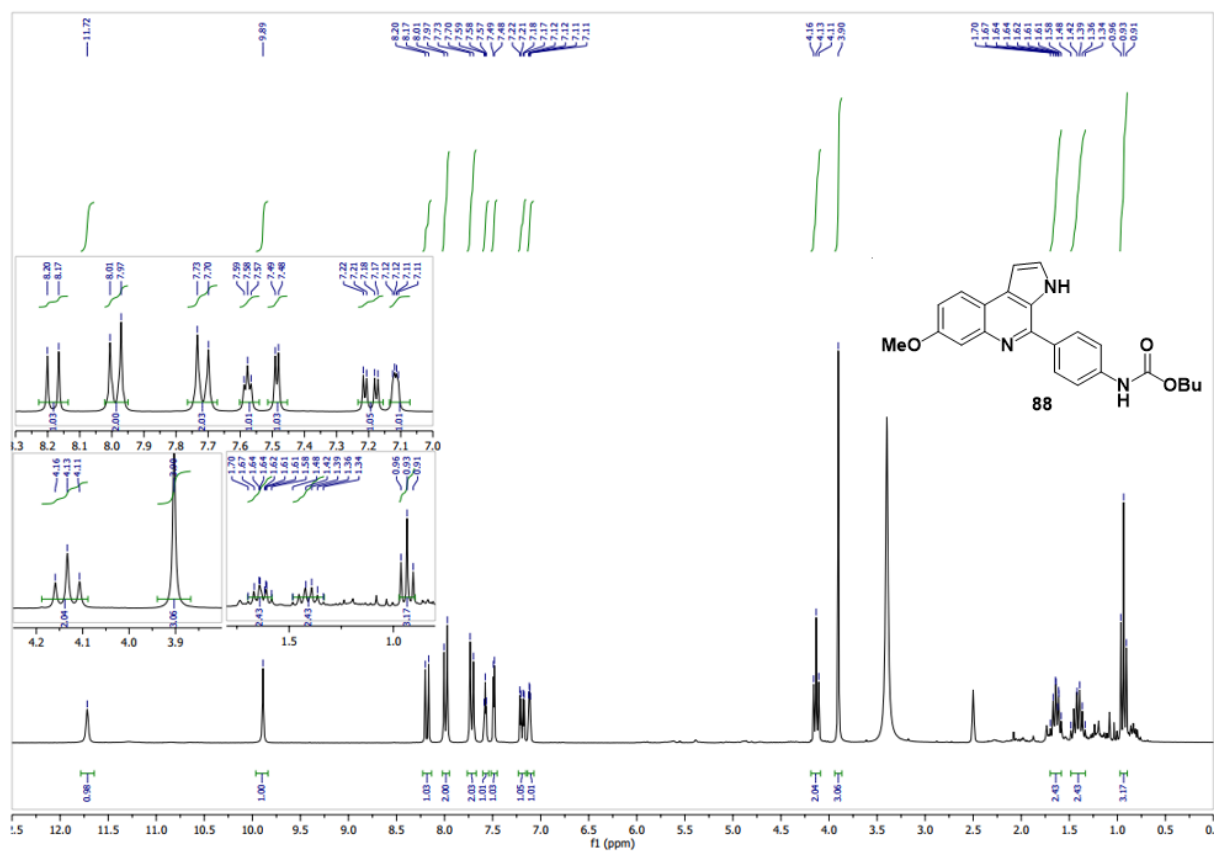
Espectro de RMN de ¹³C do composto **86** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



Espectro de RMN de ¹H do composto **87** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



Espectro de RMN de ¹³C do composto **87** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



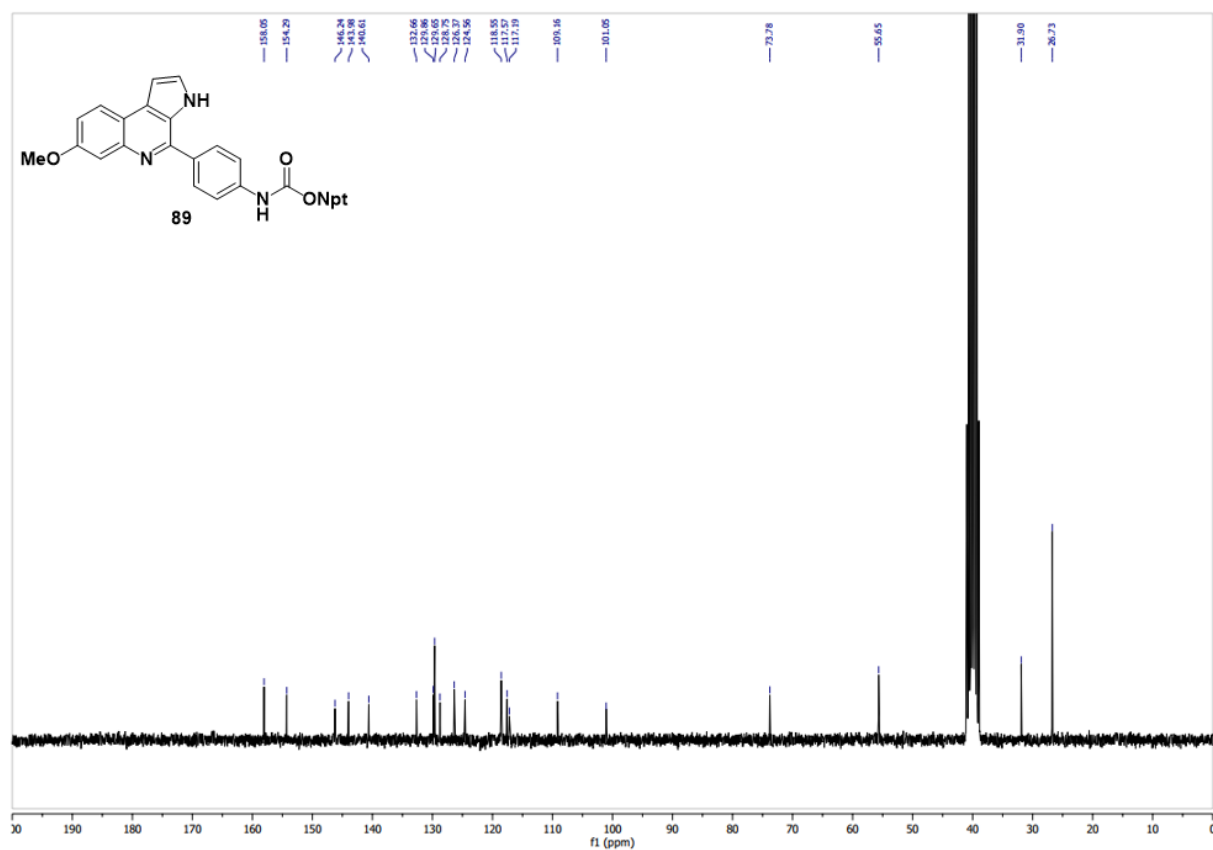
Espectro de RMN de ¹H do composto **88** (250 MHz, DMSO-*d*₆).

Chemical structure of compound 89 is shown above the spectrum. The spectrum displays peaks corresponding to the structure, with chemical shifts (ppm) and integrations indicated.

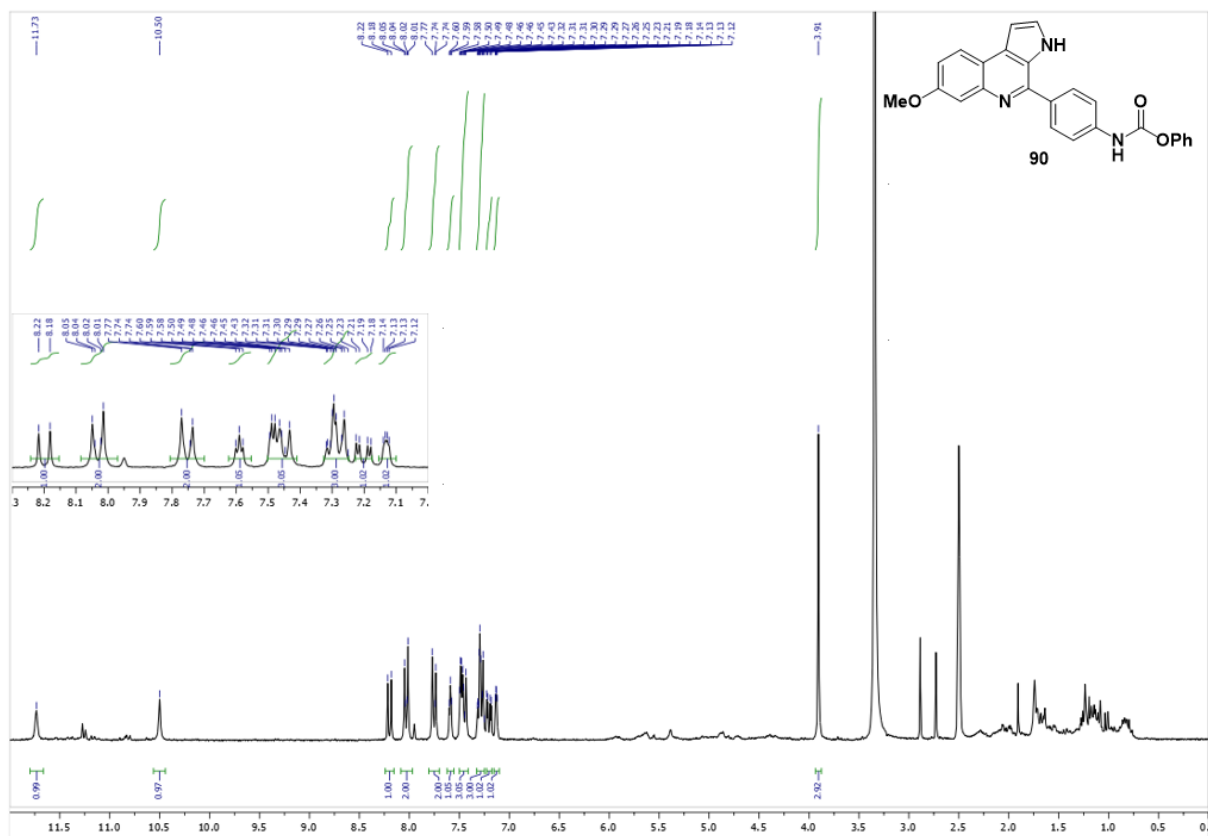
Chemical shifts (ppm) and integrations (from left to right):

- 11.71 (s, 1H, integration 0.00)
- 9.86 (s, 1H, integration 1.00)
- 8.21 (d, 1H, integration 1.00)
- 8.17 (d, 1H, integration 1.00)
- 8.00 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.99 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.97 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.86 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.73 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.71 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.70 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.59 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.58 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.57 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.47 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.46 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.22 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.21 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.18 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.17 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.16 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.15 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.14 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.13 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.12 (d, 1H, integration 1.00)
- 7.11 (d, 1H, integration 1.00)
- 3.80 (s, 3H, integration 3.00)
- 3.85 (s, 3H, integration 3.00)
- 0.98 (m, 5H, integration 0.01)

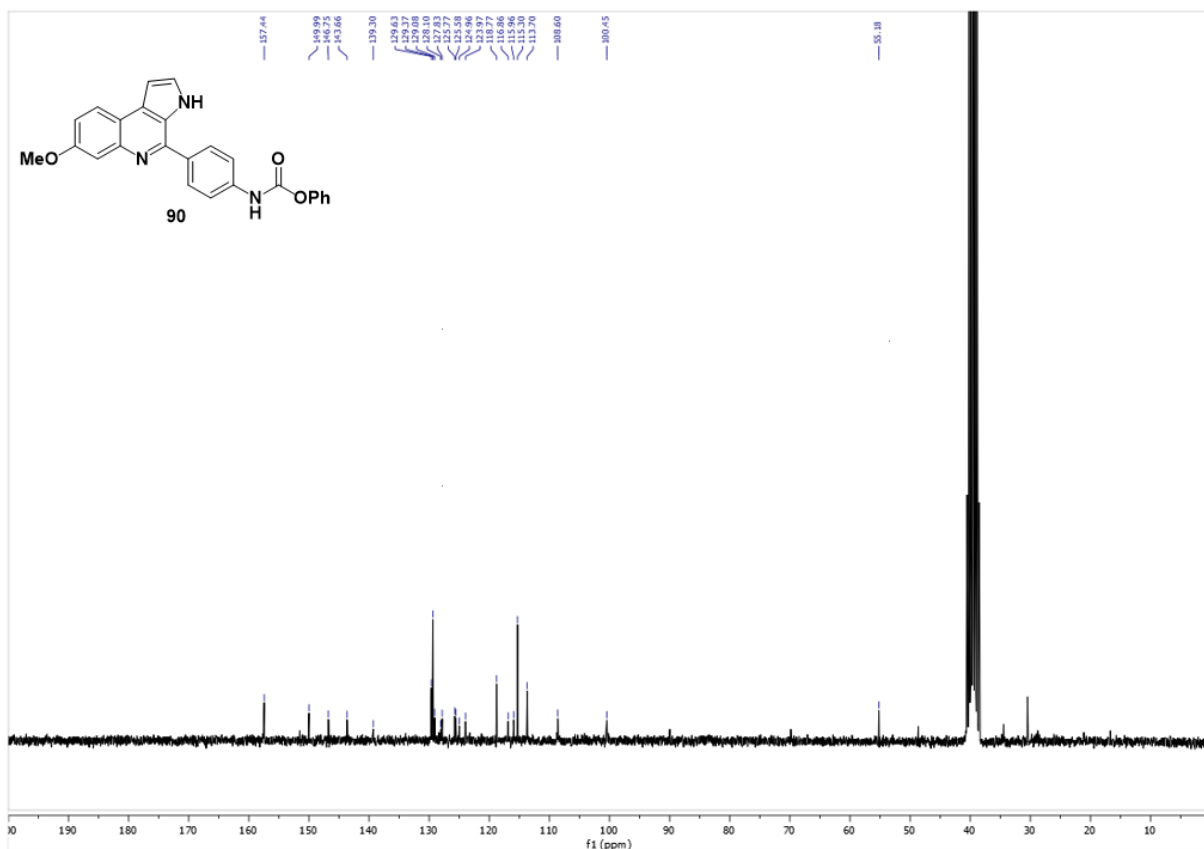
Espectro de RMN de ^1H do composto **89** (250 MHz, DMSO- d_6).



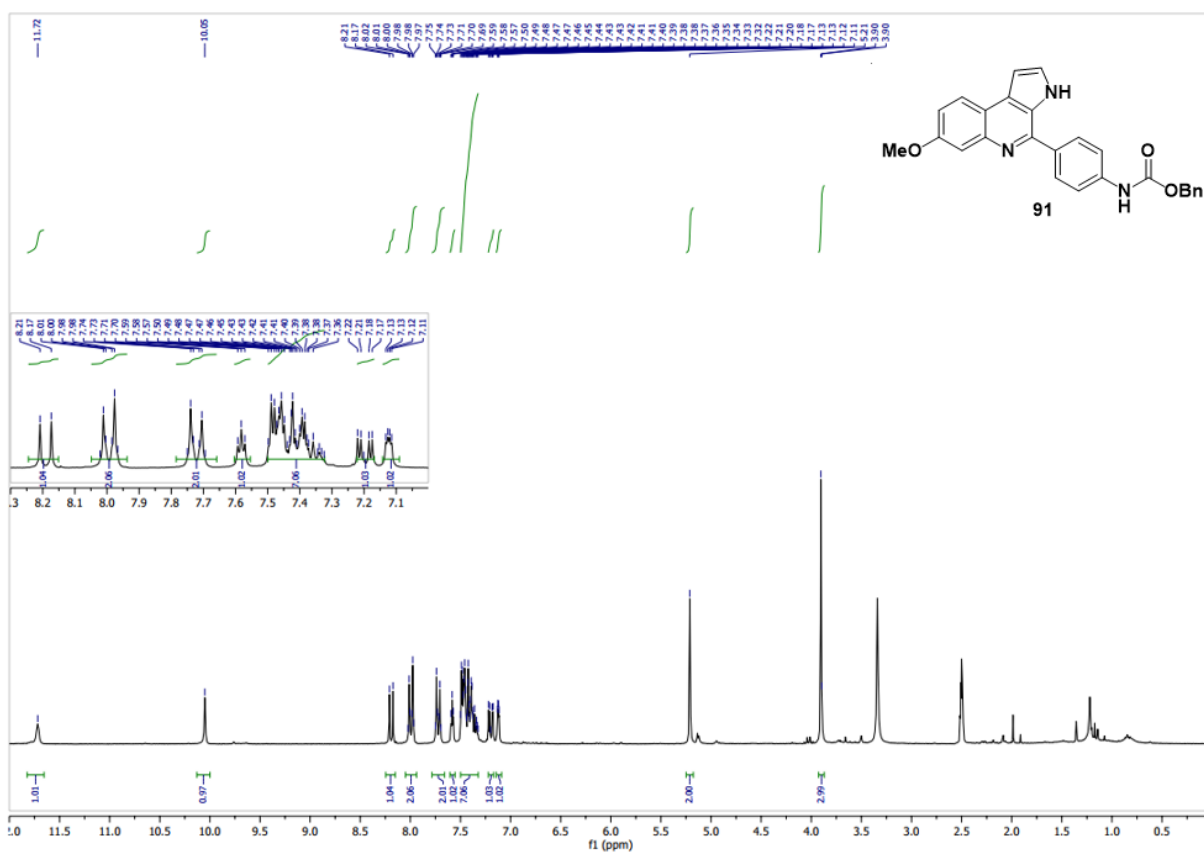
Espectro de RMN de ¹³C do composto **89** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



Espectro de RMN de ¹H do composto **90** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



Espectro de RMN de ¹³C do composto **90** (63 MHz, DMSO-*d*₆).

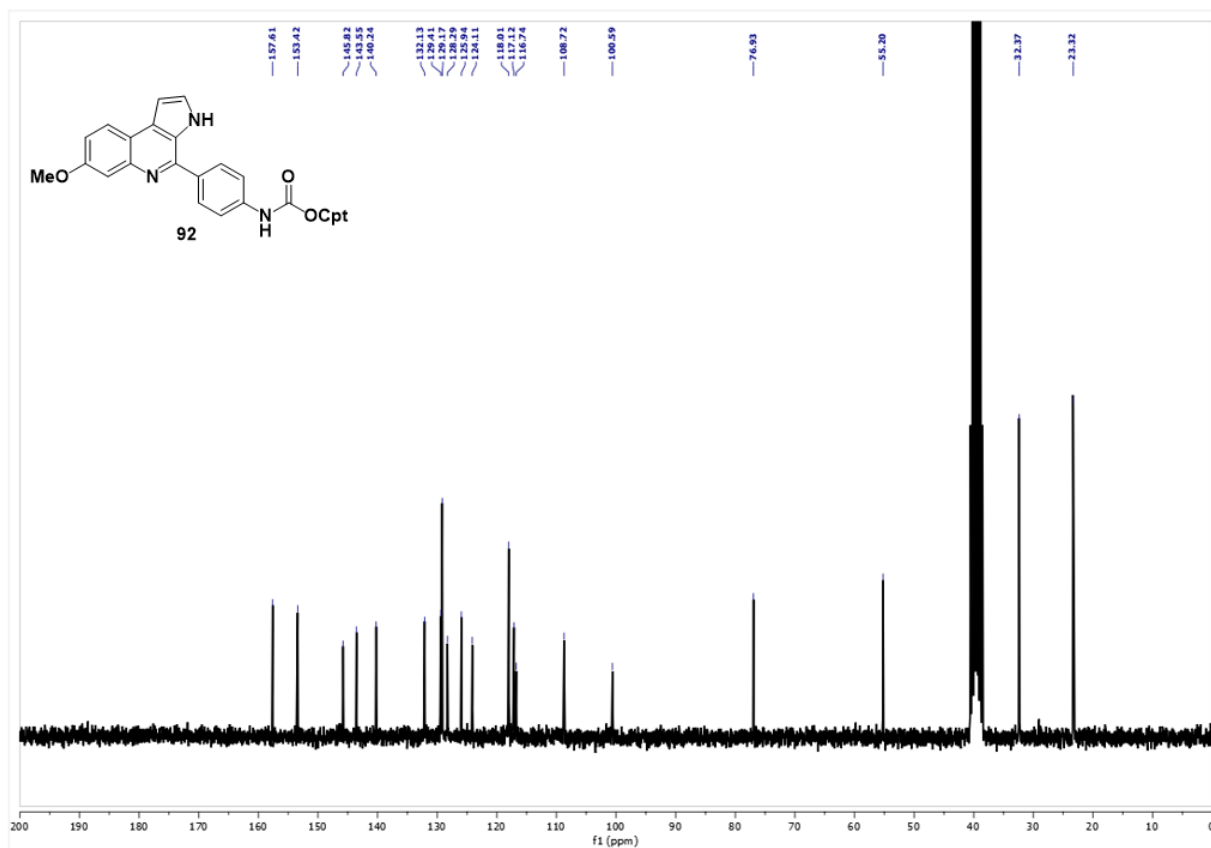


Espectro de RMN de ¹H do composto **91** (250 MHz, DMSO-*d*₆).

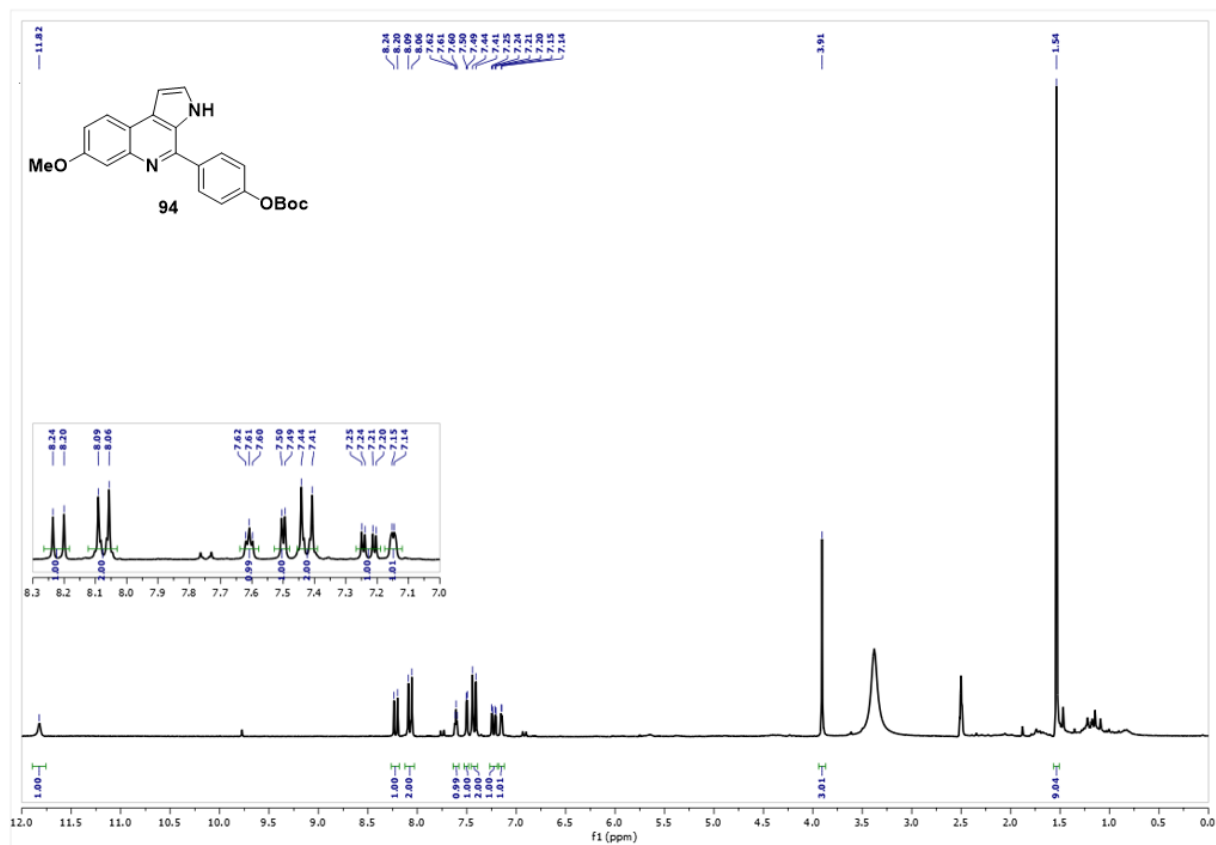
Chemical structure of compound 92: COc1ccc2c(c1)c3c[nH]c3c2-c4ccc(NC(=O)OCpt)cc4

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 92. The spectrum displays peaks from 0.0 to 12.0 ppm. Key features include a methoxy singlet at 3.90 ppm (3H), aromatic signals between 7.0-8.3 ppm, and a broad NH peak at 11.70 ppm. Integration values are shown below the baseline. Two insets provide expanded views of the aromatic region (5.0-5.3 ppm and 1.5-2.0 ppm). The chemical structure of 92 is shown in the top right.

