

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Desenvolvimento de inibidores duais de histona desacetilase 6
(HDAC6) e tirosina quinase (TQ) com vistas ao tratamento do câncer**

Maurício Temotheo Tavares

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Parise-Filho
Universidade de São Paulo

Co-orientador:

Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Desenvolvimento de inibidores duais de histona desacetilase 6
(HDAC6) e tirosina quinase (TQ) com vistas ao tratamento do câncer**

Maurício Temotheo Tavares

VERSÃO CORRIGIDA

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Parise-Filho
Universidade de São Paulo

Co-orientador:

Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

São Paulo
2019

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

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

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

T231d	Tavares, Maurício Temotheo Desenvolvimento de inibidores duais de histona desacetilase 6 (HDAC6) e tirosina quinase (TQ) com vistas ao tratamento do câncer / Maurício Temotheo Tavares. - São Paulo, 2019. 84 p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Parise-Filho, Roberto Coorientador: Sant'Anna, Carlos Mauricio Rabello de
	1. histona desacetilase. 2. tirosina quinase. 3. inibidores duais. 4. câncer. 5. híbridos. I. T. II. Parise-Filho, Roberto, orientador. III. Sant'Anna, Carlos Mauricio Rabello de , coorientador.

Maurício Temotheo Tavares

**Desenvolvimento de inibidores duais de histona desacetilase 6 (HDAC6) e
tirosina quinase (TQ) com vistas ao tratamento do câncer**

Comissão julgadora

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
Primeiro examinador

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos
Segundo examinador

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira
Terceiro examinador

São Paulo, 29 de março 2019

*“Se você está atravessando o inferno,
não pare!”*

– Winston Churchill –

Dedicatória

À minha amada esposa, Marina Candido Primi. Pela cumplicidade, amor e companheirismo. Por sempre me dizer o que é preciso e não o que é fácil. Sua companhia me faz maior.

Aos meus heróis, meu queridos pais Honorato Marques Tavares e Walquíria da Silva Temotheo Tavares. Pelos exemplos, pelo amor, pela grandeza e dedicação. Minha admiração e respeito por vocês sempre serão infinitos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho. Por estar comigo em toda a minha jornada acadêmica, pela parceria, amizade e por ser meu pai científico. Sua didática será sempre um exemplo.

Essa conquista também é de vocês.

Agradecimentos

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro dado para a execução deste trabalho.

À minha esposa e meu grande amor, Marina Candido Primi. São tantas as histórias e momentos que vivemos, que por vezes parece-me não ser real. Cresci, mudei, amadureci, e você fez parte de todos esses momentos. Tenha sempre a certeza de que você foi a maior conquista desta minha jornada, e de que serei sempre grato por ter tido a chance de tê-la em minha vida. Admiro sua determinação, resiliência e sua coragem para encarar desafios que muitos não seriam capazes de enfrentar. Você me ensina a cada dia como ser melhor e maior. Muito obrigado pelo amor e companheirismo. Estarei sempre com você.

Aos meus amados pais, Walquíria da Silva Temotheo Tavares e Honorato Marques Tavares, meus alicerces. A educação e os valores que vocês me transmitiram farão sempre parte do que eu sou. Sem todo o esforço, dedicação e sacrifícios de vocês, eu não teria chegado até aqui. Vocês sempre me apoiaram quando estive em busca dos meus objetivos, mesmo que para isso fosse necessário que eu ficasse longe de vocês. Independente disto, o amor enorme que sentimos faz com que nunca estejamos separados. Carrego vocês sempre comigo, o tempo todo, e espero sempre ser capaz de orgulhar e alegrar vocês. Muito obrigado por estarem comigo e serem simplesmente fantásticos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Parise Filho, que ao longo dos últimos sete anos se tornou muito mais do que um orientador, ganhando um lugar especial no meu coração. Suas arrebatadoras aulas de Química Farmacêutica foram as grandes responsáveis pelo amor que sinto à esta área. Obrigado pelos conselhos, pela confiança, pela amizade e pelas oportunidades. Ao longo desses anos, você me transferiu uma quantidade exorbitante de conhecimentos, sempre com muita dedicação e empenho. Sabíamos desde o início que não seria fácil e mesmo assim seguimos em frente, eu acreditando em seu potencial, você sempre expandindo meus limites. Obrigado por sempre me manter com os pés no chão e, acima de tudo, por apontar minhas limitações, fazendo eu não me esquecer delas. Lamento pelos eventuais erros e falhas durante esta trajetória e agradeço pelos momentos em que, com sua maturidade, me apontou o caminho da luz, e me mostrou que ainda há muito para eu aprender. Muito obrigado professor, de coração.

Aos meus amados sogros, Rosana Candido Primi e Marcos Primi, e ao meu cunhado Caio Candido Primi. Obrigado por todos os momentos compartilhados, pelo apoio, e por me receberem tão bem na família de vocês. O meu carinho e amor por vocês é enorme.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna. Obrigado por ter aceitado meu convite de co-orientação, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelos infinitos conhecimentos transferidos. Serei eternamente grato por suas contribuições para o meu aprendizado e formação científica.

Aos parceiros Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo, Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto, e à mestranda Larissa Costa de Almeida, por acreditarem neste trabalho e conduzirem com maestria os ensaios biológicos. A contribuição de vocês engrandeceu muito este trabalho. Muito obrigado.

À Profa. Titular Dra. Elizabeth Igne Ferreira. Pelos ensinamentos acadêmicos, pelo amor à pesquisa e à docência. Obrigado pelo apoio em diversos momentos e também pelos conselhos valiosos, sempre me tratando como um estudante seu. Nunca esquecerei tudo o que a senhora fez por mim.

Aos pesquisadores Dr. Alan P. Kozikowski e Dr. Sida Shen, por terem me recebido durante meu estágio sanduíche na *University of Illinois at Chicago*. Os conhecimentos adquiridos durante esse período mudaram a forma como eu faço ciência e foram essenciais para a minha formação. Vocês são exemplos profissionais para mim em vários níveis.

Aos amigos, colegas, e ex-integrantes do Lapessb Micael Cunha, Thais Fernandes, Gustavo Vasco, Nuno Tavares, Mariana Frojuello, Alfredo Souza, Rosania Yang, e Karinne Prado. Obrigado por partilharem as dificuldades e estarem junto comigo dando sugestões e conselhos. Não posso deixar de citar nossos momentos de descontração, risadas e parcerias. Saibam que cada um de vocês é especial para mim à sua maneira. Os bares são muito mais divertidos com vocês. Obrigado grupo!

*“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, com que se sintam humildes.”*

– Leonardo da Vinci –

Muito obrigado a todos!

– Maurício Temotheo Tavares –

*“O importante é ganhar. Tudo e sempre.
Essa história de que o importante é competir não passa de demagogia.”*

– Ayrton Senna –

Resumo

TAVARES, M. T. **Desenvolvimento de inibidores duais de histona desacetilase 6 (HDAC6) e tirosina quinase (TQ) com vistas ao tratamento do câncer.** 2019. 84p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Câncer é a denominação atribuída a um conjunto de doenças que são responsáveis pela segunda maior causa de morte no Brasil e no mundo. A quimioterapia figura entre uma das estratégias utilizadas para o tratamento e cura do câncer, sendo amplamente empregada em estratégias terapêuticas isoladas, ou em associação à radioterapia e cirurgia. A enzima histona desacetilase 6 (HDAC6) é responsável por desacetilar a cadeia lateral de *N*-acetil lisinas em α -tubulinas, desempenhando papel crítico na dinâmica do citoesqueleto celular, estando superexpressa em uma série de neoplasias. Neste sentido, na última década os receptores tirosina quinase (TQ) foram os principais alvos de fármacos aprovados para o tratamento do câncer e de doenças autoimunes e continuam atraindo a atenção de grupos de pesquisa dada a exorbitante diversidade do quinoma humano. É sabido que a monoterapia seja com inibidores de HDAC, seja com inibidores TQ, apresenta problemas de toxicidade, reações adversas, ineficácia, resistência e/ou recidiva. Diversos estudos relatam o desenvolvimento de inibidores duais de HDAC-TQ, almejando tanto a simplificação do tratamento, quanto sinergismo terapêutico e redução de efeitos adversos. Assim, o presente trabalho apresenta o planejamento, síntese e avaliação da citotoxicidade de inibidores duais, potencialmente seletivos para HDAC6 e receptores TQ. No total, 23 compostos foram sintetizados entre 2 a 4 etapas. Todos os compostos finais foram caracterizados por RMN (^1H e ^{13}C) e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de MTT, em linhagens derivadas de tumores sólidos (HCT116 e MCF-7) e hematológicos (Jurkat e Namalwa). Os compostos apresentaram citotoxicidade em concentrações micro e nanomolares em todas as linhagens testadas, sendo que a linhagem MCF-7 foi a mais resistente à ação dos compostos, e as linhagens hematológicas foram as mais sensíveis. Os inibidores **4d-f** foram os mais ativos na triagem por MTT, com IC_{50} iguais a 20, 30 e 50 nM, respectivamente, em células Jurkat. Estudos mecanísticos do efeito citotóxico indicaram que os compostos **4d-f** exercem atividade de forma tempo-dependente, e majoritariamente por ação antiproliferativa, embora estímulos apoptóticos também tenham sido observados nos estudos. Simulações de ancoramento molecular (*docking*) e de relação entre as estruturas químicas dos compostos e suas respectivas atividades biológicas (REA) permitiram identificar padrões moleculares, propriedades físico-químicas e eletrônicas que potencialmente possuem relação com a atividade biológica dos compostos, permitindo futuras otimizações do arcabouço molecular desta série de compostos. Tomados em conjunto, os resultados deste trabalho revelam o potencial terapêutico de inibidores duais de HDAC6-TQ. Notadamente, os compostos apresentados aqui podem ser os primeiros potenciais inibidores duais de HDAC6-TQ a serem reportados na literatura.

Palavras-chave: histona desacetilase, tirosina quinase, inibidores duais, híbridos, quimioterapia, câncer.

Abstract

TAVARES, M. T. **Design of histone deacetylase 6 (HDAC6) and tyrosine kinase (TK) dual inhibitors for cancer treatment.** 2019. 84p. Ph.D. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Cancer is the name of a series of diseases that are the second main cause of death in Brazil and worldwide. Chemotherapy is one of the main strategies to treat and cure cancer, and has been widely applied as a single therapeutic agent, and in association with radiotherapy and surgery. Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates N-acetyllysine side chains of α tubulin, playing crucial role on cytoskeletal dynamics, and could be overexpressed in several cancers. Tyrosine kinase receptors (TK) have been the main targets of FDA-approved drugs through the last decade for both cancer and autoimmune diseases, and have been attracting special attention of research groups due to the exorbitant diversity of the human kinome. It is known that either HDAC or TK single therapy have toxicity issues, adverse effects, inefficacy, resistance and/or recidive. Therefore, many studies report the design of HDAC-TK dual inhibitors aiming simpler treatments, synergism of action and side effects reduction. Herein, the design, synthesis and cytotoxic evaluation of dual – and selective – HDAC6-TK inhibitors are presented. A total of 23 compounds were designed and synthesized through 2 to 4 steps. All final compounds were characterized by $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR and high-resolution mass spectrometry (HRMS). The cytotoxicity of compounds was determined by MTT assay for both solid (HCT116 and MCF-7 cells) and hematological cancers (Jurkat and Namalwa cells). Compounds exhibited micro and nanomolar ranges of cytotoxicity for all cell lines tested. MCF-7 cells were the most resistant against the treatment, and hematological cells were more susceptible to the cytotoxic effect of the compounds. Compounds **4d-f** were the most actives in the MTT screening against Jurkat cells ($\text{IC}_{50} = 20, 30$ and 50 nM, respectively). Mechanistic studies regarding the cytotoxic effects of **4d-f** indicated that the compounds induced cell death in a time-dependent manner mainly *via* cytostatic activity even though apoptotic stimuli were observed also. Molecular docking and structure-activity relationships (SARs) allowed the identification of molecular patterns, and physicochemical and electronic properties that potentially modulate the biological activity of these compounds, allowing further optimizations of the molecular scaffold for these series of compounds. Taken together, the results of this study reveal the therapeutic potential of HDAC6-TK dual inhibitors. Noteworthy, the compounds reported herein could be the first HDAC6-TK dual inhibitors ever reported in literature.

Keywords: histone deacetylase, tyrosine kinase, dual inhibitors, hybrids, chemotherapy, cancer.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Taxa de mortalidade global causada por câncer, em milhões de habitantes. 3
- Figura 2.** Fases do ciclo celular adaptado de Ward (2002). 4
- Figura 3.** Inibidores de quinase aprovados para tratamento do câncer. Os núcleos destacados em negrito representam a porção das moléculas que exploram a região de interação da adenina, no bolsão de ligação do ATP (presente no domínio catalítico das quinases). As regiões destacadas pelos quadros tracejados indicam os grupos farmacofóricos responsáveis pela ação não competitiva destes fármacos (porções que contém aceptores de Michael suscetíveis a ataques nucleofílicos). EGFR: receptor de fator de crescimento epidermal; PDGFR: receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas; Raf: gene de rápida aceleração de fibrossarcoma; B-Raf: gene B de rápida aceleração de fibrossarcoma; c-Kit: proteína quinase Kit; FGFR: receptor de fator de crescimento de fibroblasto; Btk: tirosina quinase de Bruton. 7
- Figura 4. (Esquerda)** Modelo genérico bidimensional do sítio de ligação do ATP em proteínas quinases. **(Direita)** Modelo tridimensional do sítio de ligação do ATP da enzima quinase dependente de ciclina 2 (CDK2). Cores semelhantes em ambos os modelos representam as mesmas regiões. Os inibidores de TQ normalmente exploraram uma ou mais das regiões indicadas pelas diferentes cores. Adaptado de Vulpetti & Bosotti (2004). 8
- Figura 5.** Inibidores de HDAC aprovados para uso terapêutico ou em estudos clínicos. 9
- Figura 6. (A)** Estrutura dos inibidores seletivos de HDAC6 ricolinostate e citarinostate. **(B)** Modelo esquemático bidimensional e tridimensional do bolsão catalítico 2 (CD2) da HDAC6. O átomo de zinco está representado como uma esfera cinza no fundo do bolsão tridimensional. Código PDB: 5g0i. Imagem gerada utilizando o programa PyMOL 1.3 (Schrödinger, LLC). 11
- Figura 7.** Demonstração do ganho de atividade antiarrítmica pela inserção do grupo metilsulfonamídico na posição 7 do sistema benzopirânico. 13
- Figura 8.** Estrutura de uma série de híbridos com ação dual em quinases e HDAC. O núcleo destacado em azul na imagem retrata a porção de cada estrutura responsável pela ação em quinases. A porção em preto das estruturas híbridas destaca a porção responsável pela ação em HDAC. O candidato a fármaco fimepinostate (canto inferior direito) é um exemplo bem sucedido de hibridação molecular no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais de ação dual. 14
- Figura 9.** Esquema geral de planejamento dos compostos das séries 1 e 2. 21
- Figura 10.** Estruturas dos compostos finais sintetizados neste trabalho. 27
- Figura 11.** Padrão de deslocamentos químicos dos compostos da série 1. 29
- Figura 12.** Padrão de deslocamentos químicos dos compostos da série 2. 30
- Figura 13.** Relação estrutura-atividade dos análogos da série 1. 33
- Figura 14.** Relação estrutura-atividade dos análogos da série 2. Em negrito destaca-se a região de *linker* dos compostos. 34
- Figura 15.** Cinética dos compostos **4d-f**, e dos controles positivos doxorubicina e vorinostate. Cinéticas efetuadas com incubações de 24, 48, e 72 h, em células Jurkat e Namalwa. Os valores de IC₅₀ de cada composto em cada tempo e linhagem seguem expressos na imagem. 36
- Figura 16.** Apoptose detectada por citometria de fluxo em células Namalwa tratadas com doxorubicina (0,4 µM), vorinostate (4,0 µM), e com os análogos **4d** (0,7 e 1,4 µM), **4e** (1,15 e 2,3 µM), e **4f** (0,5 e 1,0 µM) por 48 h usando método de coloração com anexina V-FITC/7AAD. Os gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes superior e inferior direito (Q2 mais Q3) cumulativamente contêm a população apoptótica (células anexina V positivas). FITC: isotiocianato de fluoresceína. 7AAD: 7-aminoactinomicina D. 37
- Figura 17.** Porcentagens de células Namalwa positivas para anexina V nos grupos DMSO 0,8%, doxorubicina (0,4 µM), vorinostate (4,0 µM), e para os análogos **4d** (0,7 e 1,4 µM), **4e** (1,15 e 2,3 µM), e **4f** (0,5 e 1,0 µM), obtidas por citometria de fluxo e marcação com 7AAD e anexina V-FITC. Os resultados são apresentados como média ± SD de três experimentos independentes. *(p<0,01); **(p<0,001); ***(p<0,0001), teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni, todos os pares foram analisados e as diferenças estatisticamente significantes estão indicadas. 38

- Figura 18.** (A) Intensidade de fluorescência média (MFI) da Ki67 determinada por citometria de fluxo, após incubação de células Namalwa tratadas com DMSO 0,8%, doxorubicina (0,4 μ M), vorinostat (4,0 μ M), e com os análogos **4d** (0,7 e 1,4 μ M), **4e** (1,15 e 2,3 μ M), e **4f** (0,5 e 1,0 μ M) por 48 h. Os traços do histograma são ilustrados por padrão de cores. (B) MFI da Ki-67 normalizada para as respectivas células do controle negativo (DMSO 0,8%). Os resultados são apresentados como média \pm SD de três experimentos independentes. *($p < 0,05$), teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni, todos os pares foram analisados e as diferenças estatisticamente significantes estão indicadas. MFI: *mean fluorescence intensity*. **38**
- Figura 19.** Conversão do sistema *N*-metilpicolinamídico do sorafenibe pelo hidroxamato do composto **10b**. **40**
- Figura 20.** Estudos de *docking* procedidos para HDAC6. As poses apresentadas são as mais frequentes e melhor ranqueadas para cada um dos análogos. (A) Pose do composto **4d** (carbonos em laranja). (B) Pose do composto **4e** (carbonos em ciano). (C) Pose do composto **4f** (carbonos em magenta). (D) Pose do composto **10b** (carbonos em azul marinho). (E) Estrutura empírica do nexturastate A (carbonos em verde) ligada ao domínio catalítico CD2 da HDAC6, determinada por Miyake e colaboradores (2016) – código PDB: 5g0i. (F) Poses dos análogos **4d-f** e **10b** sobrepostas à estrutura empírica do nexturastate A no interior da cavidade catalítica (CD2) da HDAC6. A estrutura *cartoon* da proteína, e seus carbonos, estão representados em branco. Átomo de zinco (Zn^{2+}) representado como esfera cinza escura. Oxigênio representado em vermelho. Nitrogênio representado em azul. Enxofre representado em amarelo. Flúor representado em ciano. Cloro representado em verde. Bromo representado em vinho. Ligações de hidrogênio e coordenações com Zn^{2+} representadas por linhas verdes tracejadas. Distâncias interatômicas em angstroms (Å). **42**
- Figura 21.** Estudos de *docking* procedidos para HER1 quinase. As poses apresentadas são as mais frequentes e melhor ranqueadas para cada um dos análogos. (A) Pose do composto **4d** (carbonos em laranja). (B) Pose do composto **4e** (carbonos em ciano). (C) Pose do composto **4f** (carbonos em magenta). (D) Pose do composto **10b** (carbonos em azul marinho). (E) Estrutura empírica do osimertinibe (carbonos em verde) ligado à cavidade de interação do ATP da HER1 quinase, determinada por Yosaatmadja e colaboradores (2015) – código PDB: 4zau. (F) Poses dos análogos **4d-f** e **10b** sobrepostas à estrutura empírica do osimertinibe na cavidade catalítica da HER1 quinase. A estrutura *cartoon* da proteína, e seus carbonos, estão representados em branco. Oxigênio representado em vermelho. Nitrogênio representado em azul. Enxofre representado em amarelo. Flúor representado em ciano. Cloro representado em verde. Bromo representado em vinho. Ligações de hidrogênio representadas por linhas verdes tracejadas. Distâncias interatômicas em angstroms (Å). **45**
- Figura 22.** Modelo de REA proposto para os análogos da série 1. *Ensaio enzimático necessário para a comprovação da hipótese. **47**
- Figura 23.** Modelo de REA proposto para os análogos da série 2. *Ensaio enzimático necessário para a comprovação da hipótese. **47**

Lista de Esquemas

- Esquema 1.** Rota sintética dos compostos da série 1. Reagentes e condições: **a)** anilina (1 eq.), HCl 10 M (0,8 eq.), isopropanol, refluxo, 18 h; **b)** 3- ou 4-(bromometil)benzoato de metila (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), acetona, refluxo, 18 h; **c)** NH₂OH (50 eq.), NaOH (8 eq.), THF-MeOH (1:1), 0 °C – t.a., 2 h. **23**
- Esquema 2.** Mecanismo reacional de S_NAr da 4-cloropirimidina. **24**
- Esquema 3.** Mecanismo reacional de S_N2 do brometo de benzila com a 9H-purina. **24**
- Esquema 4.** Mecanismo reacional de formação do ácido benzil-hidroxâmico a partir do benzoato de metila. **24**
- Esquema 5.** Rota sintética dos compostos da série 2. Reagentes e condições: **a)** isocianatos (1 eq.), CH₂Cl₂, t.a., 16 h; **b)** NH₂OH (50 eq.), NaOH (8 eq.), THF-MeOH (1:1), 0 °C – t.a., 2 h; **c)** 10% Pd/C, H₂, EtOH, t.a., 18 h; **d)** 4-nitrofenil isocianato, (1 eq.), CH₂Cl₂, t.a., 16 h. **25**
- Esquema 6.** Mecanismo de formação da difeniluréia, a partir da anilina (nucleófilo) e do isocianato de fenila. **26**
- Esquema 7.** Mecanismo de redução do cinamato de metila mediado por paládio. **26**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados gerais e de caracterização dos compostos finais.	28
Tabela 2. Dados biológicos dos compostos ensaiados.	32
Tabela 3. Simulações de ancoramento molecular realizadas neste trabalho.	39

Lista de Siglas e Abreviaturas

7AAD: 7-aminoactinomicina D

ACN: Acetonitrila

ATP: *Adenosine triphosphate* – Trifosfato de adenosina

AUC: *Area under the curve* – Área sobre a curva

B-RAF: *Rapidly accelerated fibrosarcoma B* – Fibrossarcoma rapidamente acelerado B

Btk: *Bruton's tyrosine kinase* – Tirosina quinase de Bruton

CADD: *Computer-assisted drug design* – Planejamento de fármacos auxiliado por computador

CCDC: *Cambridge Crystallographic Data Centre*

CD1 e CD2: *Catalytic domain 1 / 2* – Domínio catalítico 1 / 2

CDK: *Cyclin-dependent kinase* – Quinases dependentes de ciclinas

CKI: *Cyclin-dependent kinase inhibitor* – Inibidor de quinase dependente de ciclina

c-Kit: *Tyrosine-protein c kinase* – Proteína tirosina quinase c

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CryoEM: *Cryogenic electron microscopy* – Microscopia eletrônica criogênica

DCM: Diclorometano

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* – Receptor do fator de crescimento epidermal (ver HER)

ESI: *Electrospray ionization* – Ionização por elétron *spray*

EWG: *Electron withdrawing group* – Grupo elétron retirador

FDA: *Food and Drug Administration*

FGFR: *Fibroblast growth factor receptor* – Receptor de fator de crescimento de fibroblasto

FITC: *Fluorescein isothiocyanate* – Isotiocianato de fluoresceína

GI₅₀: *Concentration for 50% of growth inhibition* – Concentração inibitória de 50% do crescimento

HAT: Histona acetiltransferase

HBD: *Hydrogen-bond donor* – Doador de ligação de hidrogênio

HDAC: Histona desacetilase

HER: *Human epidermal growth factor receptor* – Receptor do fator de crescimento epidermal humano (ver EGFR)

HRMS: *High-resolution mass spectrometry* – Espectrometria de massas de alta resolução

HSP90: *Heat shock protein 90* – Proteína de choque térmico 90

HTS: *High-throughput screening* – Triagem de alto rendimento

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IC₅₀: *Inhibitory concentration for 50% inhibition* – Concentração inibitória para 50% de inibição

IPA: Isopropanol

LBDD: *Ligand-based drug design* – Planejamento de fármacos baseado no ligante

MCL: *Mantle cell lymphoma* – Linfoma de células do manto

MFI: *Mean fluorescence intensity* – Intensidade média de fluorescência

MMFF: *Merck Molecular Force Field*

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NCT: *NIH Clinical Trials*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PDA: *Photo-Diode Array* – Arranjo de fotodiodos

PDB: *Protein Data Bank*

PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptors* – Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase* – Fosfatidilinositol 3-quinase

RAF: *Rapidly accelerated fibrosarcoma* – Fibrossarcoma rapidamente acelerado

REA: Relação estrutura-atividade

RMN: Ressonância magnética nuclear

RMSD: *Root mean square deviation* – Raiz do desvio quadrático médio

RNA: *Ribonucleic acid* – Ácido ribonucleico

SAHA: *Suberoylanilide hydroxamic acid* – Ácido hidroxâmico da suberoilânilida (também chamado vorinostate)

SBDD: *Structure-based drug design* – Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor

SD: *Standard deviation* – Desvio padrão

SIRT: Sirtuína

S_N: Substituição nucleofílica

S_N2: Substituição nucleofílica bimolecular

S_NAr: Substituição nucleofílica aromática

THF: Tetraidrofurano

TMS: Tetrametilsilano

TQ: Tirosina quinase

VEGF: *Vascular endothelial growth factor receptor* – Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

ZBG: *Zinc-binding group* – Grupo quelante de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer: cenário epidemiológico	2
1.2 Fisiopatologia do câncer.....	3
1.3 Inibidores de quinases e de histona desacetilases como agentes antineoplásicos	6
1.4 Planejamento racional de fármacos	11
1.4.1 Modelagem molecular: estratégia in silico de auxílio ao planejamento de fármacos	16
1.4.1.1 Docking molecular.....	16
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	19
2.1 Objetivos específicos.....	20
2.2 Planejamento dos compostos	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1 Síntese e caracterização dos compostos	23
3.2 Triagem fenotípica por ensaio de citotoxicidade	31
3.2.1 Estudos de elucidação da ação citotóxica	35
3.3 Estudos <i>in silico</i>	38
3.3.1 Visão geral da REA proposta para os compostos das séries 1 e 2.....	46
4 CONCLUSÃO.....	48
4.1 Perspectivas.....	50
5 PARTE EXPERIMENTAL.....	51
5.1 Síntese e caracterização dos compostos	52
5.1.1 Procedimento geral A	53
5.1.2 Procedimento geral B	53
5.1.3 Procedimento geral C	54
5.1.4 Procedimento geral D	54
5.1.5 Procedimento geral E.....	54
5.1.6 Caracterização dos intermediários de síntese e compostos finais.....	55
5.2 Ensaio biológico	72
5.3 Estudos <i>in silico</i>	73
6 REFERÊNCIAS.....	75
Apêndices.....	A1
Apêndice 1 – Espectros e Cromatogramas	A2
Apêndice 2 – Currículo Lattes.....	A95
Apêndice 3 – Ficha do Aluno	A96

