

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DOUGLAS DAVISON DA SILVA OLIVEIRA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE
UMA SÉRIE DE PIRIDILPIPERAZINAS**

Uberlândia

2023

DOUGLAS DAVISON DA SILVA OLIVEIRA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE
UMA SÉRIE DE PIRIDILPIPERAZINAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Química.

Linha de pesquisa: Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

Uberlândia

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 2023	<p>Oliveira, Douglas Davison da Silva, 1997- PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE UMA SÉRIE DE PIRIDILPIPERAZINAS [recurso eletrônico] / Douglas Davison da Silva Oliveira. - 2023.</p> <p>Orientador: Celso de Oliveira Rezende Júnior. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.409 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Química. I. Rezende Júnior, Celso de Oliveira , 1987-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 54</p>
-------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 377, PPGQUI				
Data:	Vinte e um de julho de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:25
Matrícula do Discente:	12122QMI003				
Nome do Discente:	Douglas Davison da Silva Oliveira				
Título do Trabalho:	"Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimalárica de uma série de piridilpiperazinas"				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Planejamento e síntese de candidatos a fármacos				

Reuniu-se, por webconferência, link <https://meet.google.com/yps-rrik-hfy>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Alberto de Oliveira, do IQUFU - Universidade Federal de Uberlândia; Gustavo Henrique Goulart Trossini, da Universidade de São Paulo e Celso de Oliveira Rezende Júnior, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/07/2023, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 21/07/2023, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Goulart Trossini, Usuário Externo**, em 24/07/2023, às 09:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4579225** e o código CRC **07D59A35**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por sempre guiar meus caminhos.

À minha mãe, Maria José, mais conhecida como Zélia, a pessoa mais importante da minha vida e fonte de inspiração e admiração. Obrigado por cuidar tão bem de nós, por ter mostrado como é o mundo e o que vamos precisar para enfrentá-lo. Obrigado por ter me apoiado a todo momento durante o mestrado e por não ter deixado eu desistir, se hoje estou finalizando mais essa etapa da minha vida é graças a você. Muito obrigado mãe, te amo!

Ao meu pai, Edivaldo, que mesmo à distância, está sempre torcendo pelo meu sucesso. Muito obrigado por tudo pai.

Ao meu irmão, David Cliff, por todo apoio e por sempre acreditar em mim.

À minha companheira de vida, Ana Vanessa, por estar sempre ao meu lado em qualquer momento da vida, seja momentos bons ou ruins, por sempre me apoiar, me aconselhar nos momentos de angústia e mostrar que eu seria capaz de finalizar esse mestrado. Você foi fundamental nessa etapa da minha vida, serei eternamente grato por todo apoio.

Ao meu orientador, professor Celso, por ter acreditado em mim e aceitado me auxiliar nesta etapa tão importante na minha vida. Obrigado por todo conhecimento e experiências compartilhadas comigo durante esses anos, aprendi muito com você. Obrigado por toda paciência durante esse período, principalmente no início. No momento que eu mais precisei de ajuda, você foi a pessoa mais compreensível e não mediu esforços em me ajudar. Serei eternamente grato por tudo.

Aos meus amigos do LaSFar, que acompanharam e me ajudaram durante o desenvolvimento desse trabalho: Thibault Lapierre, Flávia Dias, Guilherme Hercos, Danilo Farago, Raphael Tristão, Meiry Lacerda. Um agradecimento especial ao Nicolas Pétersson, por todo apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos da vida: Luiz Felipe, Gilvânio Júnior, Jéssica Santos, Rafaela Porto, Eloisa Galicio e Éderson Carlos, que estavam sempre dispostos a ouvir todas as alegrias e tristezas da vida do pós-graduando, por sempre acreditarem em mim e me aconselharem a nunca desistir dos meus sonhos. Vocês são especiais e me ajudaram a vencer essa etapa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Instituto de Química da UFU, por ter proporcionado toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

À Rede de Laboratórios Multiusuários da UFU (RELAM), por disponibilizar os equipamentos de análises, principalmente o de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), bastante utilizado no trabalho.

Ao Laboratório *Unit for Drug Discovery* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP/SP, pela colaboração na parte biológica do trabalho, em especial ao Arne Krüger e ao Franciarli Paz, por realizarem os ensaios fenotípicos. A colaboração de vocês foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas da Universidade Estadual de Maringá, em especial, ao Felipe Souza e ao Prof. Eduardo Pilau, pela realização da parte de espectrometria de massas dos compostos sintetizados.

Aos membros da Banca Examinadora, Prof. Dr. Alberto Oliveira e Prof. Dr. Gustavo Trosini, pela disponibilidade e contribuição com meu trabalho. As sugestões de vocês serão de grande importância para o aprimoramento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido por meio de bolsa de Mestrado. Agradeço à CAPES pelo investimento em educação e pesquisa no Brasil, o que contribui para o avanço da ciência e para a formação de profissionais qualificados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro concedido (APQ-01116-21 e APQ-00789-22). O apoio da FAPEMIG foi essencial para a realização deste estudo, fornecendo recursos e oportunidades que possibilitaram a execução das pesquisas de maneira eficaz.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro concedido (408208/2018-0). A contribuição do CNPQ foi de extrema importância para o desenvolvimento desta pesquisa, viabilizando recursos essenciais e oportunidades de aprimoramento acadêmico.

Muito Obrigado!

RESUMO

A malária é uma doença parasitária que atinge milhões de pessoas e causa milhares de mortes em todo o mundo. Atualmente, o tratamento da forma mais grave da malária envolve o uso de uma combinação terapêutica à base de derivados de artemisinina. No entanto, relatórios recentes da OMS apontam o surgimento de cepas resistentes a esse tratamento, aumentando a necessidade urgente de descobrir novos fármacos contra a malária. O presente trabalho tem como objetivo contribuir na descoberta de novos candidatos a fármacos antimaláricos, a partir de um estudo que investiga a relação entre a estrutura e a atividade antimalárica de derivados de piridilpiperazina. Foi realizada uma otimização dessa classe de compostos contra o *Plasmodium falciparum*, explorando modificações químicas nos fragmentos tolúil e amida do *hit* inicial **1**. Após confirmar o papel crucial desempenhado pelo fragmento arila na atividade antiplasmódica, a substituição do grupo *orto*-metil do *hit 1* por fragmentos halogenados resultou em quatro análogos com propriedades mais promissoras, tanto em termos de potência quanto de perfil farmacocinético esperado. A introdução de nitrogênios endocíclicos nesse fragmento identificou mais dois compostos otimizados, **27** e **30**, que são esperados ser mais metabolicamente estáveis do que o *hit 1*. Avaliações adicionais de citotoxicidade em células HepG2 revelaram o perfil seletivo da série, uma vez que a maioria dos compostos apresentou baixos níveis de citotoxicidade. Além disso, os resultados de potência contra a cepa Dd2 do *P. falciparum* resistente à medicamentos demonstraram que os compostos mantiveram sua atividade antiplasmódica. As avaliações de Eficiência Lipofílica de Ligante e as previsões ADME *in silico* proporcionaram um perfil satisfatório para a maioria dos compostos, finalmente identificando os quatro compostos otimizados, **18**, **20**, **27** e **30**, como promissores para a subsequente otimização desta série contra o *Plasmodium falciparum*. Foi realizada uma triagem inicial com o objetivo de avaliar o perfil de potência dos derivados com modificações no fragmento amida contra o *P. falciparum*. Os resultados obtidos ao testar os derivados em três concentrações diferentes (200, 20 e 2 μ M) revelaram um perfil adequado para estudos posteriores de determinação do IC₅₀ contra a cepa sensível do *P. falciparum* (3D7). Esses resultados são encorajadores e justificam pesquisas futuras para determinar com mais precisão a eficácia desses compostos e sua dose ideal contra o *Plasmodium falciparum*. É esperado que essas descobertas contribuam para o desenvolvimento de novos tratamentos contra a malária.

Palavras-chave: Química Medicinal; ADME; *P. falciparum*; Relação estrutura-atividade.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease that affects millions of people and causes thousands of deaths worldwide. Currently, the treatment for the most severe form of malaria involves the use of an artemisinin-based combination therapy. However, recent reports from the WHO indicate the emergence of strains resistant to this treatment, increasing the urgent need to discover new anti-malarial drugs. This study aims to contribute to the discovery of new antimalarial drug candidates, based on an investigation of the relationship between the structure and antimalarial activity of pyridylpiperazine derivatives. An optimization of this class of compounds against *Plasmodium falciparum* was performed, exploring chemical modifications in the toluyl and amide fragments of the initial hit **1**. After confirming the crucial role played by the aryl fragment in the antiplasmodial activity, the substitution of the *ortho*-methyl group of hit **1** with halogenated fragments resulted in four analogs with more promising properties in terms of potency and expected pharmacokinetic profile. The introduction of endocyclic nitrogens into this fragment identified two more optimized compounds, **27** and **30**, which are expected to be more metabolically stable than hit **1**. Additional cytotoxicity evaluations in HepG2 cells revealed the series' selective profile, as most compounds showed low levels of cytotoxicity. Furthermore, the potency results against the drug-resistant Dd2 strain of *P. falciparum* demonstrated that the compounds maintained their antiplasmodial activity. Evaluations of Ligand Lipophilicity Efficiency and *in silico* ADME predictions provided a satisfactory profile for most compounds, ultimately identifying the four optimized compounds, **18**, **20**, **27**, and **30**, as promising candidates for subsequent optimization of this series against *Plasmodium falciparum*. An initial screening was conducted to assess the potency profile of derivatives with modifications in the amide fragment against *P. falciparum*. The results obtained by testing the derivatives at three different concentrations (200, 20, and 2 μ M) revealed a suitable profile for further IC₅₀ determination studies against the sensitive strain of *P. falciparum* (3D7). These findings are encouraging and justify future research to more accurately determine the efficacy and optimal dosage of these compounds against *Plasmodium falciparum*. It is expected that these discoveries will contribute to the development of new treatments against malaria.

Keywords: Medicinal Chemistry; ADME; *P. falciparum*; Structure-Activity Relationship.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac: Acetil

ACT: Combinação Terapêutica à base de derivados de Artemisinina (*Artemisin-based Combination Therapy*, do inglês).

ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

Bn: Benzil

CCD: Cromatografia de camada delgada

CSP: Proteína Circunsporozoita (em inglês, *Circumsporozoite Protein*)

clogP: logP calculado

DCM: Diclorometano

DMAP: 4-(dimetilamino) piridina

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

ESI: Ionização por Eletrospray

Et₃N: Trietilamina

FDA: Controle de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*, em inglês)

GI: Gastrointestinal

GSK: GlaxoSmithKline

Hex: Hexano

HIT: Molécula Bioativa

HOBt: Hidroxibenzotriazol

HRMS: Espectrometria de massas de alta resolução (em inglês, *High Resolution Mass Spectrometry*)

HTS: Triagem biológica em grande escala (em inglês, *High Throughput Screening*)

IC₅₀: Concentração para inibição de 50%.

iPr: Isopropil

LLE: Eficiência lipofílica do ligante (em inglês, *Lipophilic Ligand Efficiency*)

Me: Metila

MMV: Medicamentos para risco de Malária (em inglês, *Medicines for Malaria Venture*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PDC: Dicromato de Piridínio

Pf: *Plasmodium falciparum*

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SAR: Relação estrutura-atividade (em inglês, *Structure-Activity Relationship*)

S_N1: Substituição Nucleofílica Unimolecular

S_N2: Substituição Nucleofílica Bimolecular

S_NAr: Substituição Nucleofílica Aromática

SI: Índice de Seletividade (em inglês, *Selectivity Index*)

TMS: Tetrametilsilano

UV: Ultravioleta

VS: Triagem virtual (em inglês, *Virtual Screening*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no mosquito vetor e hospedeiro humano.	17
Figura 2 – Estrutura química dos compostos envolvidos na ACT.	19
Figura 3 – Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.	21
Figura 4– Estrutura química do <i>hit 1</i>	22
Figura 5– Proposta de mecanismo para a aminação de Chan-Lam.	25
Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 28	33
Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de 28	35
Figura 8 - Resumo gráfico do SAR realizado no fragmento tolúil.	42
Figura 9 – Plot de pIC_{50} vs clog(P) da série piridilpiperazina.	48
Figura 10 - Gráfico da triagem inicial dos compostos 36-38, 40-42, 47-48, 50-52	52

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1– Rota sintética para obtenção do hit 1	24
Esquema 2– Estratégias sintéticas para obtenção dos derivados com modificações nos fragmentos toluil e amida.	26
Esquema 3– Síntese dos intermediários 9-11	28
Esquema 4 – Síntese dos compostos 13-20	29
Esquema 5– Síntese dos compostos 21-24	30
Esquema 6– Síntese dos compostos 26-31	31
Esquema 7 – Síntese dos derivados 35-45	49
Esquema 8– Síntese dos derivados 46-48	50
Esquema 9– Síntese dos compostos 51-53	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 28 (CDCl_3).....	35
Tabela 2 - Atividade <i>in vitro</i> anti- <i>P. falciparum</i> (3D7) e lipofilicidade do <i>hit 1</i> e dos compostos 13-20	37
Tabela 3 - Atividade <i>in vitro</i> anti- <i>P. falciparum</i> (3D7) e lipofilicidade dos compostos 21-33	39
Tabela 4 - Atividade antiplamodial e seletividade <i>in vitro</i>	43
Tabela 5 - Propriedades ADME (<i>in silico</i>) do <i>hit 1</i> , dos derivados 15-22 e 26-32	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Malária	16
1.2 Processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos	20
1.3 Hit 1: derivado de piridilpiperazina	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 Planejamento sintético do hit 1	24
3.2 Análise retrossintética dos derivados com modificações no fragmento toluil e amida	26
3.3 Síntese dos derivados com modificações no fragmento toluil	27
3.4 Ensaios biológicos	36
3.4.1 Relação estrutura-atividade contra <i>P. falciparum</i> (3D7)	36
3.4.2 Perfil citotóxico em células HepG2	42
3.4.3 Atividade contra <i>P. falciparum</i> resistente (cepa Dd2)	42
3.4.4 Perfil ADME <i>in silico</i>	44
3.4.5 Relação entre atividade antiplasmodial e lipofilicidade	47
3.5 Síntese dos derivados com modificações no fragmento amida	48
3.6 Ensaio biológico: triagem inicial dos compostos com modificações no fragmento amida	51
4 PARTE EXPERIMENTAL	54
4.1 Informações Gerais	54
4.2 Procedimento Experimental (Síntese)	54
4.2.1 Procedimento Geral A: síntese dos derivados de arilpiperazina por substituição nucleofílica aromática	54
4.2.2 Procedimento Geral B: síntese dos derivados de amida	55

4.2.3 Procedimento Geral C: Aminoação de Chan-Lam	55
4.2.4 Procedimento Geral D: substituição nucleofílica de haletos de benzila	55
4.2.5 Síntese dos intermediários 9-12.....	55
4.2.6 Síntese do <i>hit</i> 1 e dos derivados 13-33.....	57
4.3 Procedimento Experimental (Biológico)	72
5 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXO – Espectros de RMN (¹ H e ¹³ C) e HRMS	83

1 INTRODUÇÃO

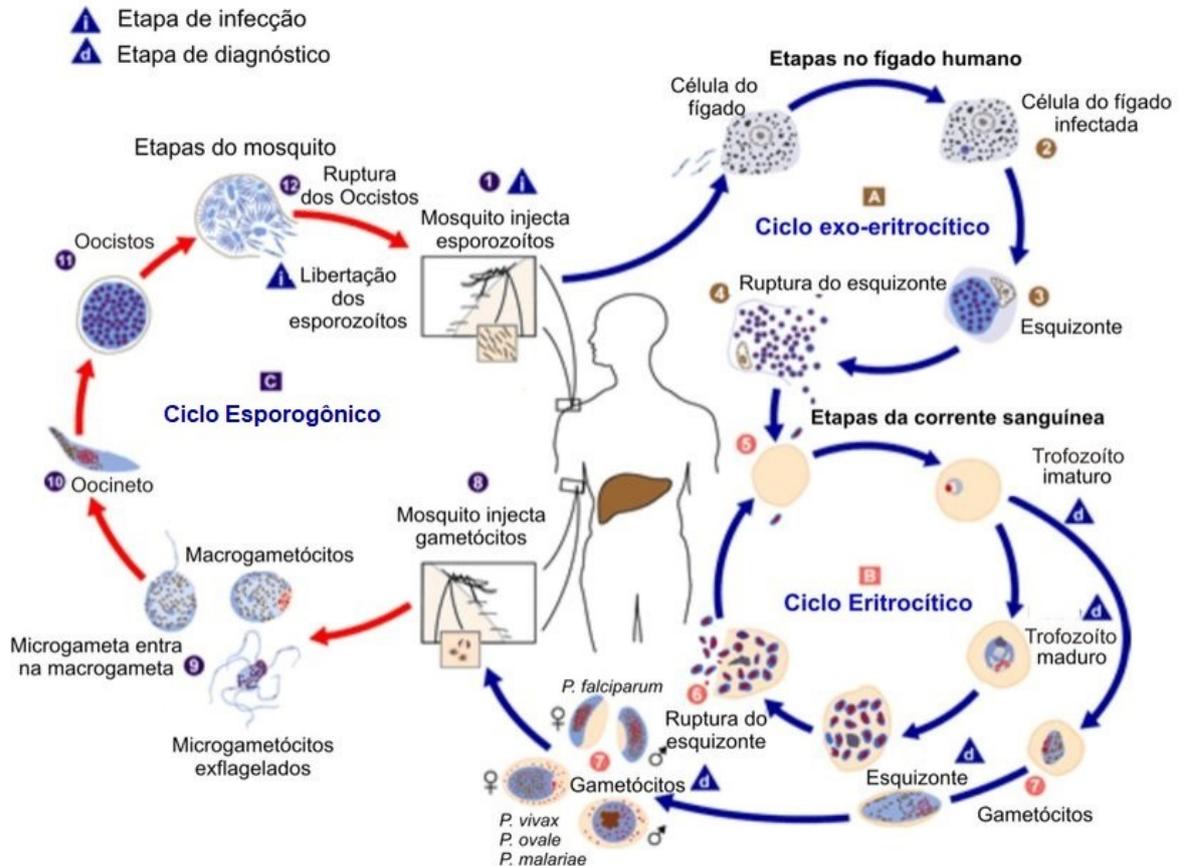
1.1 Malária

A malária é uma doença causada por parasitas do gênero *Plasmodium* (*P.*) e transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* infectado.^[1] De acordo com o último relatório mundial da malária emitido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estimam-se 247 milhões de casos e 619 mil mortes causados por malária no mundo durante o ano de 2021. A região africana apresenta a maior parcela da carga global da malária, abrigando 95% dos casos e 96% das mortes pela doença. Crianças menores de 5 anos representaram cerca de 80% de todas as mortes por malária na região em 2021.^[1,2]

Aproximadamente 100 espécies diferentes de parasitas do gênero *Plasmodium* foram identificadas, no entanto, apenas cinco delas são responsáveis por infectar humanos: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. knowlesi*.^[1,3] Dentre essas espécies, a mais letal é o *P. falciparum*, responsável por matar cerca de 1.200 crianças menores que 5 anos por dia.^[4] As manifestações clínicas da infecção por esses parasitas, geralmente aparecem 10 a 15 dias após a transmissão. Os sintomas comuns incluem febre intermitente, dor de cabeça, dor no corpo, icterícia, hepatomegalia e esplenomegalia. As infecções mais graves, como a malária cerebral, são caracterizadas por anemia grave e danos a múltiplos órgãos, muitas vezes resultando em morte.^[1,4,5]

O ciclo de vida do parasita da malária envolve dois hospedeiros: o ser humano e o mosquito (vetor). Ele passa por três ciclos distintos: o ciclo exo-eritrocítico (A), que ocorre no fígado humano; o ciclo eritrocítico (B), que ocorre na corrente sanguínea; e o ciclo esporogônico (C), que ocorre no mosquito (Figura 1). No ser humano, o ciclo tem início com a picada do mosquito fêmea *Anopheles* infectado, que libera esporozoítos através da saliva durante a refeição sanguínea (etapa 1). Esses esporozoítos infectam as células do fígado (etapa 2), amadurecem para esquizontes (etapa 3) e se rompem liberando merozoítos na corrente sanguínea (etapa 4). Em seguida, os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos, sofrem multiplicação assexuada e se desenvolvem em trofozoítos (etapa 5). Alguns amadurecem para esquizontes e provoca a ruptura dos eritrócitos, resultando em sintomas como febre e calafrios (etapa 6).^[6]

Figura 1 – Ciclo de vida do Plasmodium no mosquito vetor e hospedeiro humano.



Fonte: CDC, 2020. Adaptado pelo autor.

Alguns merozoítos liberados na corrente sanguínea se diferenciam em formas sexuadas chamadas gametócitos femininos e masculinos, que permanecem na corrente sanguínea (etapa 7). Durante a refeição de sangue, um mosquito *Anopheles* ingere esses gametócitos, dando início ao ciclo esporogônico (etapa 8). No estômago do mosquito, os microgametas penetram nos macrogametas, formando zigotos (etapa 9). Esses zigotos se transformam em oocinetos, que são formas móveis e alongadas (etapa 10), e invadem a parede do intestino médio do mosquito. Dentro da parede do intestino médio, eles se desenvolvem em oocistos (etapa 11). Os oocistos crescem, se rompem e liberam esporozoítos (etapa 12), que migram para as glândulas salivares do mosquito. Quando o mosquito pica um novo hospedeiro humano, os esporozoítos são transmitidos, dando continuidade ao ciclo de vida da malária.^[6,7]

A prevenção e o tratamento são as principais estratégias recomendadas pela OMS para controlar e erradicar a malária. No âmbito da prevenção, destaca-se o controle efetivo dos vetores, mediante o uso de mosquiteiros tratados com inseticida e/ou medicamentos antimaláricos profiláticos.^[8] Desde 2021, a OMS também recomenda amplamente o uso da vacina RTS,S/AS01 entre crianças residentes em áreas com transmissão de moderada a alta do

P. falciparum.^[2,9] Esta vacina é classificada como pré-eritrocítica, uma vez que visa a proteína circunsporozoíta (CSP) presente na superfície do esporozoíta do parasita, impedindo assim a infecção das células hepáticas pelo *P. falciparum*.^[9] Importante ressaltar que foi observada uma redução significativa no número de casos e mortes por malária grave em crianças vacinadas.^[2,9,10]

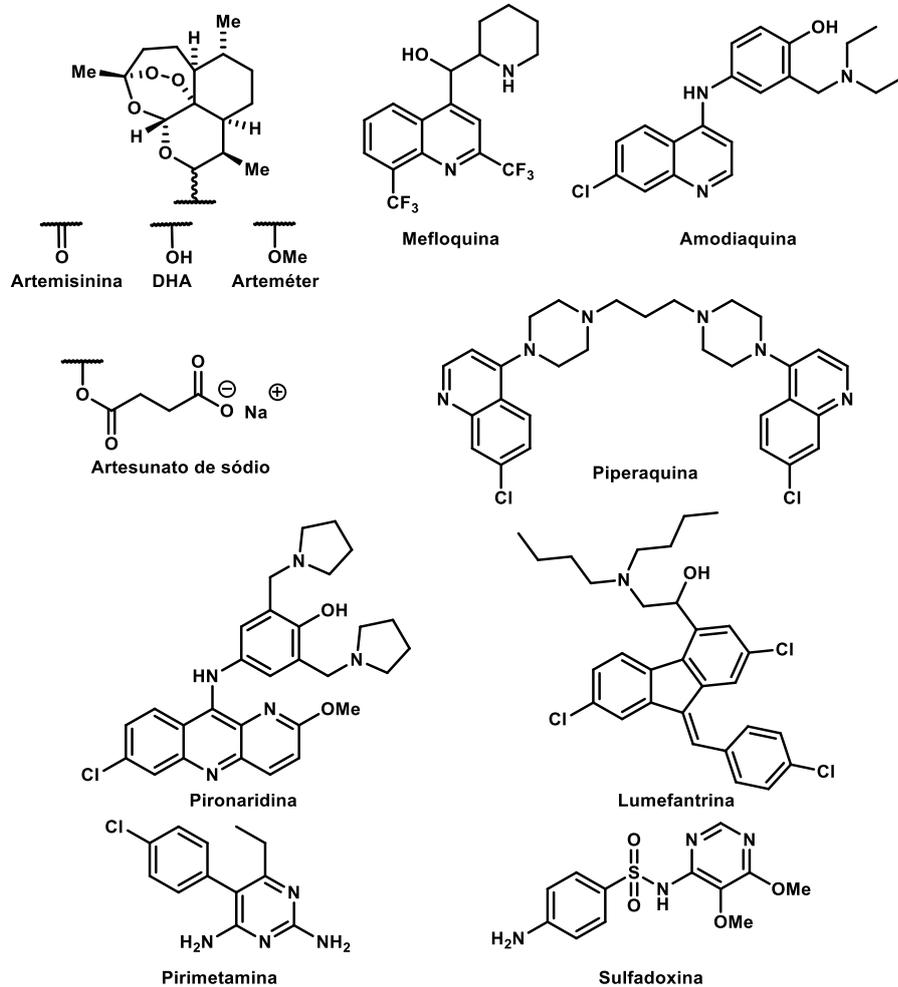
No que se refere ao tratamento da malária, os medicamentos são desenvolvidos a partir de substâncias naturais ou compostos sintéticos. Esses medicamentos são projetados para direcionar especificamente cada estágio do ciclo de vida do parasita. Existem medicamentos eritrocíticos, que visam as formas encontradas nos glóbulos vermelhos do ser humano. Há também os medicamentos gametocíticos, que eliminam as formas sexuadas do parasita (gametócitos) em indivíduos infectados, prevenindo assim a transmissão da doença para mosquitos e sua propagação para outras pessoas. Por fim, existem os medicamentos esporontocidas (ou esporoitocidas), que atuam contra os esporozoítos, eliminando-os imediatamente após entrarem na corrente sanguínea ou destruindo-os quando são liberados pelos esquizontes hepáticos ou sanguíneos.^[3]

A quinina, alcaloide presente na casca da *Chinchona*, foi utilizado como o principal quimioterápico antimalárico durante muitos anos, no entanto sua alta toxicidade e o surgimento de cepas resistentes reduziram seu uso.^[11-13] A quinina é um componente da família das quinolinas, que engloba substâncias capazes de agir contra as formas eritrocíticas do parasita, como a cloroquina, uma das principais substâncias antimaláricas utilizadas para suprimir e prevenir a malária em áreas endêmicas. A cloroquina estabeleceu-se rapidamente como o tratamento mais eficaz na luta contra a malária, tornando-se o padrão-ouro na quimioterapia da doença. Sua ampla utilização ocorreu em diversos programas de erradicação da malária, como a bem-sucedida Campanha Anti-Malária de 1957 no Suriname. No entanto, com o passar do tempo diminuiu-se o uso de cloroquina no tratamento da malária devido o surgimento de cepas resistentes a este medicamento.^[13-15]

Atualmente, uma combinação terapêutica à base de derivados de artemisinina (ACT) é utilizada para infecções por *P. falciparum*. Nessa terapia, diversos compostos são associados aos derivados de artemisinina (Diidroartemisinina (DHA), arteméter e artesunato de sódio). Essas combinações incluem mefloquina, amodiaquina, piperaquina, pironaridina, lumefantrina, pirimetamina e sulfadoxina, resultando em várias combinações de medicamentos, como arteméter-lumefantrina, artesunato-mefloquina e DHA-piperaquina, por exemplo (Figura 2).^[16,17] A ACT demonstrou alta eficácia em estudos clínicos, alcançando taxas de supressão da

parasitemia e eficácia de 97,2%, superando, assim, o critério de eficácia estabelecido pela OMS (taxa de eficácia > 95%) para regiões endêmicas de malária.^[18]

Figura 2 – Estrutura química dos compostos envolvidos na ACT.



Fonte: Do autor.

No entanto, relatórios recentes da OMS têm destacado o surgimento de cepas resistentes à ACT em espécies de *Plasmodium*, principalmente em países do sudeste asiático.^[2,16,19] Um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de resistência cruzada e multirresistência é a falta de diversidade estrutural entre os antimaláricos atualmente utilizados.^[17,20,21] Portanto, o surgimento de cepas resistentes ameaça o progresso na luta contra a malária, aumentando assim a urgência na descoberta de novos antimaláricos eficazes e seguros.

Nesse sentido, a etapa pré-clínica do desenvolvimento de fármacos é essencial nesse processo. Portanto, planejar modificações estruturais no *hit*, visando melhorar as propriedades

farmacocinéticas e farmacodinâmicas da classe de compostos em estudo, é uma das principais formas de obter melhores candidatos a fármacos.^[22]

1.2 Processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos está dividido em duas grandes fases: pré-clínica (descoberta) e clínica (desenvolvimento). A fase pré-clínica, inicia-se pela identificação de uma necessidade médica, o que inclui a avaliação da adequação das terapias existentes, caso elas já existam. Com base nessa análise e no conhecimento atual sobre a doença-alvo, são formuladas hipóteses para melhorar a terapia, buscando aprimorar a eficácia, segurança ou introduzir inovações mecânicas no método de tratamento medicamentoso para pacientes com a doença em questão.^[23] Dessa forma, o principal foco das pesquisas nesta etapa, geralmente, se concentra na identificação e otimização de moléculas bioativas (ou ligantes, do inglês *hits*).^[24]

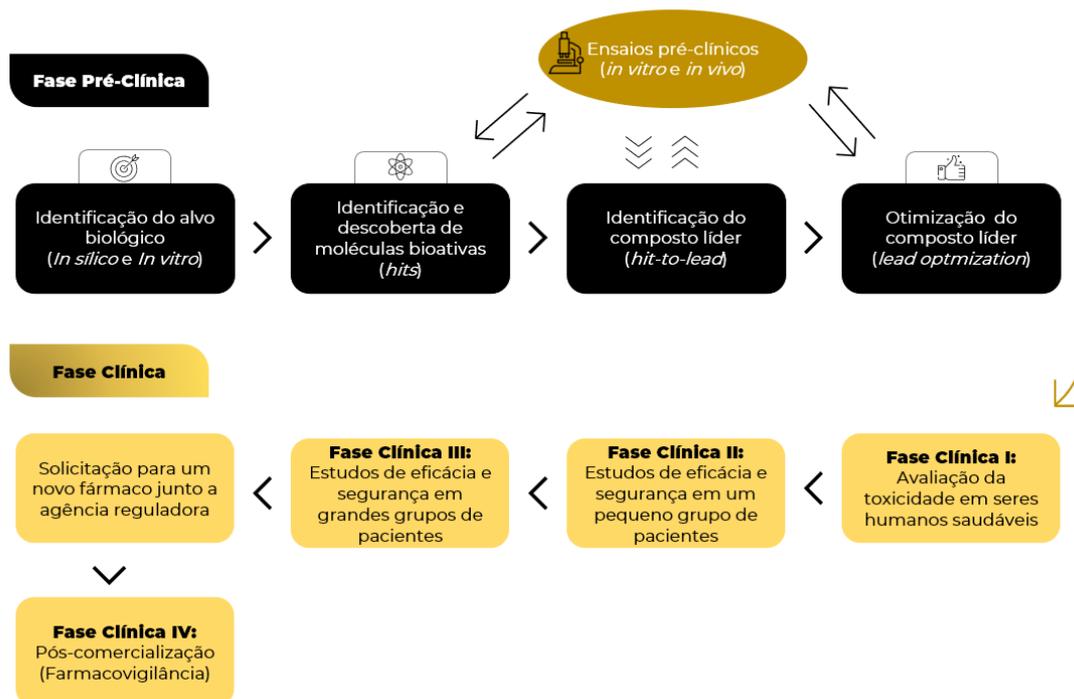
As moléculas bioativas podem ser identificadas por diversas estratégias, como aplicação de filtros moleculares, o uso da triagem virtual (VS, do inglês *virtual screening*) e o emprego de triagens biológicas automatizadas em alta escala (HTS, do inglês *high-throughput screening*). Para qualquer uma das técnicas de identificação da molécula bioativa é necessário confirmar as propriedades biológicas (como potência, por exemplo) experimentalmente através de ensaios padronizados. Normalmente, são identificadas moléculas que necessitam de aprimoramento em relação a várias propriedades farmacodinâmicas (como potência, afinidade e seletividade) e farmacocinéticas (como absorção, metabolismo e biodisponibilidade).^[24,25] Os compostos otimizados são escolhidos como compostos líderes, e esse processo é conhecido como “de ligante a líder” (*hit-to-lead*, em inglês).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos continua com a otimização dos compostos líderes (*lead optimization*, em inglês) em relação às suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, com o objetivo de descobrir novos compostos com alto potencial de desenvolvimento clínico. Nesse sentido, a química medicinal oferece diversas estratégias que desempenham um papel importante nesse processo de otimização, como estudos da Relação Estrutura-Atividade (SAR, do inglês *Structure-Activity Relationship*) que orienta a síntese de novas moléculas com propriedades otimizadas, reduzindo o universo de compostos a serem considerados nos programas de triagem biológica.^[25]

Durante toda a fase pré-clínica são realizados diversos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de direcionar o melhor candidato à fármaco para a etapa de

desenvolvimento (ensaios clínicos). Na fase clínica, inicialmente ocorre uma avaliação sequencial em voluntários humanos saudáveis para determinar a segurança do candidato à fármaco, em seguida, o objetivo é avaliar sua eficácia e estabelecer a relação dose-resposta em um pequeno grupo de voluntários afetado pela doença. Posteriormente, estudos abrangentes envolvendo milhares de pacientes afetados pela doença em questão são avaliados com o objetivo de estabelecer segurança e eficácia a curto e longo prazo. Por fim, o candidato à fármaco torna-se um medicamento e os estudos pós-comercialização são iniciados para acompanhar e garantir a segurança e eficácia do medicamento em seu contexto real de utilização.^[23,26] Os órgãos reguladores (por exemplo, OMS e FDA) acompanham cada etapa presente na fase clínica e são os responsáveis por autorizar o uso e comercialização de medicamentos em um determinado território (Figura 3).

Figura 3 – Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.



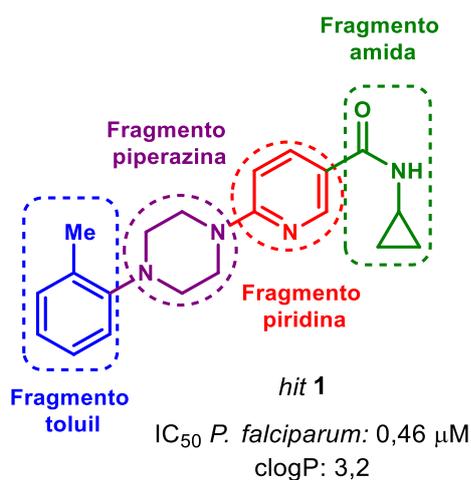
Fonte: Do autor.

1.3 *Hit* 1: derivado de piridilpiperazina

Vários estudos foram conduzidos em colaboração com organizações e empresas internacionais, como a GlaxoSmithKline (GSK) e a Medicines for Malaria Venture (MMV), visando superar as limitações dos tratamentos atuais.^[27] Um esforço notável envolveu a realização de uma triagem de alto rendimento (HTS) contra o *P. falciparum*, utilizando uma

biblioteca química de 2 milhões de compostos fornecida pela GSK. Essa triagem identificou aproximadamente 500 compostos como candidatos promissores para otimização.^[28] A partir desses resultados, foi selecionado como *hit*, o derivado de piridilpiperazina **1**, para iniciar um trabalho de otimização dessa classe contra *P. falciparum*, devido à sua potência *in vitro* e boa lipofilicidade ($IC_{50} = 0,46 \mu M$; $clogP = 3,2$) (Figura 4).^[28]

Figura 4– Estrutura química do *hit 1*.



Fonte: Do autor

Este trabalho encontra-se atualmente na fase pré-clínica do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, com foco na etapa *hit-to-lead*. Neste estudo, relatamos uma investigação de SAR específica para os fragmentos toluil e amida do *hit* inicial (Figura 4). O fragmento toluil pode ser mais suscetível ao metabolismo oxidativo devido à presença do grupo metil benzílico, enquanto o fragmento amida apresenta alto risco de hepatotoxicidade devido a formação de intermediários reativos com a abertura do anel, capazes de formarem adultos covalentes com as proteínas hepáticas.^[29–32]

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar otimizações estruturais na classe das piridilpiperazinas (*hit 1*), a fim de identificar algum composto líder contra a malária.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o *hit 1* e confirmar sua potência contra *P. falciparum*;
- Planejar e realizar modificações estruturais em todos os fragmentos do *hit 1*;
- Avaliar a atividade antimalárica e citotoxicidade dos derivados do *hit 1*;
- Determinar o perfil farmacocinético *in vitro* dos compostos mais promissores;
- Avaliar a atividade antimalárica em modelos *in vivo* dos compostos com o melhor perfil biológico.

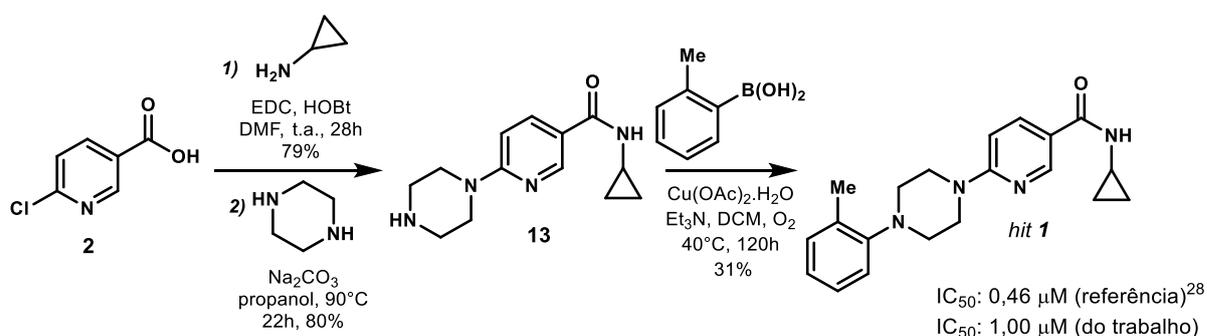
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os compostos sintetizados neste trabalho foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (Anexo 1) e submetidos a ensaios fenotípicos contra o *P. falciparum* realizados em parceria com o laboratório de parasitologia coordenado pelo professor Gerhard Wunderlich do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.1 Planejamento sintético do *hit 1*

O *hit 1* foi sintetizado com o objetivo de confirmar sua potência contra o *P. falciparum* reportada na literatura através de trabalhos de HTS. Então, foi realizada uma reação de amidação entre o ácido *p*-cloronicotínico **2** e a ciclopropilamina, seguida de uma reação de Substituição Nucleofílica Aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) com um excesso de piperazina. Por fim foi realizado uma aminação de Chan-Lam utilizando o ácido tolúil borônico, conforme ilustrado no Esquema 1.

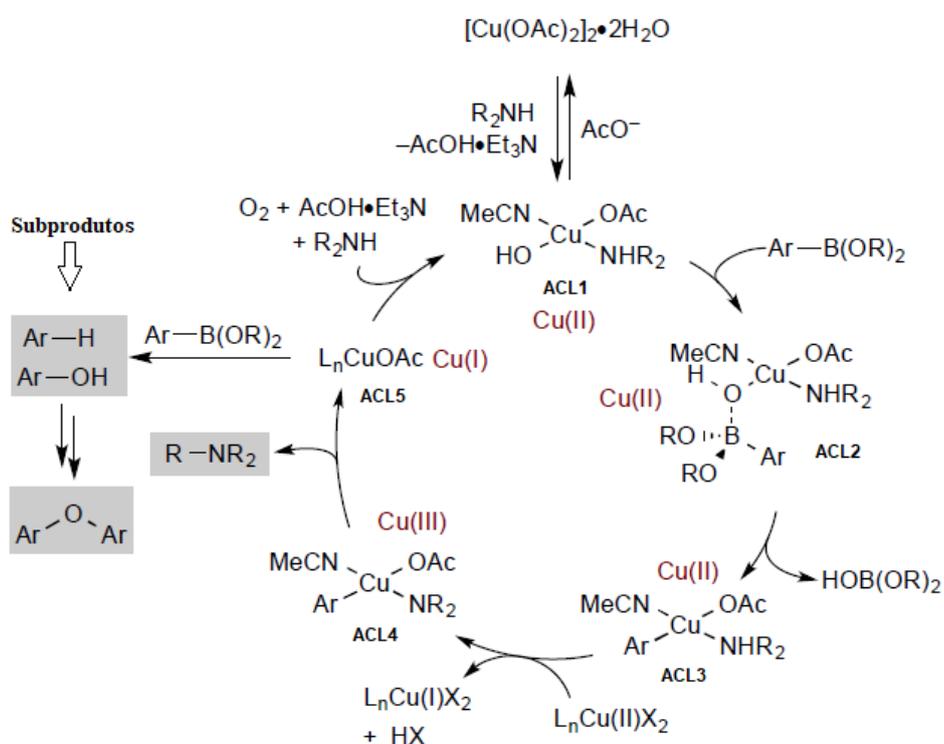
Esquema 1– Rota sintética para obtenção do *hit 1*.



A aminação de Chan-Lam trata-se de uma reação de acoplamento cruzado entre um ácido aril borônico e uma amina utilizando um catalizador de cobre para obter a arilamina correspondente. Esta reação é responsável por acoplar um composto aril organoboro e uma amina, geralmente sob condições oxidativas leves (ar ou O_2). O mecanismo para essa aminação é complexo, no entanto alguns experimentos indicam que envolve a formação de um complexo mononuclear de $\text{Cu}(\text{II})$ (**ACL1**) pela ação da amina (desnucleação). Esse evento de desnucleação é essencial para a catálise, no entanto o AcO^- e AcOH podem inibir esse processo. O componente de organoboro leva à transmetalção via estado de transição de 4 membros

(**ACL2**) que fornece espécies de Cu(II) (**ACL3**). Em seguida ocorre a oxidação à Cu(III) gerando **ACL4** via desproporcionamento seguido de uma seletiva eliminação reductiva C-N liberando o produto amina desejado e uma espécie de Cu(I)OAc (**ACL5**). Finalmente, a etapa catalítica é finalizada por meio da oxidação à Cu(II) na presença de O₂, que é facilitada na presença do substrato de amina. Esse processo de reoxidação à Cu(II) resulta na formação de subprodutos devido à sua lenta velocidade, permitindo a oxidação promovida por Cu(I) e a protodeboronação^[33], conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5– Proposta de mecanismo para a aminação de Chan-Lam.



Fonte: Vantourout *et al.*, 2017. Adaptado pelo autor.

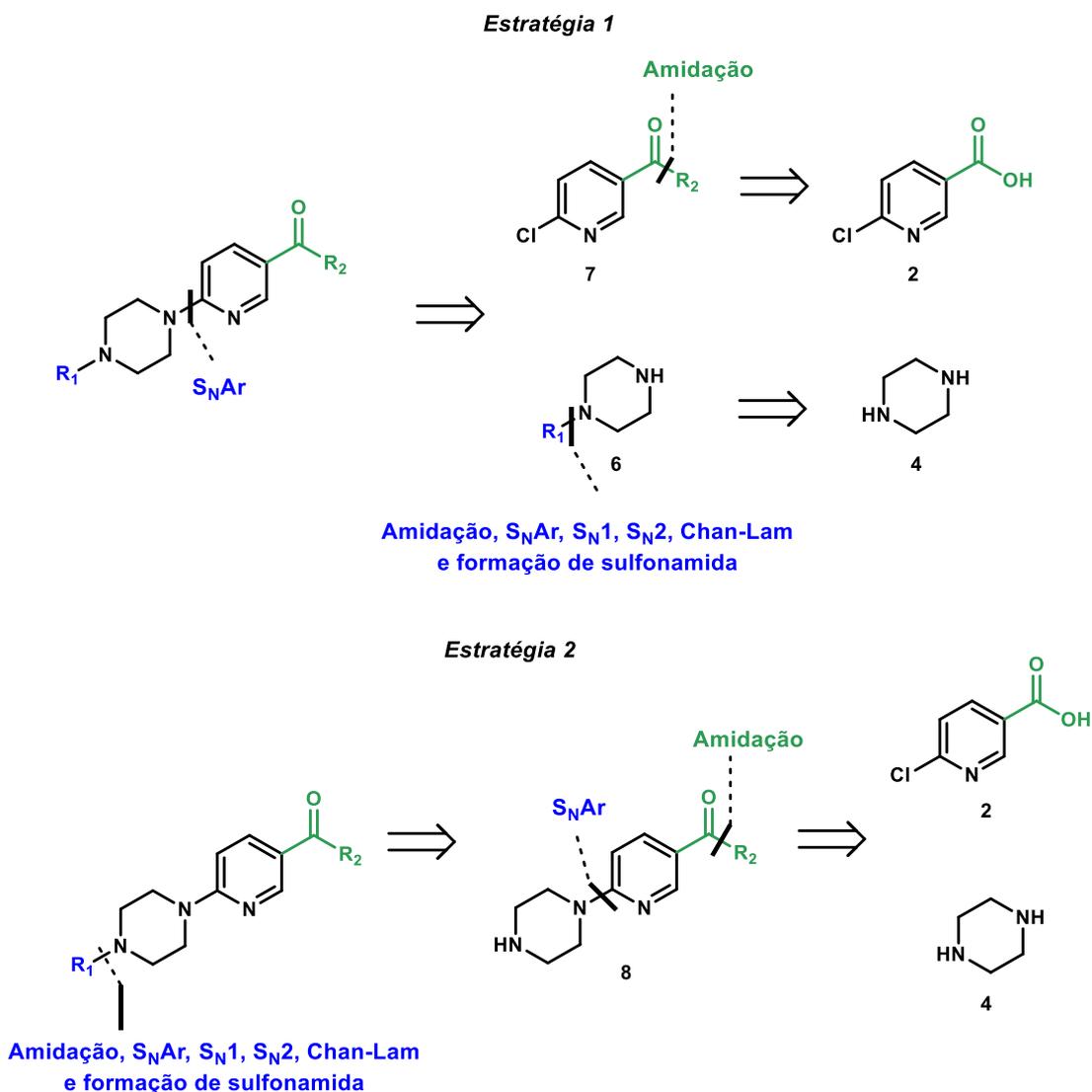
Após a síntese e caracterização, o *hit 1* foi testado *in vitro* contra o *P. falciparum* (cepa 3D7), apresentando um IC₅₀ de 1,0 μM, ou seja, aproximadamente o dobro do valor reportado na literatura. Apesar dessa diferença, o *hit 1* continua bastante potente contra *P. falciparum* e atrativo para iniciar um trabalho de otimização. É importante ressaltar que as metodologias utilizadas para determinar esses valores de IC₅₀ são diferentes, assim, este estudo será baseado nos dados obtidos pela metodologia descrita neste trabalho, ou seja, IC₅₀ do *hit 1* igual a 1,0 μM. O *hit 1* foi enviado para a determinação do perfil farmacocinético *in vitro* para estabelecer

algumas propriedades ADME, tais como estabilidade metabólica (*clearance* e tempo de meia-vida), permeabilidade e coeficiente de distribuição (logD).

3.2 Análise retrossintética dos derivados com modificações no fragmento tolúil e amida

Confirmada a potência do *hit* **1**, foi realizado o planejamento sintético dos derivados de interesse com modificações nos fragmentos tolúil e amida. Para realizar modificações nesses fragmentos, foram utilizadas duas estratégias sintéticas, a primeira envolve uma reação de S_NAr a partir do cloreto de arila **7** e do derivado piperazínico **6**. O composto **7** pode ser obtido através de uma reação de amidação partindo do ácido *p*-cloronicotínico **2**, enquanto o derivado piperazínico **6** pode ser obtido através de amidação, S_NAr, S_N1, S_N2, formação de sulfonamidas ou Chan-Lam a partir da piperazina **4**. A segunda estratégia pode utilizar amidação, S_NAr, formação de sulfonamidas ou Chan-Lam a partir da amina **8**, que por sua vez, pode ser obtida através de uma amidação partindo do ácido *p*-cloronicotínico **2**, seguida de uma S_NAr com a piperazina **4** (Esquema 2).

Esquema 2— Estratégias sintéticas para obtenção dos derivados com modificações nos fragmentos tolúil e amida.

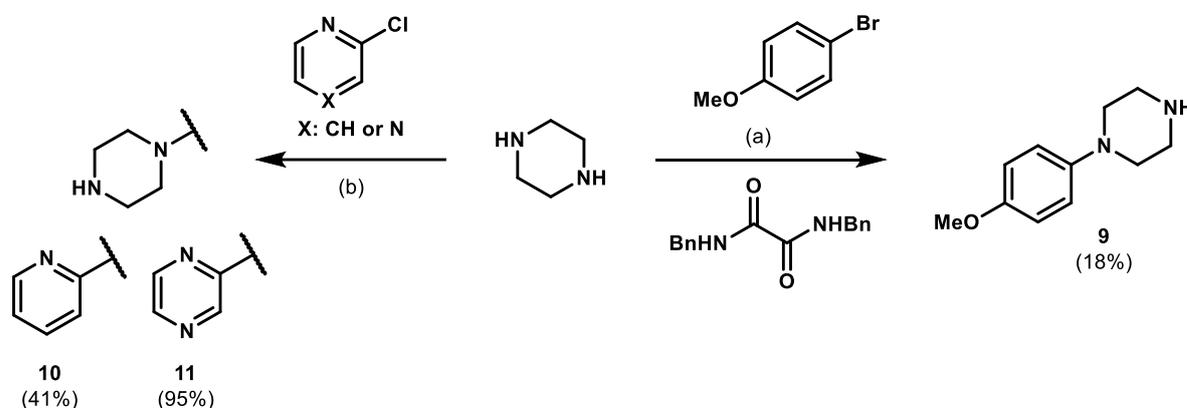


Fonte: Do autor.

3.3 Síntese dos derivados com modificações no fragmento toluil

Os intermediários **9-11** foram sintetizados a partir da piperazina e do haleto de arila correspondente (Esquema 3). A arilpiperazina **9** foi obtida por meio do acoplamento catalisado por Cu(I) do 4-bromoanisol com um excesso de piperazina, utilizando dibenziloxalamida como ligante.^[34] A substituição nucleofílica aromática entre a piperazina e o cloreto de arila correspondente produziu os compostos **10** e **11** com rendimentos de 41% e 95%.

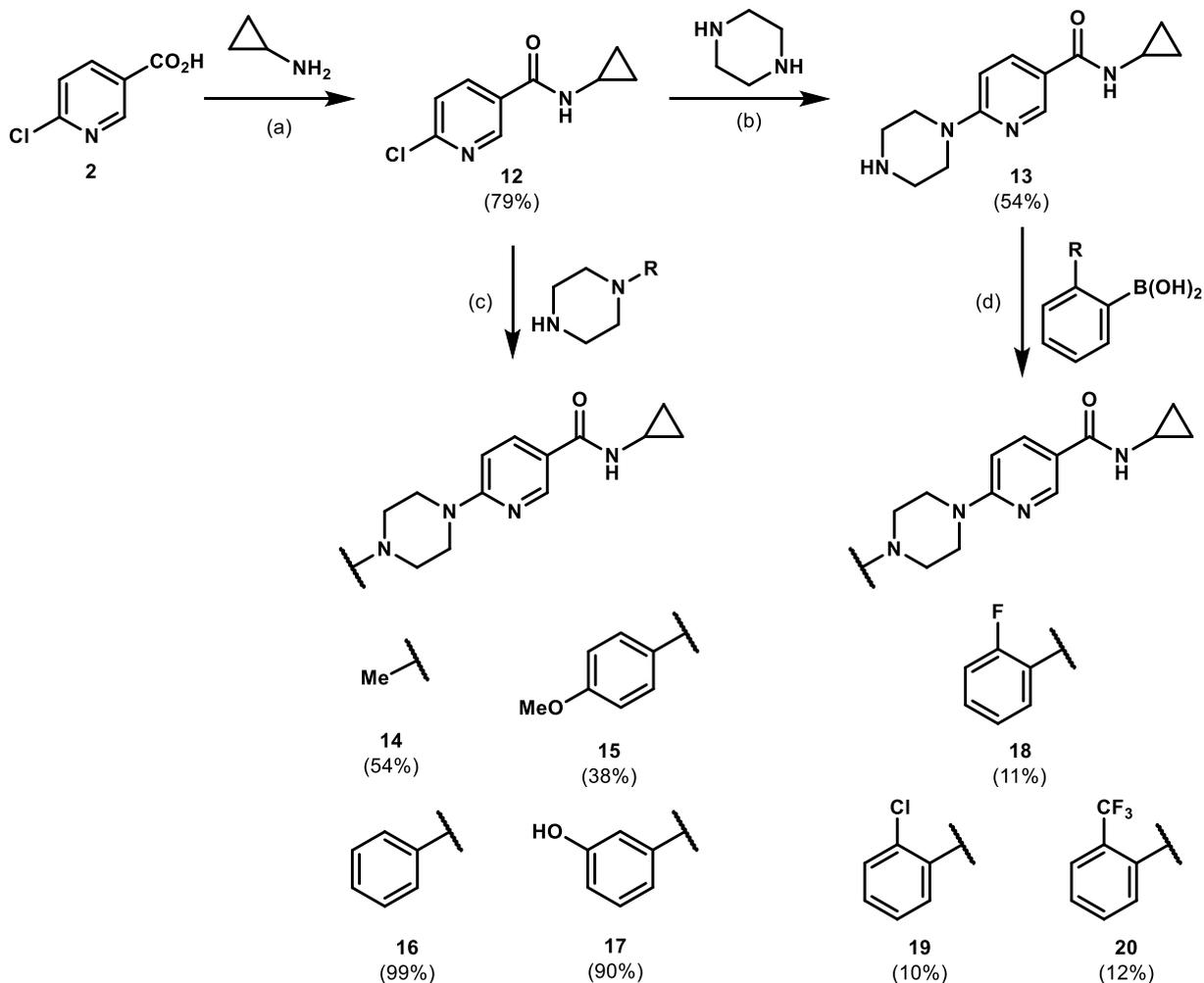
Esquema 3– Síntese dos intermediários 9-11.



Reagentes e condições: (a) CuI, KOH, EtOH, 70°C, 23h, 18%. (b) Na₂CO₃, DMF ou iPrOH, 80°C – 130°C, 24h – 36h, 41 – 95%.

O composto **12** foi sintetizado com um rendimento de 79% através do acoplamento de amida entre o ácido 6-cloronicotínico e a ciclopropanamina, mediado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (Esquema 4). Os derivados **13-17** foram obtidos por substituição nucleofílica aromática entre o composto **12** e um excesso de piperazina (para **13**) ou o derivado de piperazina correspondente (para **14-17**), com destaque para o composto **15** que utilizou o intermediário **9**, anteriormente sintetizado. Em seguida, o composto **13** foi utilizado para sintetizar os compostos **18-20**, através da aminação de Chan-Lam com o ácido aril borônico apropriado, utilizando catálise de cobre sob atmosfera de O₂ (Esquema 4).^[33]

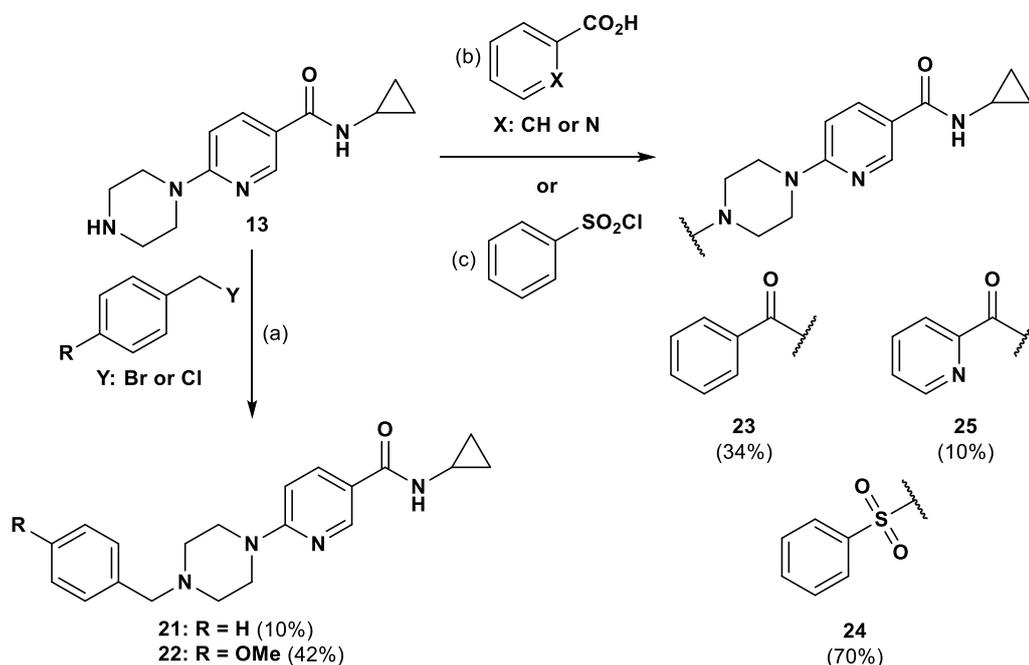
Esquema 4 – Síntese dos compostos 13-20.



Reagente e condições: (a) EDC, HOBT, DMF, t.a, 28h, 79%. (b) Na₂CO₃, PrOH, 85°C, 22h, 54%. (c) Na₂CO₃, PrOH ou DMF, 70 – 110°C, 65 – 118h, 38 – 99%. (d) Cu(OAc)₂.H₂O; Et₃N; O₂; peneira molecular (4 Å);

Os derivados **21** e **22** foram preparados por meio de uma substituição nucleofílica entre a amina **13** e o brometo de benzila ou cloreto de *p*-metoxibenzila (Esquema 5). Os ácidos benzoico e picolínico foram utilizados para obter os compostos **23** e **25** por meio de um acoplamento de amida com a amina **13**. A sulfonamida **24** foi sintetizada com rendimento de 70% a partir da amina **13** e do cloreto de benzenossulfonila, utilizando trietilamina em diclorometano (Esquema 5).

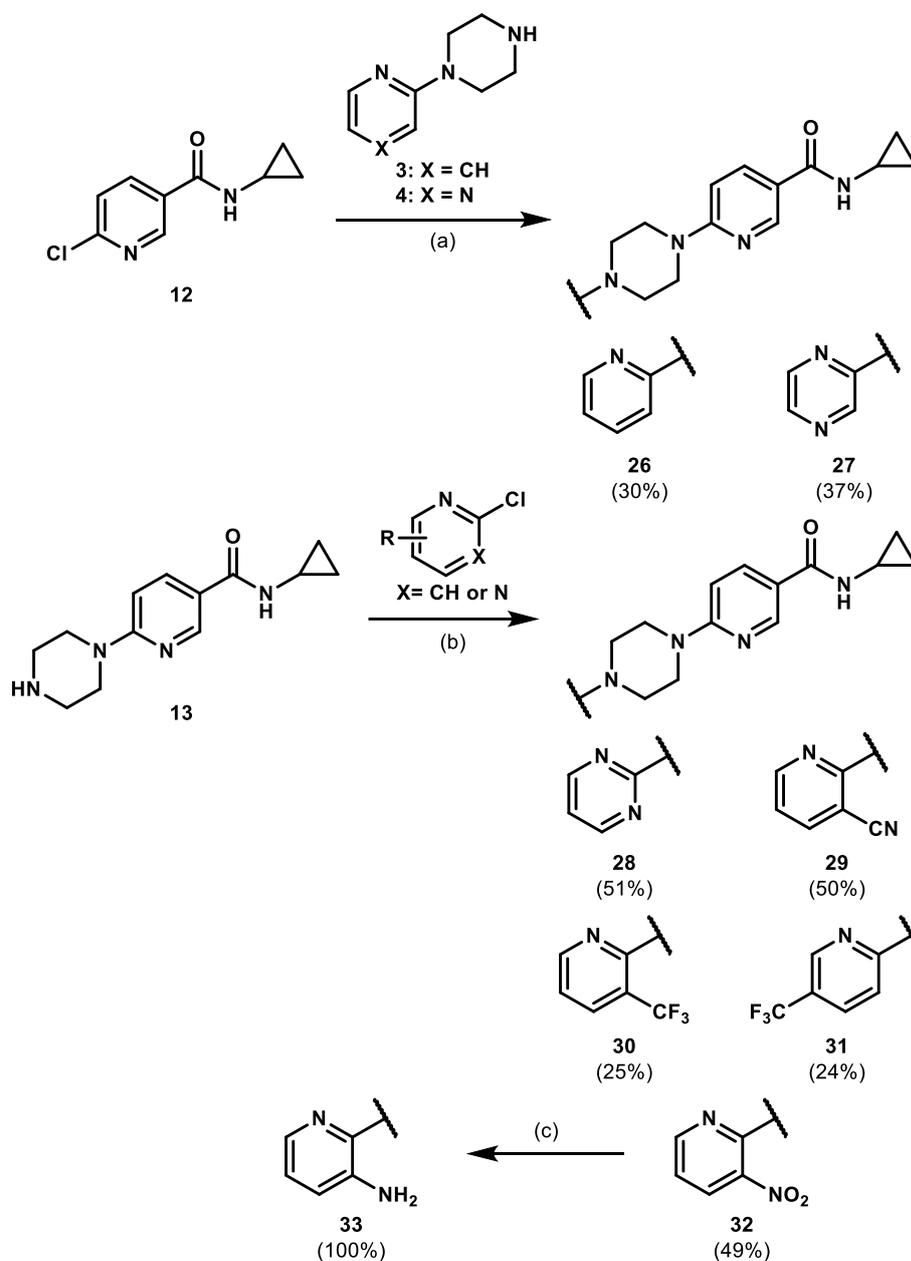
Esquema 5– Síntese dos compostos 21-24



Reagentes e condições: (a) Na_2O_3 , DMF, 50-110°C, 21h-24h, 10-42%. (b) EDC, HOBt, DMF, t.a, 21h-22h, 10-34%. (c) Et_3N , DCM, t.a, 23h, 70%.