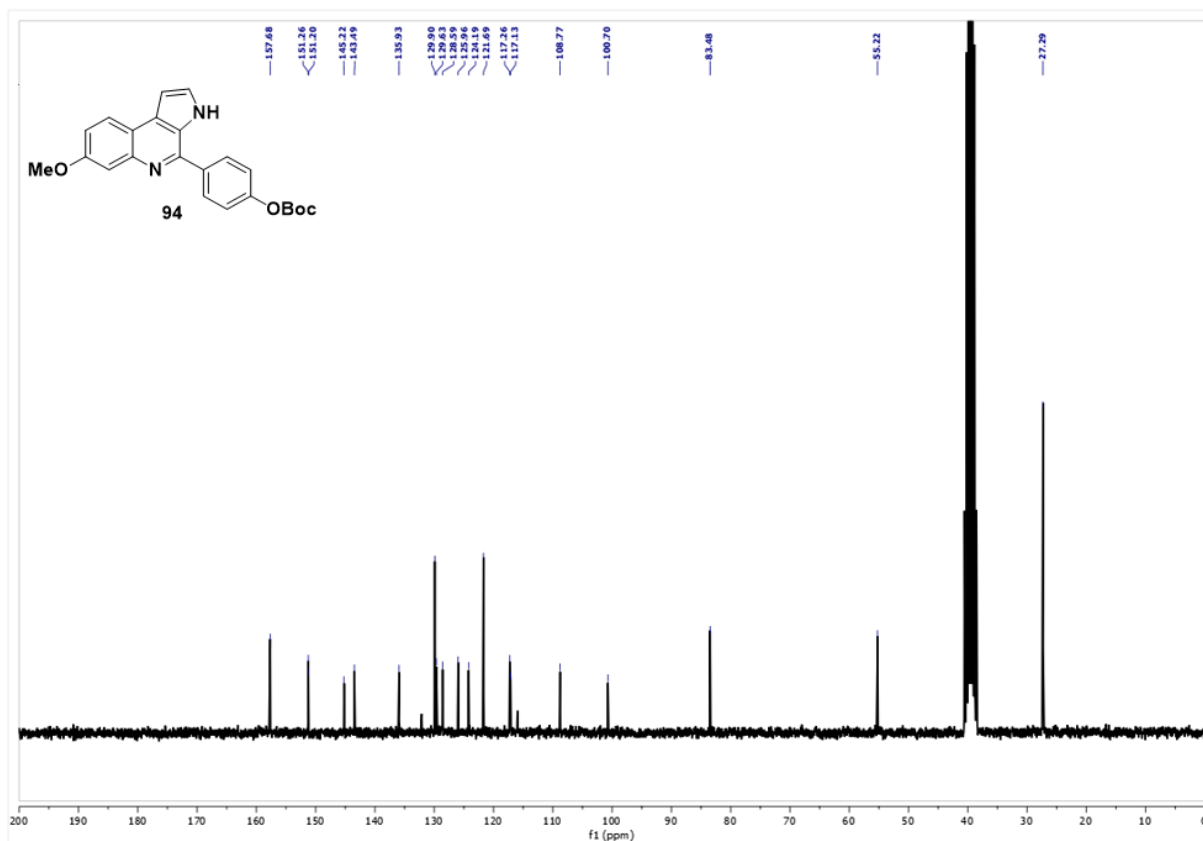
Espectro de RMN de ^1H do composto **92** (250 MHz, DMSO- d_6).



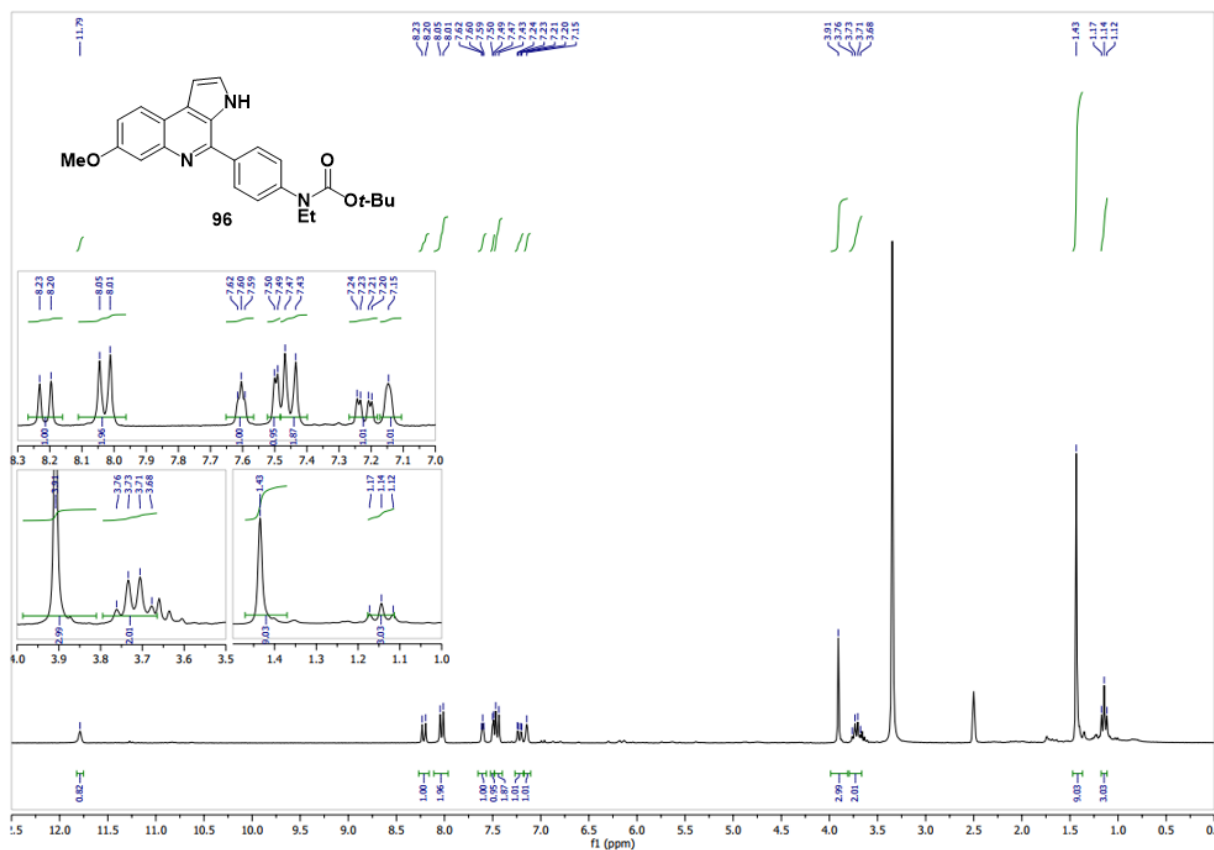
Espectro de RMN de ¹³C do composto **92** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



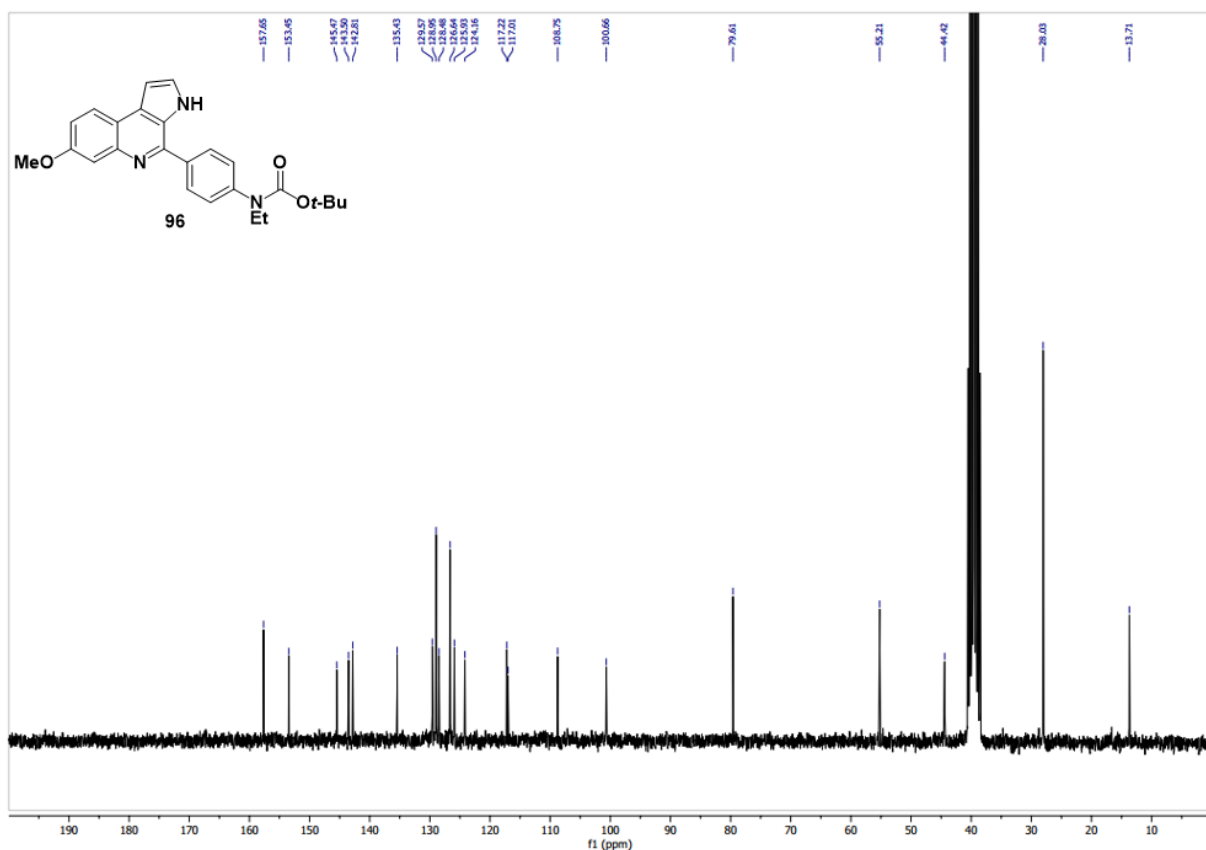
Espectro de RMN de ¹H do composto **94** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



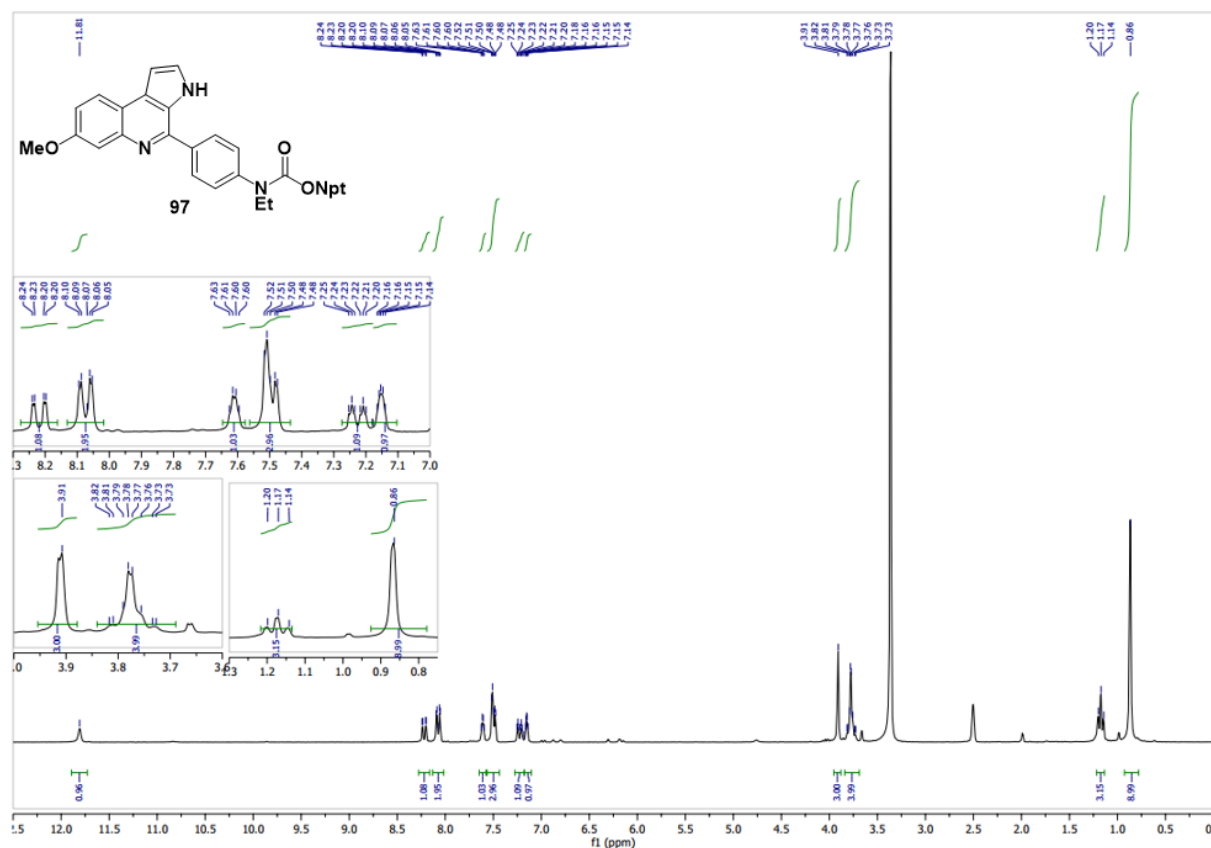
Espectro de RMN de ¹³C do composto **94** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



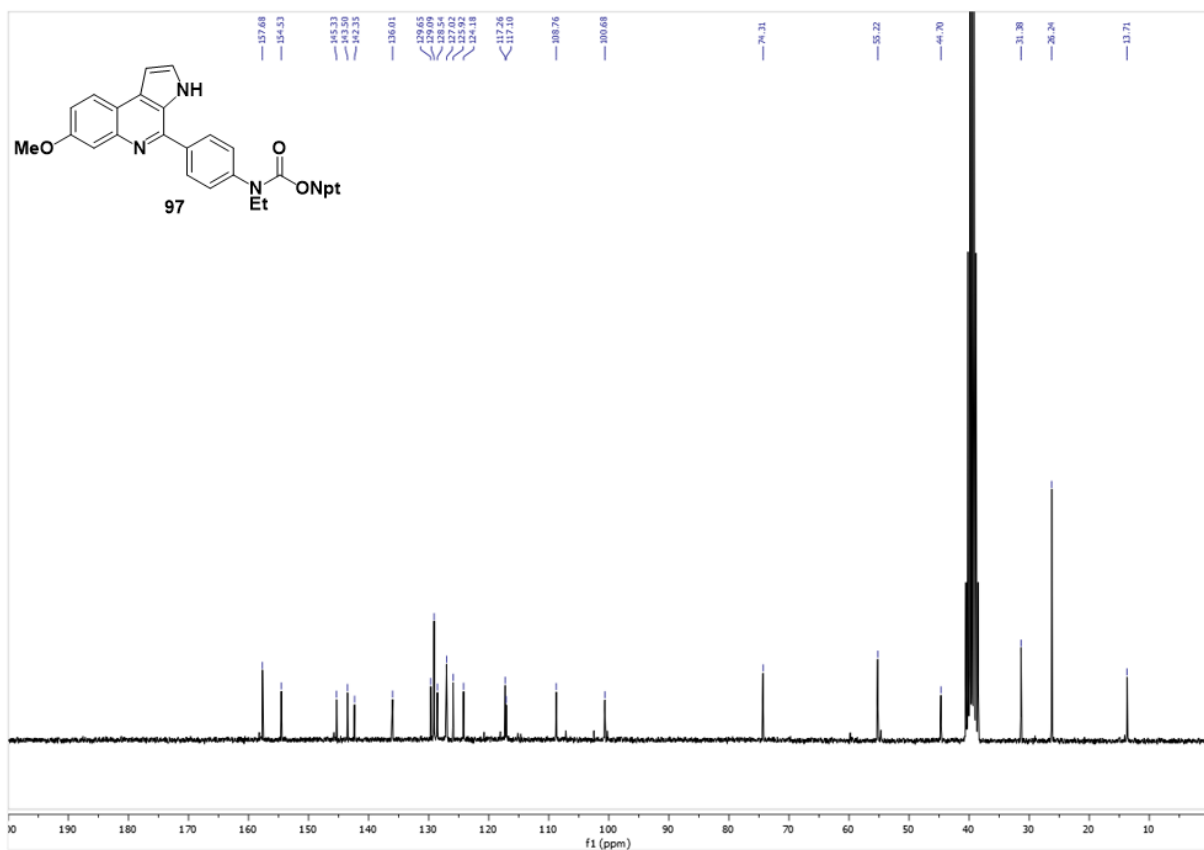
Espectro de RMN de ¹H do composto **96** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



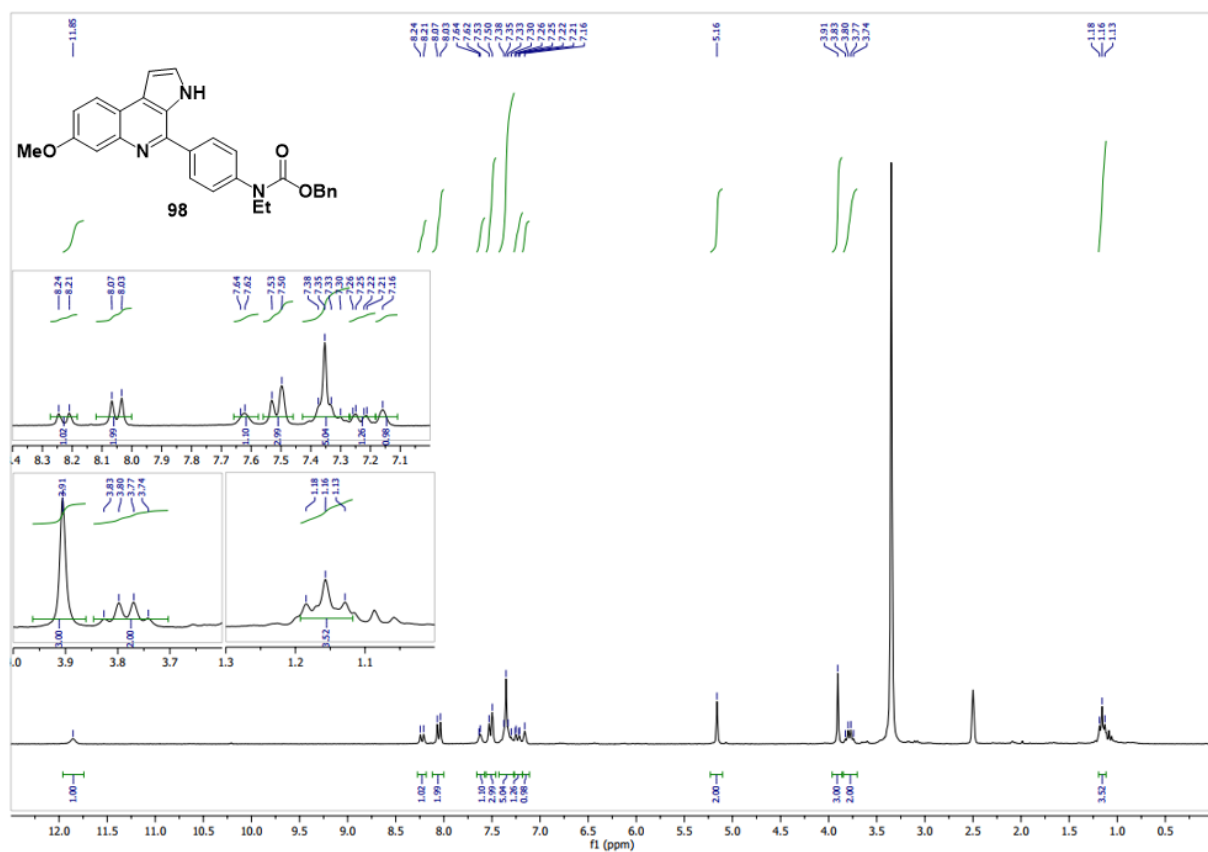
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **96** (63 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



Espectro de RMN de ^1H do composto **97** (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



Espectro de RMN de ¹³C do composto **97** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



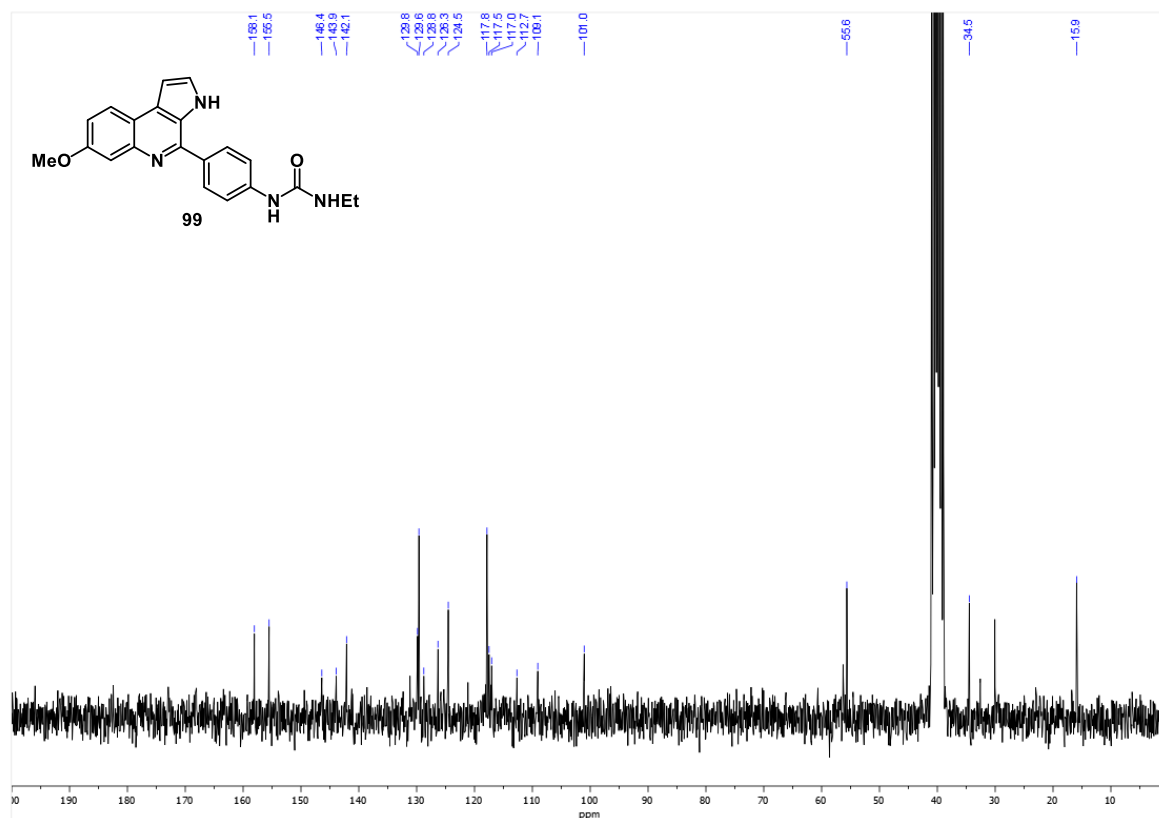
Espectro de RMN de ¹H do composto **98** (250 MHz, DMSO-*d*₆).

Chemical structure of compound 99: 1-methoxy-2-(4-((diethylamino)carbonyl)phenyl)-3,4-dihydroquinoline.

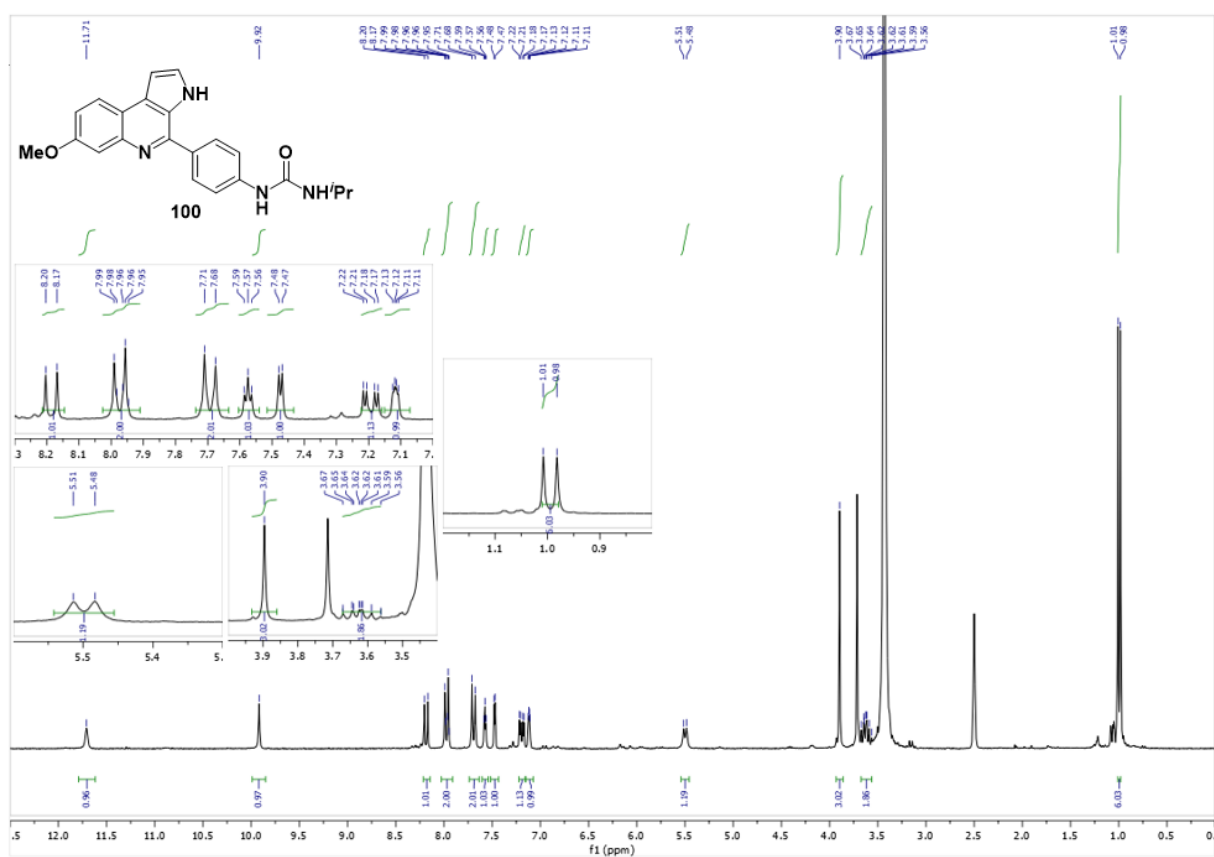
¹H NMR spectrum (CDCl₃) showing peaks and integrations:

- 12.0 ppm (s, 1H, integration 1.06)
- 8.2 ppm (d, 2H, integration 2.96)
- 7.8 ppm (d, 2H, integration 1.99)
- 7.5 ppm (m, 2H, integration 1.00)
- 7.2 ppm (m, 2H, integration 0.91)
- 3.8 ppm (s, 3H, integration 2.98)
- 3.6 ppm (m, 2H, integration 2.96)
- 1.5 ppm (m, 4H, integration 1.07)
- 1.2 ppm (m, 4H, integration 1.07)

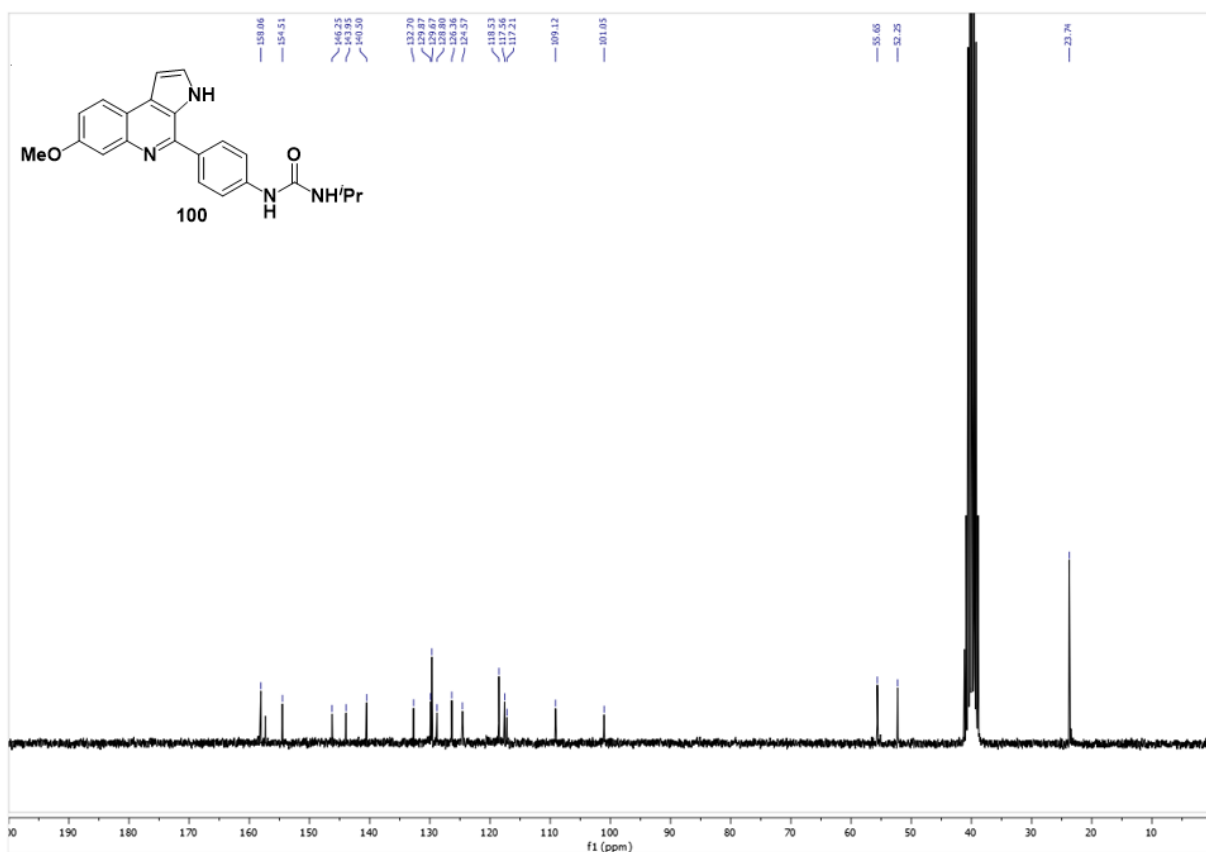
Espectro de RMN de ^1H do composto **99** (250 MHz, DMSO- d_6).