1. Introdução

Câncer, doença classificada como neoplasia maligna ou tumor maligno, é o termo genérico utilizado para definir um amplo grupo de doenças que acometem diversas células e tecidos. As características básicas do câncer consistem no rápido surgimento de células anormais a um determinado tecido, capazes de se multiplicar desordenadamente, de forma geralmente acelerada, com potencial para invadir e se multiplicar em tecidos adjacentes e/ou distantes ao seu local de surgimento.¹

As causas que levam ao câncer são extremamente variadas e podem ser classificadas em dois grupos: as causas internas; e as causas externas.² As causas internas podem ser associadas a mutações genéticas ligadas à capacidade do organismo em tolerar e se defender de agressões externas diversas, como a ação de carcinógenos químicos, físicos e biológicos. Causas externas remetem às condições do meio ambiente, hábitos e costumes do indivíduo, que podem induzir alterações celulares que, se ocorrerem em vias bioquímicas de controle celular, como a de morte celular programada (apoptose), podem desencadear a doença.³ Fatores econômicos e socioculturais corroboram o crescimento contínuo, ao longo dos últimos anos, dos casos de câncer registrados no mundo. Dados estatísticos e epidemiológicos sobre o câncer ilustram esta tendência.⁴

1.1 Câncer: cenário epidemiológico

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, acrônimo de *International Agency for Research on Cancer*), após as doenças do aparelho circulatório, o câncer é o conjunto de doenças que mais mata em todo o mundo. Em 2018, foram diagnosticados mais de 18 milhões de casos de câncer em todo o mundo, e mais de 9,5 milhões de óbitos registrados pelas agências de saúde. Dentre os diversos tumores malignos existentes, os que lideram em vítimas fatais são os cânceres de pulmão, fígado, estômago, próstata e mama (Figura 1).⁵ A projeção destes dados não se revela promissora pois são estimados pela OMS cerca de 12 milhões de óbitos em 2030, decorrentes de neoplasias malignas.¹ No Brasil, em 2016, mais de 212 mil brasileiros foram vítimas fatais de neoplasias malignas, sendo o câncer a segunda maior causa de morte no período, e responsável por 16,2% de todos os óbitos registrados, ficando atrás somente das doenças que acometem o aparelho circulatório.⁶

Conferindo maior gravidade à questão está o fato de a terapia antineoplásica ser de alto custo, bem como a tendência de envelhecimento populacional e o aumento crescente de novos casos, o que vem despertando a atenção de indústrias farmacêuticas e pesquisadores. Este fato pode ser comprovado pelo elevado número de medicamentos aprovados para o tratamento de doenças oncológicas, os quais atualmente correspondem a mais de 40% de todas as aprovações emitidas por agências sanitárias para uso terapêutico em humanos.⁷⁻⁹

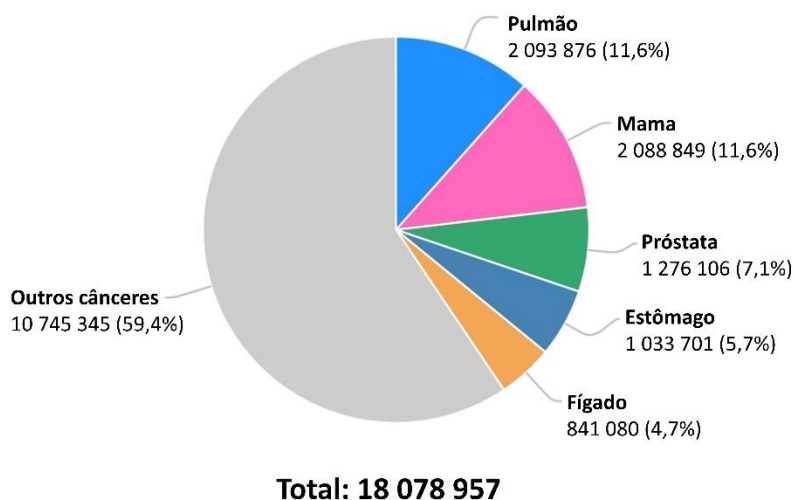


Figura 1. Taxa de mortalidade global causada por câncer, em milhões de habitantes.⁵

O desenvolvimento de novos fármacos com atividade antitumoral pode fornecer mais opções de tratamento aos pacientes, além de permitir que sejam traçadas estratégias terapêuticas mais eficientes, ou alternativas de associação farmacológica, aperfeiçoando assim a qualidade da atenção dispensada à saúde do paciente. Essa temática é constante no que se refere à quimioterapia do câncer, visto que o atual arsenal terapêutico continua a apresentar limitações de toxicidade e baixa seletividade, comprometendo a eficácia do tratamento.¹⁰

1.2 Fisiopatologia do câncer

Como mencionado anteriormente, câncer é um termo genérico usado para definir um amplo grupo de doenças distintas, que apresentam certas características semelhantes. Essas doenças podem ser consideradas de origem genética, isto pelo fato do fenótipo maligno resultar de alterações genotípicas que são transferidas de determinada célula mutada às suas descendentes.¹¹

A principal característica das células cancerosas é a presença de mutações e/ou deleções de informações genéticas relacionadas com os mecanismos de inibição e/ou indução da cascata apoptótica, fazendo com que a célula mutada, e suas descendentes, adquiram descontrolada capacidade de proliferação e perda de resposta frente a fatores de inibição do crescimento celular. Em estágios mais avançados, em que são observadas alterações profundas na fisiologia normal, tais células adquirem a capacidade de estimular a produção de vasos sanguíneos para a nutrição direta da massa tumoral, fenômeno denominado angiogênese, além de invadir tecidos vicinais e posteriormente colonizar regiões distantes a de sua gênese, evento conhecido como metástase.¹² Neste sentido, Hanahan e Weinberg¹³ elencaram dez características cruciais – ou *hallmarks* – que processos cancerosos comumente apresentam, a saber: i) resistência à morte celular; ii) manutenção do estímulo proliferativo; iii) evasão aos estímulos supressores de crescimento; iv) invasão tecidual e metástase;

v) imortalidade replicativa; vi) indução de angiogênese; vii) desregulação energética celular; viii) evasão à destruição por resposta imune; ix) inflamação tumor-dependente; x) instabilidade genética e mutagênese.¹³

De maneira geral, é sabido que o ciclo celular é regulado por fatores externos que, ao se ligarem a receptores tirosina quinase (TQ), ou acoplados à proteína G, disparam cascatas de sinalização que resultam na ativação de quinases promotoras do ciclo celular. Estas quinases, por sua vez, fosforilam fatores de transcrição necessários para a progressão do ciclo. Da mesma forma, o controle e progressão das fases do ciclo celular, após a ativação de fatores de transcrição, também ocorre por meio de quinases dependentes de ciclinas (CDK). Estas quinases, ao se complexarem com suas ciclinas correspondentes, fosforilam complexos proteicos que promovem a progressão do ciclo celular da fase G_1 (*gap* ou intervalo 1) para a etapa de síntese de DNA, denominada como fase S (Figura 2). De forma semelhante, quinases são responsáveis por fosforilar complexos proteicos que promovem a progressão do ciclo celular no final da fase G_2 (*gap* ou intervalo 2) à fase mitótica, denominada fase M (Figura 2).¹¹ Assim, é possível observar que receptores TQ estão envolvidos em uma série de eventos celulares intimamente relacionados com os já citados *hallmarks* do câncer, tendo destaque o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR, relação com o evento *ii* do parágrafo anterior), as já citadas CDK quinases (relação com o evento *iii* do parágrafo anterior), e o receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, relação com o evento *vi* do parágrafo anterior).¹³

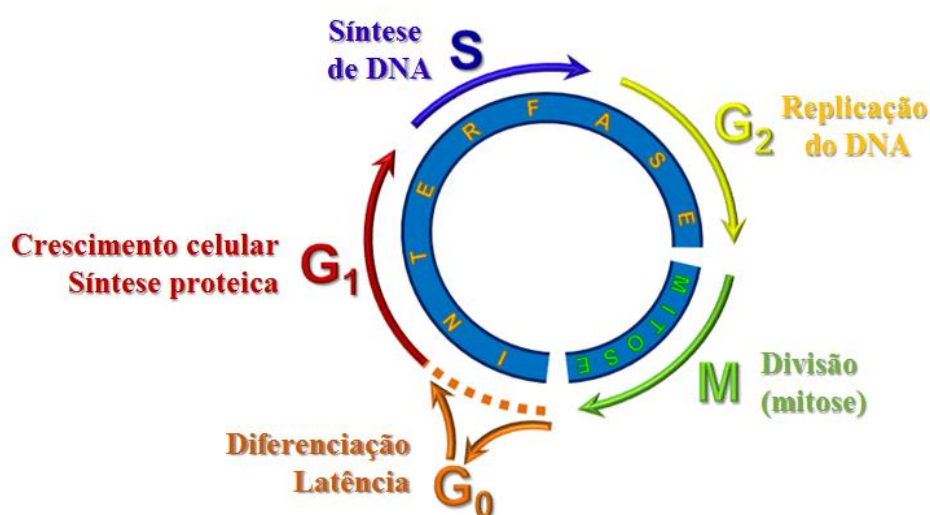


Figura 2. Fases do ciclo celular adaptado de Ward (2002).¹¹

Havendo danos importantes de informação genética, há um artifício de controle do ciclo celular coordenado por proteínas endógenas, cujas funções são inibir determinadas vias de sinalização quinase dependentes. Estas proteínas, chamadas de inibidoras de quinases dependentes de ciclinas (CKI), atuam em determinados grupos de quinases, impedindo a fosforilação de substratos e assim a progressão do ciclo celular, evitando que mutações danosas ao correto funcionamento celular sejam

propagadas às células descendentes, garantindo assim a homeostase celular, bem como do tecido em questão.¹⁴ Como diversas enzimas quinases se encontram superexpressas em uma série de tumores e estão presentes em praticamente todas as etapas de progressão do ciclo celular, o planejamento e síntese de moléculas com potencial atividade inibitória sobre quinases são bastante relevantes, principalmente para tumores que apresentam superatividade em vias bioquímicas quinase dependentes.¹⁵

Por outro lado, a origem, o desenvolvimento e a metástase tumoral podem ser influenciados por fatores epigenéticos. Epigenética pode ser definida como o conjunto de mudanças reversíveis na expressão gênica, que não resultam de mutações do material genético.¹⁶ Dentre as modulações epigenéticas conhecidas estão a metilação e acetilação de proteínas histonas, que são proteínas envolvidas no enovelamento e condensação da cromatina.¹⁷ Neste sentido, segmentos de cromatina com grande taxa de acetilação de histonas, resultam em segmentos descondensados de material genético que são passíveis de transcrição. Não obstante, segmentos de cromatina que apresentam ampla desacetilação das histonas possuem a informação genética condensada, tornando-a silenciada para transcrição gênica.¹⁷ O equilíbrio homeostático entre acetilação *versus* desacetilação de proteínas histonas é modulado por duas enzimas, conhecidas respectivamente como histona acetiltransferase (HAT) e histona desacetilase (HDAC). As HDAC são enzimas que modulam o grau de acetilação de lisinas em proteínas histonas.¹⁸ O grau de acetilação e desacetilação das cadeias laterais de lisinas é um fator crítico para o estado de condensação das cromatinas, bem como para o controle pós-translacional da regulação de genes. É sabido que as HDAC estão envolvidas em uma série de outros eventos de controle celular, sendo essenciais não apenas para o enovelamento de cromatinas, mas também para viabilizar sinalizações transcricionais e manter a homeostase celular.¹⁹ Os mamíferos possuem 18 HDAC conhecidas, que são filogeneticamente agrupadas em quatro classes de acordo com similaridades às desacetilases homólogas, produzidas por leveduras. A classe I é composta pelas enzimas HDAC1-3, e HDAC8. A classe II é subdividida em duas subclasses – IIa (HDAC4, 5, 7, e HDAC9) e subclasse IIb (HDAC6 e HDAC10). A classe III, também conhecida como sirtuínas (SIRT), compreende as enzimas SIRT1-7. A classe IV é constituída apenas por uma representante, a HDAC11. As HDAC das classes I, IIa, IIb e IV são conhecidas por serem amido-hidrolases dependentes de zinco (Zn^{2+}), e desacetilam o nitrogênio épsilon (ϵ) de lisinas não apenas em histonas, mas também de outros substratos proteicos. Já a atividade catalítica das sirtuínas (HDAC de classe III) utiliza como cofator NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), e hidrolisa não apenas grupos acetila, mas também crotonila e propionila.²⁰⁻²²

Dentre todas as isoformas de HDAC, a enzima HDAC6 tem ganhado atenção como potencial alvo terapêutico isolado, por apresentar características distintas das demais HDAC. Diferente de

outras HDAC, majoritariamente encontradas no núcleo, a HDAC6 é encontrada principalmente no citosol. Ademais, a HDAC6 é a única isoenzima dentre todas as HDAC a possuir dois domínios catalíticos conexos, denominados CD1 e CD2.²² Apesar de ambos os domínios catalíticos serem capazes de desacetilar histonas, apenas o CD2 é capaz de desacetilar outros substratos como α -tubulina, HSP90, cortactina, proteína fosfoligante 14-3-3 ζ e peroxirredoxina.²³⁻²⁶ É sabida que a ação catalítica da HDAC6 é majoritariamente sobre proteínas citosólicas e que a mesma não exerce ação catalítica significativa no controle pós-translacional de histonas. Neste sentido, a HDAC6 desempenha papel crítico na dinâmica do citoesqueleto e da rede de microtúbulos, consequentemente afetando o transporte intracelular, a morfologia e migração celular, bem como a divisão das células e a angiogênese.²⁷ Assim, distúrbios no funcionamento normal da HDAC6 têm sido fortemente correlacionados com a patogênese do câncer,^{28,29} bem como de desordens imunológicas e neurológicas como a doença de Alzheimer.^{30,31} É válido ressaltar que estudos que avaliaram os efeitos do *knockout* de diversas HDAC em camundongos indicaram que a supressão de HDAC6 não comprometeu o desenvolvimento “normal” dos embriões, apenas prejuízos na fixação de minerais pelo tecido ósseo e ligeira redução da resposta imune,³² ao passo que o *knockout* das HDAC1-4, -7, e -8 levaram à morte do embrião.³³ Considerados em conjunto, esses achados revelam o potencial tanto de quinases, quanto da enzima HDAC6 como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer e demais doenças.

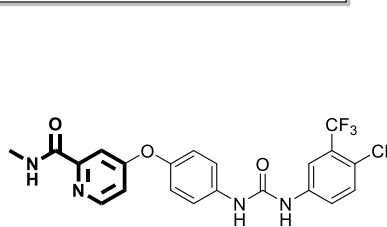
1.3 Inibidores de quinases e de histona desacetilases como agentes antineoplásicos

Na última década, os inibidores de TQ foram uma das classes terapêuticas que mais receberam aprovações de agências sanitárias para emprego terapêutico não apenas para o tratamento de tumores, mas também de artrite reumatoide e doenças autoimunes. Diversas são as proteínas quinases exploradas por fármacos de ação seletiva, ou de amplo espectro de inibição, podendo ser citados os receptores humanos epidermais (HER1-4), o receptor de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR), a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K, exemplo de quinase que atua em substrato lipídico), e a tirosina quinase de Bruton (Btk). Geralmente, os inibidores de TQ exploram o sítio de ligação do ATP (trifosfato de adenosina) presente no domínio catalítico das quinases, podendo ser por inibição competitiva, como observado para o sorafenibe, idealisibe, gefitinibe e pazobanibe (Figura 3); ou ainda por inibição não competitiva, exemplificada pelos fármacos afatinibe, osimertinibe, pirotinibe e acalabrutinibe (Figura 3).³⁴

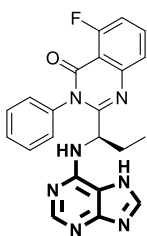
Os inibidores de TQ mostraram-se bem sucedidos para o tratamento de neoplasias que envolvem majoritariamente uma única quinase oncogênica, como a leucemia mieloide crônica, o estroma gastrintestinal e o carcinoma renal. Contudo, muitos inibidores de TQ não apresentaram

eficácia em estudos clínicos para cânceres com maior índice de mortalidade – pulmão, pâncreas, mama, próstata e colorretal – ou ainda, estes compostos apresentaram problemas de toxicidade e recidiva.³⁵ A razão do pouco sucesso terapêutico está no fato de muitos tumores serem capazes de escapar do efeito citotóxico proveniente da inibição de uma única quinase de determinada via de sinalização, seja por mutações do alvo em questão, seja por desenvolvimento de mecanismos de resistência pela massa tumoral, como a expressão de quinases alternativas àquela inibida, e a supressão de fosfatases, fazendo com que a tumor resista à ação do fármaco.^{36–38} Mesmo com a existência de mecanismos de resistência às ações dos inibidores de TQ, essa classe de quimioterápicos é responsável por importantes contribuições para a sobrevivência de pacientes portadores tanto de cânceres hematológicos, quanto de cânceres sólidos, e é empregada em uma série de estratégias terapêuticas contemporâneas.^{39,40} Ademais, estudos têm apontado que os mecanismos de resistência aos inibidores de TQ podem ser superados com abordagens terapêuticas multifatoriais, que utilizam associações farmacológicas que atacam a massa cancerosa por múltiplas vias de sinalização independentes entre si.^{41,42}

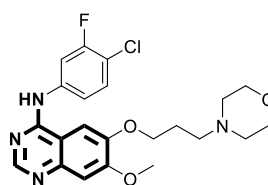
Inibidores competitivos



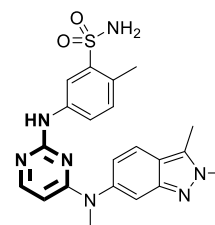
sorafenibe
(Nexavar®)
Multialvo: VEGFR, PDGFR, Raf e B-Raf



idelalisibe
(Zydelig®)
Alvo: PI3K δ

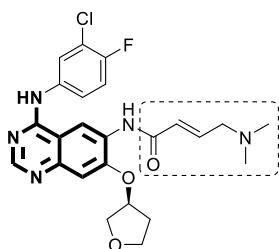


gefitinibe
(Iressa®)
Alvo: HER1 (EGFR)

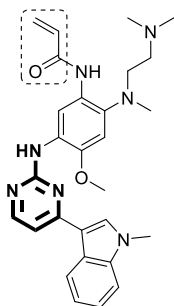


pazopanibe
(Votrient®)
Multialvo: VEGFR, PDGFR, c-Kit, FGFR

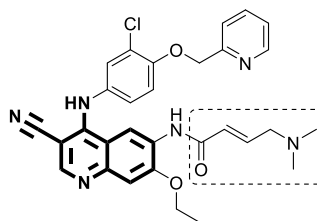
Inibidores não competitivos



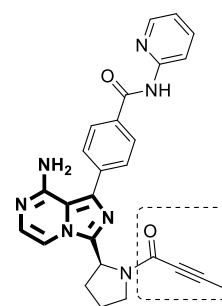
afatinibe
(Giotrif®)
Alvos: HER1 (EGFR) e HER2



osimertinibe
(Tagrisso®)
Alvo: HER1 (EGFR)



neratinibe
(Nerlynx®)
Multialvo: HER1-4



acalabrutinibe
(Calquence®)
Alvo: Btk

Figura 3. Inibidores de quinase aprovados para tratamento do câncer. Os núcleos destacados em negrito representam a porção das moléculas que exploram a região de interação da adenina, no bolsão de ligação do ATP (presente no domínio catalítico das quinases). As regiões destacadas pelos quadros tracejados indicam os grupos farmacofóricos responsáveis pela ação não competitiva destes fármacos (porções que contém aceptores de Michael suscetíveis a ataques nucleofílicos). EGFR: receptor de fator de crescimento epidermal; PDGFR: receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas; Raf: gene de rápida aceleração de fibrossarcoma; B-Raf: gene B de rápida aceleração de fibrossarcoma; c-Kit: proteína tirosina quinase c; FGFR: receptor de fator de crescimento de fibroblasto; Btk: tirosina quinase de Bruton.

De forma geral, quinases estão envolvidas em reações que transferem um grupo fosfato do ATP para substratos que contém – normalmente – tirosina, serina, ou treonina. A conformação secundária das quinases geralmente costuma apresentar alto grau de conservação e assume uma disposição bem específica, com dois grandes lóbulos separados por uma profunda fenda catalítica, onde se ligam o ATP e o substrato a receber o grupo fosfato, sendo válido ressaltar que a maioria dos inibidores de TQ se ligam no sítio de interação do ATP.⁴³ Como pode ser observado na Figura 4, a adenina do ATP realiza uma série de ligações de hidrogênio com a cadeia principal (*backbone*) da proteína, em uma região denominada *hinge* (“dobradiça”). Ainda considerando a região do *hinge*, as quinases possuem um aminoácido cuja cadeia lateral atua como limitadora da afinidade dos inibidores, sendo denominada como *gatekeeper* (porteiro). Mutações do aminoácido *gatekeeper* são amplamente reportadas na literatura como sendo as responsáveis pelo surgimento de resistência farmacológica em quadros de recidiva, e usualmente tornam o tratamento ineficaz.⁴⁴ A cavidade hidrofóbica presente no sítio de ligação do ATP é tipicamente explorada para se conferir seletividade aos inibidores, visto que apresenta variações dentre as diversas famílias de quinases e até mesmo entre isoenzimas de uma mesma classe.⁴³ Dada a natureza hidrofílica dos bolsões da ribose e de ligação do trifosfato, bem como da região exposta ao solvente, os inibidores de TQ que exploram essas regiões e que possuem grupos muito polares e volumosos, são bem tolerados e têm alta afinidade pelos seus alvos. Neste sentido, muitos inibidores de TQ costumam apresentar anéis morfolínicos, piperidínicos, e piperazínicos, que são inseridos às estruturas para modulação de propriedades físico-químicas, como a solubilidade e, como consequência, farmacocinéticas.⁴⁵ A exemplo, tem-se o pazopanibe e o gefitinibe (Figura 3), que apresentam respectivamente, o grupo fenilsulfonamídico e 3-morfolinopropoxílico em suas estruturas, que conferem maior solubilidade aos fármacos.³⁴

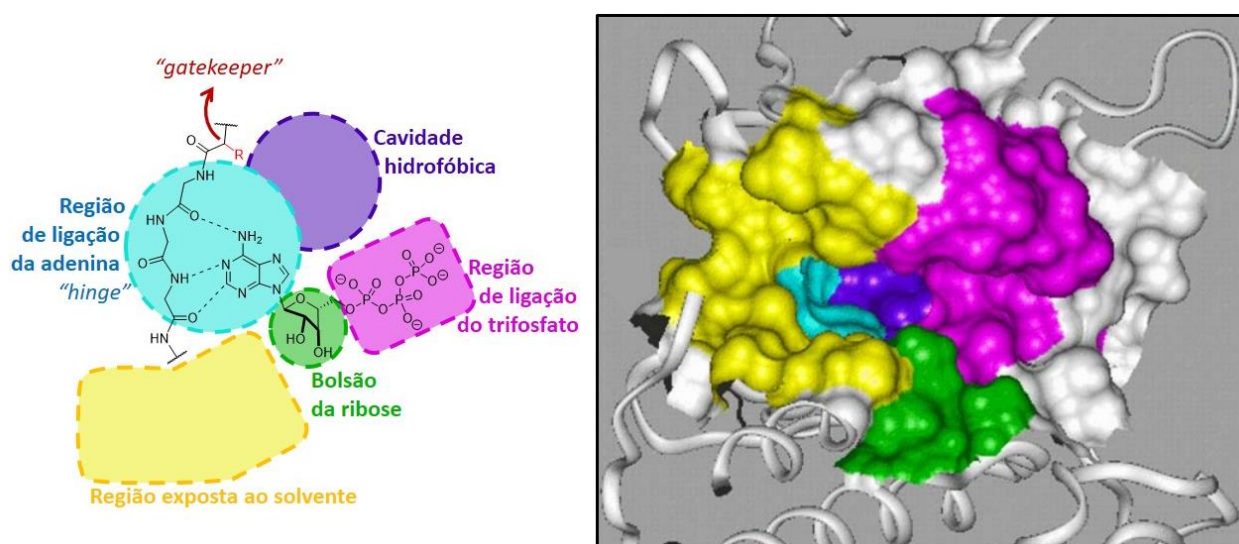


Figura 4. (Esquerda) Modelo genérico bidimensional do sítio de ligação do ATP em proteínas quinases. **(Direita)** Modelo tridimensional do sítio de ligação do ATP da enzima quinase dependente de ciclina 2 (CDK2). Cores semelhantes em ambos os modelos representam as mesmas regiões. Os inibidores de TQ normalmente exploraram uma ou mais das regiões indicadas pelas diferentes cores. Adaptado de Vulpetti & Bosotti (2004).⁴³

Por outro lado, os inibidores de HDAC também vêm ocupando um importante espaço no tratamento de neoplasias e no desenvolvimento de novos quimioterápicos. O vorinostat (Figura 5) foi o primeiro inibidor de HDAC aprovado para o tratamento de linfoma cutâneo de células T. Posteriormente, o bioprecursor romidepsina (Figura 5) recebeu aprovação para o tratamento da mesma doença, seguido do belinostat, que foi aprovado para o tratamento de linfoma de células T periférico e linfoma de células T reincidentes. O panobinostat foi o último inibidor de HDAC - até o momento - a receber aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*), para o tratamento de mieloma múltiplo. Na China, a chidamida (Figura 5) recebeu aprovação das autoridades sanitárias para o tratamento de linfoma de células T periférico, porém, carece de estudos clínicos em outras agências regulatórias. Ainda que fracamente, o ácido valpróico (Figura 5) também possui capacidade de inibir HDAC e seu emprego em associações farmacológicas é frequentemente observado em testes clínicos, devido ao seu histórico de emprego terapêutico. Os candidatos a fármacos abexinostat e entinostat (Figura 5) estão, atualmente, em estudos clínicos de fase II e III, respectivamente, para o tratamento de linfoma de células B (abexinostat) e linfoma de Hodgkin (entinostat).⁴⁶⁻⁴⁹ Como pode ser observado na Figura 5, o modelo farmacofórico dos inibidores de HDAC é composto por três porções estruturais ligadas entre si, a saber: i) um grupo quelante de zinco (ZBG – *zinc-binding group*), que interage com o zinco (Zn^{2+}) presente no fundo da cavidade catalítica da enzima; ii) um espaçante ou *linker*, que realiza interações no túnel estreito que dá acesso ao fundo da cavidade; e iii) a região de superfície, ou *cap*, que explora interações na superfície da cavidade catalítica.⁵⁰

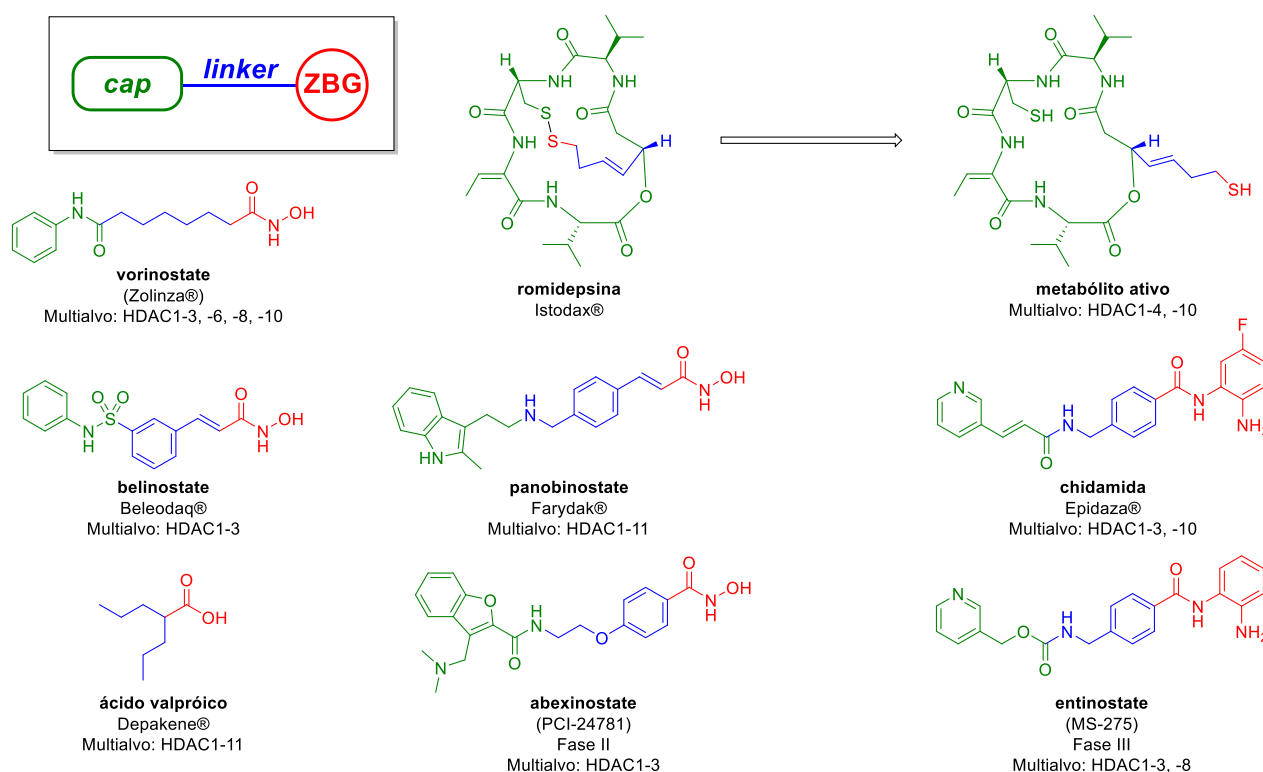


Figura 5. Modelo farmacofórico dos inibidores de HDAC e a estrutura dos inibidores de HDAC aprovados para uso terapêutico, ou em estudos clínicos.