Os intermediários **3** e **4**, previamente sintetizados, foram utilizados para obter os compostos **26** e **27** por meio de uma substituição nucleofílica aromática com o composto **12**, com rendimentos de 30% e 37%, respectivamente (Esquema 6). A mesma reação, entre a amina **13** e o cloreto de arila correspondente, forneceu os compostos **28-32** em rendimentos de moderados a médios. Por fim, o composto **33** foi obtido quantitativamente por meio de hidrogenação catalítica do derivado **32** em MeOH/EtOAc (1:1) (Esquema 6).

Esquema 6– Síntese dos compostos 26-31.



Reagentes e condições: (a) Na_2CO_3 , DMF, 100-120°C, 72-96h, 30-37%. (b) Na_2CO_3 , DMF ou PrOH, 80-130°C, 22-65h, 24-51%. (c) H_2 , Pd/C, MeOH/EtOAc (1:1), t.a, 100%.

No presente estudo, foram realizadas análises detalhadas dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) de todos os compostos sintetizados. O objetivo foi investigar a estrutura molecular e a conectividade atômica dos compostos, fornecendo informações valiosas para a compreensão de sua estrutura. Devido à extensa variedade de compostos e à semelhança estrutural dos derivados sintetizados, decidiu-se

selecionar os espectros de um composto (**28**) como representativo para os demais e realizar uma discussão mais aprofundada. Todos os outros espectros estão reportados no Anexo 1.

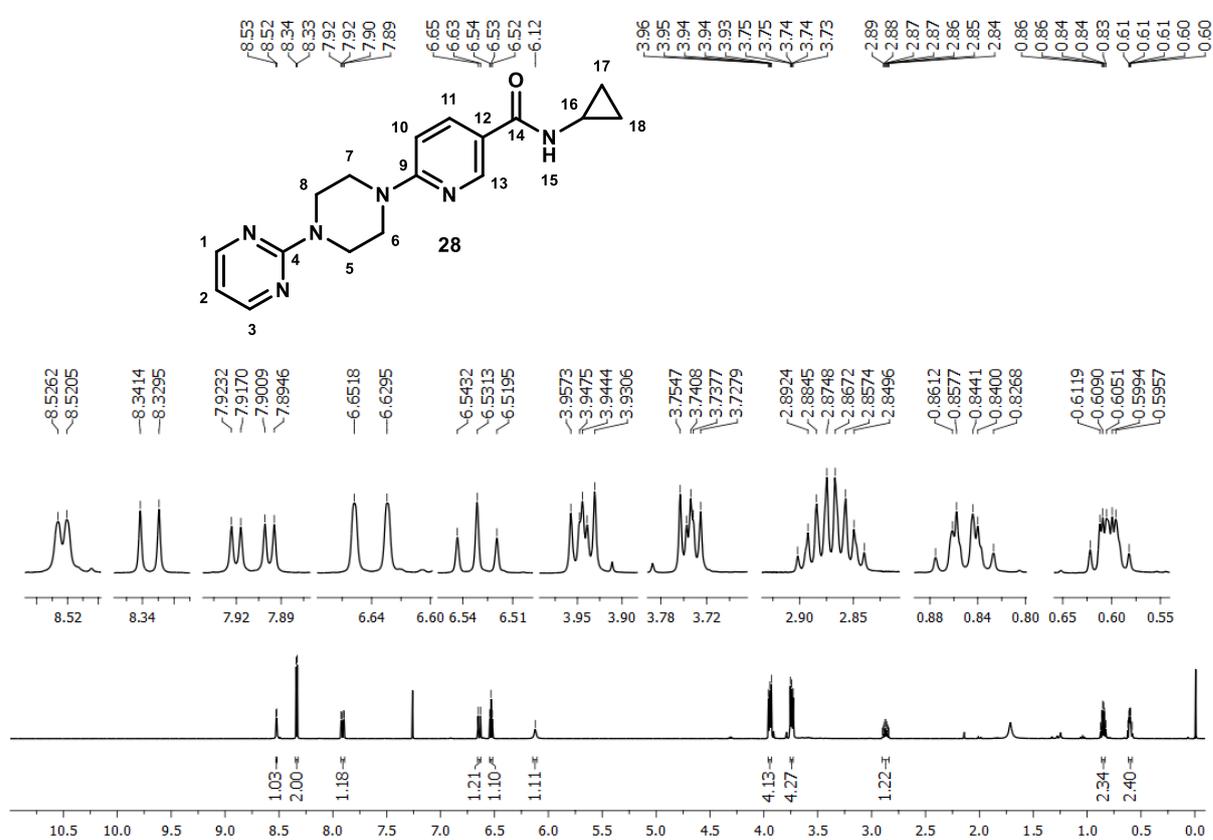
O espectro de RMN de ^1H do composto **28** (Figura 6) apresentou onze sinais referentes aos vinte hidrogênios determinados através da integral de cada sinal. Na região característica de hidrogênio aromático, o sinal em torno de δ 8,52 é observado como um duplete, integrando para um hidrogênio e com constante de acoplamento (J) de 2,5 Hz, característica de acoplamento entre hidrogênios na posição *meta*. Essa observação sugere que o hidrogênio em questão está diretamente ligado ao C-13 e realiza acoplamento *meta* com o hidrogênio do C-11. Também foi observado que o hidrogênio possui deslocamento bastante distante do TMS, o que pode ser explicado pela influência do efeito retirador de elétrons da carbonila adjacente por ressonância e do efeito indutivo do nitrogênio endocíclico vizinho.

O duplete observado em δ 8,34 apresentou integral de 2, referente à dois hidrogênios com ambiente químico semelhante. Esses hidrogênios estão diretamente ligados aos carbonos C-1 e C-3 que realizam acoplamento com o hidrogênio do carbono C-2, na posição *orto*. Essa observação pode ser confirmada pela constante de acoplamento (J) de 4,7 Hz, característica de acoplamento *orto* em anéis pirimidínicos. O duplo duplete em torno de δ 7,91 é referente ao hidrogênio do carbono C-11, que realiza acoplamento em *orto* com o carbono C-10 ($J = 9,0$ Hz) e *meta* com o carbono C-13 ($J = 2,5$ Hz). O sinal em torno de δ 6,64, que se apresenta como um duplete com uma constante de acoplamento (J) de 9,0 Hz, confirma a presença de um acoplamento *orto* entre os hidrogênios dos carbonos C-10 e C-11. Isso indica que o hidrogênio do carbono C-10 é responsável por esse sinal específico. Além disso, foi observado um tripleto em torno de δ 6,53, o qual é resultado de dois acoplamentos entre hidrogênios quimicamente equivalentes. Esse sinal indica a presença do hidrogênio pertencem ao carbono C-2, que acopla aos hidrogênios dos carbonos C-1 e C-3, demonstrado pelo tripleto, com constante de acoplamento de 4,7 Hz.

O sinal em δ 6,12 corresponde ao hidrogênio 15, que está ligado ao nitrogênio da amida. Esse singlete largo é característico de hidrogênios de amidas, devido ao efeito dos três estados de spin do núcleo de nitrogênio, que estão mudando a uma velocidade moderada. Os multipletos entre δ 3,96-3,73 são atribuídos aos hidrogênios da piperazina (C-5 a C-8). Nesse caso, existem dois sinais, cada um integrando para 4 hidrogênios. Essa observação ocorre devido à conformação da molécula, que apresenta hidrogênios em posições equatoriais e axiais. O sinal mais à esquerda no espectro corresponde aos hidrogênios em posição equatorial, uma vez que eles sofrem o efeito do cone de desblindagem resultante da ligação C-C do anel, enquanto o sinal mais à direita no espectro corresponde aos hidrogênios em posição axial. O multipletos

entre δ 2,90-2,84 está relacionado ao hidrogênio ligado ao C-16. Sua multiplicidade é resultado dos acoplamentos em *cis* e *trans* com os hidrogênios dos carbonos C-17 e C-18. Por fim, os dois multipletos entre δ 0,88-0,58 apresentam integral de 2 para cada sinal e são atribuídos aos hidrogênios em *cis* e *trans* dos carbonos C-17 e C-18. Pode-se atribuir os hidrogênios em posição *trans* ao multiplete mais à esquerda do espectro, pois estão mais desprotegidos eletronicamente, devido ao efeito do cone de desproteção da carbonila.

Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **28**.



Fonte: Do autor.

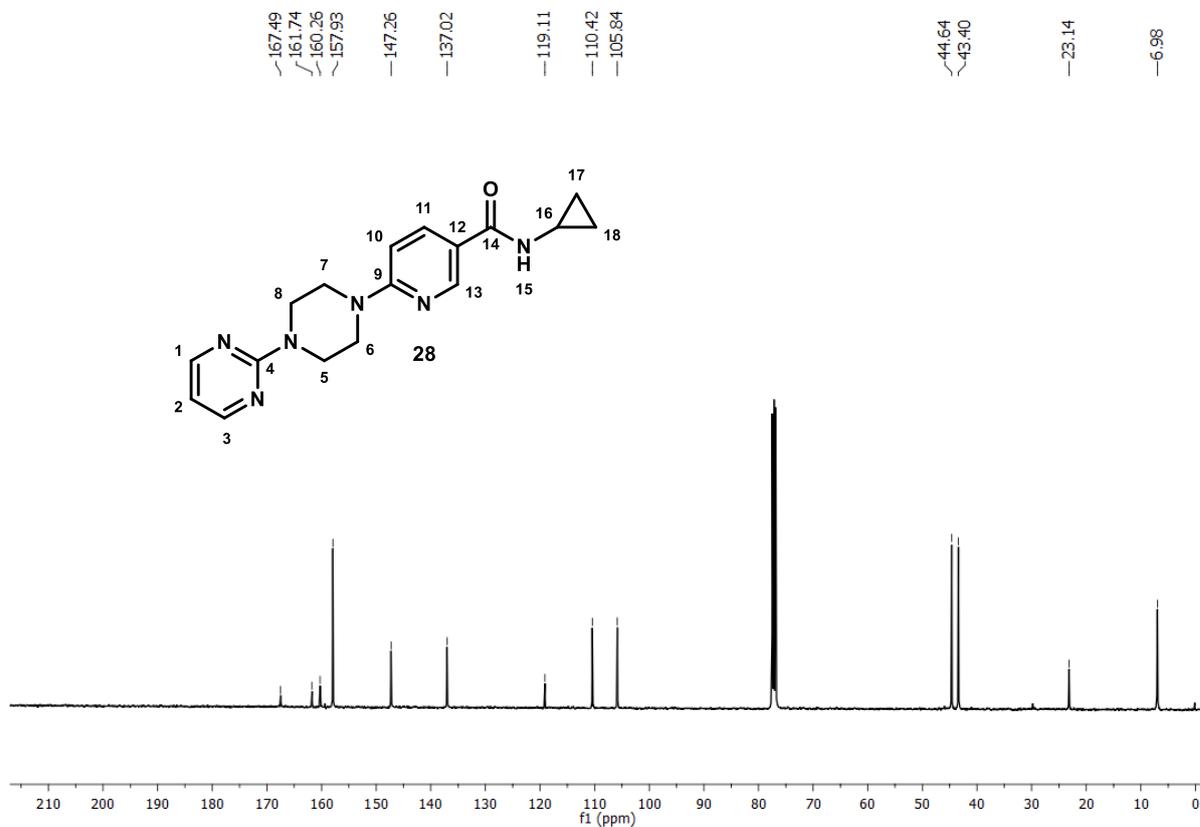
No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7), foram observados treze sinais distintos relacionados à estrutura do composto **28**. O sinal mais deslocado para a esquerda do espectro (δ 167,49) corresponde ao carbono carbonílico da amida (C-14). A intensidade e o deslocamento desse sinal indicam características de carbonos ($\text{C}=\text{O}$) presentes em ácidos carboxílicos e seus derivados, como é o caso da amida. Os sinais em δ 161,74 e δ 160,26, de baixa intensidade, são típicos de carbonos quaternários. Seus deslocamentos mais à esquerda

no espectro são atribuídos ao efeito retirador de elétrons de átomos vizinhos mais eletronegativos, como o nitrogênio. Nesse caso, pode-se atribuir esses dois sinais da seguinte forma: o sinal mais à esquerda (δ 161,74) refere-se ao carbono menos protegido eletronicamente, ou seja, aquele que sofre o maior efeito retirador de elétrons. Esse carbono é o C-4, que sofre a influência do efeito retirador de elétrons por indução de três átomos de nitrogênio vizinhos. Já o sinal mais à direita (δ 160,26) corresponde ao carbono C-9, que também sofre influência semelhante, porém com apenas dois átomos de nitrogênio vizinhos.

O sinal intenso em δ 157,93 pode ser atribuído aos dois carbonos aromáticos C-1 e C-3. Esses carbonos são quimicamente equivalentes e são afetados pelo efeito eletrônico do nitrogênio, o que explica seu deslocamento para a esquerda no espectro. Os sinais em δ 147,26 e δ 137,42 são relacionados aos carbonos aromáticos C-13 e C-11, respectivamente. Seus deslocamentos podem ser explicados pelo efeito mesomérico retirador de elétrons da carbonila, o que torna esses dois carbonos menos protegidos eletronicamente. Além disso, o C-13 sofre também o efeito indutivo retirador de elétrons do nitrogênio vizinho, o que contribui para seu maior deslocamento em relação ao carbono C-11. O sinal de baixa intensidade em δ 119,11 refere-se a um carbono quaternário. Portanto, podemos atribuir esse sinal ao carbono C-12, característico dessa região do espectro. Os sinais em δ 110,42 e δ 105,84 devem ser atribuídos aos carbonos C-2 e C-10, respectivamente. Ambos sofrem o efeito de proteção por mesomeria do nitrogênio da piperazina. No entanto, o carbono C-2 possui dois átomos de nitrogênio endocíclicos no mesmo anel, que atraem densidade eletrônica para si e, conseqüentemente, desprotegem o carbono C-2.

Os sinais em δ 44,64 e δ 43,40 correspondem aos carbonos da piperazina, C-5 a C-8. A intensidade e o deslocamento desses sinais indicam a presença de dois carbonos alifáticos em cada sinal. Além disso, o sinal em torno de δ 23,14 é referente ao carbono C-16, que é um carbono terciário (CH) ligado diretamente ao nitrogênio, um átomo eletronegativo, o qual retira elétrons por indução. Por fim, o sinal mais deslocado à direita no espectro (δ 6,98) refere-se aos dois carbonos secundários (C-17 e C-18). A intensidade desse sinal sugere a presença dos dois carbonos (CH₂).

As informações obtidas dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C oferecem uma descrição detalhada da conectividade entre os átomos na molécula em estudo. A presença dos diversos sinais e suas multiplicidades ajudaram a identificar e confirmar a estrutura do composto **28** de forma conclusiva. A Tabela 1 reúne as principais informações sobre os espectros de ¹H e ¹³C, bem como a atribuição dos hidrogênios e carbonos aos sinais observados.

Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **28**.

Fonte: Do autor.

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **28** (CDCl_3).

Posição H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} , J^{c})	Posição C	$\delta_{\text{C}}^{\text{d}}$
H-1 e H-3	δ 8,34 (d, $J = 4,7$ Hz)	C-1 e C-3	δ 157,93
H-2	δ 6,53 (t, $J = 4,7$ Hz)	C-2	δ 110,42
H-5 – H-8 (eq.) ^e	δ 3,96-3,93 (m)	C-4	δ 161,74
H-5 – H-8 (ax.) ^f	δ 3,75-3,73 (m)	C-5 e C-8	δ 44,64
H-10	δ 6,64 (d, $J = 9,0$ Hz)	C-6 e C-7	δ 43,40
H-11	δ 7,91 (dd, $J = 9,0$ e 2,5 Hz)	C-9	δ 160,26
H-13	δ 8,52 (d, $J = 2,5$ Hz)	C-10	δ 105,84
H-15	δ 6,12 (s)	C-11	δ 137,02
H-16	δ 2,93-2,82 (m)	C-12	δ 119,11
H-17 e H-18 (<i>trans</i>)	δ 0,89-0,82 (m)	C-13	δ 147,26

Posição H	δ_H^a (m ^b , J ^c)	Posição C	δ_C^d
H-17 e H-18 (<i>cis</i>)	δ 0,63-0,57 (m)	C-14	δ 167,49
–	–	C-16	δ 23,14
–	–	C-17 e C-18	δ 6,98

a: deslocamento químico (ppm) de hidrogênio em relação ao TMS como padrão interno. b: multiplicidade. c: constante de acoplamento em Hz. d: deslocamento químico (ppm) de carbono em relação ao TMS como padrão interno. e: hidrogênios na posição equatorial. f: hidrogênios na posição axial.

3.4 Ensaios biológicos

A atividade *in vitro* anti-*P. falciparum* (IC₅₀) do *hit 1* e de todos os derivados com modificações no fragmento toluil, com exceção dos intermediários **9-12**, foi avaliada em células eritrocíticas infectadas com *P. falciparum* (cepa 3D7). Para os compostos com IC₅₀ inferior a 15 μ M, a citotoxicidade *in vitro* (CC₅₀) contra células HepG2 não infectadas e o IC₅₀ contra *P. falciparum* (cepa Dd2) também foram determinados. O índice de seletividade (SI) foi calculado como a razão entre o valor de CC₅₀ determinado no ensaio de citotoxicidade e o valor de IC₅₀ determinado no ensaio de atividade antimalárica.

3.4.1 Relação estrutura-atividade contra *P. falciparum* (3D7)

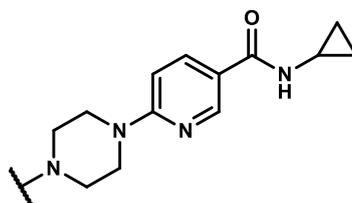
Inicialmente, foi avaliado o fragmento toluil do *hit 1* e, para confirmar sua relevância na atividade antiplasmódica, foram realizados testes com seus primeiros derivados. Observou-se uma diminuição significativa de atividade nos derivados piperazina **13** e *N*-metilpiperazina **14** (IC₅₀ > 100 μ M, Tabela 2) em comparação com o *hit 1*, o que indica fortemente a importância crítica do fragmento *N*-*orto*-toluilpiperazina para a atividade do *hit 1*. Com base nisso, foi planejado um conjunto inicial de derivados monossustituídos de *N*-arilpiperazina para avaliar a influência dos efeitos eletrônicos do substituinte, sejam eles efeitos indutivos e/ou mesoméricos.

A inversão do efeito indutivo, substituindo o grupo *orto*-metil por grupos retiradores de elétrons por indução (F, Cl e CF₃), foi relevante. Os compostos **18** (*orto*-F) e **20** (*orto*-CF₃) mantiveram potências comparáveis ao *hit 1*, enquanto o composto **19** (*orto*-Cl) apresentou uma atividade duas vezes maior do que o *hit 1*. Além do efeito na atividade, essas modificações são relevantes devido à sua tendência de aumentar a estabilidade metabólica em comparação com

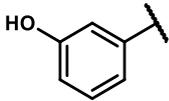
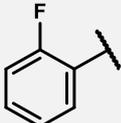
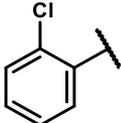
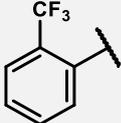
o *hit 1*, devido à substituição do grupo metil por grupos bioisotérios, que são eletronicamente retiradores e reduzem a suscetibilidade ao metabolismo oxidativo no anel arila.^[29]

A manutenção desse efeito de retirada indutivo, juntamente com a adição de um efeito doador mesomérico (*meta*-OH **17** e *para*-OMe **15**), ou a supressão de todos os efeitos dos substituintes (derivado fenila **16**), resultaram em uma leve redução na atividade (três a seis vezes em comparação com o *hit 1*). Esses resultados demonstraram que tanto os efeitos estereoeletrônicos dos substituintes no anel arila quanto sua posição relativa têm pouca influência na atividade biológica. Curiosamente, os compostos com lipofilicidade próxima à do *hit 1* (clog P de 2,56) e o próprio *hit* apresentaram as maiores potências. Isso sugere que a lipofilicidade pode estar exercendo algum efeito na ação anti-*P. falciparum*, pois pode influenciar a facilidade de permeação através de membranas celulares, pois podem se dissolver nas bicamadas lipídicas das membranas.^[35,36]

Tabela 2– Atividade *in vitro* anti-*P. falciparum* (3D7) e lipofilicidade do *hit 1* e dos compostos **13-20**.



Composto	Estrutura	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μM) ^a	95% IC para <i>Pf3D7</i> IC ₅₀ ^b	clog(P) ^c
1		1,00	0,84 – 1,19	2,56
13		>100	ND	0,76
14		>100	ND	1,05
15		2,9	2,47 – 3,45	2,23
16		6,0	5,38 – 6,66	2,21

Composto	Estrutura	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (µM) ^a	95% IC para <i>Pf3D7</i> IC ₅₀ ^b	clog(P) ^c
17		4,1	3,05 – 5,26	1,84
18		1,3	1,18 – 1,43	2,56
19		0,4	0,38 – 0,51	2,78
20		1,7	1,20 – 2,50	3,29

a) atividade antiplasmodial (IC₅₀) determinada em eritrócitos infectados com *P. falciparum* (3D7); b) intervalo de confiança de 95% para o valor de IC₅₀ contra o *P. falciparum* (3D7); c) valores de clog(P) calculados *in silico* usando a ferramenta online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>). ND: não determinado.

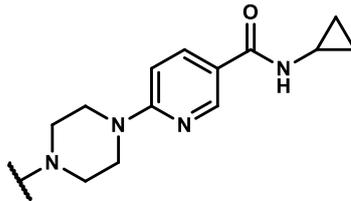
Os derivados benzil, amida e sulfonamida **21-24** foram planejados com o objetivo principal de avaliar o impacto da introdução de um espaçador entre a piperazina e o anel aril. Além disso, esses derivados foram sintetizados visando possíveis melhorias em termos de estabilidade metabólica, por meio da redução da densidade eletrônica no anel aromático. Isso poderia ser alcançado impedindo a doação de elétrons da piperazina ao anel (por meio do ligante metileno nos derivados **21** e **22**) e retirando elétrons do anel (através do efeito mesomérico do ligante nos derivados **23** e **24**) (Tabela 3).

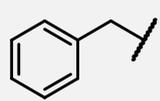
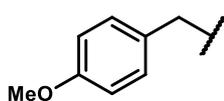
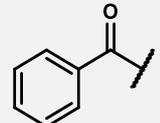
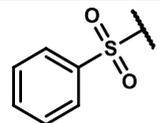
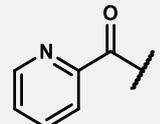
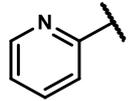
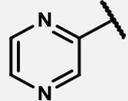
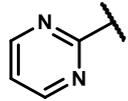
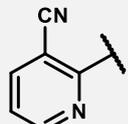
Dentre todas essas modificações, a introdução de um ligante de metileno teve o menor impacto na atividade antiplasmodial, reduzindo-a apenas duas ou três vezes em comparação com os derivados de *N*-arilpiperazina (**21** em relação a **16** e **22** em relação a **15**). Por outro lado, a presença de um espaçador de carbonila entre o anel aromático e o anel piperazina foi altamente prejudicial, levando à perda completa de atividade (**23** em relação a **16**). Uma ligação sulfonil semelhante teve, em menor grau, o mesmo impacto negativo que a ligação amida, como evidenciado na atividade exibida pela benzenossulfonamida **24**, que foi seis vezes menor que a fenilpiperazina **16**.

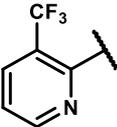
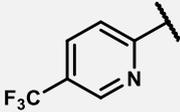
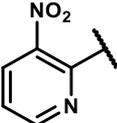
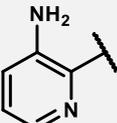
A partir desses resultados, parece que não apenas a presença do anel aril é necessária para a atividade antiplasmodial desses compostos, como já demonstrado pelos derivados **13** e **14**, mas também é crucial que esse anel esteja diretamente ligado ao fragmento piperazina para manter uma potência anti-*P. falciparum* razoável. Essa tendência pode ser explicada pelos

efeitos estéricos e eletrônicos resultantes da introdução desses ligantes, que dificultam a interação dos compostos **21-24** com o sítio ativo do alvo ainda não identificado, alterando sua conformação espacial ou diminuindo drasticamente a densidade eletrônica do anel aromático.

Tabela 3 - Atividade *in vitro* anti-*P. falciparum* (3D7) e lipofilicidade dos compostos **21-33**.



Composto	Estrutura	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μM) ^a	95% IC para <i>Pf3D7</i> IC ₅₀ ^b	clog(P) ^c
21		10,9	8,90 – 12,60	2,29
22		6,5	5,72 – 7,43	2,30
23		> 100	ND	1,95
24		37,2	ND	1,67
25		> 100	ND	1,31
26		13,9	11,23 – 17,67	1,66
27		2,8	1,64 – 12,57	0,96
28		5,6	4,39 – 7,11	1,16
29		6,7	5,05 – 8,81	1,50

Composto	Estrutura	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μM) ^a	95% IC para <i>Pf3D7</i> IC ₅₀ ^b	clog(P) ^c
30		1,0	0,85 – 1,26	2,76
31		1,1	0,87 – 1,38	2,74
32		5,7	3,30 – 9,04	1,11
33		46,4	35,76 – 112,90	1,13

a) atividade antiplasmodial (IC₅₀) determinada em eritrócitos infectados com *P. falciparum* (3D7); b) intervalo de confiança de 95% para o valor de IC₅₀ contra o *P. falciparum* (3D7); c) valores de clog(P) calculados *in silico* usando a ferramenta online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>). ND: não determinado.

Uma estratégia para melhorar a estabilidade metabólica de um composto é reduzir a lipofilicidade geral da estrutura. Isso ocorre porque o local de ligação de enzimas metabolizadoras é, geralmente, de natureza lipofílica e, portanto, essas enzimas interagem mais facilmente com moléculas desse tipo.^[29,35,37] Pensando nisso, investigou-se o impacto da introdução de um átomo de nitrogênio no anel aromático. Essa investigação foi motivada pelas possíveis vantagens que essa modificação poderia oferecer, especialmente em relação à estabilidade metabólica e lipofilicidade. Com a introdução de nitrogênio no anel é possível aumentar a polaridade da estrutura e, conseqüentemente, reduzir a lipofilicidade e possibilidade de metabolismo no anel.^[29] Além disso, considerando a influência do nitrogênio endocíclico na distribuição eletrônica do anel aromático, também foi avaliado o derivado picolínico **25**, mas confirmou-se apenas a tendência observada anteriormente em **23** e **24**, pois esse composto apresentou grande perda de atividade contra *P. falciparum* (Tabela 3).

A incorporação de um único átomo de nitrogênio teve um impacto moderadamente prejudicial, com a atividade da piridilpiperazina **26** sendo quase três vezes menor do que a da fenilpiperazina **16**. No entanto, a introdução de um segundo nitrogênio endocíclico mostrou resultados muito melhores. O derivado de pirimidil **28** foi equipotente à **16**, enquanto a pirazinilpiperazina **27** foi duas vezes mais potente. Esses resultados são muito promissores, considerando as esperadas melhorias no perfil farmacocinético proporcionadas pelo nitrogênio adicional nos compostos **27** e **28** em comparação com **16**.

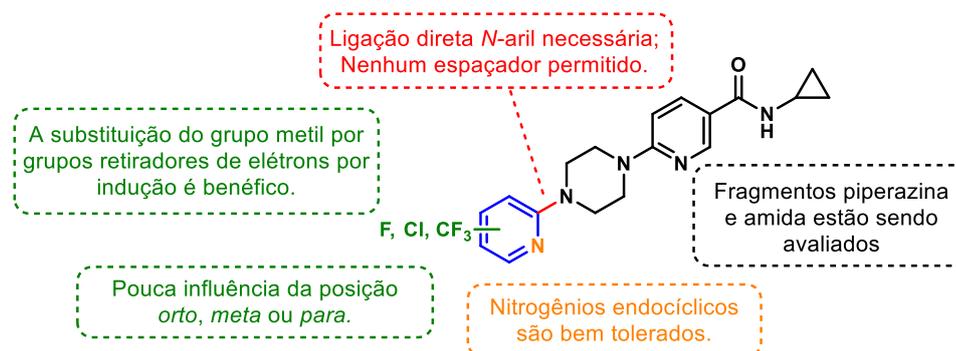
Devido aos resultados satisfatórios obtidos com os *N*-heterociclos, mesmo com a menor atividade dos derivados piridil, decidimos concluir nossa investigação do SAR explorando anéis piridil monossustituídos. Essa escolha se deve principalmente à acessibilidade sintética desses derivados e às amplas possibilidades em termos de padrões de substituição que eles oferecem (compostos **29-33**, Tabela 3).

A introdução de substituintes polares e retiradores de elétrons mesoméricos, como o grupo nitrila **29** ou nitro **32**, resultou em um aumento da atividade em duas vezes em comparação com a piridilpiperazina **26** sem substituintes. No entanto, a atividade desses derivados ainda era de seis a sete vezes menor que a do *hit* **1**. Foram realizadas modificações alterando o efeito retirador de elétrons mesomérico para indutivo. Isso resultou nos derivados trifluorometil otimizados **30** e **31**, que exibiram uma potência antiplasmodial comparável à do *hit* **1**, independentemente da posição *orto* ou *para* do substituinte CF₃. Além disso, esses derivados apresentam um perfil farmacocinético muito mais promissor, devido aos benefícios do grupo CF₃ e a presença de um nitrogênio endocíclico.

Na tentativa de explorar uma ampla variedade de efeitos eletrônicos, o nitropiridil **32** foi reduzido à anilina **33**, introduzindo assim um grupo doador de elétrons por efeito mesomérico. No entanto, essa modificação resultou em uma significativa redução da atividade, quase uma ordem de grandeza menor em comparação com o composto **32**. Essa redução na atividade pode ser compreendida levando em consideração a possível influência do nitrogênio endocíclico nos efeitos estereoeletrônicos do substituinte.

De modo geral, esse estudo SAR possibilitou identificar pontos críticos relacionados à atividade antiplasmodial da classe de compostos piridilpiperazina. Em primeiro lugar, verificou-se que o fragmento *N*-arilpiperazina é essencial para manter níveis significativos de potência contra o parasita, enquanto a presença de espaçadores entre os dois anéis não foi tolerada. Em relação ao anel aromático, foi observado que uma diversidade de (hetero)ciclos e substituintes foi bem-vinda e tolerada. Isso permitiu substituir o fragmento toluil, presente no *hit* **1**, por várias opções de anéis fenil, piridil, pirazinil ou pirimidil não substituídos ou monossustituídos, o que deve resultar em perfis farmacocinéticos mais favoráveis para os derivados otimizados. Um resumo gráfico dessas principais descobertas pode ser encontrado na Figura 8.

Figura 8 - Resumo gráfico do SAR realizado no fragmento toluil



Fonte: Do autor.

3.4.2 Perfil citotóxico em células HepG2

A citotoxicidade contra células HepG2 não infectadas foi determinada para todos os compostos cujo IC_{50} contra a cepa 3D7 do *P. falciparum* (*Pf3D7*) foi inferior a 15 μM (Tabela 1 e Tabela 2). Foi observado um baixo nível de citotoxicidade ($CC_{50} > 100 \mu M$) para nove compostos (**1**, **18**, **16**, **20**, **22**, **26**, **27**, **29** e **30**), destacando o perfil seletivo dessa série química. Alguns dos compostos mais ativos (IC_{50} próximo a 1,0 μM), como **1**, **18**, **20** e **30**, apresentaram um índice de seletividade (SI) superior a 59. Infelizmente, o derivado mais potente, **19**, mostrou-se também o mais citotóxico (16 vezes mais que o *hit* **1**), resultando em um índice de seletividade igual a 14 (Tabela 3).

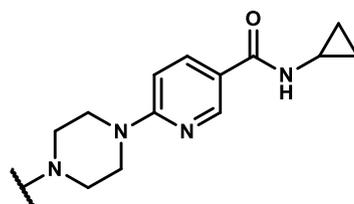
Por outro lado, compostos *orto*-fluorados, seja com um substituinte fluor (**18**) ou trifluormetil (**20** e **30**), conseguiram manter os parâmetros de atividade e citotoxicidade em níveis comparáveis à **1**. Considerando que observações semelhantes puderam ser feitas em relação à sua potência e considerando o perfil farmacocinético promissor esperado a partir de sua estrutura, esses resultados são extremamente relevantes para futuras otimizações da classe das piridilpiperazinas. Além disso, não foi evidenciada uma relação direta entre lipofilicidade e SI e/ou alta citotoxicidade, embora isso pudesse fazer sentido considerando a maior permeação das membranas celulares por compostos mais lipofílicos.^[36,38]

3.4.3 Atividade contra *P. falciparum* resistente (cepa Dd2)

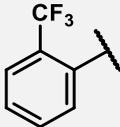
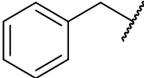
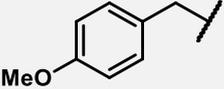
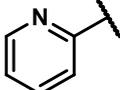
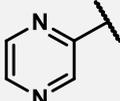
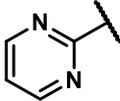
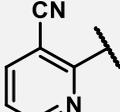
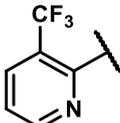
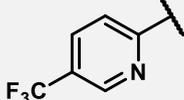
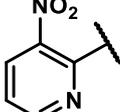
Para avaliar o potencial da série contra infecções resistentes a fármacos, também foi determinada a atividade antiplasmodial contra a cepa resistente Dd2 de *P. falciparum* (*PfDd2*) para todos os compostos com *Pf3D7* $IC_{50} < 15 \mu M$. Os resultados demonstraram que a atividade

desses derivados selecionados foi mantida contra essa cepa, o que é extremamente valioso considerando o recente surgimento de cepas resistentes de *P. falciparum*. A atividade dos compostos para os quais a atividade anti-3D7 já era ligeiramente menor do que a dos compostos otimizados foi reduzida pela metade contra Dd2 (compostos **15**, **17**, **22**, **28**, **29** e **32**, Tabela 4). Surpreendentemente, alguns compostos (**1**, **16**, **20** e **21**) mostraram-se mais ativos contra a cepa Dd2 do que contra a cepa 3D7. Isso foi principalmente o caso das fenilpiperazinas substituídas *orto*, pois tanto o *hit* **1**, o *orto*-Cl **19** quanto o *orto*-CF₃ **20** exibiram potência sub-nanomolar contra a cepa Dd2, o que consiste em uma ligeira diminuição na potência para **19** em comparação com a cepa 3D7, mas também resultou em um aumento interessante de 1,4 e 3,4 vezes para **1** e **20**, respectivamente.

Tabela 4 – Atividade antiplamodial e seletividade *in vitro*.



Composto	Estrutura	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ (SI) ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ (SI) ^b	95% CI para <i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ ^c	HepG2 CC ₅₀ (μM) ^d
1		1,0 (>100)	0,7 (>143)	ND	>100
15		2,9 (16)	9,4 (5)	6,94 – 12,79	46,7
16		6,0 (>16)	3,3 (>30)	2,30 – 4,41	>100
17		4,1 (9)	7,3 (5)	5,91 – 8,97	36,2
18		1,3 (242)	2,3 (137)	2,04 – 2,64	315
19		0,4 (14)	0,7 (9)	0,55 – 0,77	6,10

Composto	Estrutura	<i>Pf</i> 3D7 IC ₅₀ (SI) ^a	<i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ (SI) ^b	95% CI para <i>Pf</i> Dd2 IC ₅₀ ^c	HepG2 CC ₅₀ (μM) ^d
20		1,7 (>59)	0,5 (>200)	0,085 – 0,82	>100
21		10,9 (1)	6,1 (2)	4,78 – 7,72	12,1
22		6,5 (>15)	13,0 (>8)	9,94 – 18,54	>100
26		13,9 (>7)	ND	ND	>100
27		2,8 (>36)	3,0 (>33)	ND	>100
28		5,6 (4)	10,5 (2)	9,02 – 12,24	22,0
29		6,7 (>15)	15,0 (>7)	13,23 – 17,42	>100
30		1,0 (>96)	4,4 (>23)	ND	>100
31		1,1 (14)	1,6 (10)	1,08 – 2,24	16,2
32		5,7 (9)	10,2 (5)	8,01 – 13,01	51,2

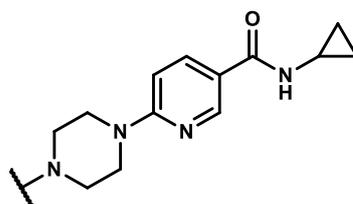
a) atividade antiplasmodial (IC₅₀) determinada em eritrócitos infectados com *P. falciparum* (3D7). SI = CC₅₀ (HepG2) / IC₅₀ (*Pf*3D7); b) atividade antiplasmodial (IC₅₀) determinada em eritrócitos infectados com *P. falciparum* (Dd2). SI = CC₅₀ (HepG2) / IC₅₀ (*Pf*Dd2); c) intervalo de confiança de 95% para o valor de IC₅₀ contra o *P. falciparum* (Dd2); d) citotoxicidade (CC₅₀) em células HepG2 não infectadas. ND: não determinado.

3.4.4 Perfil ADME *in silico*

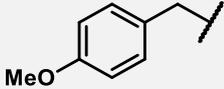
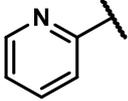
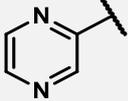
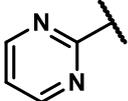
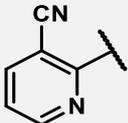
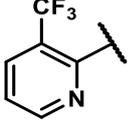
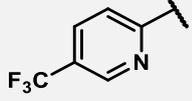
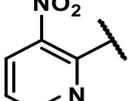
As propriedades ADME do *hit 1* e de todos os compostos com *Pf*IC₅₀ < 15 μM foram previstas *in silico* usando o SwissADME.^[39] Em geral, a série apresentou um perfil ADME adequado (Tabela 5). Todos eles mostraram alta absorção gastrointestinal, que é uma etapa

crítica no transporte de medicamentos administrados por via oral até seus alvos.^[40] Além disso, eles apresentaram boa solubilidade em água, que é um aspecto fundamental a ser considerado na geração de compostos líderes e no desenvolvimento de medicamentos. Esse parâmetro viabiliza a absorção do medicamento *in vivo* e contribui na biodisponibilidade.^[41]

Tabela 5– Propriedades ADME (*in silico*) do *hit 1*, dos derivados **15-22** e **26-32**.



Comp.	Estrutura	clog(P) ^a	clog(S) ^b	Lipinski ^c	PAINS ^d	Absorção GI ^e	Pf3D7 LLE ^f	PfDd2 LLE ^g
1		2,56	-3,90	0	0	Alta	3,44	3,59
15		2,23	-3,67	0	1	Alta	3,31	2,80
16		2,21	-3,60	0	0	Alta	3,12	3,27
17		1,84	-3,46	0	0	Alta	3,30	3,01
18		2,56	-3,76	0	0	Alta	3,33	3,08
19		2,78	-4,19	0	0	Alta	3,62	3,37
20		3,29	-4,46	0	0	Alta	2,48	3,01
21		2,29	-3,43	0	0	Alta	2,75	2,92

Comp.	Estrutura	clog(P) ^a	clog(S) ^b	Lipinski ^c	PAINS ^d	Absorção GI ^e	Pf3D7 LLE ^f	PfDd2 LLE ^g
22		2,30	-3,50	0	0	Alta	2,89	2,59
26		1,66	-3,15	0	0	Alta	3,20	ND
27		0,96	-2,48	0	0	Alta	4,59	4,48
28		1,16	-2,74	0	0	Alta	4,09	3,82
29		1,50	-3,09	0	0	Alta	3,67	3,32
30		2,76	-4,00	0	0	Alta	3,24	2,60
31		2,74	-4,00	0	0	Alta	3,22	3,06
32		1,11	-3,21	0	0	Alta	4,13	3,88

Parâmetros ADME preditos *in silico* usando a ferramenta online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>): a) Lipofilicidade; b) Solubilidade aquosa; c) Número de violações da regra dos cinco de Lipinski; d) Número de alertas acionados para compostos de interferência em ensaio-Pan (PAINS); e) Absorção gastrointestinal. f) Eficiência Lipofílica do Ligante contra *P. falciparum* (3D7). LLE = pIC₅₀ (Pf3D7) – clog(P); g) Eficiência Lipofílica do Ligante contra *P. falciparum* (Dd2). LLE = pIC₅₀ (PfDd2) – clog(P). ND: não determinado.

Nenhum dos compostos violou a regra de cinco de Lipinski nem acionou alertas de compostos potencialmente reativos (PAINS), com exceção do composto **15**, que contém um fragmento de anilina terciária *para*-disubstituída em sua estrutura (Tabela 5). Esse fragmento pode ser capaz de extinguir o oxigênio singleto, uma forma excitada e altamente reativa do oxigênio molecular, sendo assim considerado um PAINS.^[39,42] A lipofilicidade de todos os compostos também se mostrou razoavelmente boa, com clog(P) variando entre 0 e 3, sendo a exceção o composto **20** (clog(P) = 3,29).^[37,43,44] No entanto, os derivados mais potentes também foram os mais lipofílicos, isso pode sugerir que provavelmente se deve à maior capacidade dos

compostos lipofílicos permearem membranas celulares, o que geralmente leva a uma maior atividade.^[37]

3.4.5 Relação entre atividade antiplasmodial e lipofilicidade

Eficiência Lipofílica do Ligante (*Ligand Lipophilic Efficiency*, LLE, em inglês), é definida como a relação entre a potência do composto e sua lipofilicidade, ou seja, a quantidade de potência por unidade de lipofilicidade. Tanto estimativas calculadas (por exemplo, clogP) quanto medidas (logD) da lipofilicidade podem ser usadas, juntamente com a previsão mais relevante da potência *in vitro*, para avaliar a LLE. Para calcular a LLE utiliza-se a Equação 1.^[45,46]

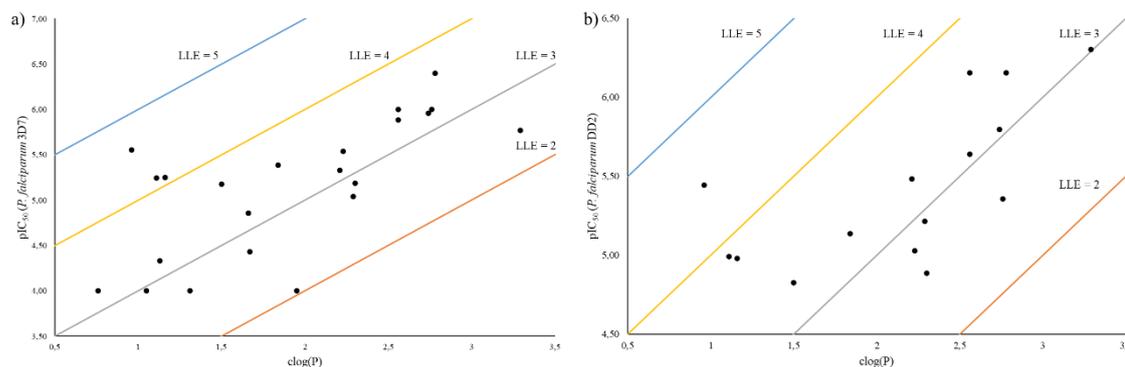
$$\text{LLE} = \text{pIC}_{50} - \text{clog(P)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Durante a análise de SAR uma possível relação entre a potência antiplasmodica dos compostos avaliados e a sua lipofilicidade foi observada, levando à necessidade em avaliar a LLE de todos os compostos. Foi avaliado a relação entre a atividade anti-*P. falciparum* (3D7) e lipofilicidade (Figura 9a). Conforme esperado, verificou-se que todos os compostos com valores de IC₅₀ próximos ou inferiores a 1,0 µM exibiam LLEs moderadas, predominantemente entre 3 e 4. Essa observação indica que parte da sua potência está relacionada à sua lipofilicidade, que facilita a penetração nas membranas celulares.

Dentre os compostos analisados, destacaram-se os ligeiramente menos potentes, como os compostos **27**, **28** e **32**, que apresentaram LLE maior que 4. Coincidentemente, essas conclusões foram mantidas mesmo quando testados contra a cepa resistente Dd2 (Figura 9b). A diferença mais significativa nos valores de LLE ocorreu nos compostos **28** e **32**, nos quais a redução de sua potência em relação à cepa Dd2 resultou em valores de LLE inferiores a 4. O composto **27**, uma pirazinilpiperazina, foi o único da série que demonstrou um valor de LLE superior a 4 contra ambas as cepas (Tabela 5).

Portanto, o composto **27**, que apresentou uma potência relevante (IC₅₀ = 2,8 µM) e é esperado que tenha uma boa estabilidade metabólica, surge como um potencial candidato para avaliação *in vivo*, desde que estudos adicionais possam estabelecer um perfil satisfatório de ADMET *in vitro* para esse composto.

Figura 9 – Plot de pIC_{50} vs $\log(P)$ da série piridilpiperazina.



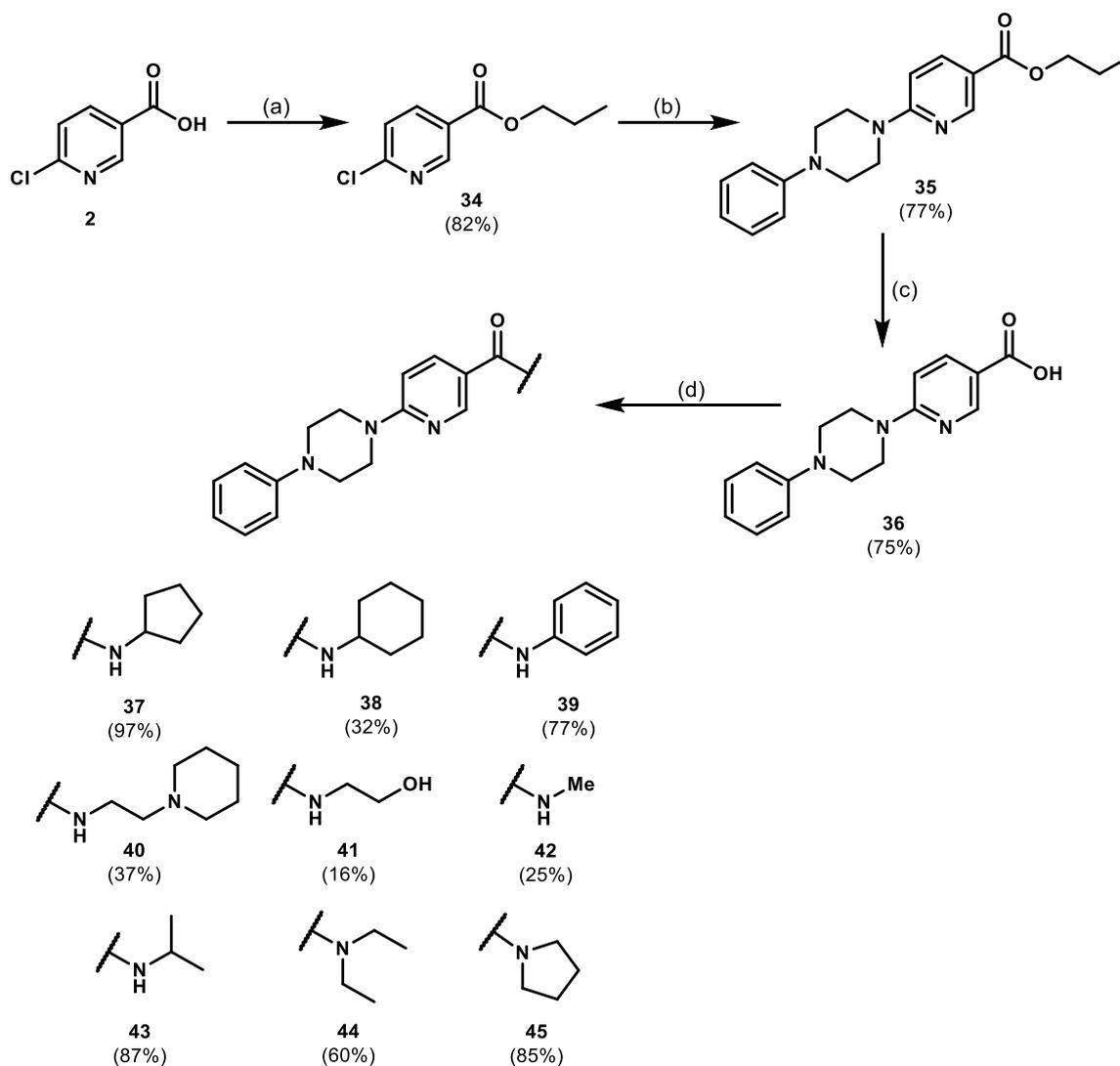
Fonte: Do autor. a) pIC_{50} referente a *Pf3D7*; b) pIC_{50} referente a *PfDd2*.

3.5 Síntese dos derivados com modificações no fragmento amida

As modificações no fragmento amida foram planejadas antes da obtenção dos resultados biológicos de alguns compostos apresentados anteriormente. Assim, no momento do planejamento, **16** era o composto mais promissor, então optou-se por fixar o fragmento fenila no lado esquerdo e realizar modificações no fragmento amida. Essas modificações foram planejadas com o objetivo de verificar o impacto de diferentes amidas na atividade antimalárica, como o efeito conformacional de diferentes cicloamidas, sejam alquila ou arila, o efeito de amidas acíclicas ou de derivados que apresentam átomos mais eletronegativos (N e O) aceptores e doadores de ligações de hidrogênio. A inserção desses átomos eletronegativos pode ocasionar uma diminuição na lipofilicidade e, conseqüentemente, uma melhora na estabilidade metabólica^{[29][35]}.

Os derivados **37-45** foram obtidos a partir da esterificação de Steglich do ácido 6-cloronicotínico **2** utilizando propanol como solvente e reagente, EDC, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador e Et_3N como base, para obter o intermediário **34** com 82% de rendimento. Em seguida, o éster **34** foi submetido a uma S_NAr com fenilpiperazina na presença de Na_2CO_3 , obtendo o derivado **35** com 77% de rendimento. O derivado **36** foi obtido com 75% de rendimento a partir da hidrólise básica, que na primeira etapa utilizou $NaOH$ (2 M) e THF como solvente, e na segunda etapa HCl (até $pH \sim 3$). Os compostos **37-45** foram obtidos a partir do ácido carboxílico **36** através da reação de amidação com a amina correspondente na presença de EDC e HOBt (Esquema 7).

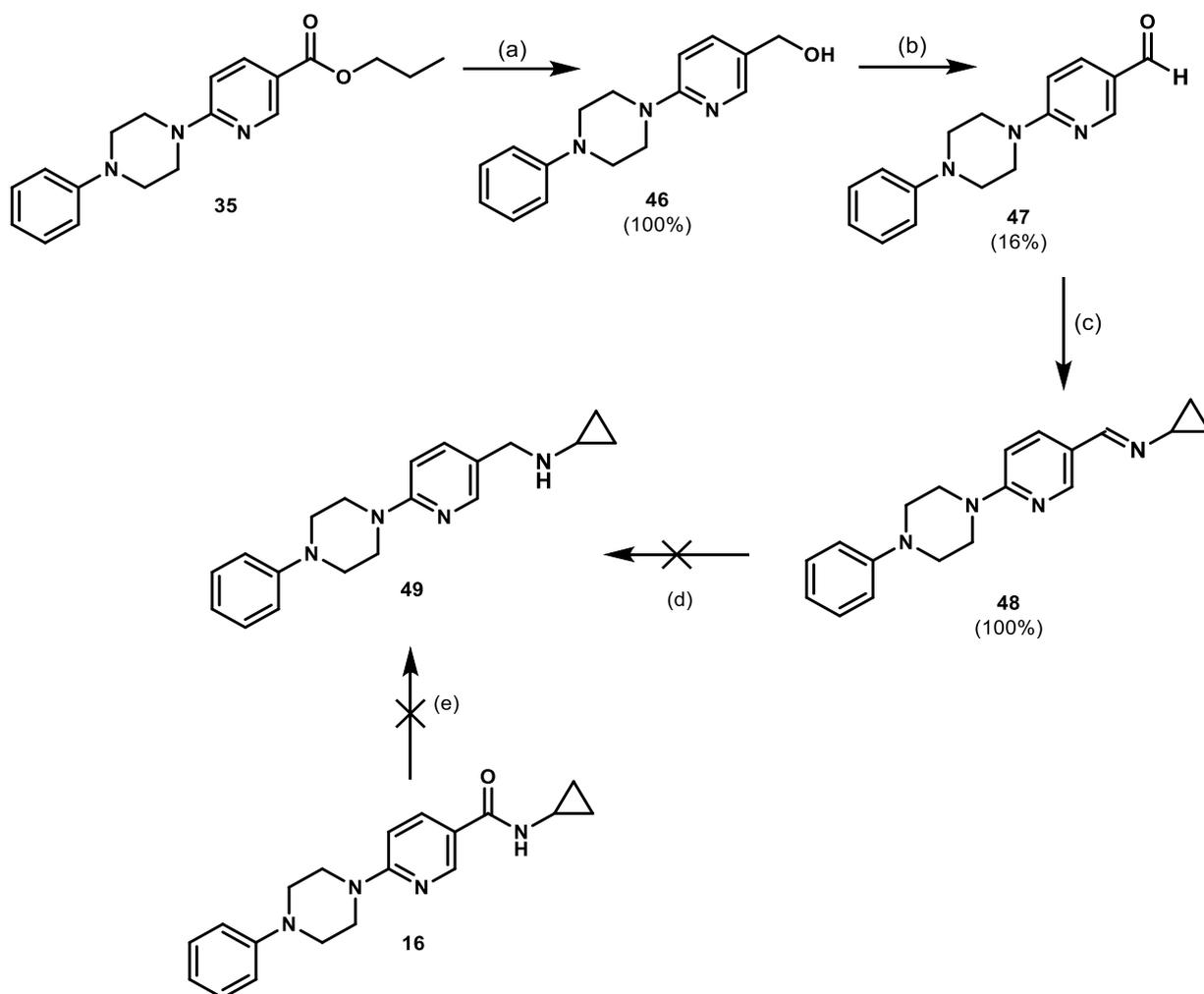
Esquema 7 – Síntese dos derivados 35-45.



Reagentes e condições: a) propanol, EDC, DMAP, Et₃N, t.a., 24h, 82%. b) fenilpiperazina, Na₂CO₃, DMF, 100°C, 47h, 77%. c) 1) NaOH (2M), THF, t.a.; 2) HCl (até pH~3), 0°C, 18h, 75%. d) amina correspondente, EDC, HOBT, DMF, t.a., 20h-66h, 16-97%.

Os derivados **35** e **46-48** foram planejados com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes grupos funcionais (éster, álcool, aldeído e imina) na atividade antimalárica. O álcool **46** foi obtido a partir da redução do éster **35** na presença de hidreto de lítio alumínio em THF anidro. Em seguida, a obtenção do aldeído **47** ocorreu através da oxidação do álcool **46**, na presença de dicromato de piridínio (PDC) que, por ser um agente oxidante mais brando, permite a reação parar no aldeído^[45]. A imina **48** foi obtida com 100% de rendimento a partir do aldeído **47** na presença de ciclopropilamina em éter dietílico. A tentativa de reduzir a imina **48** na amina **49** não foi bem-sucedida, então foi planejado a redução da amida **16** na presença de LiAlH₄, porém não foi observado a formação da amina **49**, não sendo possível avaliar esse derivado (Esquema 8).

Esquema 8– Síntese dos derivados 46-48.

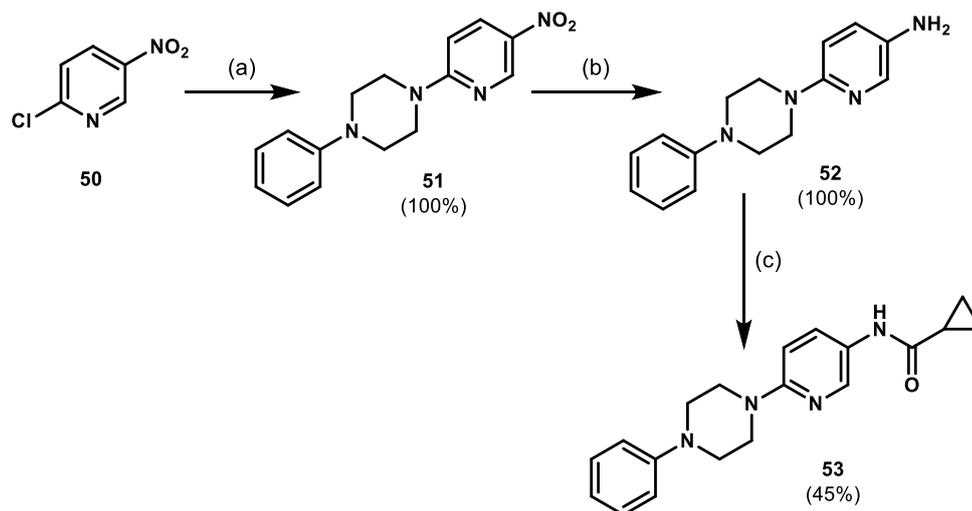


Reagentes e condições: a) hidreto de lítio alumínio; THF anidro; t.a., 27h, 100%. b) PDC; DCM anidro; t.a., 45h, 16%. c) ciclopropilamina; éter dietílico; t.a., 29h, 100%. d) NaBH₄, MeOH, t.a, 2h. e) LiAlH₄, THF, t.a – 30°C, 25h.

O derivado **53** foi planejado com o objetivo de verificar o efeito da inversão do fragmento amida na potência contra o *P. falciparum*. A rota sintética utilizada produziu dois intermediários (**51** e **52**) que contribuirão na avaliação de diferentes grupos funcionais (nitro e amina) no fragmento amida, interessantes para o estudo SAR. A obtenção de **53** partiu da S_NAr entre o cloreto de arila **50** e a fenilpiperazina na presença de Na₂CO₃, formando **51** com 100% de rendimento. Em seguida, foi realizada a redução do grupo nitro de **51**, utilizando gás hidrogênio, Pd/C como catalizador e uma mistura (1:1) de MeOH/EtOAc, obtendo a amina **52** com 100% de rendimento. Por fim, a amina **52** foi submetida a uma amidação com o ácido ciclopropanóico na presença de EDC e HOBT, gerando o derivado **53** com 45% de rendimento,

conforme Esquema 9. Os ensaios biológicos para os derivados com modificações no fragmento amida estão em andamento, porém uma triagem inicial contra *P. falciparum* à 200, 20 e 2 μM foi realizada.

Esquema 9– Síntese dos compostos **51-53**.