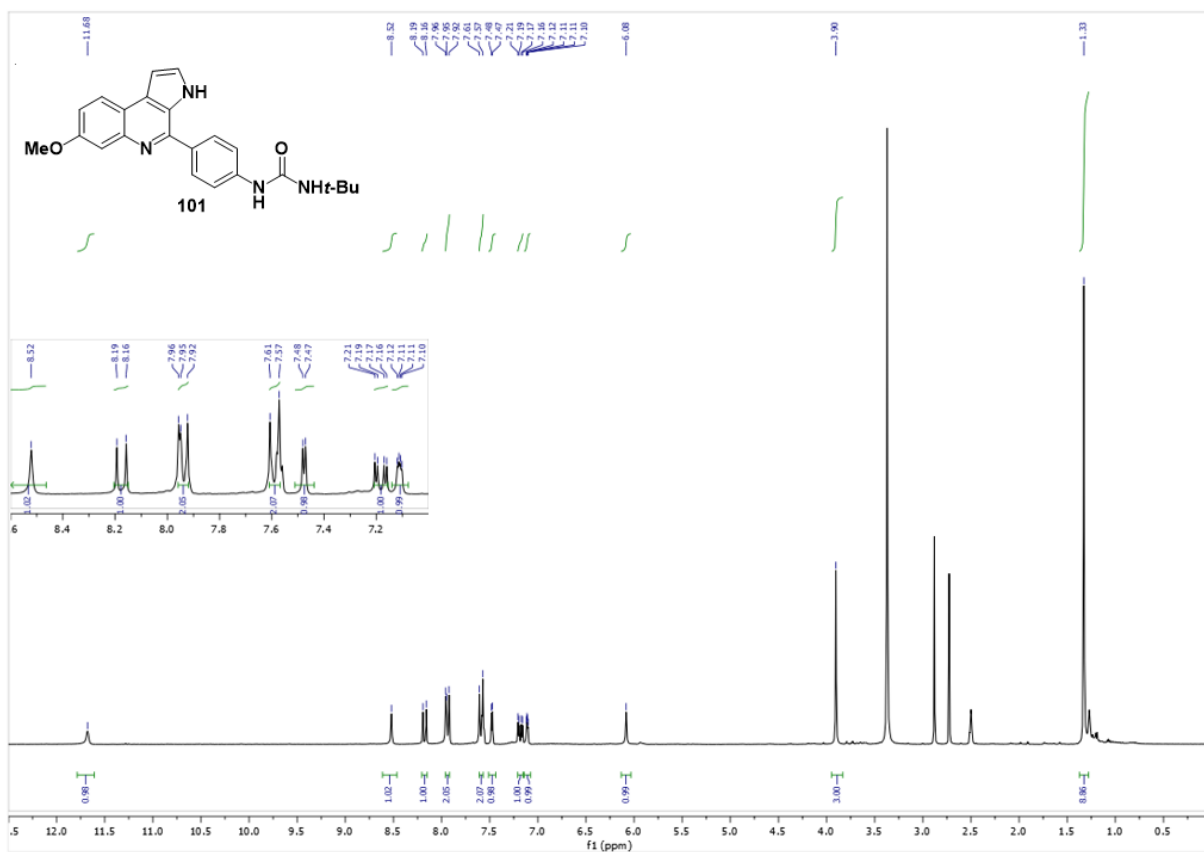
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **99** (63 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



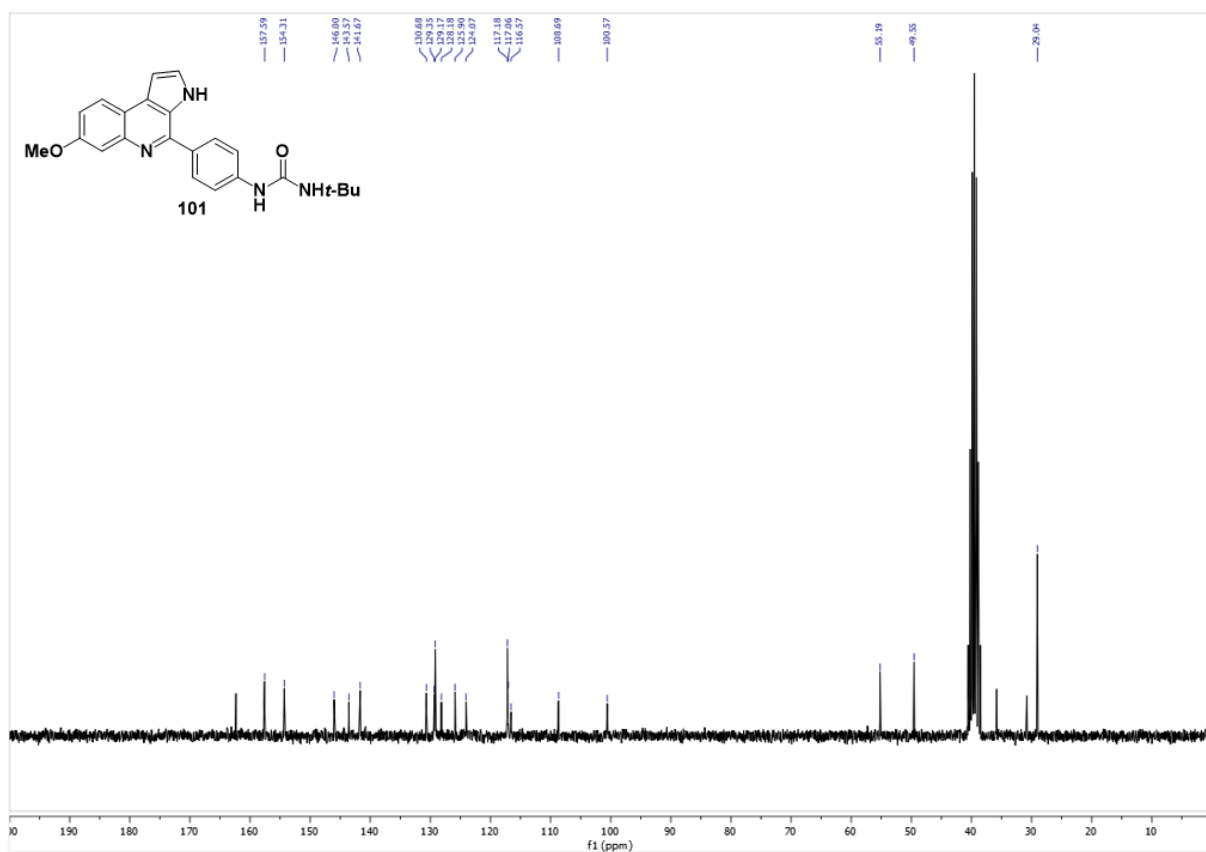
Espectro de RMN de ^1H do composto **100** (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



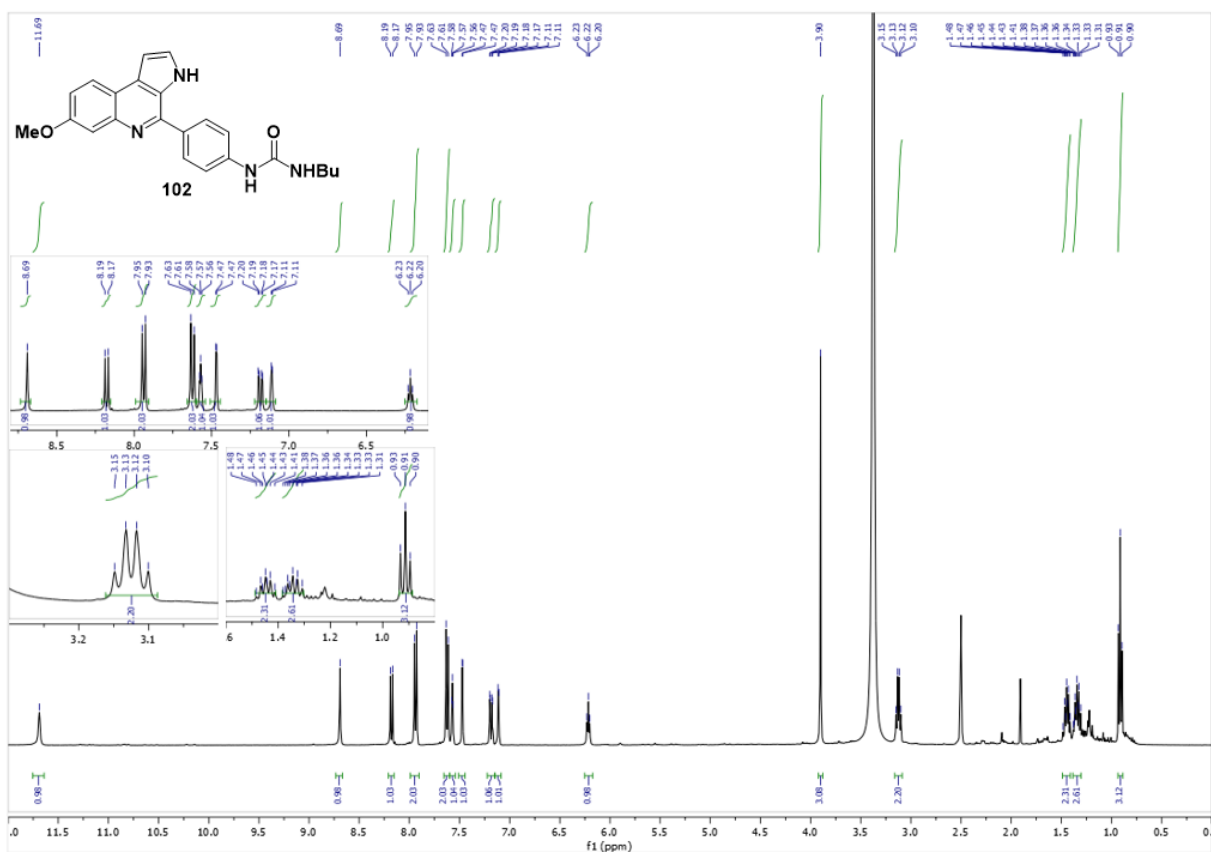
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **100** (63 MHz, DMSO- d_6).



Espectro de RMN de ^1H do composto **101** (250 MHz, DMSO- d_6).



Espectro de RMN de ¹³C do composto **101** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



Espectro de RMN de ¹H do composto **102** (250 MHz, DMSO-*d*₆).

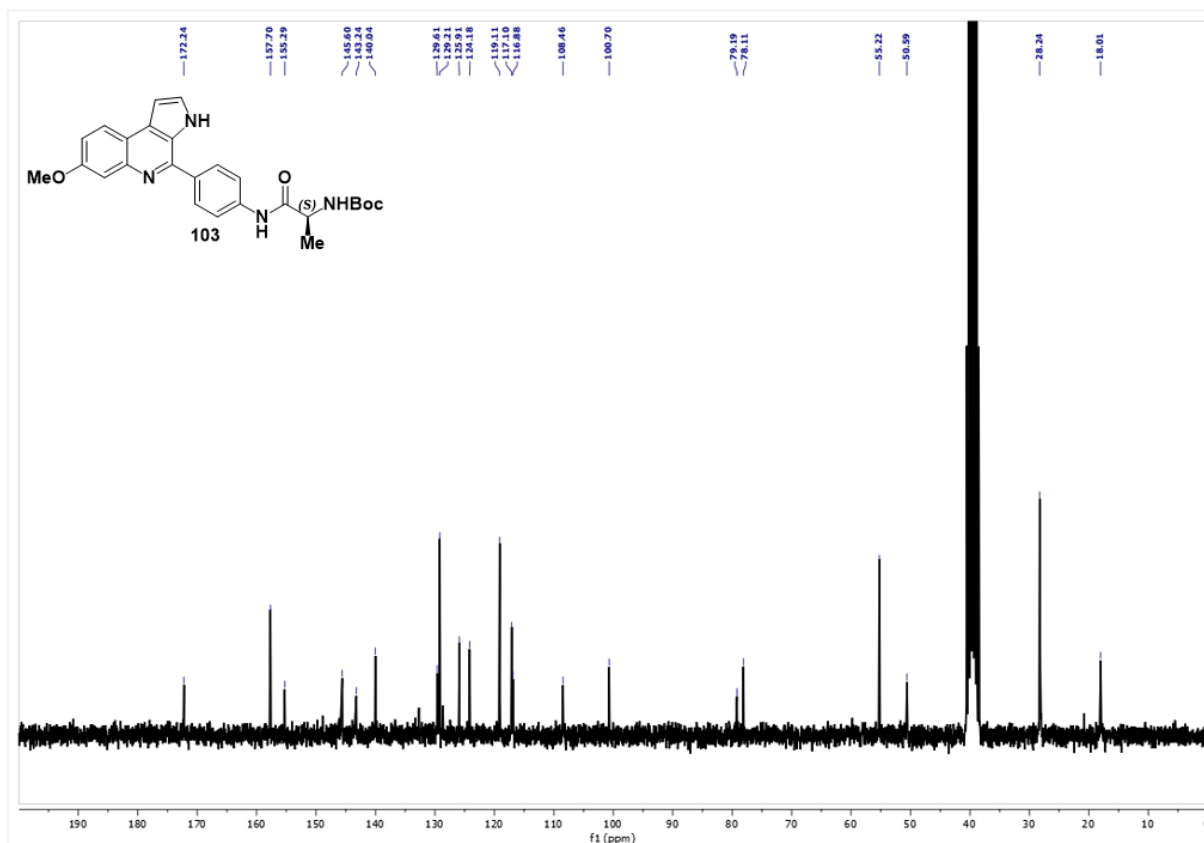
Chemical structure of compound 103: COc1ccc2c(c1)c3cc[nH]c3cc2C4=CC=C(C=C4)NC(=O)[C@H](C)C(=O)Nc5ccccc5

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 103. The spectrum shows peaks from 0 to 8.3 ppm. Two insets provide expanded views of the aromatic region (7.1-8.3 ppm) and the aliphatic region (1.3-4.5 ppm).

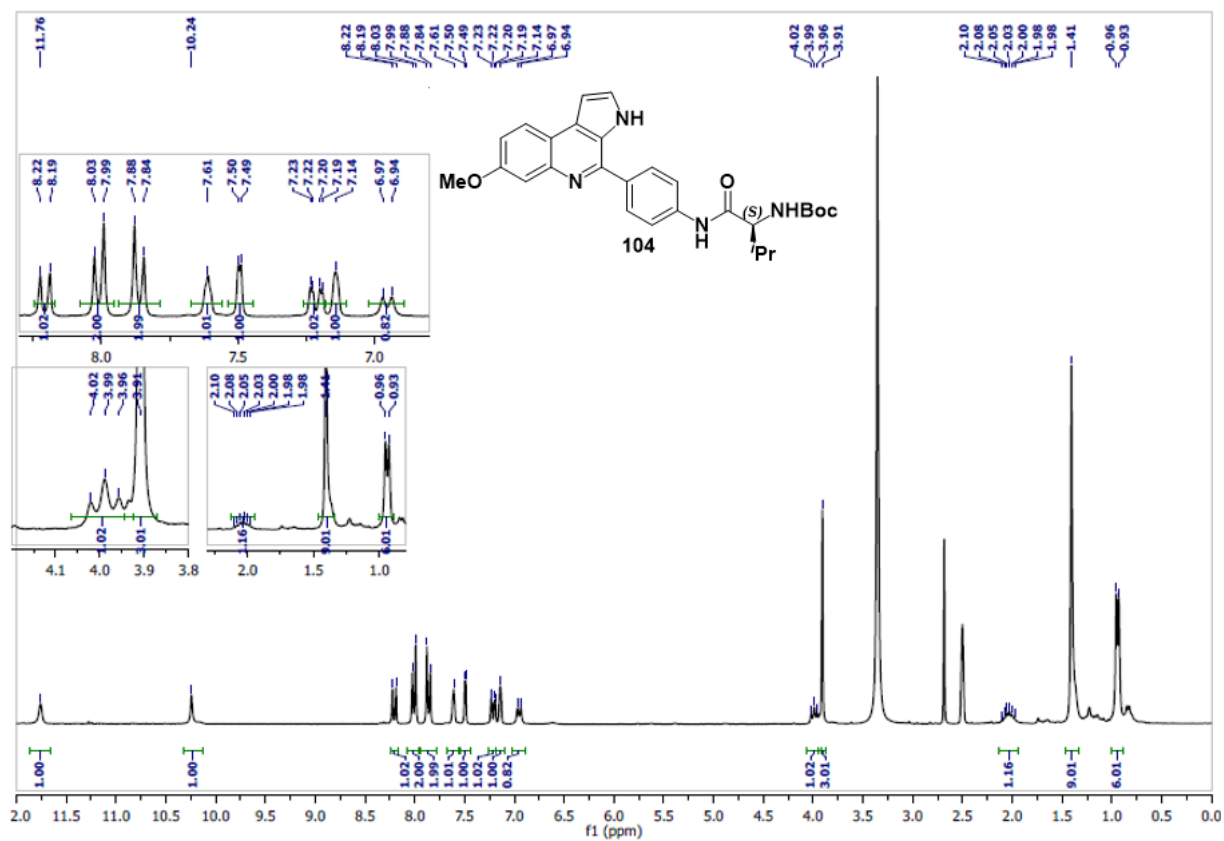
Peak list (ppm): 8.22, 8.19, 8.03, 7.99, 7.87, 7.83, 7.61, 7.50, 7.49, 7.23, 7.22, 7.20, 7.19, 7.14, 3.91, 1.40, 1.33, 1.30.

Integration values: 0.98, 1.00, 1.00, 2.00, 1.99, 1.00, 1.00, 1.10, 0.93, 2.98, 8.97, 2.99.

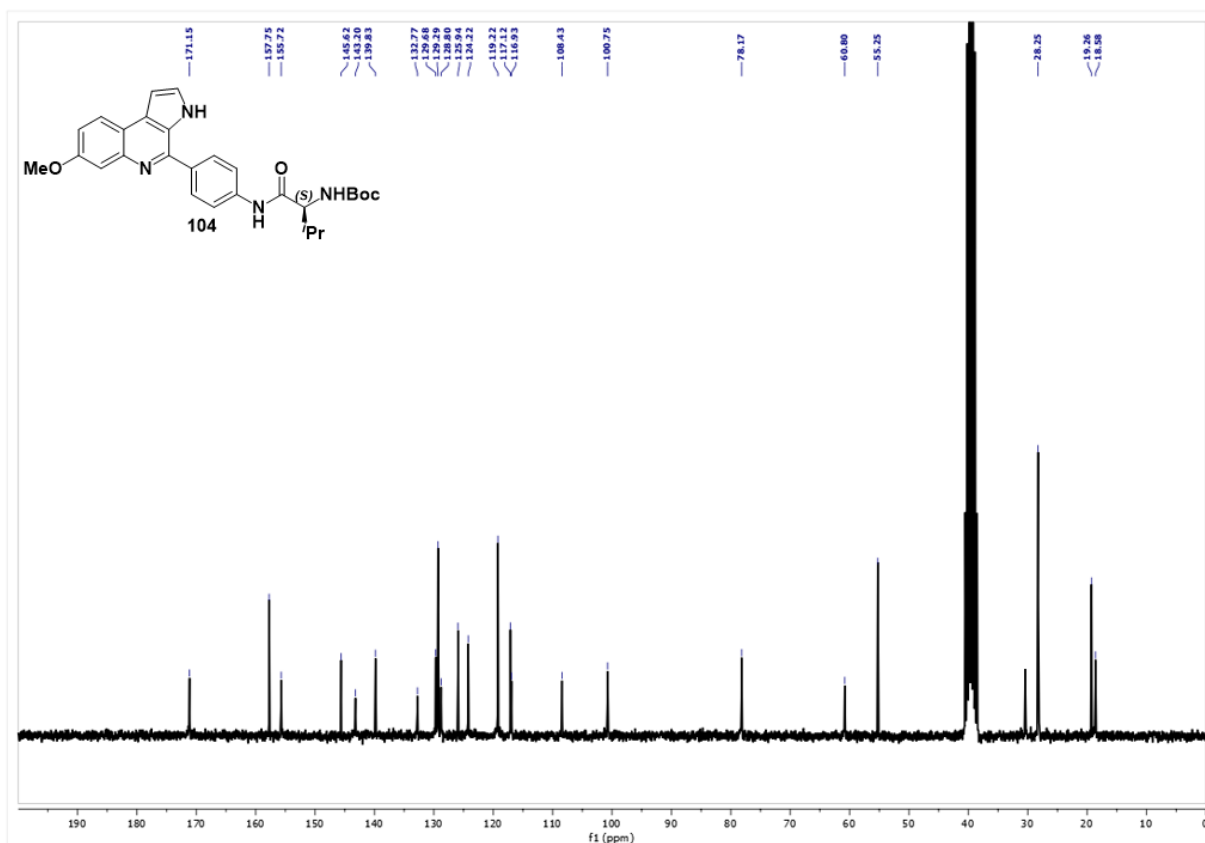
Espectro de RMN de ^1H do composto **103** (250 MHz, DMSO- d_6).