Como pode ser observado na Figura 5, todos os inibidores de HDAC aprovados, ou que estão em estudos clínicos apresentam amplo espectro inibitório, não possuindo ação seletiva a uma isoenzima específica. É sabido que a ampla inibição de HDAC apresenta uma série de efeitos adversos incluindo cardiotoxicidade, mielossupressão, trombocitopenia, neutropenia, além de diarreia, náusea, vômito e fadiga.⁵¹⁻⁵³ Estes efeitos adversos poderiam, eventualmente, ser contornados com a inibição seletiva apenas da(s) isoforma(s) intimamente relacionadas com a patogênese do tumor.

É verdade que nenhum inibidor seletivo de HDAC6 foi aprovado para uso clínico até o momento. No entanto, três candidatos a fármaco, seletivos para HDAC6, seguem em estudos clínicos para o tratamento do câncer. O ricolinostate (Figura 6A) foi o primeiro inibidor de HDAC6 a alcançar os estudos clínicos em monoterapia, ou em associação farmacológica com lenalidomida, dexametasona, bortezomibe e paclitaxel.⁵⁴ É válido ressaltar que o ricolinostate tem apresentado pouca eficácia na monoterapia de pacientes com mieloma múltiplo e cânceres linfoides, mas em associação tem apresentado resultados promissores.⁵⁵ O citarinostate (Figura 6A) também se encontra em estudos clínicos para melanoma (em monoterapia), e em associação à imunoterapia com nivolumabe e ipilimumabe para o tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas.⁵⁶ Apesar da literatura não conter a estrutura, tampouco informações detalhadas a respeito do composto KA2507, este inibidor de HDAC6 se encontra atualmente em estudo clínico de fase I para o tratamento de melanoma e outros tumores sólidos (registrado sob o número 03008018 no NCT – *NIH Clinical Trials*).⁵⁷

Conforme mencionado acima, o modelo farmacofórico clássico dos inibidores de HDAC (Figura 5 e 6C) é composto por três porções estruturais ligadas entre si, o grupo quelante de zinco (ZBG), um *linker* e a região de *cap*.⁵⁰ Muitos estudos reportam o desenvolvimento de inibidores seletivos de HDAC6 que possuem tal seletividade por explorar interações específicas na região do *cap* da enzima, como é o caso da ricolinostate e do citarinostate.^{54,56} Ademais, novas abordagens de desenvolvimento de inibidores seletivos de HDAC6 consideram o uso de *linkers* HDAC6-seletivos, como o caso dos inibidores tubastatina A e nexturastate A (Figura 6B).^{58,59} Uma vez que o canal da cavidade catalítica da HDAC6 é mais tolerante a *linkers* volumosos, se comparado aos canais das demais isoformas de HDAC, abordagens contemporâneas – e bem sucedidas – de planejamento de compostos seletivos para HDAC6 têm adotado sistemas benzílicos ou heterocíclicos para a região de linker, resultando em estruturas altamente seletivas.^{60,61} Como pode ser observado na Figura 6C, a superfície da cavidade catalítica da HDAC6 permite que o *cap* destes inibidores tolere ampla diversidade molecular, porém, o túnel e o fundo da cavidade são bastante sensíveis a modificações drásticas.⁵⁰ Normalmente, a região de *linker* dos inibidores são cadeias alifáticas, grupos benzila/fenila, ou grupos heterocíclicos. Para a região de ZBG, o ácido hidroxâmico é o grupo

quelante que geralmente confere compostos mais potentes em uma determinada série, devido à alta capacidade de interação com o zinco e demais aminoácidos do fundo do bolsão (Figura 6C). Ademais, outros grupos quelantes também são reportados, como mercaptoacetamidas, *orto*-aminobenzamidas e tióis, que são amplamente explorados no desenvolvimento de fármacos, tópico discutido a seguir.⁵⁰

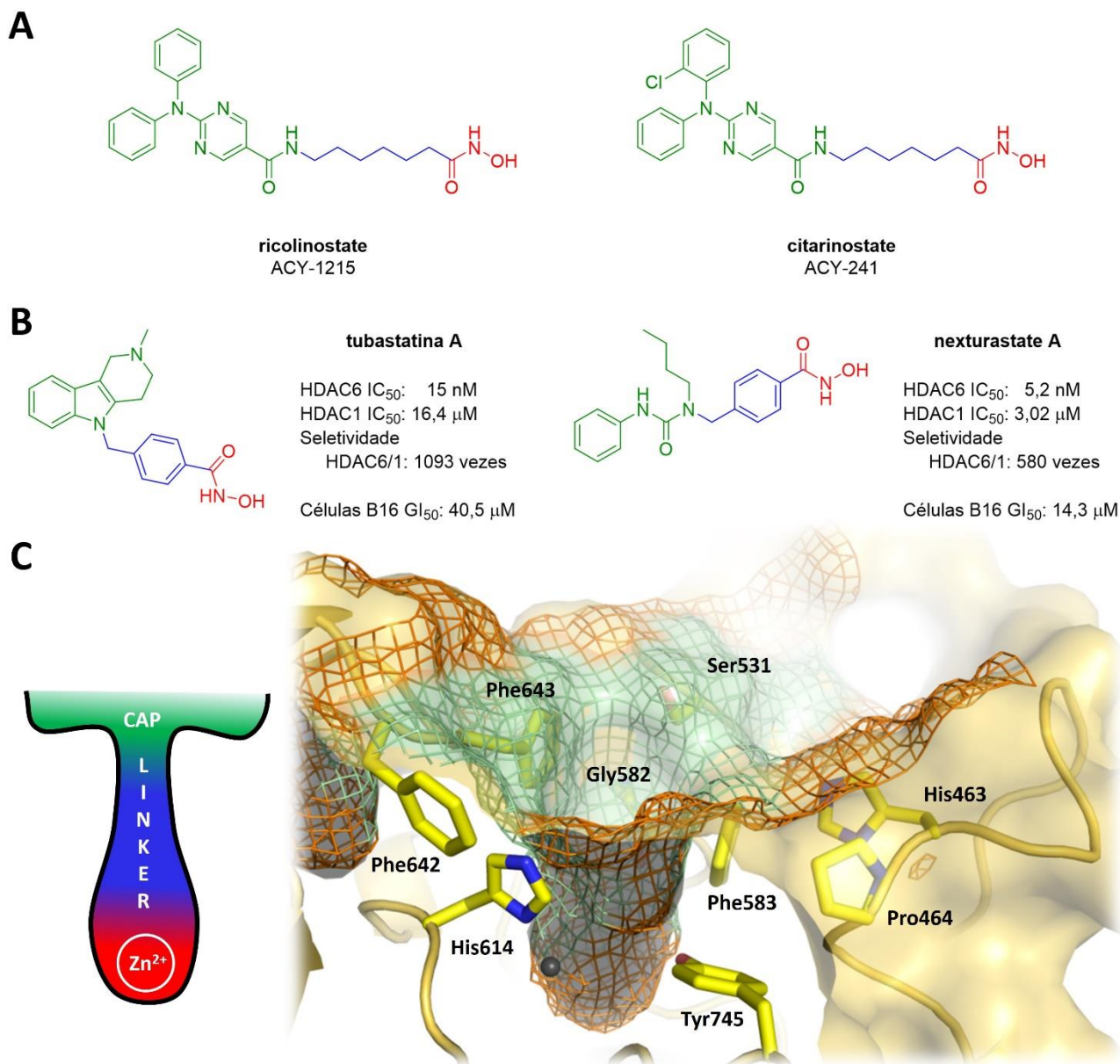


Figura 6. (A) Estrutura dos inibidores seletivos de HDAC6 ricolinostate e citarinosate, cujas seletividades são conferidas pela região do *cap*. (B) Estrutura dos inibidores seletivos de HDAC6 tubastatina A e nexturastate A, cujas seletividades são conferidas pela região de *linker*. (C) Modelo esquemático bidimensional e tridimensional do bolsão catalítico 2 (CD2) da HDAC6. O átomo de zinco está representado como uma esfera cinza no fundo do bolsão tridimensional. Código PDB: 5g0i.⁶² Imagem gerada utilizando o programa PyMOL 1.3 (Schrödinger, LLC).

1.4 Planejamento racional de fármacos

A descoberta de novos fármacos pode ser assistida por cinco fontes básicas de obtenção de compostos, são elas: i) descoberta ao acaso (*serendipity*); ii) descoberta a partir de produtos naturais; iii) síntese química de novos fármacos; iv) triagem de alto rendimento em bibliotecas químicas

(HTS); v) descoberta assistida por estudos *in silico*, isto é, com auxílio de técnicas computacionais. Contudo, mesmo partindo-se de um determinado protótipo, utilizando informações sobre seu modo de interação com o alvo biológico, o planejamento de novas estruturas bioativas é complexo e deve correlacionar diversas áreas do conhecimento.⁶³

Dentre as diversas estratégias de planejamento de fármacos existentes, duas abordagens merecem atenção por utilizarem informações de ligantes ou de seus alvos para a proposição de novos compostos, são elas: i) o planejamento baseado no ligante, ou LBDD (*ligand-based drug design*); ii) o planejamento baseado na estrutura da biomacromolécula alvo, chamado SBDD (*structure-based drug design*).⁶³⁻⁶⁵ Neste sentido, o aporte de técnicas computacionais pode otimizar o processo de descoberta de fármacos e, portanto, o desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador (CADD – *computer-assisted drug design*), vem sendo cada vez mais utilizado em todas as etapas do processo de descoberta de fármacos.⁶⁶

No planejamento por SBDD são utilizadas as informações estruturais da biomacromolécula alvo, explorando-a para o desenvolvimento de novos ligantes. Para a realização desta abordagem é necessário que a estrutura do alvo seja conhecida. Tais estruturas podem ser determinadas experimentalmente, por meio de técnicas como cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) ou criomicroscopia eletrônica (CryoEM). Caso a estrutura do alvo não seja conhecida, sua conformação e disposição espacial pode ser inferida por métodos computacionais de modelagem por homologia. Uma vez conhecida a estrutura do alvo, diversas informações podem ser obtidas como o volume máximo permitido para um ligante hipotético ocupar na cavidade de interação, as interações existentes entre o ligante e o seu alvo, o local/natureza destas interações, bem como a orientação espacial das mesmas. O SBDD pode revelar informações importantes sobre a relação entre a estrutura química da molécula e sua atividade biológica (REA), principalmente na fase de otimização estrutural de novos ligantes, podendo inclusive indicar os padrões estruturais necessários para conferir seletividade ao composto, para uma determinada isoforma do alvo.^{67,68}

O LBDD utiliza dados de propriedades físico-químicas, eletrônicas, estéricas e topológicas de compostos que possuem atividade biológica determinada, para a proposição de moléculas otimizadas do ponto de vista farmacodinâmico. Esta abordagem é de grande relevância quando não se conhece a estrutura do alvo a ser estudado.⁶⁹ No LBDD são realizadas modificações moleculares, por meio de similaridades físico-químicas, buscando para a nova molécula interações com o alvo semelhantes às observadas para seu protótipo.^{70,71}

Quando são conhecidas tanto a estrutura da biomacromolécula alvo, quanto de ligantes que atuam sobre a mesma, as abordagens de SBDD e LBDD podem ser utilizadas em conjunto, o que

aumenta a chance de sucesso na obtenção de compostos com atividade biológica otimizada. Este fato é possível, devido ao número de informações que podem ser coletadas acerca da natureza conformacional (estérica) e eletrônica dos diferentes complexos ligante-alvo, que podem ser utilizadas no planejamento de novos ligantes, propostos a partir do arcabouço estrutural já conhecido. As modificações estruturais da molécula otimizada têm o intuito de conferir complementaridade superior entre micro e macromolécula, aumentando a eficiência da interação da nova molécula com o alvo.^{71,72} É válido ressaltar que modificações moleculares podem ser utilizadas no exercício do planejamento de fármacos por LBDD e SBDD. Dentre as modificações moleculares empregadas no desenvolvimento de fármaco, podem ser citadas a hibridação molecular, o bioisosterismo e a variação da posição de grupos substituintes em sistemas anelares.⁷³⁻⁷⁶

A variação da posição em grupos substituintes em sistemas anelares, principalmente aromáticos, é uma estratégia de modificação molecular que pode ser explorada a fim de se obter melhor interação de um dado ligante com o seu alvo. Essa melhoria de interação pode ocorrer por ganhos estéricos de interação e, muitas vezes, pela influência de determinados substituintes nas propriedades eletrostáticas da molécula, que podem ser modificadas de acordo com a *meta* ou *para* substituição de sistemas aromáticos (por influência de efeitos indutivos ou ressonantes, respectivamente). Este efeito eletrostático pode alterar a forma como o sistema anelar (e a molécula como um todo) interage com o sítio de interação. Os benzopiranos (Figura 7) são excelentes exemplos da influência da posição do grupo substituinte na atividade biológica da molécula. Neste caso, a inserção do grupo metilsulfonamídico no carbono 7 do sistema benzopirânico confere ao análogo maior atividade antiarrítmica se comparado aos análogos substituídos em 6 e 8.⁷⁴

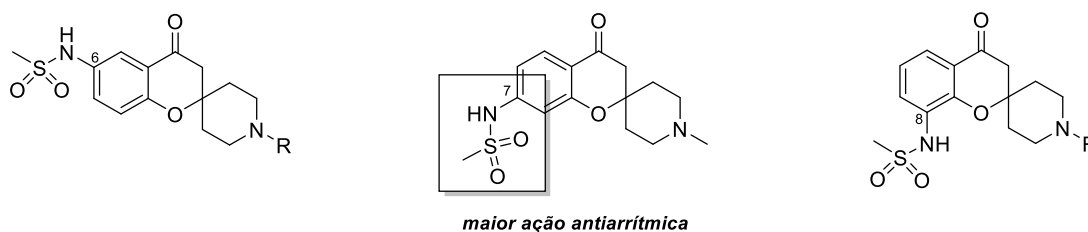
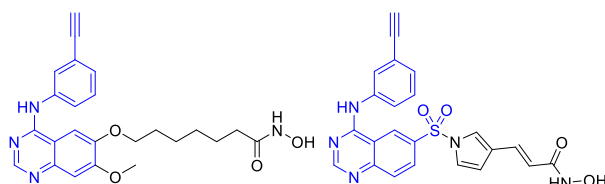
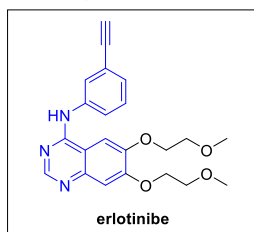


Figura 7. Demonstração do ganho de atividade antiarrítmica pela inserção do grupo metilsulfonamídico na posição 7 do sistema benzopirânico.

Hibridação molecular consiste em fundir dois ou mais farmacóforos, fármacos ou compostos bioativos, na expectativa de se obter uma nova entidade química híbrida, que apresente propriedades sinérgicas, se comparada às propriedades isoladas de cada um dos protótipos originais.⁷⁶ A fusão de núcleos ou fragmentos bioativos que atuam em diferentes alvos biológicos, permite a construção de estruturas capazes de interagir por vias bioquímicas distintas, *a priori* exploradas somente por um dos protótipos originais, o que pode resultar em estruturas com efeito sinérgico se comparadas às suas predecessoras. Alguns estudos descrevem o desenvolvimento de estruturas híbridas com ação dual

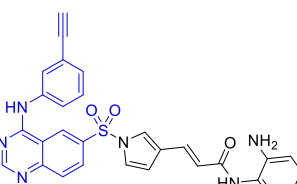
em quinases e HDAC, as quais estão intimamente relacionadas com o presente trabalho. Como pode ser observado na Figura 8, Cai e colaboradores (2010)⁷⁷ e Beckers e colaboradores (2012)⁷⁸ planejaram uma série de inibidores híbridos do erlotinibe (Figura 8) e do vorinostate (Figura 5 e 8). Os resultados descritos pelos autores ressaltam o ganho significativo de potência das estruturas híbridas e o surgimento do primeiro candidato a fármaco de ação híbrida contra HER1-2 e HDAC, o CUDC-101 (Figura 8).^{77,78}

Análogos do erlotinibe



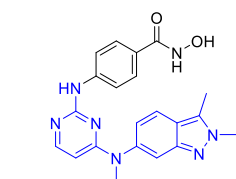
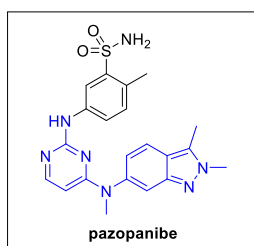
Cai et al. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2000-2009
Ação em HER1-2 e pan HDAC
[Referência 77]

Beckers et al. *Med. Chem. Commun.* **2012**, 3, 829-835
Ação em HER1-2 e pan HDAC
[Referência 78]

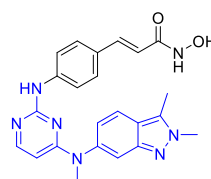


Beckers et al. *Med. Chem. Commun.* **2012**, 3, 829-835
Ação em HER1-2 e HDAC de classe I
[Referência 78]

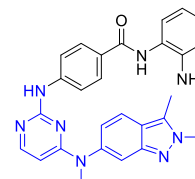
Análogos do pazopanibe



Zang et al. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 5304-5322
Ação dual em VEGFR-2 e pan HDAC
[Referência 80]

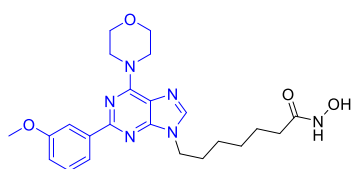


Zang et al. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 5304-5322
Ação dual em VEGFR-2 e pan HDAC
[Referência 80]

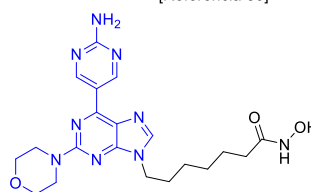


Zang et al. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 5304-5322
Ação dual em VEGFR-2 e pan HDAC
[Referência 80]

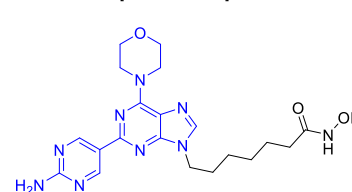
Análogos do fimepinostate



Chen et al. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 1552-1575
Ação dual pan PI3K e pan HDAC
[Referência 81]



Chen et al. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 1552-1575
Ação dual pan PI3K e pan HDAC
[Referência 81]



Chen et al. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 1552-1575
Ação dual pan PI3K e pan HDAC
[Referência 81]

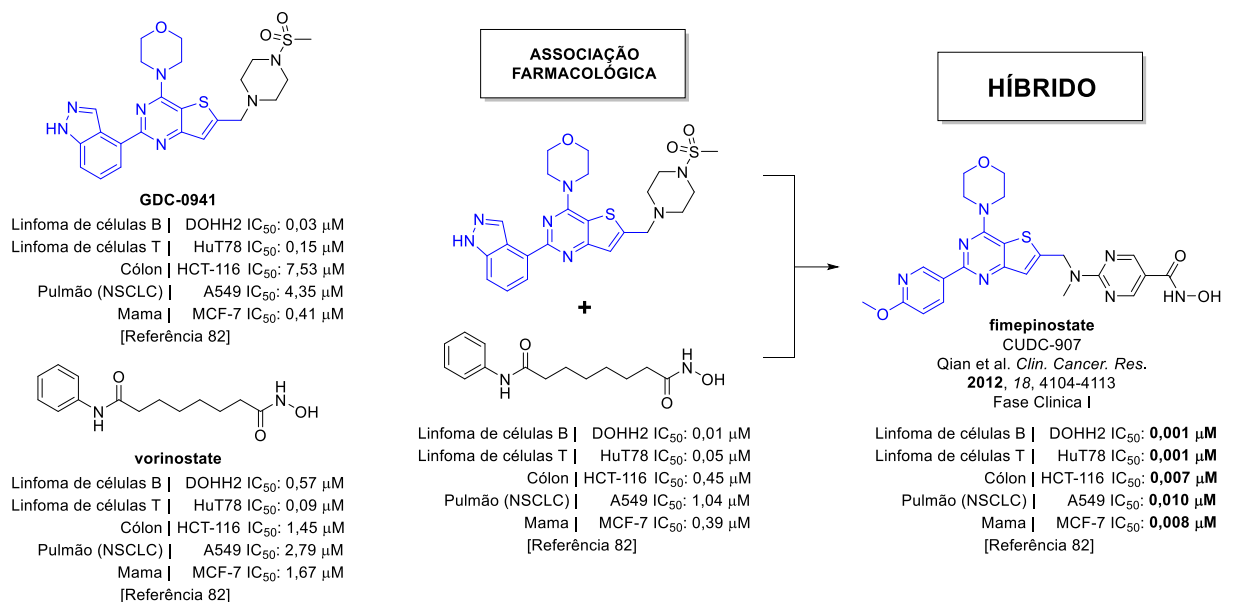


Figura 8. Estruturas de híbridos com ação dual em quinases e HDAC. O núcleo destacado em azul retrata a porção responsável pela ação em quinases. A região em preto das estruturas é responsável pela ação em HDAC. O fimepinostate (canto inferior direito) é um exemplo bem sucedido de hibridação molecular de fármacos antitumorais de ação dual.

É digno de nota que os estudos clínicos de fase I para o CUDC-101 foram encerrados por problemas de toxicidade e ineficácia, que inviabilizaram a continuidade do tratamento dos pacientes (NCT01171924).⁷⁹ Estudos recentes conduzidos por Zang e colaboradores (2018)⁸⁰ reportaram uma série de híbridos derivados do pazopanibe (Figura 3 e 8) e do belinostate/entinostate (Figura 5). Os autores foram os primeiros a reportar híbridos com ação dual em receptores VEGFR e inibição de amplo espectro das HDAC, sendo observados parâmetros farmacocinéticos favoráveis à administração oral dos compostos mais ativos, além de boa tolerabilidade nos estudos *in vivo*.⁸⁰ Estudos subsequentes reportam a síntese de inibidores duais da enzima PI3K, uma quinase que fosforila substratos lipídicos, e de enzimas HDAC.⁸¹ Os autores propuseram a síntese de inibidores do fimepinostate (Figura 8), mesclando o núcleo do protótipo GDC-0941 (Figura 8), de conhecida ação em PI3K, com o ácido hidroxâmico de cadeia alquílica do vorinostate. Os autores reportaram ganhos significativos de seletividade para linhagens tumorigênicas oriundas de cânceres hematológicos, além de viabilidade para administração via oral.⁸¹

Com base nos estudos reportados acima, o candidato a fármaco fimepinostate (CUDC-907, Figura 8) certamente é aquele que melhor representa os benefícios no desenvolvimento de estruturas híbridas. Desenvolvido a partir da junção dos núcleos tienopirimidínico do protótipo GDC-0941 e 2-aminopirimidil-5-hidroxamato, o efeito antitumoral deste composto é oriundo da ação inibitória dual do mesmo tanto em enzimas PI3K quanto em enzimas HDAC, que resultou na ação sinérgica do mesmo em cinquenta linhagens tumorigênicas provenientes tanto de tumores hematológicos, quanto de tumores sólidos. A Figura 8 apresenta o resultado dos ensaios de citotoxicidade conduzidos para o fimepinostate e seus protótipos, em algumas das linhagens avaliadas por Qian e colaboradores (2012).⁸² Os autores reportaram ganhos de até cinco vezes na potência do vorinostate e do GDC-0941 em associação, porém, a administração da estrutura híbrida (fimepinostate) conferiu ganhos de até mil vezes na potência do composto, em comparação com a associação de vorinostate e GDC-0941, e de até trinta mil vezes comparado às estruturas administradas isoladamente. Estes resultados somados à boa tolerabilidade do composto *in vivo*, e seus parâmetros farmacocinéticos favoráveis levaram o fimepinostate aos testes clínicos. Atualmente o fimepinostate segue em ensaios clínicos para o tratamento de tumores sólidos refratários, tumores que acometem o sistema nervoso central e linfomas, além de estar sendo avaliado também em associação a agentes alquilantes como a cisplatina e também associado a fármacos que afetam a dinâmica das redes de tubulina (taxanos). É válido ressaltar que em todos os estudos reportados até o momento, o fimepinostate tem mostrado reversão de quadros de resistência às ações tanto da cisplatina, quanto do paclitaxel.^{76,83-85}

As informações supracitadas podem auxiliar no planejamento e desenvolvimento de fármacos, guiando o delineamento de modificações moleculares a serem realizadas sobre um arcabouço

molecular protótipo. Conforme dito anteriormente, o desenvolvimento de fármacos por LBDD e SBDD pode ser auxiliado por estratégias computacionais, também conhecidas por modelagem molecular. Neste sentido, a modelagem molecular pode auxiliar o planejamento de novos fármacos e otimizar o processo de obtenção de novas entidades químicas, ou ainda auxiliar no entendimento de seus modos de ação ao nível molecular.^{63,76,83,86}

1.4.1 Modelagem molecular: estratégia in silico de auxílio ao planejamento de fármacos

Dado o caráter multidisciplinar relativo ao planejamento de novos fármacos, o processo de descoberta de novas entidades químicas envolve uma série de estratégias desde a concepção da molécula até seu desenvolvimento e avaliação biológica. Inserido neste contexto, o CADD é considerado eficaz quanto a redução de tempo e investimento financeiro em pesquisa e desenvolvimento. As estratégias de CADD podem ser aplicadas em diferentes etapas do desenvolvimento de fármacos e se baseiam em métodos teóricos e técnicas computacionais empregadas com o intuito de estudar diferentes estruturas moleculares, suas propriedades e respectivas interações com seus alvos moleculares. Dentre as referidas estratégias de CADD, encontra-se o ancoramento molecular ou *docking*.^{72,87-90}