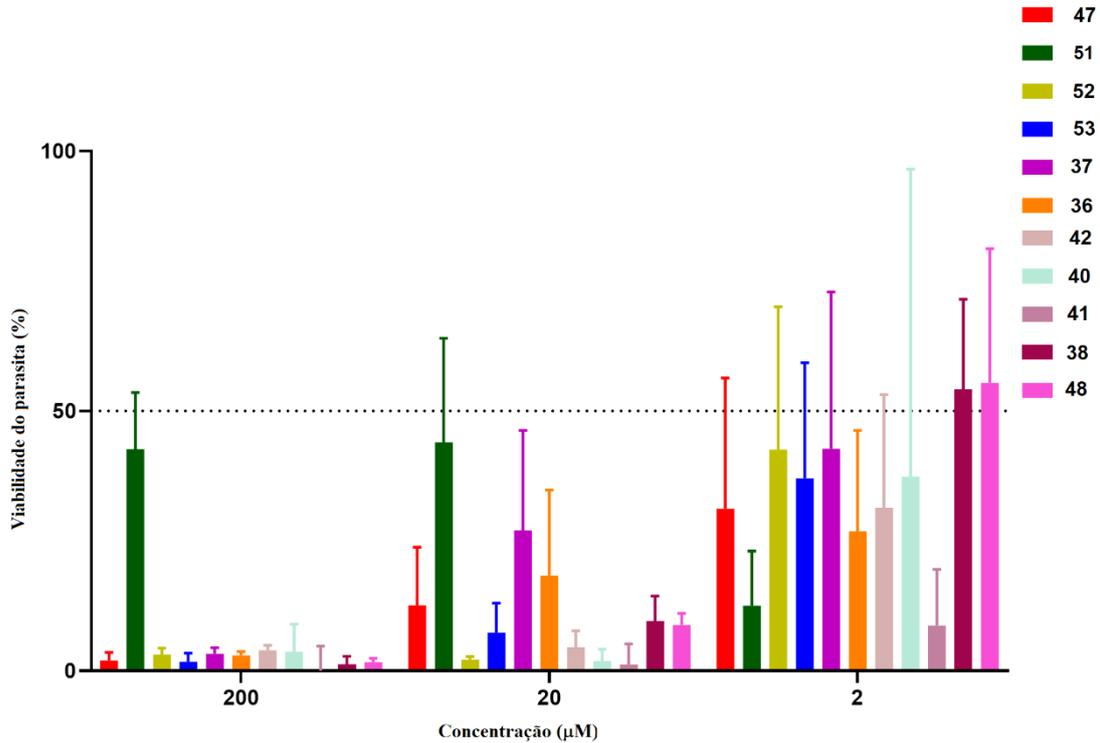


Reagentes e condições: a) fenilpiperazina, Na_2CO_3 , DMF, 110°C , 22h, 100%. b) gás hidrogênio, Pd/C, EtOAc/MeOH (1:1), t.a., 21h, 100%. c) ácido ciclopropanóico, EDC, HOBt, DMF, t.a., 20h, 45%.

3.6 Ensaio biológico: triagem inicial dos compostos com modificações no fragmento amida

Os ensaios biológicos *in vitro* para determinar o IC_{50} dos derivados com modificações no fragmento amida estão em andamento. Essa etapa é conduzida antes do ensaio de IC_{50} e ajuda a selecionar os compostos mais promissores para prosseguirem na determinação da potência anti-*P. falciparum*. Os derivados **36-38**, **40-42**, **47-48**, **51-53** foram testados na triagem inicial em três concentrações diferentes: 200, 20 e 2 μM . O gráfico da Figura 10, apresentado na forma de viabilidade do parasita em relação à concentração, permite uma análise mais detalhada dos efeitos dos compostos testados.

Figura 10 - Gráfico da triagem inicial dos compostos **36-38, 40-42, 47-48, 50-52**.



Fonte: Do autor.

Na concentração de 200 µM, foi observado que praticamente todos os compostos foram capazes de inibir 100% da parasitemia. Isso sugere uma alta atividade antimalárica dos compostos nessa concentração, indicando um potencial promissor para o desenvolvimento de agentes antimaláricos eficazes. No entanto, é importante destacar que a utilização de concentrações tão elevadas pode não ser viável na prática, uma vez que doses elevadas podem levar a efeitos tóxicos indesejáveis.

Ao considerar a concentração de 20 µM, os compostos **38, 40-42, 48, 52 e 53** foram capazes de inibir aproximadamente 90% da parasitemia. Isso indica uma atividade significativa desses compostos em uma concentração mais viável para aplicação terapêutica. Os outros quatro compostos apresentaram uma inibição um pouco menor, variando entre 70% e 50% da parasitemia. Esses resultados sugerem que esses compostos podem ter algum efeito antimalárico, mas sua potência é um pouco menor em comparação aos sete compostos mais eficazes.

Na concentração de 2 µM, os compostos **41 e 51** foram capazes de inibir até 90% da parasitemia, indicando uma atividade antimalárica notável nessas concentrações mais baixas.

No entanto, a maioria dos compostos testados inibiu entre 70% e 60% da parasitemia, exceto para os compostos **38** e **48** que apresentaram inibição abaixo de 50%. Esses resultados sugerem que os compostos podem apresentar atividade antimalárica promissora e, portanto, todos os derivados do *screening* prosseguirão no estudo para determinação dos valores de IC₅₀ contra o *P. falciparum*.

É importante ressaltar que, além dos valores de viabilidade do parasita, outros fatores devem ser considerados na avaliação da potência dos compostos. A estrutura química, a seletividade para as células do parasita em relação às células hospedeiras, a farmacocinética e a toxicidade geral são fatores cruciais que devem ser investigados em estudos posteriores. Pensando nisso, as etapas necessárias para a continuação da otimização dessa série é planejar novos derivados com modificações nos fragmentos piridina e piperazina a partir dos resultados biológicos de IC₅₀ dos derivados com modificações no fragmento tolúil e amida. Além disso, deve-se avaliar as propriedades farmacocinéticas (ADME) *in vitro* dos melhores compostos, bem como avaliar sua atividade antiplasmódica e toxicidade em estudos *in vivo*. Idealmente, também deve ser realizada a identificação do alvo molecular da série e uma investigação de seu mecanismo de ação.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Informações Gerais

A menos que especificado, todas as reações foram realizadas utilizando reagentes comerciais e os solventes foram usados sem purificação adicional. O diclorometano (DCM), a trietilamina (Et₃N) e a dimetilformamida (DMF) foram secos com peneiras moleculares. O acetato de etila (EtOAc) e o hexano (Hex) foram previamente destilados. A cromatografia em coluna foi realizada utilizando sílica gel Aldrich (35-70 mesh) ou sílica gel Macherey-Nagel (230-400 mesh ASTM). A cromatografia em camada fina analítica foi realizada em placas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Sigma-Aldrich) e a revelação das placas foi feita utilizando luz UV (254 nm) e/ou atmosfera de iodo. Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C desacoplado e ¹³C APT foram adquiridos em CDCl₃ ou DMSO-d₆ a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C e ¹³C APT) (Bruker Ascend 400) da Rede de Laboratórios Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (Relam-IQUFU). Os deslocamentos químicos (δ) são relatados em ppm utilizando o pico do solvente residual como padrão interno (CDCl₃: 7,26 ppm, DMSO-d₆: 2,50 ppm, TMS: 0,00 ppm para espectros de RMN de ¹H, e CDCl₃: 77,16 ppm, DMSO-d₆: 39,52 ppm para espectros de RMN de ¹³C e ¹³C APT). A multiplicidade do pico é relatada usando as seguintes abreviações: s = singlete, d = duplete, t = tripleto, dd = duplete de dupletos, m = multiplete. A multiplicidade é seguida da constante(s) de acoplamento em Hz e integração. Para espectros de RMN de ¹³C APT, picos apontando para cima correspondem a carbonos primários e terciários, e picos apontando para baixo correspondem a carbonos secundários e quaternários. A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foi medida utilizando ionização por eletrospray (ESI) (Bruker Daltonics Corporation, geometria Q-TOF Impact II). Os espectros de RMN e HRMS estão disponíveis como anexo.

4.2 Procedimento Experimental (Síntese)

4.2.1 Procedimento Geral A: síntese dos derivados de arilpiperazina por substituição nucleofílica aromática

Em uma solução do cloreto de arila correspondente (1,0 - 1,2 equiv.) em DMF, propanol ou isopropanol (0,1 M), adicionou-se Na₂CO₃ (2,0 - 3,0 equiv.) e a amina correspondente (1,0 - 3,0 equiv.). A reação foi agitada a 80 - 130 °C até consumo total do limitante e tratada com água destilada (15 vezes a quantidade de solvente). O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida. Quando nenhum precipitado se formou após a adição de água, a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL), e as fases orgânicas combinadas foram

secas com sulfato de sódio (Na_2SO_4), filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi então purificado por cromatografia em coluna *flash*.

4.2.2 Procedimento Geral B: síntese dos derivados de amida

O ácido carboxílico correspondente (1,0 equiv.), EDC (1,2 equiv.) e HOBt (0,1 equiv.) foram solubilizados em DMF (0,1 M). A amina correspondente (1,2 equiv.) foi adicionada e a solução foi agitada à temperatura ambiente até completar a reação. A reação foi tratada com água destilada, e a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na_2SO_4 , filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi então purificado por cromatografia em coluna *flash*.

4.2.3 Procedimento Geral C: Aminoação de Chan-Lam

A uma solução do ácido aril borônico correspondente (2,0 equiv.) em DCM anidro (0,1 M) e peneiras moleculares ativadas 4 Å (0,5 g de peneira molecular por 1,0 mmol de ácido borônico), adicionou-se $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,0 equiv.), Et_3N anidra (2,0 equiv.) e a amina **13** (1,0 equiv.). A reação foi agitada a 40 °C sob atmosfera de O_2 por 96h. A mistura reacional foi diluída com DCM e filtrada em Celite. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna *flash* (7:3 EtOAc/Hex).

4.2.4 Procedimento Geral D: substituição nucleofílica de haletos de benzila

A uma solução do haleto de benzila correspondente (1,2 equiv.) em DMF (0,15 M), foram adicionados Na_2CO_3 (2,0 equiv.) e a amina **13** (1,0 equiv.). A reação foi agitada a 50 - 110 °C até a conclusão da reação. A reação foi tratada com água destilada (15 vezes a quantidade de DMF) e o precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida.

4.2.5 Síntese dos intermediários 9-12

1-(4-metoxifenil)piperazina (**9**)

A uma solução de piperazina (289,0 mg, 3,20 mmol, 4,0 equiv.), KOH (60,0 mg, 1,04 mmol, 1,3 equiv.), CuI (8,2 mg, 0,04 mmol, 0,05 equiv.) e N^1, N^2 -dibenziloxalamida (12,1 mg, 0,04 mmol, 0,05 equiv.) em EtOH (0,15 M) sob atmosfera de argônio, foi adicionado 1-bromo-4-metoxibenzeno (150,0 mg, 0,80 mmol). A reação foi agitada a 70 °C por 23 horas. A mistura reacional foi filtrada em Celite e lavada com DCM. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se o composto **9** sem necessidade de purificação adicional.

9: Sólido marrom, 28,0 mg, 18%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 6,92 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 6,86 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,05 (s, 8H), 1,83 (s, 1H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3):** δ 153,34, 145,75, 117,75, 113,93, 55,04, 51,40, 45,71.

1-(piridin-2-il)piperazina (10)

O composto **10** foi sintetizado a partir da 2-cloropiridina (159,0 mg, 1,40 mmol) e da piperazina (361,0 mg, 4,20 mmol, 3,0 equiv.) em DMF à 130 °C por 36h, seguindo o Procedimento Geral A. Não foi formado nenhum precipitado, portanto, a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL) para obter o composto **10** sem a necessidade de purificação adicional.

10: óleo amarelo, 93,9 mg, 41%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,20 (ddd, $J = 4,9, 2,0, 0,9$ Hz, 1H), 7,48 (ddd, $J = 8,6, 7,1, 2,0$ Hz, 1H), 6,72 – 6,57 (m, 2H), 3,55 – 3,49 (m, 4H), 3,04 – 2,97 (m, 4H).

2-(piperazin-1-il)pirazina (11)

O composto **11** foi sintetizado a partir da 2-cloropirazina (300,0 mg, 2,619 mmol), piperazina (676,8 mg, 7,857 mmol, 3,0 equiv.) e Na_2CO_3 (832,7 mg, 7,857 mmol, 3,0 equiv.) em isopropanol à 90°C por 24h, seguindo o Procedimento Geral A. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando DCM/MeOH (gradiente de (9:1) a (8:2)) como eluente.

11: sólido amarelo, 408.3 mg, 95 %. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,11 – 8,10 (m, 1H), 8,05 – 8,03 (m, 1H), 7,82 – 7,81 (m, 1H), 3,59 – 3,49 (m, 4H), 3,03 – 2,91 (m, 4H), 1,93 (s, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 155,32, 141,84, 132,99, 131,14, 45,84, 45,65.

6-cloro-*N*-ciclopropilnicotinamida (12)

O composto **12** foi preparado a partir do ácido 6-cloronicotínico (161,0 mg, 10,2 mmol) e da ciclopropanamina (69,0 mg, 12,2 mmol) em DMF por 28h, seguindo o Procedimento Geral B. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura EtOAc/Hex (8:2) como eluente.

12: sólido branco, 1,58 g, 79%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,69 (dd, $J = 2,5, 0,5$ Hz, 1H), 8,06 (dd, $J = 8,3, 2,5$ Hz, 1H), 7,38 (dd, $J = 8,3, 0,5$ Hz, 1H), 6,56 (s, 1H), 2,94 – 2,81 (m, 1H), 0,98 – 0,79 (m, 2H), 0,67 – 0,59 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 166,10, 154,37, 147,97, 138,08, 129,13, 124,49, 23,44, 6,89.

4.2.6 Síntese do *hit* 1 e dos derivados 13-33

***N*-ciclopropil-6-(piperazin-1-il)nicotinamida (13)**

O composto **13** foi sintetizado a partir do cloreto de arila **12** (480,0 mg, 2,44 mmol) e da piperazina (631,0 mg, 7,32 mmol, 3,0 equiv.) em propanol à 85 °C por 22h, seguindo o Procedimento Geral A. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de DCM/MeOH (gradiente de (1:1) a (2:8)).

13: óleo amarelo, 321,8 mg, 54%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,50 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,87 (dd, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 6,58 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,20 (s, 1H), 3,61 – 3,59 (m, 4H), 3,47 (s, 1H), 2,97 – 2,95 (m, 4H), 2,88 – 2,83 (m, 1H), 0,86 – 0,81 (m, 2H), 0,60 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 167,62, 160,52, 147,32, 136,85, 118,85, 105,71, 45,83, 45,78, 23,11, 6,94. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₁₃H₁₉N₄O⁺ [M + H]⁺ = 247,1553 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 247,1553 *m/z*, erro = 0,00 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(*o*-toluil)piperazin-1-il)nicotinamida (1)**

O *hit* **1** foi preparado a partir da amina **13** (36,0 mg, 0,147 mmol) e do ácido *o*-toluilborônico (40,0 mg, 0,294 mmol), seguindo o Procedimento Geral C.

1: sólido branco, 15,0 mg, 31%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,52 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,91 (dd, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 7,26 – 7,16 (m, 2H), 7,03 – 6,99 (m, 2H), 6,67 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,06 (s, 1H), 3,79 – 3,77 (m, 4H), 3,02 – 2,99 (m, 4H), 2,90 – 2,86 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 0,88 – 0,84 (m, 2H), 0,62 – 0,59 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 160,62, 151,29, 147,30, 136,90, 132,87, 131,32, 126,81, 123,74, 119,20, 118,99, 105,86, 51,76, 45,53, 23,14, 18,03, 7,03. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₂₀H₂₅N₄O⁺ [M + H]⁺ = 337,2023 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 337,2021 *m/z*, erro = 0,59 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-metilpiperazin-1-il)nicotinamida (14)**

O composto **14** foi preparado a partir do cloreto de arila **12** (100,0 mg, 0,510 mmol) e da 1-metilpiperazina (128,0 mg, 1,23 mmol) em propanol a 95 °C por 65h, seguindo o Procedimento Geral A. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de DCM/MeOH (8:2).

14: sólido branco, 72,3 mg, 54%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,49 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,87 (dd, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 6,58 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 3,66 – 3,63 (m, 4H), 2,87

– 2,83 (m, 1H), 2,51 – 2,48 (m, 4H), 2,33 (s, 3H), 0,85 – 0,80 (m, 2H), 0,60 – 0,56 (m, 2H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 166,92, 159,70, 146,69, 136,18, 118,27, 105,08, 54,14, 45,54, 44,10, 22,45, 6,25. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 261,1710$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 261,1709$ m/z , erro = 0,38 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)nicotinamida (15)**

O composto **15** foi sintetizado a partir do cloreto de arila **12** (18,09 mg, 0,092 mmol) e da 1-(4-metoxifenil)piperazina (21,2 mg, 0,110 mmol) em DMF à 110 °C por 96h, seguindo o Procedimento Geral A. Nenhum precipitado foi formado, portanto, a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL) para obter o composto **15** sem a necessidade de purificação adicional.

15: sólido amarelo, 12,3 mg, 38%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,52 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,90 (dd, $J = 9,0, 2,4$ Hz, 1H), 6,94 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H), 6,86 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H), 6,66 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,08 (s, 1H), 3,81 – 3,78 (m, 4H), 3,78 (s, 3H), 3,17 – 3,15 (m, 4H), 2,90 – 2,83 (m, 1H), 0,88 – 0,83 (m, 2H), 0,63 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 167,51, 160,38, 154,40, 147,32, 145,61, 136,93, 119,07, 118,86, 114,68, 105,87, 55,72, 50,84, 45,09, 23,14, 7,01. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 353,1792$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 353,1960$ m/z , erro = 3,40 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (16)**

O composto **16** foi sintetizado a partir do cloreto de arila **12** (114,0 mg, 0,580 mmol) e da 1-fenilpiperazina (114,0 mg, 0,700 mmol) em propanol à 95 °C por 118h, seguindo o Procedimento Geral A. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de DCM/MeOH (95:5).

16: sólido branco, 184,6 mg, 99%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,53 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,91 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,32 – 7,25 (m, 2H), 6,98 – 6,94 (m, 2H), 6,90 (tt, $J = 7,4, 1,0$ Hz, 1H), 6,66 (dd, $J = 9,0, 0,5$ Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 3,83 – 3,78 (m, 4H), 3,32 – 3,27 (m, 4H), 2,92 – 2,84 (m, 1H), 0,86 – 0,83 (m, 2H), 0,62 – 0,59 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 164,94, 160,33, 151,23, 147,27, 137,02, 129,40, 120,43, 119,20, 116,56, 105,91, 49,26, 44,95, 23,16, 7,03. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 323,1866$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 323,1856$ m/z , erro = 3,09 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(3-hidroxifenil)piperazin-1-il)nicotinamida (17)**

O composto **17** foi preparado a partir do cloreto de arila **12** (47,3 mg, 0,223 mmol) e do 3-(piperazin-1-il)fenol (47,8 mg, 0,268 mmol) em DMF à 110 °C por 72h, seguindo o Procedimento Geral A. Nenhum precipitado foi formado, portanto, a fase aquosa foi extraída com EtOAc (3 x 15 mL) para obter o composto **17** sem a necessidade de purificação adicional.

17: sólido marrom, 67,8 mg, 90%. **RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 9,17 (s, 1H), 8,58 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 8,22 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,94 (dd, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 7,00 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,42 (dd, *J* = 8,1, 2,5 Hz, 1H), 6,35 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 6,23 (dd, *J* = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 3,73 – 3,70 (m, 4H), 3,18 – 3,16 (m, 4H), 2,82 – 2,50 (m, 1H), 0,69 – 0,65 (m, 2H), 0,55 – 0,53 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ 166,50, 159,83, 158,24, 152,43, 147,95, 136,69, 129,81, 118,79, 107,02, 106,67, 105,77, 102,87, 48,22, 44,33, 23,00, 592. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₁₉H₂₂N₄NaO₂⁺ [M + Na]⁺ = 361,1635 *m/z*, encontrado [M + Na]⁺ = 361,1627 *m/z*, erro = 2,22 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(2-fluorofenil)piperazin-1-il)nicotinamida (18)**

O composto **18** foi preparado a partir da amina **13** (40,0 mg, 0,162 mmol) e do ácido 2-fluorofenilborônico (45,4 mg, 0,325 mmol), seguindo o Procedimento Geral C.

18: sólido branco, 6,0 mg, 11%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,54 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,94 (dd, *J* = 9,0, 2,3 Hz, 1H), 7,09 – 7,02 (m, 2H), 6,98 – 6,94 (m, 2H), 6,67 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 3,84 – 3,81 (m, 4H), 3,20 – 3,18 (m, 4H), 2,91 – 2,86 (m, 1H), 0,90 – 0,83 (m, 2H), 0,62 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 167,32, 160,12, 157,26, 154,82, 146,89, 140,03, 137,32, 124,72, 124,69, 123,18, 123,10, 119,37, 116,54, 116,34, 106,13, 50,56, 50,53, 45,35, 23,23, 7,01. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₁₉H₂₂FN₄O⁺ [M + H]⁺ = 341,1772 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 341,1768 *m/z*, erro = 1,17 ppm.

6-(4-(2-clorofenil)piperazin-1-il)-*N*-ciclopropilnicotinamida (19)

O composto **19** foi sintetizado a partir da amina **13** (44,7 mg, 0,181 mmol) e do ácido 2-clorofenilborônico (56,7 mg, 0,363 mmol), seguindo o Procedimento Geral C.

19: sólido branco, 6,5 mg, 10%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,53 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,91 (dd, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 7,39 (dd, *J* = 7,9, 1,4 Hz, 1H), 7,23 (dd, *J* = 7,9, 1,4 Hz, 1H), 7,05 (dd, *J* = 7,9, 1,4 Hz, 1H), 7,01 (td, *J* = 7,9, 1,4 Hz, 1H), 6,67 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,03 (s, 1H), 3,87 – 3,79 (m, 4H), 3,20 – 3,12 (m, 4H), 2,90 – 2,86 (m, 1H), 0,89 – 0,84 (m, 2H), 0,61 – 0,60 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 167,41, 149,09, 147,02, 137,15, 130,91,

129,14, 127,83, 124,29, 120,61, 119,17, 106,03, 51,21, 45,38, 23,18, 7,02. **HRMS (ESI+)**: calculado para $C_{19}H_{22}ClN_4O^+$ $[M + H]^+ = 357,1477$ m/z, encontrado $[M + H]^+ = 357,1476$ m/z, erro = 0,28 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(2-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-il)nicotinamida (20)**

O derivado **20** foi sintetizado a partir da amina **13** (23,7 mg, 0,096 mmol) e do ácido 2-trifluorometilfenilborônico (36,5 mg, 0,192 mmol), seguindo o Procedimento Geral C.

20: sólido branco, 4,6 mg, 12%. **RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$)**: δ 8,52 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,90 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,53 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,34 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,28 – 7,22 (m, 1H), 6,65 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,06 (s, 1H), 3,79 – 3,77 (m, 4H), 3,03 – 3,01 (m, 4H), 2,90 – 2,87 (m, 1H), 0,87 – 0,83 (m, 2H), 0,63 – 0,60 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)**: δ 167,56, 160,60, 152,26, 147,34, 136,93, 132,98, 128,25, 127,78, 127,50, 127,45, 125,53, 125,33, 124,03, 122,81, 119,02, 105,86, 53,35, 45,50, 23,16, 7,02. **HRMS (ESI+)**: calculado para $C_{20}H_{22}F_3N_4O^+$ $[M + H]^+ = 391,1740$ m/z, encontrado $[M + H]^+ = 391,1737$ m/z, erro = 0,77 ppm.

6-(4-benzilpiperazin-1-il)-*N*-ciclopropilnicotinamida (21)

O composto **21** foi sintetizado a partir da amina **13** (54,5 mg, 0,220 mmol) e do bromometilbenzeno (56,0 mg, 0,330 mmol) em DMF à 50 °C por 21h, seguindo o Procedimento Geral D.

21: sólido branco, 7,5 mg, 10%. **RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$)**: δ 8,49 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,86 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,33 – 7,26 (m, 5H), 6,57 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 3,64 – 3,61 (m, 4H), 3,55 (s, 2H), 2,87 – 2,84 (m, 1H), 2,54 – 2,51 (m, 4H), 0,86 – 0,81 (m, 2H), 0,60 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)**: δ 167,59, 160,44, 147,33, 137,94, 136,81, 129,30, 128,46, 127,36, 118,73, 105,70, 63,19, 52,88, 44,91, 23,11, 6,97. **HRMS (ESI+)**: calculado para $C_{20}H_{25}N_4O^+$ $[M + H]^+ = 337,2023$ m/z, encontrado $[M + H]^+ = 337,2023$ m/z, erro = 0,00 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(4-metoxibenzil)piperazin-1-il)nicotinamida (22)**

O composto **22** foi sintetizado a partir da amina **13** (41,0 mg, 0,166 mmol) e do 1-(clorometil)-4-metoxibenzeno (31,3 mg, 0,199 mmol) em DMF à 110 °C por 24h, seguindo o Procedimento Geral D.

22: sólido amarelo, 25,5 mg, 42%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,48 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,86 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,24 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,86 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,57 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,63 – 3,60 (m, 4H), 3,48 (s, 2H), 2,86 – 2,84 (m, 1H), 2,51 – 2,49 (m, 4H), 0,85 – 0,81 (m, 2H), 0,60 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 167,62, 160,43, 158,98, 147,33, 136,81, 130,50, 129,88, 118,70, 113,81, 105,71, 62,56, 55,40, 52,76, 44,90, 23,10, 6,96. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 367,2128$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 367,2125$ m/z , erro = 0,82 ppm.

6-(4-benzoilpiperazin-1-il)-*N*-ciclopropilnicotinamida (23)

O composto **23** foi preparado a partir da amina **13** (52,7 mg, 0,210 mmol) e do ácido benzoico (31,0 mg, 0,250 mmol) em DMF à temperatura ambiente por 22h, seguindo o Procedimento Geral B. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de DCM/MeOH (9:1).

23: sólido branco, 7,9 mg, 10%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,51 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,92 (dd, $J = 8,9, 2,5$ Hz, 1H), 7,43 (s, 5H), 6,62 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,12 (s, 1H), 3,69 (s, 8H), 2,89 – 2,84 (m, 1H), 0,87 – 0,83 (m, 2H), 0,62 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 170,73, 167,43, 160,02, 147,47, 137,10, 135,42, 130,13, 128,71, 127,19, 119,73, 105,86, 47,28, 44,97, 41,96, 23,12, 6,75. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_2^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 373,1635$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 373,1636$ m/z , erro = 0,27 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)nicotinamida (24)**

A uma solução de **13** (55,5 mg, 0,230 mmol) em DCM (0,1 M), foi adicionado cloreto de benzenossulfonila (40,0 mg, 0,230 mmol) e Et_3N (69,0 mg, 0,690 mmol, 3,0 equiv.). A reação foi agitada em temperatura ambiente por 23h. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna *flash* (DCM/MeOH (9:1)).

24: sólido branco, 63,0 mg, 70%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,45 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,86 (dd, $J = 8,9, 2,5$ Hz, 1H), 7,76 – 7,74 (m, 2H), 7,63 – 7,57 (m, 1H), 7,56 – 7,50 (m, 2H), 6,55 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 3,74 – 3,71 (m, 4H), 3,11 – 3,08 (m, 4H), 2,86 – 2,83 (m, 1H), 0,83 – 0,80 (m, 2H), 0,61 – 0,57 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 167,25, 159,68, 147,24, 137,15, 135,62, 133,24, 129,33, 127,89, 119,79, 105,91, 45,84, 44,44, 23,16, 6,95. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 409,1305$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 409,1305$ m/z , erro = 0,00 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-picolinoilpiperazin-1-il)nicotinamida (25)**

O composto **25** foi sintetizado a partir da amina **13** (55,3 mg, 0,220 mmol) e do ácido picolínico (33,0 mg, 0,270 mmol) em DMF a temperatura ambiente por 21h, seguindo o Procedimento Geral B. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de DCM/MeOH (9:1).

25: sólido branco, 39,7 mg, 34%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,62 – 8,58 (m, 1H), 8,52 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,91 (dd, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 7,82 (td, *J* = 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,71 (dt, *J* = 7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,37 (ddd, *J* = 7,8, 4,9, 1,5 Hz, 1H), 6,62 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 3,93 – 3,70 (m, 8H), 2,88 – 2,84 (m, 1H), 0,89 – 0,81 (m, 2H), 0,63 – 0,56 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 167,76, 167,41, 160,13, 153,79, 148,41, 147,34, 137,35, 137,08, 124,93, 124,38, 119,54, 105,86, 46,83, 45,24, 44,62, 42,31, 23,15, 6,96. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₁₉H₂₁N₅NaO₂⁺ [M + Na]⁺ = 374,1587 *m/z*, encontrado [M + Na]⁺ = 374,1587 *m/z*, erro = 0,00 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)nicotinamida (26)**

O composto **26** foi sintetizado a partir do cloreto de arila **12** (56,5 mg, 0,288 mmol) e da amina **3** (93,9 mg, 0,575 mmol) em DMF à 110 °C por 96h, seguindo o Procedimento Geral A. A filtração do precipitado branco, a lavagem com água destilada e a secagem sob pressão reduzida, forneceram o composto **26** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

26: sólido branco, 26,20 mg, 30%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,53 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,91 (dd, *J* = 8,9, 2,1 Hz, 1H), 7,51 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 6,68 – 6,62 (m, 3H), 6,12 (s, 1H), 3,80 – 3,77 (m, 4H), 3,69 – 3,67 (m, 4H), 2,88 – 2,85 (m, 1H), 0,87 – 0,82 (m, 2H), 0,60 (s, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 167,54, 160,30, 159,31, 148,15, 147,38, 137,77, 136,93, 119,06, 113,78, 107,23, 105,77, 44,83, 44,50, 23,14, 6,98. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₁₈H₂₂N₅O⁺ [M + H]⁺ = 324,1819 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 324,1813 *m/z*, erro = 1,85 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(pirazin-2-il)piperazin-1-il)nicotinamida (27)**

O composto **27** foi sintetizado a partir do cloreto de arila **12** (45,5 mg, 0,232 mmol) e da amina **4** (31,7 mg, 0,193 mmol) em DMF à 110 °C por 72h, seguindo o Procedimento Geral A. A filtração do precipitado branco, a lavagem com água destilada e a secagem sob pressão reduzida forneceram o composto **27** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

27: sólido branco, 23,0 mg, 37%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,53 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 8,08 (dd, $J = 2,5, 1,5$ Hz, 1H), 7,92 (dd, $J = 8,9, 2,5$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 6,64 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 3,80 – 3,79 (m, 4H), 3,75 – 3,71 (m, 4H), 2,90 – 2,83 (m, 1H), 0,87 – 0,82 (m, 2H), 0,62 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 166,80, 159,45, 154,19, 146,71, 141,25, 136,37, 132,84, 130,42, 118,70, 105,10, 43,59, 43,40, 22,48, 6,30. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 325,1771$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 325,1769$ m/z , erro = 0,62 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)nicotinamida (28)**

O composto **28** foi preparado a partir da amina **13** (43,8 mg, 0,180 mmol) e da 2-cloropirimidina (22,0 mg, 0,200 mmol) em propanol à 90 °C por 24h, seguindo o Procedimento Geral A. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **28** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

28: sólido branco, 29,7 mg, 51%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,52 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 8,34 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H), 7,91 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 6,64 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,53 (t, $J = 4,7$ Hz, 1H), 6,12 (s, 1H), 3,95 – 3,93 (m, 4H), 3,75 – 3,72 (m, 4H), 2,90 – 2,84 (m, 1H), 0,86 – 0,83 (m, 2H), 0,62 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 167,49, 161,74, 160,26, 157,93, 147,26, 137,02, 119,11, 110,42, 105,84, 44,64, 43,40, 23,14, 6,98. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 325,1771$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 325,1765$ m/z , erro = 1,84 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(3-cianopiridin-2-il)piperazin-1-il)nicotinamida (29)**

O composto **29** foi sintetizado a partir da amina **13** (46,2 mg, 0,187 mmol) e da 2-cloronicotinonitrila (31,2 mg, 0,225 mmol) em DMF à 110 °C por 24h, seguindo o Procedimento Geral A. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **29** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

29: sólido branco, 32,40 mg, 50%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,53 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 8,36 (dd, $J = 4,7, 1,8$ Hz, 1H), 7,92 (dd, $J = 8,9, 2,3$ Hz, 1H), 7,80 (dd, $J = 7,6, 1,8$ Hz, 1H), 6,79 (dd, $J = 7,6, 4,7$ Hz, 1H), 6,62 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,21 (s, 1H), 3,85 – 3,80 (m, 8H), 2,89 – 2,85 (m, 1H), 0,87 – 0,82 (m, 2H), 0,62 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 166,85, 159,97, 159,55, 151,37, 146,71, 143,36, 136,35, 118,67, 117,45, 113,88, 105,07, 94,43, 46,97, 43,87, 22,48, 6,28. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 349,1771$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 349,1771$ m/z , erro = 0,00 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(3-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazin-1-il)nicotinamida (30)**

O composto **30** foi sintetizado a partir da amina **13** (61,0 mg, 0,248 mmol) e da 2-cloro-3-(trifluorometil)piridina (54,0 mg, 0,297 mmol) em DMF à 120 °C por 65h, seguindo o Procedimento Geral A. Purificação: cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de Hex/EtOAc (95:5).

30: sólido branco, 24,3 mg, 25%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,52 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 8,45 (dd, *J* = 4,8, 1,3 Hz, 1H), 7,95 – 7,86 (m, 2H), 7,03 (ddd, *J* = 7,7, 4,8, 0,7 Hz, 1H), 6,65 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,07 (s, 1H), 3,80 – 3,77 (m, 4H), 3,41 – 3,39 (m, 4H), 2,91 – 2,86 (m, 1H), 0,88 – 0,83 (m, 2H), 0,65 – 0,60 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 160,42, 159,62, 151,11, 151,06, 147,15, 137,29, 137,24, 136,78, 125,27, 118,93, 117,38, 105,74, 50,34, 44,86, 22,99, 6,85. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₁₉H₂₁F₃N₅O⁺ [M + H]⁺ = 392,1693 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 392,1683 *m/z*, erro = 2,55 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazin-1-il)nicotinamida (31)**

O composto **31** foi preparado a partir da amina **13** (41,7 mg, 0,169 mmol) e da 2-cloro-5-(trifluorometil)piridina (36,9 mg, 0,203 mmol) em propanol à 90 °C por 48h, seguindo o Procedimento Geral A. A filtração do precipitado branco, a lavagem com água destilada e a secagem sob pressão reduzida, proporcionaram o composto **31** sem a necessidade de purificação adicional.

31: sólido branco, 15,9 mg, 24%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,53 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,92 (dd, *J* = 9,0, 2,4 Hz, 1H), 7,67 (dd, *J* = 9,0, 2,4 Hz, 1H), 6,67 – 6,61 (m, 2H), 6,06 (s, 1H), 3,81 (s, 8H), 2,89 – 2,87 (m, 1H), 0,88 – 0,84 (m, 2H), 0,63 – 0,61 (m, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)**: δ 160,25, 160,11, 147,35, 147,35, 145,91, 137,02, 137,02, 134,81, 119,32, 105,72, 105,72, 44,21, 23,14, 7,02. **HRMS (ESI+)**: calculado para C₁₉H₂₁F₃N₅O⁺ [M + H]⁺ = 392,1693 *m/z*, encontrado [M + H]⁺ = 392,1683 *m/z*, erro = 2,55 ppm.

***N*-ciclopropil-6-(4-(3-nitropiridin-2-il)piperazin-1-il)nicotinamida (32)**

O composto **32** foi sintetizado a partir da amina **13** (33,5 mg, 0,210 mmol) e da 2-cloro-3-nitropiridina (43,1 mg, 0,175 mmol) em DMF à 110 °C por 22h, seguindo o Procedimento Geral A. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **32** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

32: sólido amarelo, 31,7 mg, 49%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,52 (s, 1H), 8,36 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 8,16 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,81 – 6,78 (m, 1H), 6,59 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,20 (s, 1H), 3,81 – 3,79 (m, 4H), 3,61 – 3,59 (m, 4H), 2,87 – 2,86 (m, 1H), 0,84 – 0,83 (m, 2H), 0,60 (s, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 167,50, 160,02, 152,84, 151,99, 147,38, 137,01, 135,81, 133,18, 119,28, 113,91, 105,60, 47,52, 44,14, 23,14, 6,94. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 369,1670$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 369,1667$ m/z , erro = 0,81 ppm.

6-(4-(3-aminopiridin-2-il)piperazin-1-il)-*N*-ciclopropilnicotinamida (33)

A uma solução de **32** (10,2 mg, 0,028 mmol) em uma mistura de EtOAc/MeOH (1:1) (10 mL), foi adicionado 10% de Pd/C (10% em peso). A reação foi agitada a temperatura ambiente e borbulhado H_2 até redução completa de **32**. A mistura reacional foi filtrada em Celite e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para obter o composto **33**.

33: sólido marrom, 9,4 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 8,53 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,91 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H), 7,80 (dd, $J = 4,8, 1,3$ Hz, 1H), 6,98 (dd, $J = 7,7, 1,3$ Hz, 1H), 6,87 (dd, $J = 7,7, 4,8$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,11 (s, 1H), 3,83 (s, 2H), 3,78 – 3,76 (m, 4H), 3,24 – 3,21 (m, 4H), 2,89 – 2,85 (m, 1H), 0,87 – 0,82 (m, 2H), 0,62 – 0,58 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3):** δ 165,22, 158,85, 149,58, 147,30, 137,97, 136,90, 121,96, 120,06, 115,25, 105,96, 48,64, 45,42, 14,25, 7,03. **HRMS (ESI+):** calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 339,1928$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 339,1928$ m/z , erro = 0,00 ppm.

4.2.7 Síntese do intermediário 34 e dos derivados 35-48 e 51-53

propil 6-cloronicotinato (34)

A uma solução do ácido 6-cloronicotínico (103,0 mg, 6,546 mmol, 1,0 equiv.) em propanol (0,6 M), foi adicionado EDC (1,40 g, 7,201 mmol, 1,1 equiv.), DMAP (80,0 mg, 0,6546 mmol, 0,1 equiv.) e Et_3N (2,0 g, 19,639 mmol, 3,0 equiv.) sob agitação a temperatura ambiente por 24h. Em seguida, o propanol excedente foi evaporado e adicionado água destilada à temperatura ambiente. A solução foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido a purificação por cromatografia em coluna *flash*, utilizando Hex/EtOAc (7:3) como eluente para obter o derivado **34**.

34: óleo incolor, 1,1 g, 82%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,99 (dd, $J = 2,4, 0,6$ Hz, 1H), 8,24 (dd, $J = 8,3, 2,4$ Hz, 1H), 7,41 (dd, $J = 8,3, 0,7$ Hz, 1H), 4,31 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 1,89 –

1,71 (m, 2H), 1,03 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164,62, 155,71, 151,30, 139,70, 125,47, 124,29, 67,39, 22,14, 10,56.

propil 6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinato (35)

O composto **35** foi sintetizado a partir do éster **34** (300,0 mg, 1,503 mmol, 1,0 equiv.) e da fenilpiperazina (292,7 mg, 1,804 mmol, 1,2 equiv.) em DMF à 100 °C por 47h, seguindo o Procedimento Geral A. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **35** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

35: sólido branco, 378,7 mg, 77%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,81 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 8,04 (dd, $J = 9,0, 2,4$ Hz, 1H), 7,28 (dd, $J = 8,9, 7,5$ Hz, 2H), 6,95 (dd, $J = 8,7, 0,9$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,63 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 4,23 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,86 – 3,81 (m, 4H), 3,32 – 3,25 (m, 4H), 1,82 – 1,70 (m, 2H), 1,00 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 166,22, 160,68, 151,09, 138,72, 129,35, 120,42, 116,52, 115,38, 105,42, 66,22, 49,21, 44,77, 22,26, 10,60. **HRMS (ESI+)**: calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2^+ [\text{M} + \text{H}]^+ = 326,1863$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 326,1853$ m/z , erro = 3,06 ppm.

Ácido 6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotínico (36)

A uma solução do éster **35** (330,0 mg, 1,014 mmol, 1,0 equiv.) em THF (0,2 M), foi adicionado NaOH (2M, 5,0 mL, 10,141 mmol, 10 equiv.). A reação foi agitada a temperatura ambiente por 18h. Em seguida, o THF foi evaporado e adicionado HCl (2M) lentamente à 0°C até pH~3. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **36** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

34: sólido branco, 210,0 mg, 74%. **RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)** δ 8,59 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 8,07 (dd, $J = 9,2, 2,3$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 6,0$ Hz, 4H), 7,13 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 7,06 (s, 1H), 4,25 (s, 1H) 4,03 (s, 4H), 3,48 – 3,41 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)** δ 165,88, 157,90, 147,38, 139,55, 129,46, 129,39, 117,87, 115,55, 107,96, 49,93, 43,87.

N-ciclopentil-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (37)

O composto **37** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (87,8 mg, 0,310 mmol) e da ciclopentanamina (24,0 mg, 0,2818 mmol) em DMF por 72h, seguindo o Procedimento Geral B. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **37** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

37: sólido amarelo, 93,9 mg, 97%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,55 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,92 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 9,0, 7,5$ Hz, 2H), 6,97 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 6,90 (t,

$J = 7,5$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 5,84 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,45 – 4,34 (m, 1H), 3,84 – 3,78 (m, 4H), 3,33 – 3,28 (m, 4H), 2,11 – 2,06 (m, 2H), 1,73 – 1,65 (m, 4H), 1,53 – 1,40 (m, 2H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 165,71, 160,22, 151,22, 147,10, 137,07, 129,40, 120,43, 119,73, 116,56, 105,97, 51,74, 49,26, 45,01, 33,51, 23,96.

***N*-ciclohexil-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (38)**

O composto **38** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (30,0 mg, 0,106 mmol) e da ciclohexanamina (7,8 mg, 0,128 mmol) em DMF por 49h, seguindo o Procedimento Geral B. O composto **38** foi obtido após extração com EtOAc (3 x 15 mL) sem necessidade de qualquer purificação adicional.

38: sólido branco, 12,6 mg, 32%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,56 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,92 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,31 – 7,27 (m, 2H), 6,97 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 5,79 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,02 – 3,92 (m, 1H), 3,85 – 3,79 (m, 4H), 3,36 – 3,24 (m, 4H), 2,03 – 2,01 (m, 2H), 1,76 – 1,73 (m, 2H), 1,47 – 1,38 (m, 3H), 1,22 – 1,20 (m, 3H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 165,21, 160,29, 151,25, 147,21, 136,99, 129,38, 120,38, 119,85, 116,54, 105,90, 49,24, 48,63, 44,98, 33,48, 25,75, 25,05.

***N*-fenil-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (39)**

O composto **39** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (20,0 mg, 0,071 mmol) e da anilina (7,9 mg, 0,085 mmol) em DMF por 20h, seguindo o Procedimento Geral B. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **39** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

39: sólido marrom, 19,5 mg, 77%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,71 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 8,02 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,62 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,37 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,30 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,14 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,98 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 6,91 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,72 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 3,89 – 3,82 (m, 4H), 3,35 – 3,28 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 160,30, 151,09, 147,62, 138,19, 137,40, 129,36, 129,10, 124,43, 120,55, 120,49, 120,44, 119,53, 116,56, 106,20, 49,23, 44,87.

6-(4-fenilpiperazin-1-il)-*N*-(2-(piperidin-1-il)etil)nicotinamida (40)

O composto **40** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (20,0 mg, 0,071 mmol) e da 2-(piperidin-1-il)etan-1-amina (10,91 mg, 0,085 mmol) em DMF por 66h, seguindo o

Procedimento Geral B. O composto **40** foi obtido após extração com EtOAc (3 x 15 mL) sem necessidade de qualquer purificação adicional.

(40): sólido amarelo, 10,4 mg, 37%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,65 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,99 (dd, $J = 8,9, 2,3$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 8,5, 7,4$ Hz, 2H), 6,97 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 6,65 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 3,86 – 3,76 (m, 4H), 3,63 – 3,59 (m, 2H), 3,34 – 3,26 (m, 4H), 2,79 – 2,71 (m, 2H), 2,63 (s, 4H), 1,70- 1,65 (m, 4H), 1,52 – 1,45 (m, 2H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 166,31, 160,33, 151,25, 147,95, 137,03, 129,38, 120,36, 119,15, 116,53, 105,82, 57,30, 54,47, 49,25, 44,92, 35,84, 25,15, 23,76.

***N*-(2-hidroxi-etil)-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (41)**

O composto **41** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (30 mg, 0,106 mmol) e do 2-aminoetan-1-ol (7,79 mg, 0,128 mmol) em DMF por 66h, seguindo o Procedimento Geral B. O composto **41** foi obtido após extração com EtOAc (3 x 15 mL) sem necessidade de qualquer purificação adicional.

41: sólido amarelo, 5,4 mg, 16%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,61 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,94 (dd, $J = 9,0, 2,5$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 8,6, 7,3$ Hz, 2H), 6,97 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,59 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H), 3,83 – 3,78 (m, 6H), 3,66 – 3,58 (m, 2H), 3,32 – 3,27 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 167,26, 160,39, 151,20, 147,72, 137,01, 129,38, 120,39, 118,88, 116,53, 105,83, 62,65, 49,23, 44,92, 42,97.

***N*-metil-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (42)**

O composto **42** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (20,0 mg, 0,071 mmol) e da metilamina (16,0 mg, 0,236 mmol) em DMF por 49h, seguindo o Procedimento Geral B. O composto **42** foi obtido após extração com EtOAc (3 x 15 mL) sem necessidade de qualquer purificação adicional.

42: sólido amarelo, 5,3 mg, 25%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,56 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,94 (dd, $J = 8,9, 2,5$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 8,9, 7,3$ Hz, 2H), 6,97 (dd, $J = 8,9, 0,8$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,03 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 3,85 – 3,77 (m, 4H), 3,34 – 3,26 (m, 4H), 2,99 (d, $J = 4,5$ Hz, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 166,85, 160,32, 151,23, 147,24, 137,01, 129,38, 120,39, 119,43, 116,54, 105,95, 49,24, 44,94, 26,82.

***N*-isopropil-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (43)**

O composto **43** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (37,1 mg, 0,131 mmol) e da isopropilamina (9,32 mg, 0,158 mmol) em DMF por 49h, seguindo o Procedimento Geral B. O composto **43** foi obtido após extração com EtOAc (3 x 15 mL) sem necessidade de qualquer purificação adicional.

43: sólido amarelo, 37,0 mg, 87%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,55 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,92 (dd, $J = 8,9, 2,5$ Hz, 1H), 7,29 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,97 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 5,71 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 4,30 – 4,25 (m, 1H), 3,83 – 3,78 (m, 4H), 3,33 – 3,27 (m, 4H), 1,26 (d, $J = 6,5$ Hz, 6H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 165,33, 160,34, 151,27, 147,27, 136,93, 129,39, 120,39, 119,73, 116,55, 105,88, 49,25, 44,98, 41,88, 23,11.

***N,N*-dietil-6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinamida (44)**

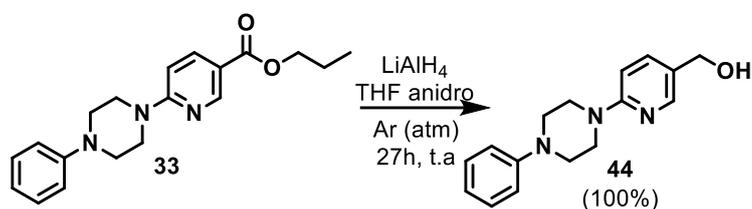
O composto **44** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (42,0 mg, 0,148 mmol) e da dietilamina (12,0 mg, 0,163 mmol) em DMF por 48h, seguindo o Procedimento Geral B. O composto **44** foi obtido após extração com EtOAc (3 x 15 mL) e purificação por cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de EtOAc/Hex (9:1).

44: sólido amarelo, 30,0 mg, 60%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,28 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,61 (dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, 1H), 7,31 – 7,26 (m, 2H), 6,97 (dd, $J = 8,8, 0,8$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,68 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,82 – 3,73 (m, 4H), 3,47 – 3,44 (m, 4H), 3,34 – 3,26 (m, 4H), 1,20 (t, $J = 7,3$ Hz, 6H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 169,33, 159,13, 150,96, 146,39, 136,90, 129,03, 121,79, 120,01, 116,21, 105,91, 48,94, 44,80.

(6-(4-fenilpiperazin-1-il)piridin-3-il)(pirrolidin-1-il)metanona (45)

O composto **45** foi preparado a partir do ácido carboxílico **36** (41,1 mg, 0,145 mmol) e da pirrolidina (11,3 mg, 0,159 mmol) em DMF por 30h, seguindo o Procedimento Geral B. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **45** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

45: sólido branco, 41,3 mg, 85%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,45 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 7,78 (dd, $J = 8,9, 2,0$ Hz, 1H), 7,30 (dd, $J = 8,9, 7,3$ Hz, 2H), 6,98 (dd, $J = 8,9, 0,9$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,68 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,83 – 3,75 (m, 4H), 3,63 – 3,57 (m, 4H), 3,34 – 3,27 (m, 4H), 1,94 – 1,90 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 167,86, 159,45, 151,21, 147,76, 137,97, 129,38, 121,95, 120,44, 116,57, 106,06, 49,95, 49,30, 46,65, 45,08, 26,75, 24,51.

(6-(4-fenilpiperazin-1-il)piridin-3-il)metanol (46)

A uma solução do éster **35** em THF anidro (0,1 M) foi adicionada uma solução de LiAlH_4 (1 M) em THF (12 equiv.) à 0°C e sob atmosfera de argônio. A reação foi agitada por 27 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 0,34 mL de água destilada, 0,34 mL de solução 15% de NaOH e 0,51 mL de água destilada, respectivamente, à 0°C em agitação. A reação foi filtrada em Celite utilizando uma mistura de DCM/MeOH (1:1) obtendo o produto **44** com 100% de rendimento.

46: sólido branco, 106,2 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,18 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,56 (dd, $J = 8,7, 2,3$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 8,7, 7,4$ Hz, 2H), 6,98 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H), 6,71 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 4,58 (s, 2H), 3,75 – 3,69 (m, 4H), 3,34 – 3,28 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 159,34, 151,42, 147,39, 137,74, 129,36, 125,74, 120,28, 116,56, 107,29, 63,02, 49,34, 45,59.

6-(4-fenilpiperazin-1-il)nicotinaldeído (47)

A uma solução de **46** (101,0 mg, 0,375 mmol), em DCM anidro (0,1 M) foi adicionado PDC (282,1 mg, 0,750 mmol, 2,0 equiv.) à temperatura ambiente sob agitação por 27h. Em seguida, foi adicionado éter dietílico (4 mL) e realizada uma filtração para remoção de PDC excedente. O filtrado foi seco sob pressão reduzida e submetido a purificação por cromatografia em coluna *flash*, utilizando uma mistura de Hex/EtOAc (1:1) como eluente para obter o aldeído **47** com 16% de rendimento.

47: sólido amarelo, 15,7 mg, 16%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 9,80 (s, 1H), 8,59 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,96 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, 1H), 7,30 (dd, $J = 8,7, 7,3$ Hz, 2H), 6,96 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,91 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,71 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 3,96 – 3,89 (m, 4H), 3,36 – 3,28 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 189,16, 162,89, 154,48, 151,03, 136,79, 129,43, 122,85, 120,55, 116,54, 106,28, 49,23, 44,78.

(E)-N-ciclopropil-1-(6-(4-fenilpiperazin-1-il)piridin-3-il)metanimina (48)

A uma solução do aldeído **47** (14,7 mg, 0,055 mmol), em éter dietílico (1 mL) foi adicionado ciclopropilamina (3,4 mg, 0,061 mmol, 1,1 equiv.) sob agitação a temperatura ambiente por 29h. Em seguida, foi adicionado água destilada e o precipitado foi filtrado e seco sob pressão reduzida, fornecendo a imina **48** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

48: sólido alaranjado, 17,0 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,34 (s, 1H), 8,31 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,95 (dd, $J = 9,0, 2,2$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 9,0, 7,3$ Hz, 2H), 6,97 (dd, $J = 9,0, 0,9$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,69 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 3,82 – 3,77 (m, 4H), 3,33 – 3,28 (m, 4H), 3,0 – 2,95 (m, 1H), 0,95 – 0,85 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 159,95, 155,83, 151,34, 149,52, 135,46, 129,38, 122,73, 120,31, 116,53, 106,94, 49,28, 45,14, 42,10, 8,71.

1-(5-nitropiridin-2-il)-4-fenilpiperazina (51)

O composto **51** foi preparado a partir do cloreto de arila **50** (50,0 mg, 0,315 mmol) e da fenilpiperazina (61,4 mg, 0,378 mmol) em DMF à 110 °C por 22h, seguindo o Procedimento Geral A. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **51** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

51: sólido amarelo, 90,0 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 9,07 (dd, $J = 2,8, 0,5$ Hz, 1H), 8,24 (dd, $J = 9,5, 2,8$ Hz, 1H), 7,31 (dd, $J = 8,8, 7,3$ Hz, 2H), 6,97 – 6,94 (m, 2H), 6,92 – 6,61 (m, 1H), 6,62 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 3,97 – 3,91 (m, 4H), 3,35 – 3,29 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 160,52, 150,89, 146,61, 133,24, 129,47, 120,69, 116,58, 104,73, 49,19, 44,97.

6-(4-fenilpiperazin-1-il)piridin-3-amina (52)

A uma solução de **51** (83,22 mg, 0,293 mmol) em uma mistura de EtOAc/MeOH (1:1) (10 mL), foi adicionado 10% de Pd/C (10% em peso). A reação foi agitada a temperatura ambiente e borbulhado H_2 até redução completa de **51** (21h). A mistura reacional foi filtrada em Celite e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para obter o composto **52** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

52: sólido rosa, 77,2 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7,82 (dd, $J = 2,9, 0,6$ Hz, 1H), 7,31 – 7,26 (m, 2H), 7,02 – 6,90 (m, 3H), 6,89 – 6,86 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,64 (d, $J = 8,8$

Hz, 1H), 3,57 – 3,50 (m, 4H), 3,35 – 3,28 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 154,56, 151,54, 135,50, 135,01, 129,29, 126,24, 120,09, 116,50, 108,83, 49,41, 47,05.

***N*-(6-(4-fenilpiperazin-1-il)piridin-3-il)ciclopropanocarboxamida (53)**

O composto **53** foi preparado a partir do ácido ciclopropanoico (12,2 mg, 0,142 mmol) e da amina **52** (30,0 mg, 0,118 mmol) em DMF por 20h, seguindo o Procedimento Geral B. O precipitado foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob pressão reduzida, fornecendo o composto **53** sem necessidade de qualquer purificação adicional.

53: sólido rosa, 17,2 mg, 45%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8,15 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 7,30 – 7,26 (m, 2H), 6,98 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,89 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,69 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 3,71 – 3,62 (m, 4H), 3,33 – 3,27 (m, 4H), 2,77 (s, 1H), 1,56 – 1,45 (m, 1H), 1,11 – 1,05 (m, 2H), 0,90 – 0,79 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 172,19, 156,89, 151,43, 140,04, 131,42, 129,33, 126,39, 120,23, 116,55, 107,32, 49,33, 45,98, 15,57, 8,01.

4.3 Procedimento Experimental (Biológico)

O efeito antiplasmodial dos compostos foi validado contra a cepa 3D7 de *P. falciparum* por meio de diluições seriadas duplas dos compostos que foram preparadas em placas de 96 poços em triplicata e incubadas por 96 h em condições normais de crescimento, usando uma parasitemia inicial de 0,5% e um hematócrito de 4% em um volume de 100 μL por poço. A proliferação parasitária foi determinada medindo a carga de DNA via fluorescência nos poços através da adição de 100 μL de tampão de lise suplementado com SYBR Green I (0,02% v/v) e incubação por 1 h em temperatura ambiente no escuro. A fluorescência foi quantificada usando um leitor de placas CLARIOstar (BMG Labtech, Alemanha) em bandas de comprimento de onda de excitação e emissão de 485 (± 9) e 530 (± 12) nm, respectivamente. O ajuste focal e de ganho foi realizado usando os controles não tratados (sinal de fluorescência esperado mais alto)^[46].

Os dados foram adquiridos por meio do software CLARIOstar (V5.20) e MARS, dimensionados manualmente para 0-100% e plotados usando GraphPad Prism (versão 8.4.3 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). A análise dos valores de IC_{50} foi realizada usando o ajuste de curva de regressão não linear implementado no GraphPad Prism sempre que possível com a análise de quatro parâmetros – inclinação

variável. Os resíduos foram testados quanto à normalidade por meio do teste D'Agostino-Pearson omnibus (K2) e quanto à homocedasticidade para verificar a ponderação adequada.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, a estratégia sintética utilizada para obtenção do *hit 1* se mostrou eficiente e sua potência (IC₅₀) antimalárica foi confirmada através dos ensaios biológicos. Isso possibilitou o início de um trabalho *hit-to-lead*, visando otimizar a classe das piridilpiperazinas contra a malária. Foram planejadas modificações nos diferentes fragmentos do *hit 1* com objetivo de melhorar as propriedades biológicas, principalmente a potência antimalárica nesse primeiro momento. As estratégias sintéticas utilizadas para obter os derivados foram eficientes, sendo obtidos 38 derivados inéditos do *hit 1* explorando modificações nos fragmentos toluil e amida. Todos os compostos foram enviados para ensaios biológicos contra *P. falciparum*. Os resultados de IC₅₀ referentes às modificações realizadas no fragmento toluil foram obtidos enquanto os resultados referentes ao fragmento amida estão em andamento.

Foi estabelecida uma relação estrutura-atividade para esta série de piridilpiperazina, ao explorar o fragmento toluil do *hit 1*. Isso revelou características estruturais cruciais para a atividade antiplasmódica desses compostos, permitindo identificar análogos otimizados do *hit 1*. Todos esses compostos otimizados possuíam um anel aromático diretamente ligado à piperazina. Investigações preliminares destacaram que a remoção do grupo aril ou a introdução de um espaçador foram altamente prejudiciais à atividade, resultando em compostos com atividade até seis vezes menor que o *hit 1*.

Em contraste, a substituição do grupo *orto*-metil no *hit 1* por substituintes *orto*-fluorados, como o *o*-fluoreto no composto **18** e o *o*-trifluormetil no composto **20**, proporcionou os primeiros compostos otimizados da série. Embora esses compostos fossem comparáveis ao *hit 1* em termos de potência e citotoxicidade, eles se mostraram muito mais promissores em relação à estabilidade metabólica e perfil farmacocinético devido a essa substituição.

A introdução de átomos de nitrogênio endocíclicos no mesmo fragmento aril foi bem tolerada. As conclusões obtidas para os compostos **18** e **20** também se aplicaram à pirazinilpiperazina **27**, que apesar da potência antiplasmódica duas vezes menor que a do *hit 1* apresentou melhor valor de clog(P), resultando no maior LLE da série.

A combinação desses dois elementos levou ao desenvolvimento do derivado *orto*-trifluormetilpiridin-2-il **30**. Esse composto não apenas apresentou potência antiplasmódica, citotoxicidade e seletividade comparáveis ao *hit 1*, mas também se beneficiou de um perfil metabólico altamente otimizado, devido tanto ao substituinte CF₃ quanto ao nitrogênio endocíclico, quando comparado ao fragmento toluil do *hit 1*, facilmente metabolizado.

Esses quatro compostos otimizados, juntamente com outros compostos da série com atividade antiplasmódica abaixo de 15 μM , mostraram um perfil ADME *in silico* adequado às características esperadas de compostos líderes. Embora a lipofilicidade tenha se mantido em níveis moderados, com a maioria dos valores de $\text{clog}(P)$ entre 2 e 3, os compostos demonstraram valores de LLE moderados, principalmente entre 3 e 4, com exceção da pirazinilpiperazina **27**, que apresentou um LLE de 4,59. No entanto, tais valores de LLE são compatíveis com compostos líderes iniciais.

Além disso, uma avaliação adicional dos compostos mais potentes ($\text{IC}_{50} < 15 \mu\text{M}$) contra a cepa Dd2, resistente a medicamentos, revelou que a série foi capaz de manter sua potência contra essa cepa de *P. falciparum*. Isso é crucial, dada a recente emergência de infecções maláricas resistentes a tratamentos. Portanto, os quatro compostos otimizados **18**, **20**, **27** e **30** podem ser considerados um ponto de partida adequado para estudos futuros envolvendo a classe de piridilpiperazina contra *P. falciparum*.