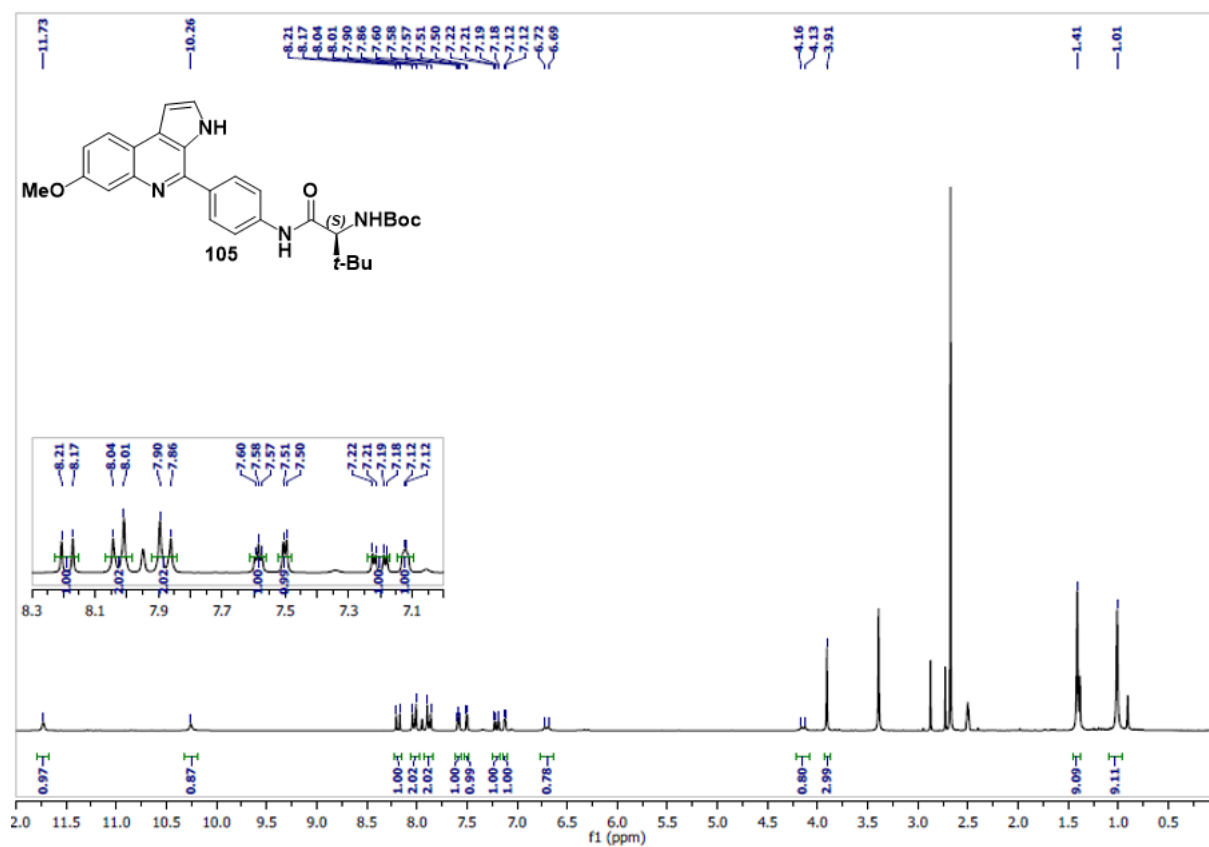
Espectro de RMN de ¹³C do composto **103** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



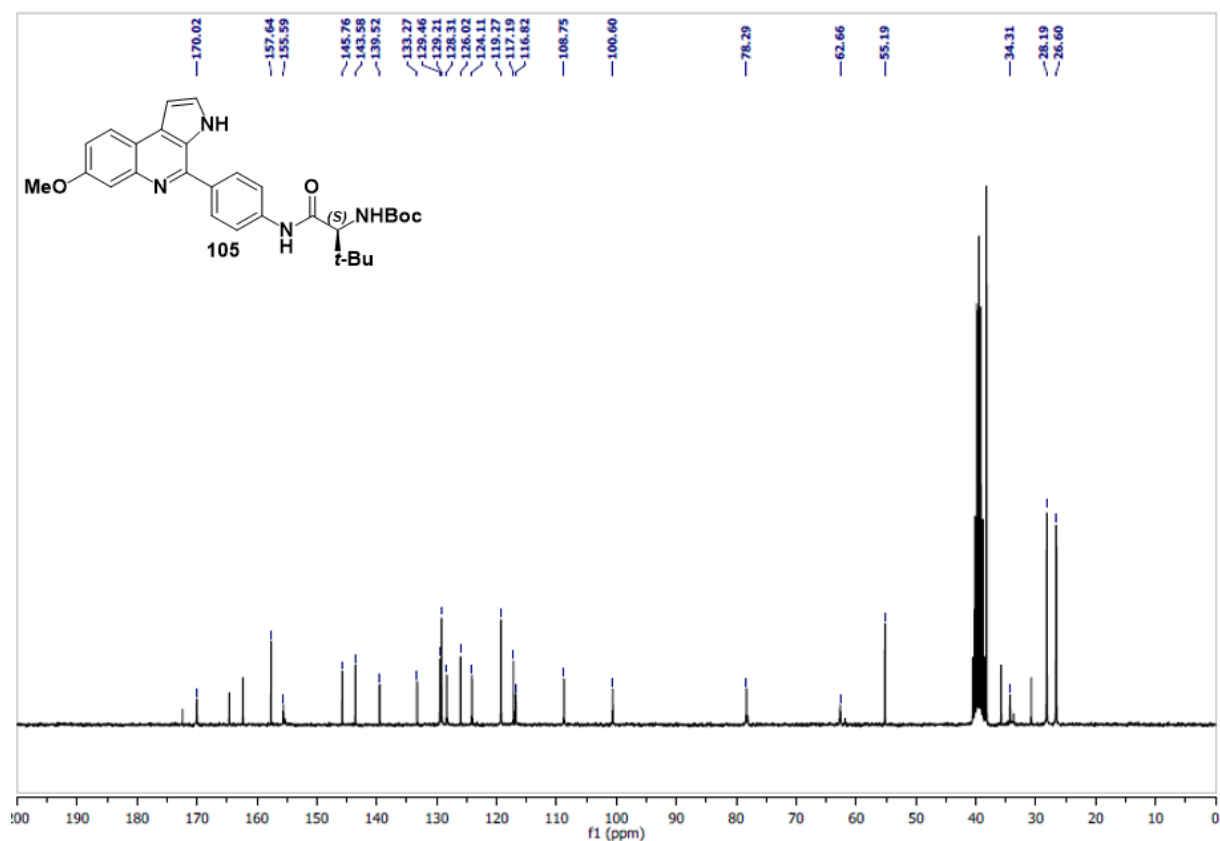
Espectro de RMN de ¹H do composto **104** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



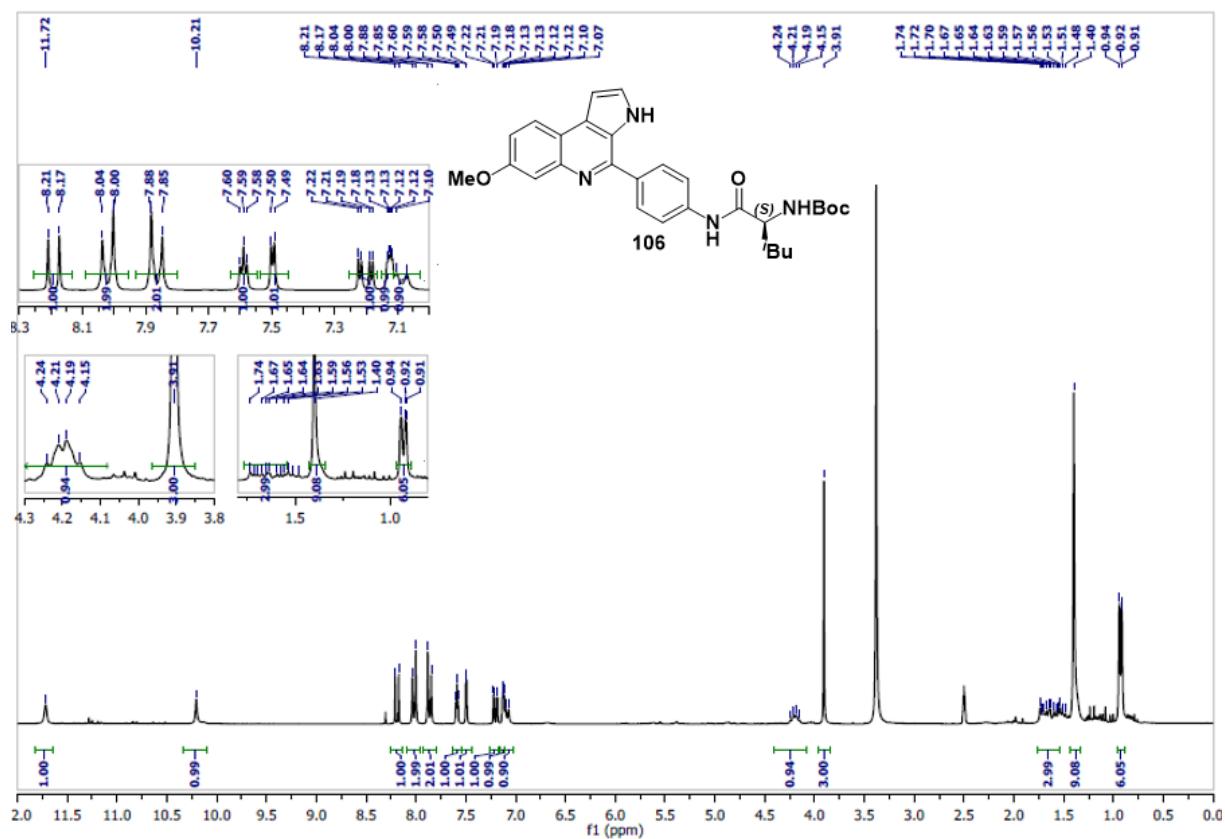
Espectro de RMN de ¹³C do composto **104** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



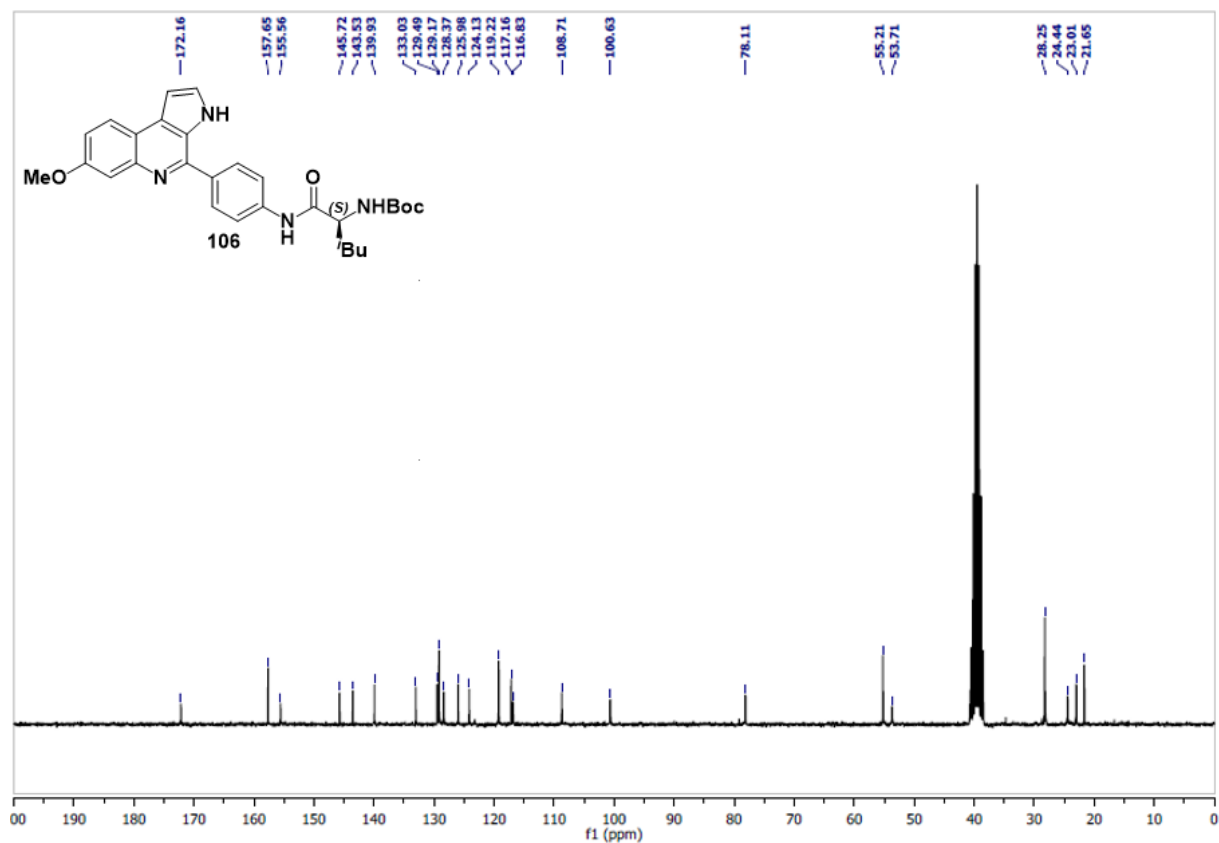
Espectro de RMN de ¹H do composto **105** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



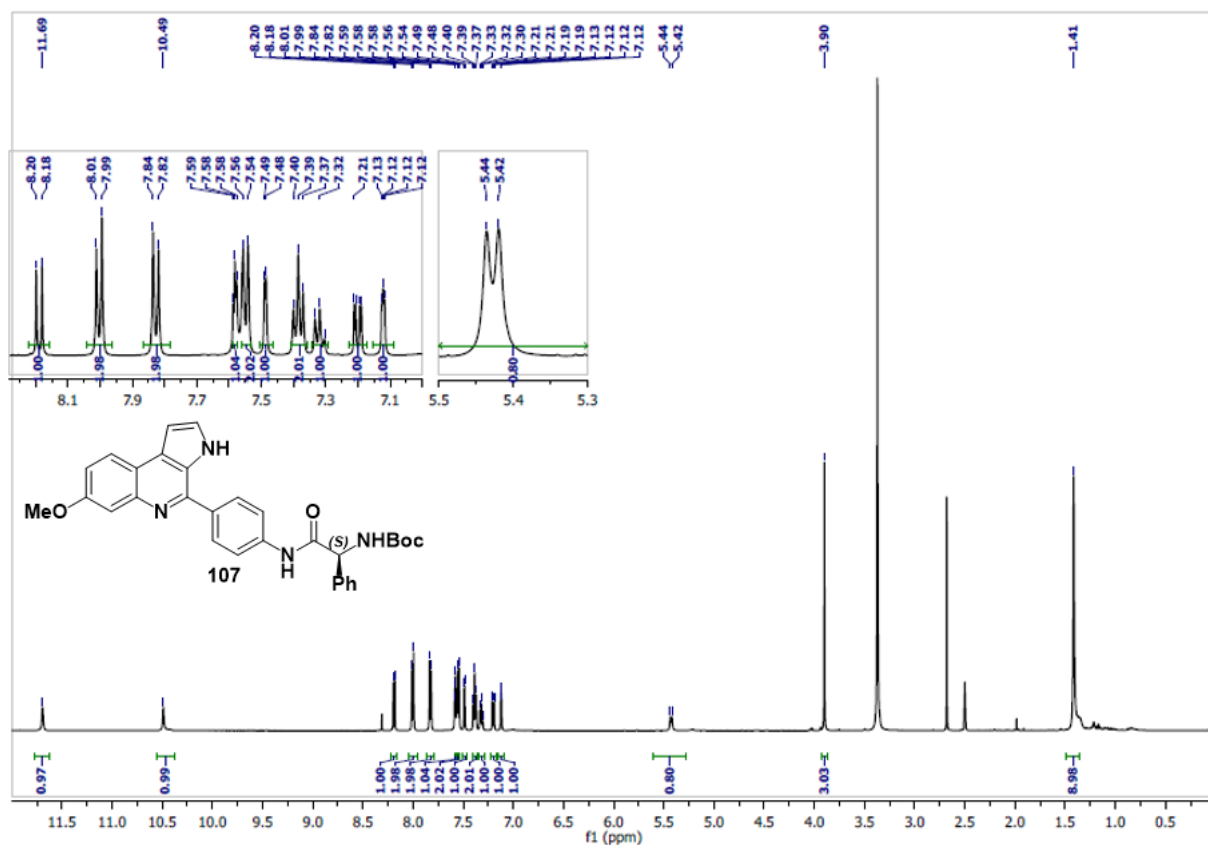
Espectro de RMN de ¹³C do composto **105** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



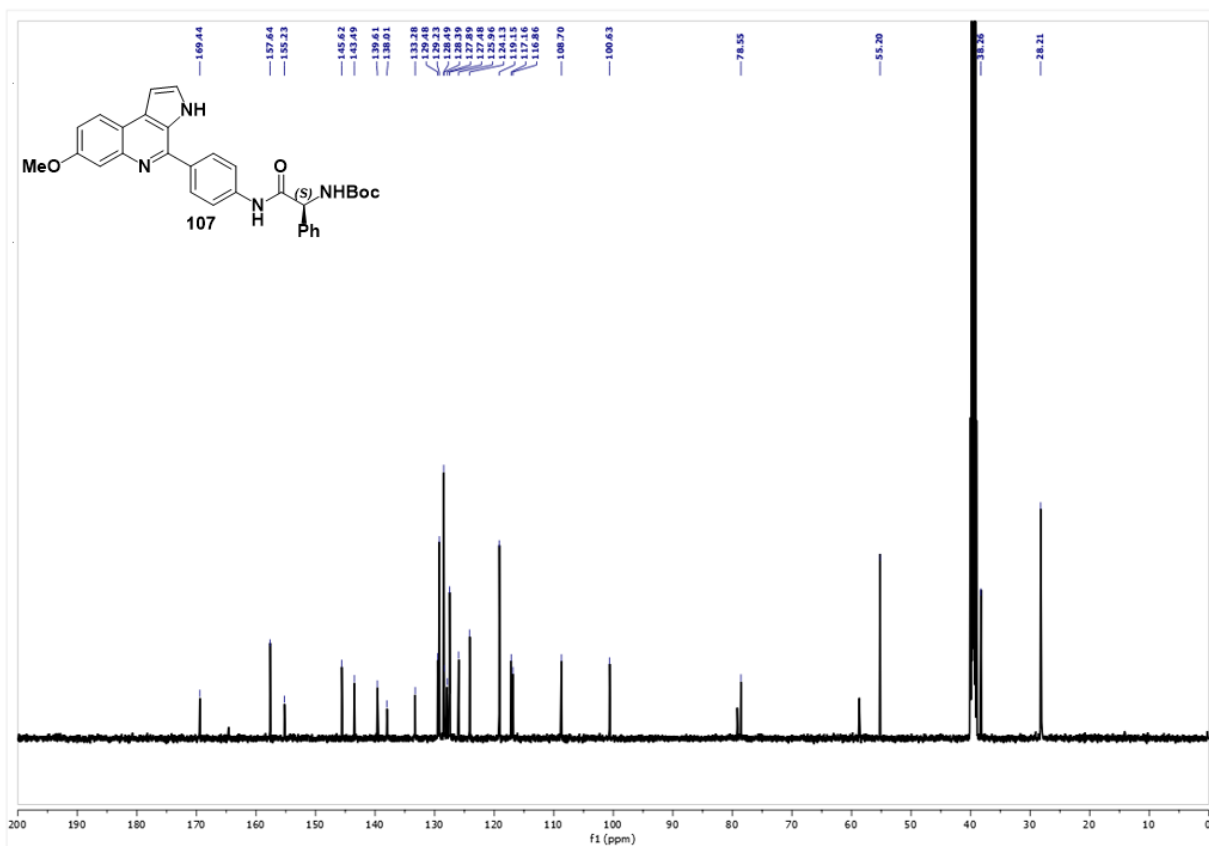
Espectro de RMN de ¹H do composto **106** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



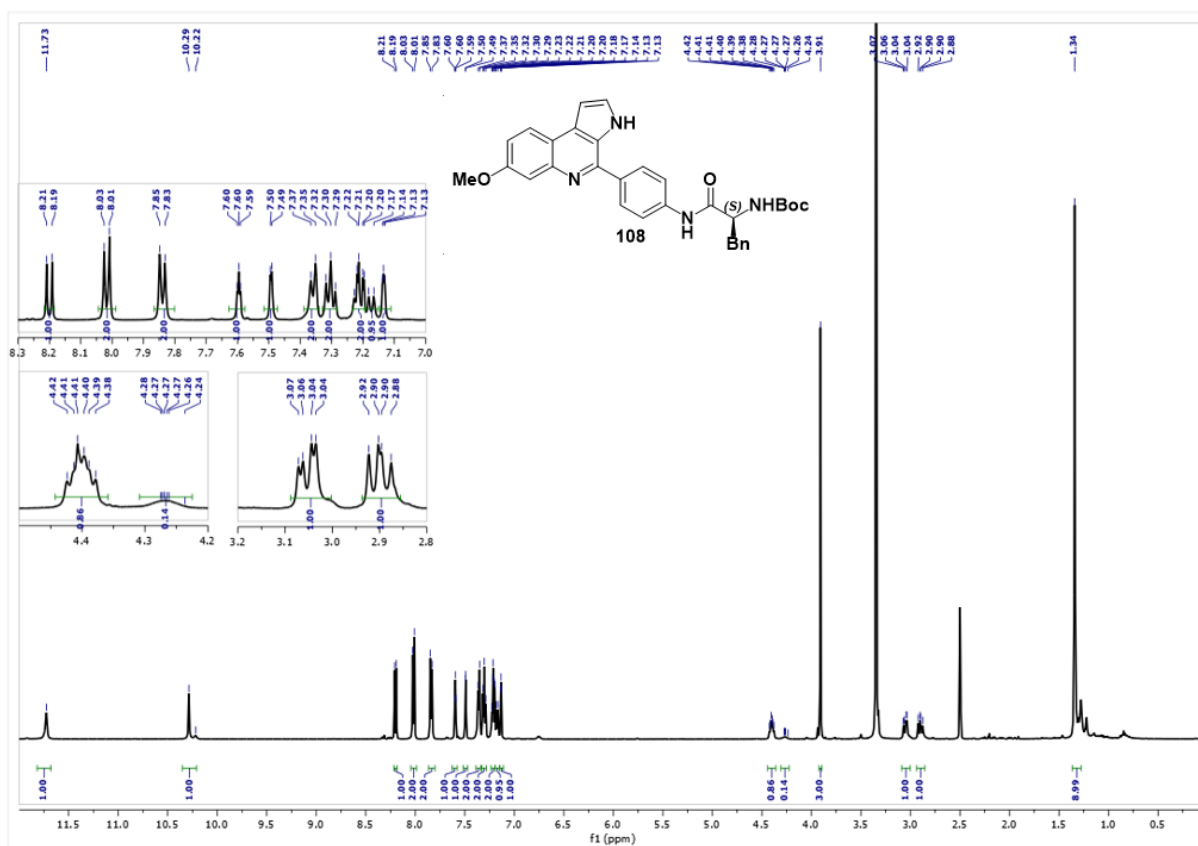
Espectro de RMN de ¹³C do composto **106** (63 MHz, DMSO-*d*₆).



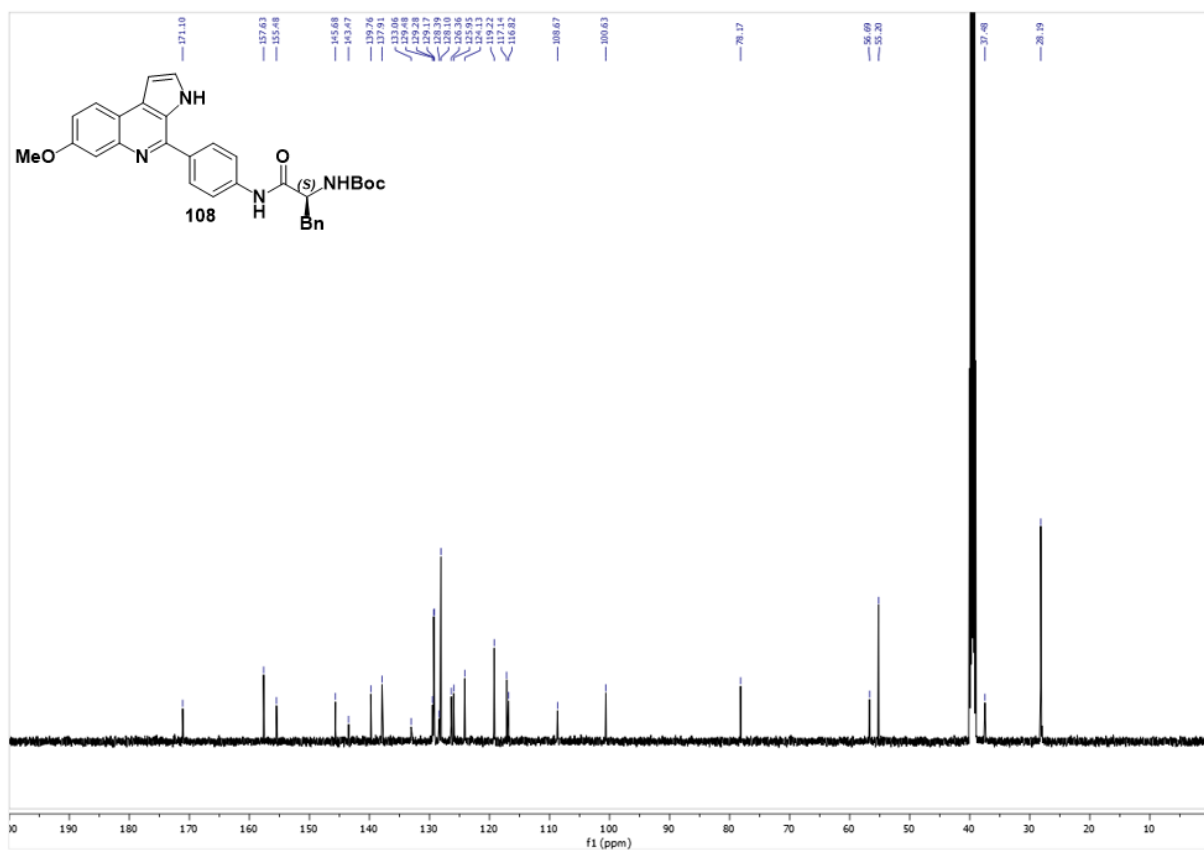
Espectro de RMN de ¹H do composto **107** (500 MHz, DMSO-*d*₆).