1.4.1.1 Docking molecular

O ancoramento molecular, mais conhecido como *docking*, consiste em uma estratégia de CADD bastante promissora, que é utilizada na identificação de *hits* (ligantes), na otimização de compostos líderes, bem como para estudos sobre o modo de interação entre ligantes e alvos. Em geral, o ancoramento molecular é bastante útil na proposição teórica de complexos ligante-alvo, ou seja, consiste em uma modelagem estrutural que prevê – ou elucida – o modo de interação entre micro e macromolécula. A partir de estudos prévios sobre a formação do complexo ligante-alvo, é possível por meio do *docking* identificar ligantes que sejam capazes de explorar a cavidade de interação, além de planejar novas moléculas ou ainda otimizar ligantes já conhecidos.^{87,91} Na estratégia de *docking*, realiza-se o ancoramento de pequenos ligantes em alvos macromoleculares, obtendo-se ao final diferentes poses, isto é, diferentes orientações conformacionais dos ligantes ancorados na cavidade de interação do alvo, hierarquizando estas poses de acordo com a complementaridade de cada uma pelo sítio ativo.⁹²

Para realizar estudos teóricos sobre o modo de interação de compostos ativos com seus respectivos alvos biológicos, primeiramente é feito um estudo cuidadoso do modo de interação de ligantes conhecidos do determinado alvo – caso haja ligantes conhecidos – observando a conformação e orientação destes ligantes no sítio de interação. Então, estas análises de complementaridade podem ser utilizadas como base comparativa para os resultados obtidos após os ancoramentos dos compostos

ensaiados, fornecendo importantes informações a respeito do modo de interação dos compostos ensaiados ao nível molecular. Ademais, estas análises podem guiar posteriores otimizações moleculares do arcabouço inicial, sendo ponto de partida para o planejamento de novas estruturas, que exploraram de forma mais eficiente a cavidade de interação.^{87,91} A identificação de características-chaves, responsáveis pelo reconhecimento biológico de um ligante por seu alvo é uma questão muito complexa ao nível molecular e eletrônico. Assim, a simulação de *docking* molecular possui diversas etapas, crescentes em complexidade, que demandam rigor em suas conduções.⁹²

Primeiramente, há a aplicação de algoritmos de busca, os quais irão adicionar os ligantes no sítio ativo, considerando e conferindo possíveis graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional aos mesmos. Nesta etapa, o algoritmo de busca utilizado permite a identificação de possíveis orientações e conformações dos ligantes ao interagir com o alvo. Dentre os algoritmos de busca inclui-se o algoritmo genético, algoritmo de otimização e busca, baseado em mecanismos evolutivos que, no caso do *docking*, busca a orientação/conformação energeticamente mais estável do ligante, ao interagir com o sítio. O programa computacional GOLD (CCDC Software Ltd.) é um exemplo de programa que utiliza o algoritmo genético como método de otimização da interação entre ligantes e alvos, otimizando os seguintes parâmetros: ângulos diedros (do ligante), geometrias de anéis (do ligante), ângulos diedros de grupos hidroxilas e aminas (presentes no alvo) e a posição do ligante no sítio de interação, ocorrendo um mapeamento desta.^{87,91-93}

Os algoritmos de busca são complementados por funções de escore (ou pontuação) durante o *docking*. Estas funções classificam cada pose (conformação/orientação) dos ligantes no seu alvo. As funções de escore podem ser agrupadas em três categorias: i) as baseadas em campo de força; ii) as empíricas; iii) as baseadas em conhecimento. No caso das funções de escore empíricas, como a GoldScore, aplicada pelo programa GOLD, a avaliação do encaixe do ligante considera dados experimentalmente determinados para estruturas complexas.⁹⁴

As funções de pontuação do *docking* possuem aproximações necessárias para dar rapidez ao método, porém, estas aproximações geram uma limitação na qualidade dos valores de pontuação obtidos. Neste sentido, quando se deseja avaliar a energia de interação entre micro e macromolécula, devem ser utilizados métodos mais robustos e precisos, como métodos semiempíricos ou quânticos de cálculo de energia. Para que o processo de *docking* seja realizado com sucesso, é necessário que os passos anteriormente citados sejam realizados com critério adequado, sendo importante para tal, a resolução da estrutura cristalográfica a ser utilizada (não devendo ser superior a 3,0 Å), a flexibilidade da biomacromolécula e/ou do sítio catalítico, a flexibilidade dos ligantes e também a solvatação do sistema, isto é, a presença ou não de moléculas de água no estudo.^{87,91,95}

Uma limitação importante da técnica de *docking*, bem difundida na comunidade científica, está relacionada ao fato de ser uma técnica que, na maioria dos casos, não considera flexibilidade para alvos durante a simulação. Considerar que interações entre micro e macromoléculas ocorrem de forma rígida está intimamente relacionado ao conceito clássico “chave-fechadura” de interação fármaco-receptor. Porém, atualmente a teoria mais aceita de interação entre micro e macromolécula considera que ambas sofrem adaptações em suas estruturas, para que haja assim a formação do complexo ligante-alvo, teoria conhecida como “encaixe induzido”.⁹⁶ Apesar deste fato potencialmente comprometer a confiabilidade dos resultados obtidos nas simulações de *docking*, esta técnica continua sendo valiosa e amplamente explorada na condução de estudos sobre o modo de interação entre ligantes e macromoléculas.⁹⁷

2. Objetivos e Justificativa

Diversos estudos apontam o potencial e a tendência da polifarmacologia no tratamento do câncer.^{35,41,98} Neste sentido, a hibridação de grupos farmacofóricos de ação distinta pode ser uma valiosa estratégia na descoberta de estruturas capazes de atuar por duas – ou mais – vias celulares de sinalização, aumentando a eficiência do tratamento quimioterápico.

As diversas aprovações de inibidores de TQ e HDAC para uso terapêutico são provas de suas relevâncias no tratamento de neoplasias, e validam esses alvos para o desenvolvimento de novas moléculas com perfis farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos otimizados. Neste sentido, diversos estudos clínicos de associações entre inibidores de TQ e HDAC têm apresentado resultados muito promissores para o tratamento tanto de tumores sólidos, quanto de tumores hematológicos, sendo destacadas as associações entre vorinostate e erlotinibe;⁹⁹ vorinostate e gefitinibe;^{100,101} e panobinostate e sorafenibe.¹⁰² Ainda que promissora, as manifestações clínicas da inibição seletiva de HDAC6 em associação à inibição de quinases oncogênicas é pouquíssimo conhecida.

Sahakian e colaboradores (2012) reportaram que a associação entre ricolinostate e ibrutinibe (inibidor de Btk) aumentou em três vezes a indução de apoptose *in vitro* de linfoma de células do manto (MCL), se comparada aos tratamentos isolados de cada composto, indicando assim o efeito sinérgico desta abordagem.¹⁰³ Ademais, estudos clínicos conduzidos para o composto CUDC-907 (Figura 8) têm apresentado resultados promissores para inibidores híbridos de HDAC-TQ, sendo eficaz em tumores sólidos refratários, linfomas, e cânceres do sistema nervoso central (NCT01742988; NCT02307240; e NCT02909777).⁸⁵ É válido ressaltar que, até o presente momento, não há relato de nenhum inibidor híbrido de HDAC6 e TQ (HDAC6-TQ), ou de compostos cujos efeitos biológicos reportados sejam decorrentes da inibição mútua de quinases e HDAC6.

Face ao exposto, este trabalho teve como objetivo central a síntese de inibidores HDAC6-TQ, com vistas ao tratamento do câncer, e melhor compreensão das bases moleculares da ação destes híbridos frente aos seus alvos. Para este fim, os análogos foram planejados, sintetizados, caracterizados e avaliados com relação à sua atividade biológica. Estudos computacionais de *docking* molecular foram conduzidos para proposição de REA e melhor compreensão da interação destes inibidores com seus possíveis alvos biológicos.

2.1 Objetivos específicos

- I. Realizar a síntese e caracterização dos análogos propostos, planejados por hibridação molecular;
- II. Realizar a triagem fenotípica *in vitro* para os compostos sintetizados em linhagens de tumores sólidos (MCF-7, carcinoma de mama; e HCT 116, carcinoma colorretal), de tumores hematológicos (Jurkat, leucemia linfoblástica aguda de células T; e Namalwa, leucemia

linfoblástica aguda de células B), e em linhagem hematológica não tumorigênica (cultura de células primárias de sangue periférico);

- III. Investigar o mecanismo de ação citotóxica dos compostos ativos na triagem preliminar;
- IV. Realizar estudos de *docking* molecular dos compostos ensaiados nas enzimas HDAC6 e HER1 quinase, e assim avaliar os perfis de interação com vistas a REA.

2.2 Planejamento dos compostos

Conforme apresentado na seção 1.3 deste trabalho, a maioria dos inibidores de TQ exploram o sítio de interação do ATP presente na cavidade catalítica da enzima. Assim, a primeira série proposta (Série 1) utilizou o núcleo purínico como base para a construção dos compostos (Figura 9). Ao núcleo purínico, foram adicionados diversos substituintes aminoarílicos na posição 6, com vistas à potencial modulação de afinidade para enzimas quinases. Ao nitrogênio 9 do sistema purínico, foi adicionado o núcleo responsável pela ação seletiva para a enzima HDAC6, o grupo 4-(hidroxicarbamoil)benzílico (ou “4-benzil-hidroxiato”).

A série 2 de compostos híbridos foi planejada a partir do sorafenibe (Figure 9). A porção 1,3-difeniluréia do fármaco foi mantida, e variaram-se os grupos quelantes de zinco, bem como os substituintes em *para* de um dos anéis. Para o anel A dos compostos (Figura 9), foram considerados grupos elétron doadores (-Cl e -OCH₃) e elétron retiradores (-NO₂) como substituintes da posição *para*, além do análogo não substituído. Já para o anel B, o grupo 4-oxi-*N*-metilpicolinamídico do sorafenibe foi substituído por diferentes hidroxiatos. As consequências destas modificações na ação citotóxica dos análogos foi então avaliadas.

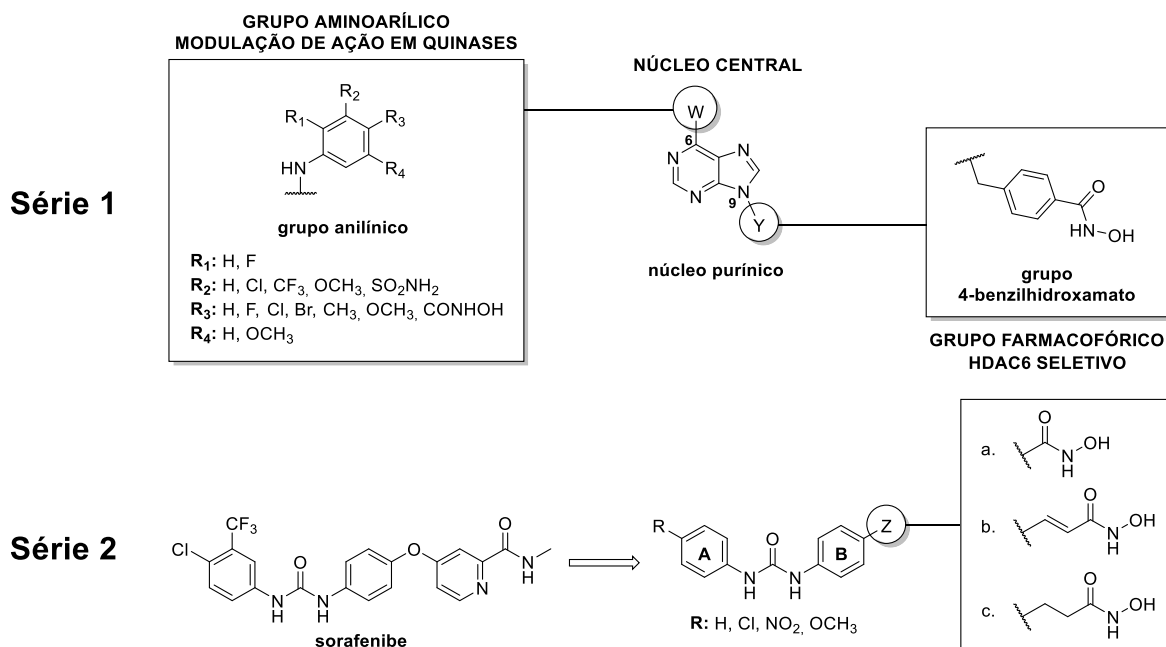
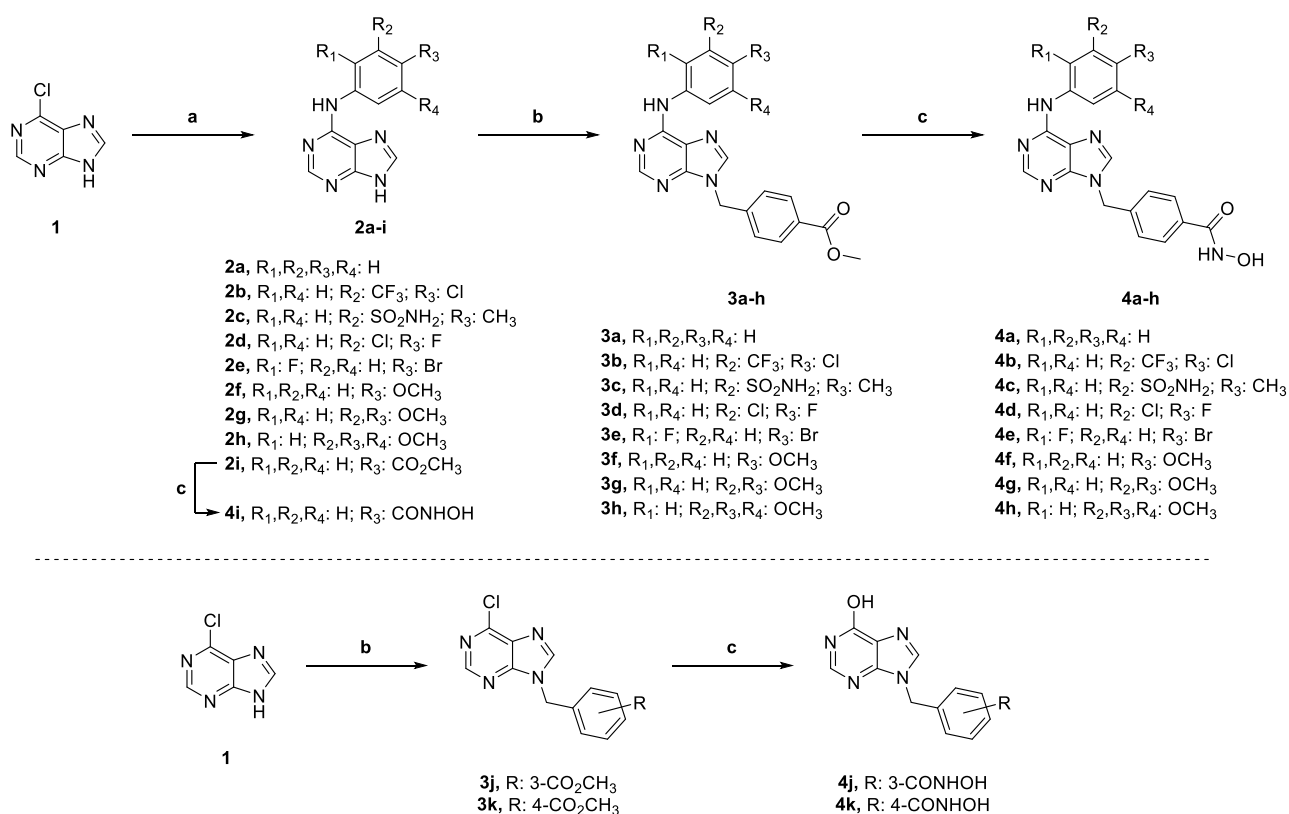


Figura 9. Esquema geral de planejamento dos compostos das séries 1 e 2.

3. Resultados e Discussão

3.1 Síntese e caracterização dos compostos

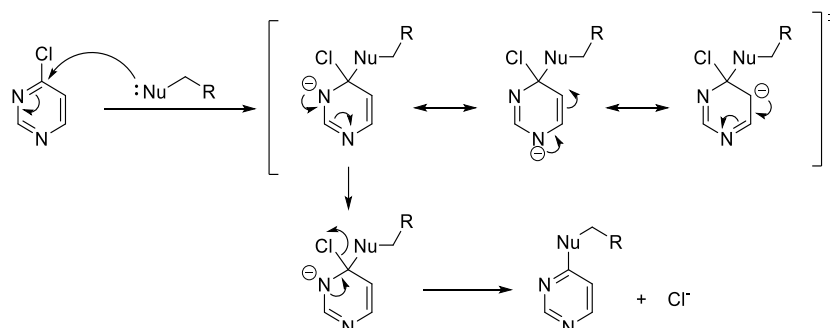
No total, 11 compostos pertencentes a série 1 foram sintetizados, conforme apresenta o Esquema 1. O compostos finais foram preparados a partir da reação da 6-cloropurina (**1**) com a anilina, e com anilinas mono, di, ou trissubstituídas, por meio de substituição nucleofílica aromática (S_NAr), formando os intermediários **2a-i**. Os intermediários **2a-h** foram submetidos à reação com 4-(bromometil)benzoato de metila via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), para a formação dos intermediários ésteres **3a-h**. Por fim, os ésteres **2i** e **3a-h** foram reagidos com hidroxilamina (NH_2OH) para a formação dos hidroxamatos correspondentes **4a-i**. Para os hidroxamatos **4j** e **4k**, a síntese iniciou-se pela reação entre a 6-cloropurina e 3- e 4-(bromometil)benzoato de metila, respectivamente, formando assim os intermediários **3j** e **3k**. Posteriormente, os ésteres **3j** e **3k** foram clivados em meio a hidroxilamina e NaOH, para a formação dos compostos finais 6-hidroxipurinil hidroxamatos **4j** e **4k**.



Esquema 1. Rota sintética dos compostos da série 1. Reagentes e condições: **a)** anilina (1 eq.), HCl 10 M (0,8 eq.), isopropanol, refluxo, 18 h; **b)** 3- ou 4-(bromometil)benzoato de metila (1 eq.), K₂CO₃ (3 eq.), acetona, refluxo, 18 h; **c)** NH₂OH (50 eq.), NaOH (8 eq.), THF-MeOH (1:1), 0 °C – t.a., 2 h.

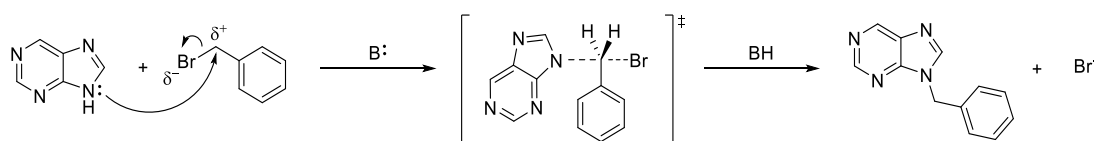
Como a primeira etapa de síntese dos compostos desta série é S_NAr , o mecanismo genérico deste tipo de reação segue descrito no Esquema 2 que utiliza a 4-cloropirimidina como substrato. Neste tipo de reação, o substrato da reação deve possuir, necessariamente, um ponto de baixa densidade eletrônica, suscetível ao ataque do nucleófilo. Neste sentido, anéis heterociclos, ou que possuam grupos elétron retiradores (EWG – *electron withdrawing group*) na posição *orto* e/ou *para*

são ativadores da reação de substituição, pois tornam o carbono ligado ao halogênio (ou outro grupo abandonador) suscetível a sofrer o ataque do nucleófilo. O ânion formado após o ataque do nucleófilo ao anel aromático perturba a aromaticidade do anel, a qual estabiliza os pares de elétrons não ligados por meio dos elétrons π do sistema ressonante. Visto que o estado de energia do produto substituído é menor do que o do material de partida, o reestabelecimento da aromaticidade da estrutura resulta na liberação do cloreto para o meio e consequente formação do produto desejado.¹⁰⁴



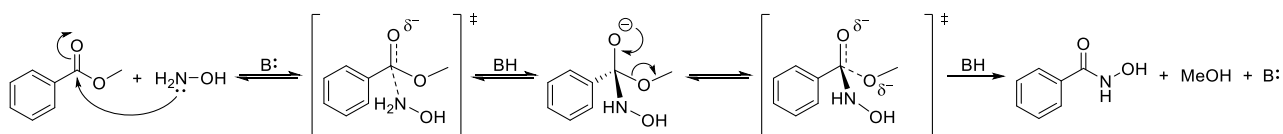
Esquema 2. Mecanismo reacional de S_NAr da 4-cloropirimidina.

A segunda etapa de preparação dos compostos consiste em uma reação de S_N2 (Esquema 3). A substituição nucleofílica bimolecular leva esse nome devido ao fato de os dois materiais de partida (nucleófilo e eletrófilo) estarem envolvidos na formação do estado de transição. Neste sentido, as concentrações dos respectivos materiais de partida afetam a cinética da reação. No mecanismo de reações de S_N2 , é amplamente aceito que o grupo abandonador do eletrófilo deixe a estrutura no mesmo momento em que o nucleófilo ataca a face oposta (orbital antiligante) do eletrófilo, o que leva à típica inversão de configuração do produto final, em casos de centros assimétricos.¹⁰⁴



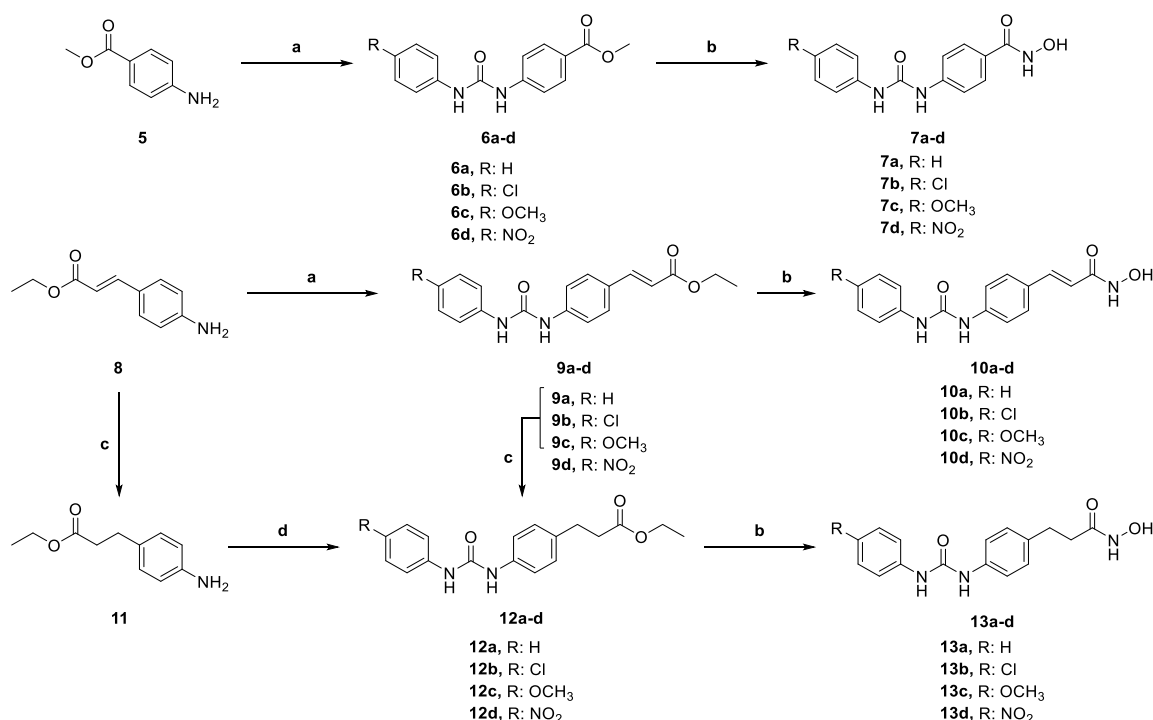
Esquema 3. Mecanismo reacional de S_N2 do brometo de benzila com a 9H-purina.

A terceira e última etapa de síntese dos compostos da série 1 consistiu em reação de hidrólise básica dos ésteres **4a-k** em meio contendo hidroxilamina (NH_2OH). O mecanismo de hidrólise alcalina ocorre inicialmente com a adição da hidroxilamina ao carbono carbonílico do substrato, formando o intermediário tetraédrico representado no Esquema 4. Subsequentemente, o intermediário formado sofre eliminação do grupo abandonador que, no exemplo abaixo, é representado pelo grupo metoxila, formando assim o hidroxamato alvo.



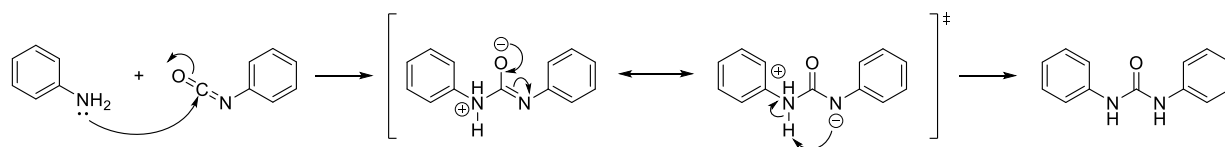
Esquema 4. Mecanismo reacional de formação do ácido benzil-hidroxâmico a partir do benzoato de metila.

Para a série 2, foram sintetizados 12 hidroxamatos, conforme apresenta o Esquema 5. Os compostos finais **7a-d** foram preparados por reações de adição do 4-aminobenzoato de metila (**5**) aos fenilisocianatos substituídos (ou não) na posição 4, formando os intermediários **6a-d**. Os intermediários **6a-d** foram submetidos à reação com NH_2OH para a formação dos hidroxamatos **7a-d**. Os demais hidroxamatos foram preparados a partir do 4-aminocinamato de etila (**8**), que foi submetido às reações com os mesmos fenil isocianatos citados anteriormente, para a formação dos intermediários **9a-d**, subseqüentemente convertidos aos hidroxamatos α,β -insaturados **10a-d** com o uso de NH_2OH . A olefina dos intermediários **9a-c** foi reduzida mediante reação com paládio em carbono para a formação dos intermediários reduzidos **12a-c**. O intermediário nitroderivado **12d** foi preparado a partir da redução do material de partida **8** com paládio em carbono, formando assim o intermediário **11**, posteriormente reagido com 4-nitrofenil isocianato para a formação do intermediário **12d**. Por fim, os intermediários **12a-d** foram convertidos aos hidroxamatos **13a-d** pela mesma abordagem citada acima.