REFERÊNCIAS

- 1 World Health Organization. **Malaria**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Acesso em 25 maio 2023.
- 2 World Health Organization. **World Malaria Report 2022**. Geneva: WHO, 2022.
- 3 FRANÇA, Tanos C. C.; SANTOS, Marta G. dos; FIGUEROA-VILLAR, José D.. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000500060>.
- 4 PHILLIPS, Margaret A.; BURROWS, Jeremy N.; MANYANDO, Christine; VAN HUIJSDUIJNEN, Rob Hooft; VAN VOORHIS, Wesley C.; WELLS, Timothy N. C.. Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-24, 3 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.
- 5 WASSMER, Samuel Crocodile; GRAU, Georges Emile Raymond. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front?. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 47, n. 2-3, p. 145-152, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.002>.
- 6 Centers for Disease Control and Prevention, CDC . Division of parasitic diseases and malaria. Global Health. **Malaria: life cycle**. USA, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em: 25 maio 2023.
- 7 BAKER, David A.. Malaria gametocytogenesis. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [S.L.], v. 172, n. 2, p. 57-65, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019>.
- 8 FATUNLA, Odunayo Adebukola Temitope; OLATUNYA, Oladele Simeon; OGUNDARE, Ezra Olatunde; FATUNLA, Tolulope Oladapo; BABATOLA, Adefunke Olarinre; ADENIYI, Adewuyi Temidayo; OYELAMI, Oyeku Akibu. Malaria prevention practices and malaria prevalence among children living in a rural community in Southwest Nigeria. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, [S.L.], v. 16, n. 02, p. 352-361, 28 fev. 2022. Journal of Infection in Developing Countries. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.14894>.

- 9 LAURENS, Matthew B.. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 480-489, 22 out. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>.
- 10 RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP. **Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial.** **The Lancet**, [S.L.], v. 386, n. 9988, p. 31-45, jul. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)60721-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)60721-8).
- 11 GREGSON, Aric; PLOWE, Christopher V.. Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. **Pharmacological Reviews**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 117-145, 24 fev. 2005. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.57.1.4>.
- 12 SHANKS, G. Dennis. Historical Review: problematic malaria prophylaxis with quinine. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 95, n. 2, p. 269-272, 3 ago. 2016. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0138>.
- 13 SILVA, André Felipe Cândido da; BENCHIMOL, Jaime Larry. Malaria and Quinine Resistance: a medical and scientific issue between brazil and germany (1907-19). **Medical History**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 1-26, 16 dez. 2013. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/mdh.2013.69>.
- 14 LALLOO, David G.; SHINGADIA, Delane; BELL, David J.; BEECHING, Nicholas J.; WHITTY, Christopher J.M.; CHIODINI, Peter L.. UK malaria treatment guidelines 2016. **Journal Of Infection**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 635-649, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.001>
- 15 SKRZYPEK, Ruth; CALLAGHAN, Richard. The “pushmi-pullyu” of resistance to chloroquine in malaria. **Essays In Biochemistry**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 167-175, 28 fev. 2017. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/ebc20160060>.
- 16 NSANZABANA, Christian. Resistance to Artemisinin Combination Therapies (ACTs): do not forget the partner drug!. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 26, 1 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed4010026>.

- 17 RATHOD, Gajanan K.; JAIN, Meenakshi; SHARMA, Krishna K.; DAS, Samarpita; BASAK, Ahana; JAIN, Rahul. New structural classes of antimalarials. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 242, p. 114653, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114653>.
- 18 KINFU, Gebremedhin; GEBRE-SELASSIE, Solomon; FIKRIE, Nigus. Therapeutic Efficacy of Artemether-Lumefantrine for the Treatment of Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria in Northern Ethiopia. **Malaria Research And Treatment**, [S.L.], v. 2012, p. 1-6, 11 abr. 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/548710>.
- 19 WOODROW, Charles J.; WHITE, Nicholas J.. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 34-48, 8 set. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuw037>.
- 20 TEIXEIRA, Cátia; VALE, Nuno; PÉREZ, Bianca; GOMES, Ana; GOMES, José R. B.; GOMES, Paula. “Recycling” Classical Drugs for Malaria. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 114, n. 22, p. 11164-11220, 20 out. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr500123g>.
- 21 FIDOCK, David A.; ROSENTHAL, Philip J.; CROFT, Simon L.; BRUN, Reto; NWAKA, Solomon. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 509-520, jun. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1416>.
- 22 KATSUNO, Kei; BURROWS, Jeremy N.; DUNCAN, Ken; VAN HUIJSDUIJNEN, Rob Hooft; KANEKO, Takushi; KITA, Kiyoshi; MOWBRAY, Charles E.; SCHMATZ, Dennis; WARNER, Peter; SLINGSBY, B. T.. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 751-758, 5 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4683>.
- 23 LOMBARDINO, Joseph G.; LOWE, John A.. The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 3, n. 10, p. 853-862, out. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1523>.

- 24 GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, [S.L.], v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142010000300006>.
- 25 GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D.. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 24-36, 1 jul. 2008. *Revistas Processos Quimicos*. <http://dx.doi.org/10.19142/rpq.v2i4.66>.
- 26 KENAKIN, Terry P.. The Drug Discovery Process. **A Pharmacology Primer**, [S.L.], p. 323-371, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813957-8.00011-4>.
- 27 MMV, Medicines for Malaria Venture. **Research and Development**. Disponível em: <https://www.mmv.org/our-work/research-and-development>. Acesso em: 20/06/2023.
- 28 CALDERÓN, Félix; BARROS, David; BUENO, José María; COTERÓN, José Miguel; FERNÁNDEZ, Esther; GAMO, Francisco Javier; LAVANDERA, José Luís; LEÓN, María Luisa; MACDONALD, Simon J. F.; MALLO, Araceli. An Invitation to Open Innovation in Malaria Drug Discovery: 47 quality starting points from the teams. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 741-746, 17 ago. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ml200135p>.
- 29 NASSAR, Alaa-Eldin F.; KAMEL, Amin M.; CLARIMONT, Caroline. Improving the decision-making process in the structural modification of drug candidates: enhancing metabolic stability. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 9, n. 23, p. 1020-1028, dez. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446\(04\)03280-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446(04)03280-5).
- 30 ZHANG, Zhoupeng; TANG, Wei. Drug metabolism in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 721-732, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.04.003>.
- 31 SHAH, Poonam; WESTWELL, Andrew D.. The role of fluorine in medicinal chemistry. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 527-540, jan. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14756360701425014>.
- 32 SUN, Qin; ZHU, Ran; FOSS, Frank W.; MACDONALD, Timothy L.. In Vitro Metabolism of a Model Cyclopropylamine to Reactive Intermediate: insights into trovafloxacin-induced hepatotoxicity. **Chemical Research In Toxicology**, [S.L.], v.

- 21, n. 3, p. 711-719, 26 fev. 2008. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/tx7003085>.
- 33 VANTOUROUT, Julien C.; MIRAS, Haralampos N.; ISIDRO-LLOBET, Albert; SPROULES, Stephen; WATSON, Allan J. B.. Spectroscopic Studies of the Chan–Lam Amination: a mechanism-inspired solution to boronic ester reactivity. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 139, n. 13, p. 4769-4779, 24 mar. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.6b12800>.
- 34 MARTINHO, Ana Clara Cassiano; RESENDE, Daniela de Melo; LANDIN, Emanuely Silva; LAPIERRE, Thibault Joseph William Jacques Dit; BERNARDES, Talita Cristina Diniz; MARTINS, Luan Carvalho; FERREIRA, Rafaela Salgado; MURTA, Silvane Maria Fonseca; REZENDE JÚNIOR, Celso de Oliveira. Synthesis, Design, and Structure-Activity Relationship of a Benzenesulfonylpiperazine Series against *Trypanosoma cruzi*. **Chemmedchem**, [S.L.], v. 17, n. 19, 6 set. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202200211>.
- 35 MILLER, Randy R.; MADEIRA, Maria; WOOD, Harold B.; GEISLER, Wayne M.; RAAB, Conrad E.; MARTIN, Iain J.. Integrating the Impact of Lipophilicity on Potency and Pharmacokinetic Parameters Enables the Use of Diverse Chemical Space during Small Molecule Drug Optimization. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 21, p. 12156-12170, 7 jul. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01813>.
- 36 LIU, Xiangli; TESTA, Bernard; FAHR, Alfred. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 962-977, 30 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-010-0303-7>.
- 37 ARNOTT, John; PLANEY, Sonia Lobo. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 863-875, 19 set. 2012. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>.
- 38 ABBOTT, N. Joan; PATABENDIGE, Adjanie A.K.; DOLMAN, Diana E.M.; YUSOF, Siti R.; BEGLEY, David J.. Structure and function of the blood–brain

- barrier. **Neurobiology Of Disease**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 13-25, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
- 39 DAINA, Antoine; MICHELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-35, 3 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep42717>.
- 40 YAN, Aixia; WANG, Zhi; CAI, Zongyuan. Prediction of Human Intestinal Absorption by GA Feature Selection and Support Vector Machine Regression. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 1961-1976, 20 out. 2008. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms9101961>.
- 41 OTTAVIANI, Giorgio; GOSLING, Daniel J.; PATISSIER, Celine; RODDE, Stephane; ZHOU, Liping; FALLER, Bernard. What is modulating solubility in simulated intestinal fluids? **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 41, n. 3-4, p. 452-457, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.07.012>.
- 42 BAELL, Jonathan B.; HOLLOWAY, Georgina A.. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 7, p. 2719-2740, 8 abr. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm901137j>.
- 43 LIPINSKI, Christopher A.; LOMBARDO, Franco; DOMINY, Beryl W.; FEENEY, Paul J.. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 23, n. 1-3, p. 3-25, jan. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(96\)00423-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(96)00423-1).
- 44 WARING, Michael J.. Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates—Molecular weight dependent lower logD limits based on permeability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 2844-2851, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.109>.
- 45 EDWARDS, Martin P.; PRICE, David A.. Role of Physicochemical Properties and Ligand Lipophilicity Efficiency in Addressing Drug Safety Risks. **Annual Reports In**

- Medicinal Chemistry**, [S.L.], p. 380-391, 2010. Elsevier.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0065-7743\(10\)45023-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-7743(10)45023-x).
- 46 BUCKLE, Derek R.; ERHARDT, Paul W.; GANELLIN, C. Robin; KOBAYASHI, Toshi; PERUN, Thomas J.; PROUDFOOT, John; SENN-BILFINGER, Joerg. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry Part II (IUPAC Recommendations 2013). **Annual Reports In Medicinal Chemistry**, [S.L.], p. 387-418, 2013. Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-417150-3.00024-7>.
- 47 CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, S.; WARREN, N. **Organic Chemistry**. Oxford: Oxford, 2001.
- 48 SMILKSTEIN, Martin; SRIWILAIJAROEN, Nongluk; KELLY, Jane Xu; WILAIRAT, Prapon; RISCOE, Michael. Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 1803-1806, maio 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.48.5.1803-1806.2004>.

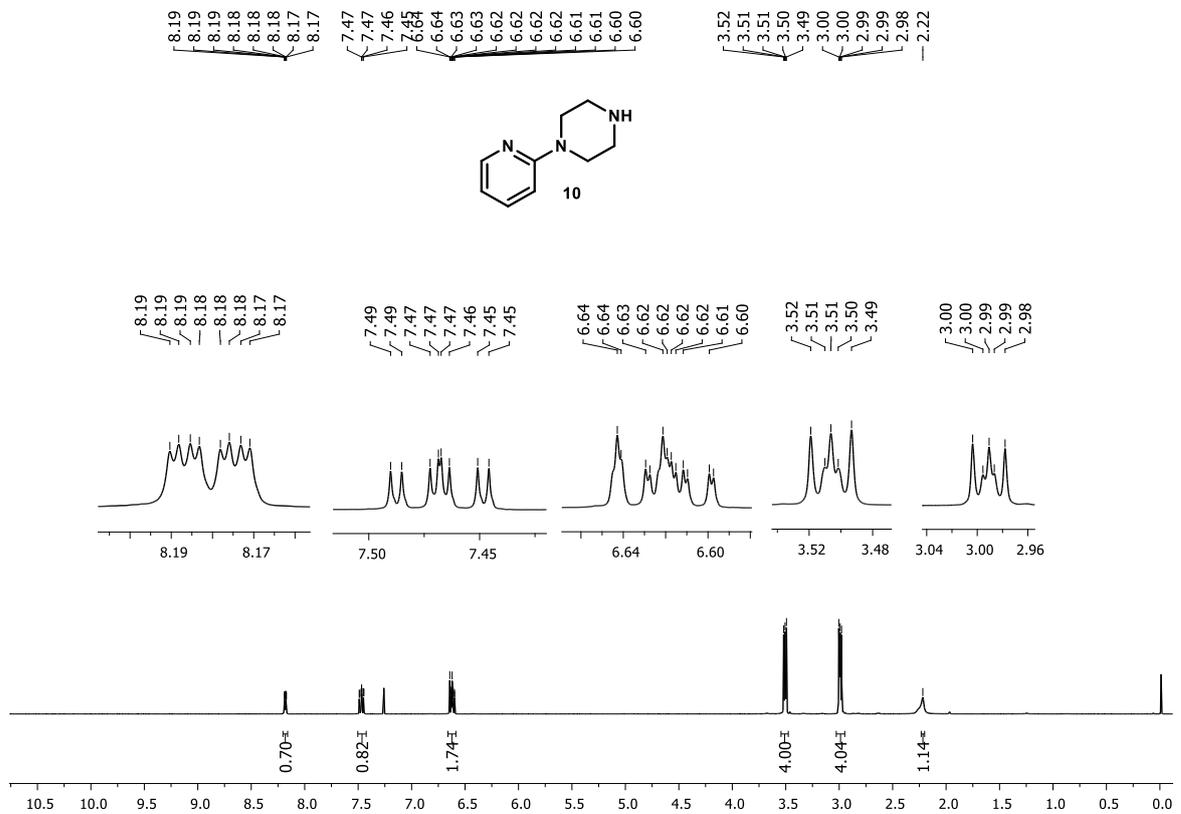
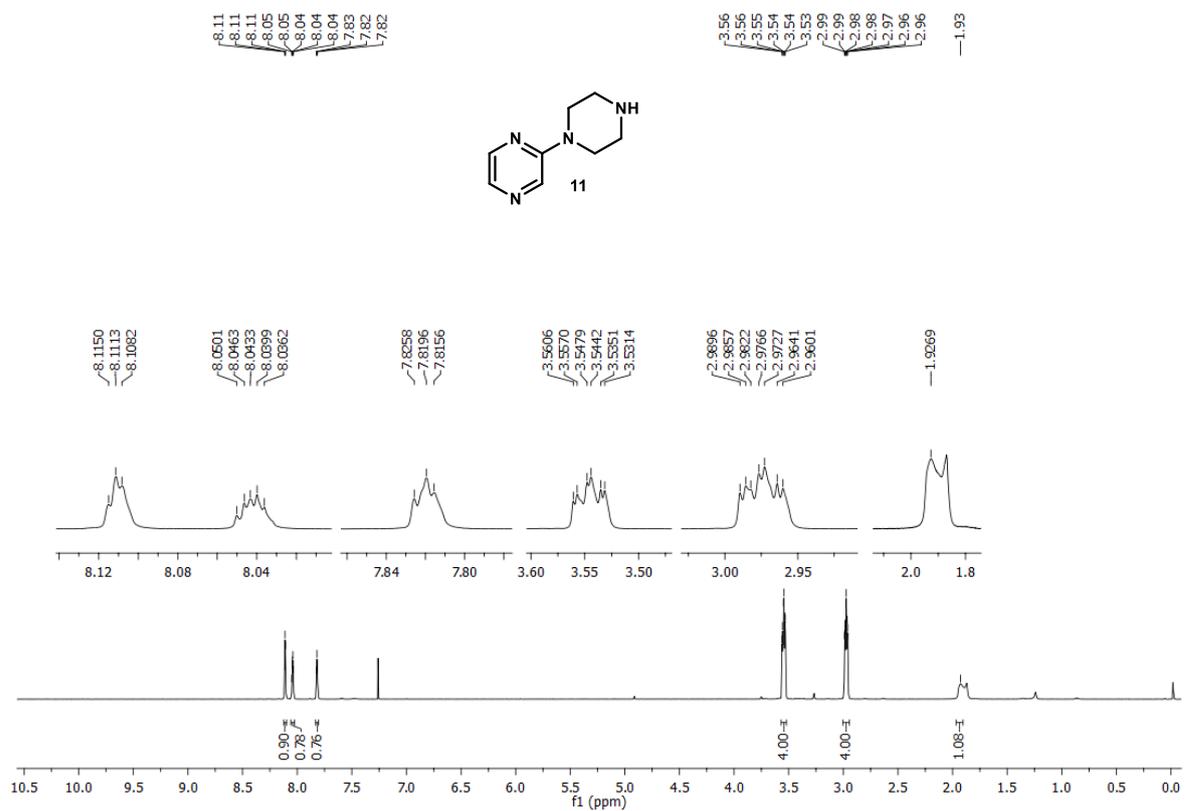
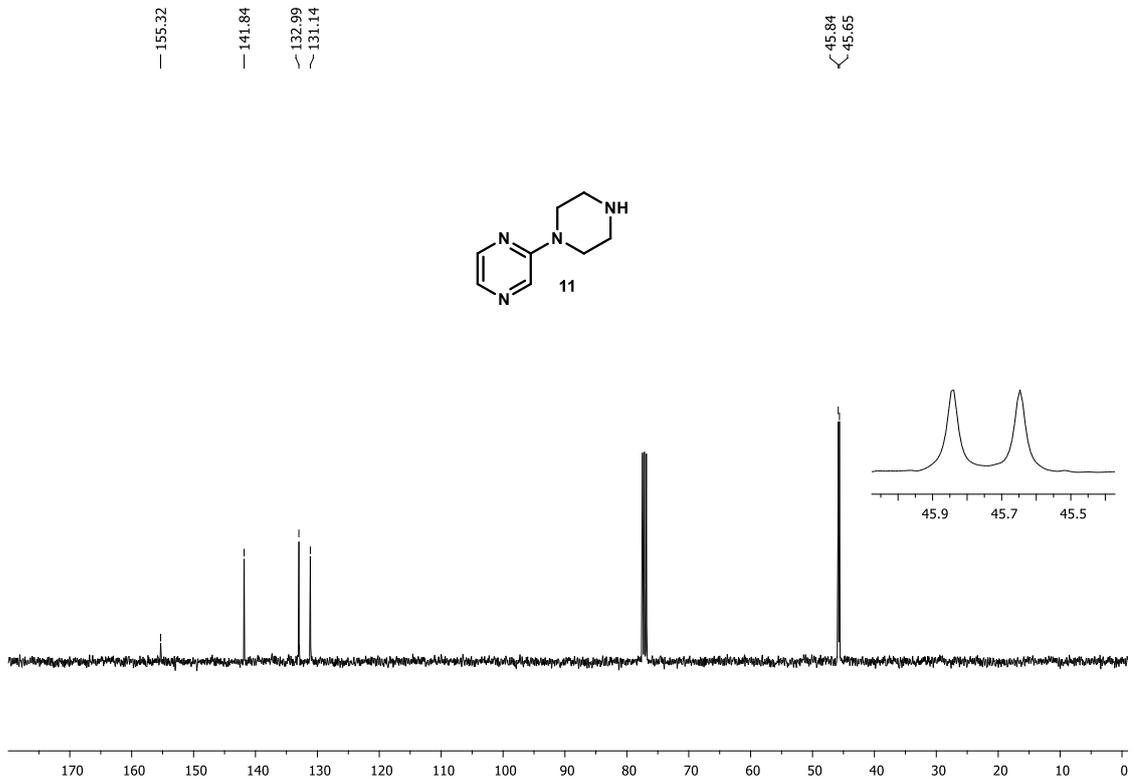
ANEXO – Espectros de RMN (^1H e ^{13}C) e HRMSFigura A1 – Espectro de RMN de ^1H de **10** (400 MHz, CDCl_3)

Figura A2 – Espectro de RMN de ^1H de **11** (400 MHz, CDCl_3)Figura A3 – Espectro de RMN de ^{13}C de **11** (101 MHz, CDCl_3)

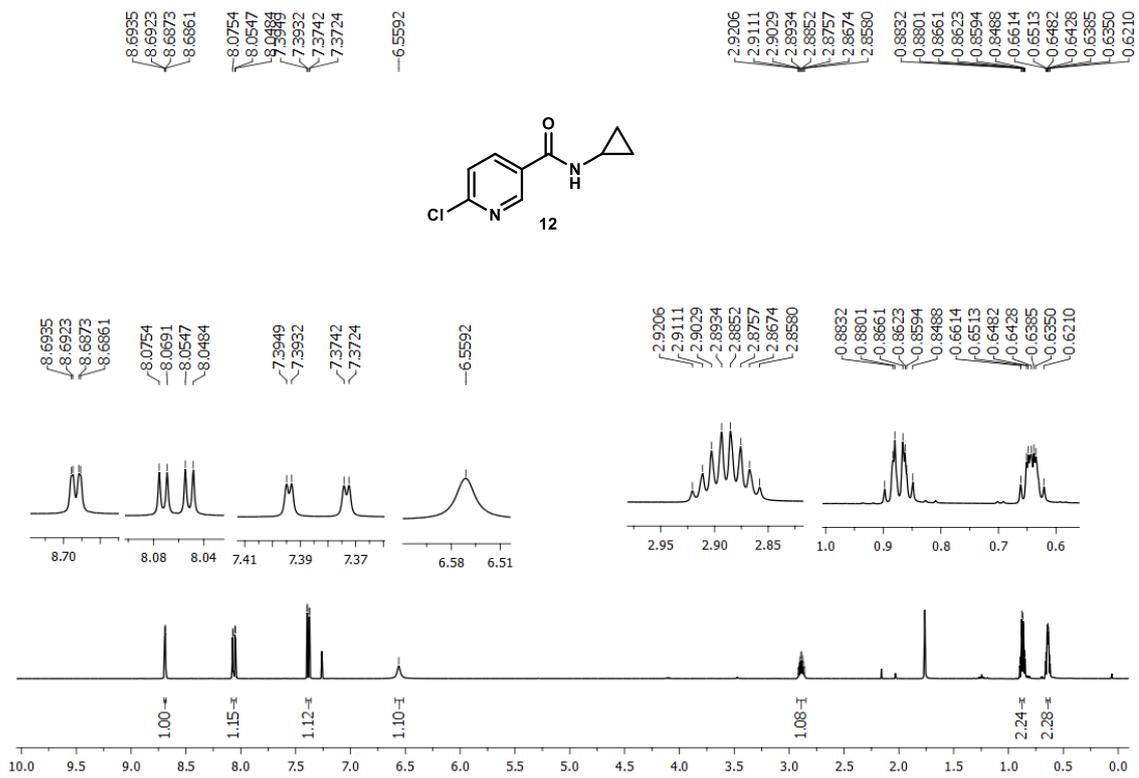


Figura A4 – Espectro de RMN de ^1H de **12** (400 MHz, CDCl_3)

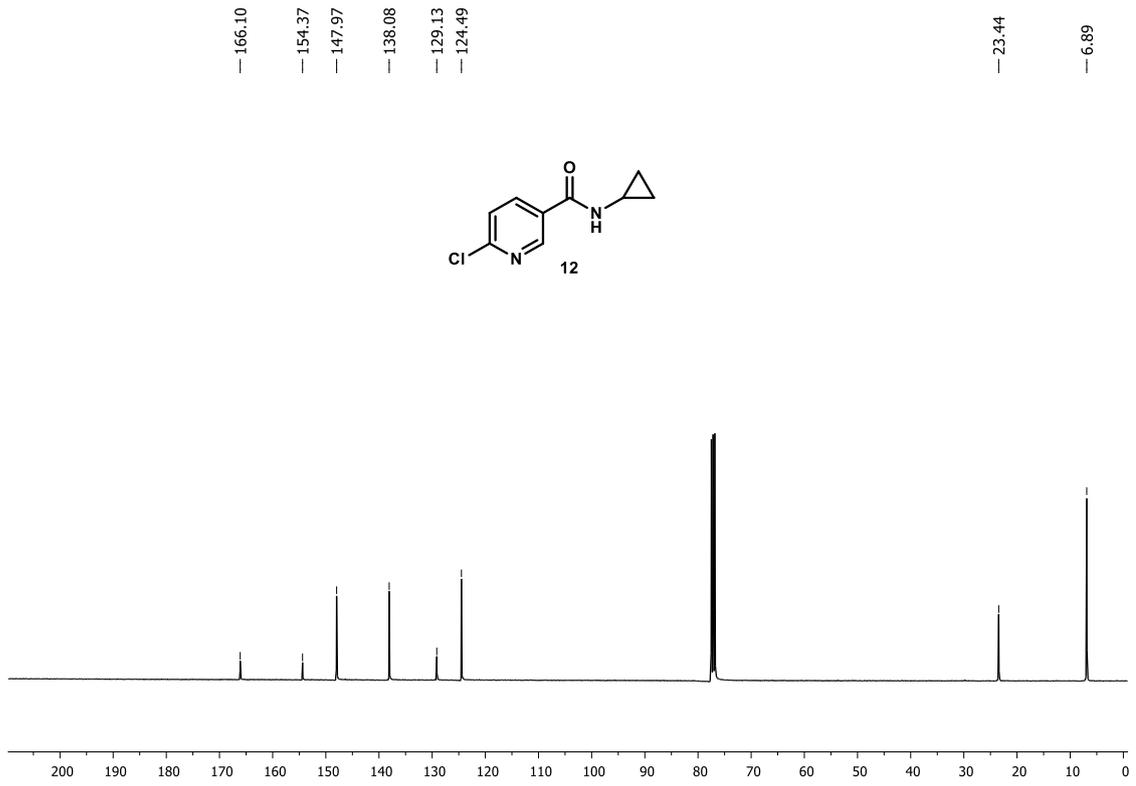


Figura A5 – Espectro de RMN de ^{13}C de **12** (101 MHz, CDCl_3)

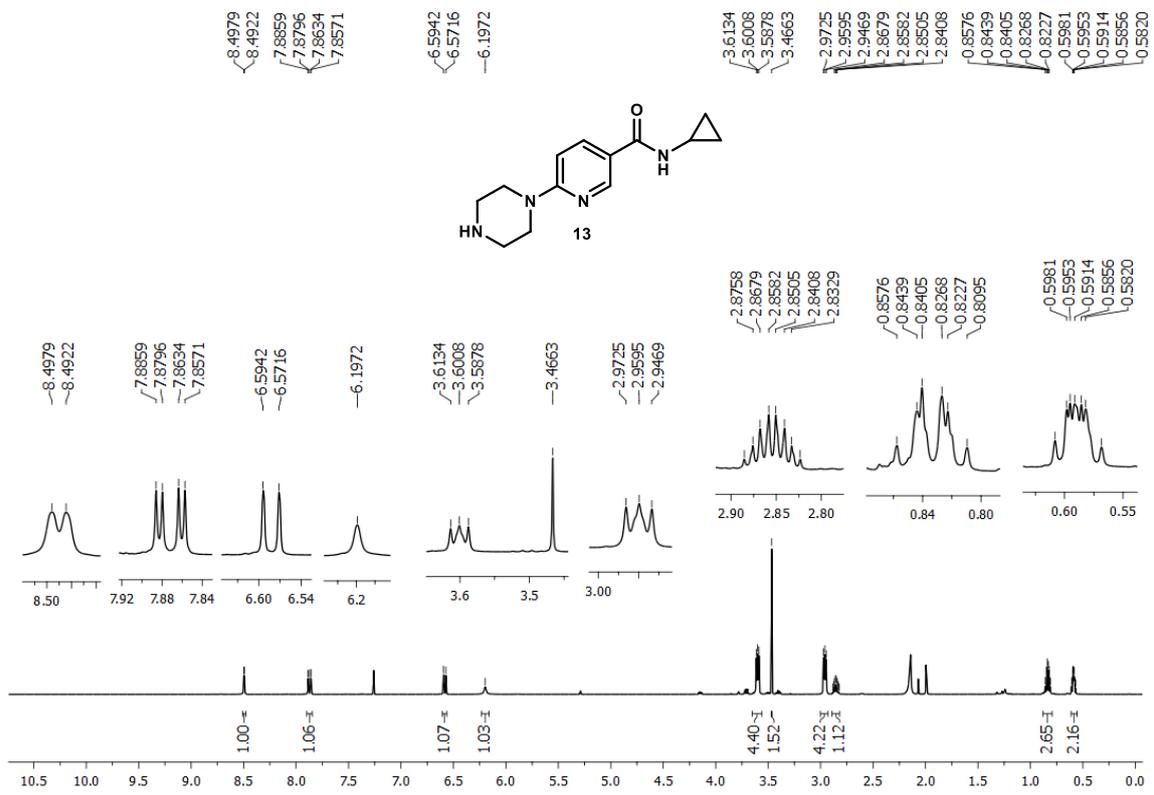
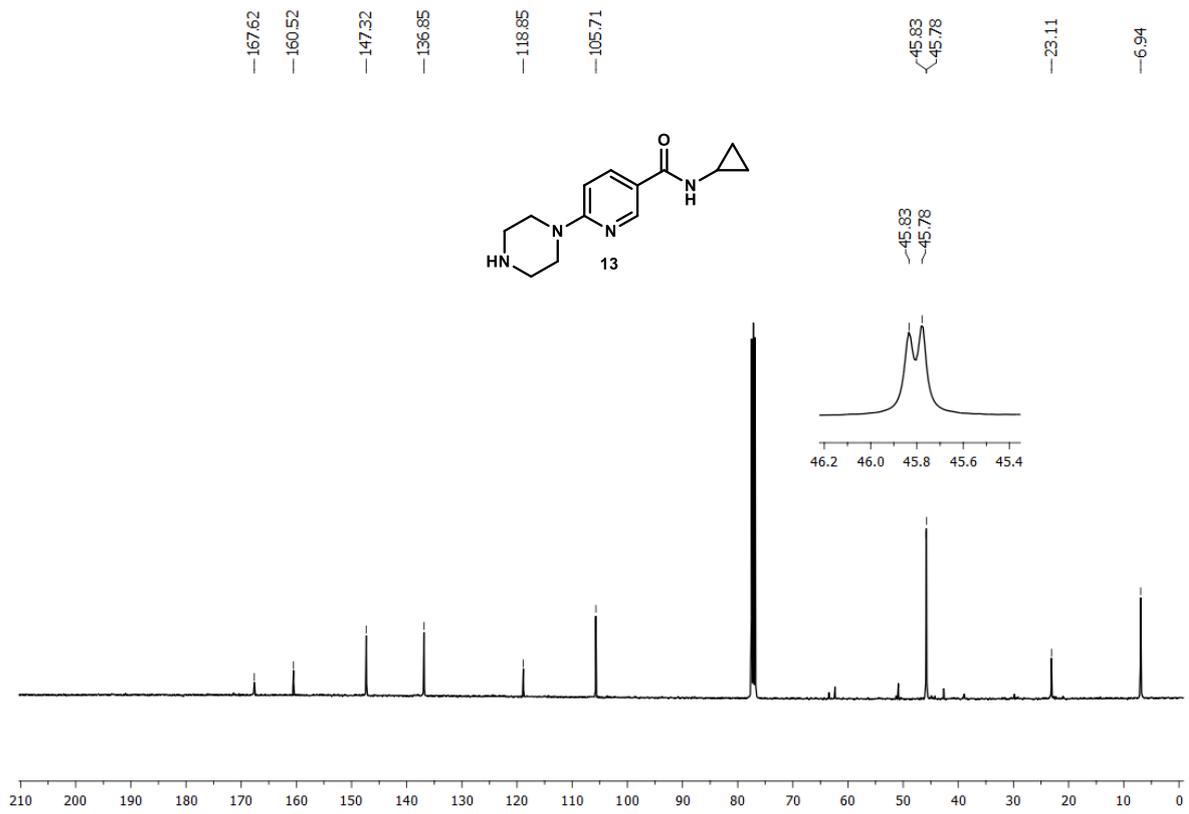
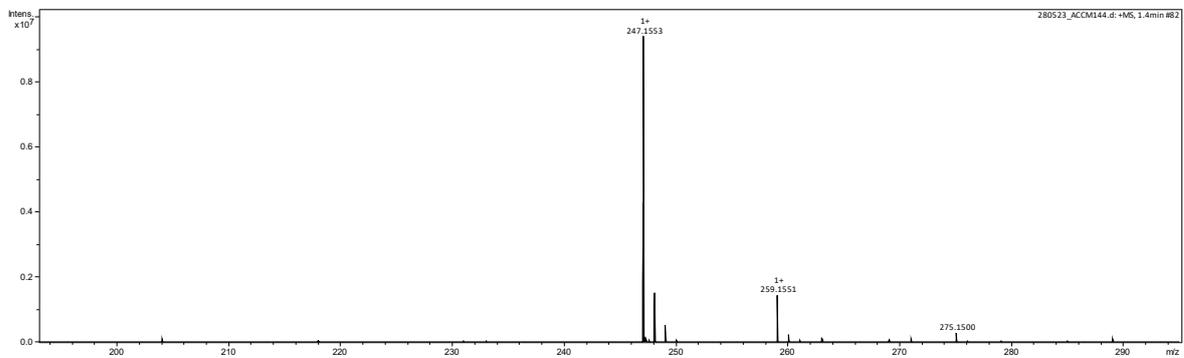


Figura A6 – Espectro de RMN de ^1H de **13** (400 MHz, CDCl_3)

Figura A7 – Espectro de RMN de ^{13}C de **13** (101 MHz, CDCl_3)Figura A8 – Espectro de HRMS (ESI+) de **13**

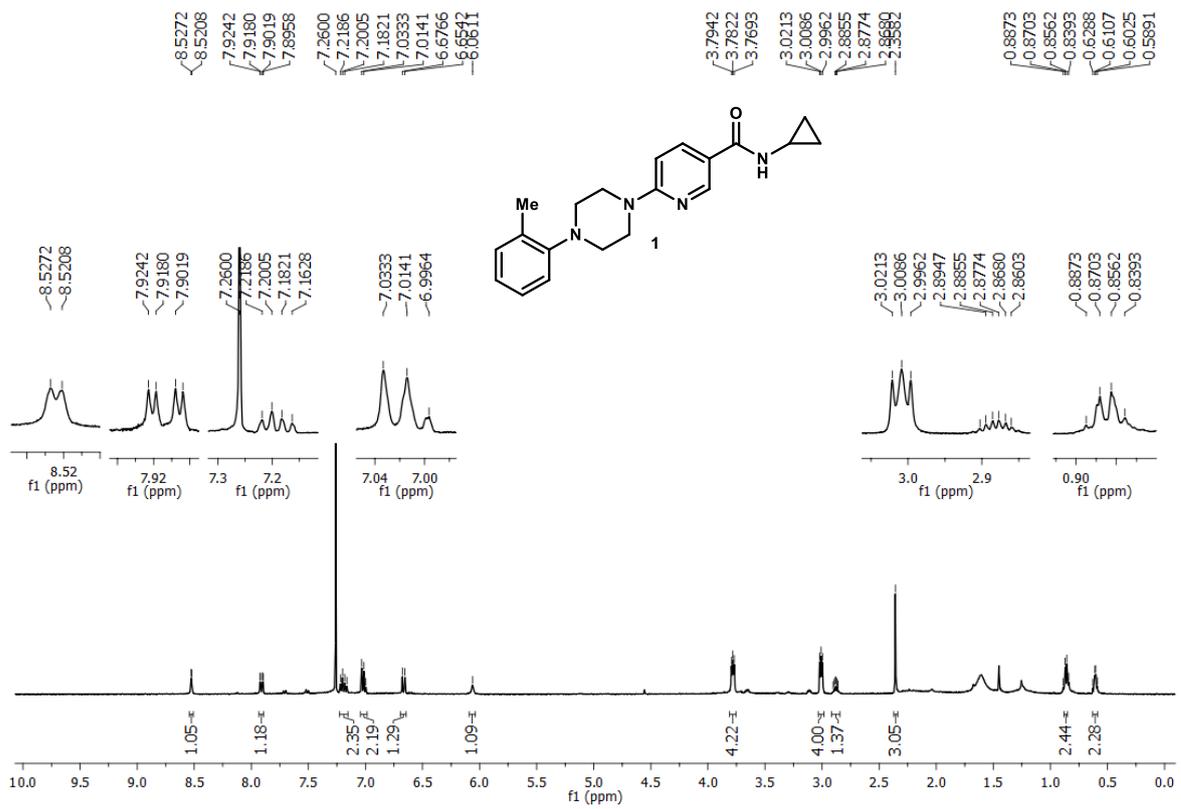
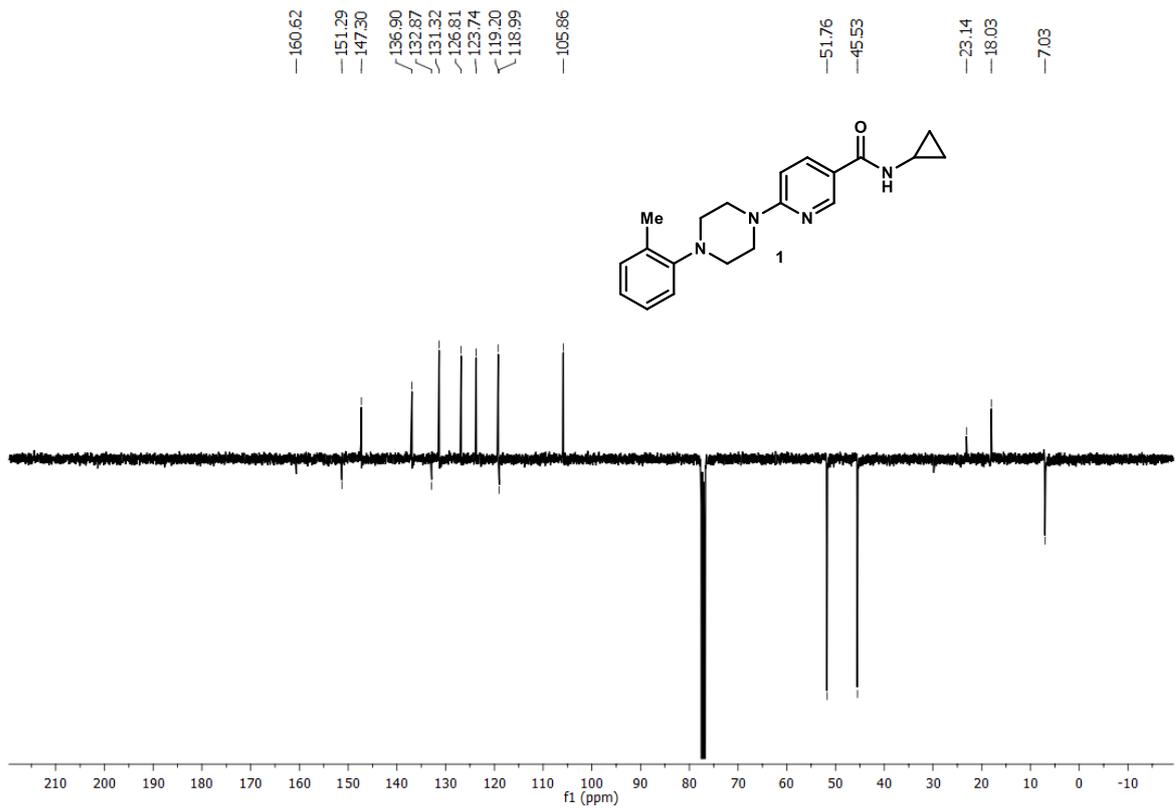
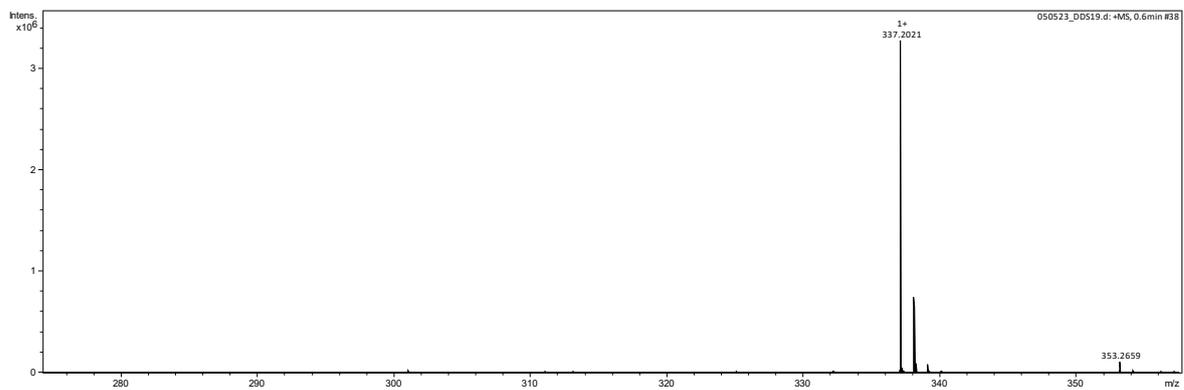


Figura A9 – Espectro de RMN de ¹H de **1** (400 MHz, CDCl₃)

Figura A10 – Espectro de RMN de ¹³C APT de **1** (101 MHz, CDCl₃)Figura A11 – Espectro de HRMS (ESI+) de **1**

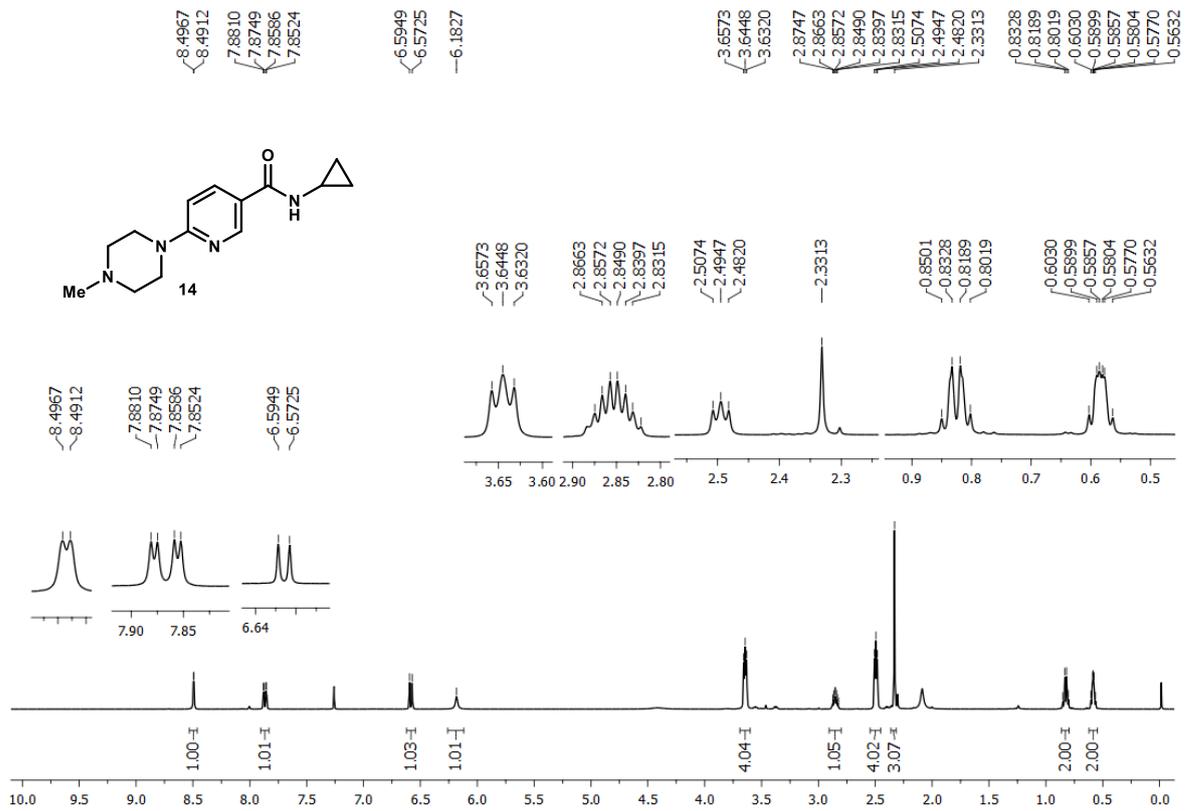
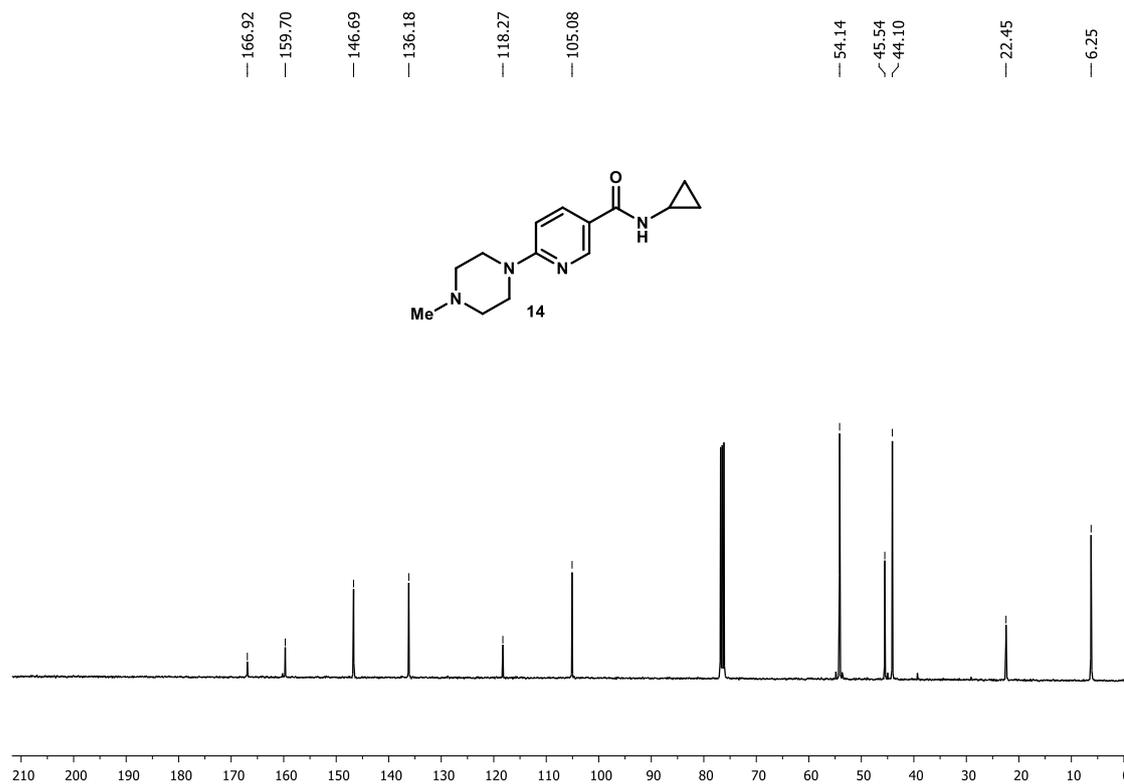
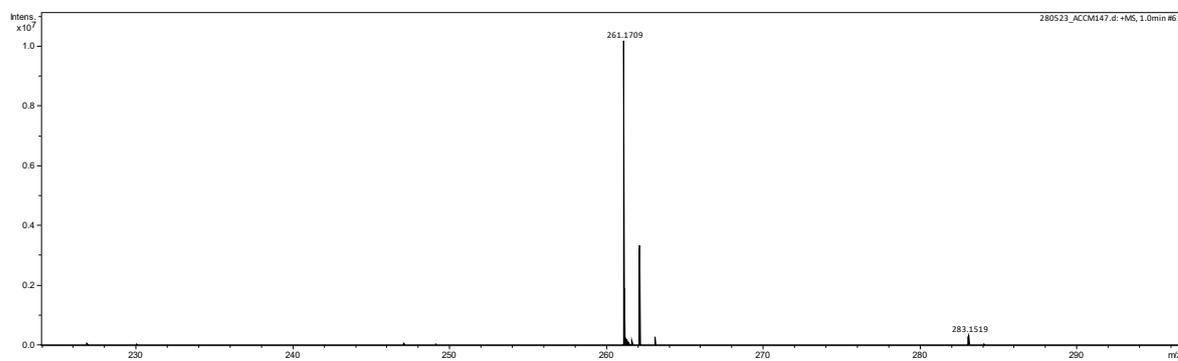


Figura A12 – Espectro de RMN de ^1H de **14** (400 MHz, CDCl_3)

Figura A13 – Espectro de RMN de ^{13}C de **14** (101 MHz, CDCl_3)Figura A14 – Espectro de HRMS (ESI+) de **14**

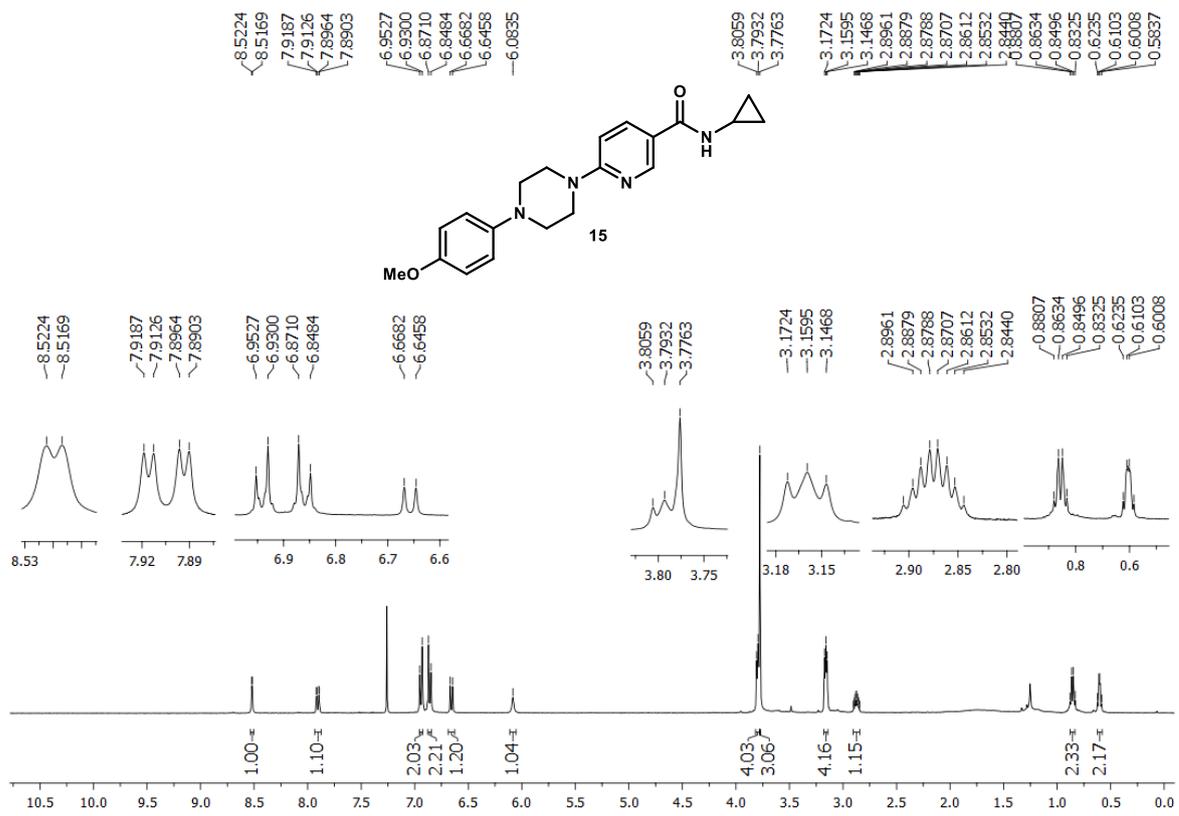


Figura A15 – Espectro de RMN de ^1H de **15** (400 MHz, CDCl_3)

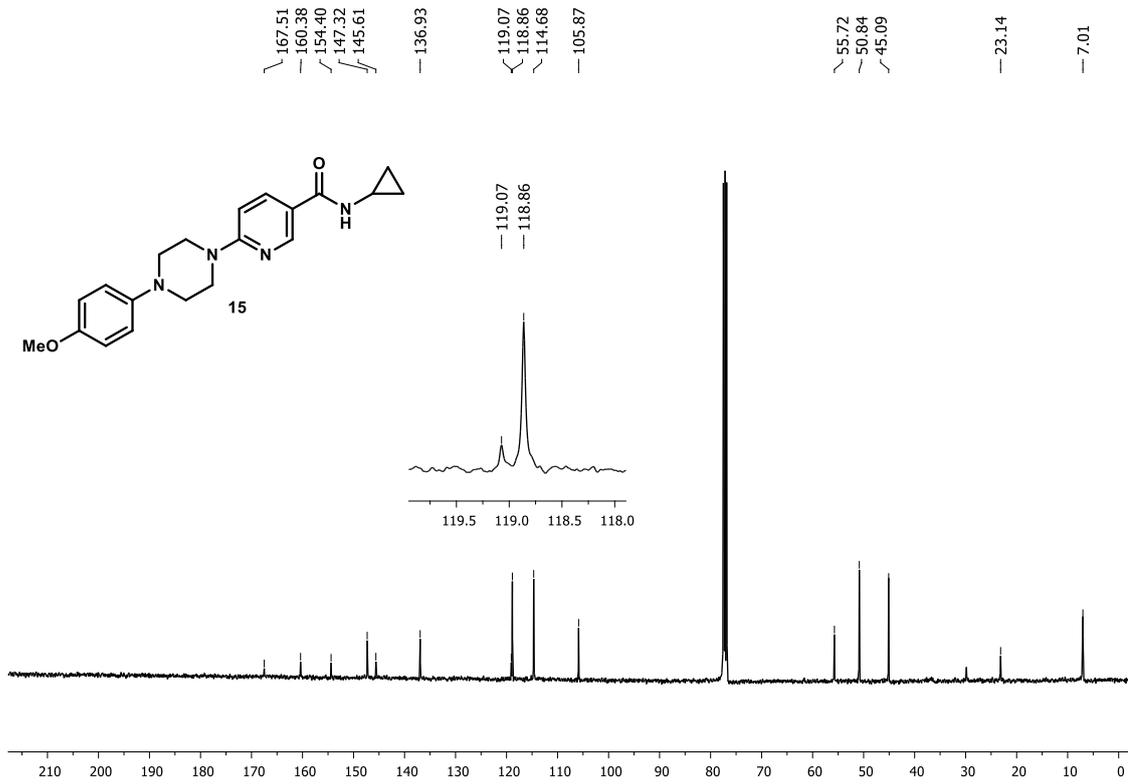


Figura A16 – Espectro de RMN de ^{13}C de **15** (101 MHz, CDCl_3)

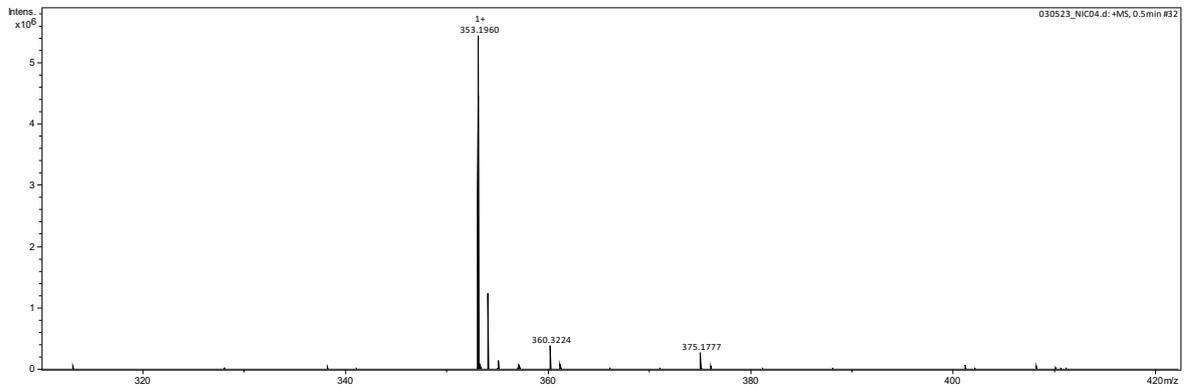


Figura A17 – Espectro de HRMS (ESI+) de **15**

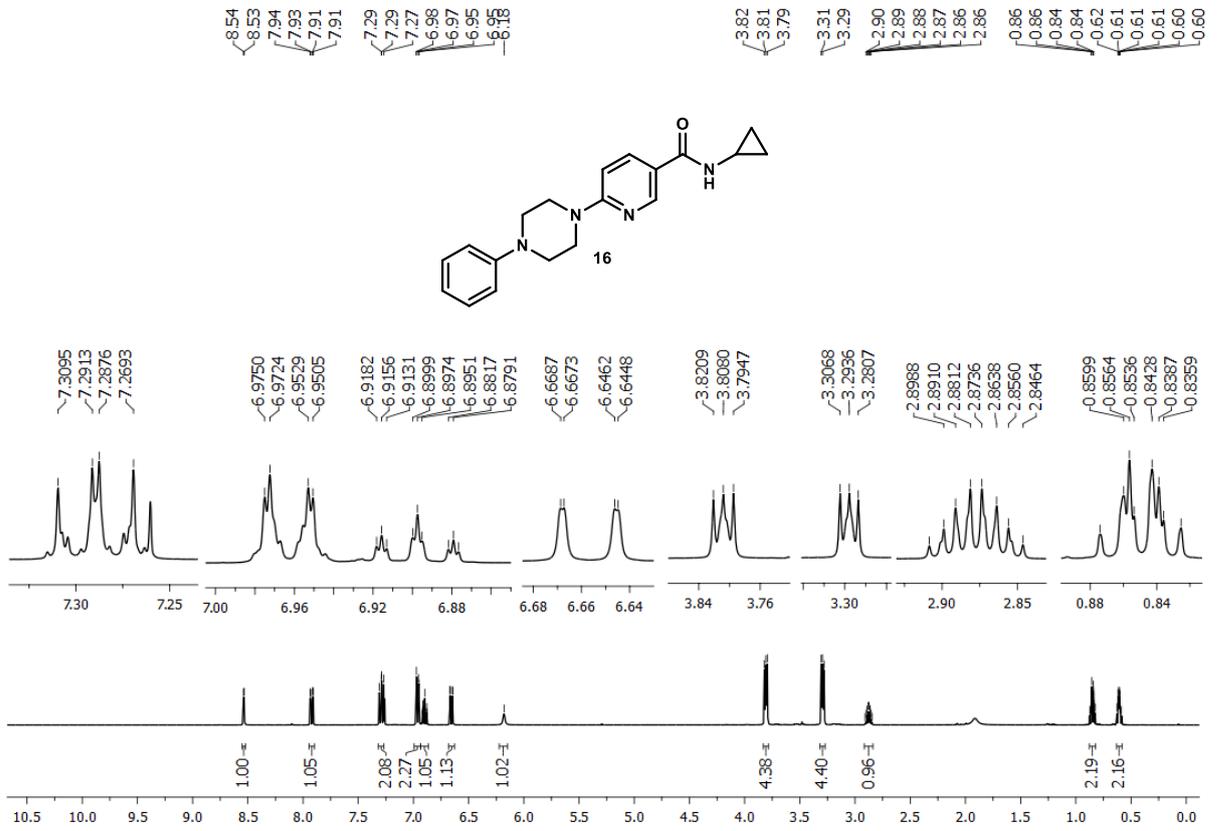
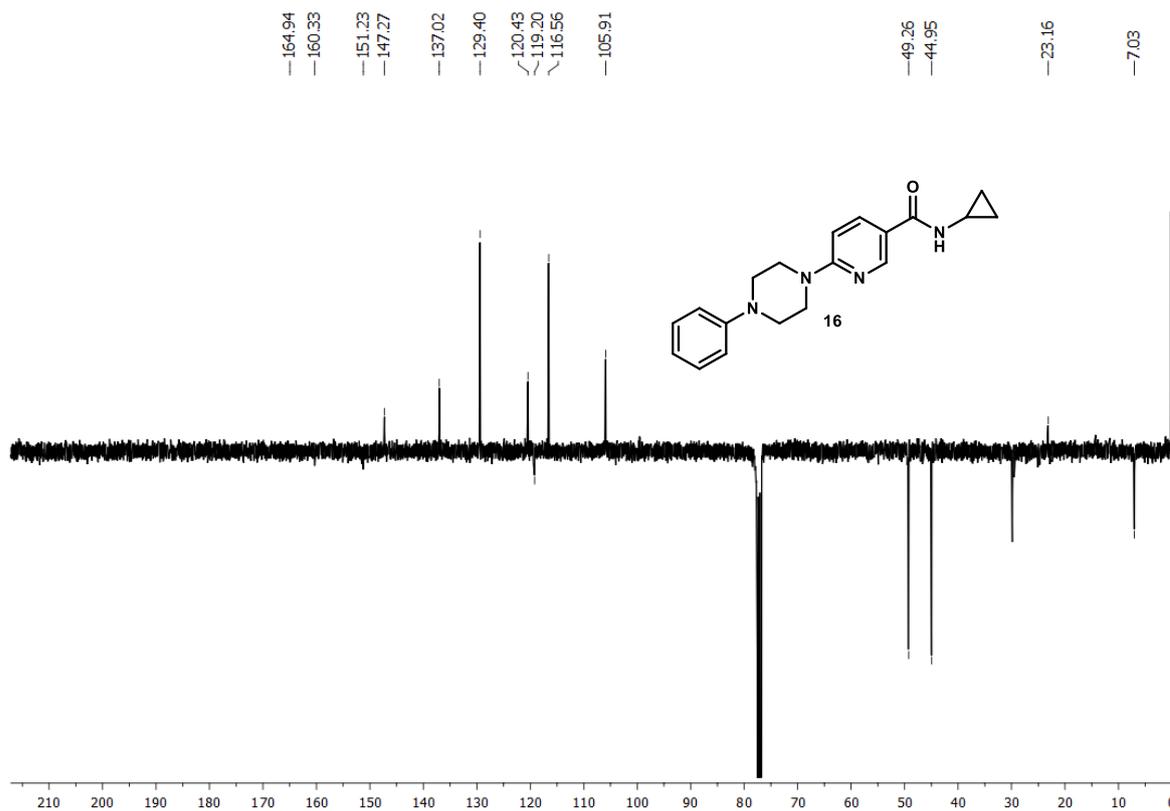
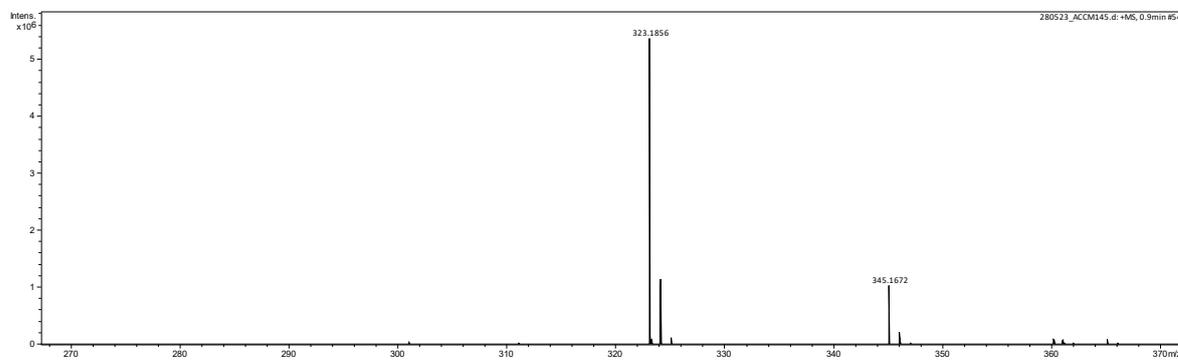