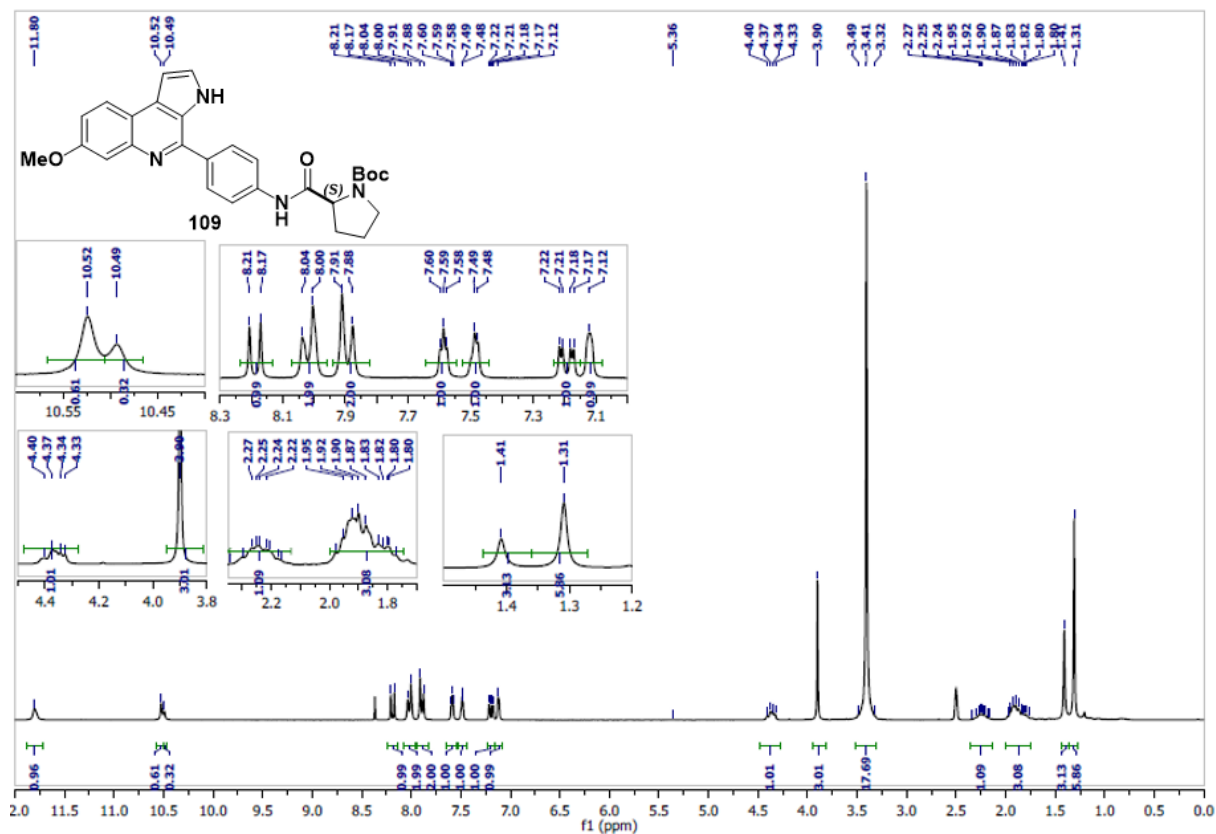
Espectro de RMN de ¹³C do composto **107** (126 MHz, DMSO-*d*₆).



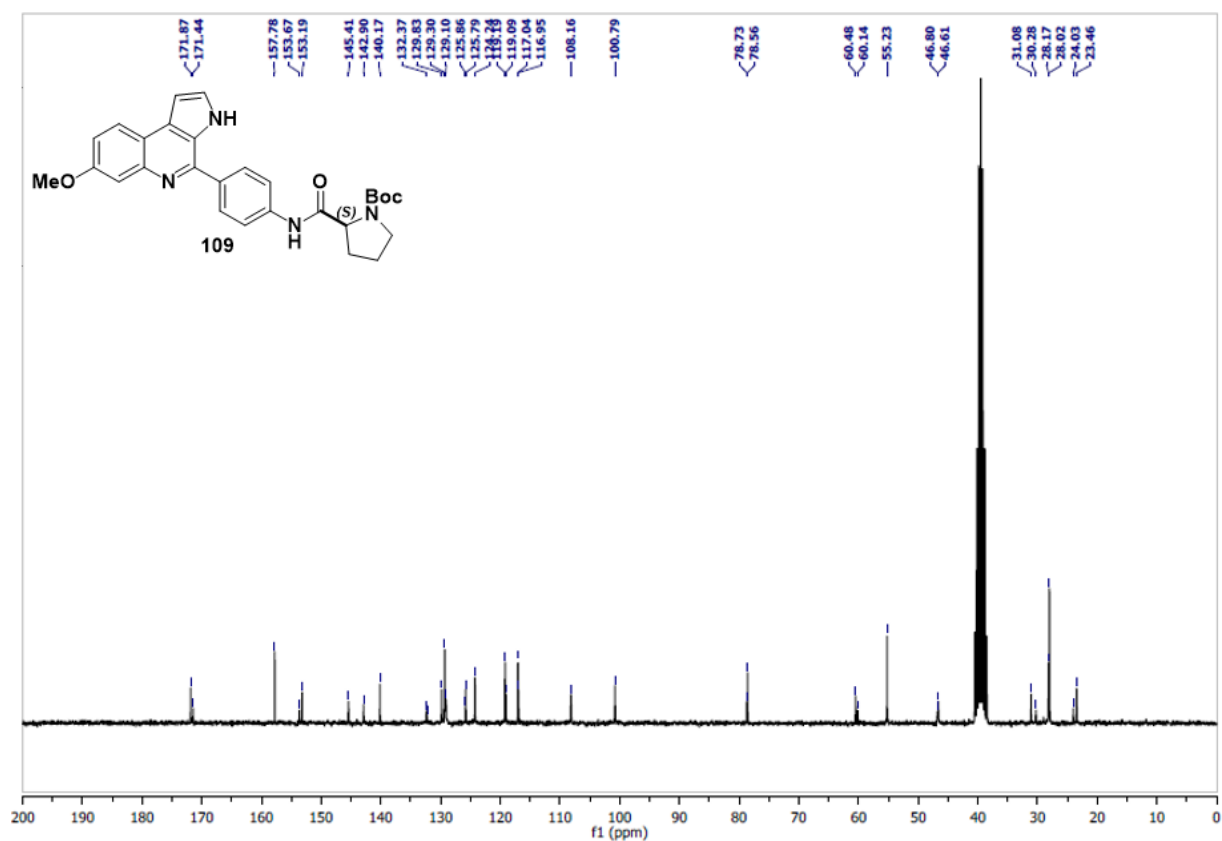
Espectro de RMN de ¹H do composto **108** (500 MHz, DMSO-*d*₆).



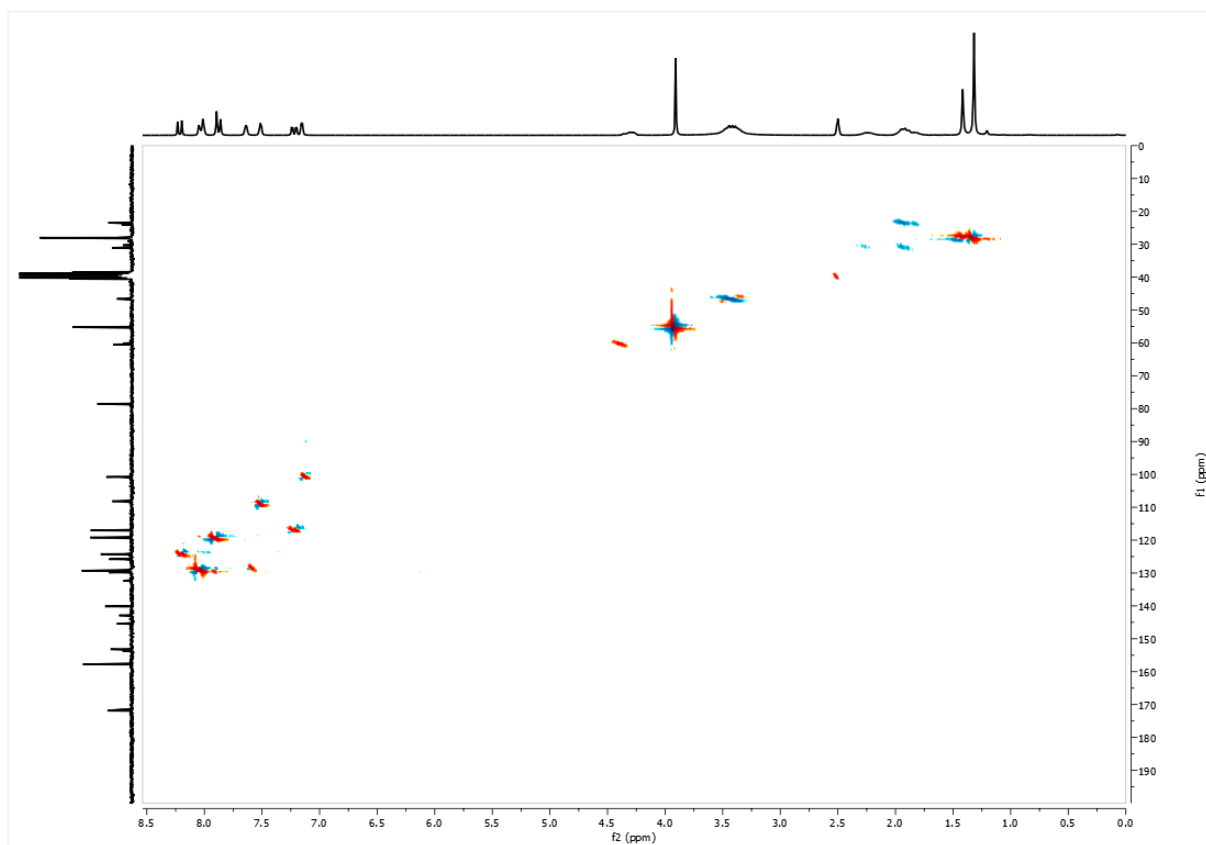
Espectro de RMN de ¹³C do composto **108** (126 MHz, DMSO-*d*₆).



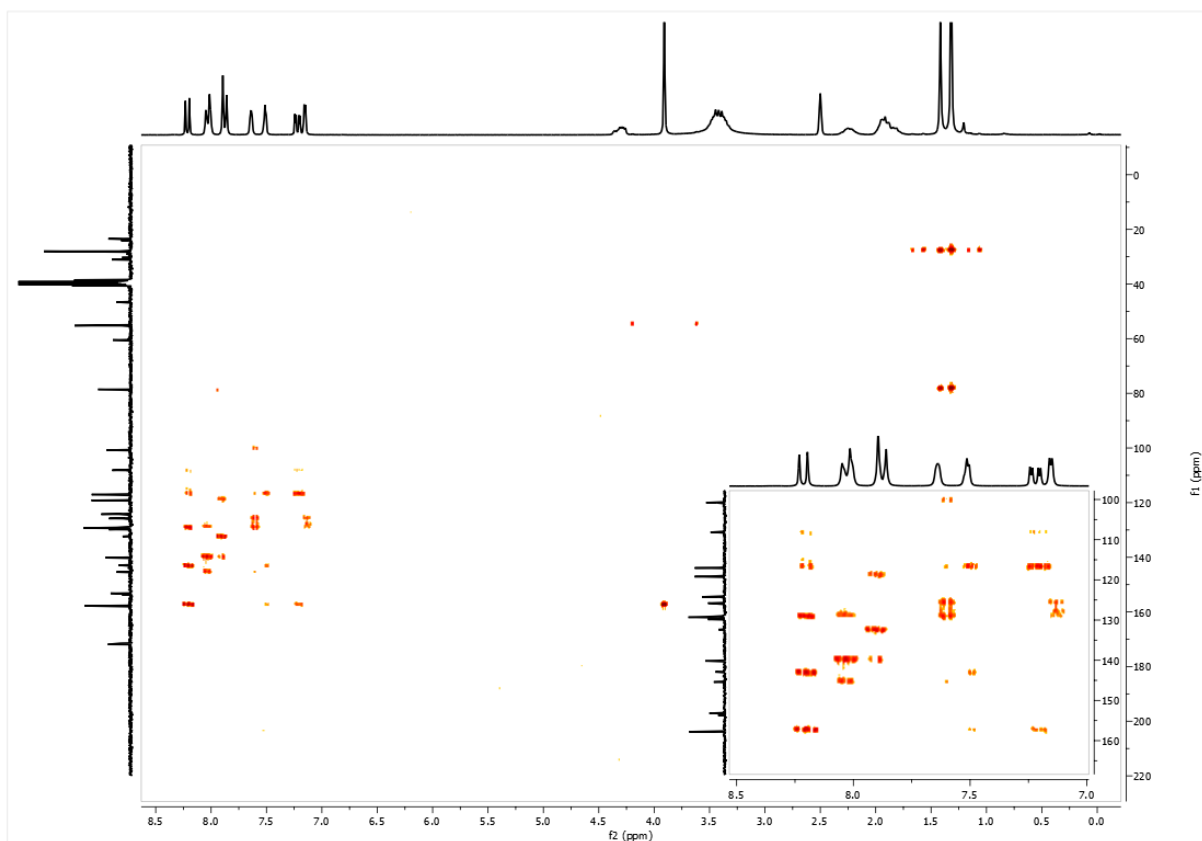
Espectro de RMN de ¹H do composto **109** (250 MHz, DMSO-*d*₆).



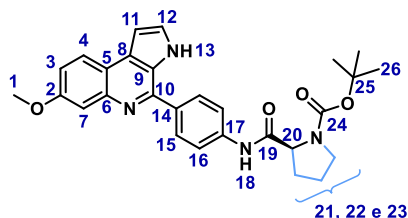
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **109** (63 MHz, DMSO- d_6).



Mapa de contorno de HSQC do composto **109** (250 MHz, DMSO- d_6).

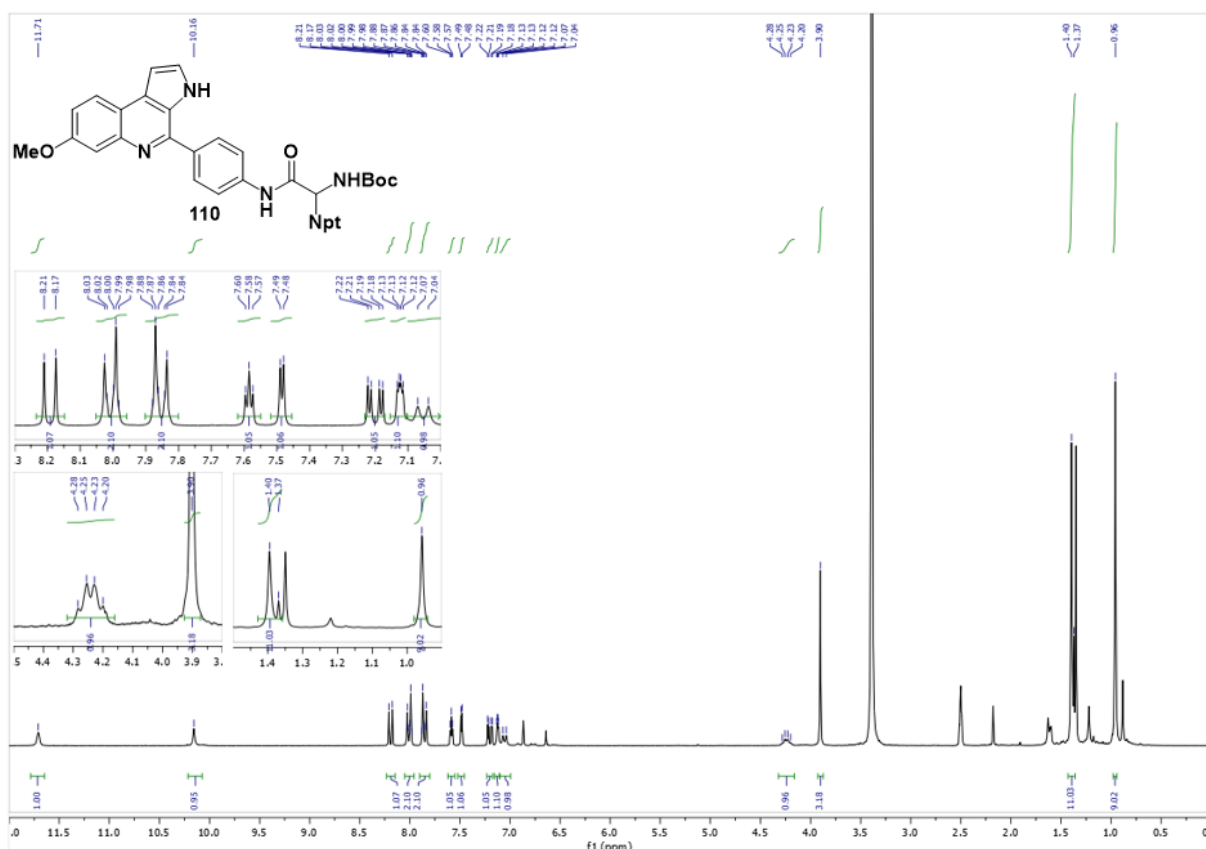


Mapa de contorno de HMBC do composto **109** (250 MHz, DMSO-*d*₆).

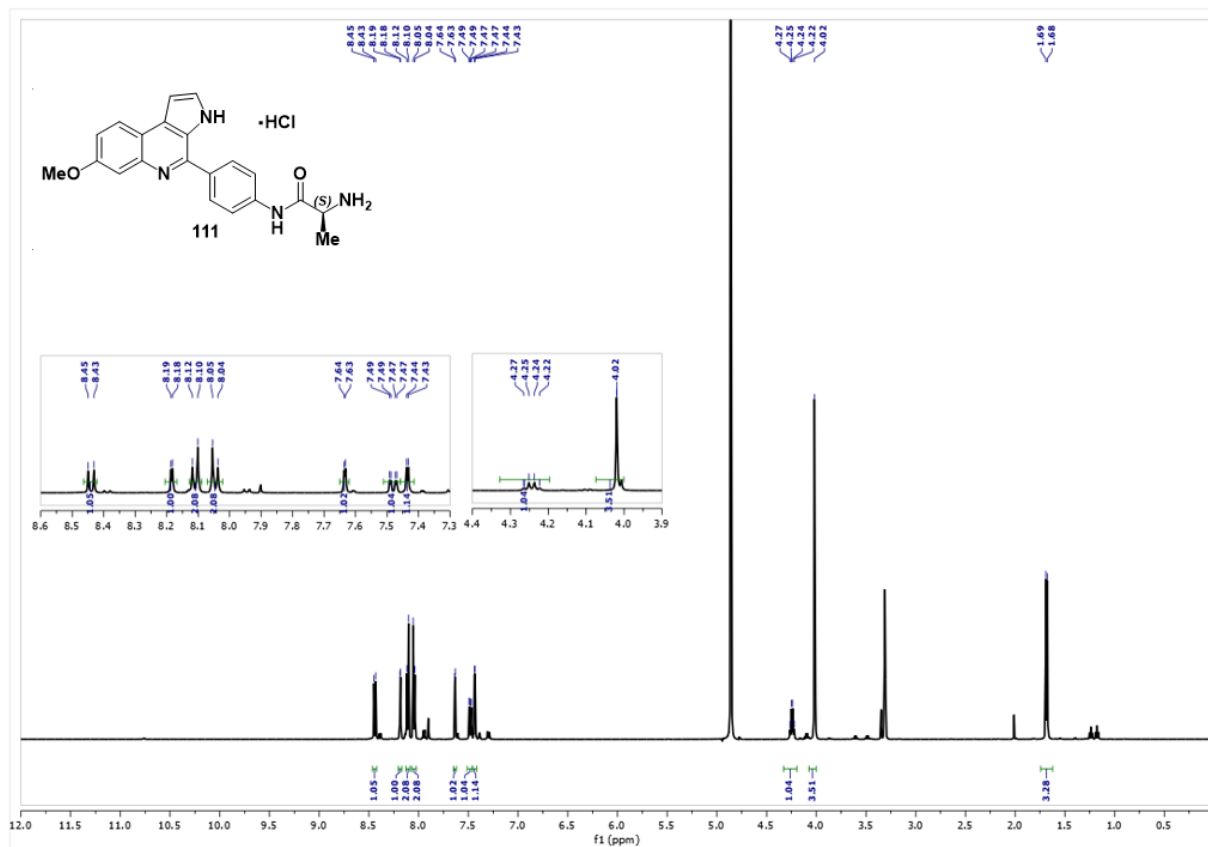
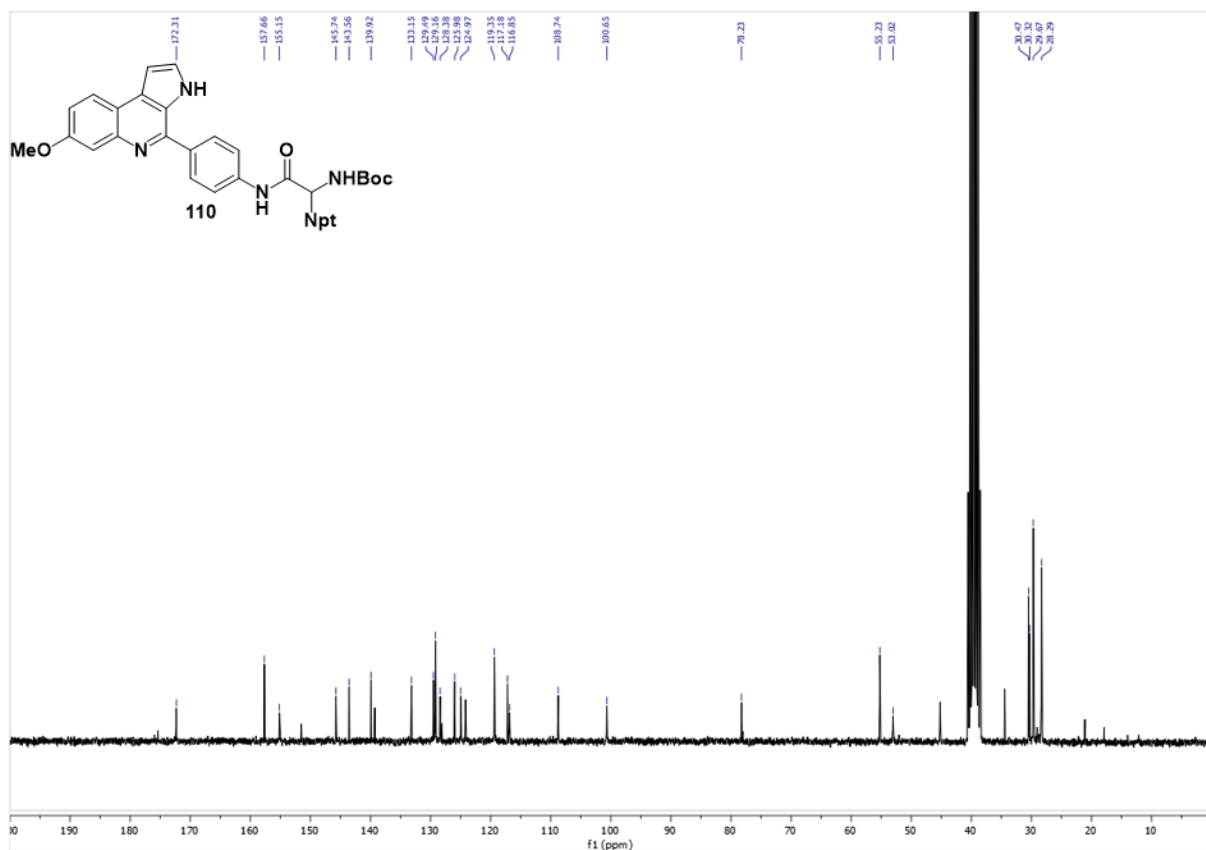


C/H	¹ H δ (ppm) (m, J in Hz)	¹³ C/HSQC δ (ppm)	HMBC
1	3,90 (s)	55,2	-
2	-	157,8	H7
3	7,19 (dd, J = 8,9, 2,5 Hz)	117,0	H4, H7
4	7,48 (d, J = 2,4 Hz)	108,2	-
5	-	116,9	-
6	-	142,9	H7
7	8,19 (d, J = 8,9 Hz)	124,2	-
8	-	125,8 (125,9)	H11, H12
9	-	145,4	H15
10	-	129,1	H7, H12, H15
11	7,12 (s)	100,8	-
12	7,59 (t, J = 2,6 Hz)	129,3	-
13	11,80 (brs)	-	-

14	-	140,2	H15, H16
15	8,02 (d, J = 8,5 Hz)	129,8	-
16	7,89 (d, J = 8,6 Hz)	119,2 (119,1)	-
17	-	132,4 (132,3)	H16
18	10,52 (10,49) (brs)	-	-
19	-	171,9 (171,4)	-
20	4,40 – 4,33 (m)	60,5 (60,1)	-
21	3,49 – 3,32 (m)	46,6 (46,8)	
22	2,36 – 2,13 (m)	31,1 (30,3)	-
23	2,00 – 1,75 (m)	23,5 (24,0)	
24	-	153,2 (153,7)	-
25	-	78,6 (78,7)	H26
26	1,41 (1,31) (s)	28,0 (28,2)	-



Espectro de RMN de ^1H do composto **110** (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



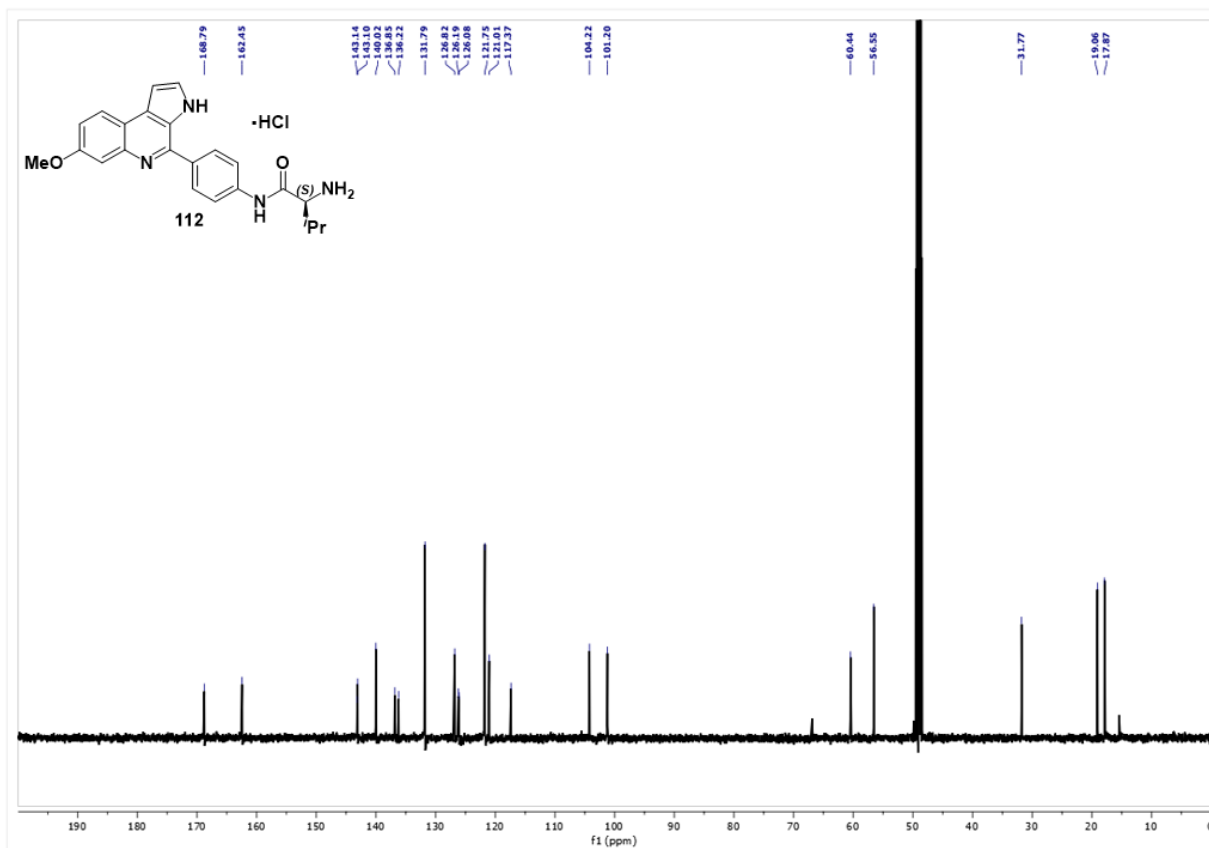
Chemical structure of compound 112 is shown in the top right corner. The structure is a 4-(4-methoxy-1H-indolizin-2-yl)-N-((S)-1-aminopropan-2-yl)benzamide hydrochloride salt. The structure is labeled 112 and includes the chemical formula MeO , NH , HCl , and NH_2 .

The ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6) shows the following peaks (ppm):

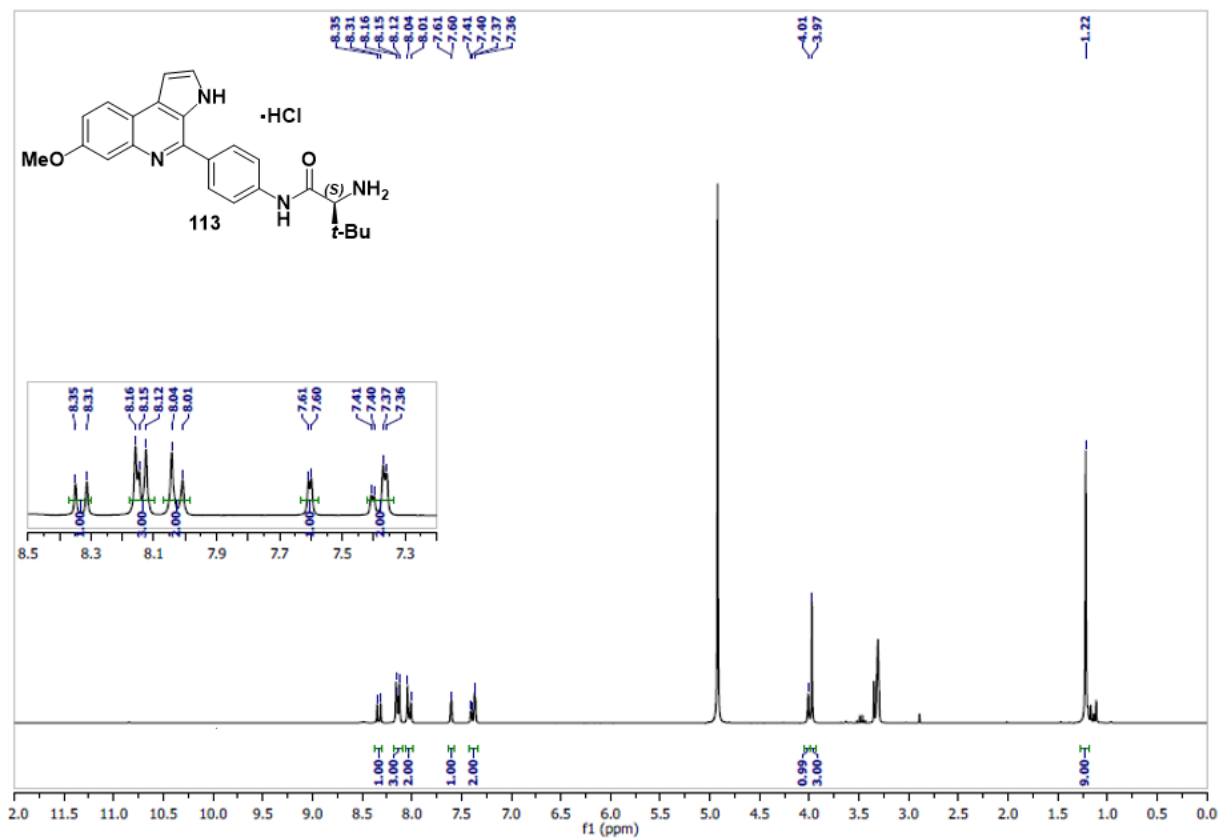
- 11.5 (broad, NH)
- 8.39, 8.38, 8.37, 8.36, 8.17, 8.16, 8.15, 8.14, 8.13, 8.03, 7.65, 7.65, 7.43, 7.42, 7.42, 7.41, 7.41, 7.41, 7.39, 7.39
- 4.07, 4.06, 3.99
- 2.46, 2.45, 2.45, 2.43, 2.41, 2.38, 2.38, 2.37
- 1.20, 1.18, 1.16, 1.14

The spectrum is labeled with the chemical shift (ppm) on the x-axis, ranging from 0.5 to 12.0.

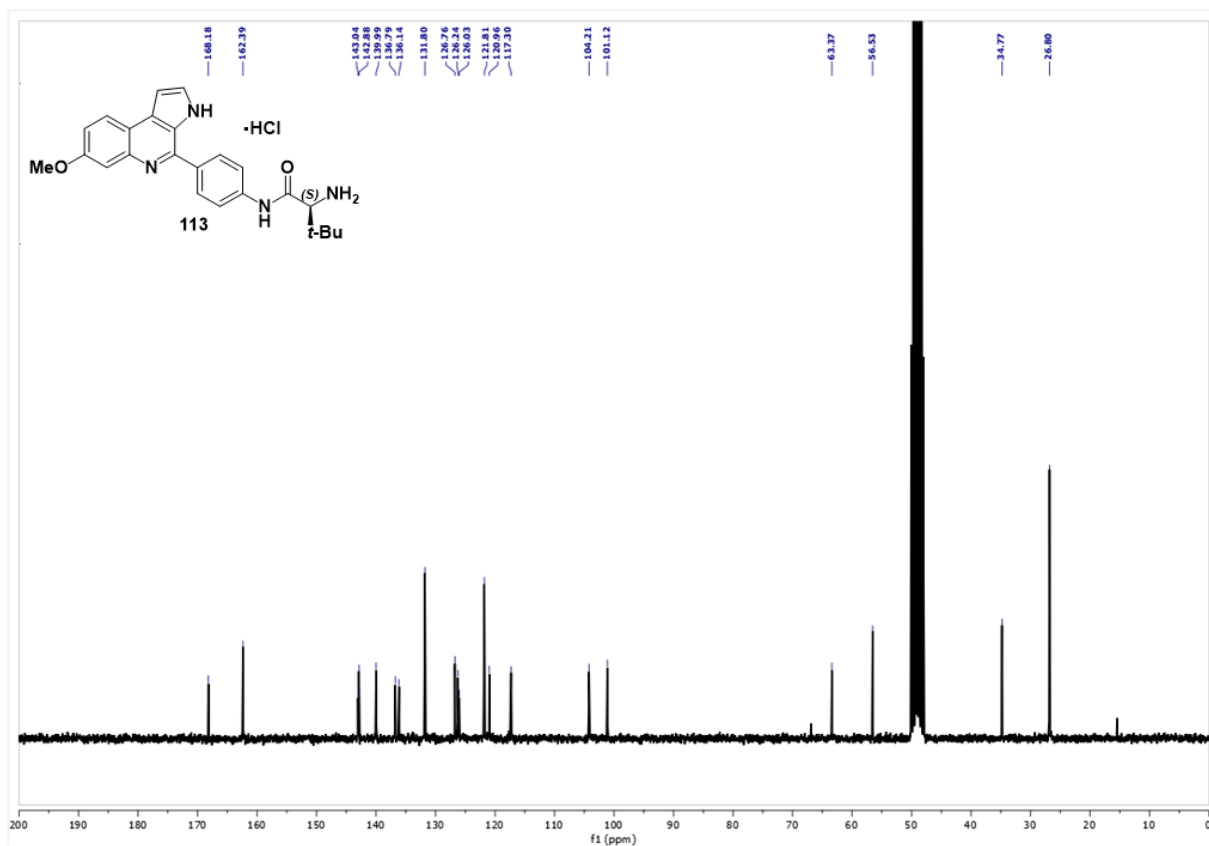
Espectro de RMN de ^1H do composto **112** (500 MHz, MeOD).



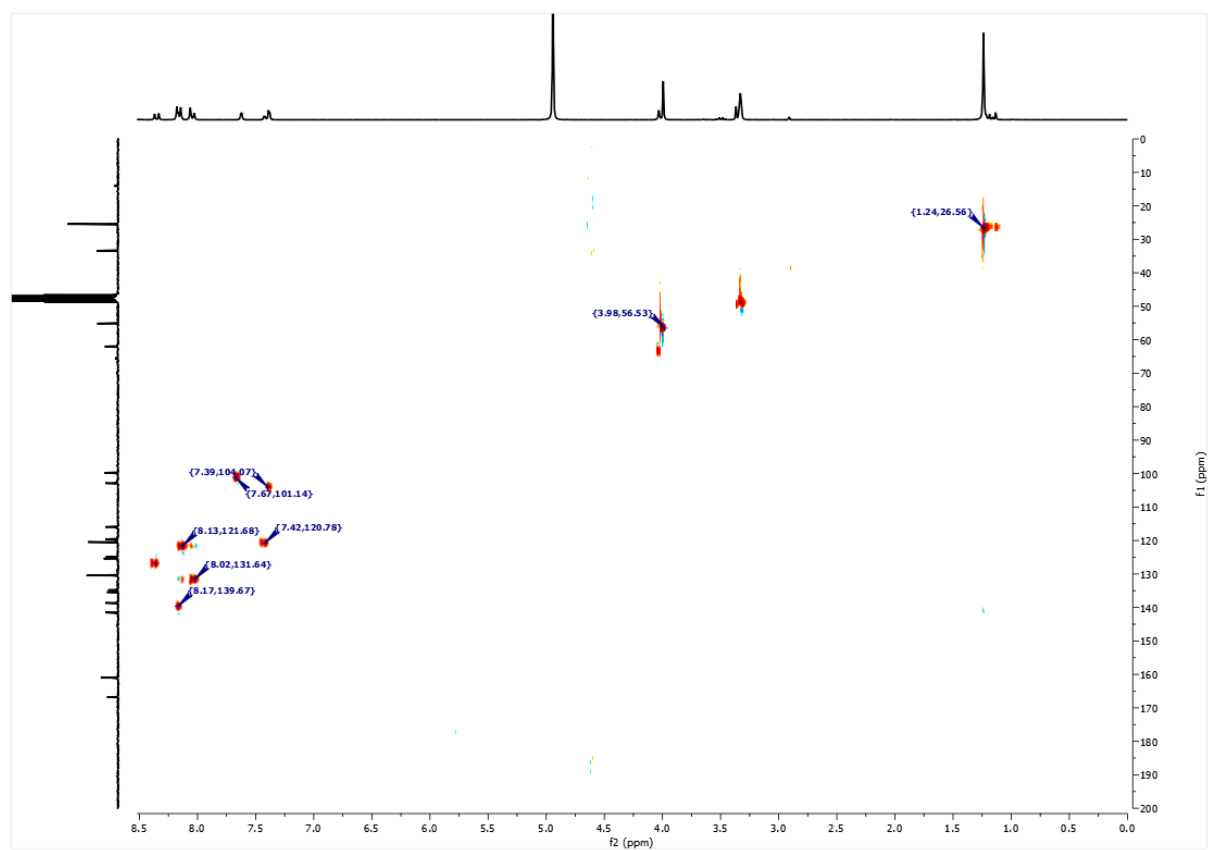
Espectro de RMN de ¹³C do composto **112** (126 MHz, MeOD).



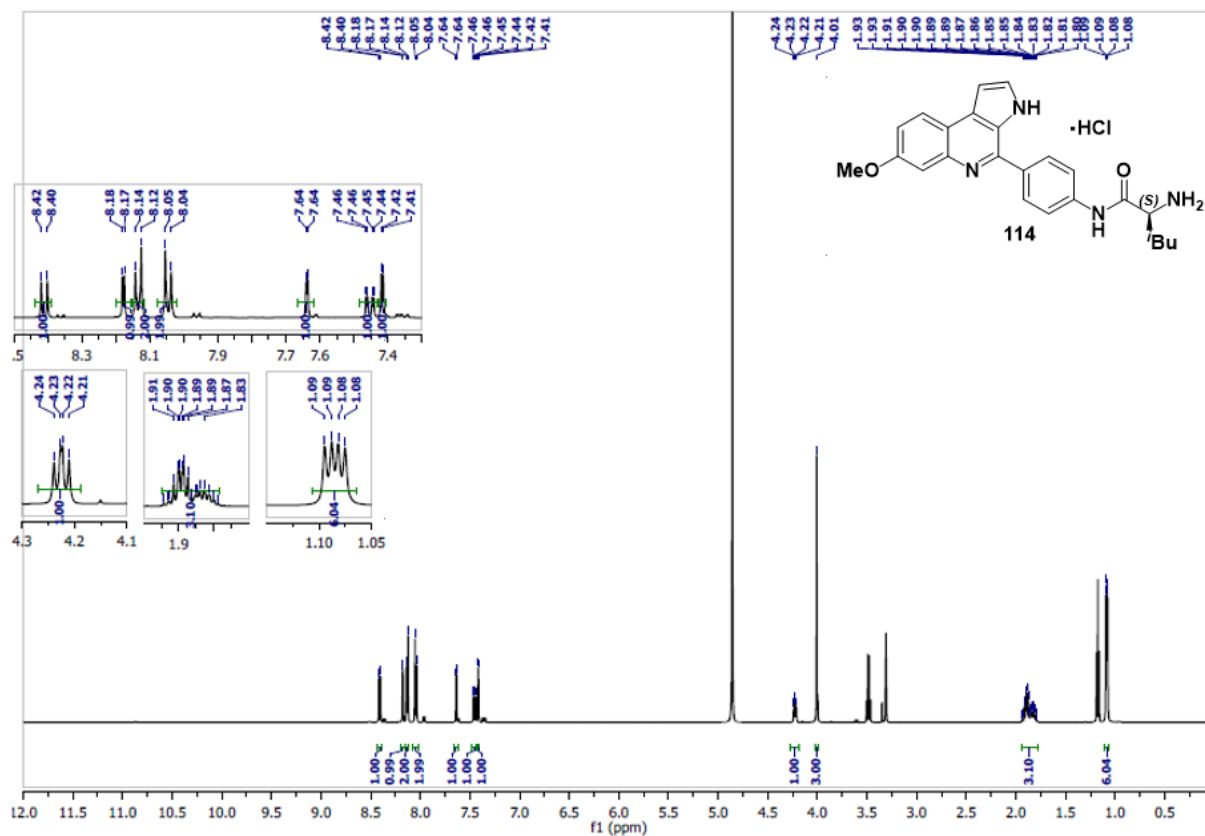
Espectro de RMN de ¹H do composto **113** (250 MHz, MeOD).



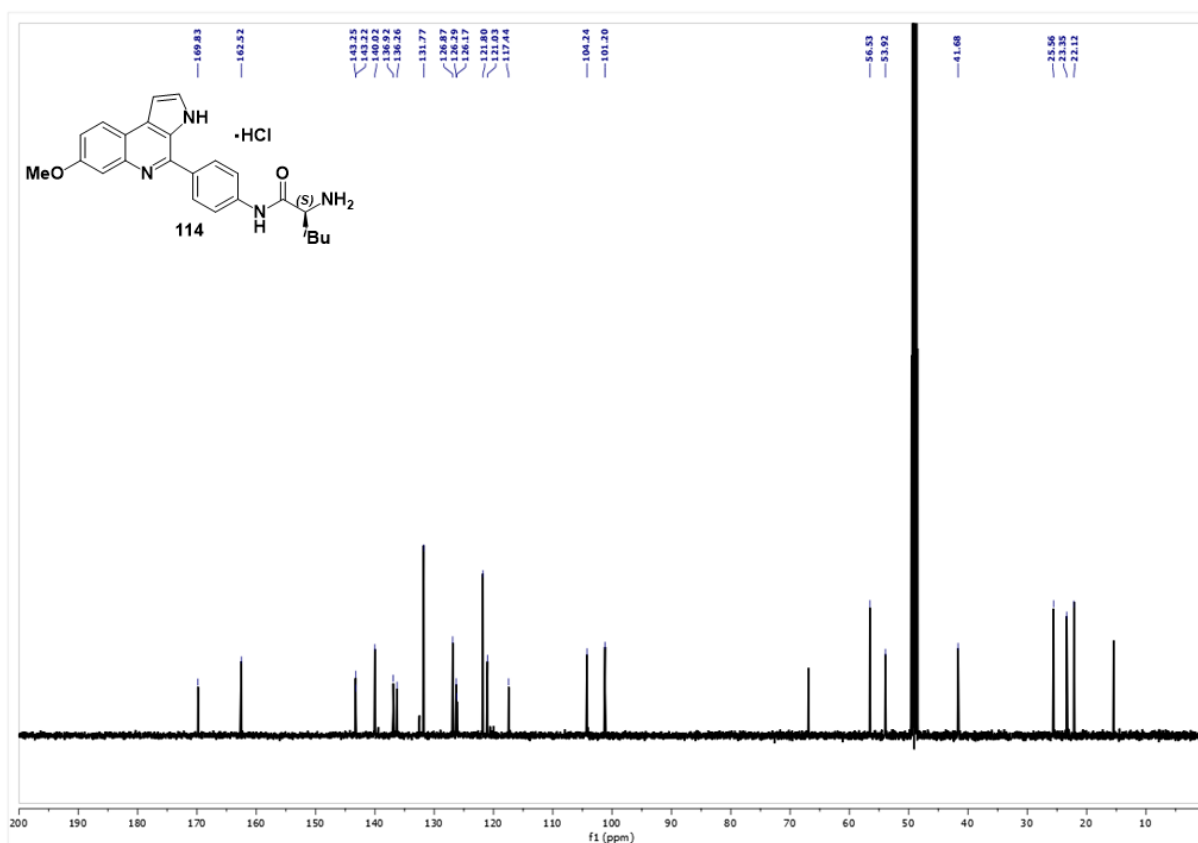
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **113** (63 MHz, MeOD).

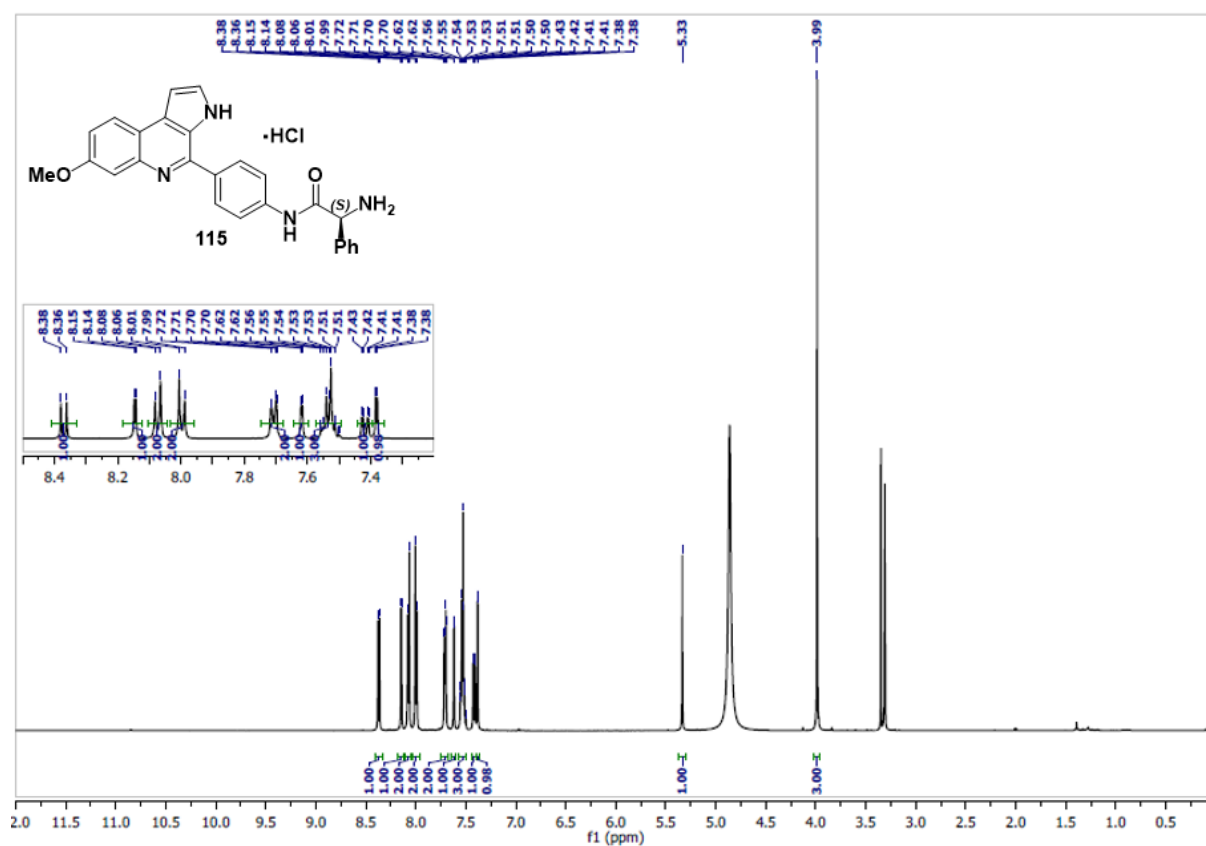
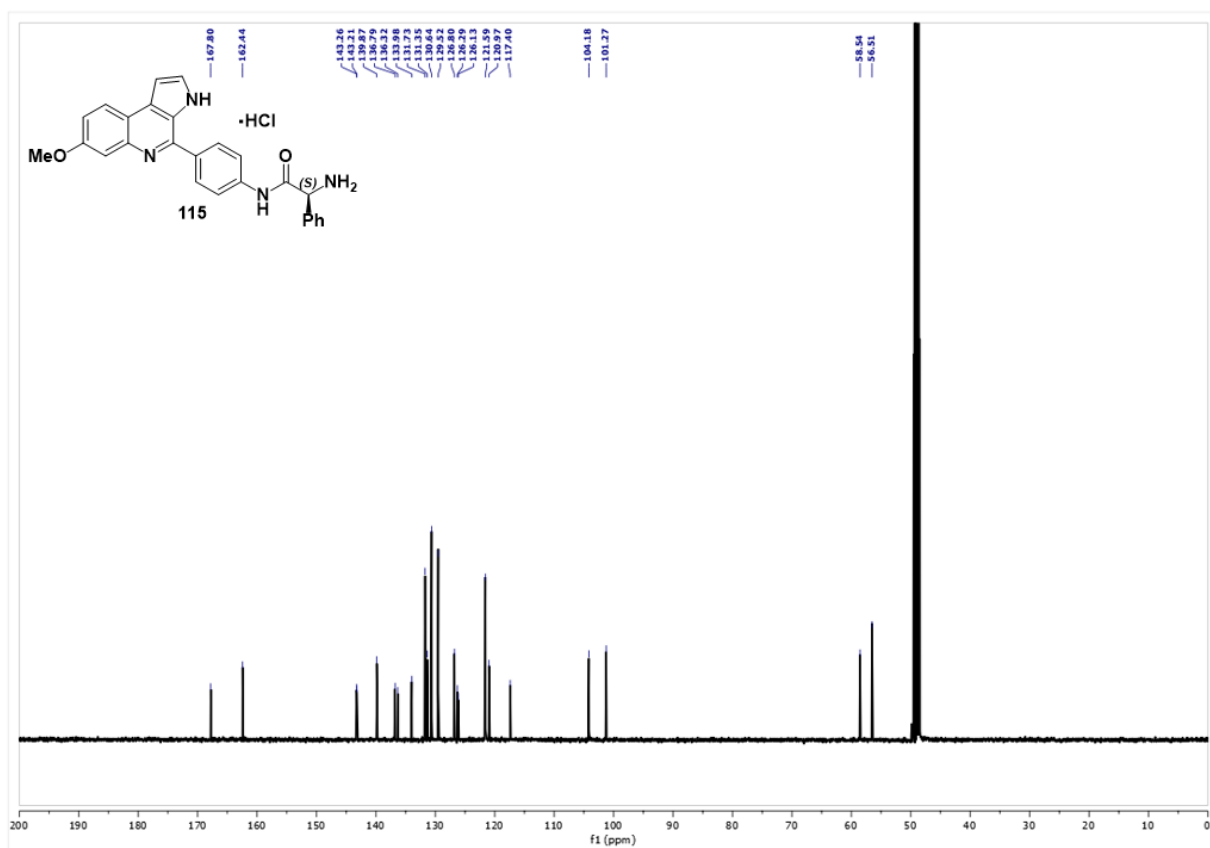


Mapa de contorno de HSQC do composto **113** (250 MHz, MeOD).