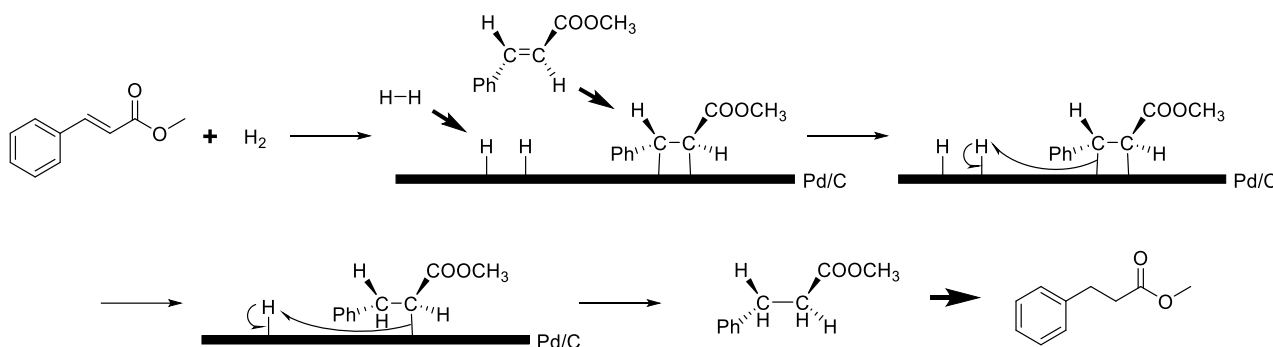
Esquema 5. Rota sintética dos compostos da série 2. Reagentes e condições: **a)** isocianatos (1 eq.), CH_2Cl_2 , t.a., 16 h; **b)** NH_2OH (50 eq.), NaOH (8 eq.), THF-MeOH (1:1), 0 °C – t.a., 2 h; **c)** 10% Pd/C, H_2 , EtOH, t.a., 18 h; **d)** 4-nitrofenil isocianato, (1 eq.), CH_2Cl_2 , t.a., 16 h.

Para os compostos da série 2, as reações dos isocianatos com as aminas descritas acima são conhecidas como reações de adição. Especificamente para a formação de uréias, as reações de adição envolvem um nucleófilo – as aminas em questão – e o substrato que sofrerá o ataque deste nucleófilo, no caso os isocianatos (Esquema 6), resultando na formação de um novo composto, sem que haja troca de substituintes na estrutura, como observado em reações de S_{N} .¹⁰⁴



Esquema 6. Mecanismo de formação da difeniluréia, a partir da anilina (nucleófilo) e do isocianato de fenila.

A redução das olefinas **9a-d** foi feita utilizando paládio em carbono (Pd/C) como catalizador, em atmosfera de hidrogênio (H₂). Para esta reação, o paládio em superfície de carbono atua inicialmente quebrando a ligação existente entre os dois átomos de hidrogênio (H–H), convertendo-os em espécies atômicas (mais reativas). Subsequentemente, a medida em que o alqueno entra em contato com a superfície do metal, que contém adsorvida os hidrogênios, os mesmos adicionam-se ao substrato, formando assim o alceno correspondente (Esquema 7).¹⁰⁴ Os hidroxamatos **7a-d**, **10a-d**, e **13a-d** foram formados pelo mesmo mecanismo reacional descrito para os compostos da série 1.



Esquema 7. Mecanismo de redução do cinamato de metila mediado por paládio.

A compilação dos compostos finais deste trabalho está apresentada na Figura 10. Para os compostos da série 1 (**4b-e**, **4h**), a escolha dos substituintes da posição 6 do sistema purínico (vide Figura 9) se deu a partir de padrões encontrados em inibidores de TQ aprovados para uso terapêutico. Os substituintes do composto **4b** foram baseados na estrutura do sorafenibe; para o composto **4c**, os substituintes foram baseados na estrutura do pazopanibe; Para o análogo **4d** utilizou-se o mesmo padrão encontrado para os fármacos gefitinibe, afatinibe, dacomitinibe e pelitinibe; O composto **4e** apresenta o padrão do vandetanibe. Já o sistema trimetoxilado do composto **4h** foi inspirado no padrão apresentado pelo fármaco tamatinibe, e o número de grupos metoxilas ligados ao análogo também foi variado, sendo considerados os análogos monometoxilado (**4f**) e dimetoxilado (**4g**). Para fins de comparações entre perfis de atividade biológica, o análogo sem substituintes **4a** foi sintetizado. Para fins de estabelecimento de REA, a inserção do grupo 4-benzil-hidroamato (Figura 9) na posição 6 do núcleo purínico foi avaliada (composto **4i**). A variação da posição *meta* e *para* do hidroamato foi considerada nos análogos **4j** e **4k**, que também apresentam inserção de hidroxila à posição 6 do sistema purínico.

Os compostos da série 2 possuem três padrões de grupos quelantes investigados, sendo eles o ácido benzil-hidroxiâmico (**7a-7d**), ácido cinamil-hidroxiâmico (**10a-d**) e o ácido di-hidrocinamil-hidroxiâmico (**13a-d**). Para o anel A (vide Figura 9), foram sintetizados análogos *para*-substituídos com grupos elétron retiradores ($-\text{Cl}$: **7b**, **10b**, **13b**; $-\text{NO}_2$: **7d**, **10d**, **13d**) e elétron doadores ($-\text{OCH}_3$: **7c**, **10c**, **13c**), a fim de se avaliar a influência destes substituintes na atividade biológica destes compostos. Por fim, os análogos **7a**, **10a**, **13a** compreendem os análogos não substituídos desta série.

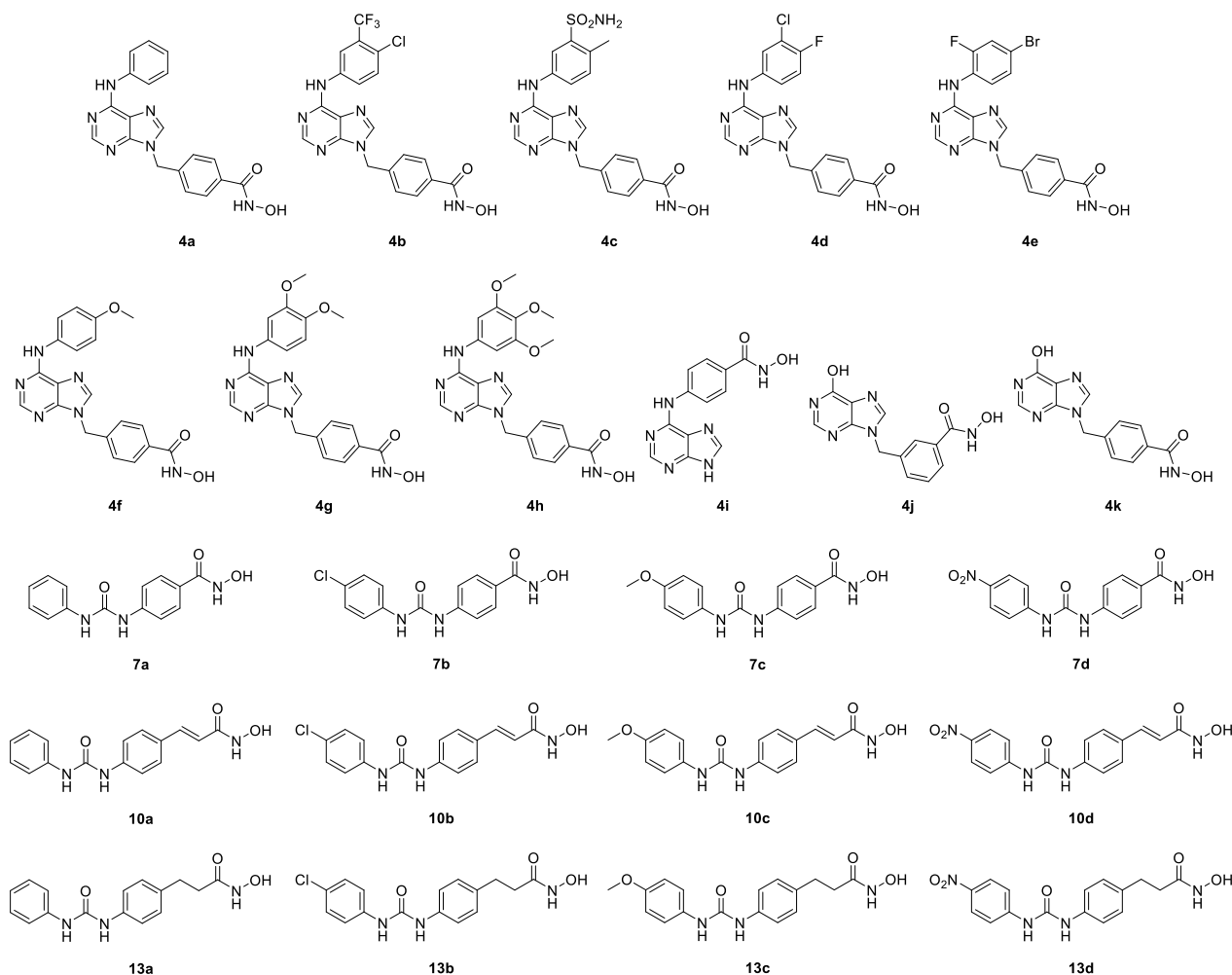


Figura 10. Estruturas dos compostos finais sintetizados neste trabalho.

Visto que todos os compostos são obtidos em mais de uma etapa, a Tabela 1 apresenta os dados de rendimento global e demais dados de caracterização dos análogos. Os compostos foram obtidos em rendimentos globais que variaram entre 4% e 86%. De forma geral, os produtos finais que apresentaram rendimentos abaixo de 30% foram aqueles que tiveram problemas de solubilidade, seja dos materiais de partida envolvidos na rota, seja dos intermediários em questão. Porém, todos os compostos finais foram obtidos com massa suficiente para serem conduzidos aos ensaios biológicos. A caracterização completa dos intermediários e produtos finais segue descrita na seção 5 deste trabalho – *Parte Experimental*.

As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e os compostos foram purificados por recristalização, precipitação e cromatografia em coluna, quando necessário. De forma geral, os intermediários e compostos finais não apresentaram grandes dificuldades para seus isolamentos. É digno de nota que os compostos finais submetidos às análises de espectrometria de massas apresentaram íons moleculares dentro de valores aceitáveis de desvios, não sendo superiores a ± 5 partes por milhão – ppm – conforme apresenta a Tabela 1.

Tabela 1. Dados gerais e de caracterização dos compostos finais.

Composto	Aspecto Físico	Rendimento	Massas Teórico	Massas Experimental	Pureza ^c
		Global (%) ^{a,b}	[M + H] ⁺ m/z	[M + H] ⁺ m/z	
4a	Sólido branco	43	361,1408	361,1414	98,9
4b	Sólido branco	34	463,0892	463,0899	99,6
4c	Sólido branco	37	454,1292	454,1299	98,2
4d	Sólido branco	53	413,0924	413,0926	98,2
4e	Sólido branco	60	457,0418	457,0422	97,8
4f	Sólido branco	50	391,1513	391,1514	95,2
4g	Sólido branco	53	421,1619	421,1610	95,8
4h	Sólido branco	52	451,1724	451,1717	99,7
4i	Sólido branco	71	271,0938	271,0940	98,0
4j	Sólido branco	4	286,0935	286,0943	98,5
4k	Sólido branco	30	308,0760 ^d	308,0785 ^d	99,4
7a	Sólido branco	31	272,1030	272,1025	98,3
7b	Sólido branco	39	306,0640	n.d. ^e	98,3
7c	Sólido branco	17	302,1135	n.d.	97,8
7d	Sólido amarelo	60	317,0880	n.d.	99,7
10a	Sólido branco	83	298,1186	298,1193	97,0
10b	Sólido amarelo	71	332,0796	n.d.	98,9
10c	Sólido branco	67	328,1292	n.d.	99,9
10d	Sólido amarelo	86	343,1037	n.d.	99,8
13a	Sólido branco	60	300,1343	300,1345	98,1
13b	Sólido branco	57	334,0953	n.d.	97,8
13c	Sólido branco	61	330,1448	n.d.	99,8
13d	Sólido amarelo	10	345,1193	n.d.	99,4

^aCompostos **4a-h**, **13a-d**: rendimentos globais calculados para três etapas reacionais. ^bCompostos **4i-k**, **7a-d**, **10a-d**: rendimentos globais calculados para duas etapas reacionais. ^cPureza calculada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O valor percentual reportado corresponde ao cálculo de área sobre a curva (AUC) do pico a $\lambda = 254$ nm. ^dValor referente ao íon sodiado ($m/z = [M + Na]^+$). O pico $[M + H]^+$ experimental foi 286,0958 (teórico: 286,0935), porém, o mesmo não foi o íon molecular da análise. ^en.d.: não determinado.

Em relação a caracterização por RMN, os compostos finais apresentaram deslocamentos químicos comuns para toda a série, que puderam ser usados para comprovar a formação dos mesmos. A Figura 11 mostra os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C utilizados como referência de formação dos compostos de série 1, por serem comuns a toda a série e facilmente identificáveis. Para o exemplo da Figura 11, foi utilizado os espectros do composto **4a**. Os hidrogênios ligados aos heteroátomos (hidrogênios 1-3, Figura 11) são os mais desprotegidos nos espectros e todos se apresentam como simpletos largos de integral igual a 1 e deslocamentos químicos médios iguais a 11,1; 9,8; e 9,0 ppm, respectivamente. Logo em seguida estão os dois simpletos (4 e 5 na Figura 11), correspondentes aos hidrogênios ligados ao anel purínico dos compostos, cada um contendo integral igual a 1 e deslocamentos médios de 8,5 e 8,4 ppm, respectivamente. O sinal 6 (Figura 11) é referente ao

simpleto de dois hidrogênios (integral = 2) relativo ao metileno que une o núcleo purínico ao benzil-hidroxiato, com deslocamento químico em torno de 5,5 ppm.

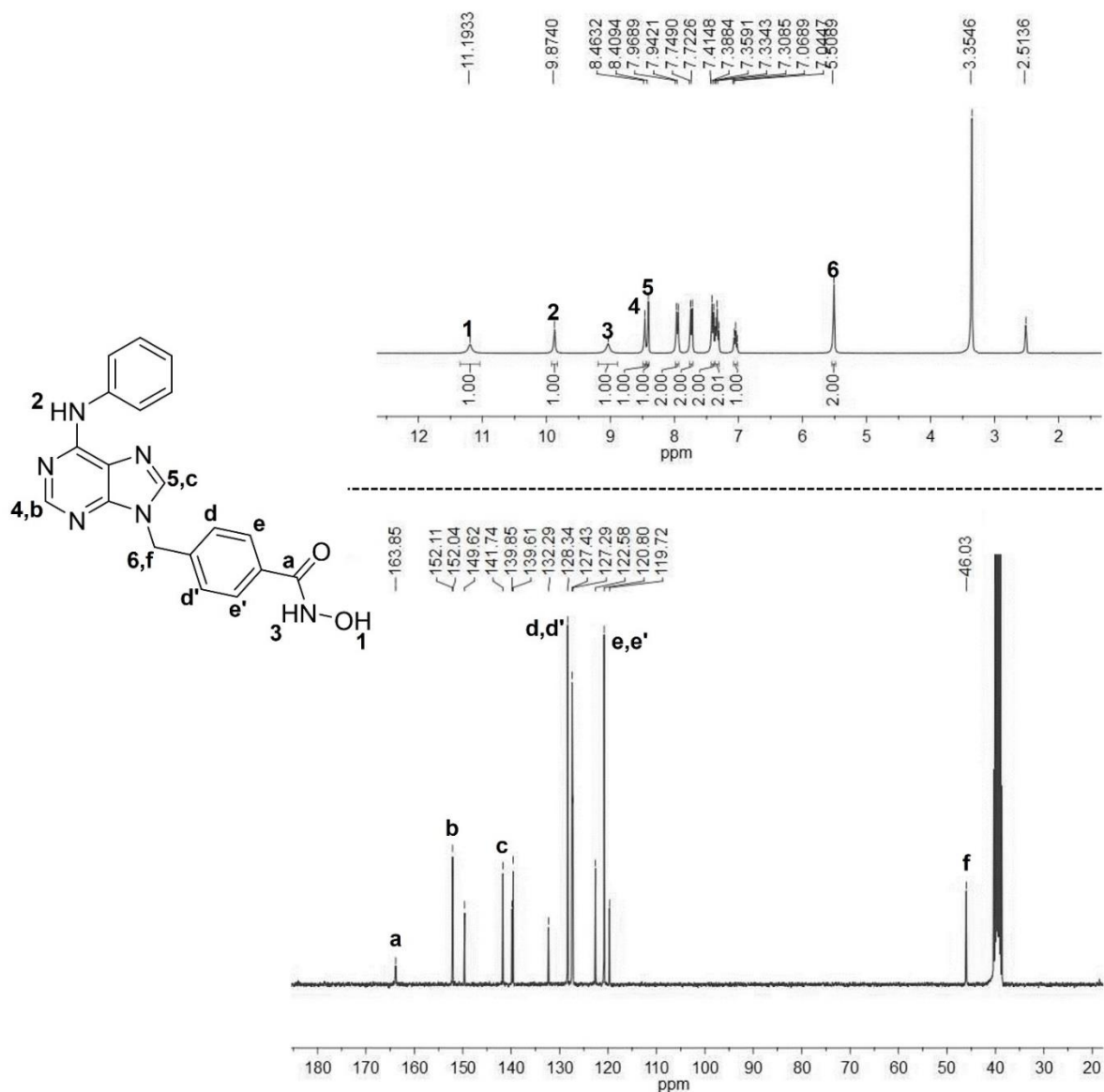


Figura 11. Padrão de deslocamentos químicos dos compostos da série 1. Solvente: DMSO d_6 .

Em relação aos sinais de carbono 13, em torno de 163 ppm é detectado o sinal referente ao carbono carboxílico da função hidroxamato (sinal “a”). Os carbonos CH do anel purínico também foram utilizados como referência, por apresentarem deslocamentos médios de 152 ppm (“b”, Figura 11) e 141 ppm (“c”, Figura 11), respectivamente. Os deslocamentos químicos e a intensidade dos sinais de carbono do anel aromático pertencente a porção benzil-hidroxiato também foram observados para todos os compostos. Os sinais “d” e “e” (Figura 11) foram detectados com deslocamentos médios de, respectivamente, 128 e 120 ppm, apresentando o triplo da intensidade dos demais sinais de carbonos terciários. Por fim, o sinal do único carbono metilênico (CH₂) da estrutura (“f”, Figura 11) também foi observado, e apresentou deslocamento químico em torno de 46 ppm em média.

Para a série 2, o padrão de sinais observado para todos os compostos segue apresentado na Figura 12, que utiliza com estrutura de exemplo o composto **7a**. Os hidrogênios ligados ao oxigênio (sinal 1) e ao nitrogênio (sinal 2) da função hidroxamato se apresentaram como simpletos de deslocamentos químicos médios iguais a 11,07 e 8,90 ppm, respectivamente. Os hidrogênios ligados aos nitrogênios da função uréia também foram observados como simpletos de deslocamentos químicos iguais a 8,89 ppm (sinal 3) e 8,70 ppm (sinal 4), e também serviram como referência para a identificação preliminar dos produtos finais desta série.

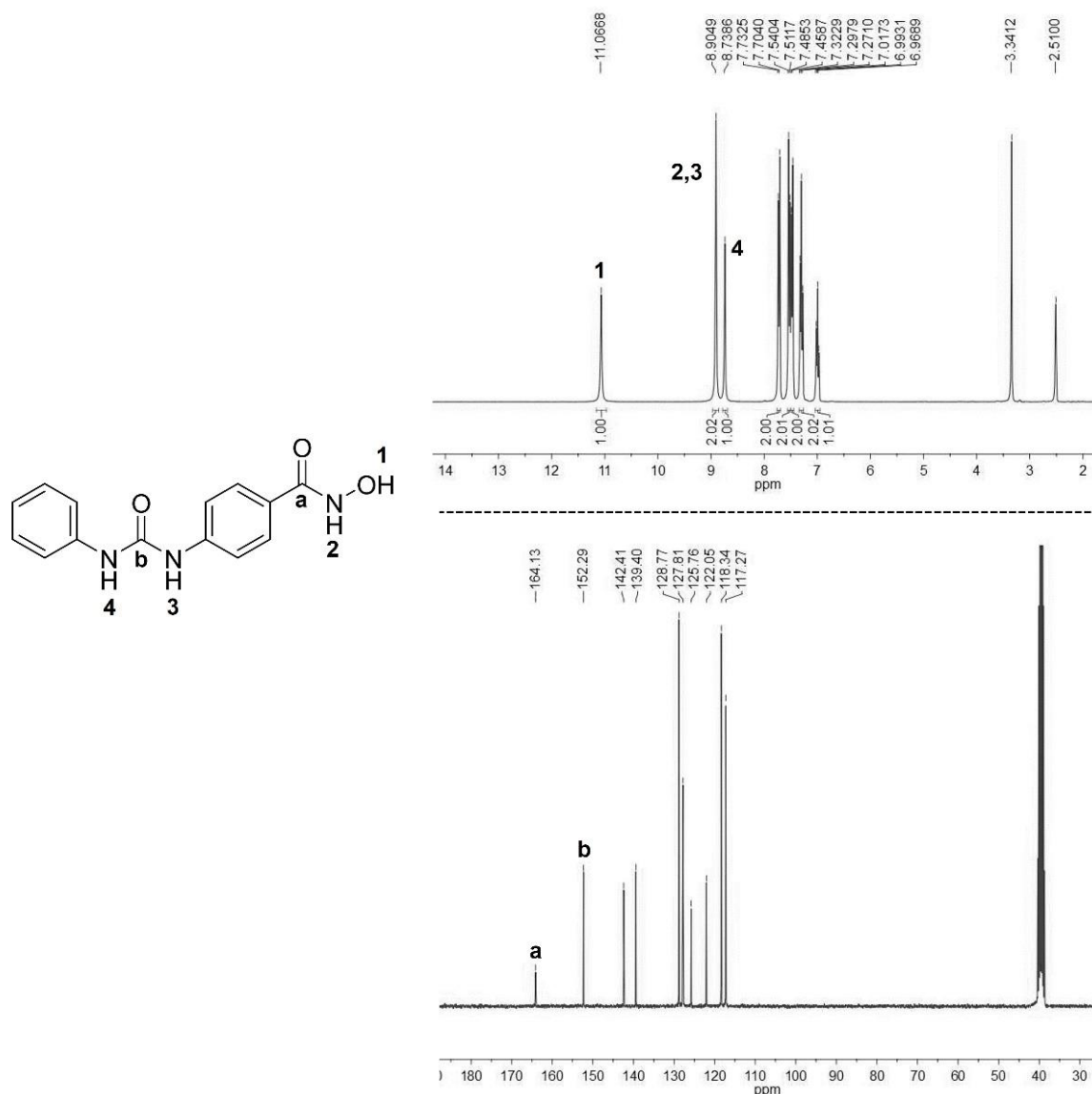


Figura 12. Padrão de deslocamentos químicos dos compostos da série 2. Solvente: DMSO d_6 .

Os carbonos carbonílicos dos análogos da série 2 também auxiliaram na caracterização inicial dos produtos, os quais apresentaram deslocamentos médios iguais a 164 e 152 ppm, relativos às carbonilas da função hidroxamato (sinal “a”, Figura 12) e da função uréia (sinal “b”, Figura 12), respectivamente. Os espectros e demais caracterizações de todos os composto estão apresentados na seção 5 deste trabalho – *Parte Experimental*.

3.2 Triagem fenotípica por ensaio de citotoxicidade

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo, com o Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto e a mestranda Larissa Costa de Almeida, que prontamente aceitaram nossa proposta de parceria para a triagem dos compostos por meio do ensaio de MTT. O ensaio de biorredução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), ou sal de tetrazólio, é um método colorimétrico de avaliação da atividade metabólica celular.¹⁰⁵ O produto final, formazana, de cor azul escura, insolúvel em meio aquoso, pode ser quantificado por espectrofotometria após lise celular induzida e solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO).¹⁰⁶ O fundamento desta técnica baseia-se em traçar uma correlação entre a quantidade de formazana produzida e a concentração de células viáveis no meio, assim, quanto maior for a concentração de células vivas, maior será a taxa de biorredução do MTT e assim a de formazana no meio.¹⁰⁵

Com isso, é possível se estimar a taxa de proliferação e viabilidade celular, estando estas células expostas aos compostos sintetizados neste trabalho. Primeiramente foram preparadas soluções 50 μ M de todos os compostos contendo 1% de DMSO. A partir destas soluções, diluições sucessivas foram realizadas até a concentração de 3 nM. É importante, para a correta condução dos ensaios, que a concentração final de DMSO seja de no máximo 1%, visto que é amplamente conhecido o potencial citotóxico do mesmo, quando em concentrações superiores a 2%. É digno de nota que nenhum composto apresentou problemas de solubilidade para a condução dos ensaios. Maiores detalhes a respeito do método estão apresentados na seção 5 deste trabalho – *Parte Experimental*.

A Tabela 2 apresenta os resultados de concentração inibitória 50% (IC₅₀) da triagem fenotípica procedida para as duas linhagens de tumores sólidos (MCF-7 e HCT 116) e duas linhagens de tumores hematológicos (Jurkat e Namalwa). De forma geral, as linhagens hematológicas foram mais suscetíveis a ação dos compostos, se comparadas às ações em linhagens de tumores sólidos. Os compostos da série 1 apresentaram capacidade inibitória superior aos compostos da série 2, sendo destaque os compostos **4d**, **4e**, e **4f**, que apresentaram, respectivamente, atividades inibitórias iguais a 20, 30 e 50 nM contra células Jurkat, e de 40, 40 e 100 nM sobre células Namalwa. É válido ressaltar que os valores de atividade determinados para estes compostos foram superiores aos valores determinados para os fármacos doxorrubicina e vorinostate, conforme será discutido no próximo parágrafo.

É sabido que tumores hematológicos são mais suscetíveis a ação de inibidores de HDAC e de TQ, o que pode ser exemplificado pelo grande número de aprovações clínicas desses fármacos para o tratamento de cânceres desta natureza. Ainda assim, os valores de IC₅₀ encontrados para os

compostos **4d-f** podem ser considerados bastante promissores, visto que foram superiores aos determinados para o fármaco amplamente utilizados na terapêutica, doxorubicina (IC₅₀: 50 nM para Jurkat; e 90 nM contra Namalwa), bem como foram superiores à ação inibitória determinada para o pan inibidor de HDAC, vorinostate (IC₅₀: 100 nM contra Jurkat; e 110 nM para Namalwa). Neste sentido, espera-se que a inibição de uma única isoforma de HDAC – neste caso a HDAC6 – exerça ação biológica inferior àquela promovida pela inibição global de todas as isoformas da enzima, isto é, de todas as onze isoformas de HDAC existentes. O fato dos compostos **4d-f** possuírem potência superior a do vorinostate nas linhagens hematológicas pode sugerir duas hipóteses: i) os compostos são mais potentes do que o vorinostate; ou ii) os resultados sugerem que os compostos **4d-f** podem estar exercendo atividade por mecanismos duais e sinérgicos de inibição, o que viria a refletir nos valores mais baixos de IC₅₀ encontrados. Para comprovação de tais hipóteses, ensaios de inibição enzimática nas enzimas HDAC1-11 e em painel de quinases podem ser conduzidos, trazendo luz aos aspectos mecanísticos destes compostos.