Figura A18 – Espectro de RMN de ^1H de **16** (400 MHz, CDCl_3)

Figura A19 – Espectro de RMN de ^{13}C APT de **16** (101 MHz, CDCl_3)Figura A20 – Espectro de HRMS (ESI+) de **16**

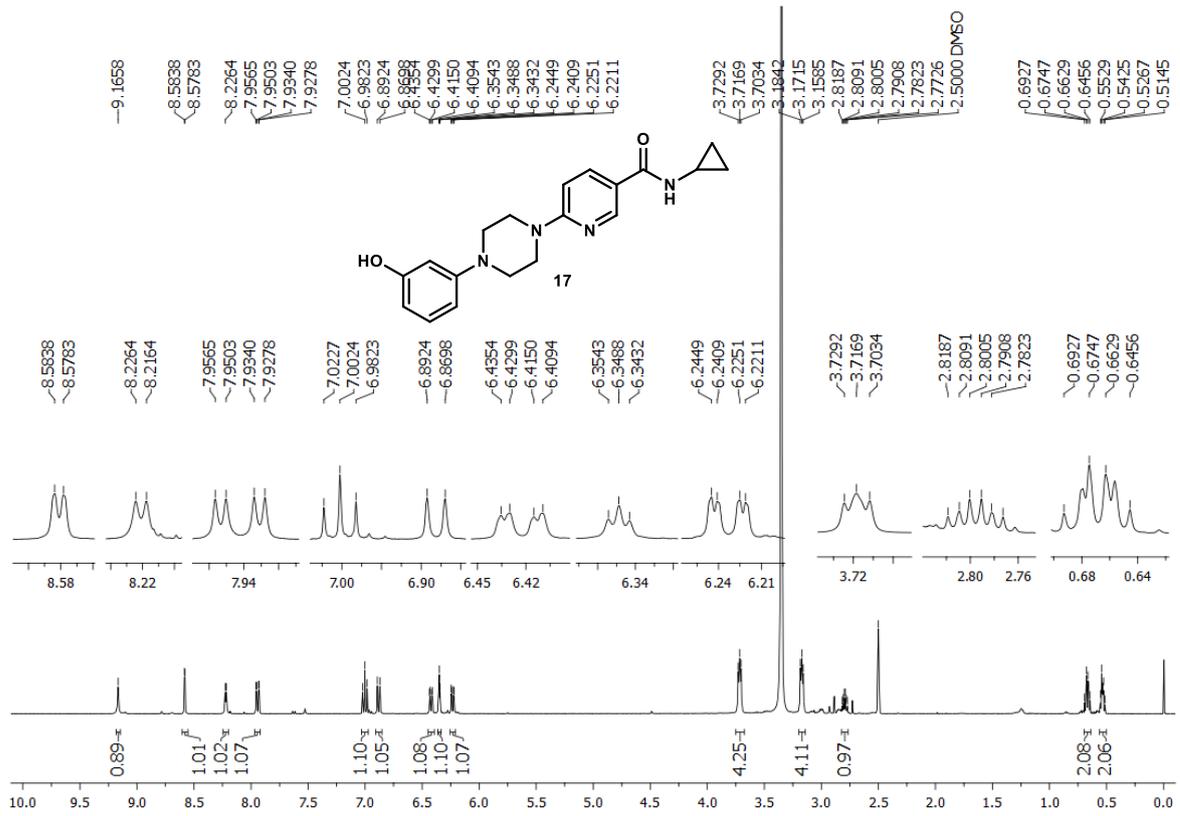


Figura A21 – Espectro de RMN de ¹H de 17 (400 MHz, DMSO-*d*₆)

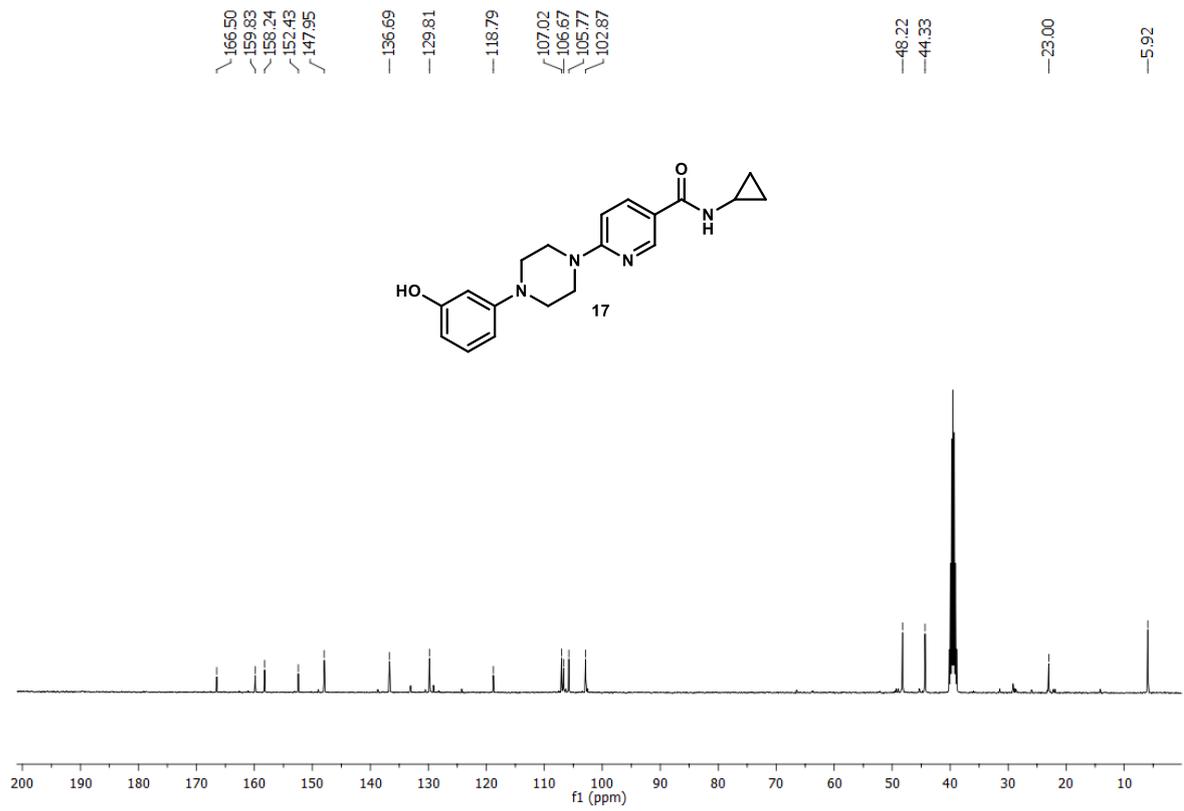


Figura A22 – Espectro de RMN de ^{13}C de **17** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

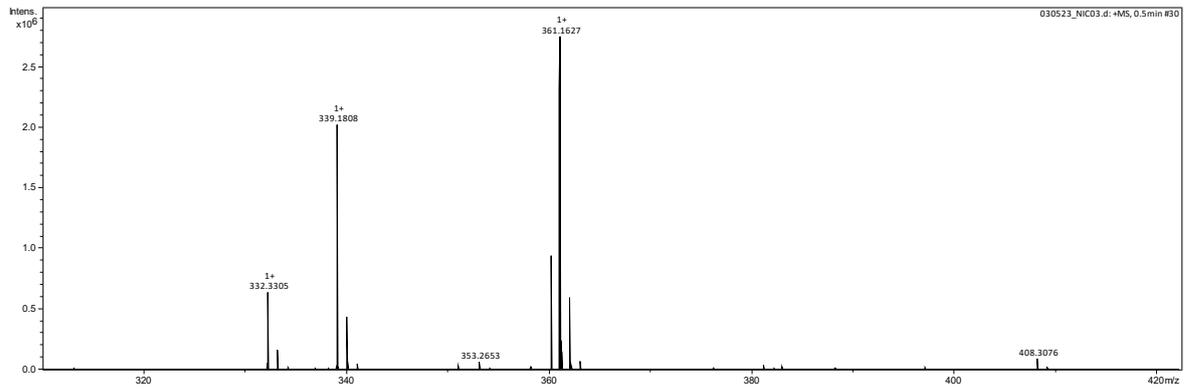


Figura A23 – Espectro de HRMS (ESI+) de **17**

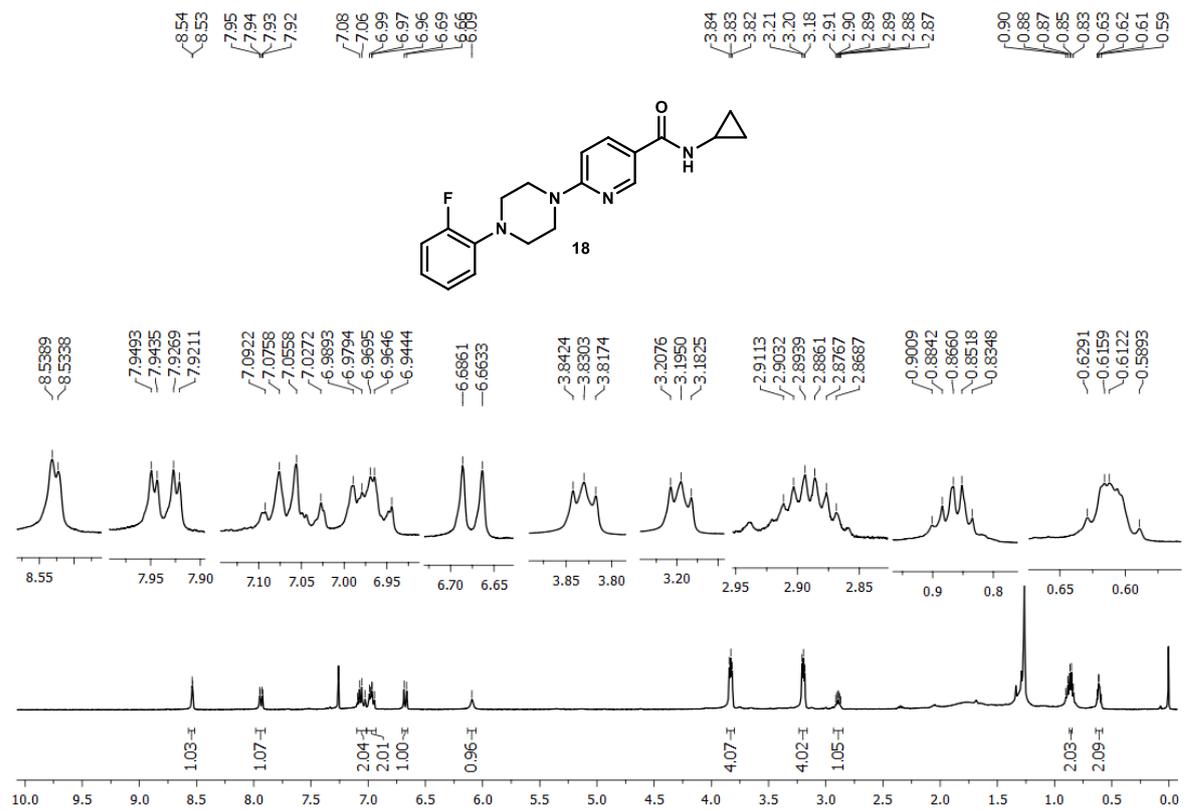


Figura A24 – Espectro de RMN de ^1H de **18** (400 MHz, CDCl_3)

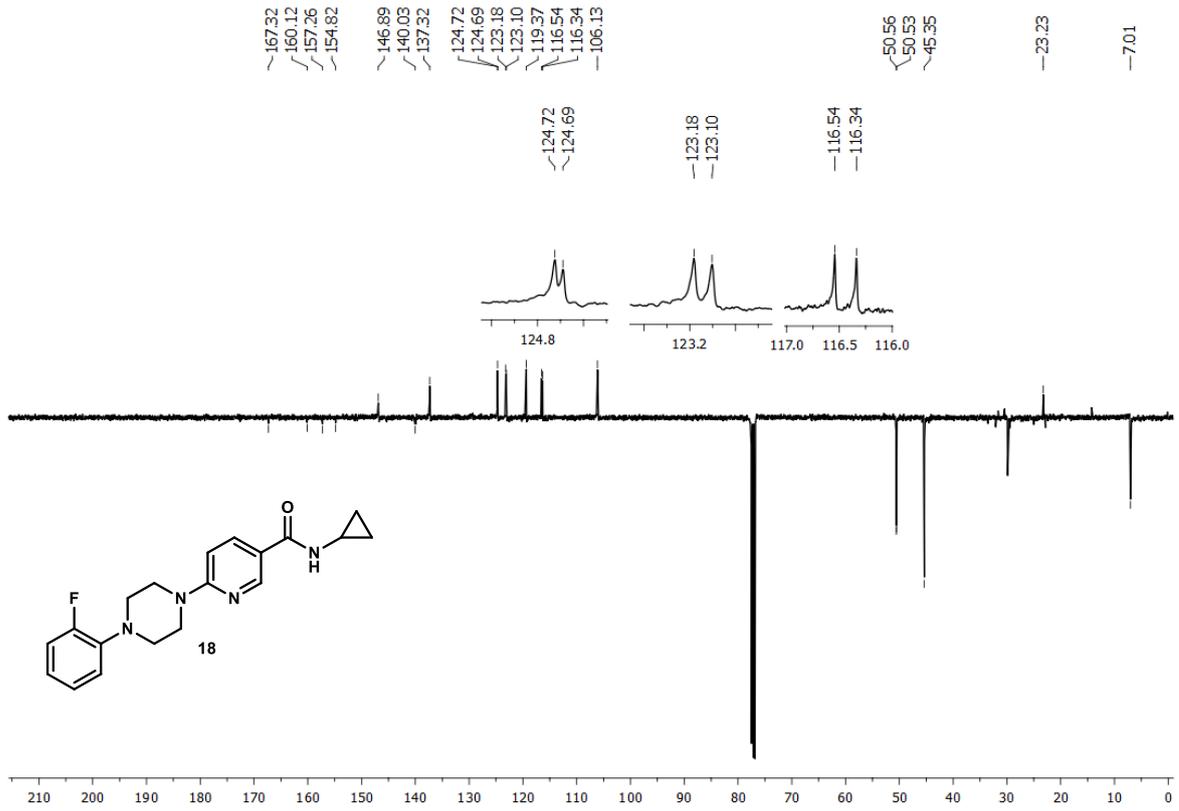


Figura A25 – Espectro de RMN de ^{13}C APT de **18** (101 MHz, CDCl_3)

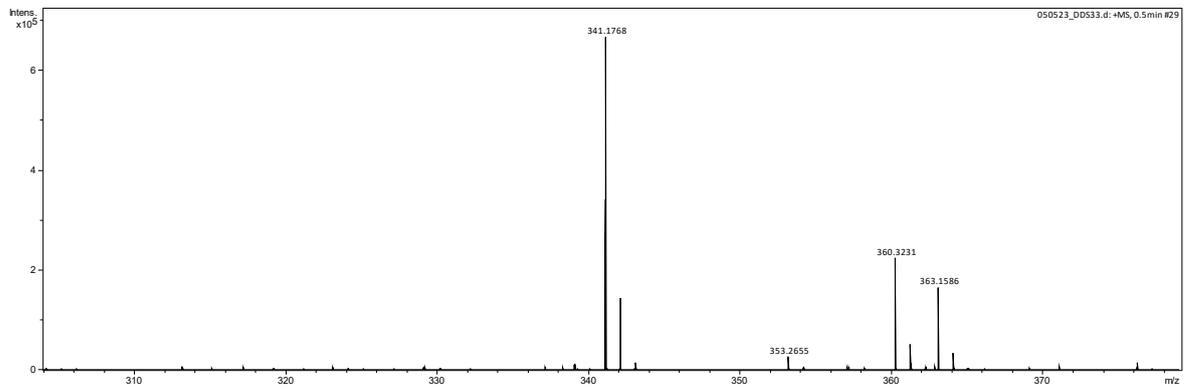
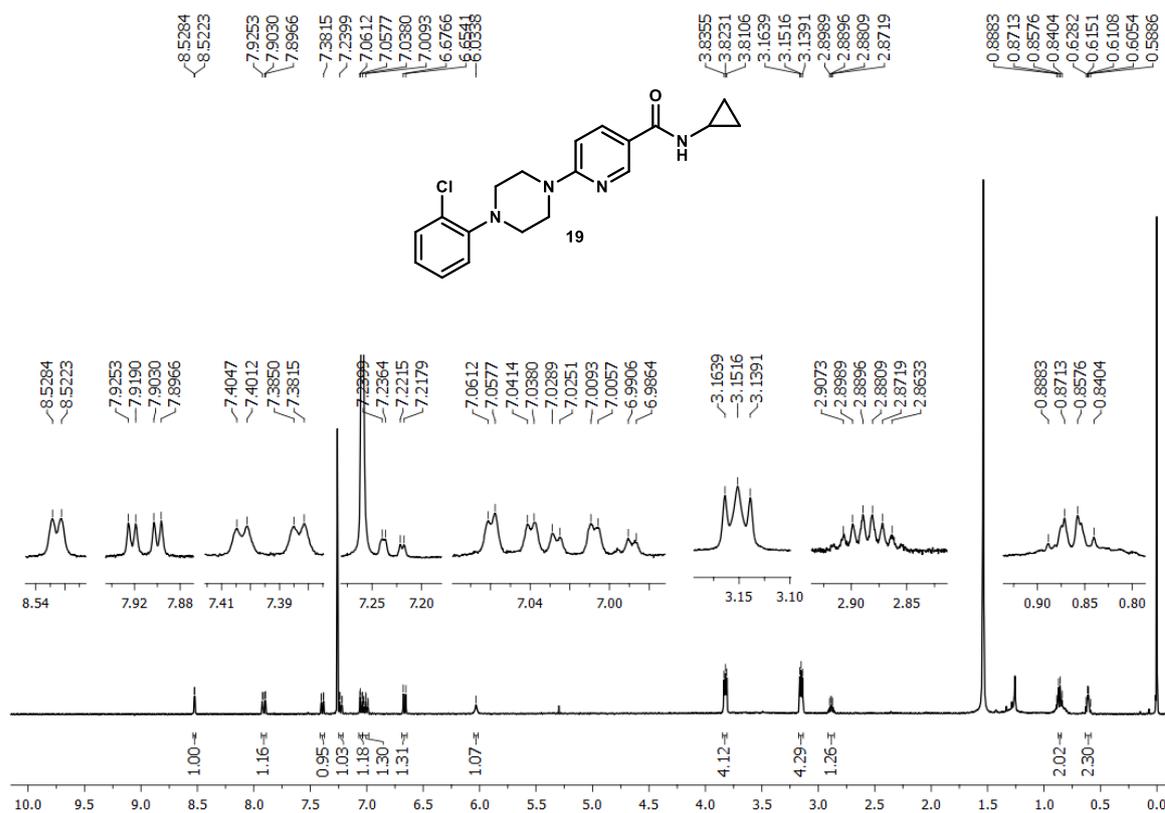
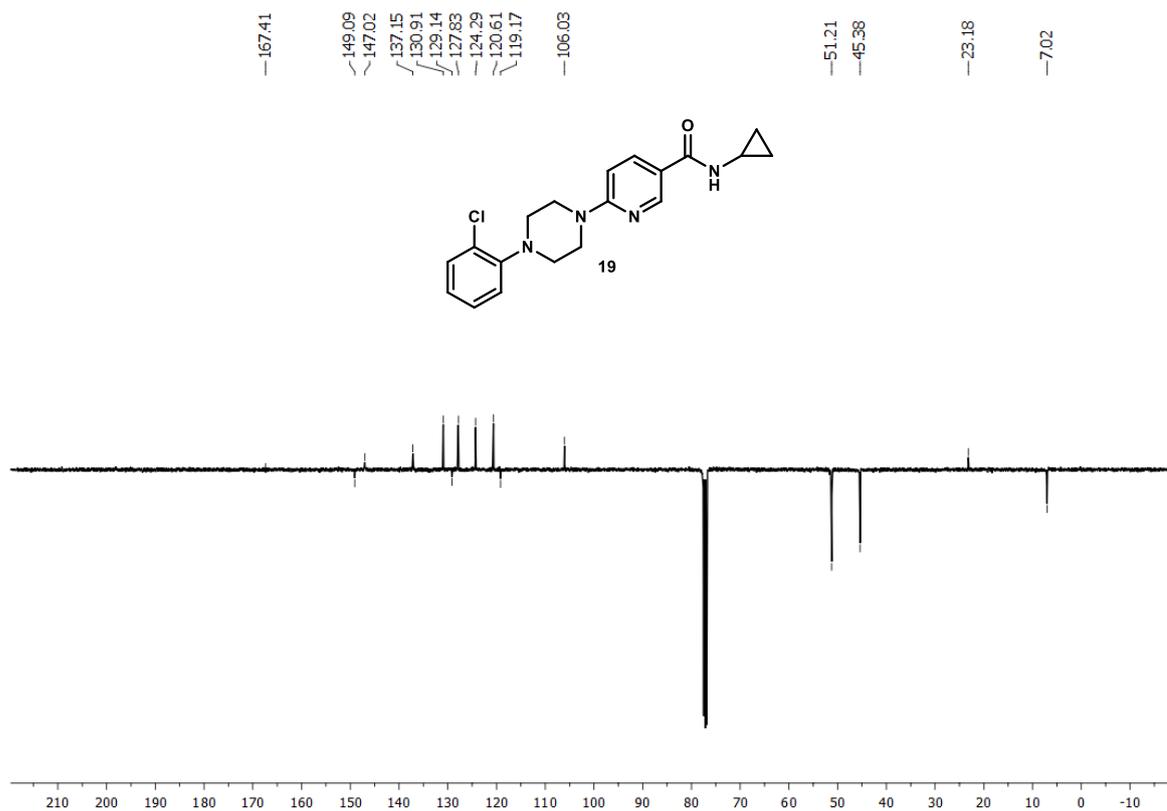
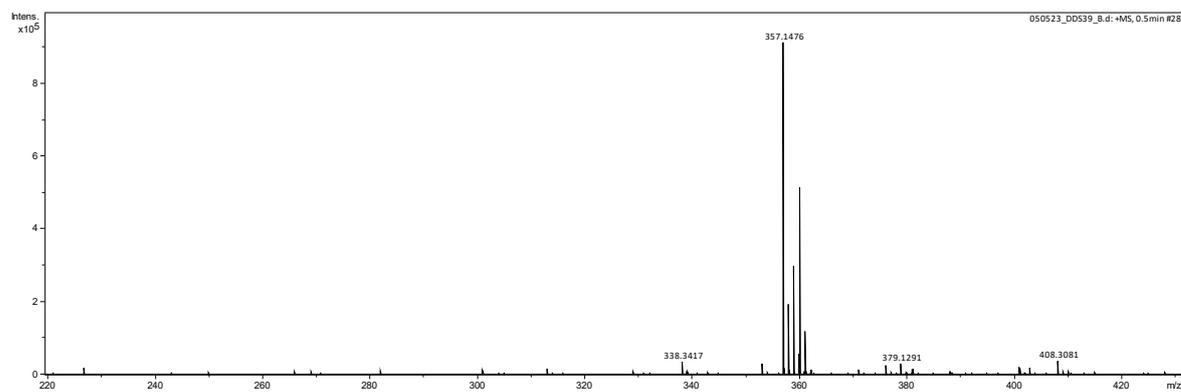


Figura A26 – Espectro de HRMS (ESI+) de **18**

Figura A27 – Espectro de RMN de ¹H de **19** (400 MHz, CDCl₃)

Figura A28 – Espectro de RMN de ¹³C APT de **19** (101 MHz, CDCl₃)Figura A29 – Espectro de HRMS (ESI +) de **19**

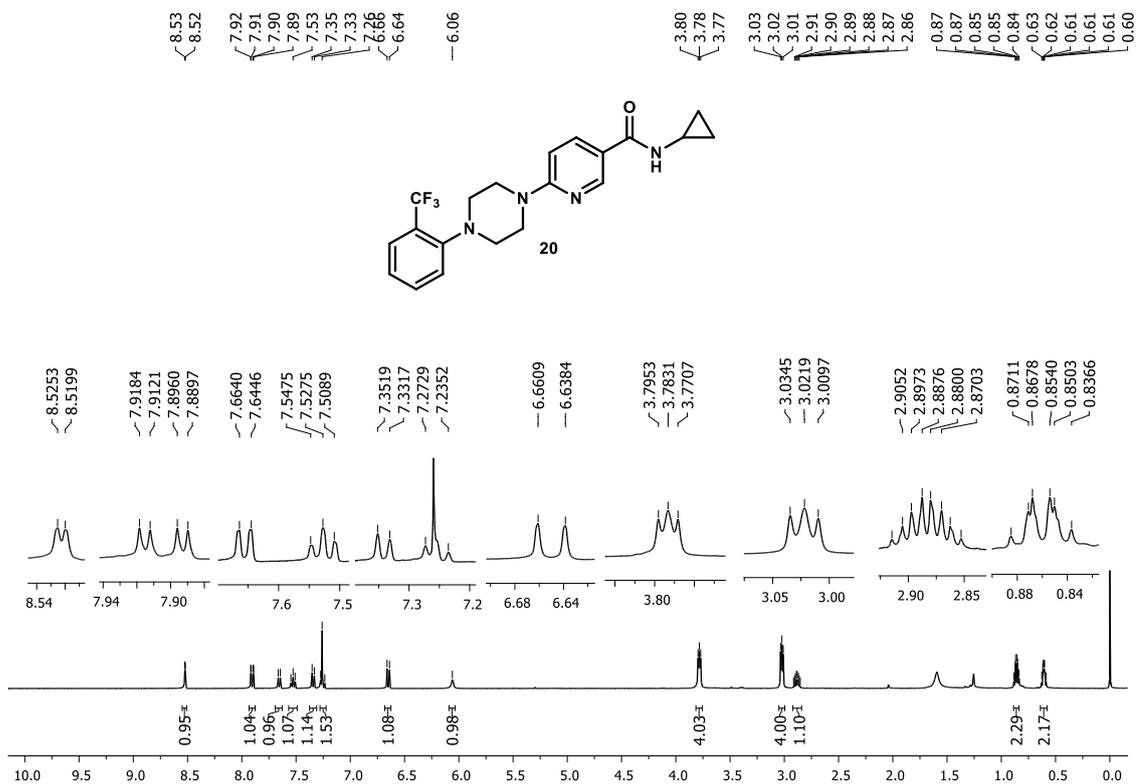


Figura A30 – Espectro de RMN de ^1H de **20** (400 MHz, CDCl_3)

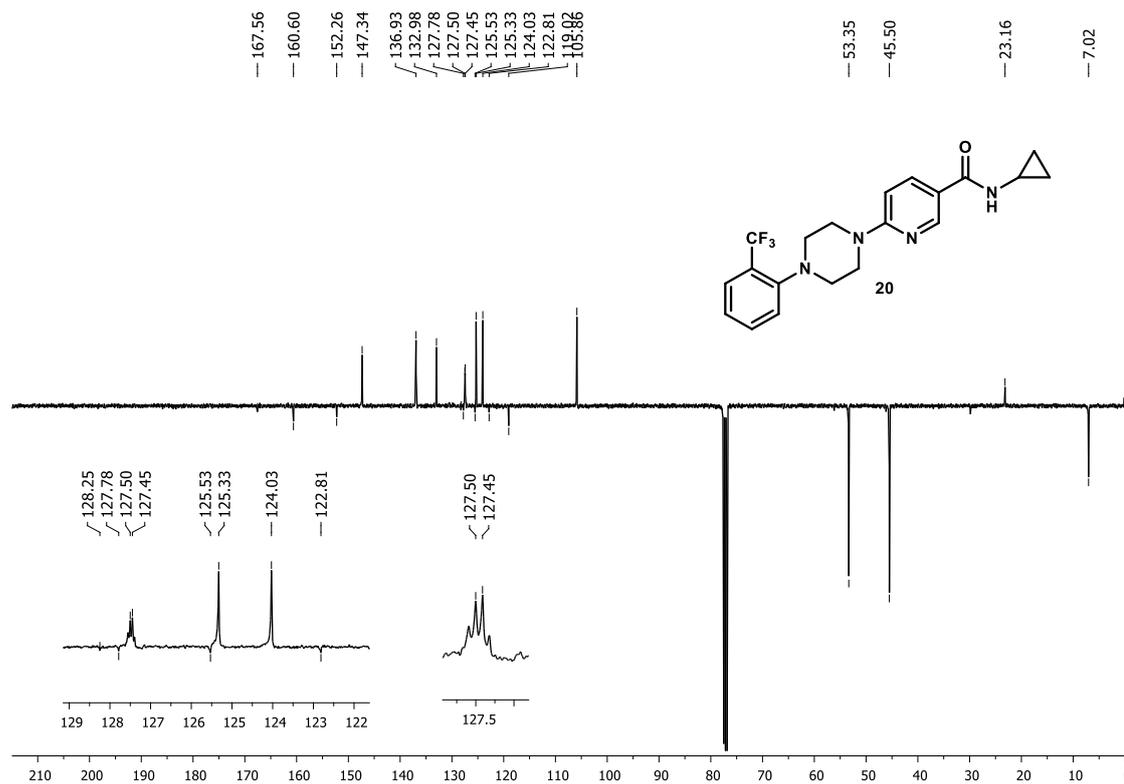


Figura A31 – Espectro de RMN de ^{13}C APT de **20** (101 MHz, CDCl_3)

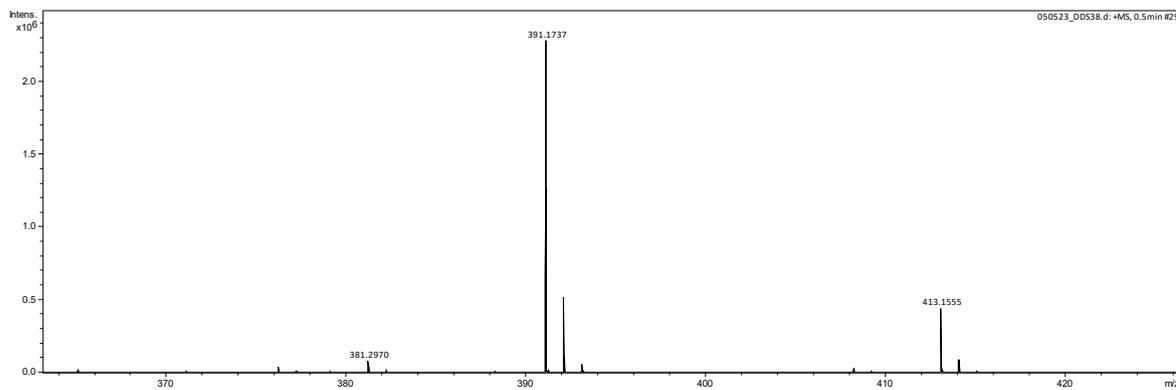


Figura A32 – Espectro de HRMS (ESI+) de **20**

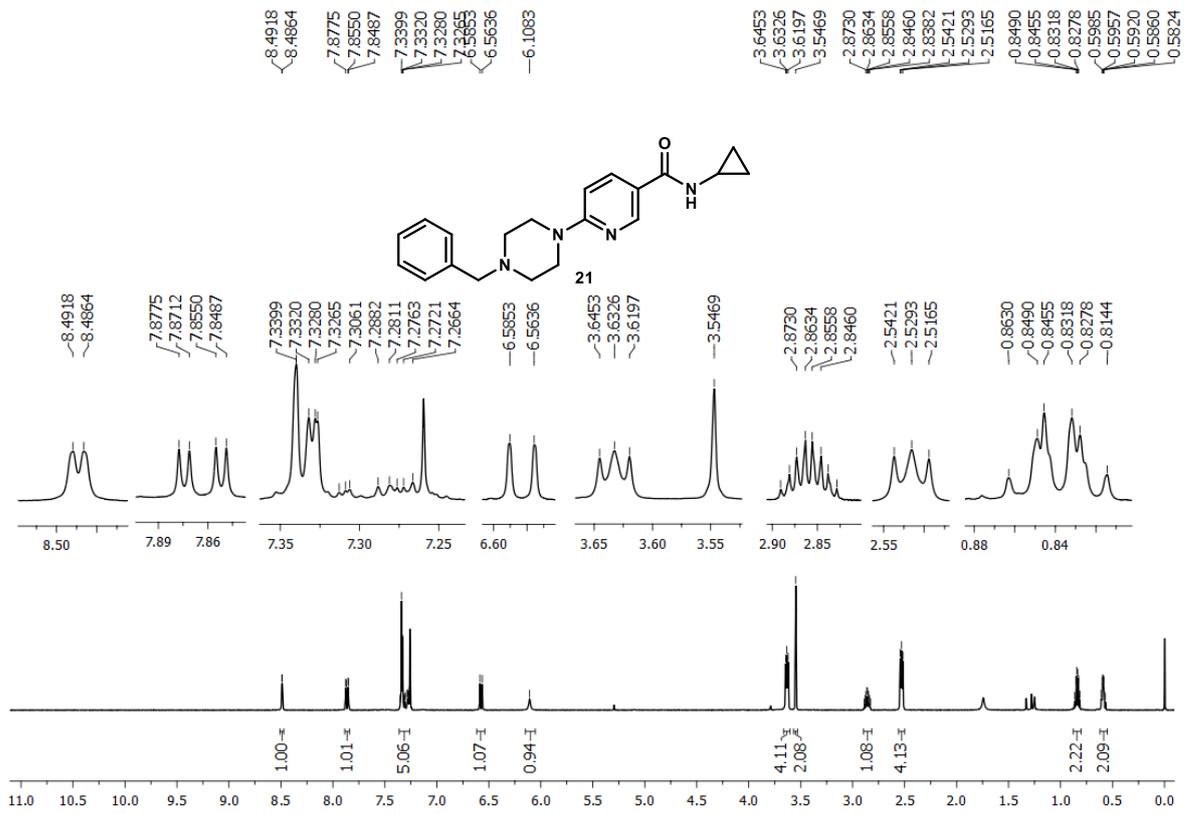


Figura A33 – Espectro de RMN de ^1H de **21** (400 MHz, CDCl_3)

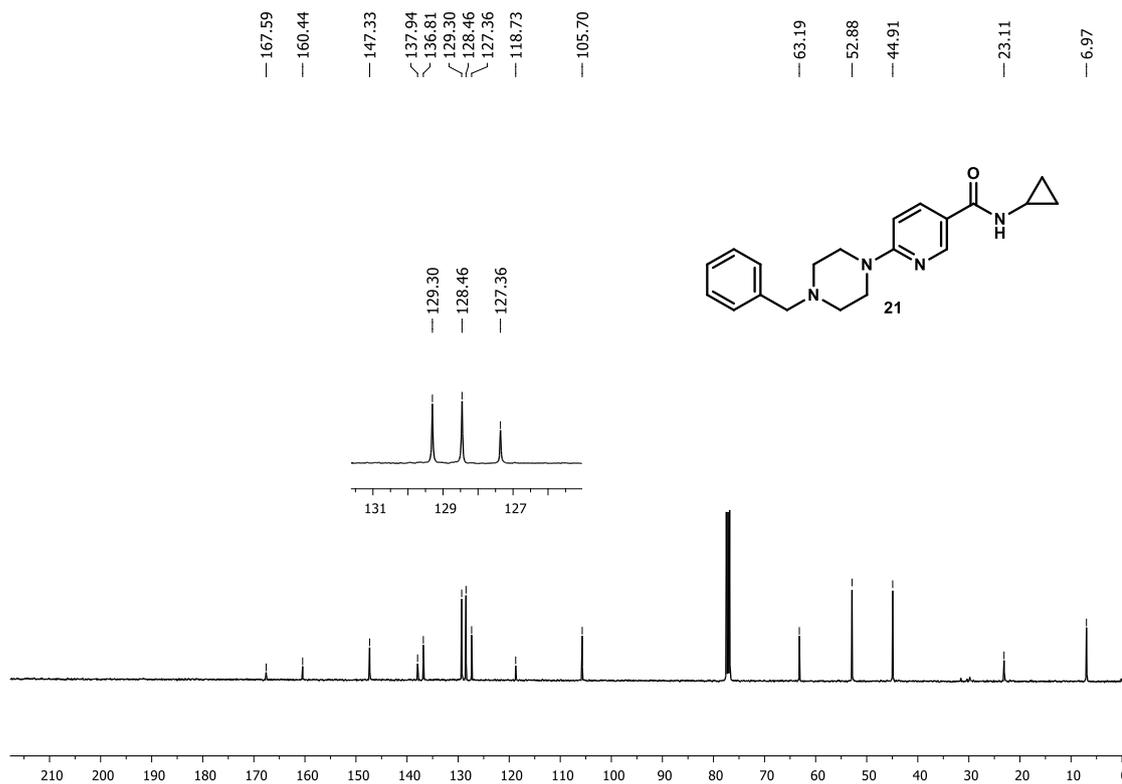


Figura A34 – Espectro de RMN de ¹³C de **21** (101 MHz, CDCl₃)

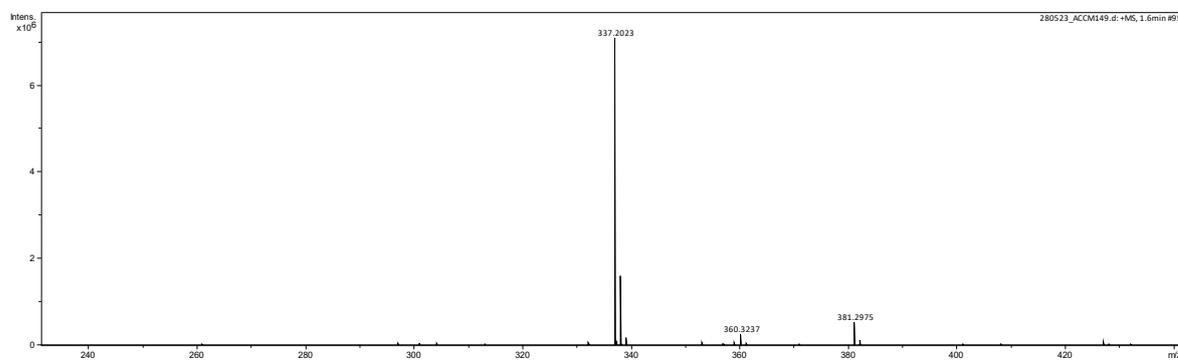


Figura A35 – Espectro de HRMS (ESI +) de **21**

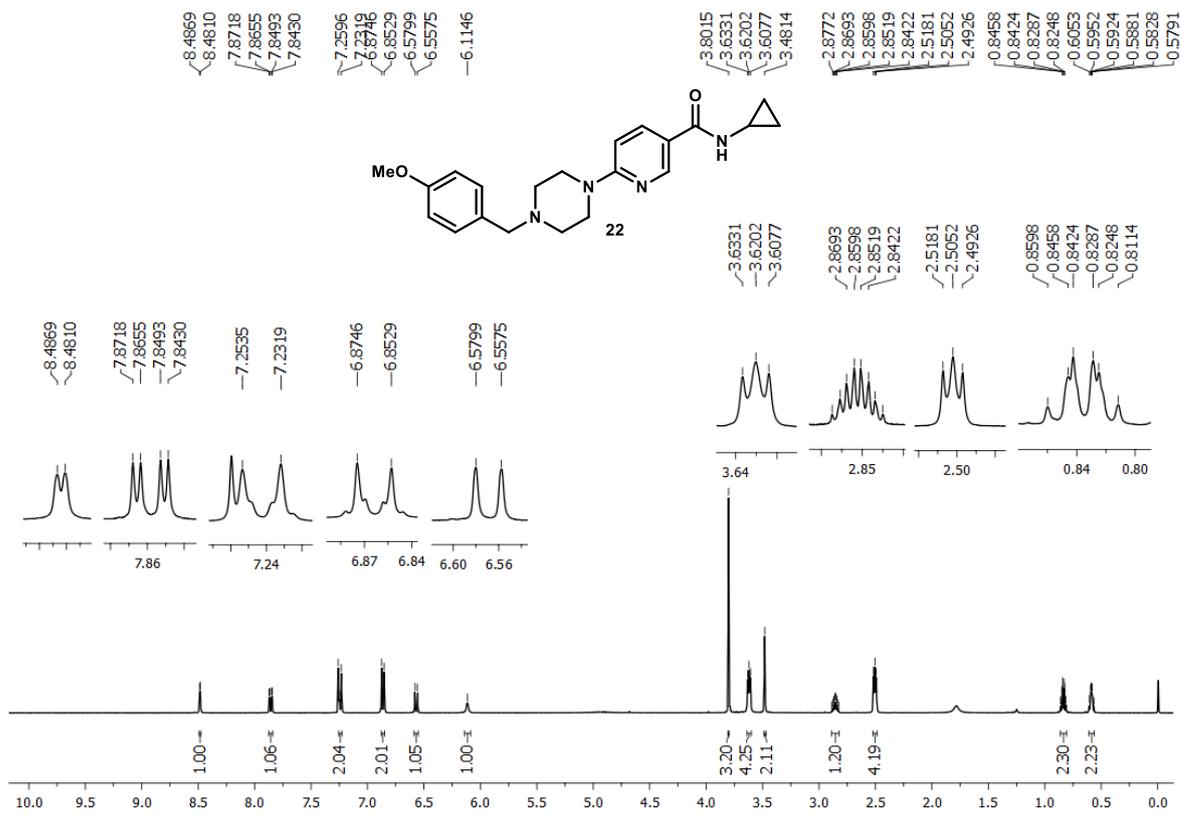
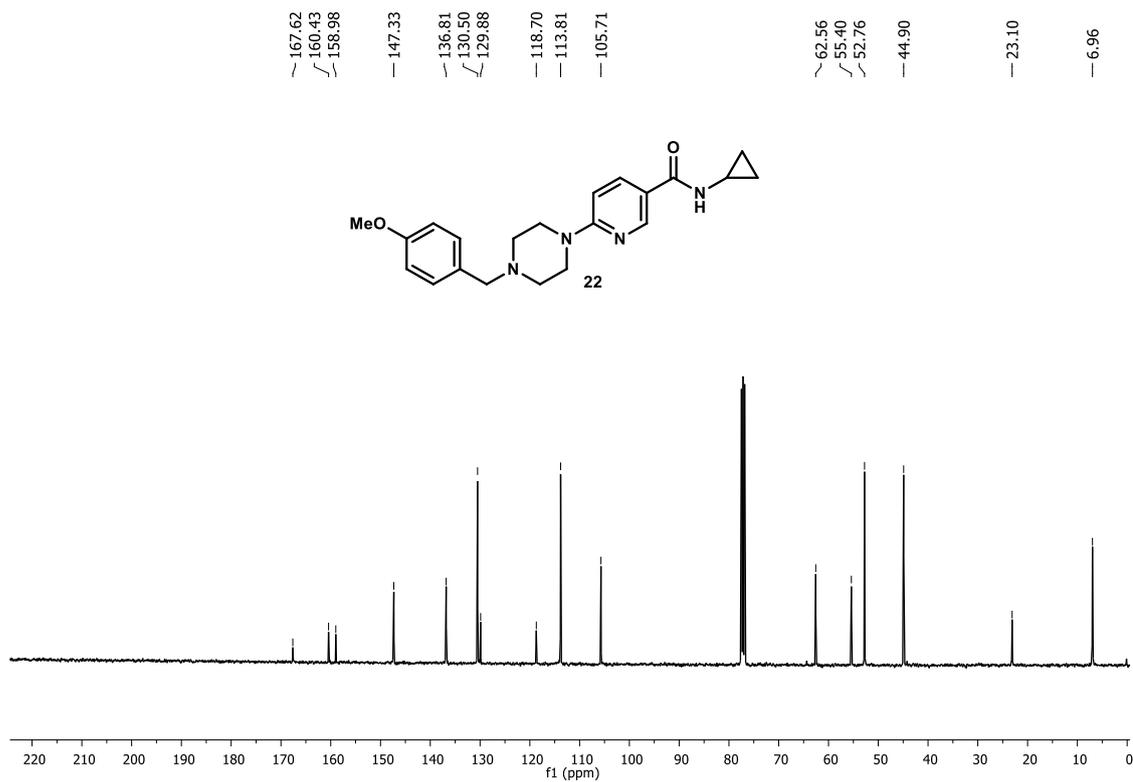
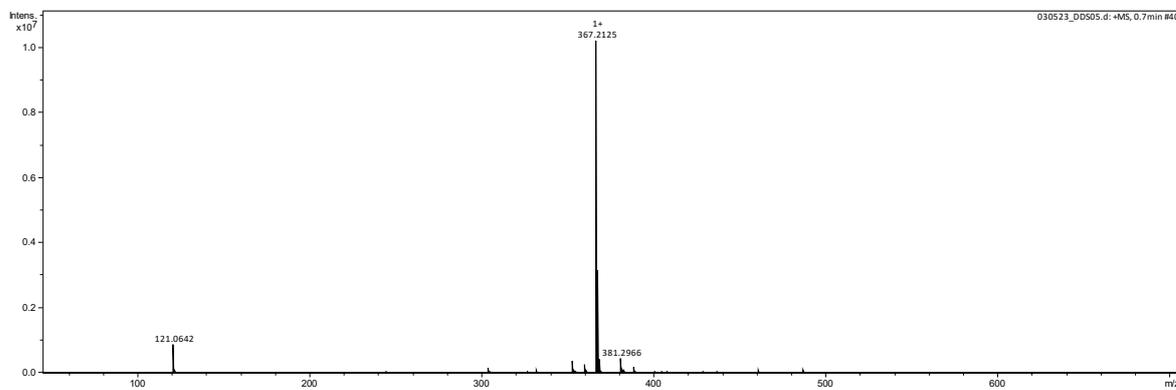
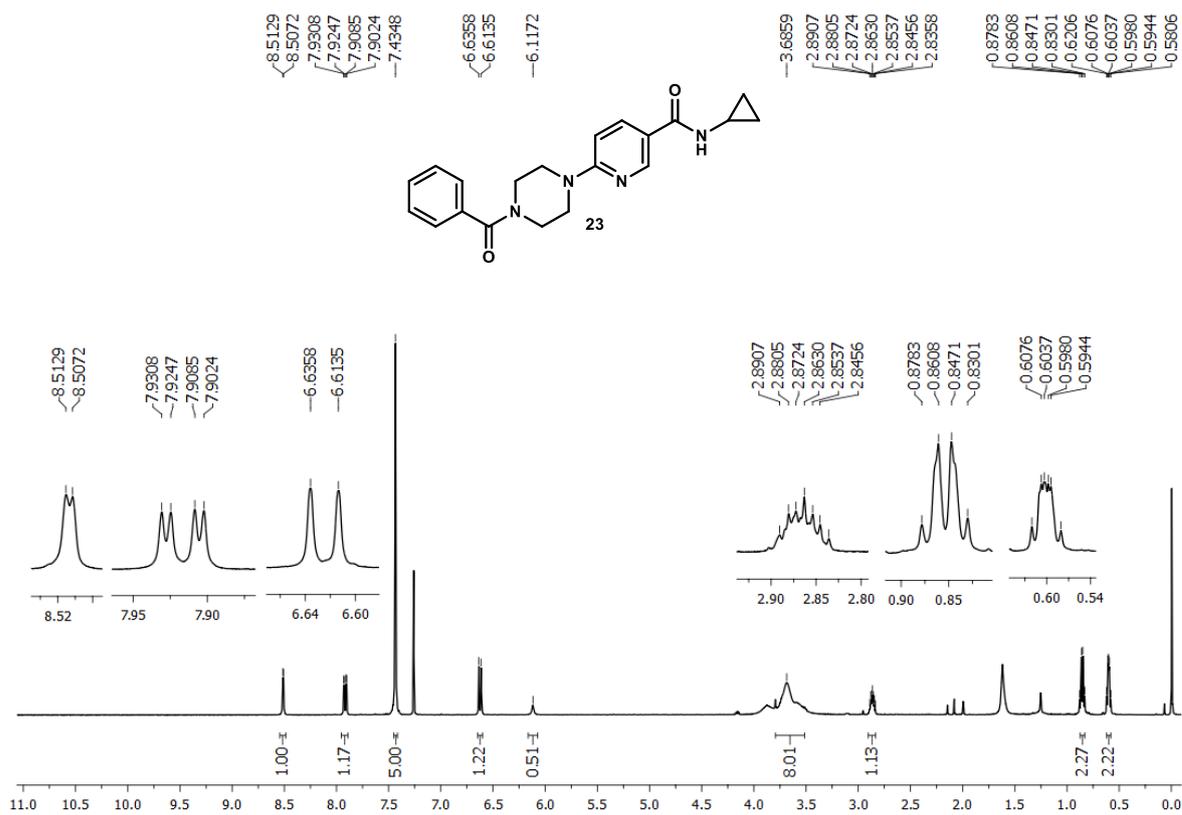


Figura A36 – Espectro de RMN de ¹H de **22** (400 MHz, CDCl₃)

Figura A37 – Espectro de RMN de ^{13}C de **22** (101 MHz, CDCl_3)Figura A38 – Espectro de HRMS (ESI+) de **22**

Figura A39 – Espectro de RMN de ^1H de **23** (400 MHz, CDCl_3)

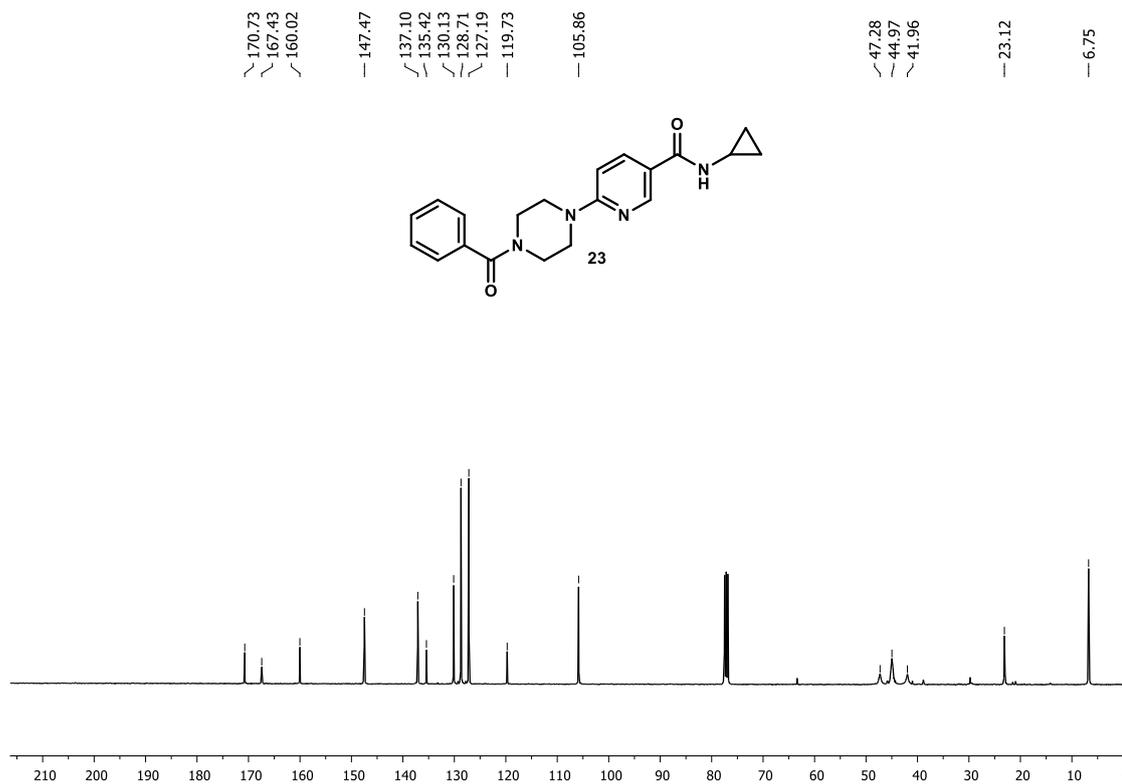


Figura A40 – Espectro de RMN de ^{13}C de **23** (101 MHz, CDCl_3)

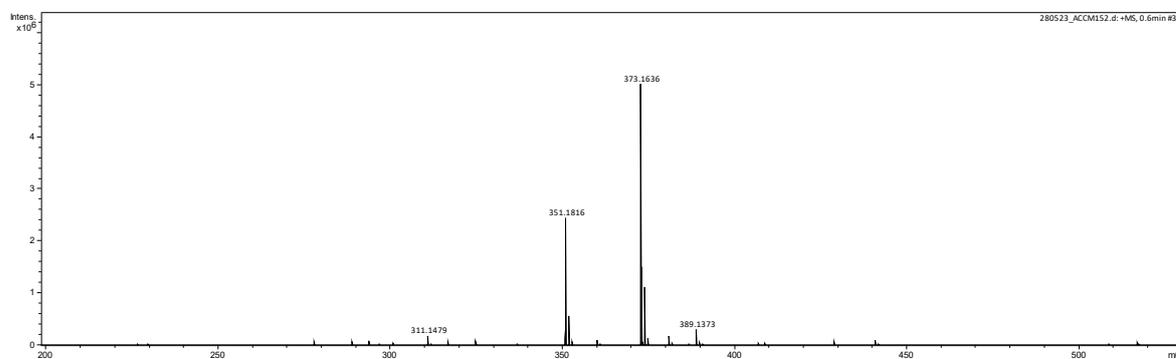
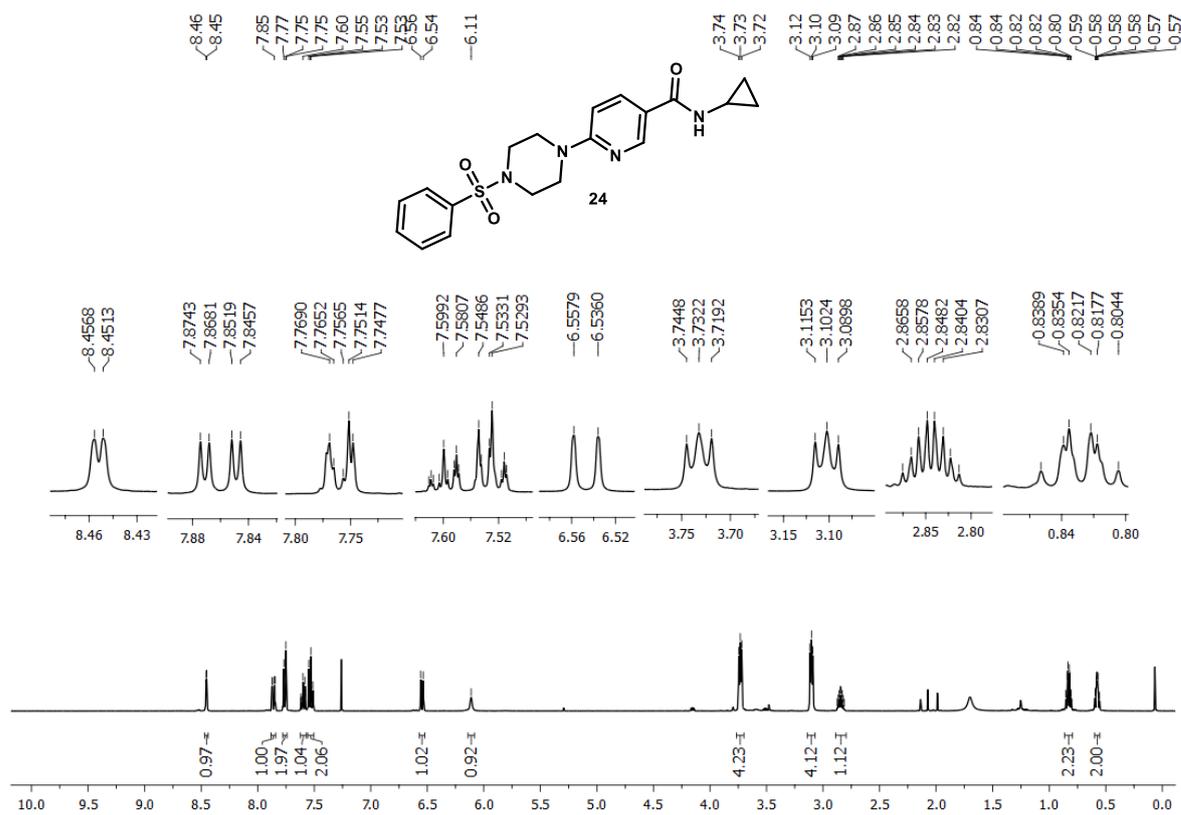
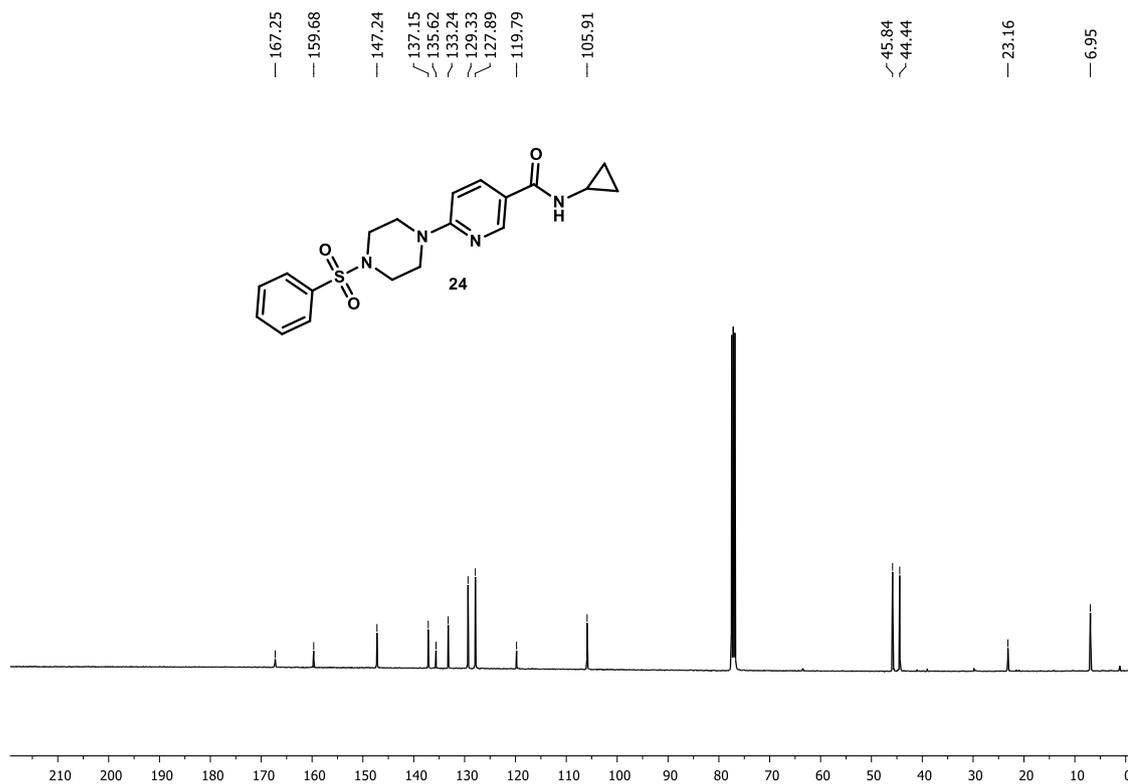
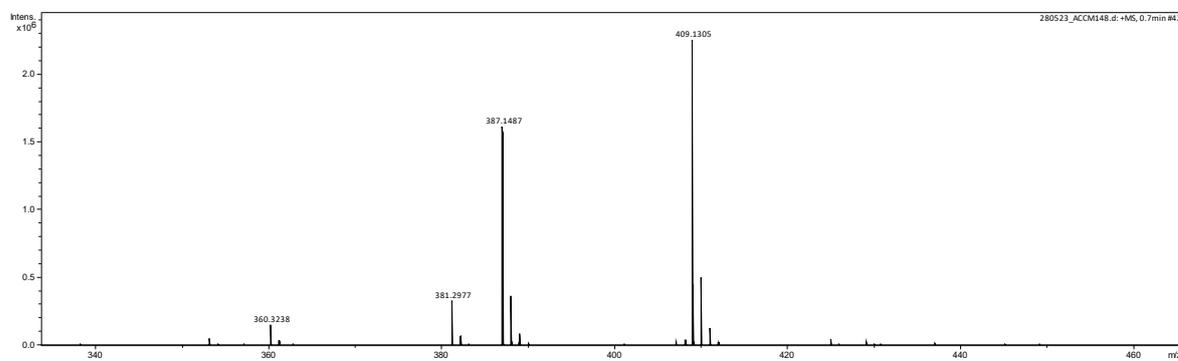