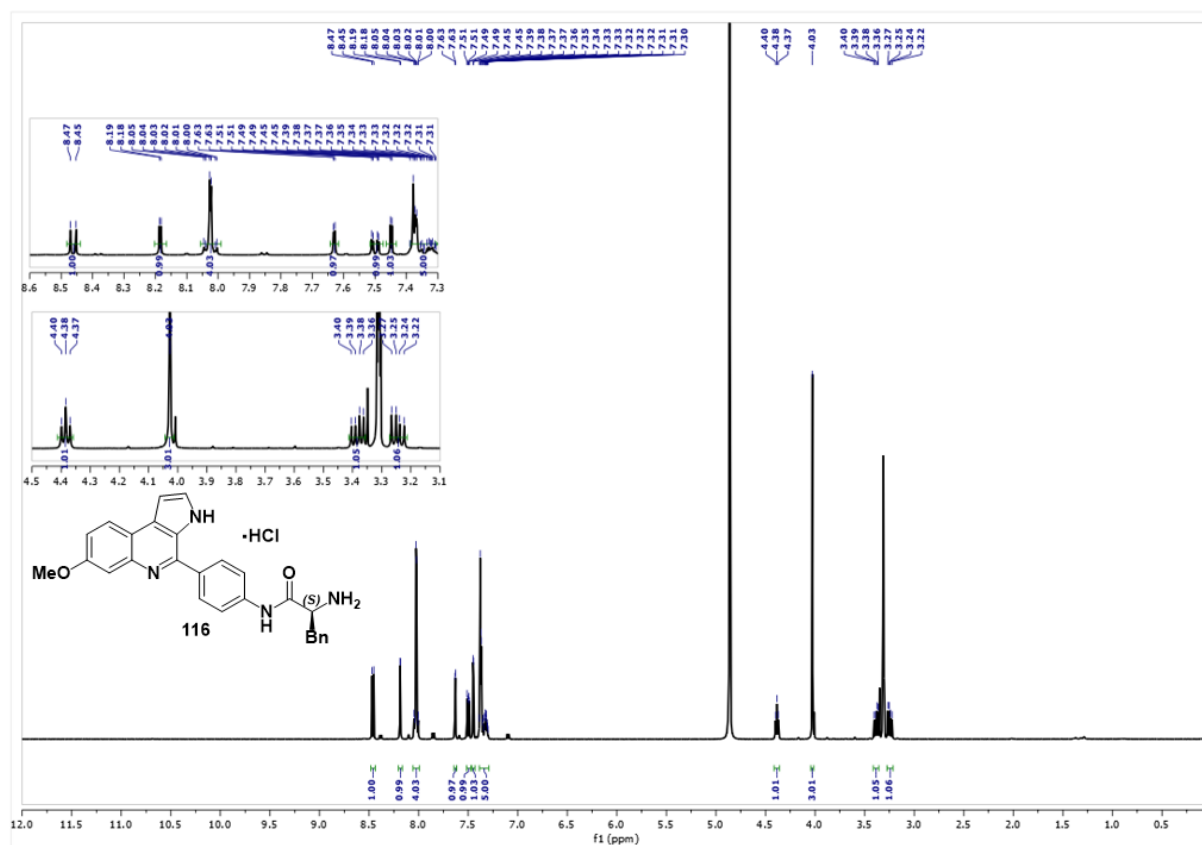


Espectro de RMN de ^1H do composto **114** (500 MHz, MeOD).

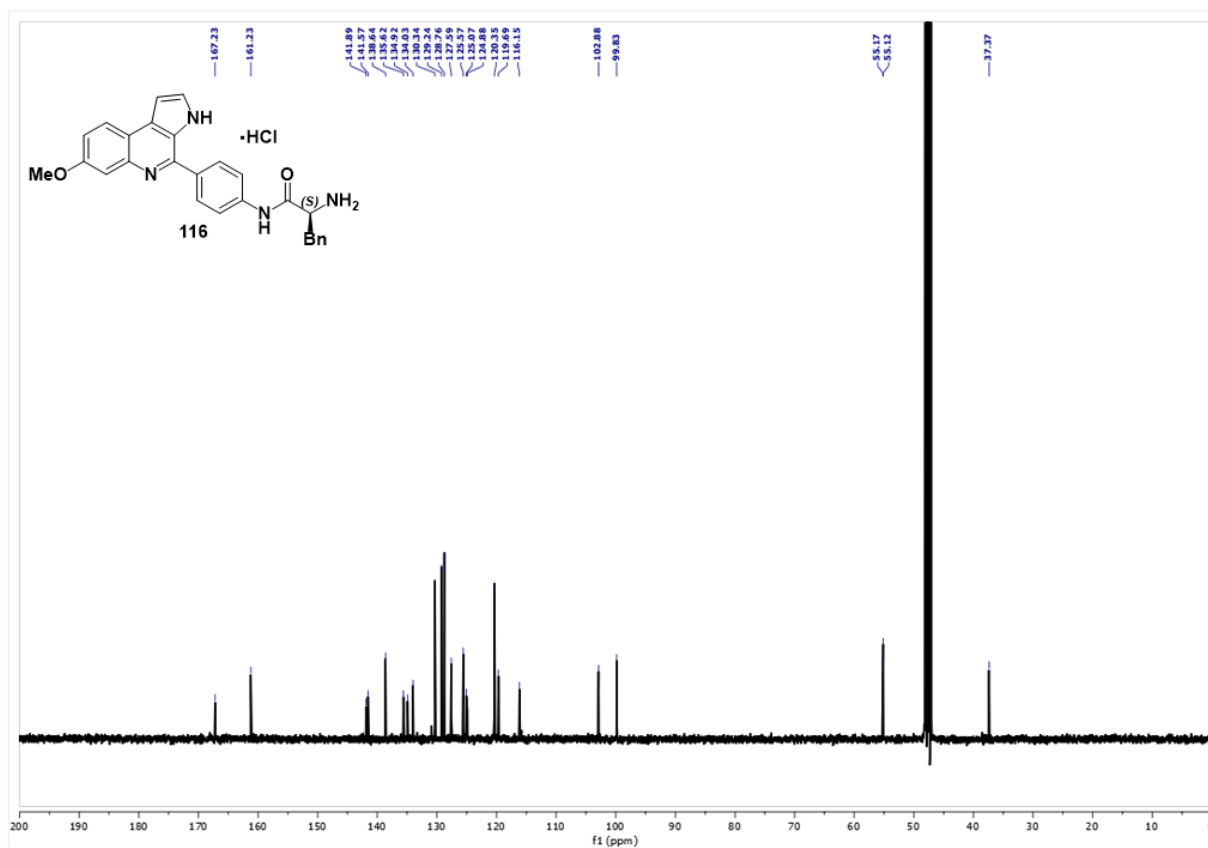


Espectro de RMN de ^{13}C do composto **114** (126 MHz, MeOD).Espectro de RMN de ^1H do composto **115** (500 MHz, MeOD).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **115** (126 MHz, MeOD).



Espectro de RMN de ^1H do composto **116** (500 MHz, MeOD).



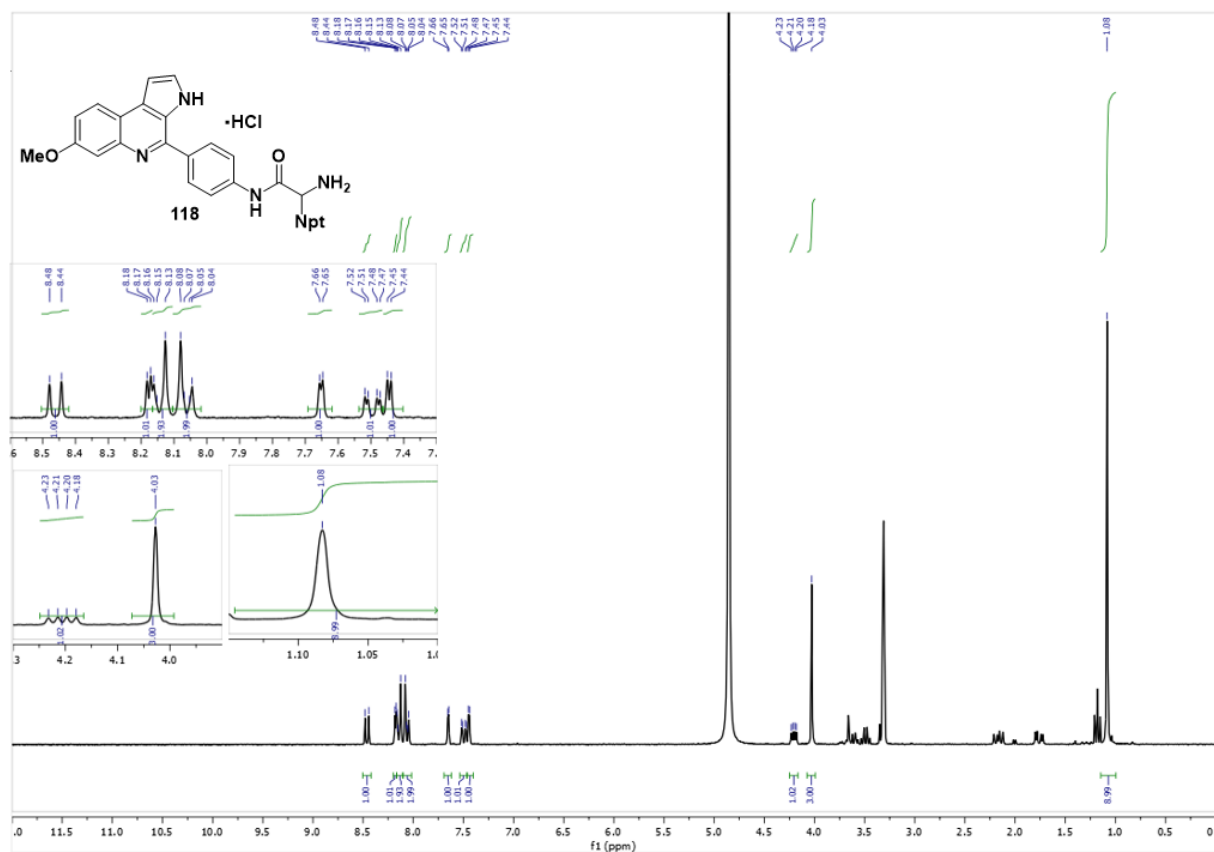
Espectro de RMN de ^{13}C do composto **116** (126 MHz, MeOD).

Chemical structure of compound 117 is shown above the spectrum. The structure is a 6-methoxy-3-(4-(pyrrolidin-2-ylcarbonyl)phenyl)indole-2-carboxamide hydrochloride salt, labeled 117.

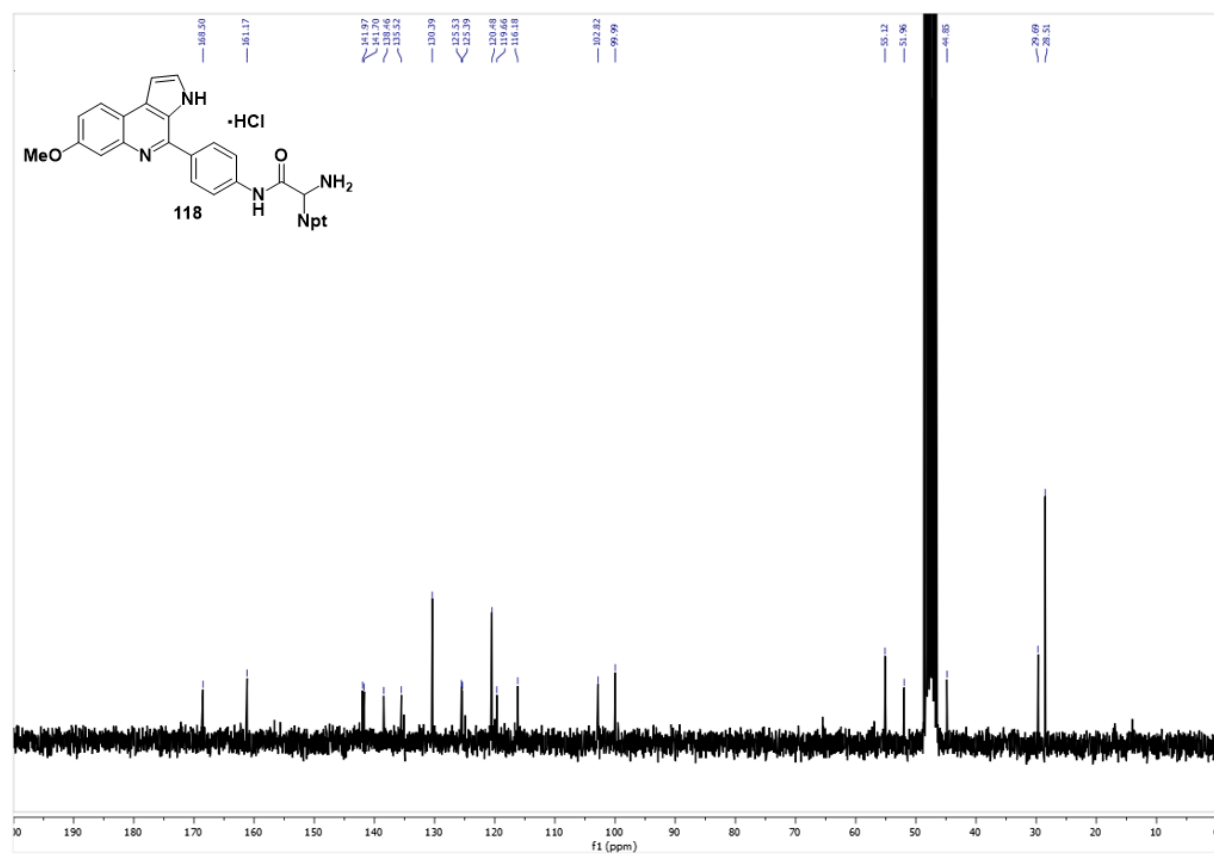
The ^{13}C NMR spectrum (f1 (ppm)) shows the following chemical shifts (ppm):

- 168.62
- 162.59
- 143.25
- 140.03
- 138.66
- 136.39
- 131.78
- 126.92
- 126.36
- 126.23
- 121.70
- 121.06
- 117.50
- 104.26
- 101.21
- 61.99
- 56.52
- 47.60
- 31.14
- 25.15

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **117** (126 MHz, MeOD).



Espectro de RMN de ¹H do composto **118** (250 MHz, MeOD).



Espectro de RMN de ¹³C do composto **118** (63 MHz, MeOD).

[illegible]

Espectro de RMN de ^1H do composto **120** (250 MHz, MeOD).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WHO – *Guidelines for the treatment of malaria*, 3^a ed. **2015**. Disponível online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf;jsessionid=E7C686B27179E9BE5ACA609D151A571E?sequence=1 (acessado em 27/06/2020).
- [2] White, N. J.; Pukrittayakamee, S.; Hien, T. T.; Faiz, M. A.; Mokuolu, O. A. & Dondorp, A. M. Malaria. *Lancet* **383**, 723–735 (2014).
- [3] Steketee, R. W.; Nahlen, B. L.; Parise, M. E. & Menendez, C. The Burden of Malaria in Pregnancy in Malaria-Endemic Areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**, 36–44 (2001).
- [4] WHO – *World Malaria Report 2021*. Disponível online: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021> (acessado em 14/03/2022).
- [5] Pina-Costa, A.; Brasil, P.; Di Santi, S. M.; de Araujo, M. P.; Suárez-Mutis, M. C.; Santelli, A. C. F. S.; Oliveira-Ferreira, J.; Lourenço-de-Oliveira, R. & Daniel-Ribeiro, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**, 618–634 (2014).
- [6] Ferreira, M. U. & Castro, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar. J.* **15**, 284 (2016).
- [7] Barbosa, S.; Gozze, A. B.; Lima, N. F.; Batista, C. L.; Bastos, M. S.; Nicolete, V. C.; Fontoura, P. S.; Gonçalves, R. M.; Viana, S. A. S.; Menezes, M. J.; Scopel, K. K. G.; Cavasini, C. E.; Malafronte, R. S.; Silva-Nunes, M.; Vinetz, J. M.; Castro, M. C. & Ferreira M. U. Epidemiology of Disappearing Plasmodium vivax Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3109 (2014).
- [8] Malaria Vaccine Initiative. Disponível online: <https://www.malariavaccine.org> (acessado em 01/06/2019).
- [9] Cowman, A. F.; Healer, J.; Marapana, D.; Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **167**, 610–624 (2016).
- [10] Baer, K.; Klotz, C.; Kappe, S. H. I.; Schnieder, T. & Frevert, U. Release of Hepatic Plasmodium yoelii Merozoites into the Pulmonary Microvasculature. *Plos Pathog.* **3**, e171 (2007).
- [11] Egan, T. J. J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *Inorg. Biochem.* **102**, 1288–1299 (2008).

- [12] Sachs, J. & Malaney, P. The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**, 680–685 (2002).
- [13] Guyatt, H L. & Snow, R. W. The epidemiology and burden of Plasmodium falciparum-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**, 36–44 (2001).
- [14] Eisele, T. P.; Larsen, D. & Steketee, R. W. Protective efficacy of interventions for preventing malaria mortality in children in Plasmodium falciparum endemic areas. *Int. J. Epidemiol.* **39**, i88–i101 (2010).
- [15] Kurtovik, L.; Boyle, M. J.; Opi, D. H.; Kennedy, A. T.; Tham, W.-H.; Reiling, L.; Chan, J.A. & Beeson, J. G. Complement in malaria immunity and vaccines. *Immunol. Rev.* **293**, 38–56 (2020).
- [16] França, T. C. C.; dos Santos, M. G. & Figueroa-Villar, J. D. Malaria: historical aspects and chemotherapy. *Quim. Nova* **31**, 1271–1278 (2008).
- [17] Wells, T. N. C.; van Huijsduijnen, R. H. & Voorhis, W. C. V. Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Disc.* **14**, 424–442 (2015).
- [18] Parhizgar, A. R. & Tahghighi, A. Introducing New Antimalarial Analogues of Chloroquine and Amodiaquine: A Narrative Review. *Iran. J. Med. Sci.* **42**, 115–128 (2017).
- [19] Alven, S. & Aderibigbe, B. Combination Therapy Strategies for the Treatment of Malaria. *Molecules* **24**, 3601 (2019).
- [20] Al-Bari, A. A. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *J. of Antimicrob. Chemother.* **70**, 1608–1621 (2015).
- [21] Kumar, S.; Guha, M.; Choubey, V.; Maity, P. & Bandyopadhyay, U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sci.* **80**, 813–828 (2007).
- [22] Egan, T. J. Haemozoin formation as a target for the rational design of new antimalarials. *Drug Design Rev.* **1**, 93–110 (2004).

- [23] Camarda, G.; Jirawatcharadech, P.; Priestley, R. S.; Saif, A.; March, S.; Wong, M. H. L.; Leung, S.; Miller, A. B.; Baker, D. A.; Alano, P.; Paine, M. J. I.; Bhatia, S. N.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A. & Biagini, G. A. Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. *Nature Commun.* **10**, 3226 (2019).
- [24] Ashley, E. A.; Recht, J. & White, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. *Malar. J.* **13**, 418 (2014).
- [25] Ratner, M. FDA approves first single-dose antimalarial *Nat. Biotechnol.* **36**, 785 (2018).
- [26] Achan, J.; Talisuna, A. O.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J. K.; Baliraine, F. N.; Rosenthal, P. J. & D'Alessandro, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar. J.* **10**, 144 (2011).
- [27] Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **17**, 1217–1220 (2011).
- [28] White, N. J.; Hien, T. T. & Nosten, F. H. A Brief History of Qinghaosu. *Trends Parasitol.* **31**, 607–610 (2015).
- [29] Sun, J.; Li, C. & Wang, S. Organism-like formation of Schistosoma hemozoin and its function suggest a mechanism for anti-malarial action of artemisinin. *Sci. Rep.* **6**, 34463 (2016).
- [30] Shandilya, A.; Chacko, S.; Jayaram, B. & Ghosh, I. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. *Sci. Rep.* **3**, 2513 (2013).
- [31] Eastman, R. T. & Fidock, D. A. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 684–874 (2009).
- [32] Nixon, G. L.; Moss, D. M.; Shone, A. E.; Laloo, D. G.; Fisher, N.; O'Neil, P. M.; Ward, S. A. & Biagini, G. A. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 977–985 (2013).
- [33] McKeage, K. & Scott, L. J. Atovaquone/proguanil: a review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Drugs* **63**, 597–623 (2003).
- [34] Maskin, E.; Monga, C.; Thuilliez, J. & Berthélemy, J. C. The economics of malaria control in an age of declining aid. *Nat. Comm.* **10**, 2269 (2019).

- [35] Ashley, E. A.; Dhorda, M.; Fairhurst, R. M.; Amaratunga, C.; Lim, P.; Suon, S.; Sreng, S.; Anderson, J. M.; Mao, S.; Sam, B.; Sopha, C.; Chuor, C. M.; Nguon, C.; Sovannaroeth, S.; Pukrittayakamee, S.; Jittamala, P.; Chotivanich, K.; Chutasmit, K.; Suchatsoonthorn, C.; Runchaoen, R.; Hien, T. T.; Thuy-Nhien, N. T.; Thanh, N. V.; Phu, N. H.; Htut, Y.; Han, K-T.; Aye, K. H.; Mokuolu, O. A.; Olaosebikan, R. R.; Folaranmi, O. O.; Mayxay, M.; Khanthavong, M.; Hongvanthong, B.; Newton, P. N.; Onyamboko, M. A.; Fanello, C. I.; Tshefu, A. K.; Mishra, N.; Valecha, N.; Phyo, A. P.; Nosten, F.; Yi, P.; Tripura, R.; Borrmann, S.; Bashraheil, M.; Peshu, J.; Faiz, M. A.; Ghose, A.; Hossain, M. A.; Samad, R.; Rahman, M. R.; Hasan, M. M.; Islam, A.; Miotto, O.; Amato, R.; MacInnis, B.; Stalker, J.; Kwiatkowski, D. P.; Bozdech, Z.; Jeeyapant, A.; Cheah, P. Y.; Sakulthaew, T.; Chalk, J.; Intharabut, B.; Silamut, K.; Lee, S. J.; Vihokhern, B.; Kunasol, C.; Imwong, M.; Tarning, J.; Taylor, W. J.; Yeung, S.; Woodrow, C. J.; Flegg, J. A.; Das, D.; Smith, J.; Venkatesan, M.; Plowe, C. V.; Stepniewska, K.; Guerin, P. J.; Dondorp, A. M.; Day, N. P. & White, N. J. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N. Eng. J. Med.* **371**, 411–423 (2014).
- [36] Cohen, J. M.; Woolsey, A. M.; Sabot, O. J.; Gething, P. W.; Tatem, A. J. & Moonen, B. The fight against malaria: Diminishing gains and growing challenges. *Science* **338**, 612–614 (2022).
- [37] Pulcini, S., Staines, H., Lee, A., Shafik, S. H.; Bouyer, G.; Moore, C. M.; Daley, D. A.; Hoke, M. J.; Altenhofen, L. M.; Painter, H. J.; Mu, J.; Ferguson, D. J. P.; Llinás, M.; Martin, R. E.; Fidock, D. A.; Cooper, R. A. & Krishna, S. Mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, PfCRT, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities. *Sci. Rep.* **5**, 14552 (2015).
- [38] Bray, P. G.; Martin, R. E.; Tilley, L.; Ward, S. A.; Kirk, K. & Fidock, D. A. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol. Microbiol.* **56**, 323–333 (2005).
- [39] Haldar, K.; Bhattacharjee, S. & Safeukui, I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 156–170 (2018).
- [40] Siddiqui, F. A.; Boonhok, R.; Cabrera, M.; Gaele, H.; Mbenda, N.; Wang, M.; Min, H.; Liang, X.; Qin, J.; Zhu, X.; Miao, J.; Ção, Y. & Cui, L. Role of *plasmodium*

falciparum kelch 13 protein mutations in p. Falciparum populations from northeastern myanmar in mediating artemisinin resistance. *mBio* **11**, e01134–19 (2020).

[41] Blasco, B.; Leroy, D. & Fidock, D. Antimalarial drug resistance: linking Plasmodium falciparum parasite biology to the clinic. *Nat. Med.* **23**, 917–928 (2017).

[42] Mishra, B. B.; Kumar, D.; Mishra, A.; Mohapatra, P. P. & Tiwari, V. K. Cyclo-release strategy in solid-phase combinatorial synthesis of heterocyclic skeletons. *Adv. Heterocyc. Chem.* **107**, 41–99 (2012).

[43] de Sá Alves, F. R.; Barreiro, E. J. & Fraga, C. A. From nature to drug discovery: the indole scaffold as a 'privileged structure'. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 782–793 (2009).

[44] Van Order, R. B. & Lindwall, H. G. Indole. *Chem. Rev.* **30**, 69–96 (1942).

[45] Prajapati, S. M.; Patel, K. D.; Vekariya, R. H.; Panchala, S. N. & Patel, H. D. Recent advances in the synthesis of quinolines: a review. *RSC Adv.* **4**, 24463–24476 (2014).

[46] Robinson, G. M. & Robinson, R. C.—The mechanism of E. Fischer's synthesis of indoles. Application of the method to the preparation of a pyrindole derivative. *J. Chem. Soc., Trans.* **125** 827–840 (1924).

[47] K.-Opas, A.; Panphon, S.; Fun, H-K. & Chantrapromma, S. 4-Methyl-3*H*-pyrrolo [2, 3-*c*] quinoline. *Acta Cryst.* **E62**, o2728–o2730 (2006).

[48] Srisukchayakul, P.; Suwanachart, C.; Sangnoi, Y.; Kanjana-Opas, A.; Hosoya, S.; Yokota, A. & Arunpairojana, V. *Rapidithrix thailandica* gen. nov., sp nov., a marine gliding bacterium isolated from samples collected from the Andaman sea, along the southern coastline of Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **57**, 2275–2279 (2007).

[49] Okanya, P. W.; Mohr, K. I.; Gerth, K.; Jansen, R. & Muller, R. Marinoquinolines A-F, pyrroloquinolines from *Ohtaekwangia kribbensis* (Bacteroidetes). *J. Nat. Prod.* **74**, 603–608 (2011).