Tabela 2. Dados biológicos dos compostos ensaiados.^a

Composto	Concentração inibitória média – IC ₅₀ ± SD (µM) ^{b,c}			
	Tumores sólidos		Tumores hematológicos	
	HCT116	MCF-7	Jurkat	Namalwa
3b	> 50	> 50	> 50	> 50
4a	> 50	> 50	0,20 ± 0,07	0,13 ± 0,04
4b	2,90 ± 1,60	13,20 ± 4,30	0,25 ± 0,07	0,26 ± 0,06
4c	> 50	> 50	> 50	> 50
4d	9,30 ± 2,10	9,30 ± 2,10	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01
4e	21,70 ± 8,00	21,70 ± 7,80	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
4f	8,30 ± 5,40	19,50 ± 8,20	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,01
4g	16,30 ± 5,60	> 50	0,60 ± 0,18	0,50 ± 0,20
4h	> 50	> 50	1,50 ± 0,52	0,80 ± 0,50
4i	> 50	> 50	> 50	> 50
4j	> 50	> 50	> 50	> 50
4k	> 50	> 50	> 50	> 50
7a	14,71 ± 2,82	> 50	2,50 ± 0,76	0,53 ± 0,14
7b	> 50	> 50	1,06 ± 0,45	0,87 ± 0,46
7c	22,28 ± 5,27	> 50	8,03 ± 3,07	4,79 ± 1,93
7d	28,40 ± 6,97	> 50	12,65 ± 3,86	13,25 ± 5,87
10a	6,49 ± 1,16	> 50	0,16 ± 0,04	0,30 ± 0,09
10b	29,86 ± 8,44	> 50	0,04 ± 0,01	0,20 ± 0,05
10c	11,86 ± 3,86	> 50	0,11 ± 0,05	0,46 ± 0,19
10d	12,57 ± 2,44	> 50	0,09 ± 0,03	0,58 ± 0,22
13a	16,22 ± 3,66	> 50	1,59 ± 0,72	0,78 ± 0,18
13b	17,92 ± 7,12	> 50	0,41 ± 0,23	0,37 ± 0,13
13c	31,03 ± 6,82	> 50	2,80 ± 0,86	1,99 ± 0,83
13d	6,37 ± 3,17	> 50	0,81 ± 0,32	2,50 ± 0,98
doxorubicina	0,50 ± 0,20	1,90 ± 0,70	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,03
vorinostate	4,20 ± 1,60	> 50	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,04

^aValores obtidos pelo ensaio de biorredução do MTT. ^bn = 2 experimentos independentes, realizados em duplicatas.

^cSD: desvio padrão, ou *standard deviation*.

A Figura 13 correlaciona o padrão estrutural dos compostos mais ativos e menos ativos da série 1. Como é possível observar, a substituição na posição 6 do núcleo purínico parece exercer influência crítica na atividade dos compostos. Observa-se que a ausência de anilinas nesta posição (compostos **4j** e **4k**), bem como a presença de anilinas que contenham substituintes polares e hidrofílicos

(compostos **4c** e **4i**) resultaram na perda total de atividade do produto. É digno de nota que a substituição do núcleo 6-cloropurínico pode exercer influência crítica na eventual ação dual destes compostos, visto que a clássica interação de inibidores de TQ na região de *hinge* do bolsão de quinases (vide Figura 4) requer ao menos um grupo doador de ligação de hidrogênio (HBD – *hydrogen-bond donor*).⁴³ Contudo, estudos de inibição enzimática destes compostos nos respectivos alvos representam a forma mais adequada de suportar e dar robustez a esta hipótese, e são considerados na seção 4.1 deste trabalho – *Perspectivas*.

Por outro lado, observa-se que a medida em que o composto (**4a**) é substituído por anilinas contendo substituintes de maior caráter lipofílico (compostos **4b**, **4d**, **4e**, e **4f**), a atividade biológica dos compostos também é aumentada. Ademais, para os compostos **4f-h**, observa-se que o grau de substituição das anilinas por metoxilas afetou a atividade biológica final. É possível observar que, para a linhagem Jurkat, a conversão do sistema trimetoxilado (**4h**) por dimetoxilado (**4g**) dobrou a potência do análogo, ao passo que a conversão do sistema dimetoxilado para monometoxilado (**4f**) aumentou em 12 vezes a atividade do composto (Figura 13).

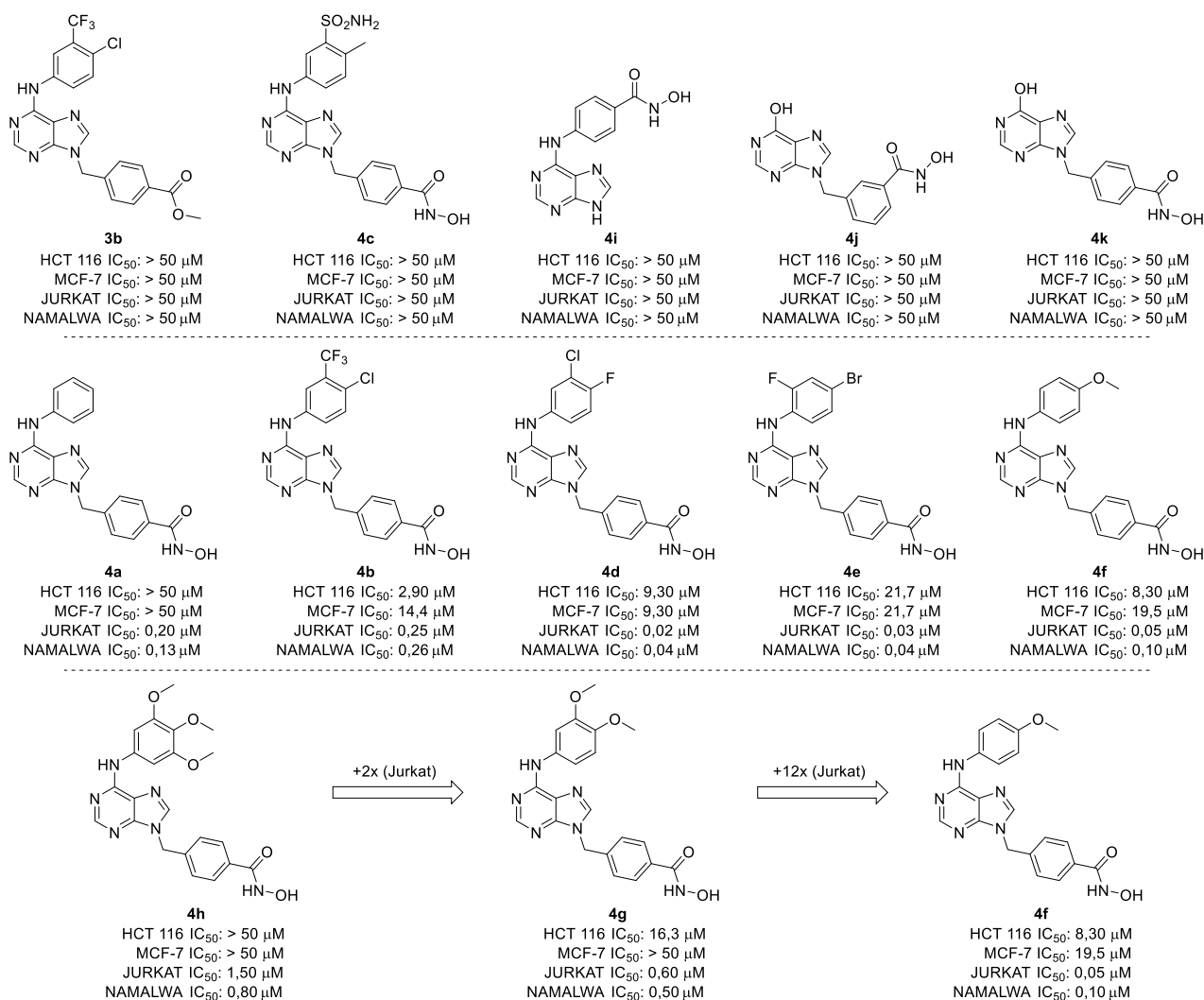


Figura 13. Relação estrutura-atividade dos análogos da série 1.

Estes resultados sugerem que para a série 1, anilinas de caráter lipofílico com menor impedimento estérico e menor área de superfície polar possuem melhor capacidade de interação com seus alvos biológicos potenciais. Por fim, é possível observar que a ausência do grupo hidroxamato comprometeu totalmente a atividade dos compostos, o que é ilustrado na Figura 13 pelos valores de atividade do composto **4b** e de seu intermediário de síntese **3b**, cuja ausência da função quelante resultou na perda total de atividade do composto.

Para a série 2, é possível observar na Figura 14 a influência do tipo de *linker* (vide Figura 5) na atividade dos compostos. De forma geral, a atividade biológica dos análogos aumentou com a conversão do *linker* fenil por cinamil e reduziu com a sua hidrogenação, gerando o *linker* di-hidrocinamílico. Em se tratando das atividades em células Jurkat, o *linker* cinamil causou aumentos de, respectivamente, 15, 26, 73 e 140 vezes na atividade dos compostos **10a-d**, se comparado aos análogos fenílicos **7a-d**, fato este que pode ser correlacionado a melhor capacidade dos compostos (**10a-d**) em se acomodar na cavidade de interação, se comparados aos análogos fenílicos. Por outro lado, os compostos **13a-d** apresentaram prejuízos de, respectivamente, 10, 10, 25 e 9 vezes na atividade, se comparados aos análogos cinamílicos. Neste sentido, o *linker* mais flexível dos análogos **13a-d** parece ter prejudicado a atividade biológica destes compostos, fato que pode estar associado a prejuízos entrópicos causados pela ponte etilênica para a formação do complexo ligante-alvo.

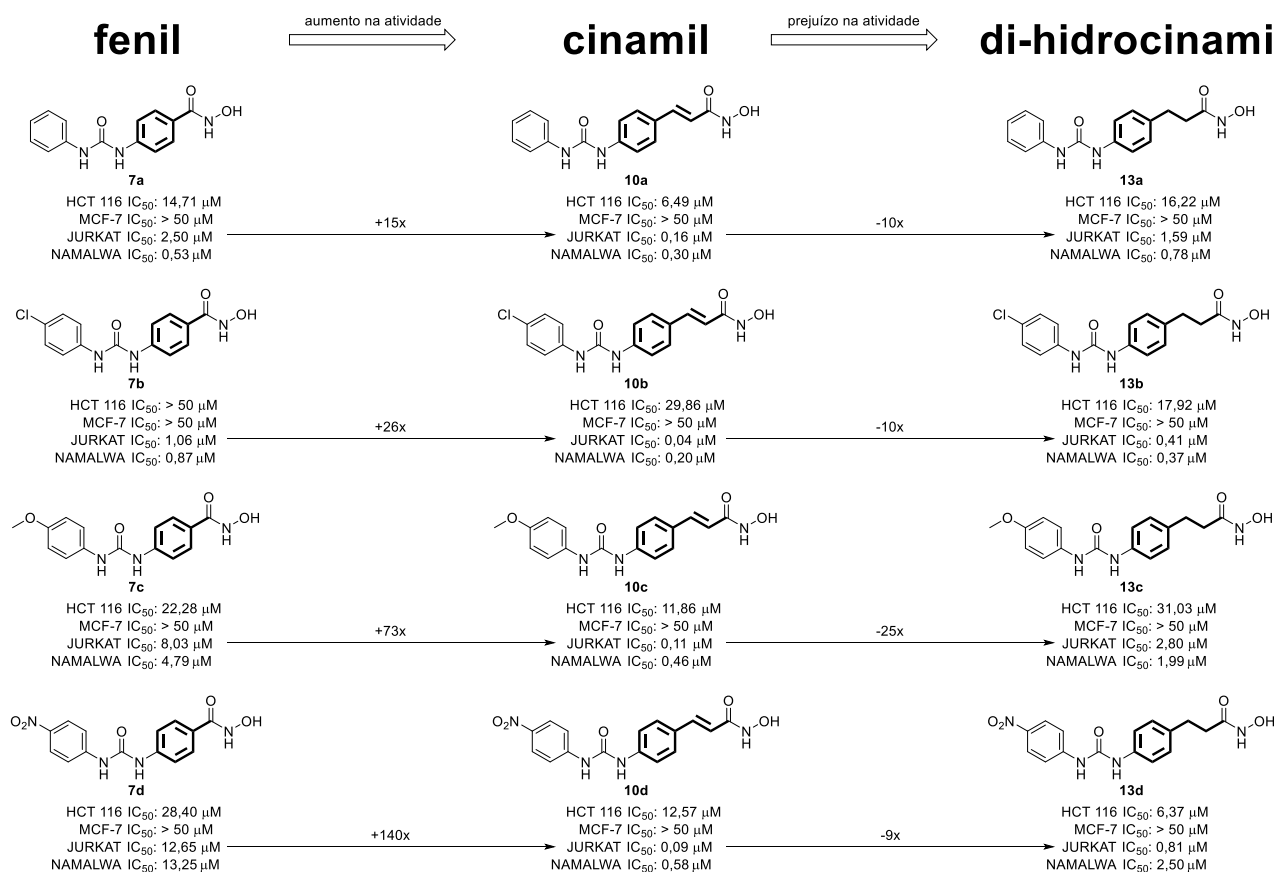


Figura 14. Relação estrutura-atividade dos análogos da série 2. Em negrito destaca-se a região de *linker* dos compostos.

Em relação aos substituintes do anel A (vide Figura 9) destes compostos, os análogos *para* clorados (**7b**, **10b**, e **13b**) foram os análogos mais potentes para cada um dos *linkers* testados, o que reforça a hipótese de que substituintes lipofílicos podem contribuir positivamente para a atividade dos compostos. Porém, para fortalecimento desta hipótese, novos análogos devem ser estudados. Notadamente, até o momento não foi possível traçar correlações em relação à *para* substituição do anel A dos compostos da série 2, seja por grupo doadores ou desativadores, os quais não exerceram influências significativas na atividade, de forma que não é possível se estabelecer características para este padrão de substituição que contribuam positivamente para a atividade dos compostos.

3.2.1 Estudos de elucidação da ação citotóxica

Frente aos resultados da triagem fenotípica, fica clara a maior suscetibilidade das linhagens hematológicas à ação dos compostos planejados neste trabalho. Neste sentido, os estudos de investigação sobre o efeito tóxico dos compostos ativos foram conduzidos nas linhagens Jurkat e Namalwa, especificamente para os compostos **4d-f**, os mais ativos nos ensaios de citotoxicidade. Inicialmente, avaliou-se a cinética de citotoxicidade dos compostos pelo método de MTT com incubações de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 15). Os compostos **4d-f** apresentaram efeito citotóxico tempo-dependente, uma vez que diminuíram-se os valores de IC_{50} dos análogos a medida em que aumentaram-se os tempos de exposição das células tratadas. Neste sentido, a ação tempo-dependente dos compostos **4d-f** foi semelhante àquela observada para o pan inibidor de HDAC, vorinostat, bem como para o fármaco doxorrubicina. Adicionalmente, estudos conduzidos por Beckers e colaboradores (2012)⁷⁸ para inibidores duais de HER1-2 e HDAC, análogos do erlotinibe (vide Figura 8), reportaram o mesmo comportamento para os compostos mais potentes estudados. Mais tarde, Zang e colaboradores (2018) corroboraram estes achados em seus estudos com análogos duais do pazopanibe com atividade em VEGFR e HDAC (Figura 8).⁸⁰

Para a linhagem Namalwa, foi realizado o estudo do percentual de células em apoptose após 48 h de tratamento com os compostos **4d-f**. As células tratadas com os compostos apresentaram aumento significativo de populações celulares em apoptose quando comparadas ao controle (Figuras 16 e 17), estando assim marcadas com anexina V, proteína capaz de se ligar à fosfatidilserina liberada por células em processo apoptótico.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Adicionalmente, foi avaliado a proliferação celular por marcação com Ki67, uma proteína associada com a transcrição de RNA ribossômico, evento intimamente relacionado com a proliferação das células (Figura 18).¹¹⁰ Foi observada um importante redução de proliferação celular de células Namalwa nos grupos tratados com as IC_{50} determinadas para os compostos **4d-f** previamente, e também nos grupos tratados com metade do valor de IC_{50} ($IC_{50}/2$).

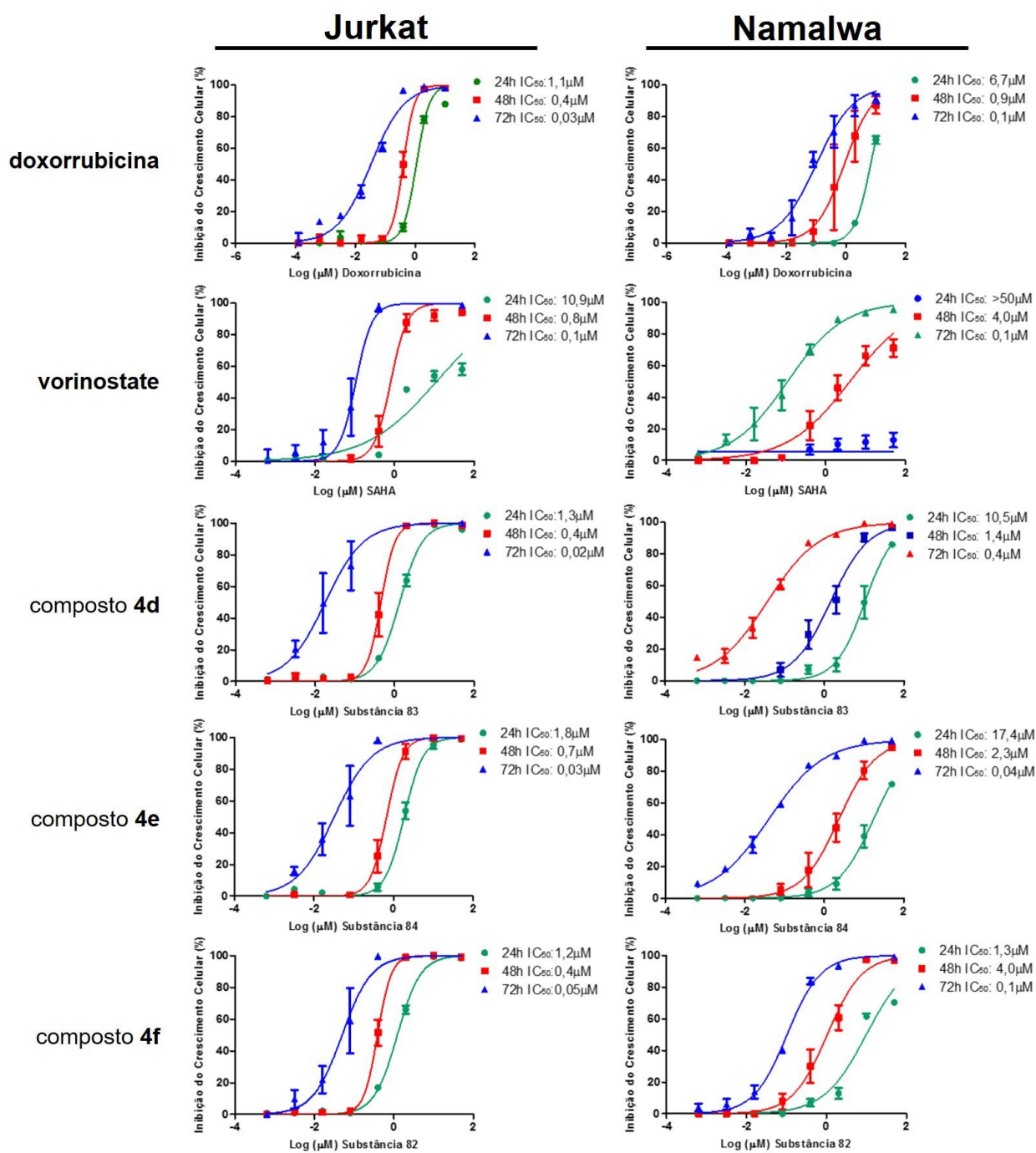


Figura 15. Cinética dos compostos **4d-f**, e dos controles positivos doxorubicina e vorinostat. Cinéticas efetuadas com incubações de 24, 48, e 72 h, em células Jurkat e Namalwa. Os valores de IC₅₀ de cada composto em cada tempo e linhagem seguem expressos na imagem.

Tomados em conjunto, os resultados de apoptose (ensaio com anexina V) e proliferação (ensaio com Ki67) complementam os achados de triagem fenotípica por MTT. Conforme apresentado nas Figuras 16-18, observou-se que a ação citotóxica dos compostos **4d-f** em células Namalwa tem relação à resposta das células a dois processos celulares distintos, neste caso a indução de estímulo apoptótico e, principalmente, a ação antiproliferativa dos compostos, esta última com maior relevância para o efeito citotóxico resultante. Neste sentido, é válido ressaltar os benefícios existentes na quimioterapia do câncer com o uso de fármacos cujas respostas terapêuticas sejam oriundas de

efeitos citostáticos, especialmente no que se refere à toxicidade e tolerabilidade por parte dos pacientes, o que pode ser fator chave para o sucesso do tratamento.^{111–114}

Os estudos conduzidos para o candidato a fármaco fimepinostate (CUDC-907), bem como para os demais inibidores duais de HDAC-TQ (apresentados na Figura 8), indicam que o efeito citotóxico destes compostos é oriundo de ação citostática para todas as linhagens descritas nos estudos.^{77,78,80–82} Neste sentido, os resultados biológicos obtidos até o momento para os análogos **4d-f**, ainda que não comprovem de forma inequívoca a ação dual destes análogos, são evidências de que as respostas celulares causadas pelo tratamento das células (Namalwa) possuem correlação com aquelas reportadas para inibidores HDAC-TQ já descritos na literatura, induzindo respostas bastante semelhantes, especialmente em relação aos estudos de avaliação da ação citostática.

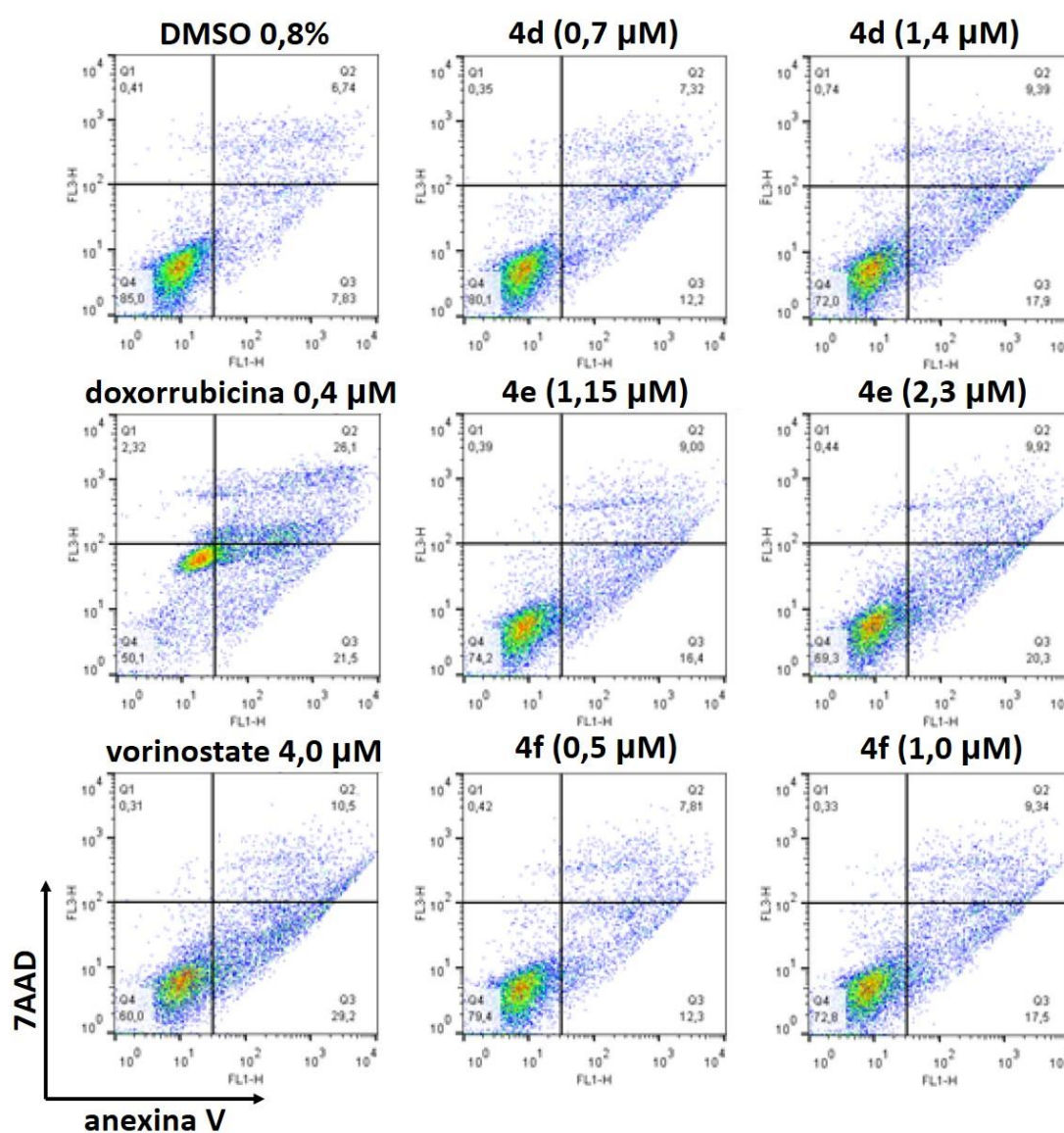


Figura 16. Apoptose detectada por citometria de fluxo em células Namalwa tratadas com doxorubicina (0,4 μM), vorinostatate (4,0 μM), e com os análogos **4d** (0,7 e 1,4 μM), **4e** (1,15 e 2,3 μM), e **4f** (0,5 e 1,0 μM) por 48 h usando método de coloração com anexina V-FITC/7AAD. Os gráficos de pontos representativos são mostrados para cada condição; os quadrantes superior e inferior direito (Q2 mais Q3) cumulativamente contêm a população apoptótica (células anexina V positivas). FITC: isotiocianato de fluoresceína. 7AAD: 7-aminoactinomicina D.

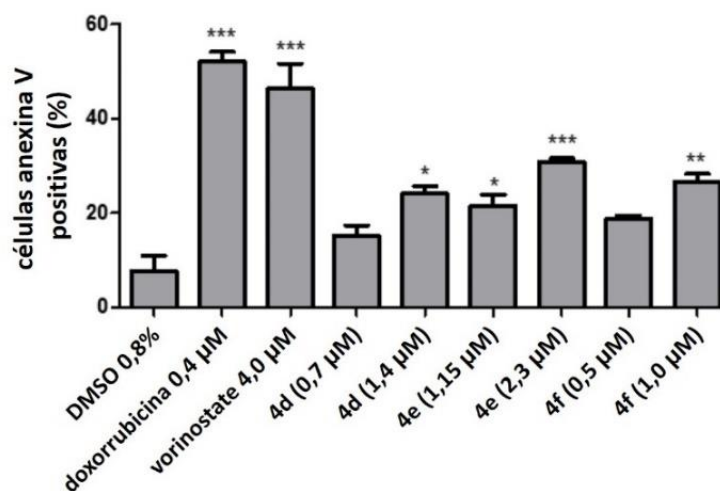


Figura 17. Porcentagens de células Namalwa positivas para anexina V nos grupos DMSO 0,8%, doxorubicina (0,4 µM), vorinostate (4,0 µM), e para os análogos **4d** (0,7 e 1,4 µM), **4e** (1,15 e 2,3 µM), e **4f** (0,5 e 1,0 µM), obtidas por citometria de fluxo e marcação com 7AAD e anexina V-FITC. Os resultados são apresentados como média \pm SD de três experimentos independentes. *($p < 0,01$); **($p < 0,001$); ***($p < 0,0001$), teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni, todos os pares foram analisados e as diferenças estatisticamente significantes estão indicadas.