Figura A41 – Espectro de HRMS (ESI +) de **23**

Figura A42 – Espectro de RMN de ¹H de **24** (400 MHz, CDCl₃)

Figura A43 – Espectro de RMN de ^{13}C de **24** (101 MHz, CDCl_3)Figura A44 – Espectro de HRMS (ESI+) de **24**

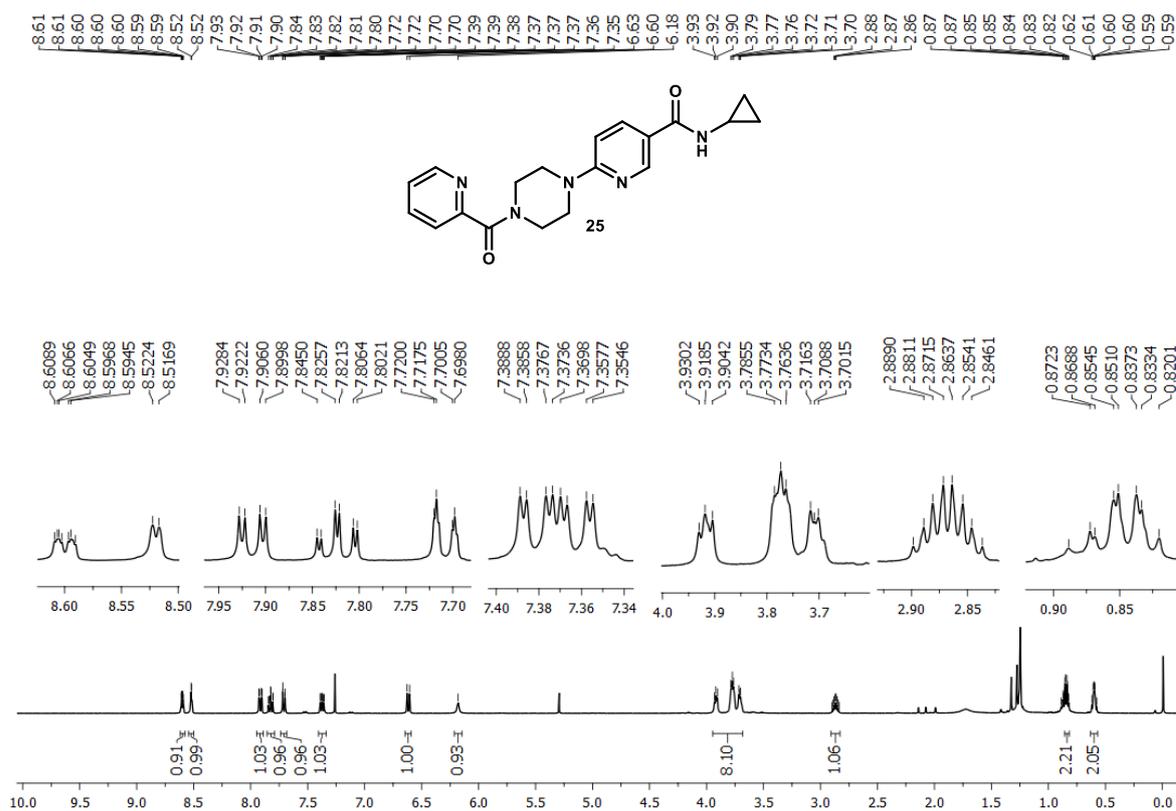
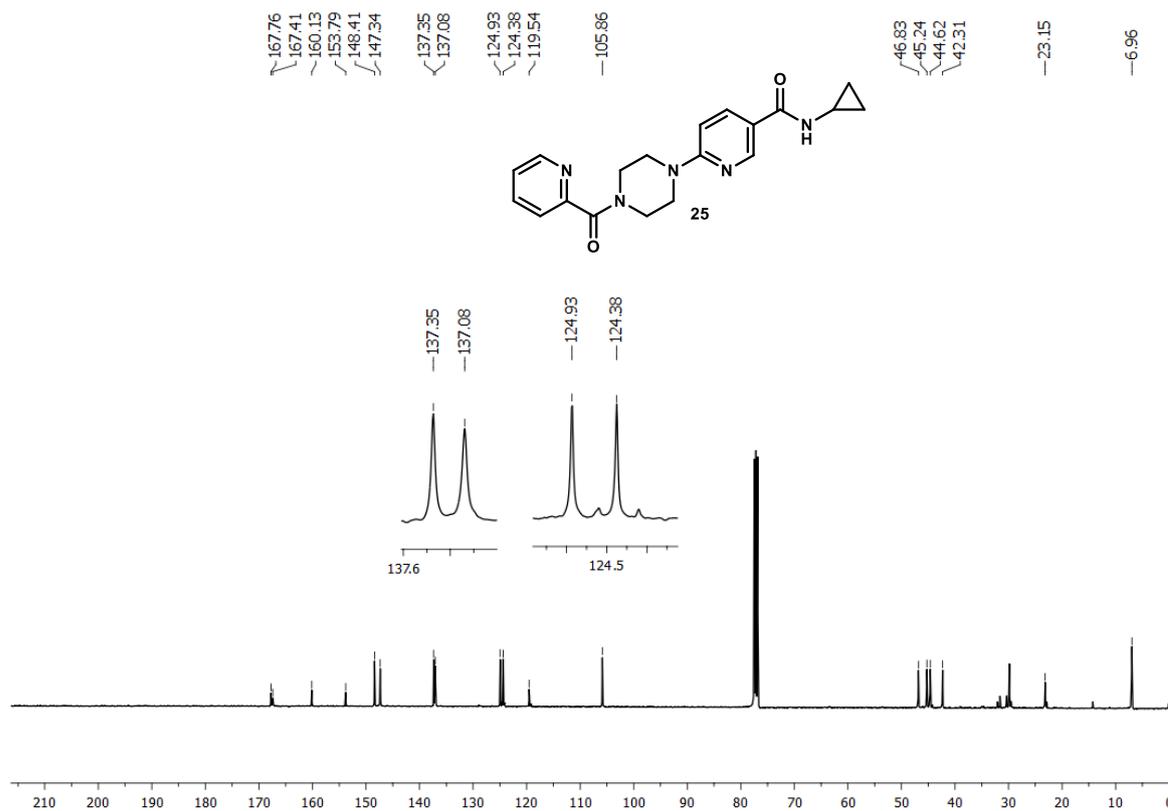
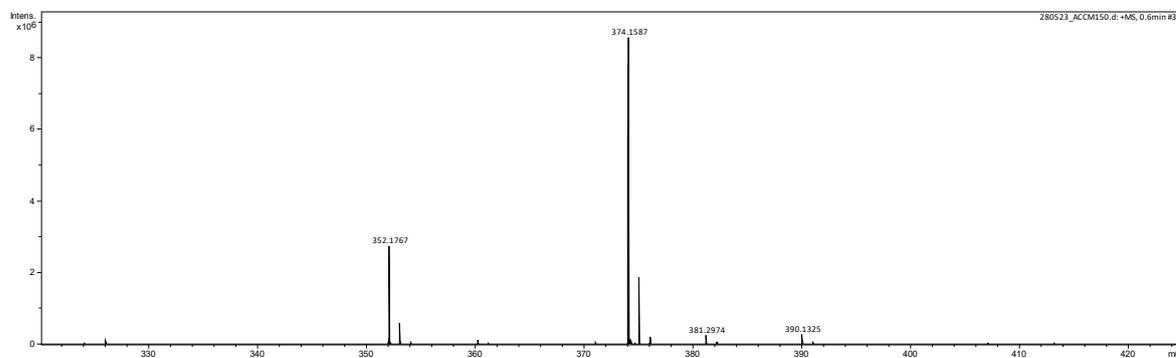
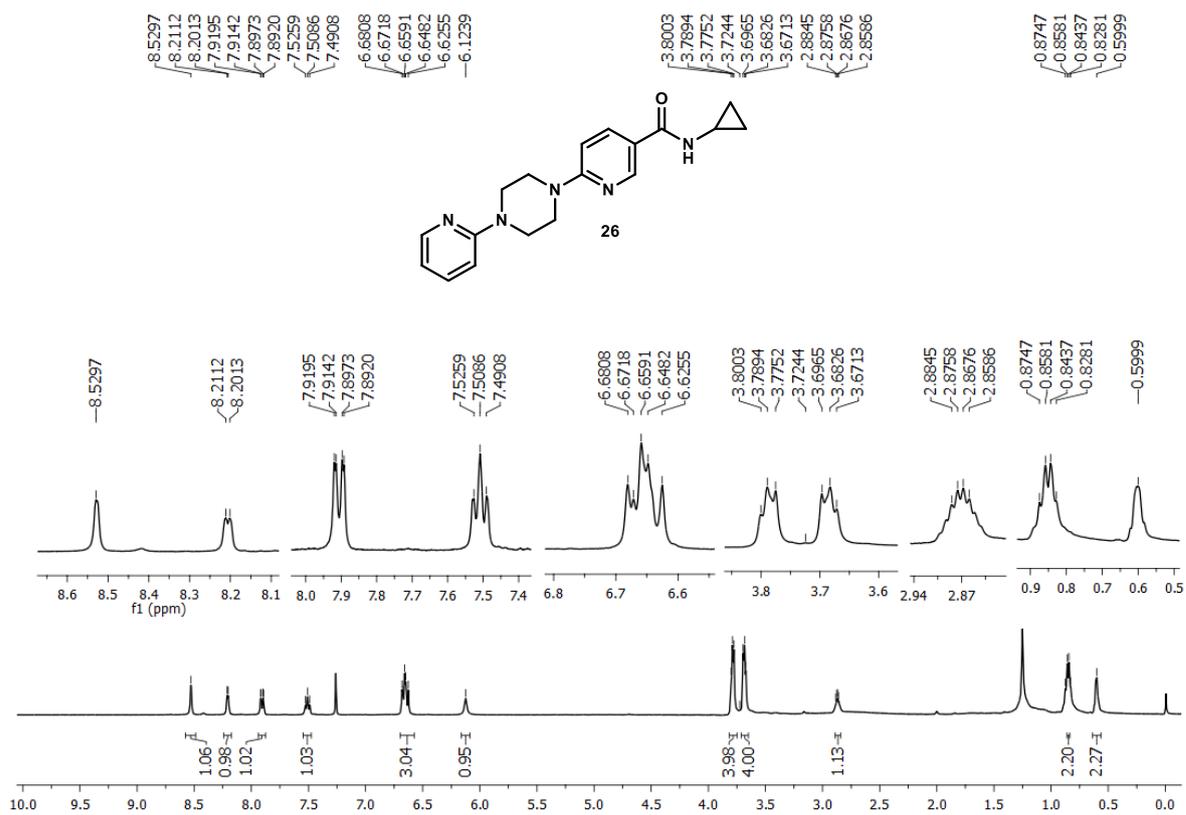


Figura A45 – Espectro de RMN de ^1H de **25** (400 MHz, CDCl_3)

Figura A46 – Espectro de RMN de ^{13}C de **25** (101 MHz, CDCl_3)Figura A47 – Espectro de HRMS (ESI+) de **25**

Figura A48 – Espectro de RMN de ¹H de **26** (400 MHz, CDCl₃)

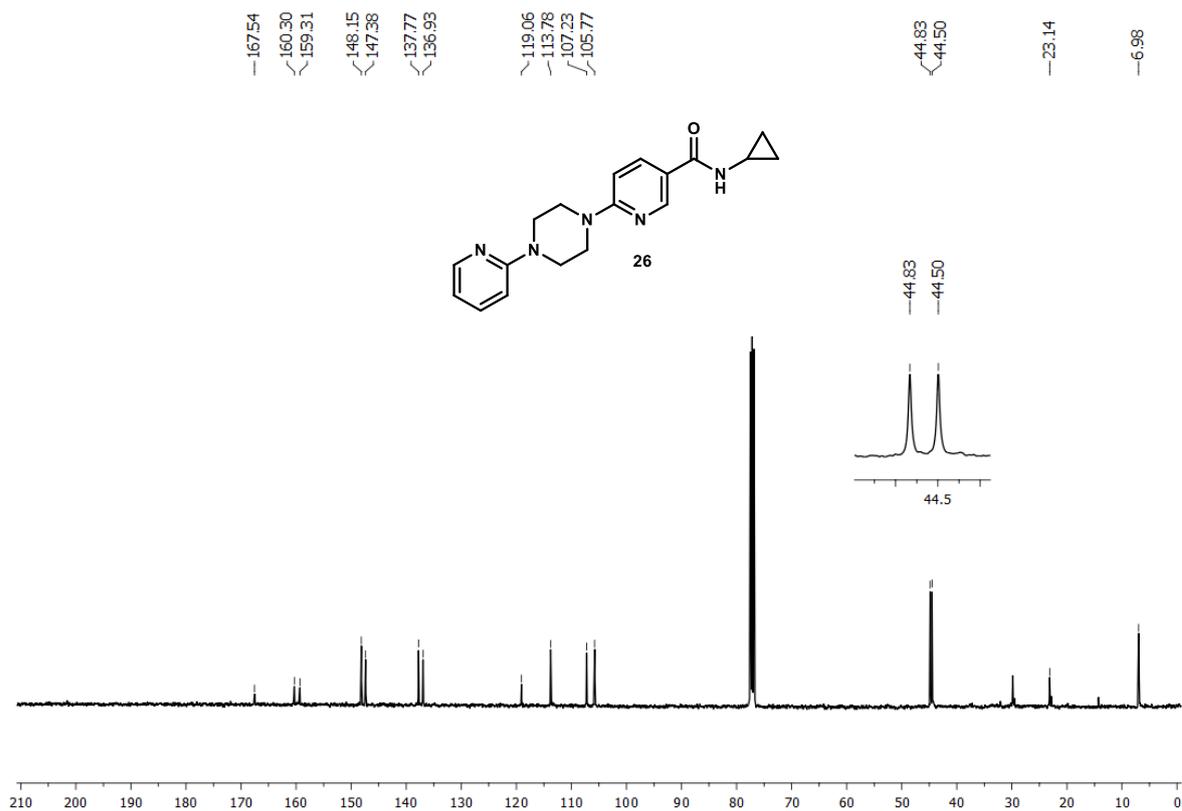


Figura A49 – Espectro de RMN de ^{13}C de **26** (101 MHz, CDCl_3)

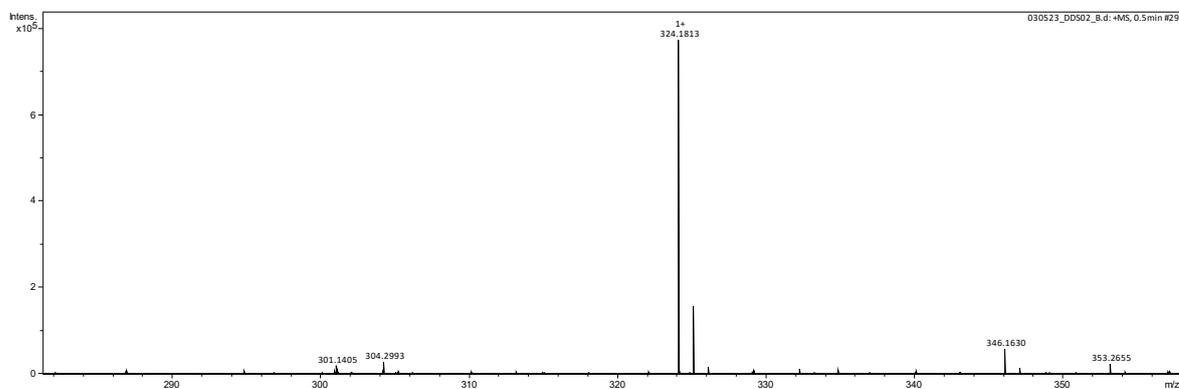


Figura A50 – Espectro de HRMS (ESI+) de **26**

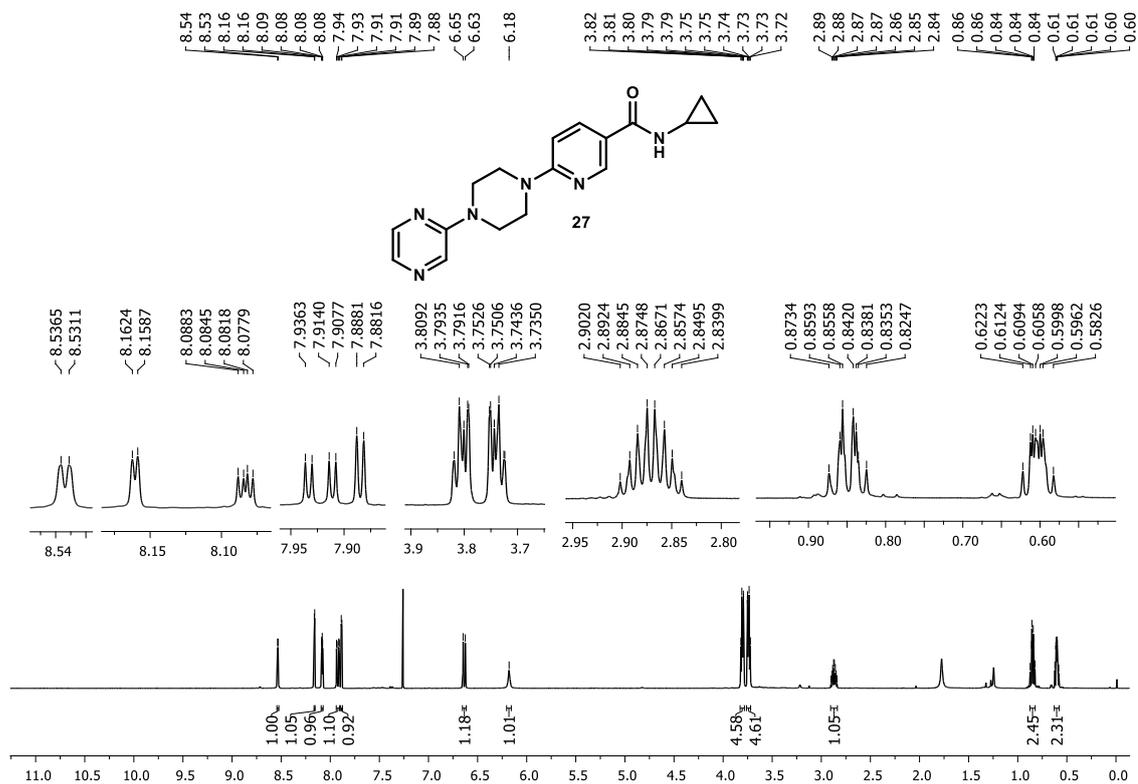


Figura A51 – Espectro de RMN de ^1H de **27** (400 MHz, CDCl_3)

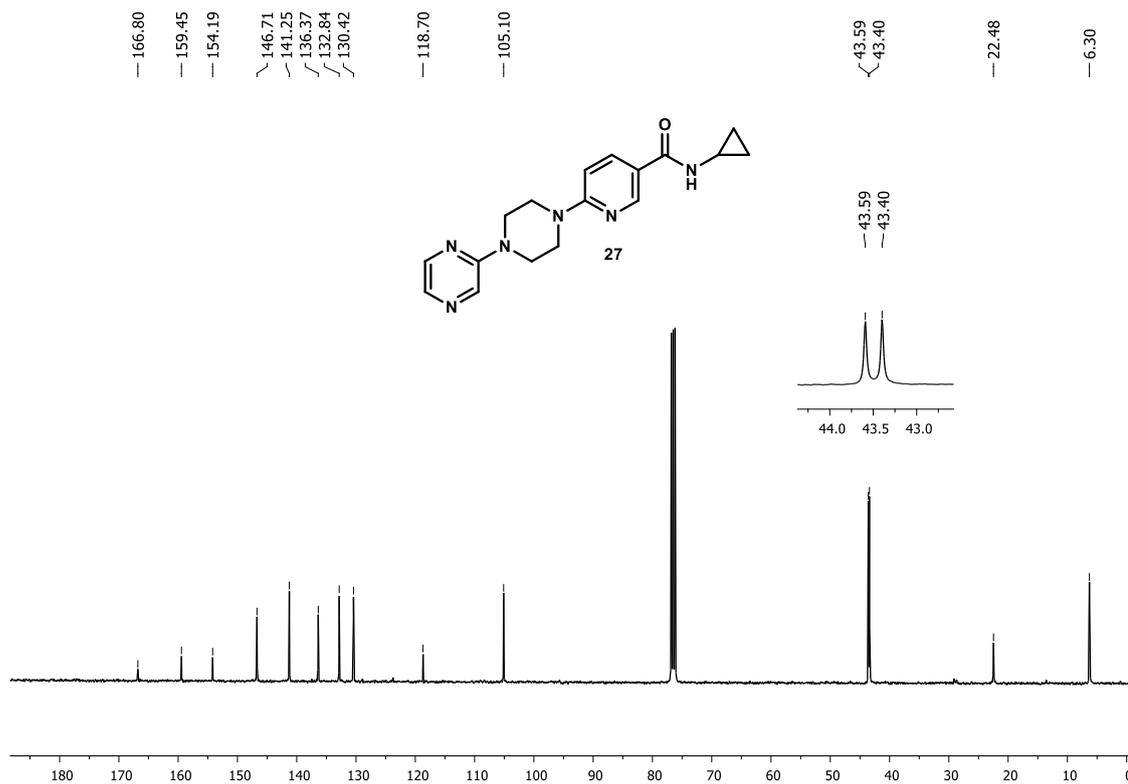


Figura A52 – Espectro de RMN de ^{13}C de **27** (101 MHz, CDCl_3)

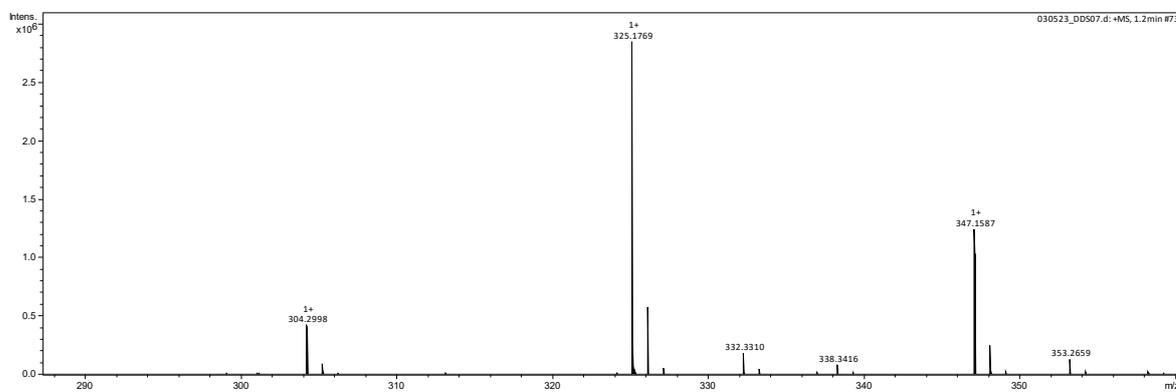


Figura A53 – Espectro de HRMS (ESI+) de **27**

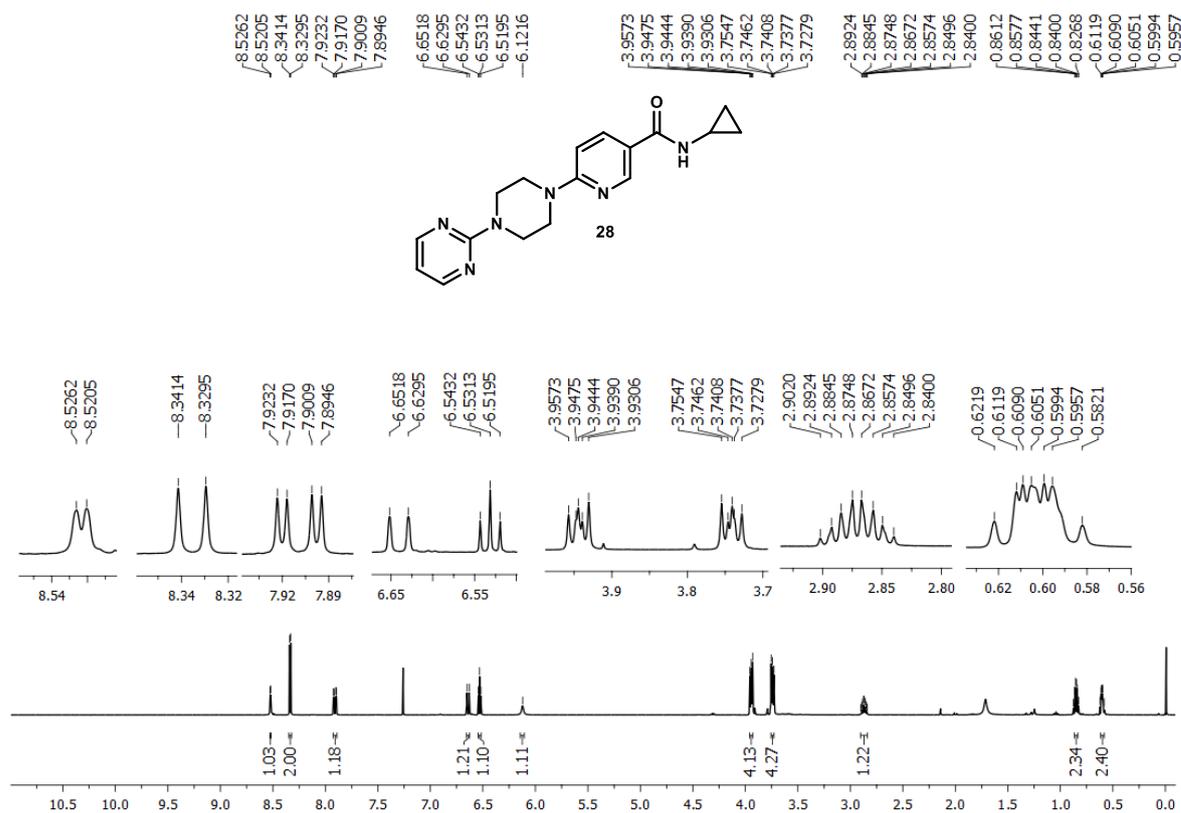
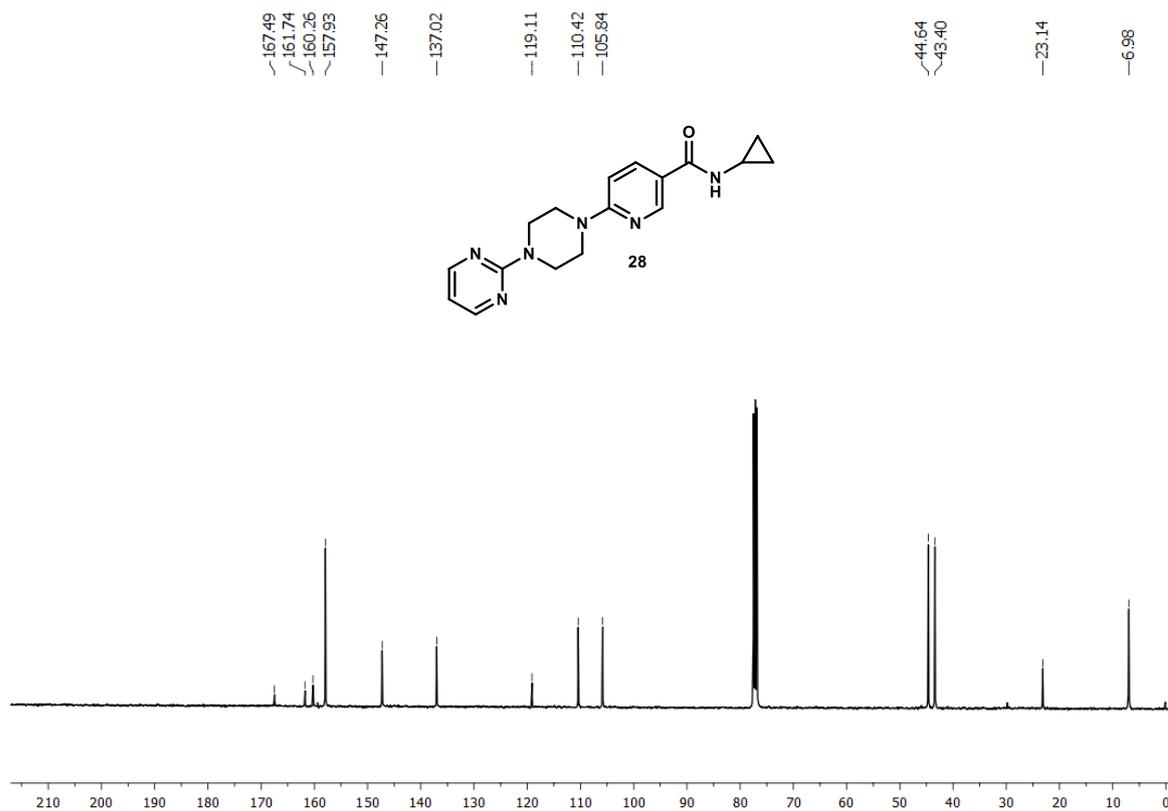
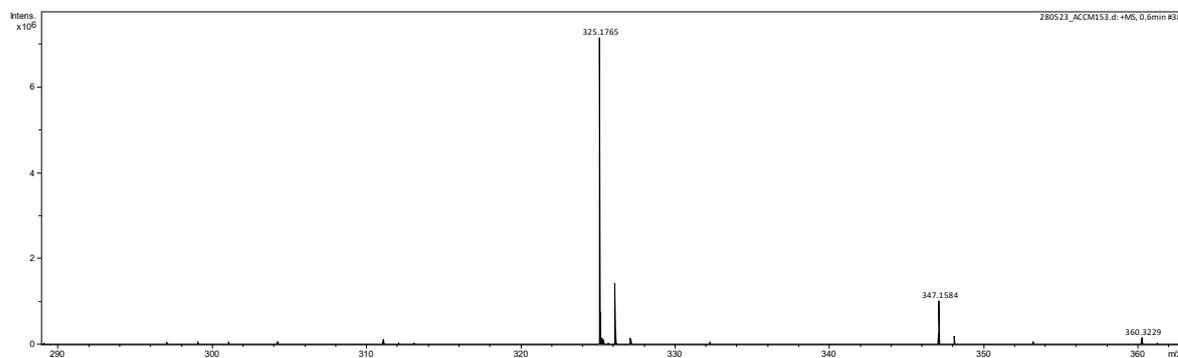


Figura A54 – Espectro de RMN de ^1H de **28** (400 MHz, CDCl_3)

Figura A55 – Espectro de RMN de ^{13}C de **28** (101 MHz, CDCl_3)Figura A56 – Espectro de HRMS (ESI+) de **28**

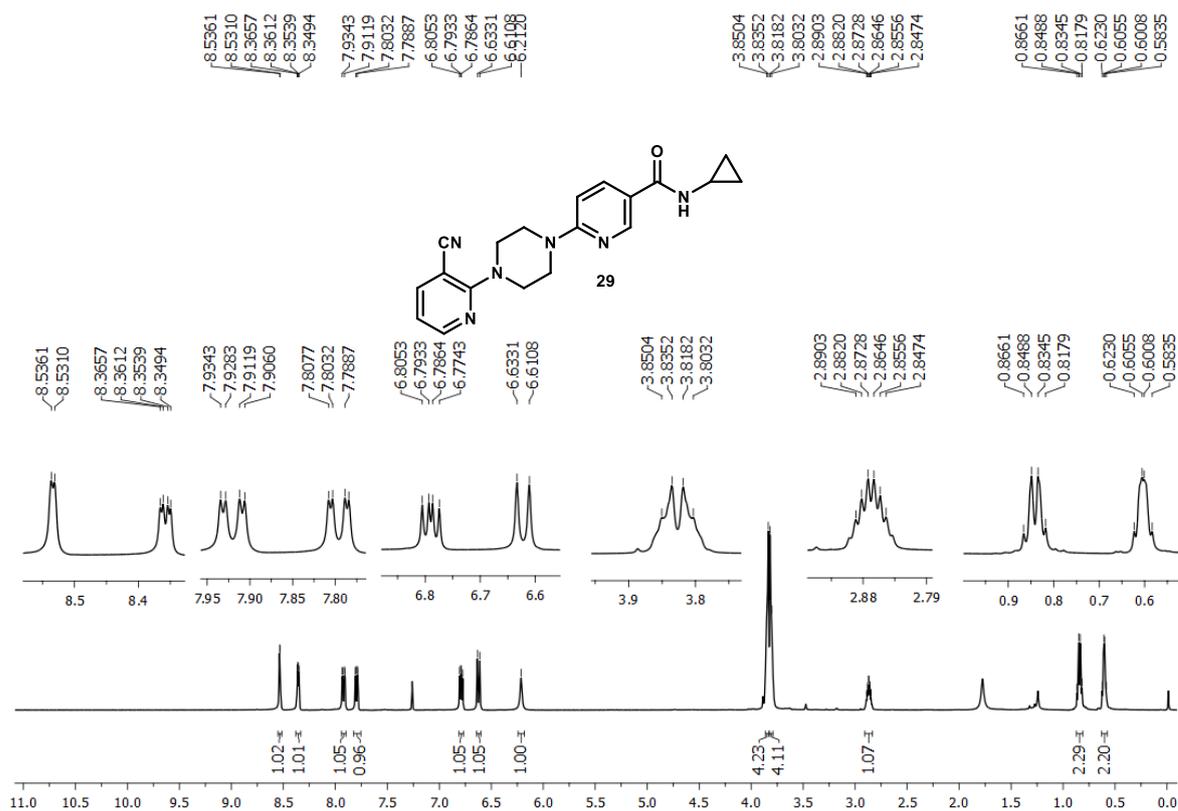


Figura A57 – Espectro de RMN de ¹H de **29** (400 MHz, CDCl₃)

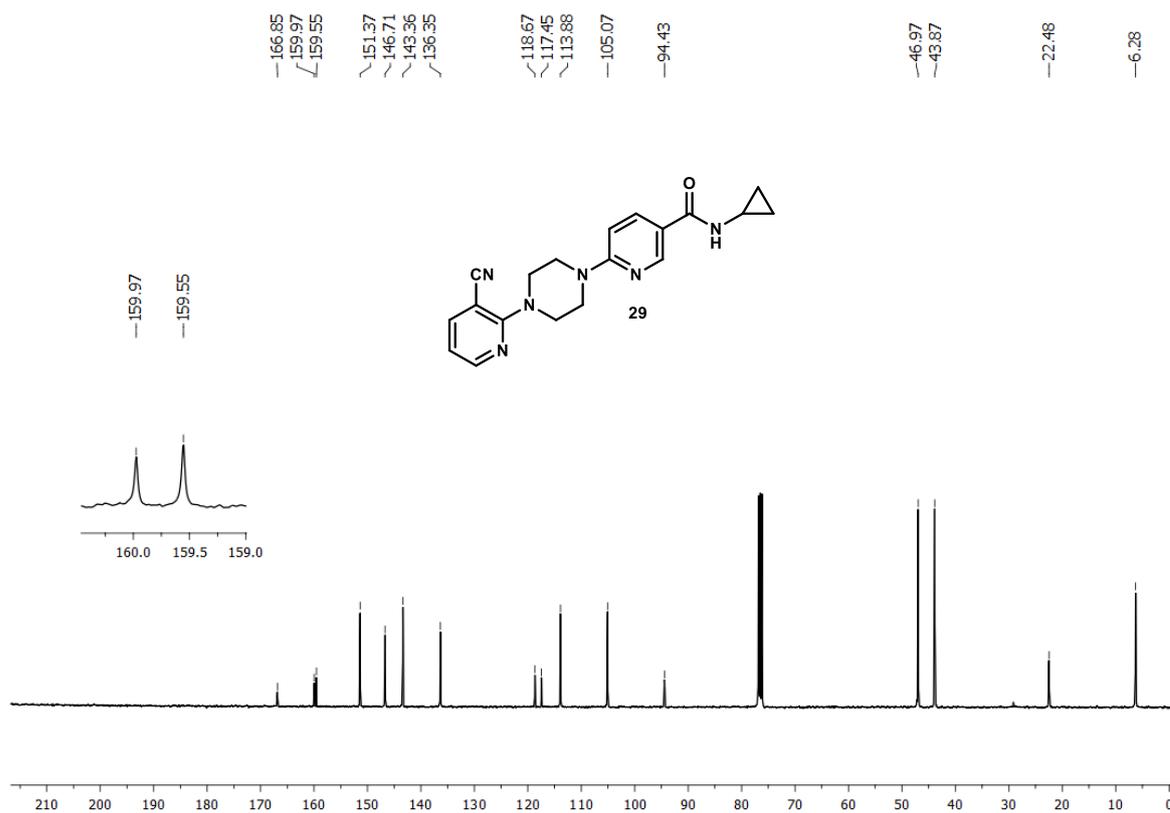


Figura A58 – Espectro de RMN de ^{13}C de **29** (101 MHz, CDCl_3)

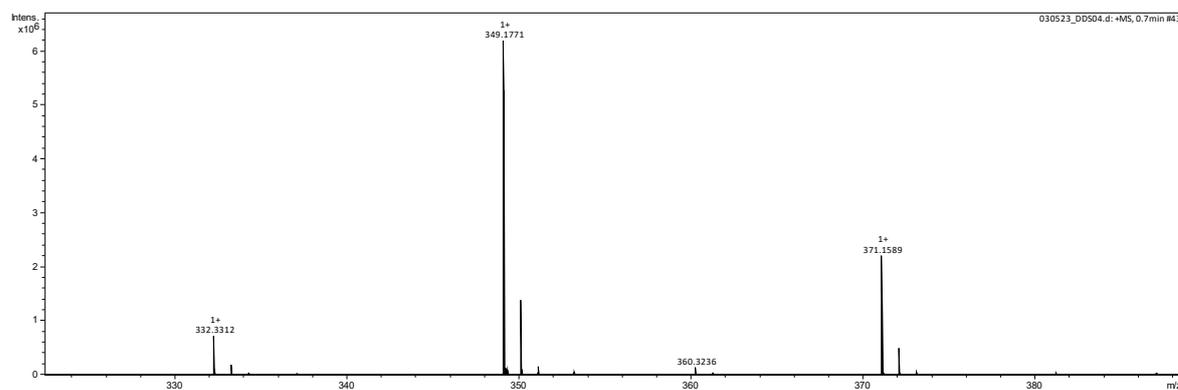


Figura A59 – Espectro de HRMS (ESI+) de **29**

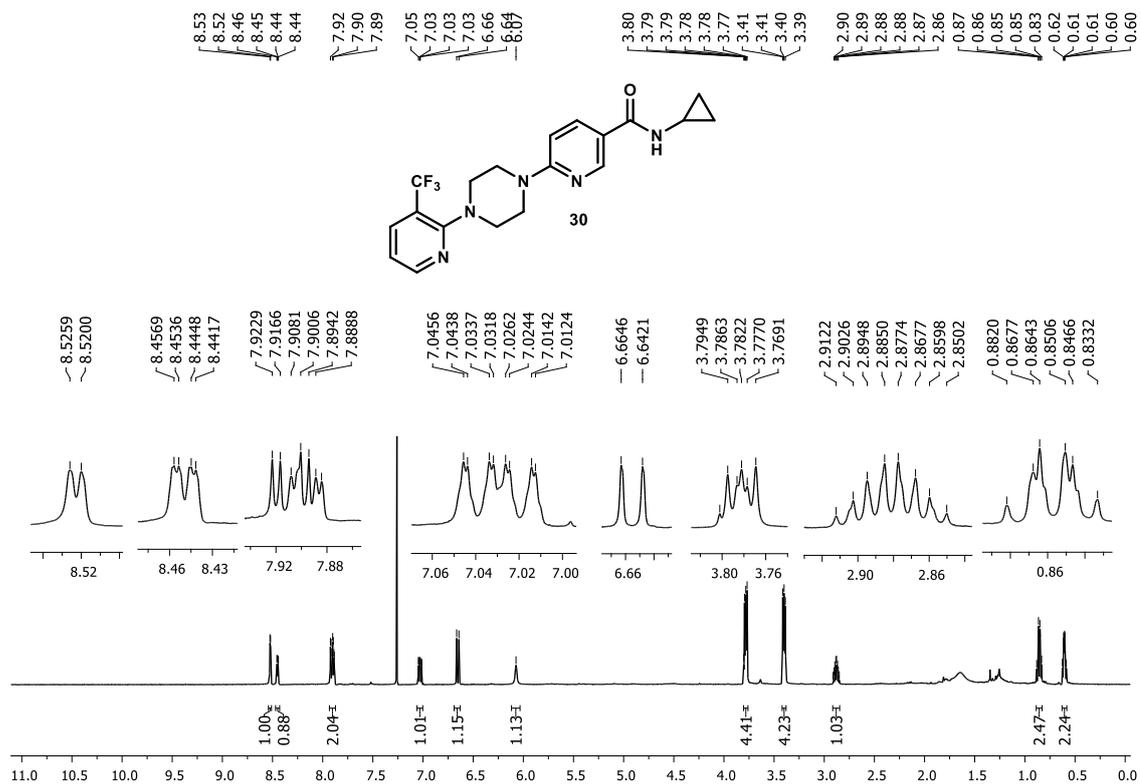


Figura A60 – Espectro de RMN de ^1H de **30** (400 MHz, CDCl_3)

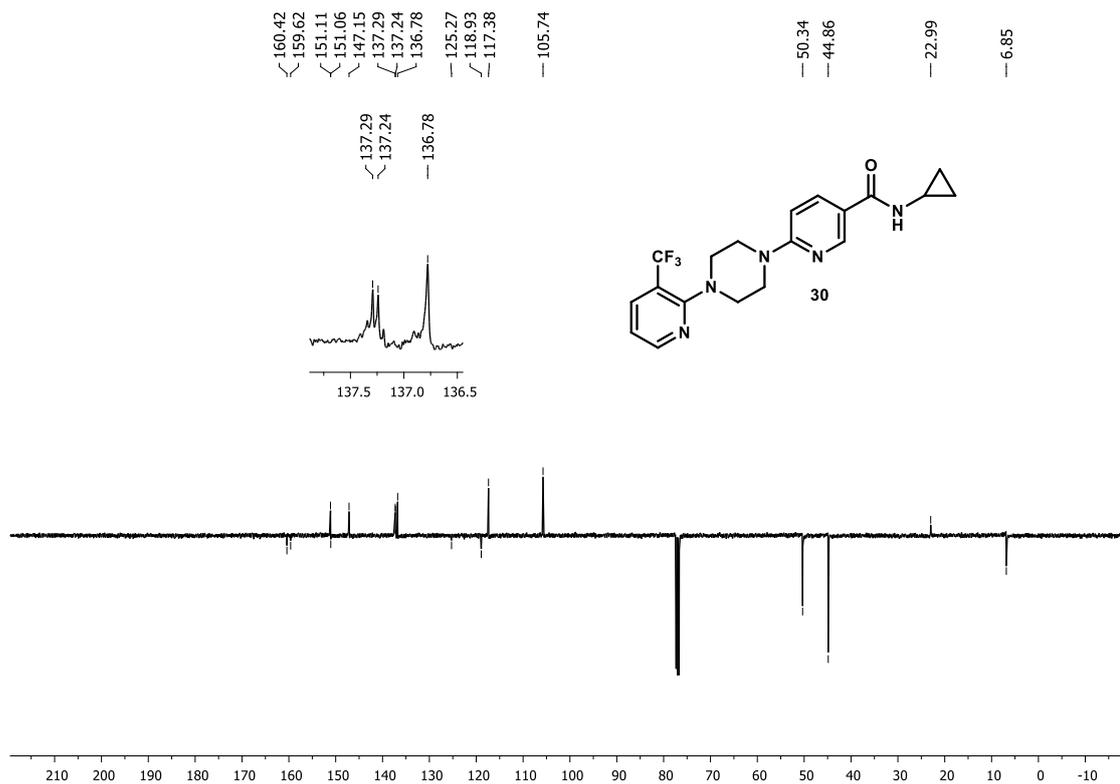


Figura A61 – Espectro de RMN de ^{13}C APT de **30** (101 MHz, CDCl_3)

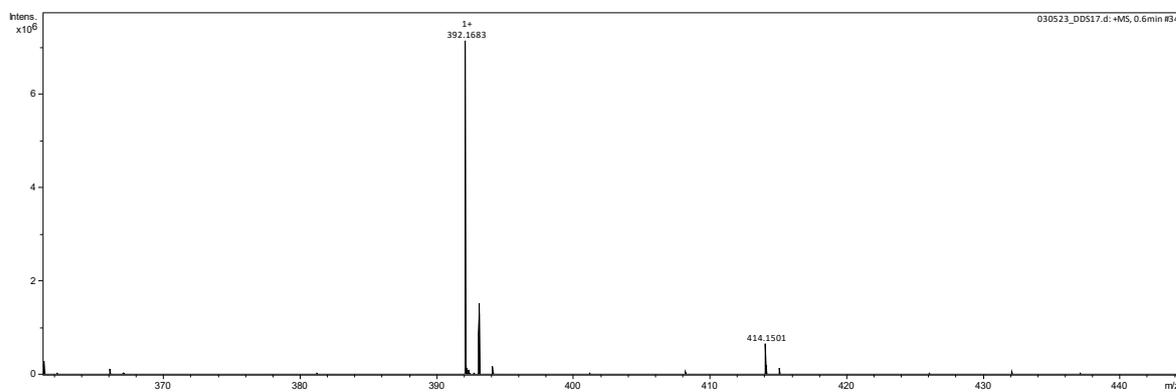
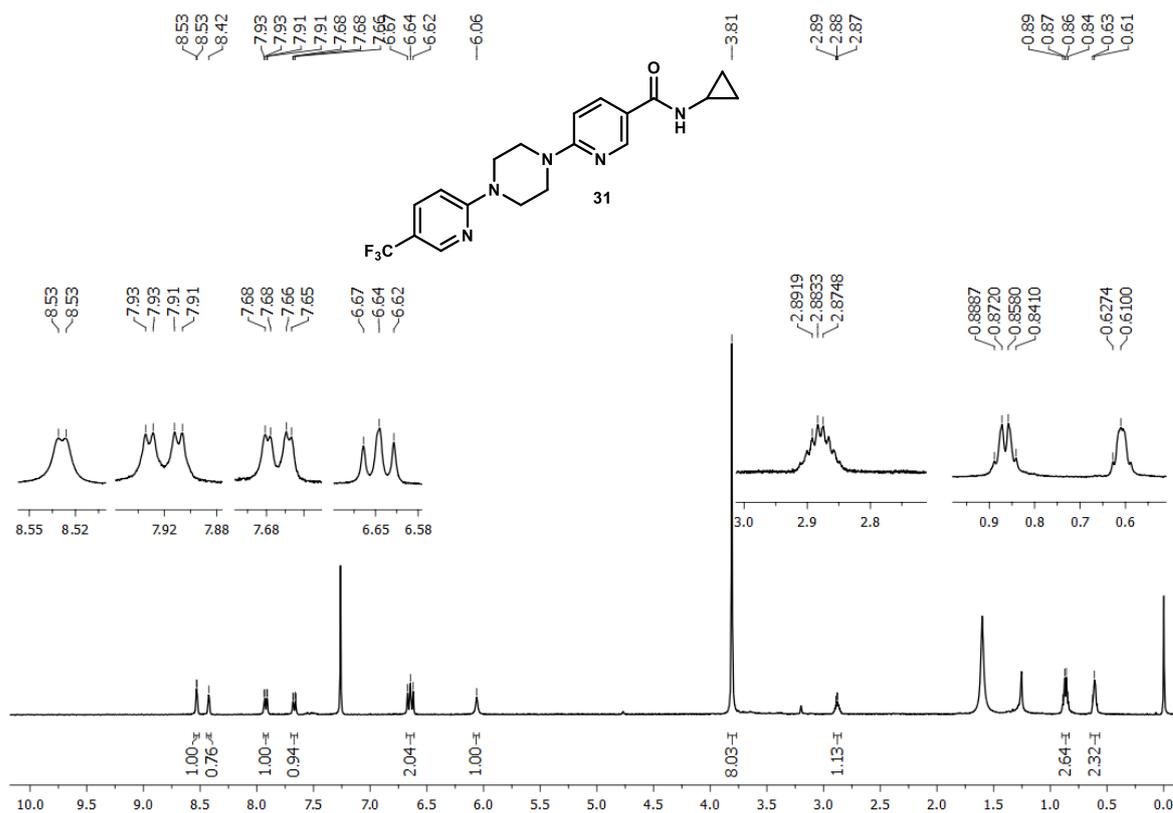


Figura A62 – Espectro de HRMS (ESI+) de **30**

Figura A63 – Espectro de RMN de ^1H de **31** (400 MHz, CDCl_3)

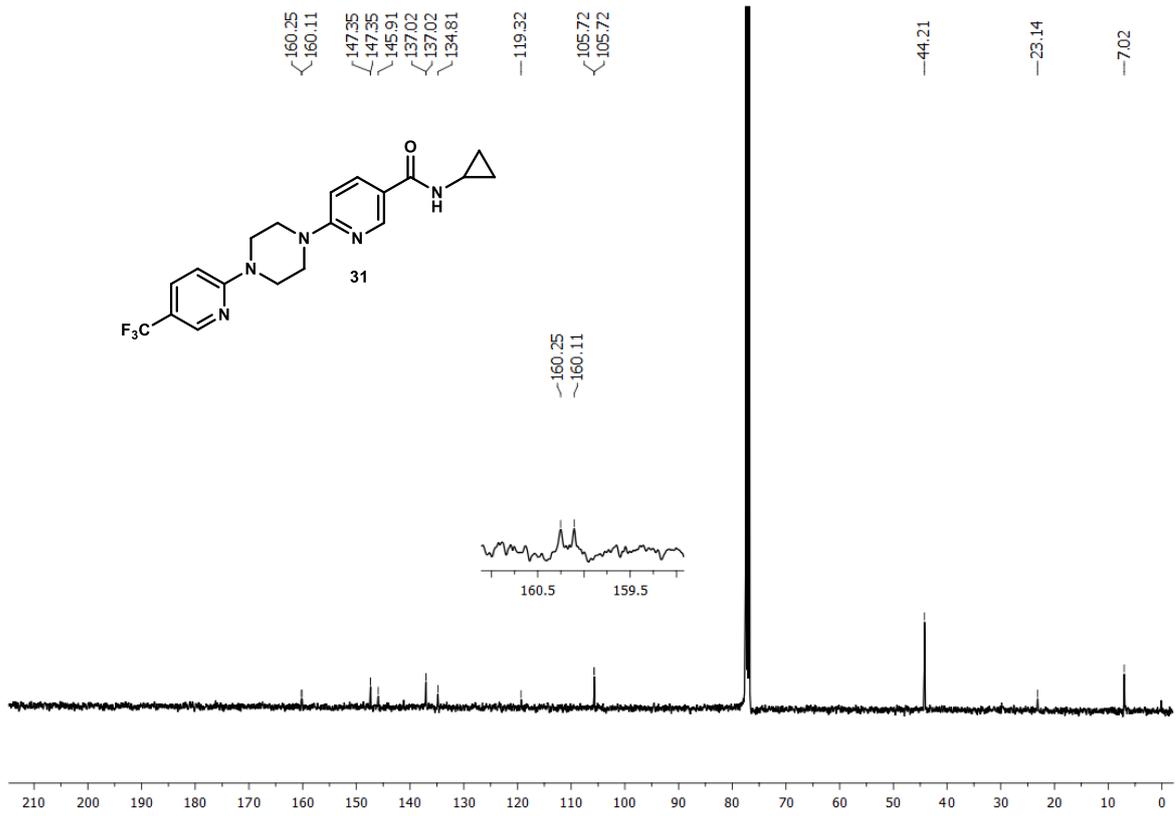


Figura A64 – Espectro de RMN de ^{13}C de **31** (101 MHz, CDCl_3)

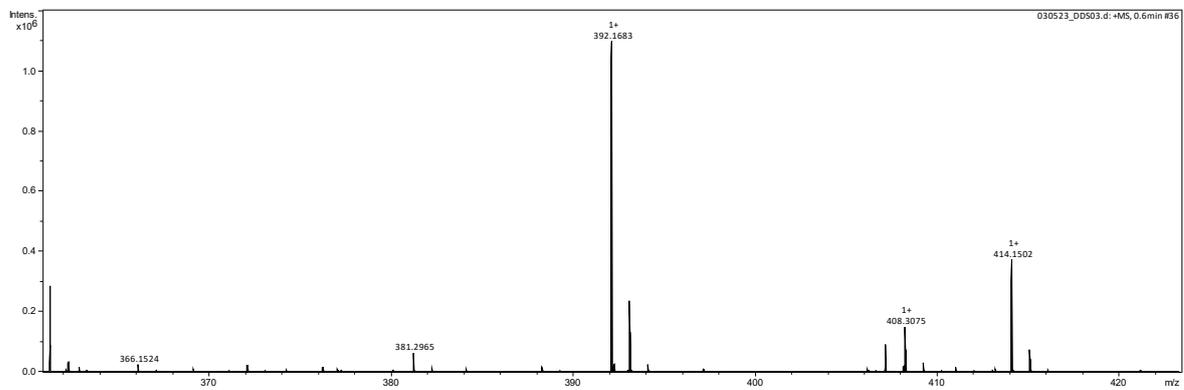
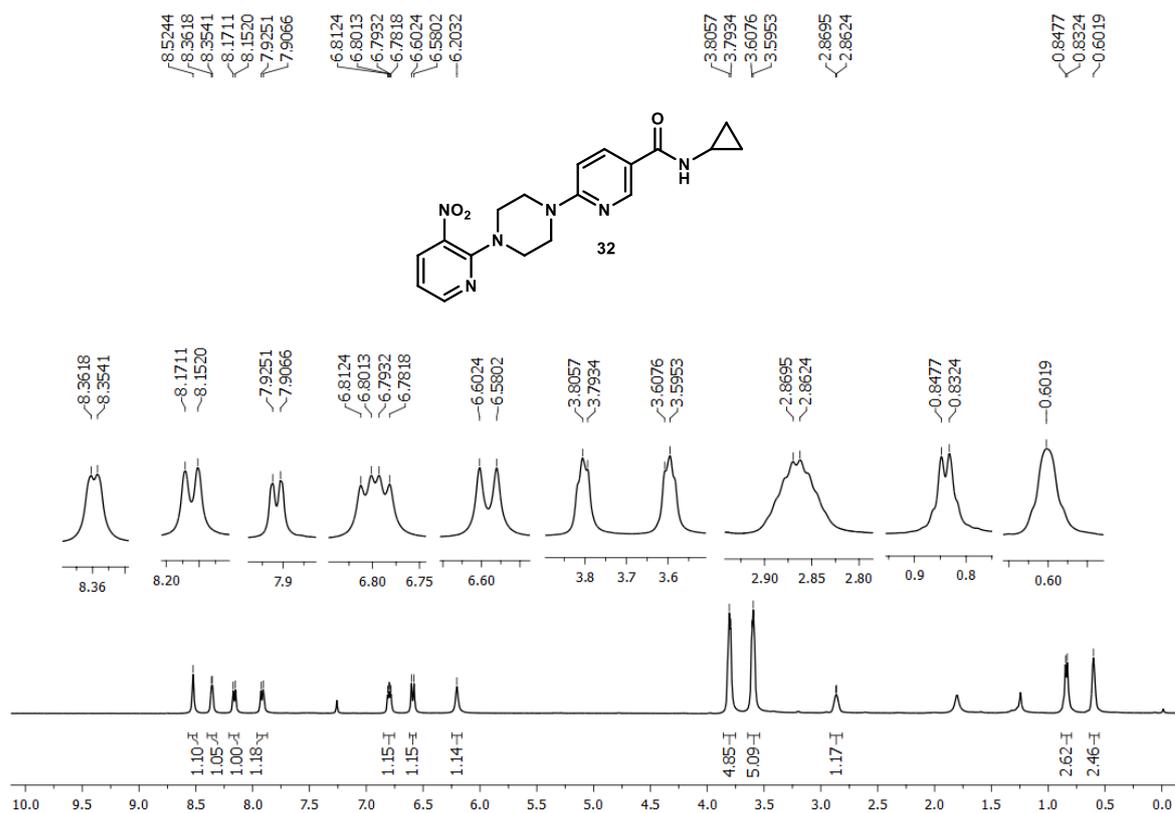


Figura A65 – Espectro de HRMS (ESI+) de **31**

Figura A66 – Espectro de RMN de ¹H de **32** (400 MHz, CDCl₃)