[50] Choi, E. J.; Nam, S-J.; Paul, L.; Beatty, D.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R. & Fenical, W. Previously Uncultured Marine Bacteria Linked to Novel Alkaloid Production. *Chem. Biol.* **22**, 1270–1279 (2015).

- [51] Carroll, A. R.; Duffy, S. & Avery, V. M.; Aplidiopsamine A, an antiplasmodial alkaloid from the temperate Australian ascidian, *Aplidiopsis confluata*. *J. Org. Chem.* **75**, 8291–8294 (2010).
- [52] Li, S-F.; Di, Y-T.; He, H-P.; Zhang, Y.; Wang, Y-H.; Yin, J-L.; Tan, C-J.; Li, S-L. & Hao, X-J. Trigonoines A and B, two novel alkaloids from the leaves of *Trigonostemon* lili. *Tetrahedron Lett.* **52**, 3186–3188 (2011).
- [53] Mevers, E.; Saurí, J.; Helfrich, E. J. N.; Henke, M.; Barns, K. J.; Bugni, T. S.; Andes, D.; Currie, C. R. & Clardy, J. Pyonitrins A–D: Chimeric Natural Products Produced by *Pseudomonas protegens*. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 17098–17101 (2019).
- [54] Sangnoi, Y.; Sakulkeo, O.; Yuenyongsawad, S.; Kanjana-opas, A.; Ingkaninan, K.; Plubrukarn, A. & Suwanborirux, K. Acetylcholinesterase-Inhibiting Activity of Pyrrole Derivatives from a Novel Marine Gliding Bacterium, *Rapidithrix thailandica*. *Mar. Drugs* **6**, 578–586 (2008).
- [55] Arima, K.; Imanaka, H.; Kousaka, M.; Fukuta, A. & Tamura, G. Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of pyrrolnitrin. *J. Antibiot.* **18**, 201–204 (1965).
- [56] Pée, K.-H. Biosynthesis of Halogenated Alkaloids. In *The Alkaloids: chemistry and biology*, Hans-Joachim Knölker, H.-J., 1 Ed.; Elsevier Inc: Cambridge, 2012, pp. 167–210.
- [57] Malve, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **8**, 83–91 (2016).
- [58] Atkinson, C. M. & Mattocks, A. R. 733. Triazaphenanthrenes. Part II. Derivatives of 10-phenyl- 1 : 2 : 9-triazaphenanthrene. *J. Chem. Soc.* 3722–3726 (1957).
- [59] Govindachari, T. R.; Rajappa, S. & Sudarsanam, V. Condensed pyrrole compounds-I : 3H-pyrrolo(2,3,-c)quinolines. *Tetrahedron* **16**, 1–4 (1961).
- [60] Parrick, J. & Wilcox, R. Convenient routes to pyrrolo[3,2-b]-, pyrrolo[3,2-c]-, and pyrrolo[2,3-c]-quinolines, and a study of the pyrolysis of 2-quinolylhydrazones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **19**, 2121–2125 (1976).

- [61] Molina, P.; Alajarín, M. & Sánchez-Andrada, P. A facile synthesis of some new 3H-pyrrolo[2,3-c]quinoline derivatives from 4-formyl-quinolines. *Synthesis* **2**, 225–228 (1993).
- [62] Ni, L.; Li, Z.; Wu, F.; Xu, J.; Wu, X.; Kong, L. & Yao, H. Concise total syntheses of Marinoquinolines A–C. *Tetrahedron Lett.* **53**, 1271–1274 (2012).
- [63] Smith, N. D.; Huang, D. & Cosford, N. D. P. One-Step Synthesis of 3-Aryl- and 3,4-Diaryl-(1H)-Pyrroles Using Tosylmethyl Isocyanide (TOSMIC). *Org. Lett.* **4**, 3537–3539 (2002).
- [64] Guillon, J.; Moreau, S.; Desplat, V.; Vincenzi, M.; Pinaud, N.; Savrimoutou, S.; Rubio, S.; Ronga, L.; Rossi, F. & Marchivie, M. Synthesis, crystal structure and anti-leukemic activity of 4-{4-[(4-(2-Oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)benzyl]}-3-phenyl-3H-pyrrolo[2,3-c]quinoline. *J. Chem. Cryst.* **49**, 106–112 (2019).
- [65] Schwalm, C. S. & Correia, C. R. D. Divergent total synthesis of the natural antimalarial marinoquinolines A, B, C, E and unnatural analogues. *Tetrahedron Lett.* **53**, 4836–4840 (2012).
- [66] Lustosa, D. M. Estudo da arilação enantiosseletiva de 3-pirrolinas N-protegidas via reação de Heck-Matsuda. Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2014.
- [67] Taylor, J. G.; Moro, A. V. & Correia, C. R. D. Evolution and Synthetic Applications of the Heck–Matsuda Reaction: The Return of Arenediazonium Salts to Prominence. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1403–1428 (2011).
- [68] Kurti, L.; Czako, B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis; Elsevier Academic Press: New York, 2005. 204.
- [69] Hati, S.; Holzgrabe, U. & Sen, S. Oxidative dehydrogenation of C–C and C–N bonds: A convenient approach to access diverse (dihydro)heteroaromatic compounds. *Beilstein J. Org. Chem.* **13**, 1670–1692 (2017).
- [70] Ma, X.; Vo, Y.; Banwell, M. G. & Willis, A. C. Total Synthesis of Marinoquinoline A Using a Palladium(0)-Catalyzed Ullmann Cross-Coupling Reaction. *Asian J. Org. Chem.* **1**, 160–165 (2012).

- [71] Panarese, J. D. & Lindsley, C. W. Biomimetic synthesis and biological evaluation of aplidiopsamine A. *Org. Lett.* **14**, 5808–5810 (2012).
- [72] Martin, R. & Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions Employing Dialkylbiaryl Phosphine Ligands. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1461–1473 (2008).
- [73] Maimone, T. J.; Milner, P. J.; Kinzel, T.; Zhang, Y.; Takase, M. K. & Buchwald, S. L. Evidence for in Situ Catalyst Modification during the Pd-Catalyzed Conversion of Aryl Triflates to Aryl Fluorides. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18106–18109 (2011).
- [74] Patel, B. & Hilton, S. T. Simple and Highly Efficient Synthesis of Indolo- and Pyrrolo[1,2-a]quinoxalines Promoted by Molecular Iodine. *Synlett* **26**, 79–83 (2015).
- [75] Yamaoka, Y.; Yoshida, T.; Shinozaki, M.; Yamada, Ken-ichi. & Takasu, K. Development of a Brønsted Acid-Promoted Arene–Ynamide Cyclization toward the Total Syntheses of Marinoquinolines A and C and Aplidiopsamine A. *J. Org. Chem.* **80**, 957–964 (2015).
- [76] Men, Y.; Dong, J.; Wang, S. & Xu, X. Bicyclization of Azomethine Ylide: Access to Highly Functionalized 3H-Pyrrolo[2,3-c]quinolines. *Org. Lett.* **19**, 6712–6715 (2017).
- [77] Bao, L.; Liu, J.; Xu, L.; Hu, Z. & Xu, X. Direct C–H Trifluoromethylation of Quinoxalin-2(1H)-ones under Transition-Metal-Free Conditions. *Adv. Synth. Catal.*, **360**, 1870–1875 (2018).
- [78] Zou, F.; Pei, F.; Wang, L.; Ren, Z.; Cheng, X.; Sun, Y.; Wu, J. & He, P. Synthesis of 3H-Pyrrolo[2,3-c]quinoline by Sequential I₂-Promoted Cyclization/Staudinger/Aza-Wittig/Dehydroaromatization Reaction. *Synlett* **30**, 717–720 (2019).
- [79] Osano, M.; Jhaveri, D. P. & Wipf, P. Formation of 6-Azaindoles by Intramolecular Diels–Alder Reaction of Oxazoles and Total Synthesis of Marinoquinoline A. *Org. Lett.* **22**, 2215–2219 (2020).
- [80] do Espírito Santo, R. D.; Capitão, R. M.; Barbosa, P. S.; dos Santos, E. F. S. & Correia, C. R. D. The Chemistry and Biological Applications of 3H-Pyrrolo[2,3-c]quinolines and Marinoquinolines. *Asian. J. Org. Chem.* **10**, 1938–1957 (2021).
- [81] Alekseyev, R. S.; Aliyev, F. N. & Terenin, V. I. Methods for the synthesis of 3H-pyrrolo[2,3-c]quinolines. *Chem. Heterocycl. Comp.* **57**, 1155–1163 (2021).

- [82] Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**, 770–803 (2020).
- [83] Aguiar, A. C. C.; Panciera, M.; Santos, E. F. S.; Singh, M. K.; Garcia, M. L.; Souza, G. E.; Nakabashi, M.; Costa, J. L.; Garcia, C. R. S.; Oliva, G.; Correia, C. R. D. & Guido, R. V. C. Discovery of Marinoquinolines as Potent and Fast-Acting Plasmodium falciparum Inhibitors with in Vivo Activity. *J. Med. Chem.* **61**, 5547–5568 (2018).
- [84] Akula, M.; Sridevi, J. P.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. & Bhattacharya, A. New class of antitubercular compounds: synthesis and anti-tubercular activity of 4-substituted pyrrolo[2,3-c]quinolines. *Monatsh. Chem.* **145**, 811–819 (2014).
- [85] Panciera, M.; Lence, E.; Rodríguez, A.; Gracia, B.; Aínsa, J. A.; M.-Marín, C.; Rubio, V.; Correia, C. R. D. & G.-Bello, C. Discovery of 3H-pyrrolo[2,3-c]quinolines with activity against Mycobacterium tuberculosis by allosteric inhibition of the glutamate-5-kinase enzyme. *Eur. J. Med. Chem.* **232**, 114206 (2022).
- [86] Duffy B. C.; Zhu L.; Decornez H. & Kitchen D. B. Early phase drug discovery: cheminformatics and computational techniques in identifying lead series. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 5324–5342 (2012).
- [87] Gioiello, A.; Piccinno, A.; Lozza, A. M. & Cerra, B. The Medicinal Chemistry in the Era of Machines and Automation: Recent Advances in Continuous Flow Technology. *J. Med. Chem.* **63**, 6624–6647 (2020).
- [88] Camp, D.; Garavelas, A. & Campitelli, M. Analysis of Physicochemical Properties for Drugs of Natural Origin. *J. Nat. Prod.* **78**, 1370–1382 (2015).
- [89] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3–25 (1997).
- [90] Bunally, S. B.; Luscombe, C. N.; Young, R. J. Using Physicochemical Measurements to Influence Better Compound Design. *SLAS Discovery* **24**, 791–801 (2019).
- [91] Nogrady, T.; Weaver, D. F. Medicinal Chemistry: a molecular and biochemical approach. New York: Oxford University Press, 3. ed., p. 9-66, 2005.

- [92] Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C. & Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Disc.* **13**, 105–121 (2014).
- [93] Kenny, P. W. The nature of ligand efficiency. *J. Cheminform.* **8**, 1–18 (2019).
- [94] Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B. & Philpott K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1239–1249 (2011).
- [95] Burrows, J. N.; Duparc, S.; Gutteridge, W. E.; van Huijsduijnen, R. H.; Kaszubska, W.; Macintyre, F.; Mazzuri, S.; Möhrle, J. J. & Wells, T. N. C. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. *Malar. J.* **16**, 26 (2017).
- [96] The Pharmaceutical Journal, Drug development: the journey of a medicine from lab to shelf; Online. Disponível online: < <https://pharmaceutical-journal.com/article/feature/drug-development-the-journey-of-a-medicine-from-lab-to-shelf>> (acessado em: 30/03/22).
- [97] Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B. & Philpott K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1239–1249 (2011).
- [98] Benigni, R.; Bossa, C. & Tcheremenskaia, O. Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts. *Chem. Rev.* **113**, 2940–2957 (2013).
- [99] Benigni, R. & Bossa, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. *Chem. Rev.* **111**, 2507–2536 (2011).
- [100] Ghosh, A. K. & Brindisi, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **58**, 2895–2940 (2015).
- [101] Smilkstein, M.; Sriwilaijaroen, N.; Kelly, J. X.; Wilairat, P. & Riscoe, M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **48**, 1803–1806 (2004).
- [102] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods* **68**, 55–63 (1983).

- [103] Muchowski, J. M. & Solas, D. R. β -substituted pyrroles via electrophilic substitution of n-triisopropylsilylpyrrole. *Tetrahedron Lett.* **24**, 3455–3456 (1983).
- [104] Muchowski, J. M. & Naef, R. 3-Lithiopyrroles by Halogen-Metal Interchange of 3-Bromo-1-(triisopropylsilyl)pyrroles. Synthesis of Verucarín E and Other 3-Substituted Pyrroles. Preliminary Communication. *Helv. Chim. Acta* **67**, 1168–1172 (1984).
- [105] Bray, B. L.; Mathies, P. H.; Naef, R.; Solas, D. R.; Tidwell, T. T.; Artis, D. R. & Muchowski, J. M. N-(Triisopropylsilyl)pyrrole. A progenitor "par excellence" of 3-substituted pyrroles. *J. Org. Chem.* **55**, 6317–6328 (1990).
- [106] Virgil, S. C.; Jenkins, P. R.; Wilson, A. J.; García Romero, M. D. N-Bromosuccinimide. Em *e-EROS: Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; Fuchs, P. L., Ed.; Wiley, 2006.
- [107] Belen'kii, L. I.; Chuvylkin, N. D. & Nesterov, I. D. Positional selectivity in electrophilic substitution reactions of π -excessive heterocycles (review). *Chem. Heterocycl. Comp.* **48**, 241–257 (2012).
- [108] Albrecht, F.; Sowada, O.; Fistikci, M. & Boysen, M. M. K. Heteroarylboronates in Rhodium-Catalyzed 1,4-Addition to Enones. *Org. Lett.* **16**, 5212–5215 (2014).
- [109] Billingsley K. & Buchwald, S. L. Highly Efficient Monophosphine-Based Catalyst for the Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura Reaction of Heteroaryl Halides and Heteroaryl Boronic Acids and Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 3358–3366 (2007).
- [110] Biajoli, A. F. P.; Schwalm, C. S.; Limberger, J. & Claudino, T. S. Recent Progress in the Use of Pd-Catalyzed C-C Cross-Coupling Reactions in the Synthesis of Pharmaceutical Compounds *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 2186–2214 (2014).
- [111] Boström, J.; Brown, D. G.; Young, R. J. & Keserü, G. M. Expanding the medicinal chemistry synthetic toolbox. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 709–727 (2018).
- [112] Brown, D. G. & Boström, J. Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? *J. Med. Chem.* **59**, 4443–4458 (2016).

- [113] Martin, R. & Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions Employing Dialkylbiaryl Phosphine Ligands. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1461–1473 (2008).
- [114] Verma, A. K.; Jha, R. R.; Sankar, V. K. & Singh, R. P. Selective synthesis of 4,5-dihydroimidazo- and imidazo[1,5-a]quinoxalines via modified Pictet–Spengler reaction. *Tetrahedron Lett.* **54**, 5984–5990 (2013).
- [115] Pictet, A. & Spengler, T. Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **44**, 2030–2036 (1911).
- [116] Katritzky, A. R.; Lan, X.; Yang, J. Z. & Denisk, O. V. Properties and Synthetic Utility of N-Substituted Benzotriazoles. *Chem. Rev.* **98**, 409–548 (1998).
- [117] Verma, A. K.; Jha, R. R.; Sankar, V. K.; Aggarwal, T.; Singh, R. P. & Chandra, R. Lewis Acid-Catalyzed Selective Synthesis of Diversely Substituted Indolo- and Pyrrolo[1,2-a]quinoxalines and Quinoxalinones by Modified Pictet–Spengler Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6998–7010 (2011).
- [118] Antonia Stank, A.; Kokh, D. B.; Fuller, J. C. & Wade, R. C. Protein Binding Pocket Dynamics. *Acc. Chem. Res.* **49**, 809–815 (2016).
- [119] Bissantz, C.; Kuhn, B. & Stahl, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *J. Med. Chem.* **53**, 5061–5084 (2010).
- [120] Ramesh, R.; Bhat, R. G. & Chandrasekaran, S. Highly selective deblocking of propargyl carbonates in the presence of propargyl carbamates with tetrathiomolybdate. *J. Org. Chem.* **70**, 837–840 (2005).
- [121] Vossen, M. G.; Pferschy, S.; Chiba, P. & Noedl, H. The SYBR Green I malaria drug sensitivity assay: performance in low parasitemia samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 398–401 (2010).
- [122] W.-Schmidt, B.; Jonker, H. R. A.; Wulsdorf, T.; Gerber, H.-D.; Saxena, K.; Kudlinzki, D.; Sreeramulu, S.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Heine, A.; Schwalbe, H. & Klebe, G. Paradoxically, Most Flexible Ligand Binds Most Entropy-Favored: Intriguing Impact of Ligand Flexibility and Solvation on Drug–Kinase Binding. *J. Med. Chem.* **61** (14), 5922–5933 (2018).

- [123] Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; van Huijsduijnen, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P. & Slingsby, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 751–758 (2015).
- [124] Zhou, P.; Huang, J. & Tian, F. Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: implications for rational drug design. *Curr. Med. Chem.* **19**, 226–238 (2012).
- [125] Byun, E.; Hong, B.; de Castro, K. A.; Lim, M. & Rhee, H. One-Pot Reductive Mono-N-alkylation of Aniline and Nitroarene Derivatives Using Aldehydes. *J. Org. Chem.* **72**, 9815–9817 (2007).
- [126] Salvatore, R. N.; Yoon, C. H. & Jung, K. W. Synthesis of secondary amines. *Tetrahedron* **57**, 7785–7811 (2001).
- [127] Kumari, S.; Carmona, A. V.; Tiwari, A. K. & Trippier, P. C. Amide Bond Bioisosteres: Strategies, Synthesis, and Successes. *J. Med. Chem.* **63**, 12290–12358 (2020).
- [128] Fortinac, J. S.; Lacroix, J.; Desjardins, M.; Patenaude, A.; Petitclerc, E. & C.-Gaudreault, R. Alkylation potency and protein specificity of aromatic urea derivatives and bioisosteres as potential irreversible antagonists of the colchicine-binding site. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4456–4469 (2007).
- [129] Barret, R. 5 - Importance and Evaluation of the Polar Surface Area (PSA and TPSA). *Therapeutic Chemistry*, 89–95 (2018). Disponível online: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-288-5.50005-6>.
- [130] Varma, M. V.; Steyn, S. J.; Allerton, C. & El-Kattan, A. F. Predicting Clearance Mechanism in Drug Discovery: Extended Clearance Classification System (ECCS). *Pharm. Res.* **32**, 3785–3802 (2015).
- [131] Daly, A. K.; Rettie, A. E.; Fowler, D. M. & Miners, J. O. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations. *J. Pers. Med.* **8**, 1 (2018).
- [132] Vandenberg, J. I.; Perry, M. D.; Perrin, M. J.; Mann, S. A.; Ke, Y. & Hill, A. P. hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol. Rev.* **92**, 1393–1478 (2012).

- [133] Mandell, L. & Tillotson, G. Safety of fluoroquinolones: An update. *Can. J. Infect. Dis.* **13**, 54–61 (2002);
- [134] Jamieson, C.; Moir, E. M.; Rankovic, Z. & Wishart, G. Medicinal Chemistry of hERG Optimizations: Highlights and Hang-Ups. *J. Med. Chem.* **49**, 5029–5046 (2006).
- [135] Finch, A. & Pillans, P. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. *Aust. Prescr.* **37**, 137–139 (2014).
- [136] Jun, J. V.; Chenoweth, D. M. & Petersson, E. J. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 5747–5763 (2020).
- [137] Mullard, A. A probe for every protein. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 733–736 (2019).
- [138] Oprea, T. I.; Bologa, C. G.; Boyer, S.; Curpan, R. F.; Glen, R. C.; Hopkins, A. L.; Lipinski, C. A.; Marshall, G. R.; Martin, Y. C.; O.-Halip, L.; Rishton, G.; Ursu, O.; Vaz, R. J.; Waller, C.; Waldmann, H. & Sklar, L. A. A crowdsourcing evaluation of the NIH chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 441–447 (2009).
- [139] Frye, S. V. The art of the chemical probe. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 159–161 (2010).
- [140] Saeki, K.-I.; Kawai, H.; Kawazoe, Y. & Hakura, A. Dual stimulatory and inhibitory effects of fluorine-substitution on mutagenicity: an extension of the enamine epoxide theory for activation of the quinoline nucleus. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 646–650 (1997).
- [141] Russmann, S.; K.-Ublick, G. A. & Grattagliano, I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr. Med. Chem.* **16**, 3041–3053 (2009).
- [142] Rosin, A. J.; van Dijk, Y. M.; Grafstein, I.; Herbert, J. *Age and Ageing* **1980**, 9, 253–256; Hammel, P.; Larrey, D.; Bernuau, J.; Kalafat, M.; Freneaux, E.; Babany, G.; Degott, C.; Feldmann, G.; Pessayre, D. & Benhamou, J. P. Acute hepatitis after tetrahydroaminoacridine administration for Alzheimer's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **12**, 329–331 (1990).
- [143] Milhous, W. K.; Weatherly, N. F.; Bowdre, J. H. & Desjardins, R. E. In vitro activities of and mechanisms of resistance to antifol antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemot.* **27**, 525–530 (1985).

- [144] Nzila, A. & Mwai, L. In vitro selection of *Plasmodium falciparum* drug-resistant parasite lines. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 390–398 (2010).
- [145] Duffey, M.; Blasco, B.; Burrows, J. N.; Wells, T. N. C.; Fidock, D. A. & Leroy, D. L. Assessing risks of *Plasmodium falciparum* resistance to select next-generation antimalarials. *Trends in Parasitol.* **37**, 709–21 (2021).
- [146] Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; van Huijsduijnen, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P. & Slingsby, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 751–758 (2015).
- [147] Manasi, M.; Vigyasa, S. & Shailja, S. Structural Insights Into Key *Plasmodium* Proteases as Therapeutic Drug Targets. *Front. Microbiol.* **10**, 394 (2019).
- [148] Lisk, G.; Pain, M.; Gluzman, I. Y.; Kambhampati, S.; Furuya, T.; Su, X. Z.; Fay, M. P.; Goldberg, D. E. & Desai, S. A. Changes in the plasmodial surface anion channel reduce leupeptin uptake and can confer drug resistance in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2346–2354 (2008).
- [149] Matsumoto, K.; Mizoue, K.; Kitamura, K.; Tse, W. C.; Huber, C. P. & Ishida, T. Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers* **51**, 99–107 (1999).
- [150] Deu, E. Proteases as antimalarial targets: strategies for genetic, chemical, and therapeutic validation. *The FEBS Journal* **284**, 2604–2628 (2017).
- [151] Mishra, M.; Singh, V. & Singh, S. Structural Insights Into Key *Plasmodium* Proteases as Therapeutic Drug Targets. *Front. Microb.* **10**, 394 (2019).
- [152] Pinzi, L. & Rastelli, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4331 (2019).
- [153] Lee, Ar.; Lee, K. & Kim, D. Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery. *EODDBX* **11**, 707–705 (2016).
- [154] Merckx, A.; Echaliier, A.; Langford, K.; Sicard, A.; Langsley, G.; Joore, J.; Doerig, C.; Noble, M. & Endicott, J. Structures of *P. falciparum* protein kinase 7 identify an activation motif and leads for inhibitor design. *Structure* **16**, 228–238 (2008).

- [155] Wang, F.; Wu, F.-X.; Li, C.-Z.; Jia, C.-Y.; Su, S.-W.; Hao, G.-F. & Yang, G.-F. ACID: a free tool for drug repurposing using consensus inverse docking strategy. *J. Cheminform.* **11**, 73 (2019).
- [156] D.-Semblat, D.; Sicard, A.; Doerig, C. & R.-Cartwright, L. Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell* **7**, 279-85 (2008).
- [157] Arendse, L. B.; Wyllie, S.; Chibale, K. & Gilbert, I. H. Plasmodium Kinases as Potential Drug Targets for Malaria: Challenges and Opportunities. *ACS Infect. Dis.* **7**, 518–534 (2021).
- [158] Eck, T.; de Souza, M. L.; Delvillar, M.; Ashraf, K.; Bheemanaboina, R. R. Y.; Chakrasali, R.; Kreiss, T.; Siekierka, J. J.; Rotella, D. P.; Bhanot, P. B. & Goodey, N. M. Characterization of Competitive Inhibitors of *Plasmodium falciparum* cGMP-Dependent Protein Kinase. *Chembiochem* **23**, e202100704 (2022).
- [159] Kumar, S.; Haile, M. T.; Hoopmann, M. R.; Tran, L. T.; Michaels, S. A.; Morrone, S. R.; Ojo, K. K.; Reynolds, L. M.; Kusebauch, U.; Vaughan, A. M.; Moritz, R. L.; Kappe, S. H. I. & Swearingen, K. E. *Plasmodium falciparum* Calcium-Dependent Protein Kinase 4 is Critical for Male Gametogenesis and Transmission to the Mosquito Vector. *mBio* **12**, e02575-21 (2021).
- [160] Yogavel, M.; Nettleship, J. E.; Sharma, A.; Harlos, K.; Jamwal, A.; Chaturvedi, R.; Sharma, M.; Jain, V.; C.-Goel, J. & Sharma, A. Structure of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase from *Plasmodium vivax* sheds light on drug resistance. *J. Biol. Chem.* **293**, 14962–14972 (2018).
- [161] Pacheco, M. A.; Schneider, K. A.; Cheng, Q.; Munde, E. O.; Ndege, C.; Onyango, C.; Raballah, E.; Anyona, S. B.; Ouma, C.; Perkins, D. J. & Escalante, A. A. Changes in the frequencies of *Plasmodium falciparum* dhps and dhfr drug-resistant mutations in children from Western Kenya from 2005 to 2018: the rise of Pfdhps S436H. *Malar. J.* **19**, 378 (2020).
- [162] Rathod, P. K.; McErlean, T. & Lee, P.-C. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 9389–9393 (1997).

[163] Still, W. C.; Kahn, M. & Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923–2925 (1978).