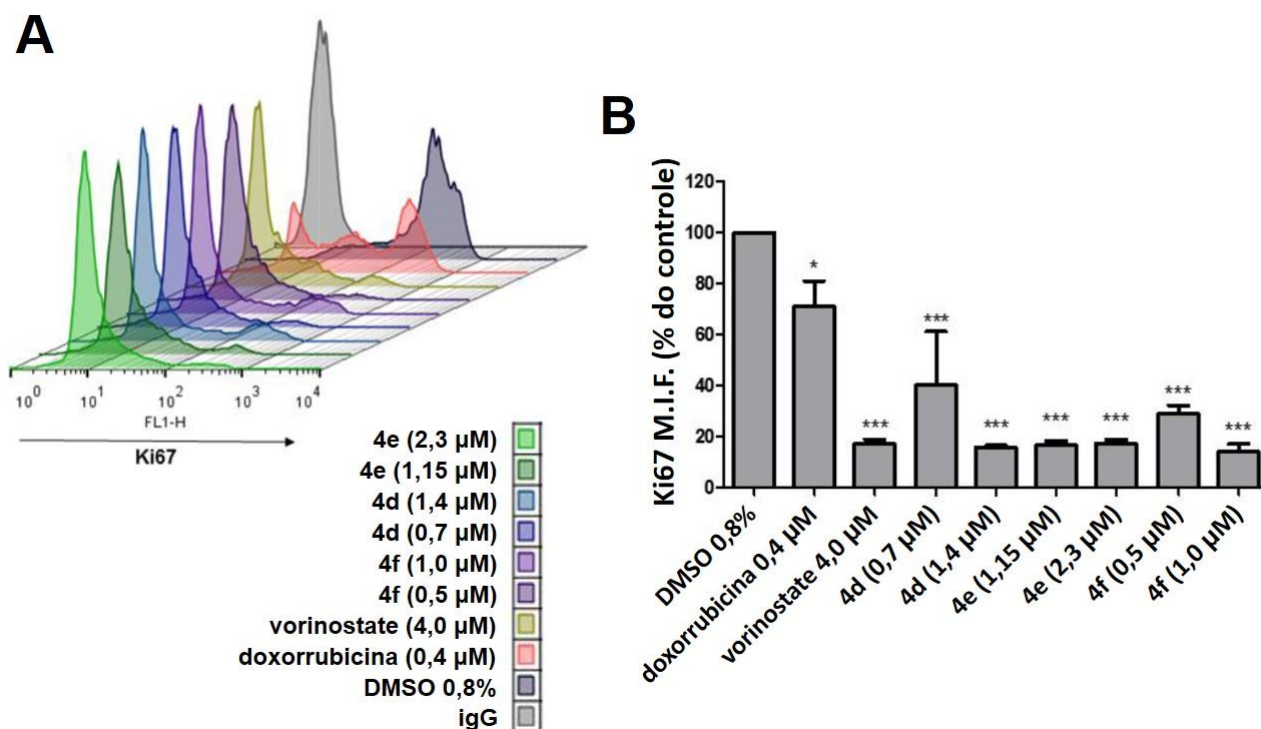


Figura 18. (A) Intensidade de fluorescência média (MFI) da Ki67 determinada por citometria de fluxo, após incubação de células Namalwa tratadas com DMSO 0,8%, doxorubicina (0,4 µM), vorinostate (4,0 µM), e com os análogos **4d** (0,7 e 1,4 µM), **4e** (1,15 e 2,3 µM), e **4f** (0,5 e 1,0 µM) por 48 h. Os traços do histograma são ilustrados por padrão de cores. (B) MFI da Ki-67 normalizada para as respectivas células do controle negativo (DMSO 0,8%). Os resultados são apresentados como média \pm SD de três experimentos independentes. *($p < 0,05$), teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni, todos os pares foram analisados e as diferenças estatisticamente significantes estão indicadas. MFI: *mean fluorescence intensity*.

3.3 Estudos *in silico*

Os resultados dos ancoramentos moleculares foram conduzidos nas proteínas HDAC6 (código PDB: 5g0i⁶²) e HER1 (código PDB: 4zau¹¹⁵). Mesmo sem informações a respeito da inibição

específica desses alvos pelos compostos sintetizados neste trabalho, a escolha foi feita com base em estudos preliminares de REA realizados para inibidores de HER1⁴⁵ e HDAC6.⁵⁰ Estes estudos sugerem que o padrão estrutural dos inibidores aqui apresentados tem correlação com inibidores destes dois alvos, o que motivou os estudos *in silico*. A Tabela 3 apresenta os valores de escore dos análogos nas simulações de *docking* para cada um dos alvos. Como é possível observar, os compostos ativos da série 1 (**4a**, **4b**, **4d-h**, destacados em verde) apresentaram valores médios de escore acima de 70 nas simulações procedidas para HDAC6. Já os compostos inativos (**4c**, **4i-k**, destacados em vermelho) apresentaram valores inferiores a 69. Curiosamente, para os análogos da série 2, os valores médios de escore obtidos foram semelhantes aos observados para os compostos ativos da série 1 (escores entre 71 e 72), o que sugere que estes compostos possuem capacidades equiparáveis de interação com a HDAC6. É válido ressaltar que os achados *in silico* não devem ser considerados isoladamente como fator determinante de avaliação da capacidade dos análogos em inibir a HDAC6. Assim, compostos inativos nos ensaios celulares não possuirão, necessariamente, baixa afinidade pelo alvo nas simulações, visto que outros fatores podem estar relacionados à ausência de atividade (ex: solubilidade, estabilidade e reações com outros substratos intracelulares).

Tabela 3. Simulações de ancoramento molecular realizadas neste trabalho.

		Valores de ranqueamento nas simulações de <i>docking</i>													
		Dockings em HDA6 (PDB: 5g0i) ^a						Dockings em HER1 (PDB: 4zau) ^b							
Comp. ^{c,d}		#1	#2	#3	#4	#5	#6	Média	#1	#2	#3	#4	#5	#6	Média
Série 1	4a^e	70,85	71,72	70,63	69,90	70,15	70,93	70,70	30,14	30,86	29,78	30,88	29,96	29,33	30,16
	4b	74,51	71,88	72,05	73,61	73,98	72,95	73,16	35,27	33,76	34,54	35,76	36,04	36,15	35,25
	4c	67,69	70,04	68,07	70,62	68,24	69,19	68,98	30,65	28,43	29,77	28,47	30,61	27,69	29,27
	4d	73,51	73,86	74,80	72,90	71,65	71,63	73,06	32,88	29,91	30,98	31,48	31,75	30,54	31,26
	4e	70,98	72,59	70,26	70,74	71,66	71,52	71,29	33,52	32,29	30,37	30,00	32,64	33,32	32,02
	4f	72,34	72,50	72,82	72,27	72,21	69,81	71,99	31,67	30,98	32,12	30,85	31,58	31,65	31,48
	4g	77,41	75,76	74,91	79,19	75,91	79,51	77,12	31,28	29,63	31,38	31,81	29,53	31,23	30,81
	4h	77,87	76,36	72,32	73,37	77,10	76,09	75,52	32,72	32,26	31,55	32,38	32,55	32,06	32,25
	4i	66,53	67,62	64,63	68,06	63,91	66,38	66,19	25,71	24,33	25,18	25,40	25,50	25,97	25,35
	4j	62,83	62,95	63,20	62,52	63,71	63,43	63,11	25,62	25,95	25,02	26,01	26,09	26,89	25,93
	4k	64,30	66,20	64,22	64,62	64,62	65,29	64,88	24,36	24,17	24,21	24,27	23,74	24,10	24,14
Série 2	7a	69,41	72,89	72,54	73,18	72,58	73,35	72,33	22,85	23,79	23,80	23,67	23,37	23,63	23,52
	7b	70,39	72,59	73,08	73,16	72,75	71,43	72,23	23,72	23,40	23,27	23,84	23,29	23,07	23,43
	7c	69,32	72,28	72,88	73,28	73,00	73,59	72,39	25,18	25,64	26,27	25,53	25,95	24,93	25,58
	7d	71,38	69,09	73,26	73,00	73,13	72,61	72,08	26,08	24,37	24,56	24,33	25,92	24,46	24,95
	10a	70,71	71,44	70,24	71,09	71,71	71,82	71,17	26,64	25,57	26,01	26,41	26,86	25,87	26,23
	10b	71,24	71,92	71,68	71,85	71,55	71,63	71,65	26,78	26,62	27,57	27,37	27,57	27,08	27,17
	10c	71,29	71,79	71,98	71,94	71,51	71,56	71,68	27,03	27,00	26,67	27,18	26,99	27,30	27,03
	10d	68,88	71,36	71,53	71,84	71,48	71,57	71,11	27,49	27,82	29,44	27,72	27,71	28,16	28,06
	13a	71,52	71,46	72,27	71,55	72,37	71,37	71,76	25,70	26,74	27,31	27,12	25,47	26,81	26,53
	13b	69,40	73,25	73,21	73,69	73,60	73,44	72,77	29,04	27,70	28,50	27,63	28,31	27,75	28,16
	13c	70,69	70,79	71,58	71,14	70,45	74,97	71,60	27,75	27,36	27,69	27,50	27,69	28,23	27,70
13d	74,31	71,42	74,86	69,42	71,96	74,97	72,82	29,08	28,20	29,39	28,94	30,43	28,99	29,17	

^aSimulações realizadas em sextuplicata, utilizando a função de escore GoldScore. ^bSimulações realizadas em sextuplicata, utilizando a função de escore ASP. ^cO número de identificação dos compostos da série 1, ativos nos ensaios biológicos, e de seus respectivos escores médios seguem destacados em verde na tabela. ^dO número de identificação dos compostos da série 1, inativos nos ensaios biológicos, bem como seus respectivos valores de escores médios estão destacados em vermelho na tabela. ^eOs valores de ranqueamento da série 1 foram representados em esquema de cores para melhor interpretação. Compostos ativos destacados em verde e compostos inativos destacados em vermelho.

Para as simulações de *docking* conduzidas na HER1 quinase, o mesmo perfil de ranqueamento foi observado para os compostos ativos e inativos da série 1 (Tabela 3). Neste caso, os compostos que apresentaram atividade biológica (**4a**, **4b**, **4d-h**, destacados em verde) apresentaram valores de escore acima de 30, ao passo que os compostos inativos (**4c**, **4i-k**, destacados em vermelho) apresentaram escores inferiores a 30. Para a série 2 (Figura 9), as modificações propostas para os análogos do sorafenibe compreendem a conversão do sistema *N*-metilpicolinamídico (em negrito, Figura 19) pelo grupo hidroxamato. De acordo com estudos de REA e mecanismo de ação ao nível molecular, a porção *N*-metilpicolinamídica do sorafenibe se liga à região de *hinge* do bolsão do ATP de quinases (Figura 4), e constitui parte fundamental da capacidade de interação do sorafenibe com quinases.^{116,117} Neste sentido, modificações deste núcleo tendem a comprometer a afinidade do análogo resultante pelo alvo. Com base nos achados experimentais, e com os resultados dos estudos *in silico*, a potência reduzida dos análogos da série 2 (em comparação com os da série 1), bem como os baixos valores de ranqueamento desses análogos em HER1 quinase – comparáveis aos ranqueamentos dos compostos inativos da série 1 – sugerem que esses análogos possam estar inibindo o proliferação celular apenas via inibição de HDA6. Ademais, o fato dos análogos terem tido menor efeito frente às linhagens provenientes de tumores sólidos pode ser um fator indicativo de que outras quinases, que não a HER1, podem ser alvos destes inibidores. Este fato é suportado pelo fato de receptores de fator de crescimento epidermal – como o HER1 – estarem amplificados em uma série de tumores sólidos, dentre eles o adenocarcinoma mamário MCF-7.^{118,119} O fato dos análogos terem exercido menor efeito citotóxico em MCF-7 pode estar relacionado a isto, e simulações de *docking* adicionais, realizadas em quinases alternativas como a PI3K, o VEGFR e a Btk quinase podem fornecer novos *insights* a respeito do modo de ação destes compostos, especialmente em relação aos análogos da série 1. Porém, é necessário ressaltar que os ensaios de triagem de inibição enzimática podem confirmar a atividade destes compostos frente a cada uma das enzimas.

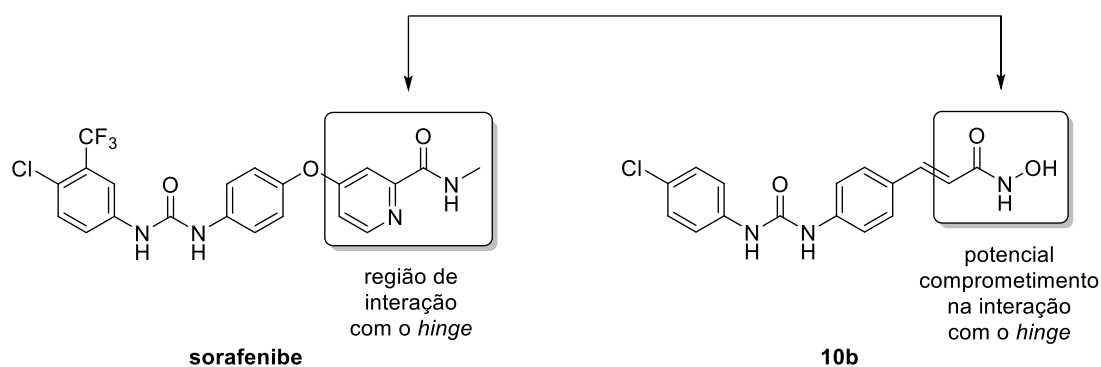


Figura 19. Conversão do sistema *N*-metilpicolinamídico do sorafenibe pelo hidroxamato do composto **10b**.

Outro ponto importante de discussão está no fato de as simulações de *docking* terem sido conduzidas em HER1 com a função de escore “ASP”, enquanto as simulações conduzidas para a

HDAC6 utilizaram a função “GoldScore” (devido a critérios de validação do método). Estas funções utilizam métricas e parâmetros diferentes de ranqueamento das poses de cada ligante e, conseqüentemente, geram valores distintos de pontuação/ranqueamento.¹²⁰⁻¹²² Sendo assim, os valores de pontuação obtidos para as simulações de cada alvo não devem ser comparados entre si e, tão pouco, retratam diferenças de afinidade entre os alvos estudados.¹²³ Assim, os valores encontrados podem ser comparados dentro da própria análise, isto é, resultados obtidos com a função “GoldScore” em HDAC6 devem ser comparados com os demais resultados de HDAC6, e o mesmo se aplica para a função “ASP” em HER1.¹²⁴

O modo de interação dos compostos com os alvos moleculares estudados neste trabalho foram avaliados após as simulações de *docking*. A pose mais frequente e de maior ranqueamento de cada análogo foi isolada e analisada minuciosamente. As poses dos compostos mais ativos (**4d-f**, e **10b**) dispostos no interior da cavidade catalítica da HDAC6 seguem apresentadas na Figura 20. O composto **4d** (Figura 20A) apresentou coordenação monodentada com zinco, algo observado para outros inibidores seletivos de HDAC6 reportados na literatura, como o nexturastate A.⁶² Ademais, a função hidroxamato do composto **4d** estabeleceu duas ligações de hidrogênio adicionais no fundo da cavidade de interação, com os aminoácidos Gly582 e Asp612. Na região do *linker* (vide Figura 20A) o composto realizou interações hidrofóbicas com Phe583, His614 e Phe643, interações comumente observadas para inibidores de HDAC6.⁶² Interações adicionais na região do *cap* também foram observadas para o composto **4d**. Nesta região de interação, o núcleo purínico do composto estabeleceu uma interação hidrofóbica adicional com Phe642; e a região do anel 3-cloro-4-fluoroanilina uma interação de hidrogênio importante com Arg636, do tipo NH...F. Interações semelhantes foram observadas para o composto **4e** (Figura 20B). Porém, para este análogo, é necessário destacar a clássica coordenação bidentada com Zn²⁺, a qual também é descrita para diversos inibidores de HDAC6.¹²⁵ Além disso, a região do anel 4-bromo-2-fluoroanilina do composto **4e** estabeleceu duas ligações de hidrogênio com a cadeia lateral da Ala641 (OH...F) e da Asn645 (NH...F), bem como com a cadeia lateral da Ser531 (OH...N). O composto **4f** (Figura 20C) apresentou coordenação monodentada com zinco e foi o análogo que estabeleceu menos interações de hidrogênio com a HDAC6, no caso, com o Asp612 no fundo da cavidade, e com a Ser531 na região do *cap*. Curiosamente, o composto **4f** foi um dos mais ativos da série 1, fato que, tomado em conjunto com os resultados de ancoramento molecular, pode sugerir que o número de interações polares efetuadas ao longo da cavidade da HDAC6 não necessariamente refletem em maior potência ou ação citotóxica dos análogos. O análogo da série 2 apresentado na Figura 20D – composto **10b** – foi único composto que não estabeleceu interações na região do *cap* da enzima. A disposição linear destas uréias impediu

que todos os análogos da série 2 estabelecessem interações adicionais na superfície da cavidade da HDAC6.

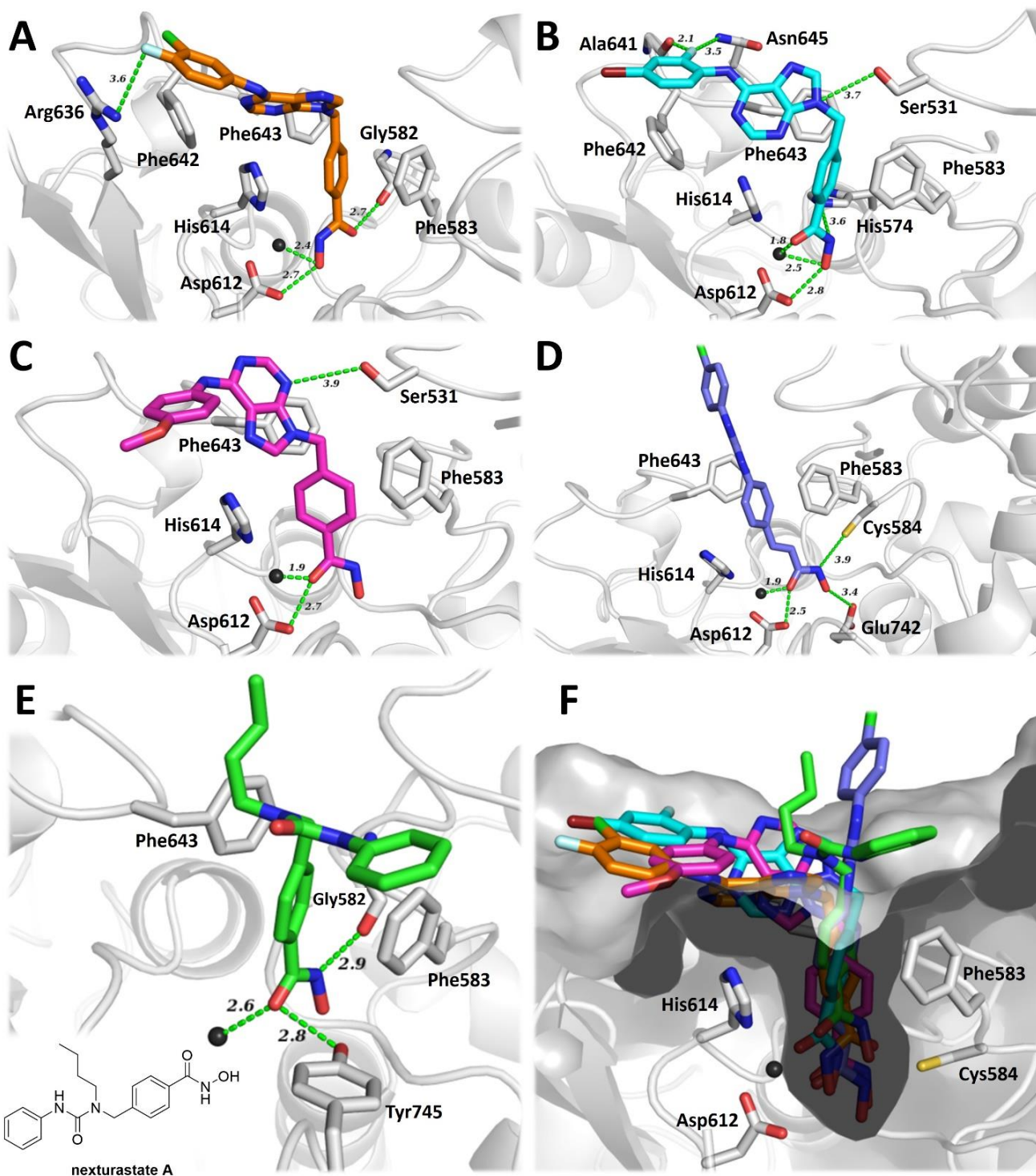


Figura 20. Estudos de *docking* procedidos para HDAC6. As poses apresentadas são as mais frequentes e melhor ranqueadas para cada um dos análogos. (A) Pose do composto **4d** (carbonos em laranja). (B) Pose do composto **4e** (carbonos em ciano). (C) Pose do composto **4f** (carbonos em magenta). (D) Pose do composto **10b** (carbonos em azul marinho). (E) Estrutura empírica do nexturastate A (carbonos em verde) ligada ao domínio catalítico CD2 da HDAC6, determinada por Miyake e colaboradores (2016)⁶² – código PDB: 5g0i. (F) Poses dos análogos **4d-f** e **10b** sobrepostas à estrutura empírica do nexturastate A no interior da cavidade catalítica (CD2) da HDAC6. A estrutura *cartoon* da proteína, e seus carbonos, estão representados em branco. Átomo de zinco (Zn^{2+}) representado como esfera cinza escura. Oxigênio representado em vermelho. Nitrogênio representado em azul. Enxofre representado em amarelo. Flúor representado em ciano. Cloro representado em verde. Bromo representado em vinho. Ligações de hidrogênio e coordenações com Zn^{2+} representadas por linhas verdes tracejadas. Distâncias interatômicas em angstroms (Å).

No fundo da cavidade, o composto **10b** apresentou coordenação monodentada com Zn^{2+} e ligações de hidrogênio com Cys584 (SH \cdots NH), Asp612 (OH \cdots O), e Glu742 (O \cdots OH). Na região de *linker*, as mesmas interações hidrofóbicas observadas para os demais análogos foram observadas (a saber, com Phe583, His614 e Phe643). As Figuras 20E e 20F permitem análises comparativas entre as poses obtidas para os compostos **4d-f** e **10b** e a estrutura empírica do nexturastate A.⁶² Como pode ser observado, o nexturastate A explora a cavidade de interação de forma bastante semelhante aos análogos, estabelecendo interações hidrofóbicas do tipo π -*stacking* com as cadeias laterais da Phe583 e Phe643, além de ligação de hidrogênio com Tyr745 (OH \cdots O) e coordenação do tipo monodentada com zinco no fundo da cavidade, do tipo $Zn^{2+}\cdots O$ (Figura 20E).⁶² Neste sentido, a sobreposição dos análogos **4d-f** e **10b** na superfície da cavidade de interação da HDAC6 (Figura 20F) indica que a exploração da cavidade de interação na região de *linker* e ZBG é semelhante à reportada para o nexturastate A.⁶² Interessantemente, para a região de *cap* a natureza dos substituintes polares dos compostos **4d-f** permitiram que os compostos sofressem ajustes induzidos em suas conformações, que viabilizaram o estabelecimento de interações adicionais na superfície da cavidade, o que não é observado para o nexturastate A. Notadamente, a região de *cap* do nexturastate A carece de substituintes polares que viabilizem interações polares na superfície, o que pode ter relação com a disparidade conformacional existente na região de *cap* entre os compostos **4d-f** e o nexturastate A. Neste sentido, Bergman e colaboradores (2012)⁵⁹ reportaram valores de concentração inibitória de 50% do crescimento (GI₅₀) para o nexturastate A e para a tubastatina A (GI₅₀: 14,3 μ M e 40,5 μ M, respectivamente – Figura 6B), determinadas em células de melanoma murino B16. Ainda que os compostos **4d-f** não tenham sido ensaiados em linhagem B16, é possível se traçar um paralelo entre as atividades em tumores sólidos, encontradas para estes compostos, o nexturastate A, e a tubastatina A. Os achados de atividade biológica dos compostos **4d-f** em HCT116 e MCF-7 (Tabela 2 e Figura 13) indicam que estes compostos podem, potencialmente, apresentar atividade aprimorada em tumores sólidos se comparados ao nexturastate A e à tubastatina A, uma vez que apresentarem valores de IC₅₀ entre 9,3 μ M e 21,7 μ M nestas linhagens. A possível melhoria de atividade em linhagens sólidas destes análogos pode estar associada à melhor eficiência de exploração da cavidade de interação de seus alvos, como a HDAC6. Contudo, a ausência de dados de atividade do nexturastate A e da tubastatina A para as linhagens testadas neste estudo, bem como a ausência – até o momento – de dados de atividade inibitória dos análogos **4d-f** e **10b** frente a HDAC6 e às demais isoformas de HDAC, inviabilizam análises mais aprofundadas de correlação entre estes compostos, o que oportunamente poderá ser feito, com base no perfil inibitório destes análogos frente às onze isoformas de HDAC.

Para o composto **10b**, foi observada uma disposição linear na cavidade da HDAC6, com o sistema 4-clorofenilureia exposto ao solvente. Conseqüentemente, é possível observar que o análogo **10b** foi aquele que explorou a cavidade catalítica mais a fundo e de forma mais equivalente ao nexturastate A, o que em parte pode estar associado ao sistema linear cinamílico dos análogos **10a-d**, que devido ao sistema olefinico α,β -insaturado, torna a região de *linker* destes análogos mais rígida (comparado aos análogos **13a-d**), e volumosa (se comparado aos análogos da série 1 e aos compostos **7a-d**).