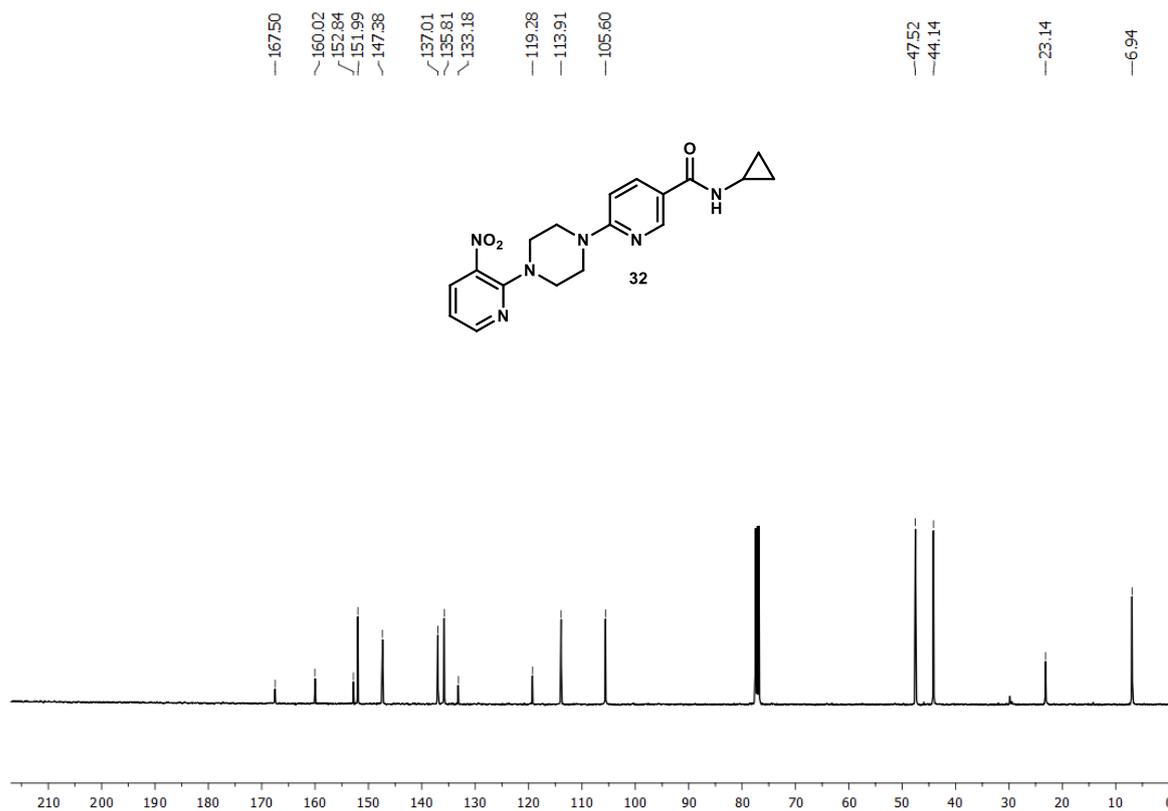


Figura A67 – Espectro de RMN de ^{13}C de **32** (101 MHz, CDCl_3)

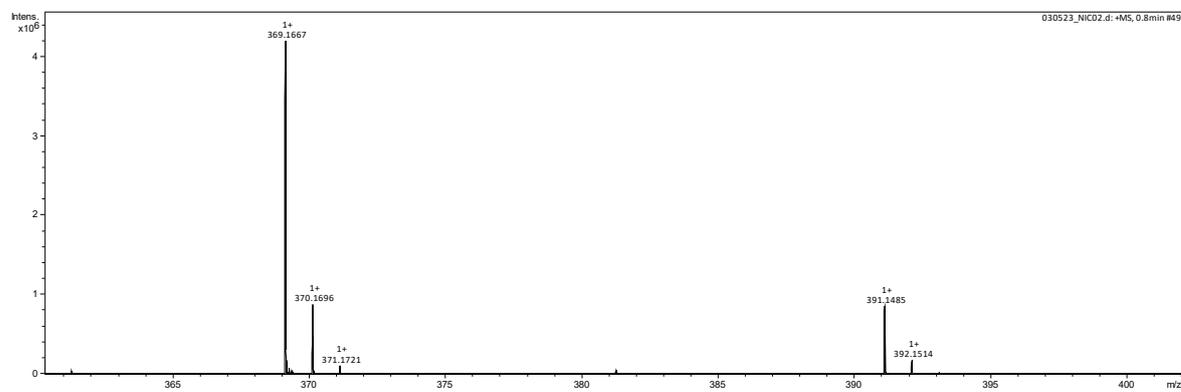


Figura A68 – Espectro de HRMS (ESI+) de **32**

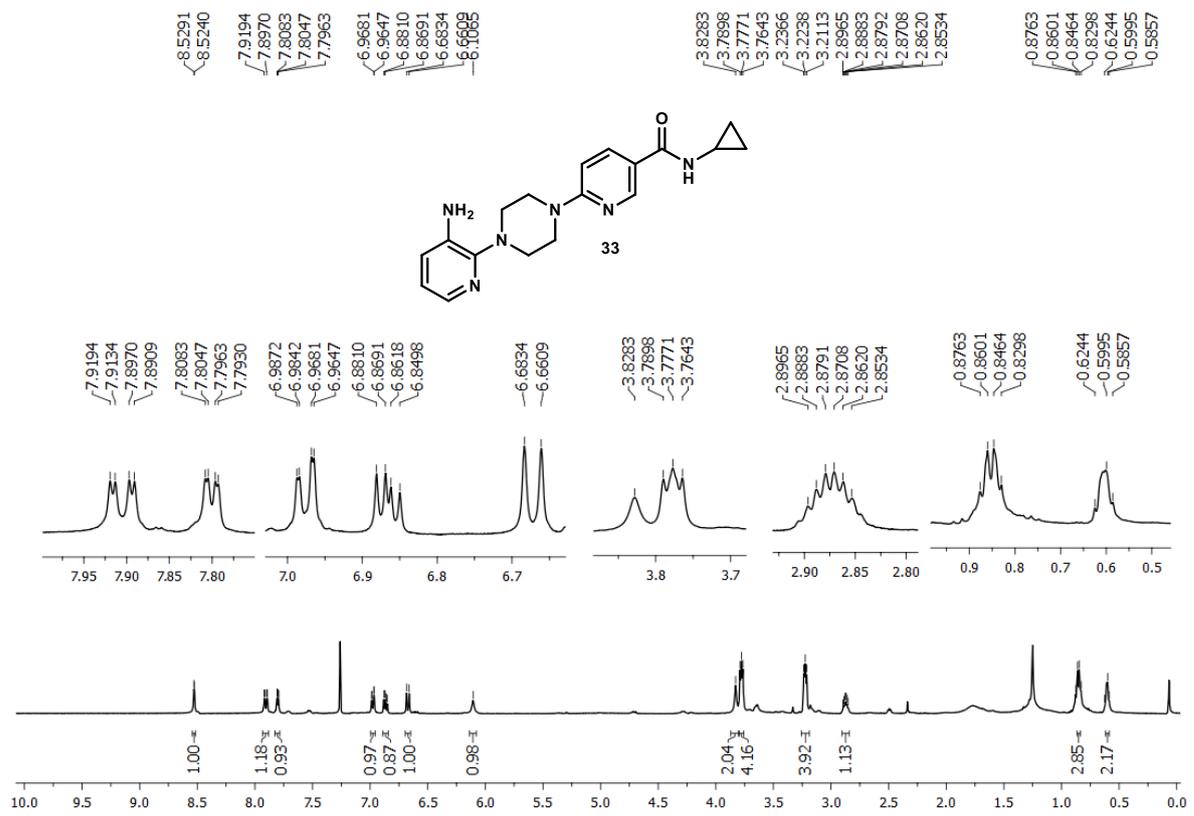


Figura A69 – Espectro de RMN de ^1H de **33** (400 MHz, CDCl_3)

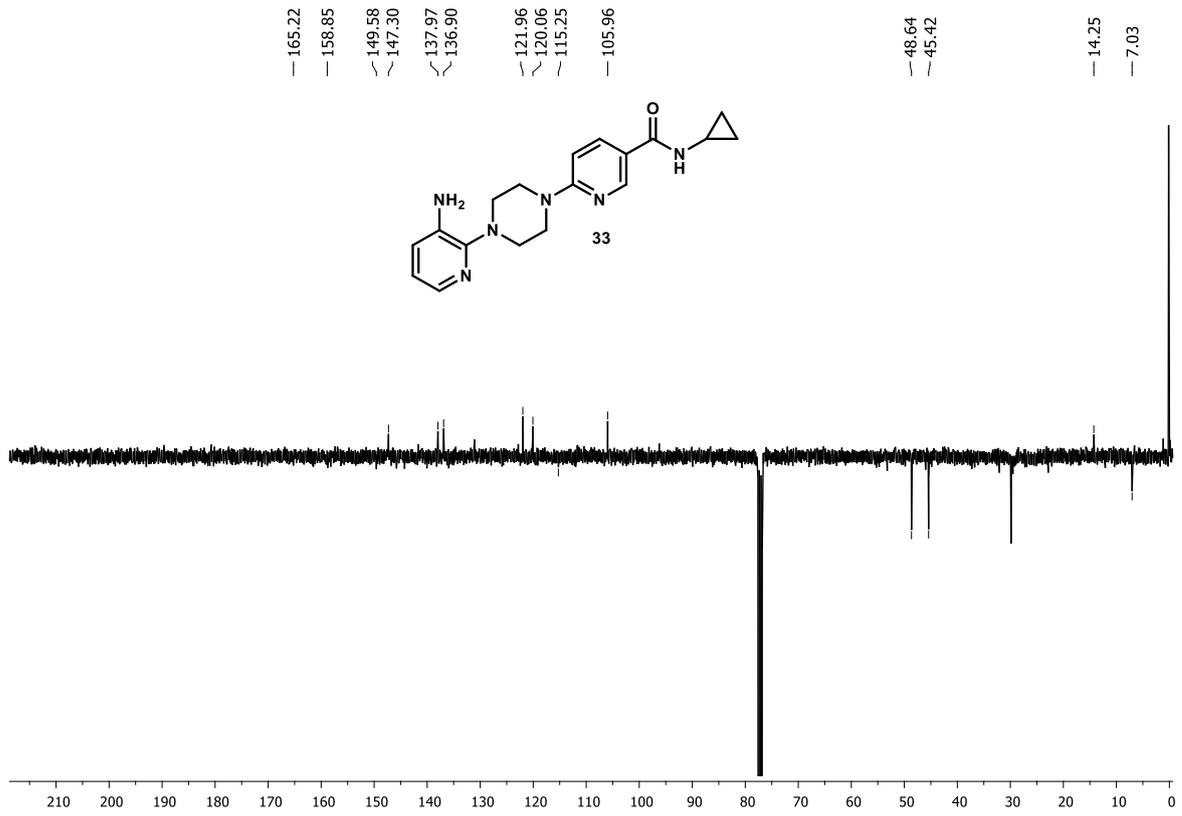


Figura A70 – Espectro de RMN de ^{13}C APT de **33** (101 MHz, CDCl_3)

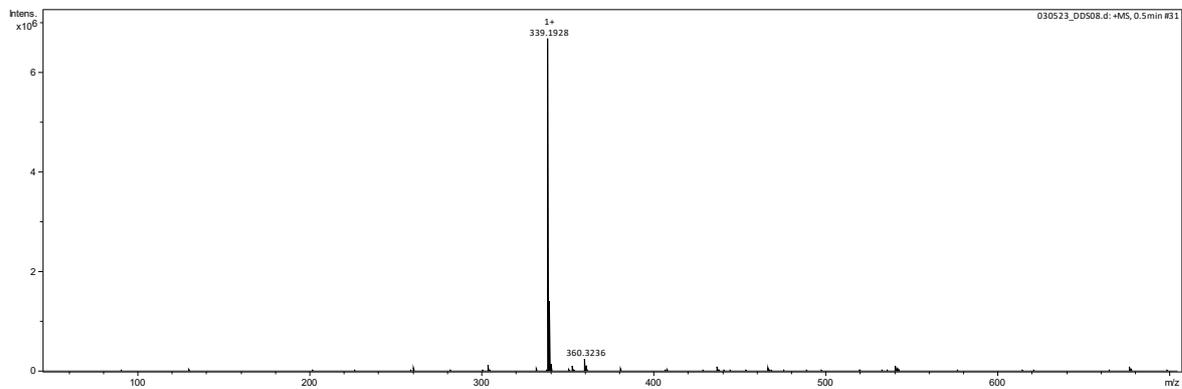


Figura A71 – Espectro de HRMS (ESI+) de **33**

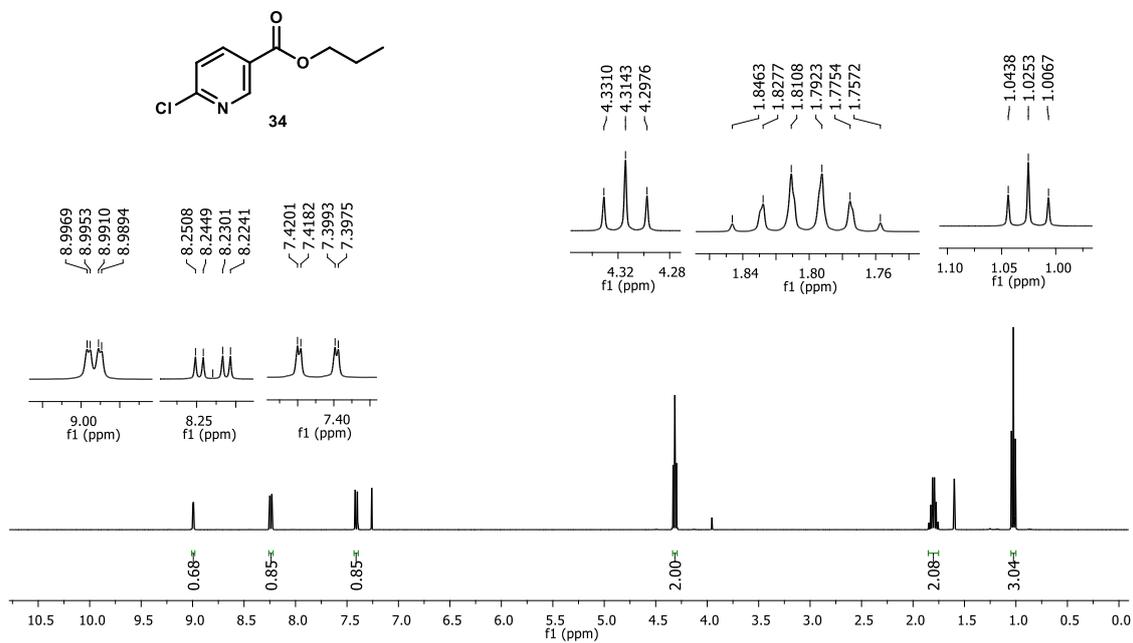
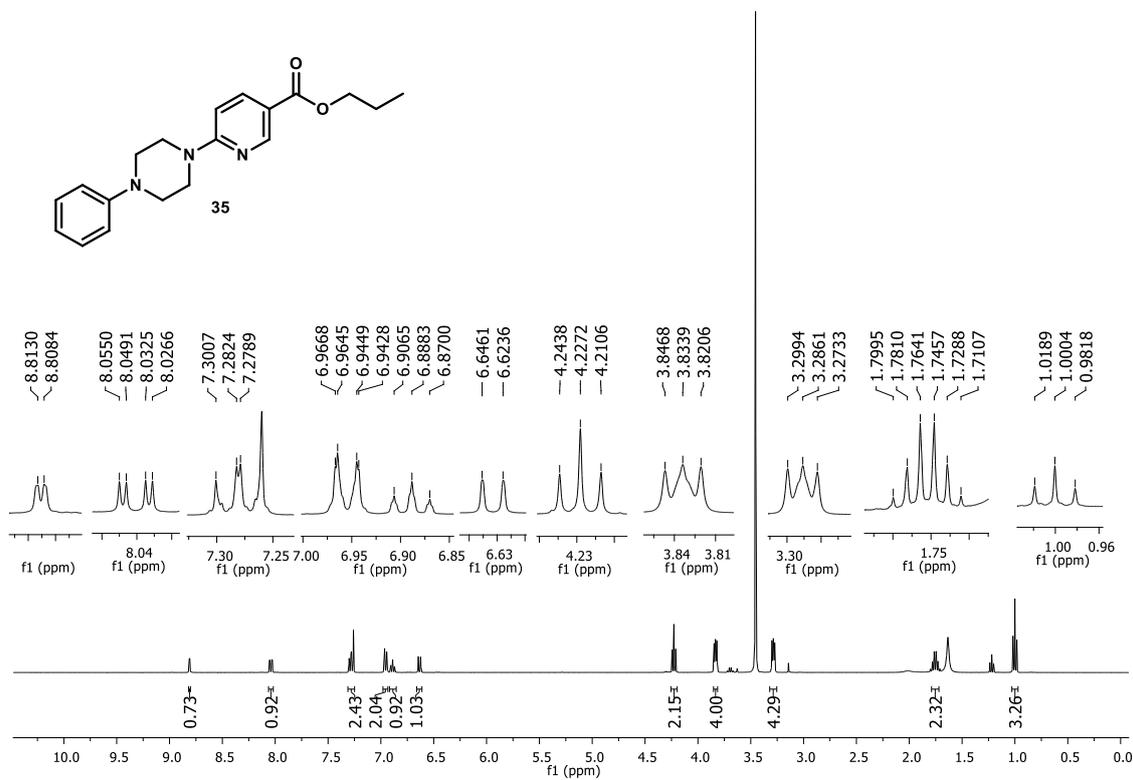
Figura A72 – Espectro de RMN de ^1H de **34** (400 MHz, CDCl_3)



Figura A73 – Espectro de RMN de ^{13}C APT de **34** (101 MHz, CDCl_3)

Figura A74 – Espectro de RMN de ^1H de **35** (400 MHz, CDCl_3)

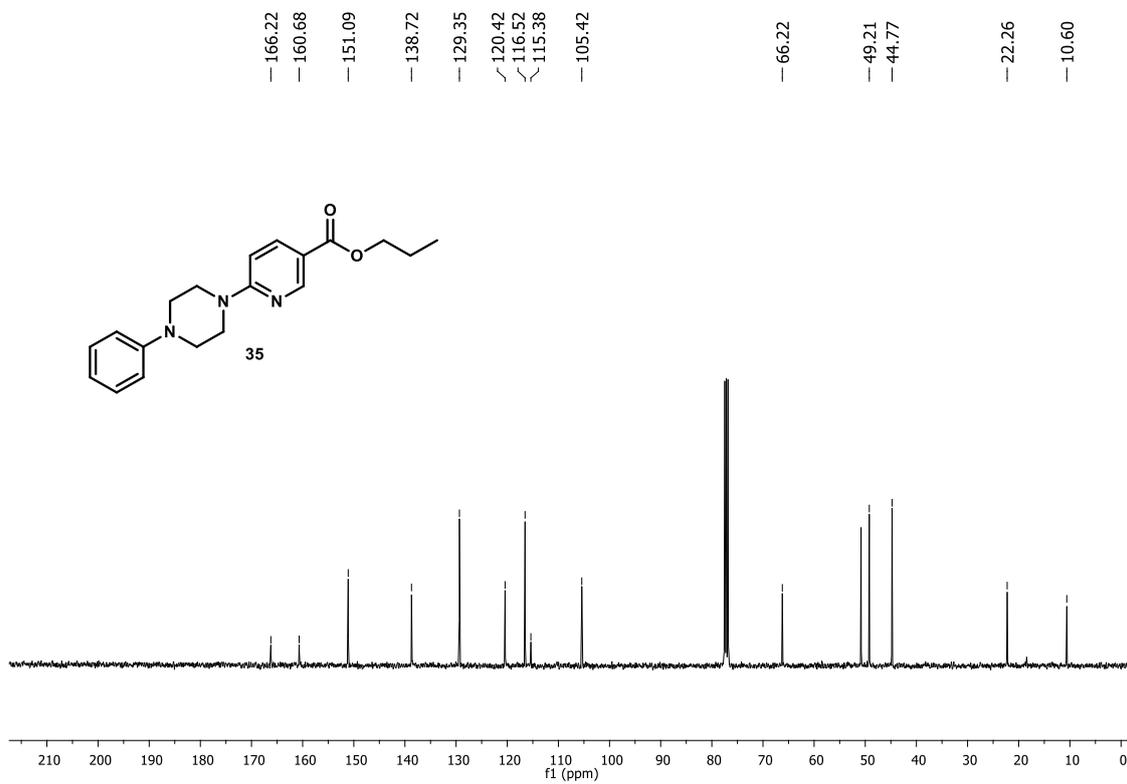


Figura A75 – Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **35**

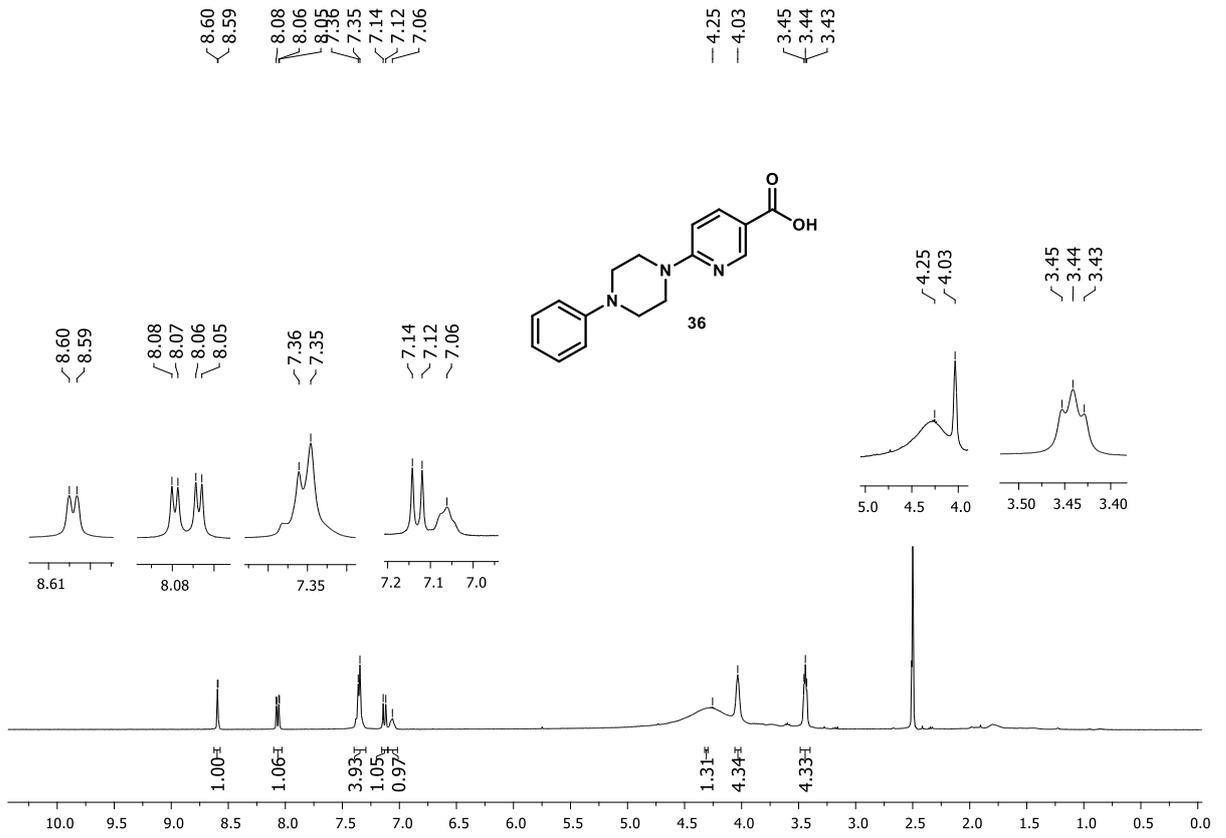


Figura A76 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) de **36**

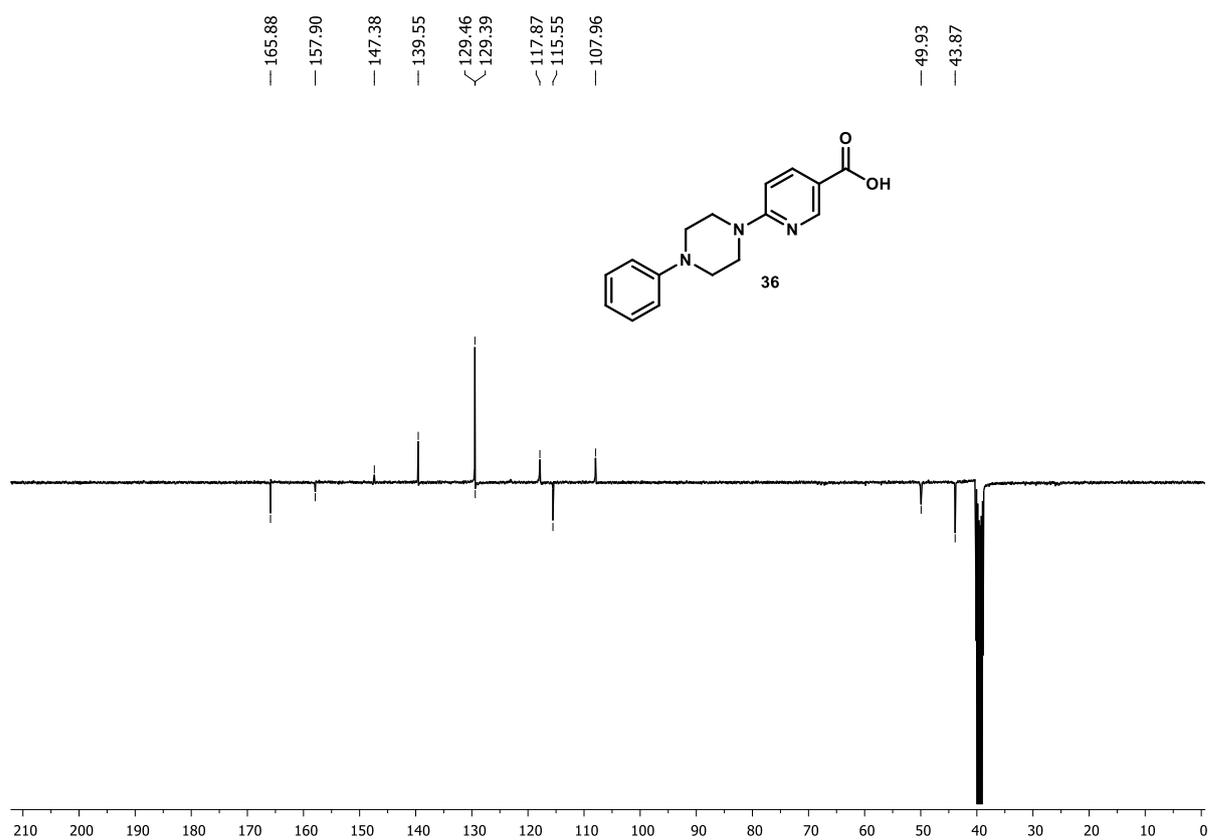


Figura A77 – Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **36**

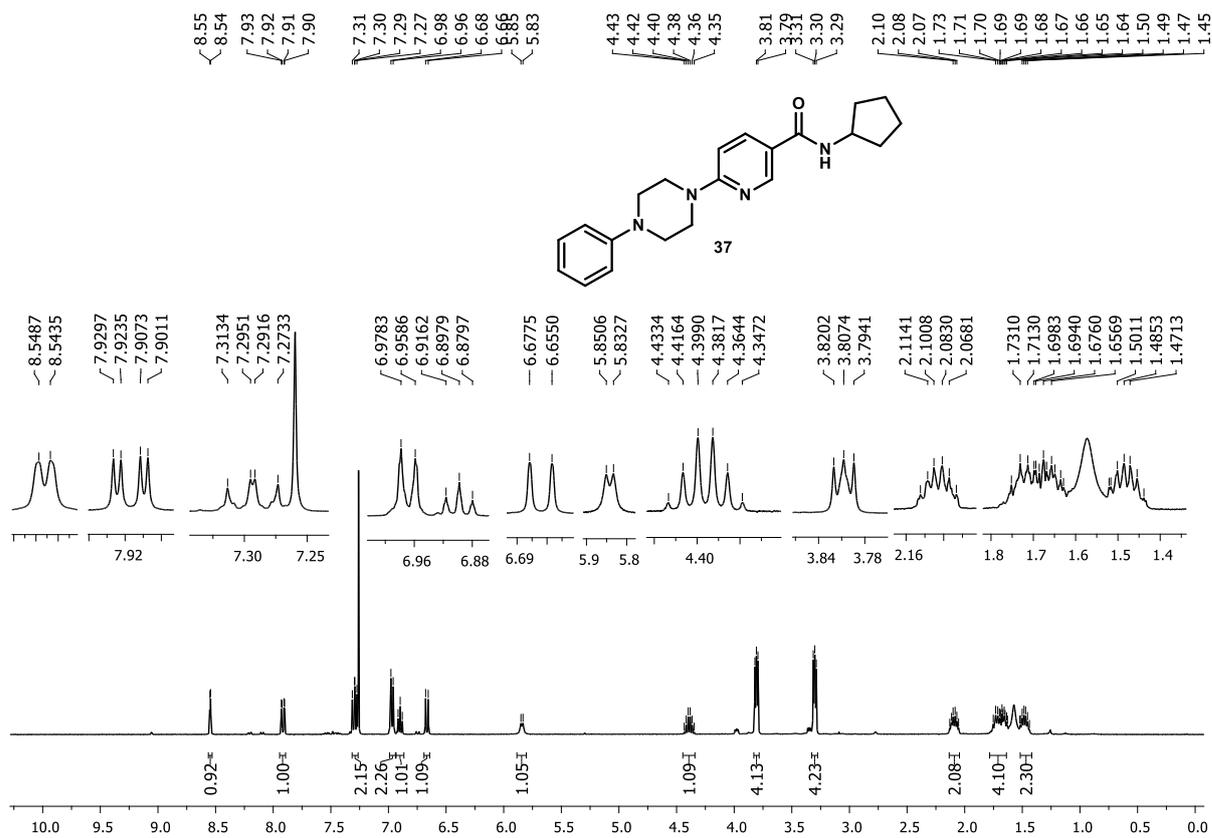


Figura A78 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **37**

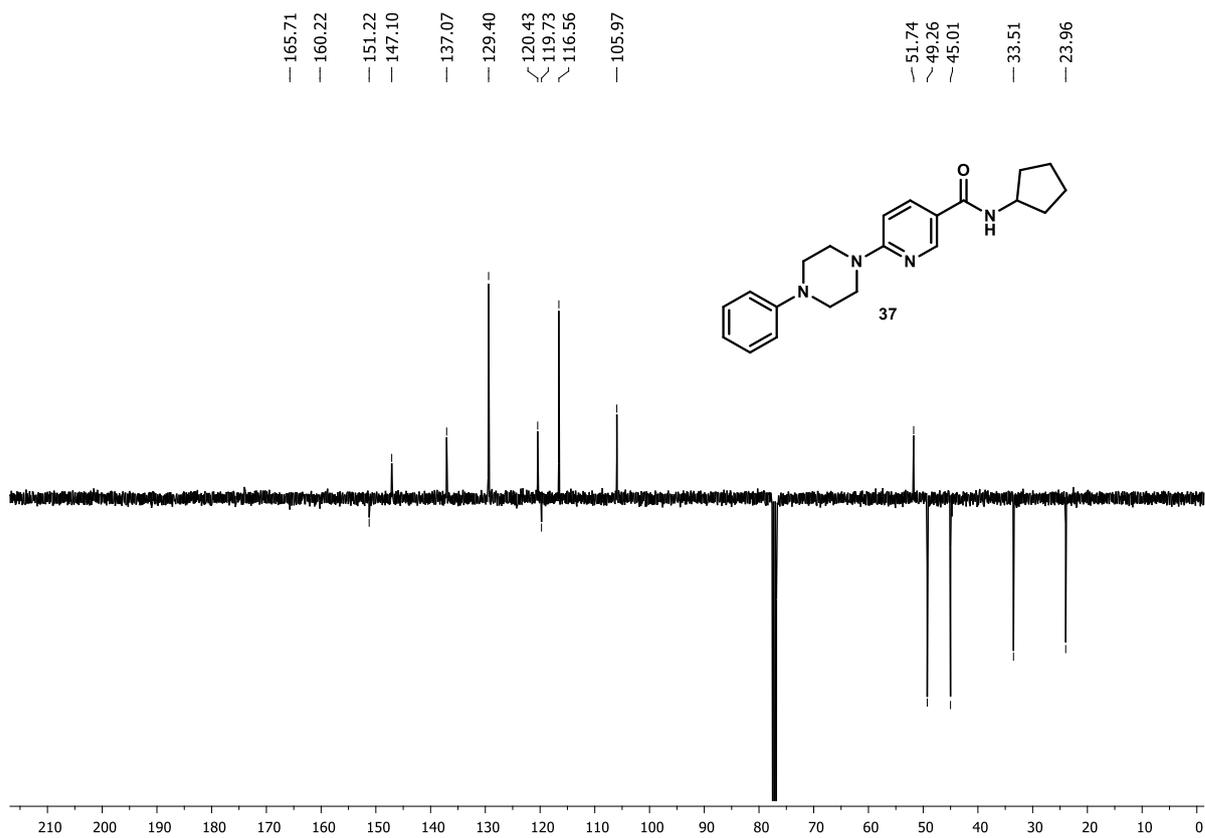


Figura A79 – Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) de **37**

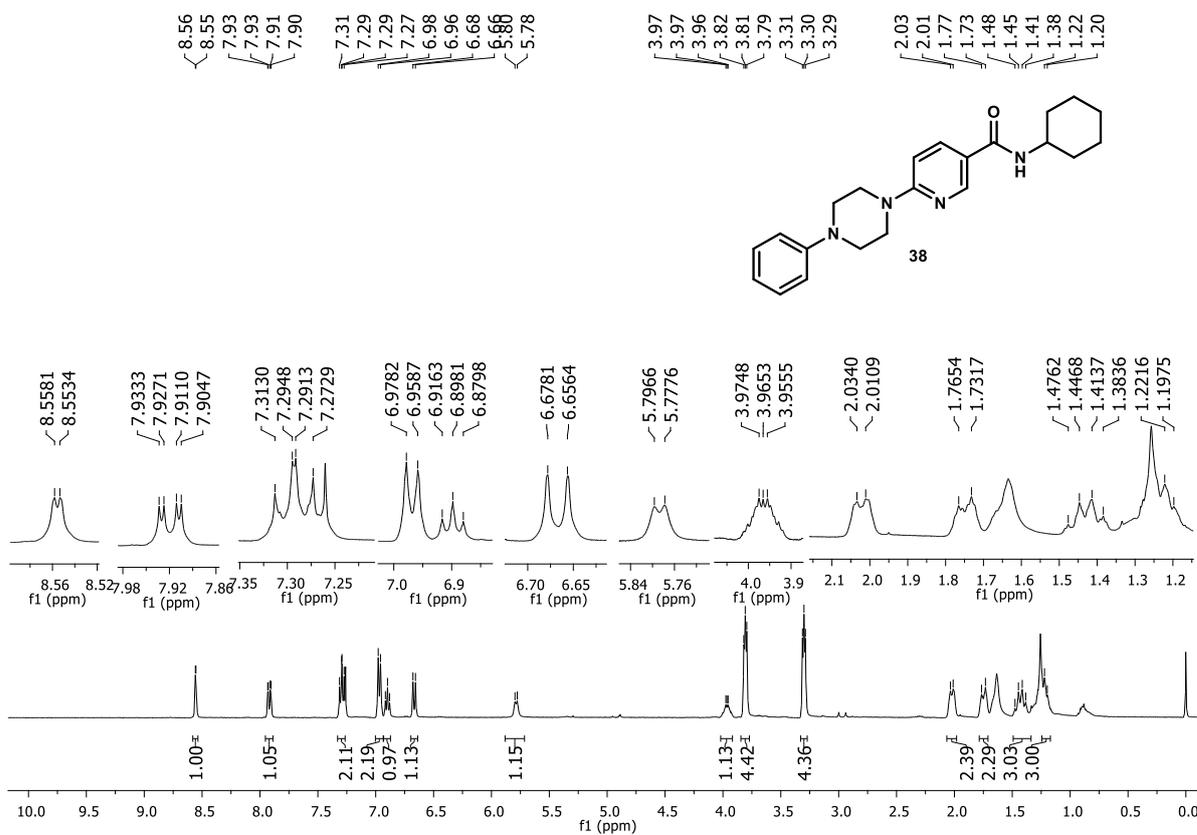


Figura A80 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **38**

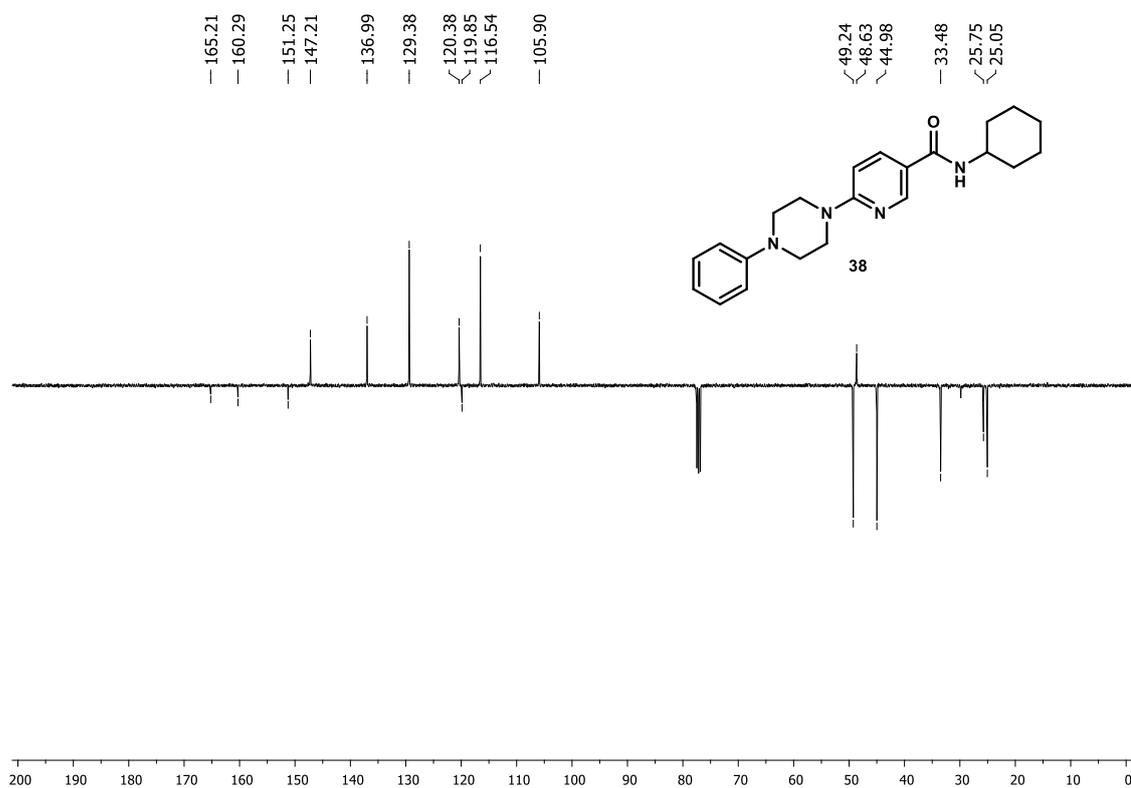


Figura A81 – Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) de **38**

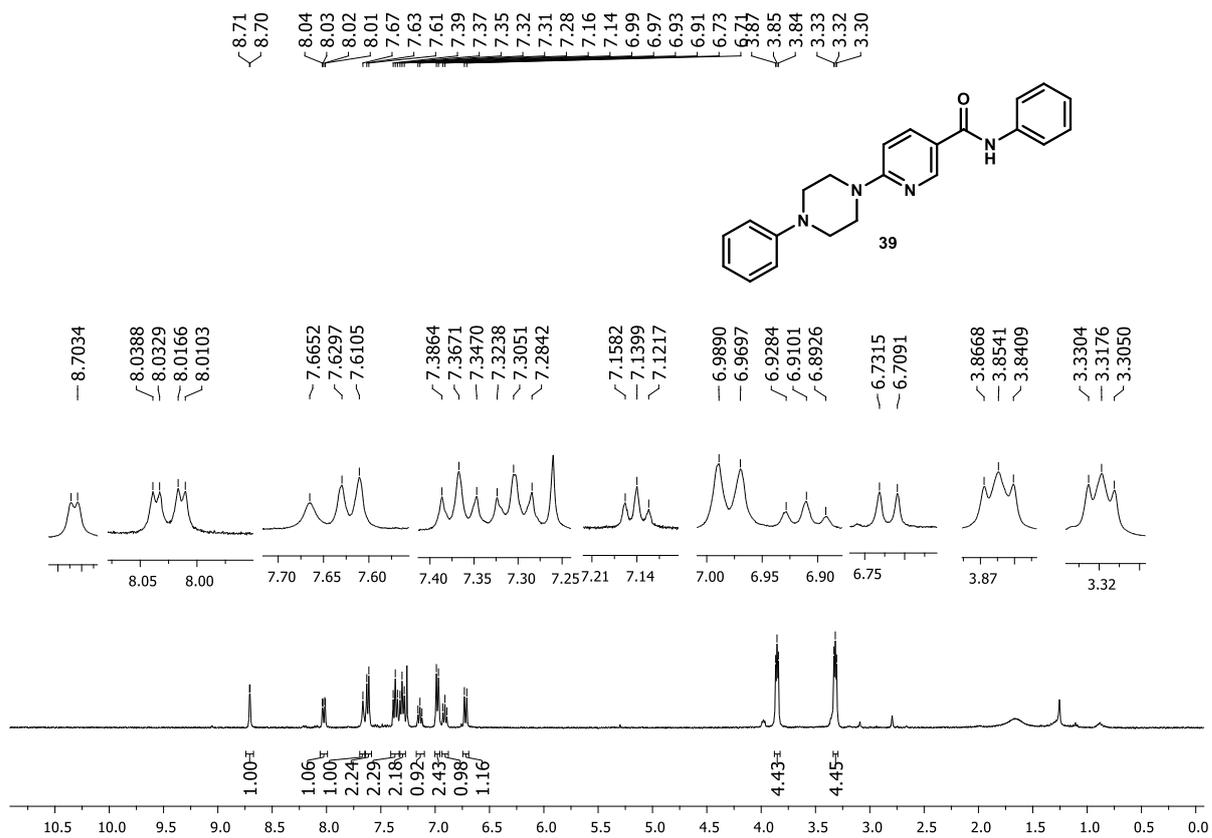


Figura A82 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **39**

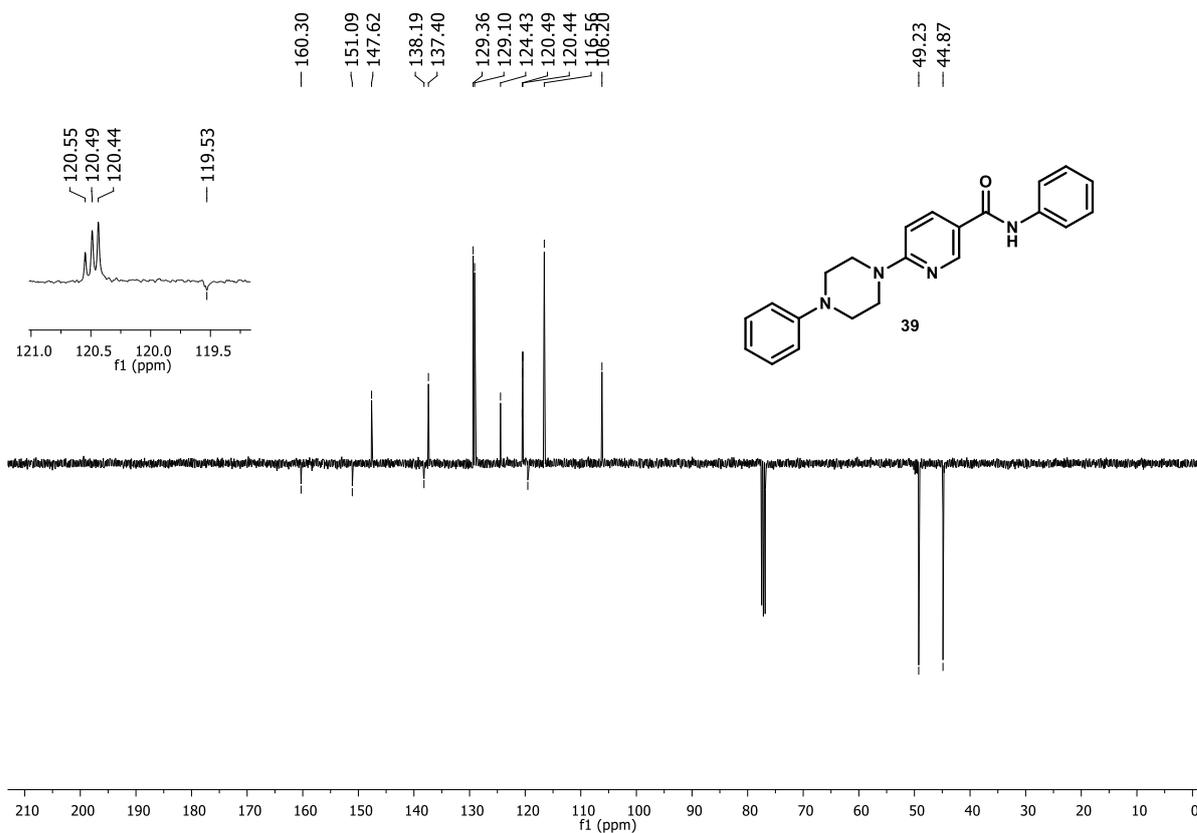


Figura A83 – Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) de **39**

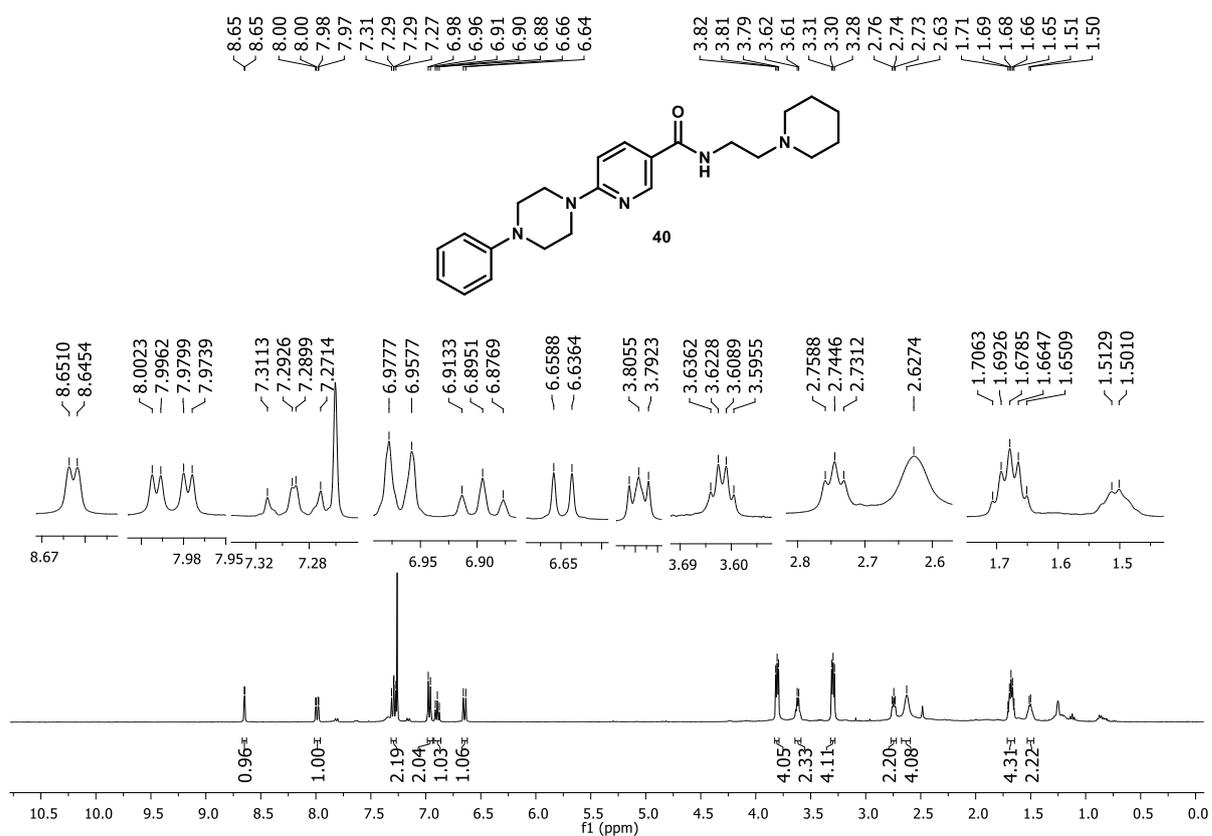


Figura A84 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **40**

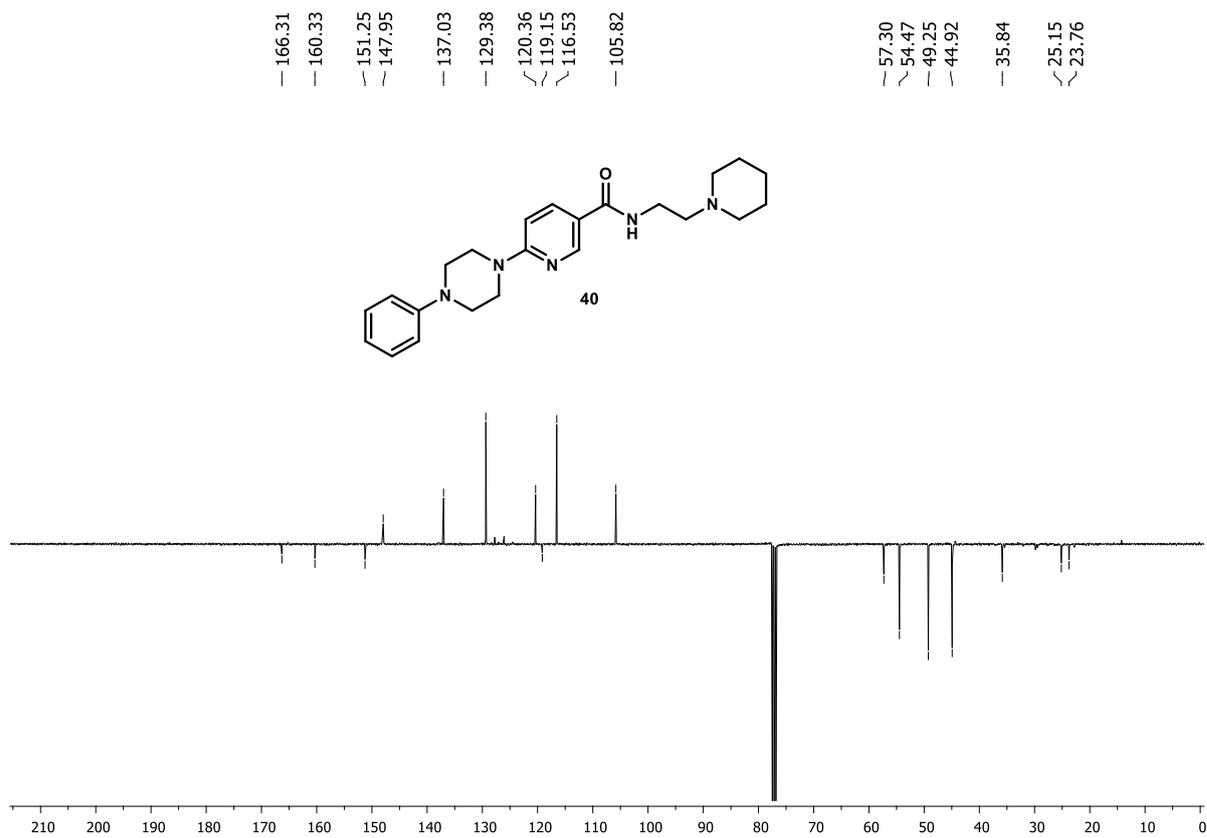
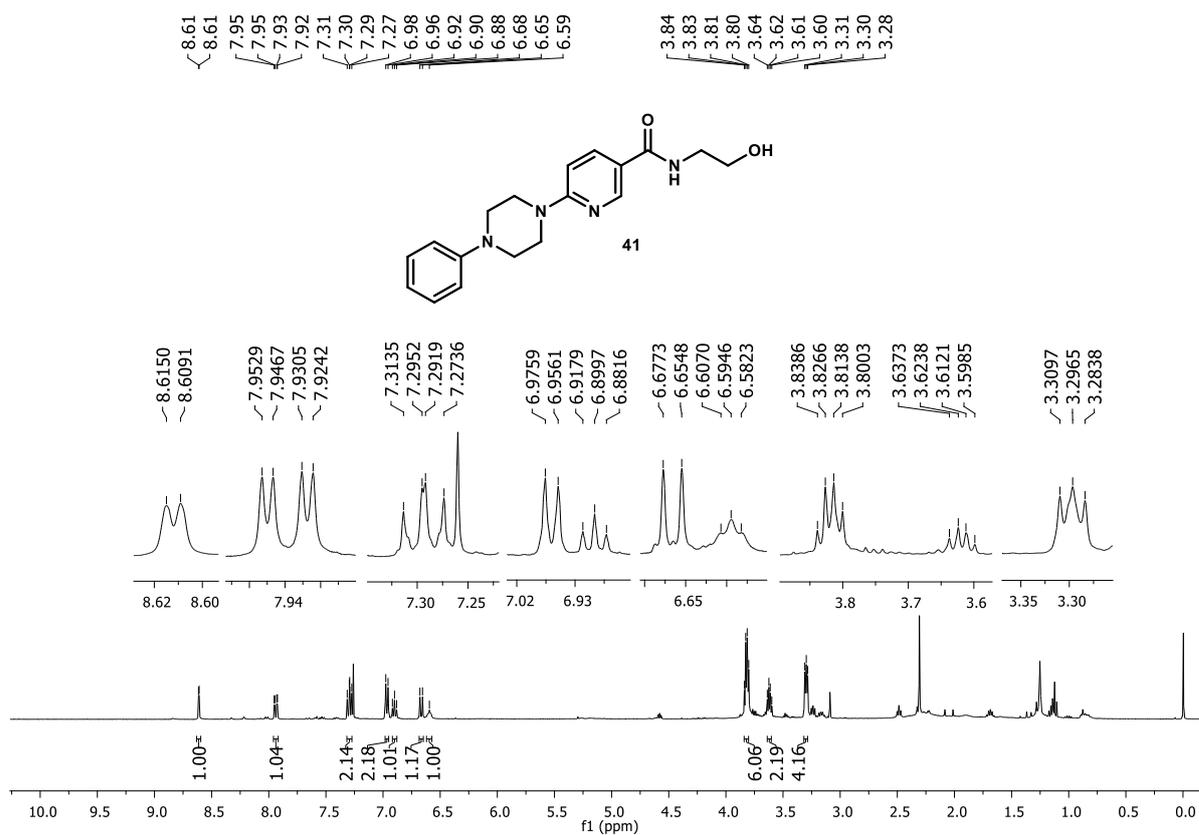


Figura A85 – Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) de **40**

Figura A86 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **41**

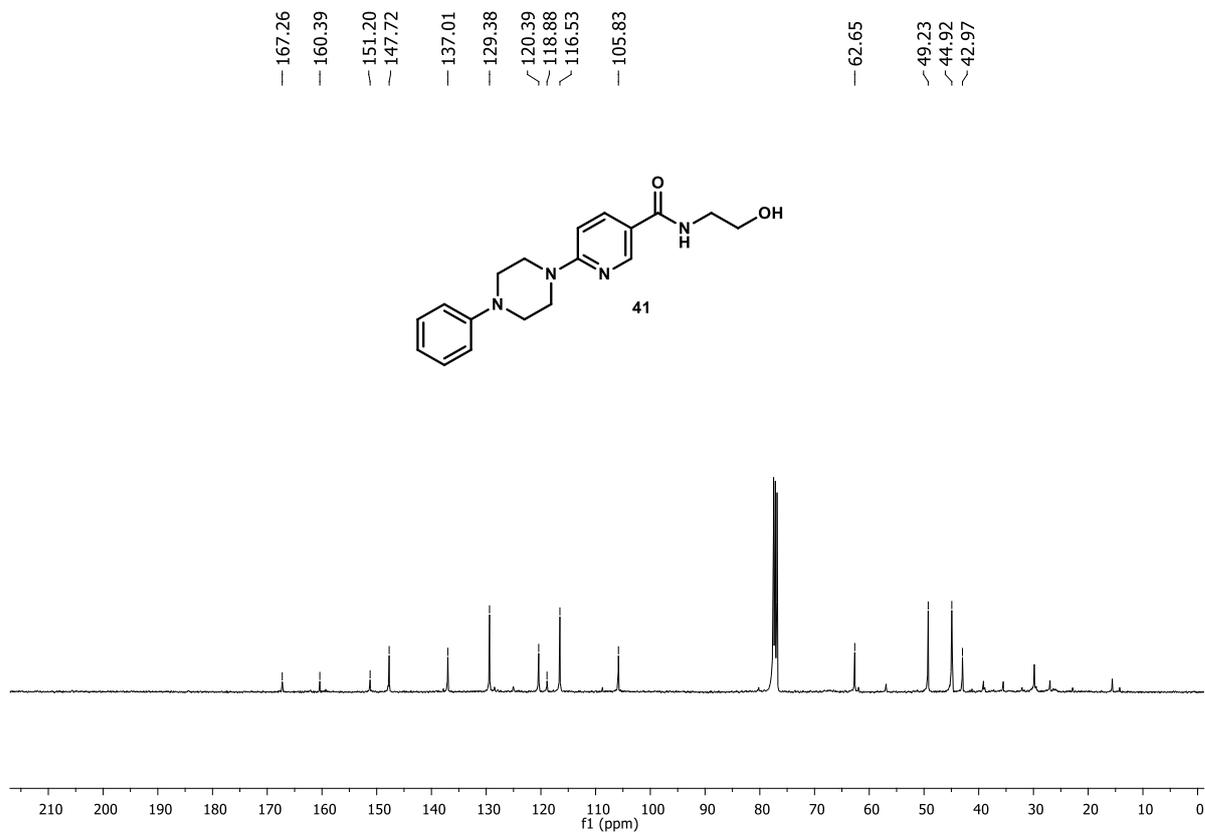


Figura A87 – Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **41**

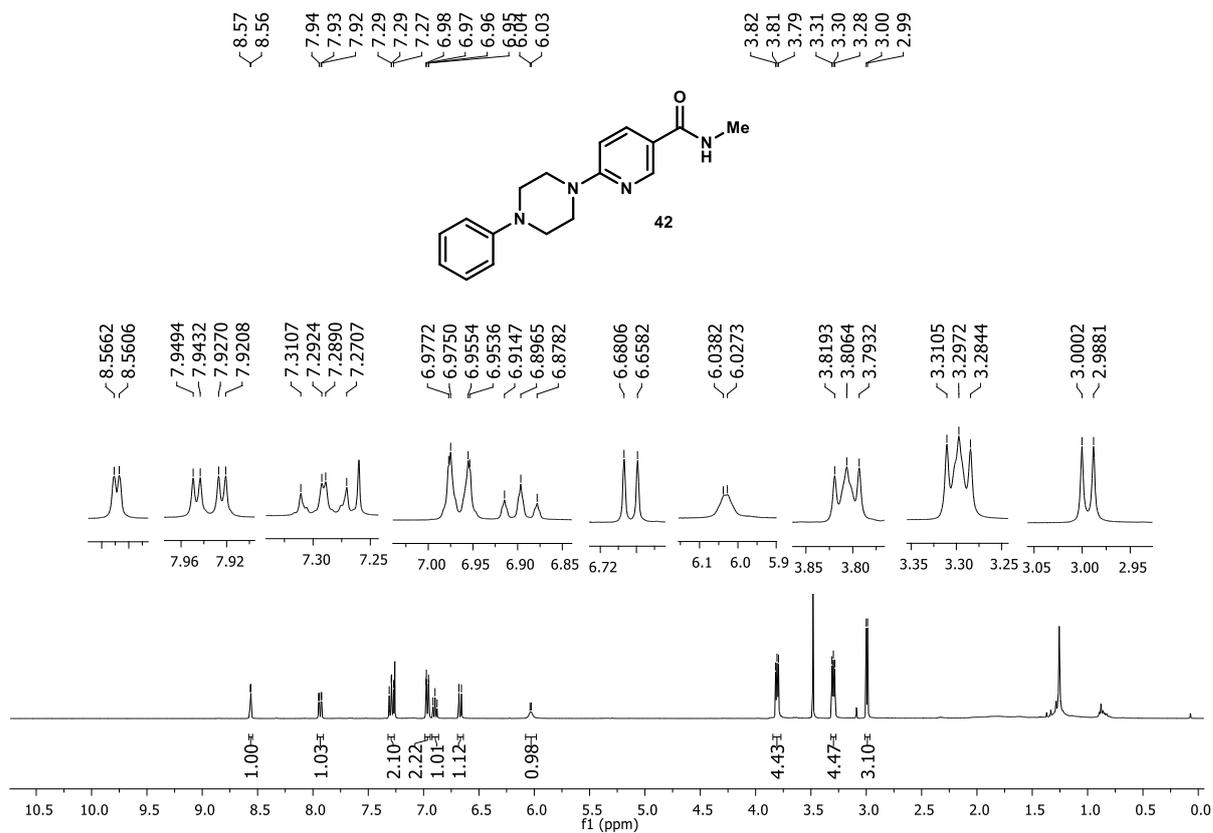


Figura A88 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **41**

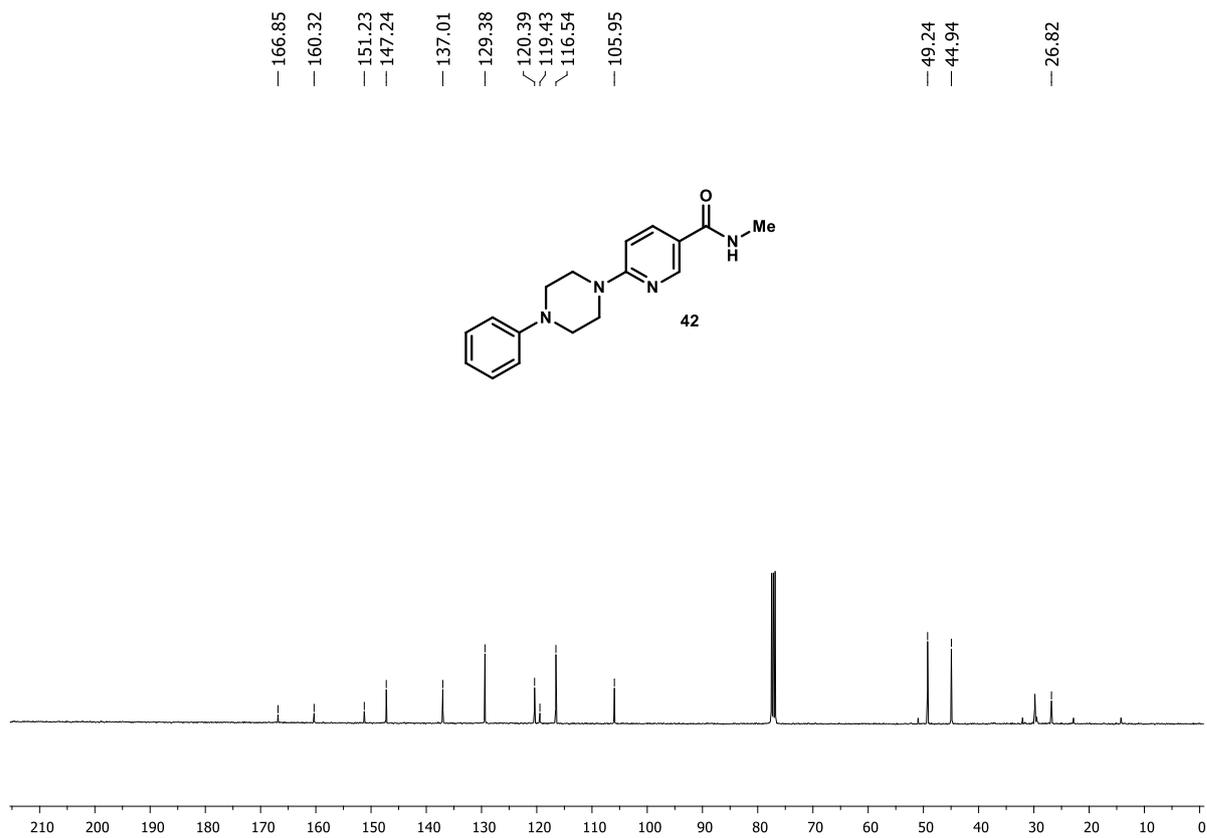


Figura A89 – Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **42**

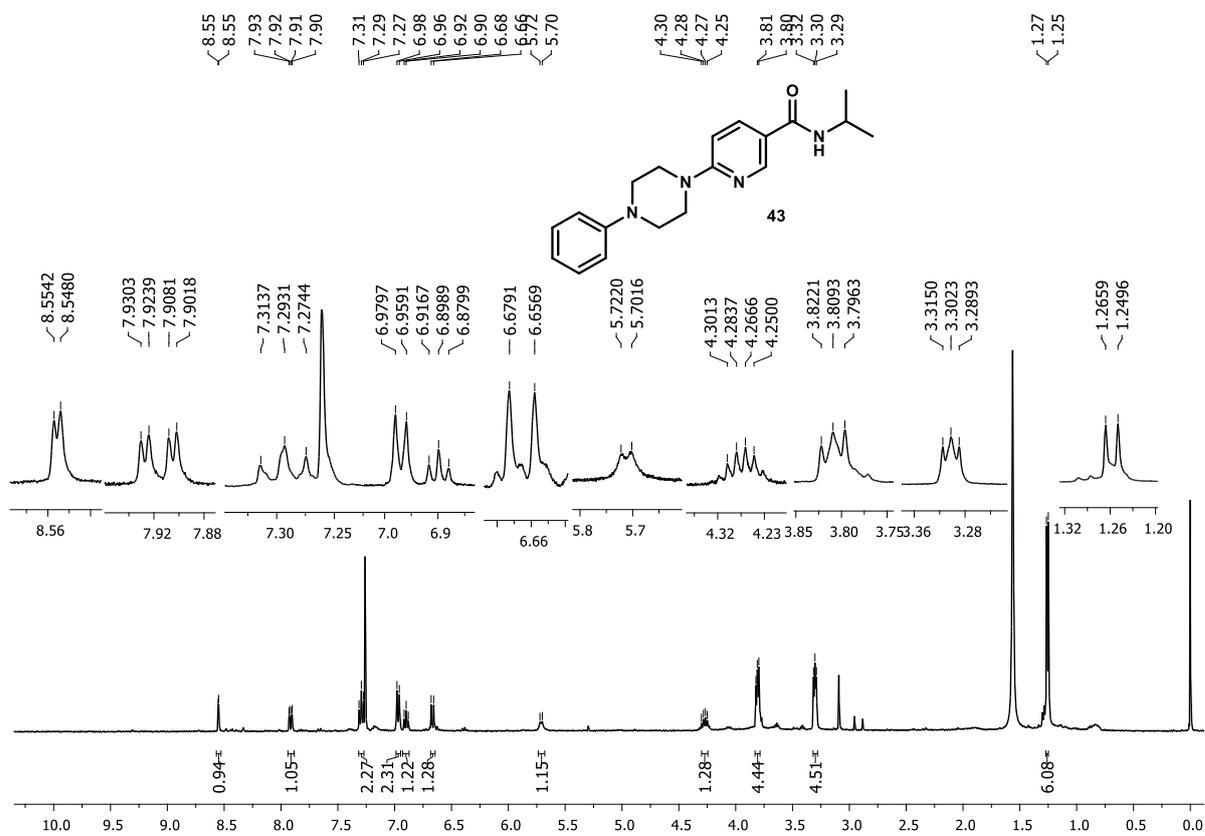
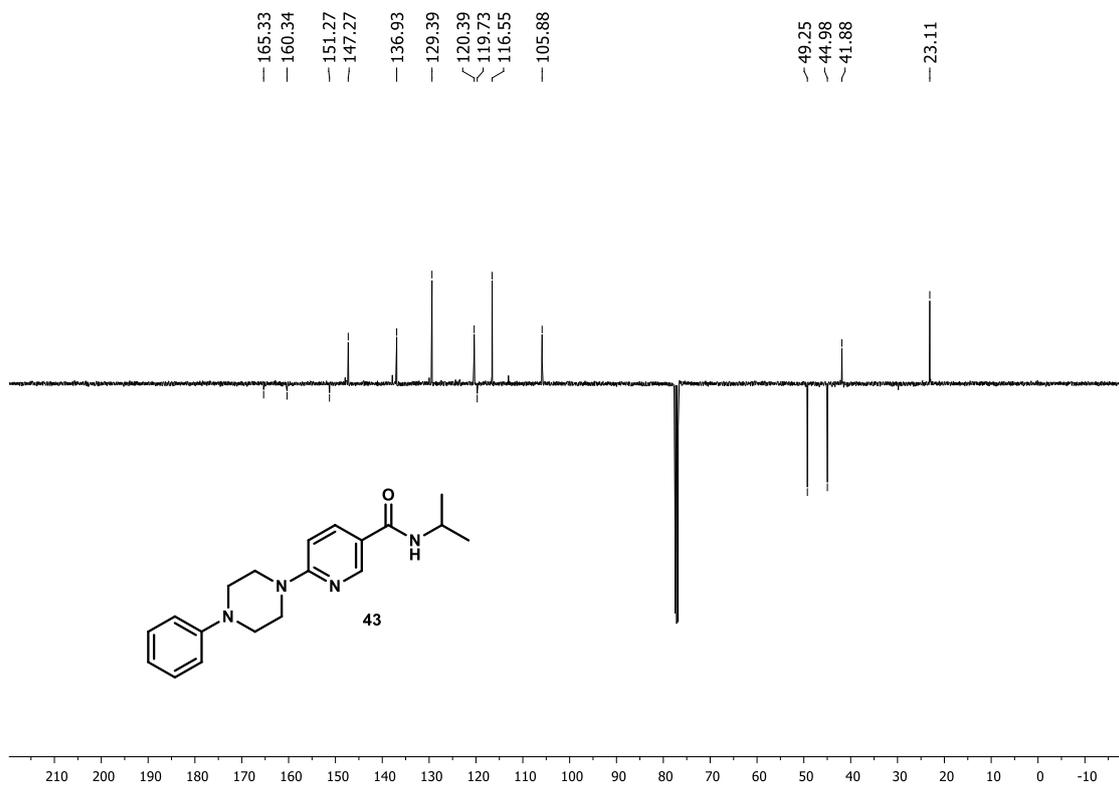


Figura A90 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **43**



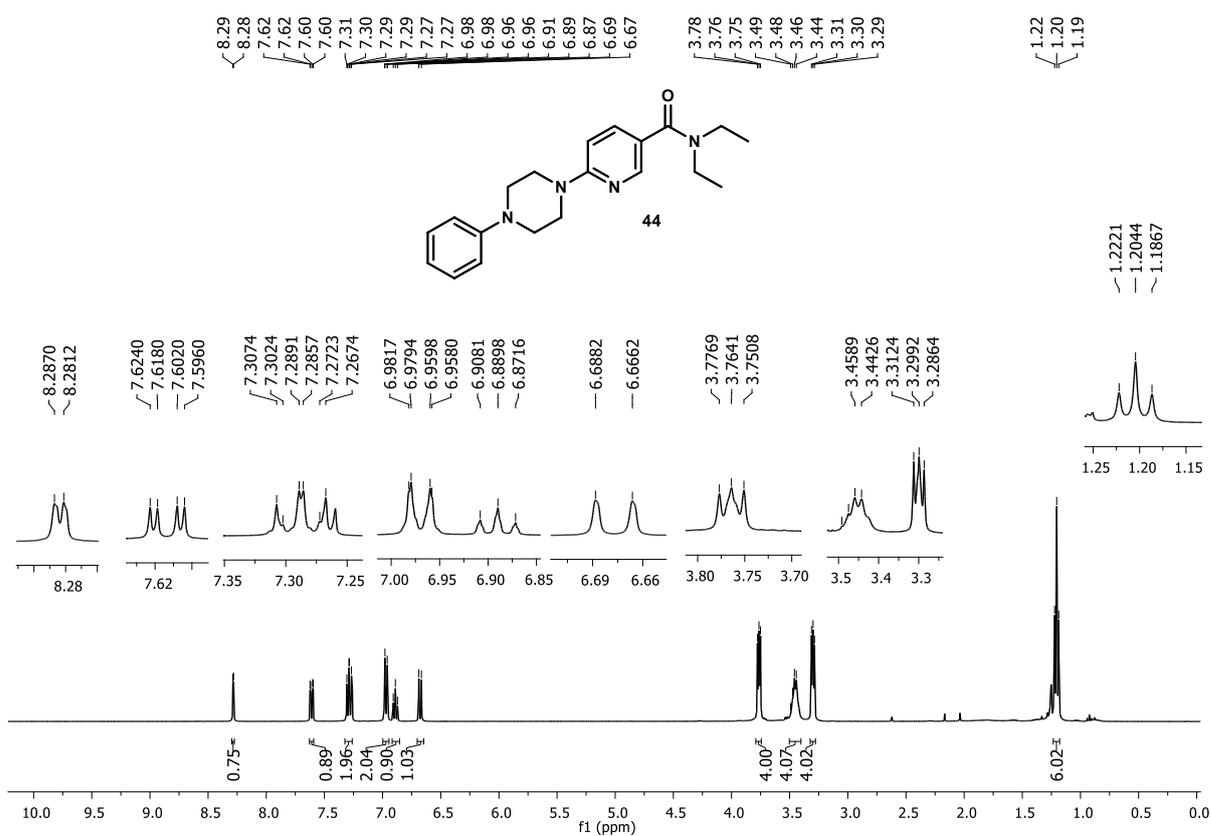


Figura A92 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **44**

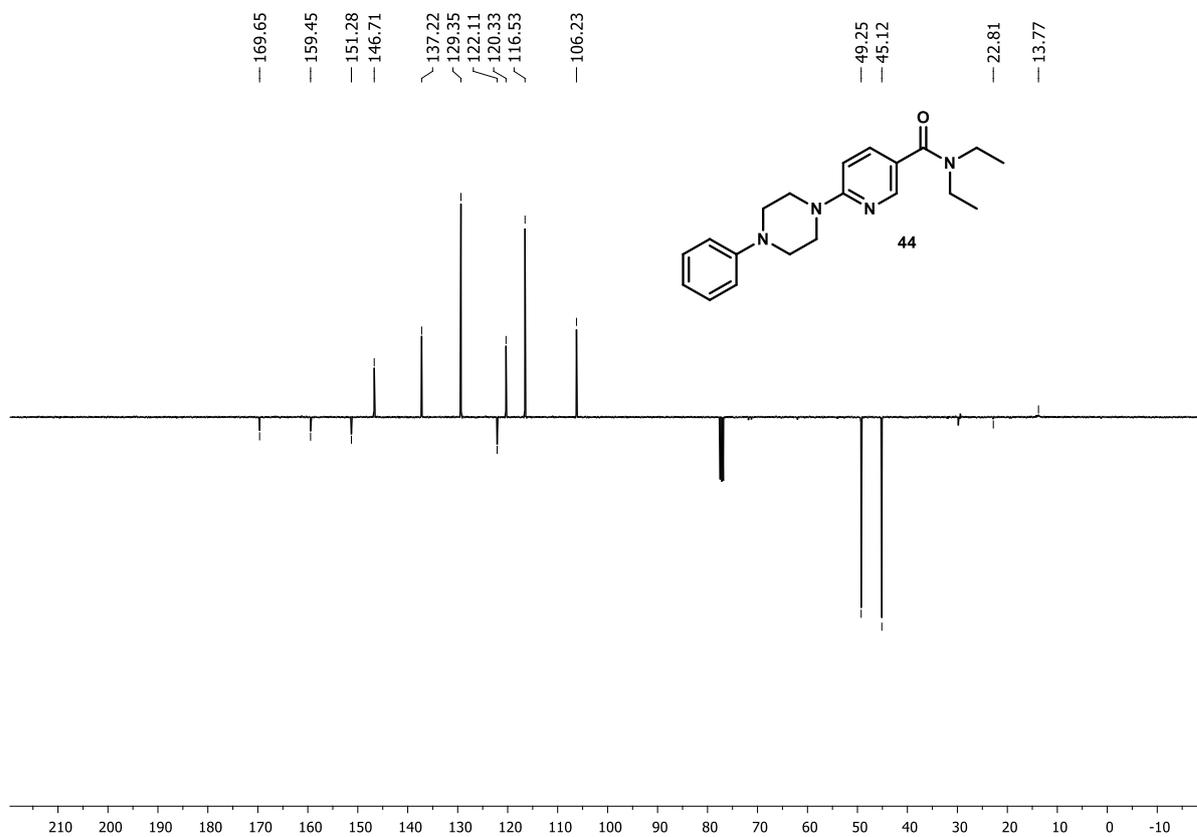


Figura A93 –Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) de **44**

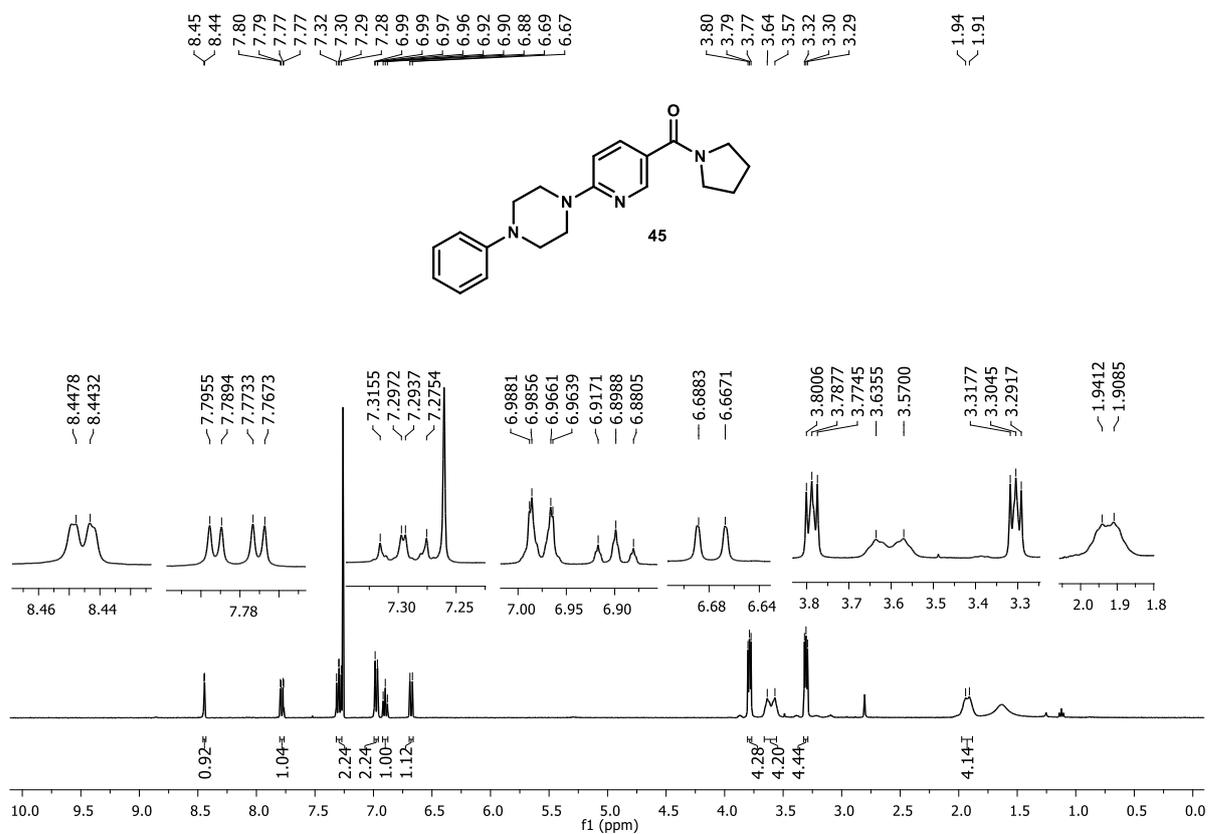


Figura A94 –Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 45

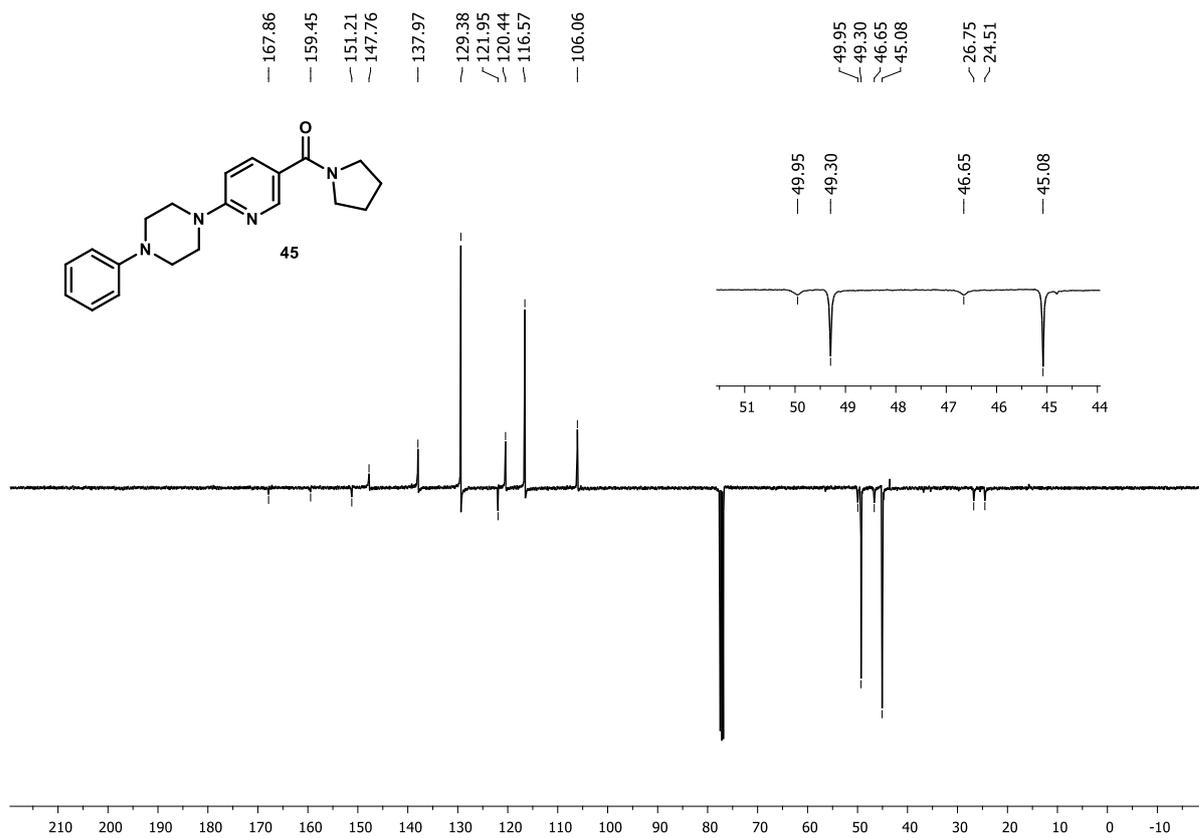
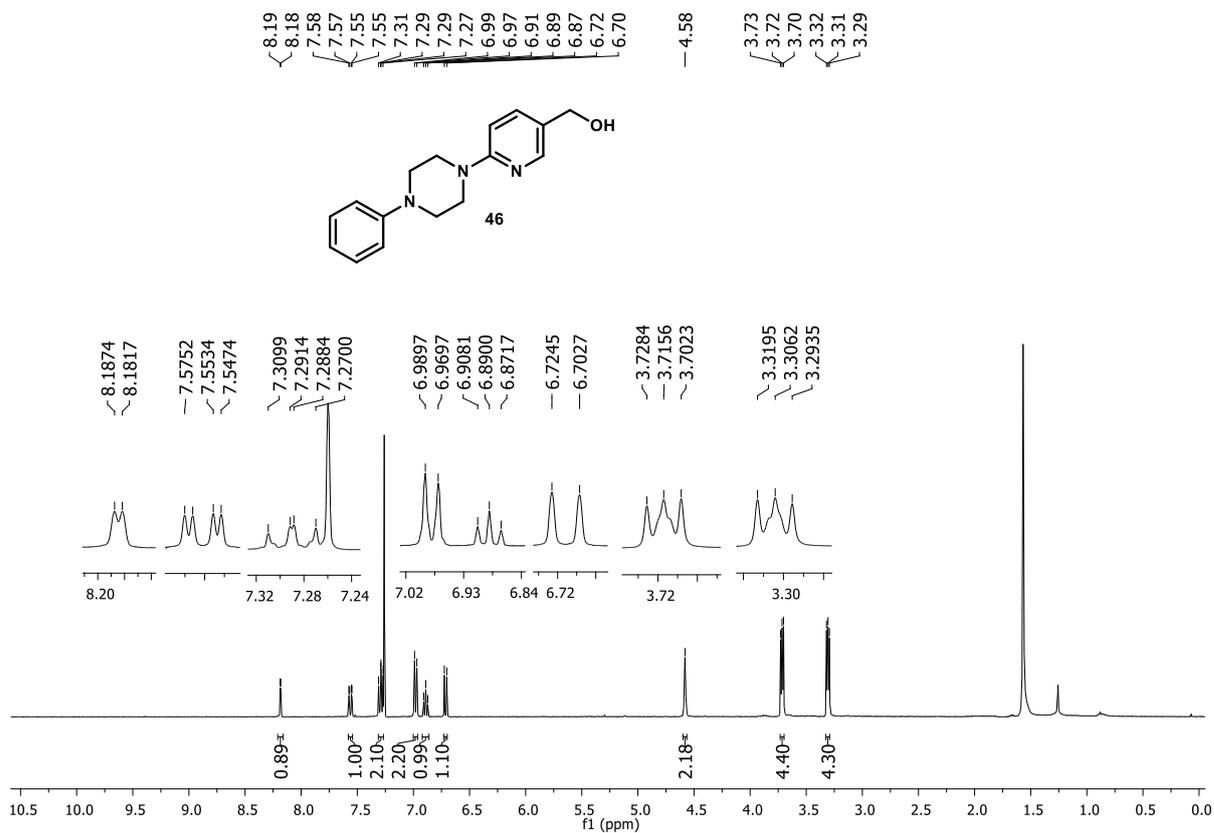
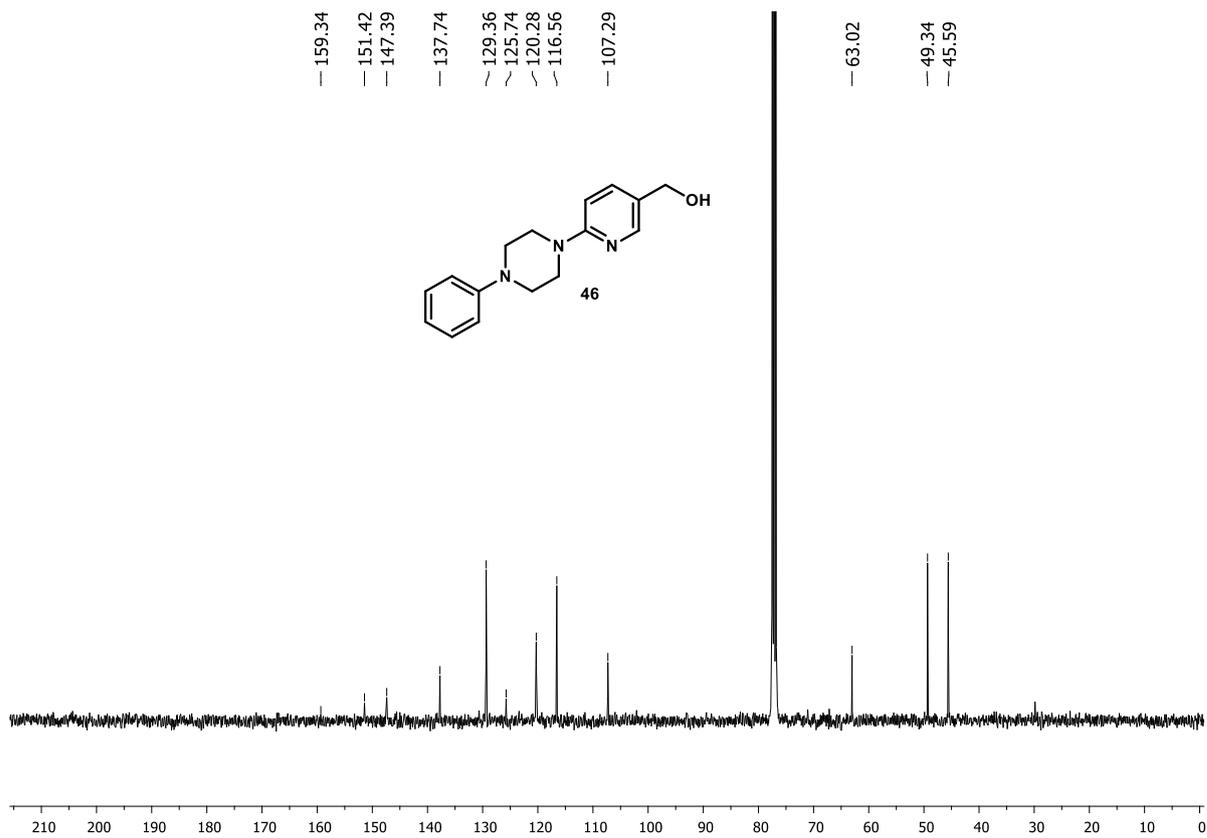
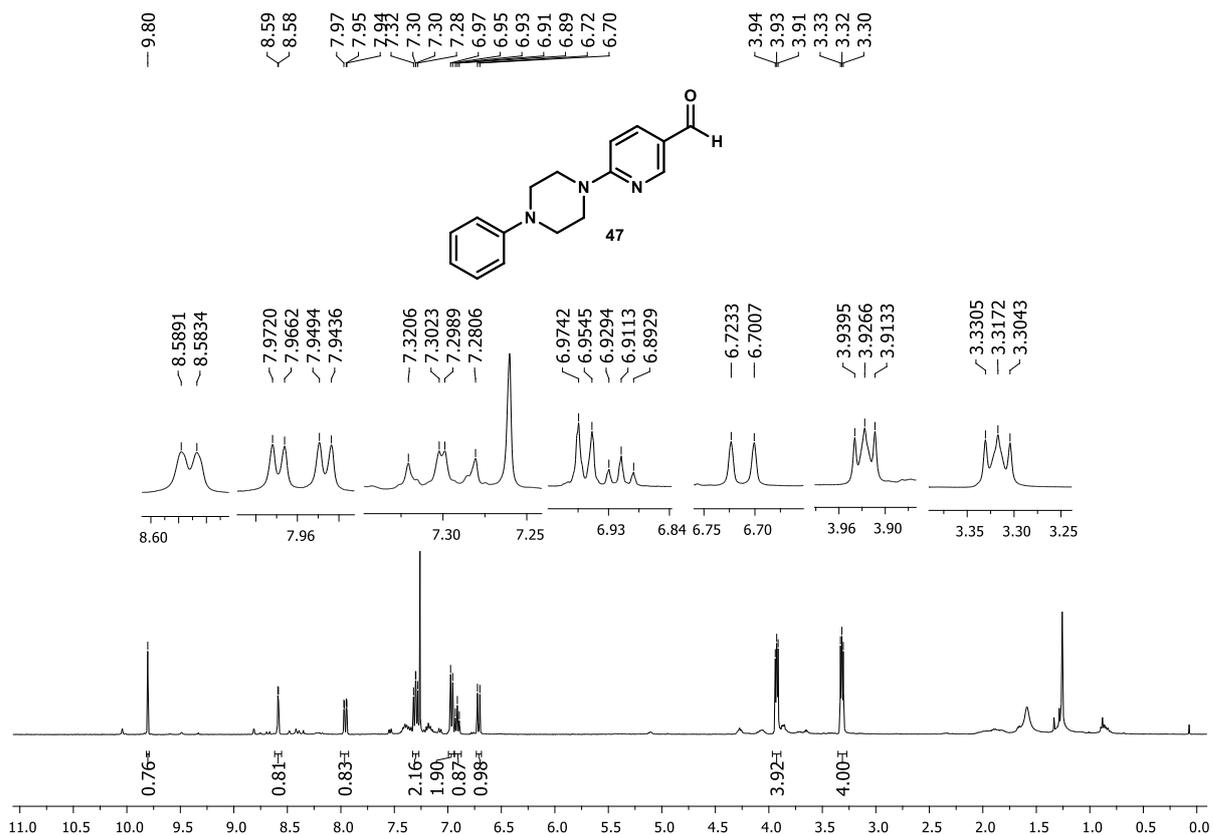
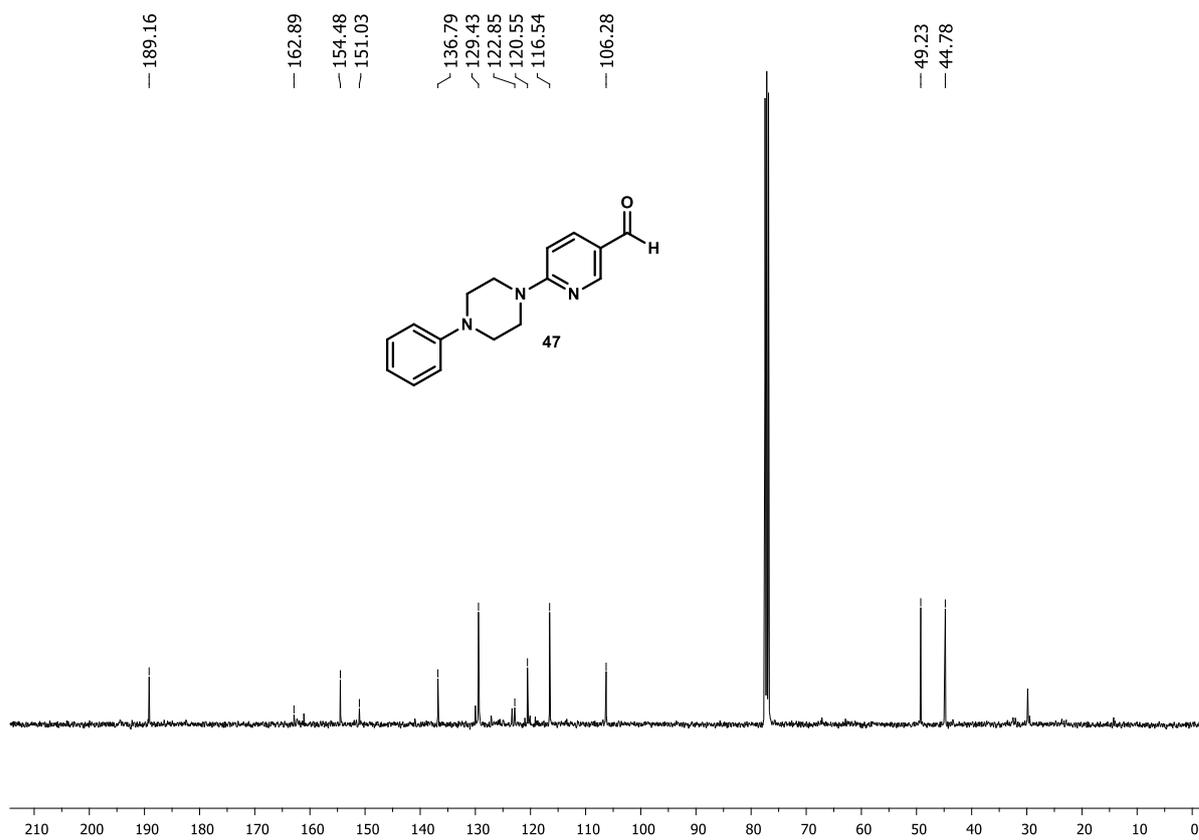


Figura A95 – Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) de **45**

Figura A96 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **46**



Figura A98 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **47**

Figura A99 – Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **47**

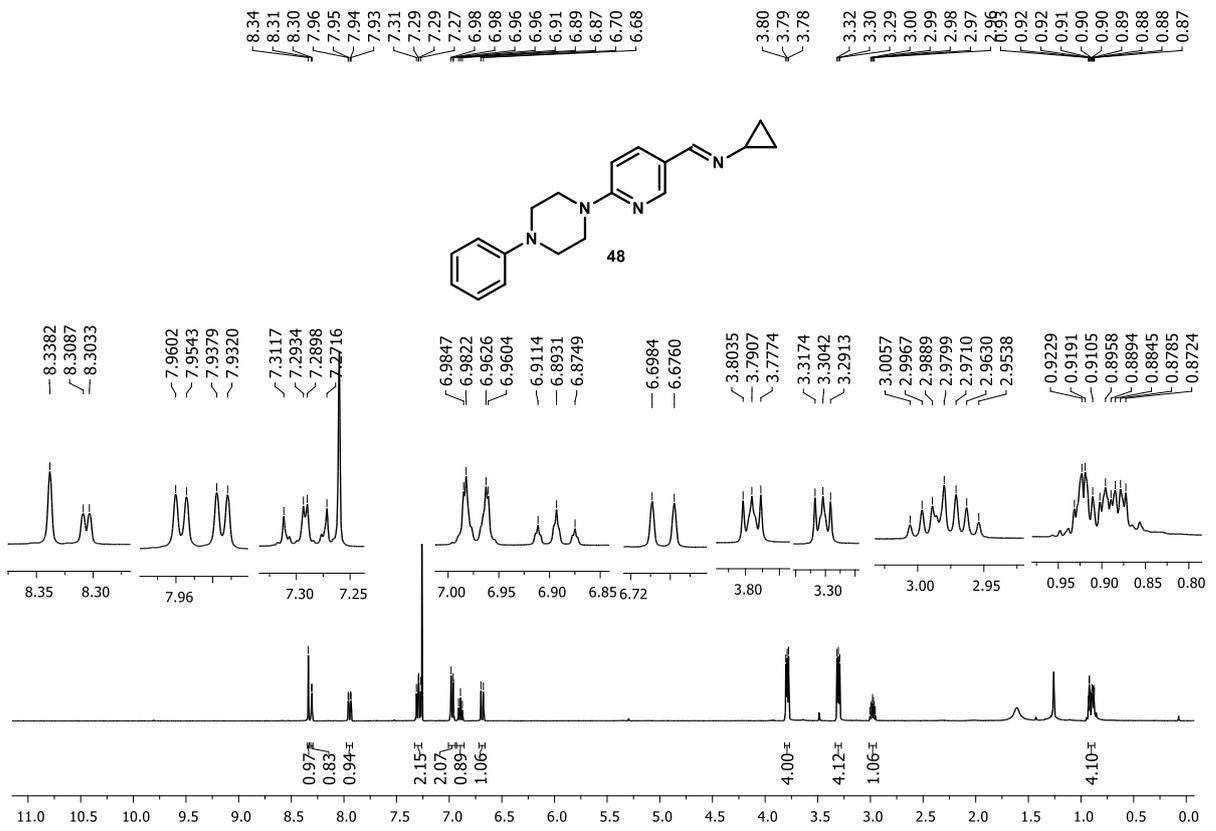


Figura A100 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **48**

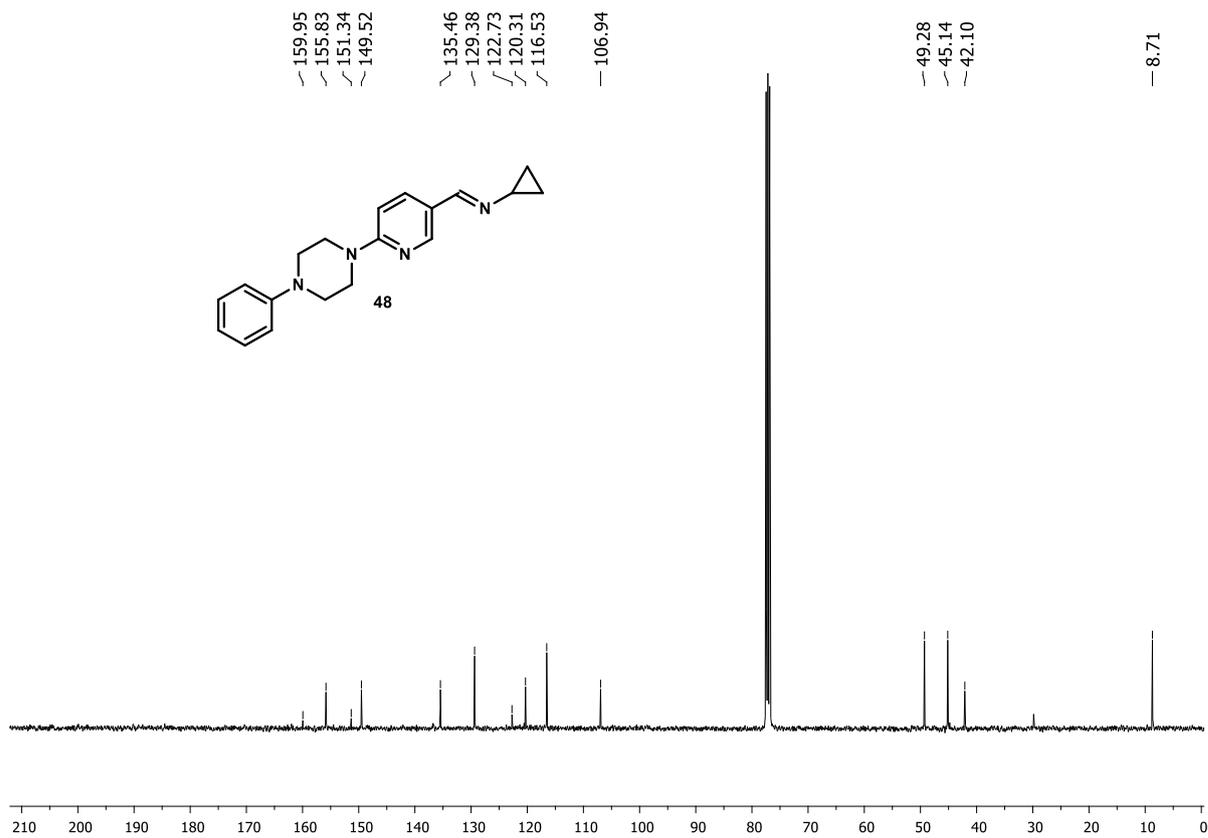
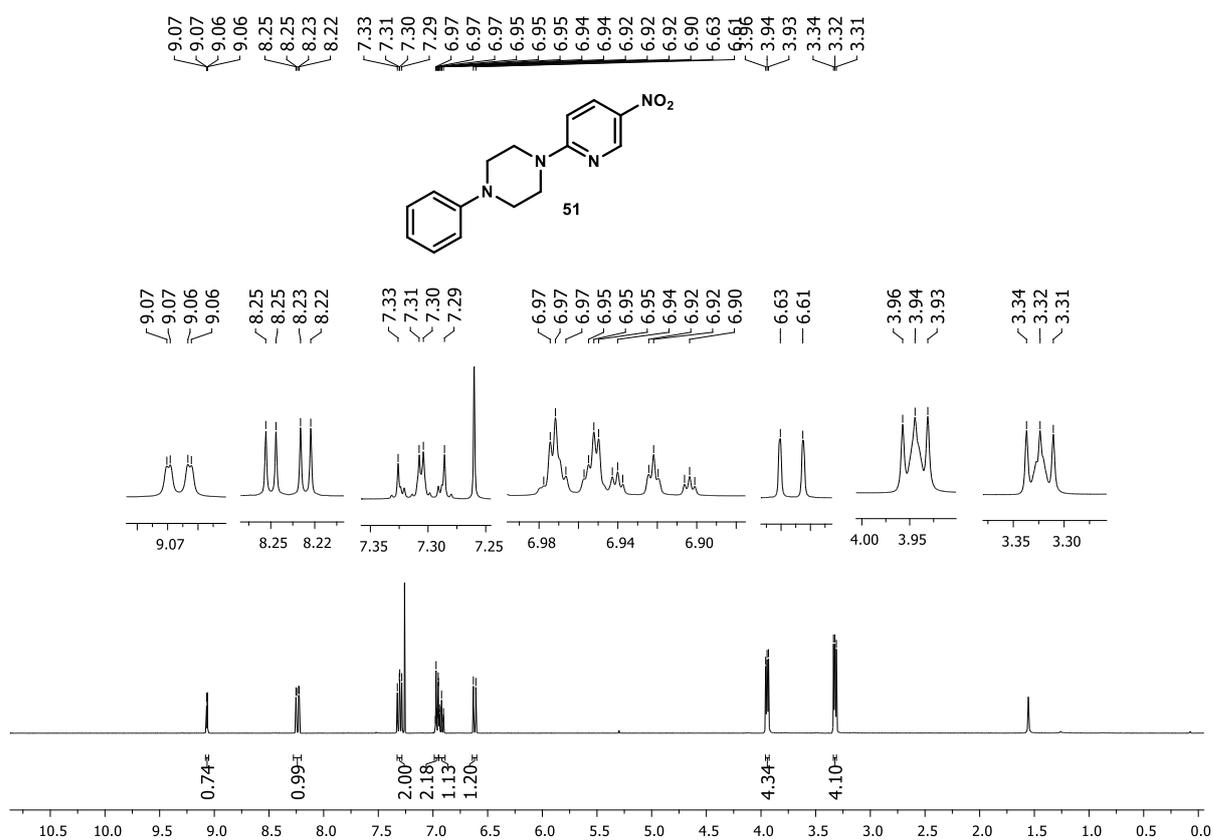


Figura A101 – Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **48**

Figura A102 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **51**

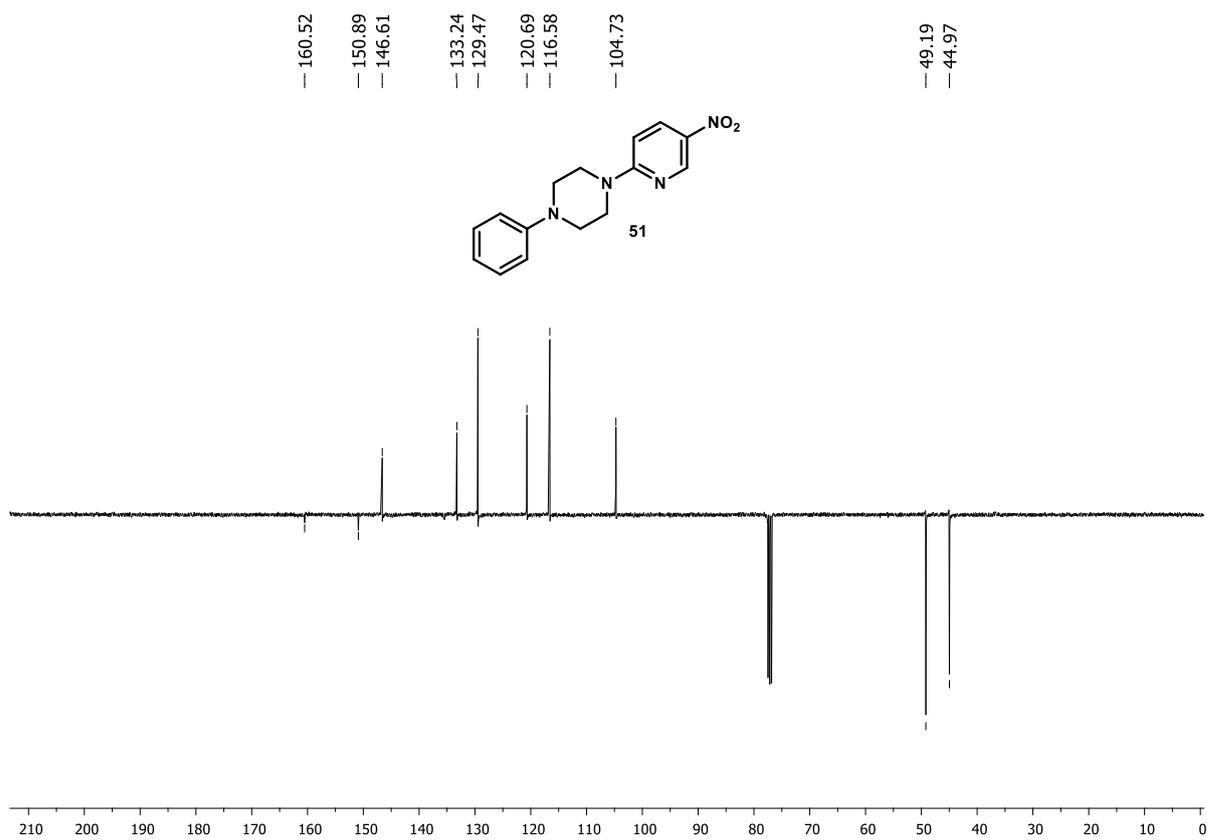
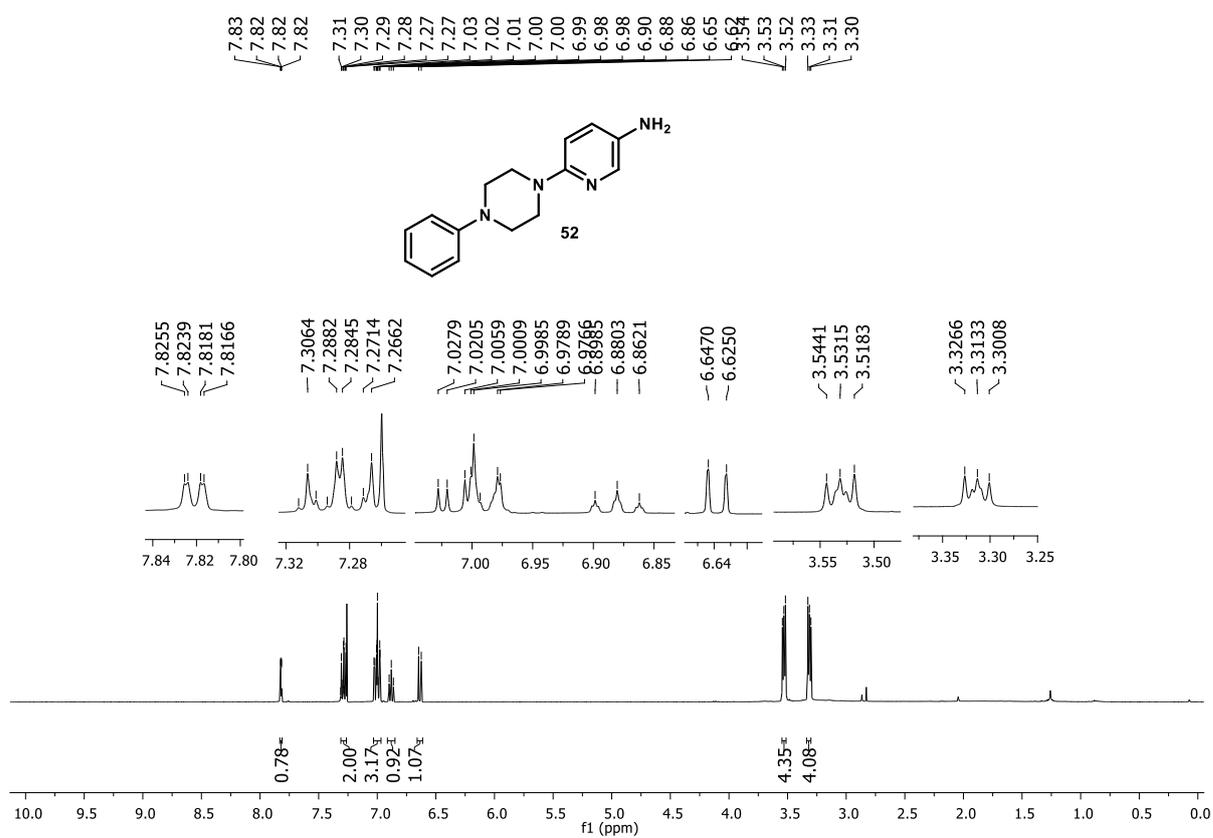


Figura A103 – Espectro de RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) de **51**

Figura A104 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **52**

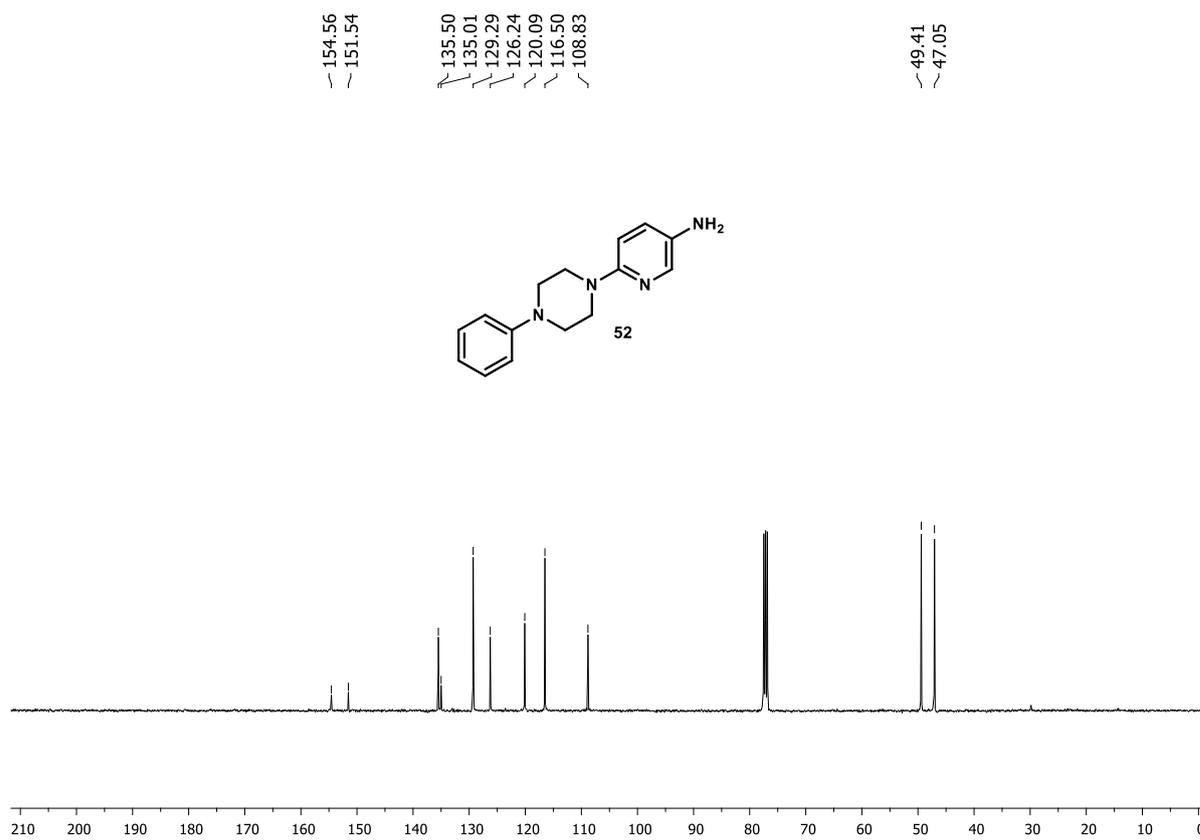


Figura A104 – Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) de **52**

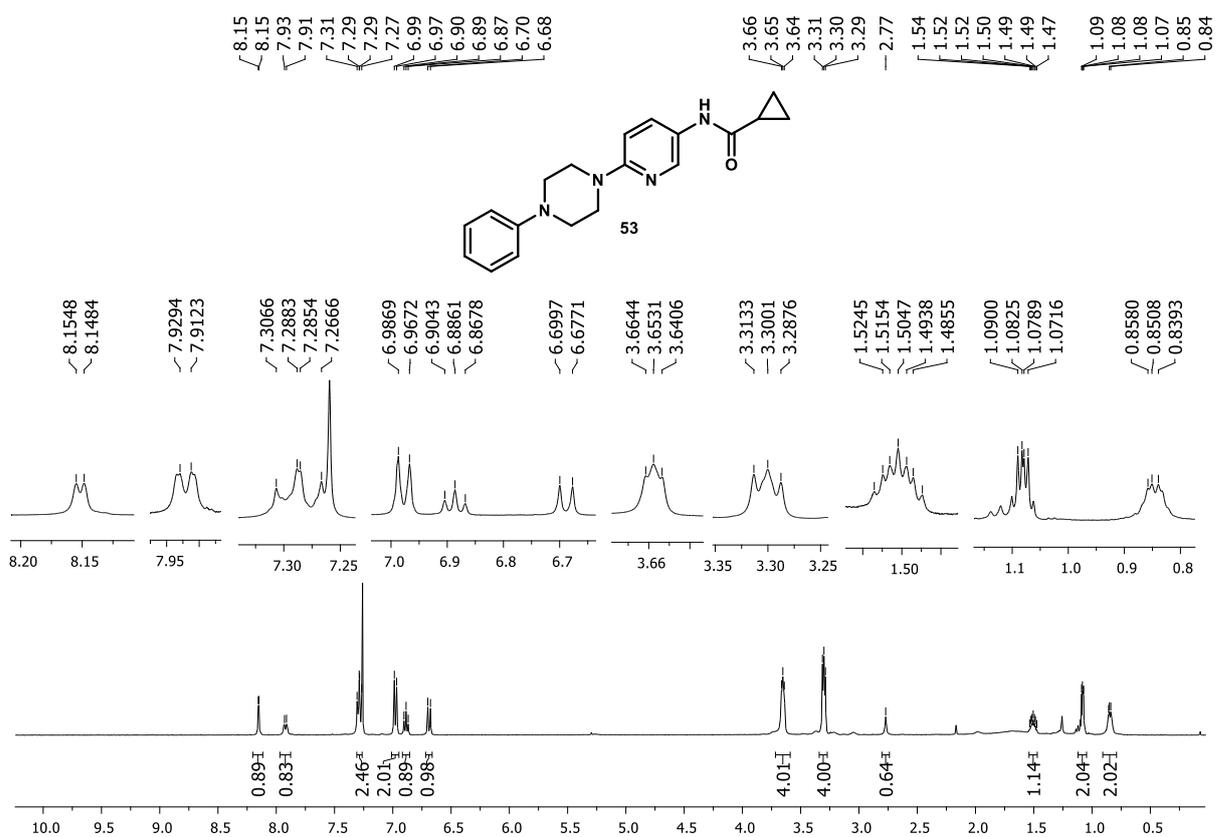


Figura A105 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **53**

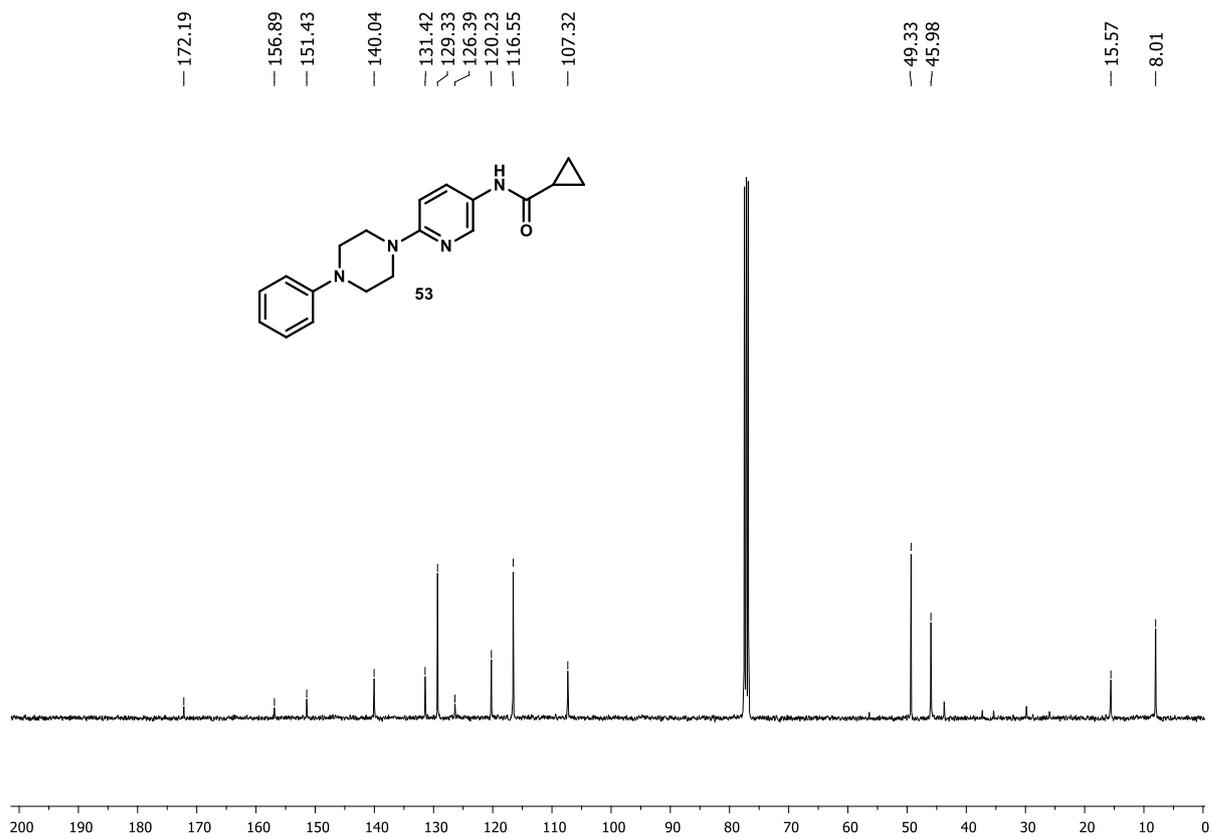


Figura A106 – Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **53**