As poses mais frequentes e de maior ranqueamento dos compostos mais ativos (**4d-f**, e **10b**), dispostos no interior da cavidade catalítica da HER1 quinase seguem apresentadas na Figura 21. Todos os compostos avaliados (**4d-f** e **10b**) apresentaram interações hidrofóbicas com as cadeias laterais dos aminoácidos Leu718, Ala743 e Leu844, as quais exercem importância na formação do complexo ligante-alvo para HER1 quinase, e são reportadas para outros inibidores descritos na literatura.⁴⁵ Ademais, todos os compostos estabeleceram ligações de hidrogênio com o *backbone* do aminoácido Met793, situado na região de *hinge* da HER1 quinase (vide Figura 4), e que é considerado um ponto de interação crucial não apenas para inibidores de HER, mas também de outros receptores e enzimas TQ como VEGFR, PDGFR, e Btk quinase.^{34,35}

Curiosamente, as simulações de *docking* apontaram duas poses possíveis (em frequências semelhantes) para os análogos. Como é possível observar para o composto **4d** (Figura 21A), a porção hidroxamato do composto ficou exposta à região do solvente (vide Figura 4), ao passo que os compostos **4e**, **4f** e **10b** (Figura 21B-D) apresentam a função hidroxamato estabelecendo ligações de hidrogênio com Asp855 (**4e** e **4f**) ou Glu762 e Thr854 (**10b**), situados na região do sítio de ligação da ribose (vide Figura 4). Para esta região, o análogo **4d** estabeleceu uma ligação de hidrogênio adicional com a cadeia lateral da Lys745 ($\text{NH}\cdots\text{F}$, Figura 21A). A exposição da função hidroxamato ao solvente, ou a interação da mesma com aminoácidos do sítio de interação da ribose foi observada para todos os análogos, em frequência praticamente semelhante. É digno de nota que todas as poses dos inibidores que apresentaram a função hidroxamato exposta ao solvente, estabeleceram apenas uma ligação de hidrogênio com o *backbone* da Met793, sendo esta estabelecida entre o nitrogênio peptídico (do aminoácido) e o nitrogênio 3 do anel purínico dos inibidores da série 1 (interação do tipo $\text{NH}\cdots\text{N}$); ou o nitrogênio *para*-cinamílico do composto **10b** da série 2 (interação do tipo $\text{O}\cdots\text{NH}$). Para as poses em que o hidroxamato voltou-se ao sítio da ribose, duas ligações de hidrogênio foram estabelecidas com o *backbone* da Met793, incluindo o análogo **10b** da série 2. Surpreendentemente, o composto **10b** estabeleceu duas ligações de hidrogênio a partir de sua função ureia (Figura 21D). Estes achados sugerem que os compostos da série 2 podem, potencialmente, interagir com HER1 mesmo sem apresentar o núcleo *N*-metilpicolinamídico (vide Figura 19). É importante ressaltar que,

até o momento, as evidências experimentais reportadas para inibidores de quinase que possuem função uréia em suas estruturas não indicam a existência de interações de hidrogênio entre a uréia do composto, e a região de *hinge* da cavidade.^{116,117,126}

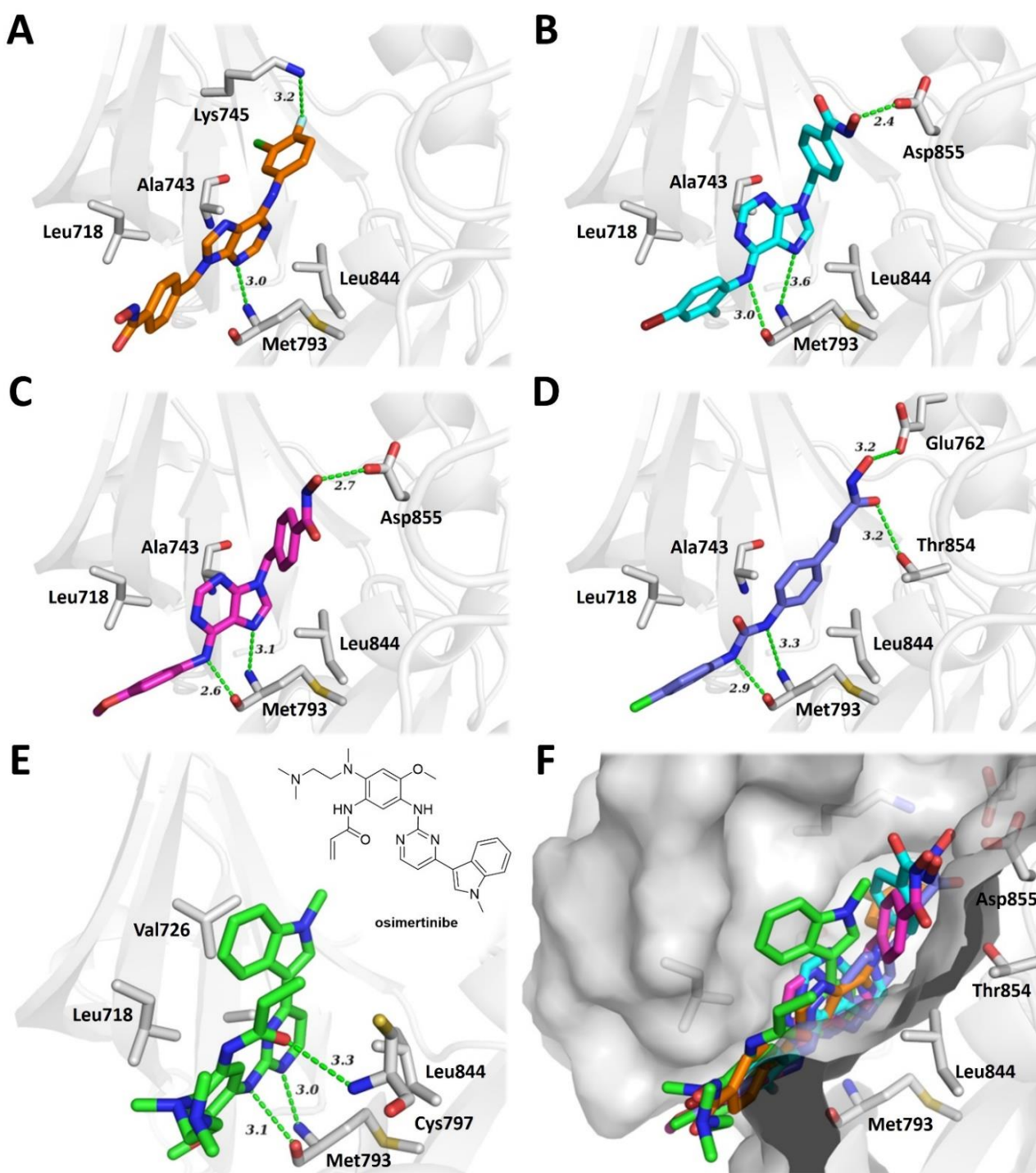


Figura 21. Estudos de *docking* procedidos para HER1 quinase. As poses apresentadas são as mais frequentes e melhor ranqueadas para cada um dos análogos. (A) Pose do composto **4d** (carbonos em laranja). (B) Pose do composto **4e** (carbonos em ciano). (C) Pose do composto **4f** (carbonos em magenta). (D) Pose do composto **10b** (carbonos em azul marinho). (E) Estrutura empírica do osimertinibe (carbonos em verde) ligado à cavidade de interação do ATP da HER1 quinase, determinada por Yosaatmadja e colaboradores (2015)¹¹⁵ – código PDB: 4zau. (F) Poses dos análogos **4d-f** e **10b** sobrepostas à estrutura empírica do osimertinibe na cavidade catalítica da HER1 quinase. A estrutura *cartoon* da proteína, e seus carbonos, estão representados em branco. Oxigênio representado em vermelho. Nitrogênio representado em azul. Enxofre representado em amarelo. Flúor representado em ciano. Cloro representado em verde. Bromo representado em vinho. Ligações de hidrogênio representadas por linhas verdes tracejadas. Distâncias interatômicas em angstroms (Å).

Assim, caso esta interação esteja ocorrendo de fato para os análogos da série 2, ela que pode ser comprovada por ensaios de inibição enzimática. Adicionalmente, estudos de caracterização da disposição preferencial destes análogos perante o alvo podem ser conduzidos para maior elucidação do mecanismo ao nível molecular destes análogos com a HER1 quinase, como a cristalografia de raios-X de complexos ligante-proteína e cálculos semiempíricos de energia de interação, estes últimos com capacidade de determinação de valores teóricos de energia livre (ΔG°) para cada uma das poses ancoradas, indicando aquelas mais favoráveis energeticamente.¹²⁷

As Figuras 21E e 21F permitem análises comparativas entre as poses obtidas para os compostos **4d-f** e **10b** e a estrutura empírica do osimertinibe.¹¹⁵ Como pode ser observado, o osimertinibe explora a região de *hinge* da cavidade de interação de forma bastante semelhante aos análogos, estabelecendo duas interações de hidrogênio com o *backbone* da Met793, de forma semelhantes aos compostos **4e**, **4f**, e **10b**. Contudo, o osimertinibe estabelece uma ligação de hidrogênio adicional com o *backbone* da Cys797 (do tipo $\text{NH}\cdots\text{O}$) e não explora a cavidade de interação do fosfato, sendo importante ressaltar que este fármaco é considerado de segunda geração para a classe dos inibidores de HER, por se tratar de um inibidor irreversível.^{128,129}

Neste sentido, o mecanismo de ação canônico do osimertinibe prevê o ataque nucleofílico da acrilamida pela cadeia lateral da Cys797.¹²⁹ Porém, o cristal utilizado nas simulações foi obtido para a proteína selvagem, sem que o ataque nucleofílico ao osimertinibe tenha ocorrido.¹¹⁵ Assim, como pode ser observado na Figura 21F, os compostos **4d-f** e **10b** exploram de forma mais eficiente a região do fosfato da HER1 quinase se comparados ao osimertinibe que, contudo, exerce sua ação inibitória mediante ligação covalente com o alvo. É possível observar que, independente da orientação da porção hidroxamato das moléculas na cavidade, o espaço molecular ocupado pelos ligantes é bastante semelhante ao do osimertinibe, fato que pode estar relacionado com as interações com o *backbone* da Met793, na região de *hinge*.

3.3.1 Visão geral da REA proposta para os compostos das séries 1 e 2

Face ao exposto, os achados biológicos em associação às observações decorrentes das simulações de docking molecular permitem a proposição de mapas de REA para cada uma das séries propostas e sintetizadas neste trabalho. Como é possível observar no modelo geral proposto para a série 1 (Figura 22), a presença de anilinas na posição 6 do anel purínico foi essencial para a atividade dos compostos, o que em parte pode estar associado à presença da tríade de nitrogênios que é capaz de mimetizar o mesmo padrão apresentado pela adenina do ATP. Da mesma forma, o sistema benzílico ligado ao nitrogênio 9 do anel purínico parece ser importante para a manutenção da seletividade dos compostos para HDAC6, embora ensaios enzimáticos sejam necessários para

reforçar esta hipótese de interação. Por fim, a função hidroxamato provou-se essencial para a atividade dos compostos, o que foi comprovado por ensaios efetuados com o intermediário avançado de síntese **3b** (Tabela 2 e Figura 13).

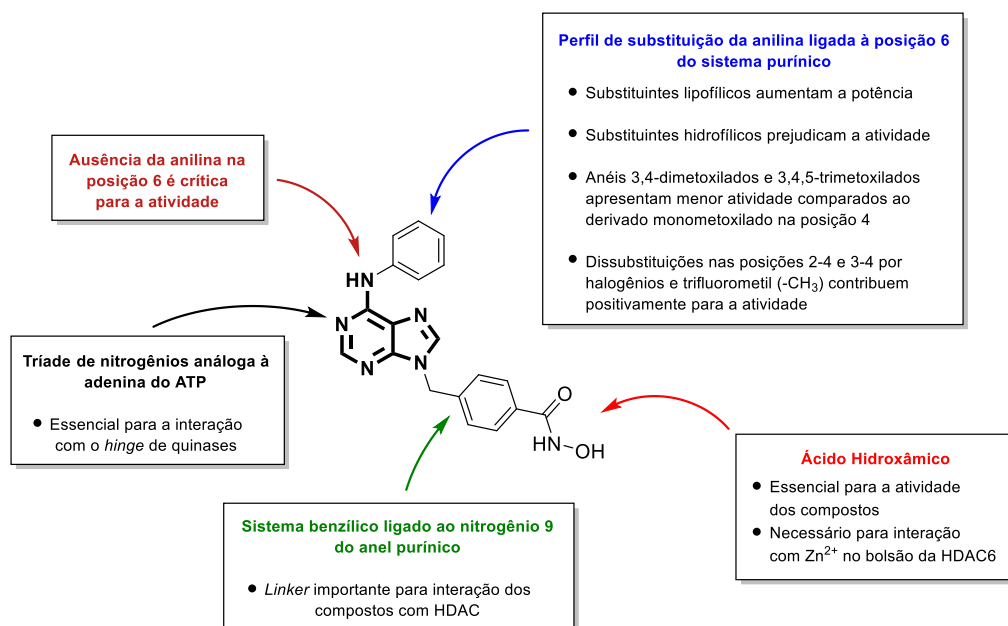


Figura 22. Modelo de REA proposto para os análogos da série 1.

Para os compostos da série 2 (Figura 23), o mesmo perfil da série 1 pode ser associado à função hidroxamato dos compostos desta série. Porém, para a região de *linker*, o sistema cinâmico – rígido e linear – apresentado pelos compostos **10a-d** foi aquele que conferiu os análogos mais potentes da série. Curiosamente, este tipo de *linker* é encontrado em dois fármacos inibidores de HDAC, o belinostate e o panobinostate (Figura 5). As simulações de *docking* apontaram a capacidade da função uréia em estabelecer ligações de hidrogênio com a região de *hinge* de quinases (HER1), ainda que estudos de inibição enzimática possam confirmar essa hipótese de interação. Até o momento não foi possível estabelecer relações de contribuição de *para*-substituintes para o anel A (Figura 9) dos compostos, e estudos adicionais são necessários para melhor compreensão do perfil de substituição desta região.

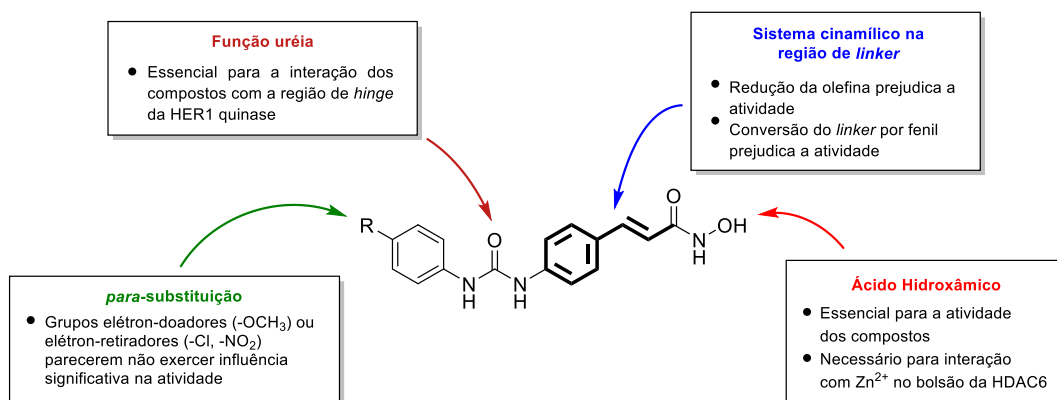


Figura 23. Modelo de REA proposto para os análogos da série 2.

4. Conclusão

Neste trabalho foram planejados inibidores seletivos da enzima HDAC6, com atividade dual frente a enzimas TQ. Foram planejadas duas séries de compostos com base em estudos prévios de REA a respeito de inibidores destes dois alvos. Foram sintetizados 11 compostos pertencentes a série 1, que apresenta núcleo purínico substituído nas posições 6 e 9 com anilinas e grupo quelante de zinco, respectivamente. Para a série 2 foram sintetizados 12 compostos planejados com base na estrutura do sorafenibe. Todos os 23 compostos planejados foram sintetizados, isolados e caracterizados. Os compostos foram obtidos em duas ou três etapas sintéticas em rendimentos globais que variaram entre 4 e 86%. As rotas sintéticas empregadas utilizaram estratégias clássicas de síntese orgânica, de baixo custo geral e facilmente extrapoláveis para escalas industriais. Todos os compostos obtidos são inéditos, excetuando o análogo **10b**, e foram encaminhados aos ensaios de triagem biológica.

Os compostos foram ensaiados em quatro linhagens tumorigênicas sendo duas dessas linhagens provenientes de tumores sólidos e duas provenientes de tumores hematológicos. Os compostos da série 1 apresentaram os maiores valores de atividade pelo ensaio de MTT. As linhagens hematológicas foram mais sensíveis à ação dos compostos, fato amplamente reportado em literatura para inibidores de HDAC6 e TQ. Apenas os compostos **4b**, **4d-f** foram ativos contra células MCF-7 de carcinoma mamário. Os compostos **4d-f** apresentaram valores de atividade superiores aos do controle positivo vorinostate em todas as linhagens, exceto HCT116 (adenocarcinoma colorretal). Os compostos **4d-f** apresentaram valores de atividade ligeiramente superiores aos do controle positivo doxorrubicina nas duas linhagens hematológicas testadas. O padrão de substituição das anilinas ligadas à posição 6 do núcleo purínico dos análogos da série 1 parece exercer influência na atividade dos compostos. Para a série 2, o núcleo cinamílico gerou os análogos mais ativos da série (**10a-d**). As substituições em *para* do anel A dos compostos da série 2, por grupo doadores ou desativadores não exerceram influências significativas na atividade, de forma que não é possível, até o momento, se estabelecer características para esta posição que influenciem positivamente a atividade dos compostos.

Os estudos preliminares de elucidação do mecanismo de ação citotóxica executados para os compostos **4d-f** indicam que a citotoxicidade apresentada pelos compostos em células Namalwa deriva majoritariamente de ação citostática, e também de estímulo apoptótico. Este fato possui correlação com resultados reportados para outros inibidores duais HDAC-TQ descritos na literatura, e pode representar um importante ganho para estes compostos quanto à toxicidade e efeitos adversos.

Os achados *in silico* permitiram a elaboração de hipóteses sobre o modo de interação ao nível molecular destes compostos. Os inibidores da série 1 apresentaram padrão mono e bidentado de quelação com o zinco, nas simulações procedidas em HDAC6, com ligeira preferência para o modo

monodentado de interação. Todos os compostos da série 2 apresentaram o padrão monodentado de quelação. Em relação à superfície da enzima HDAC6, os análogos da série 1 foram capazes de estabelecer interação na região de *cap* dos compostos, ao passo que os análogos da série 2 estabeleceram interação somente ao longo da região de *linker* e no fundo da cavidade de interação (com o Zn^{2+} e cadeias laterais de aminoácidos). Estudos de *docking* efetuados para a proteína HER1 quinase indicaram dois perfis de interação para os compostos, que variaram de acordo com a orientação da porção hidroxamato na cavidade de interação. Os achados sugerem a possível orientação do grupo hidroxamato sentido à área exposta ao solvente, ou ainda estabelecendo interações de hidrogênio com o bolsão de interação da ribose (Figura 4). Todos os compostos estabeleceram interações de hidrogênio importante com o aminoácido Met793 situado na região de *hinge* da enzima.

Mesmo sem análises probatórias específicas, o presente trabalho apresenta os primeiros potenciais inibidores duais de enzimas HDAC6 e HER1 reportados na literatura, que possuem elevado potencial de proteção intelectual e aplicabilidade para o tratamento do câncer.

4.1 Perspectivas

Frente aos resultados iniciais promissores deste projeto, as seguintes etapas estão sendo conduzidas, ou serão conduzidas em breve:

- **Ensaio de inibição enzimática frente às onze isoformas de HDAC (HDAC1-11).** Avaliação de seletividade para HDAC6;
- **Ensaio de inibição enzimática frente a um painel de quinases.** Avaliação de seletividade para HER1;
- **Avaliação da citotoxicidade em linhagens não tumorigênicas.** Estabelecimento do índice de seletividade para linhagens tumorigênicas;
- **Estudos mecanísticos aprofundados.** Determinação das vias de sinalização de indução de morte celular;
- **Avaliação preliminar de parâmetros farmacocinéticos (estudos PK).** Determinação de propriedades farmacocinéticas para posterior condução de estudos *in vivo* ou possíveis otimizações nas estruturas dos compostos (ex: curva de solubilidade, ensaio de permeabilidade por PAMPA e células Caco-2, teste de conjugação à albumina sérica, estabilidade microssômica, e genotoxicidade por teste Ames);
- **Estudos *in vivo*.** Estudos iniciais de segurança e eficácia em modelos xenográfico de camundongos.

5. Parte Experimental

5.1 Síntese e caracterização dos compostos

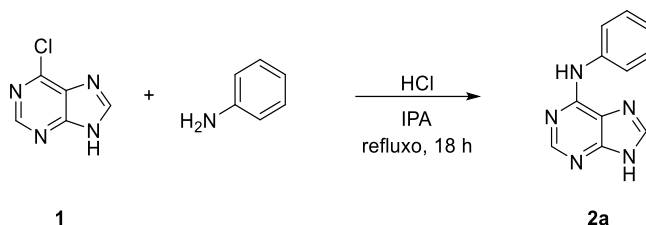
Foram utilizados vidrarias e equipamentos comumente empregados na rotina de laboratórios de síntese orgânica. Os reagentes e solventes utilizados foram obtidos comercialmente dos fornecedores Synth™, Merck™, Sigma-Aldrich-Merck™, e Oakwood Chemicals™. A síntese dos compostos foi acompanhada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando cromatofolhas de alumínio e sílica gel GF₂₅₄ (Merck-Millipore™) reveladas por luz ultravioleta (UV, λ : 254 nm) e solução reveladora de ninidrina, vanilina e molibdato. Os compostos foram purificados por precipitação, recristalização, cromatografia em coluna com sílica gel (tamanho de poro: 60 Å), ou cromatografia líquida automatizada com colunador automático Isolera Prime® (Biotage™).

A pureza dos compostos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo Shimadzu™ Proeminence®, com coluna analítica C-18 Gemini® (5 μ m, 150 x 4,6 mm). As corridas cromatográficas foram monitoradas por arranjo de diodos (PDA) e o cromatograma apresentado reflete ao perfil da amostra em 254 nm. A fase móvel utilizada foi água-acetonitrila (5-100%), contendo 0,1% de ácido trifluoroacético e fluxo de 1 mL/minuto. O tempo total de corrida das análises foi de 25 minutos e o volume de injeção das amostras igual a 20 μ L.

Os intermediários de síntese e compostos finais de síntese foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono-13 (¹H/¹³C), utilizando espectrômetro Bruker™ Advanced-DPX-300® nas frequências 300 MHz e 75 MHz, respectivamente. Os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆, Cambridge Isotope Laboratories™) ou clorofórmio deuterado (CDCl₃, Sigma-Aldrich™). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm). Para calibração interna das análises, utilizou-se o sinal residual dos solventes ou tetrametilsilano (TMS). As multiplicidades dos sinais foram reportadas como simpleto (s), simpleto largo (sl), simpleto aparente (sa), dubleto (d), tripleto (t), tripleto aparente (ta), duplo-dubleto (dd), quarteto (q) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (*J*) dos sinais foram expressas em Hertz (Hz). Os compostos finais também foram caracterizados por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS – *high-resolution mass spectrometry*) com o auxílio de um espectrômetro MicroToF® Bruker Daltonics™ acoplado a uma fonte ionizadora por elétron *spray* (ESI – *electrospray ionization*) e a um cromatógrafo (CLAE) Waters™. Foram consideradas aceitáveis as análises cujos íons moleculares (*m/z*) determinados experimentalmente apresentaram desvios menores ou iguais a ± 5 ppm em relação aos *m/z* teóricos.

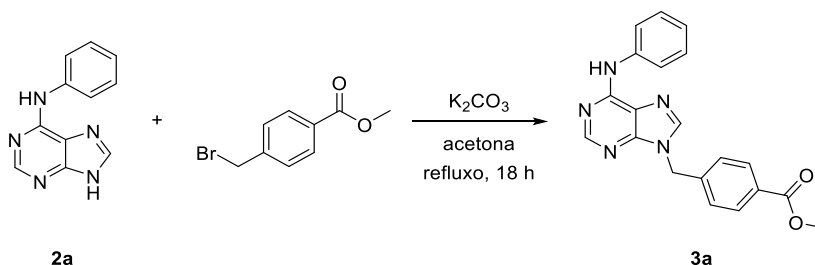
A descrição dos métodos sintéticos gerais estão descritas a seguir, e utilizam como exemplo as rotas de síntese dos compostos **4a**, e os intermediários **6a** e **12a**.

5.1.1 Procedimento geral A



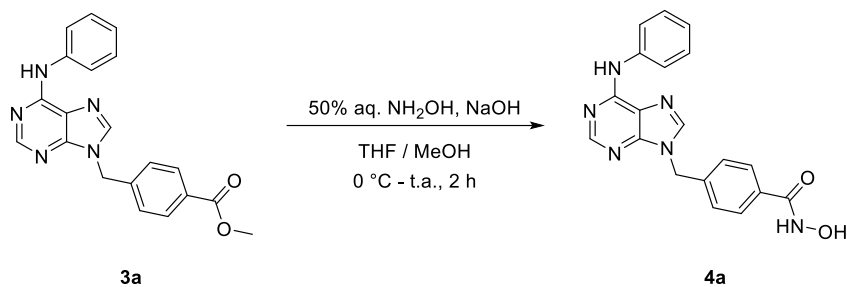
N-fenil-9H-purin-6-amina (2a): Em uma suspensão de 6-cloropurina (**1**, 0,773 g, 5 mmol, 1 eq.) e anilina (0,456 mL, 5 mmol, 1 eq.) em 10 mL de isopropanol, foram adicionados 0,4 mL de HCl concentrado (4 mmol, 0,8 eq.). A suspensão foi mantida em refluxo e agitação constante por 18 h. A mistura resultante foi filtrada a vácuo e lavada com isopropanol (3 x 30 mL). O filtrado foi ressuspenso em 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), e mantido em agitação por 10 minutos. A suspensão foi filtrada a vácuo, lavada com água (3 x 30 mL), e seca em bomba de vácuo para a obtenção do produto **2a** como um sólido verde (1,05 g, >99%).

5.1.2 Procedimento geral B



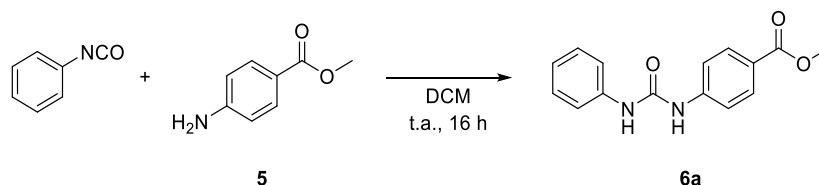
4-((6-(fenilamino)-9H-purin-9-yl)methyl)benzoato de metila (3a): Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 0,401 g do intermediário **2a** (1,9 mmol, 1 eq.), 0,435 g de 4-bromometilbenzoato de metila (1,9 mmol, 1 eq.), e 0,788 g de carbonato de potássio anidro (K₂CO₃, 5,7 mmol, 1 eq.) em 20 mL de acetona. A mistura foi mantida em agitação constante e refluxo por 18 h. A reação foi interrompida com 20 mL de H₂O e extraída com acetato de etila (EtOAc, 3 x 20 mL). A fase orgânica combinada foi lavada com solução de Brine, seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e concentrada em evaporador rotativo. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente diclorometano–metanol (DCM–MeOH; 9,5:0,5) para a obtenção do produto **3a** como um sólido branco (0,432 g, 63%).

5.1.3 Procedimento geral C



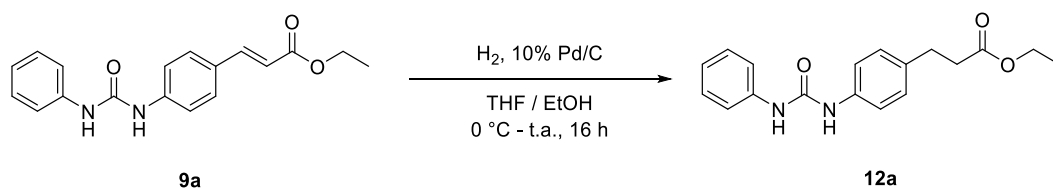
N-hidroxi-4-((6-(fenilamino)-9*H*-purin-9-il)metil)benzamida (**4a**): Em um balão de fundo redondo, 0,243 g de hidróxido de sódio (NaOH, 6,08 mmol, 8 eq.) foi dissolvido em 1,059 mL de solução aquosa de hidroxilamina (50% p/v, 38 mmol, 50 eq.) a 0 °C. Então, foi adicionada gota a gota uma solução contendo o intermediário **3a** (0,273 g, 0,76 mmol, 1 eq.) em tetraidrofurano (THF) e metanol (1:1, 6 mL). A mistura foi mantida em agitação constante e em temperatura ambiente por 2 h. A solução resultante foi neutralizada com HCl 2 N e vertida em 20 mL de água gelada. A suspensão resultante foi filtrada a vácuo, lavada com água gelada (3 x 30 mL), e seca em bomba de vácuo para a obtenção do produto final **4a** como um sólido branco (0,190 g, 69%).

5.1.4 Procedimento geral D



4-(3-fenilureido)benzoato de metila (**6a**): Em uma solução de 4-aminobenzoato de metila (**5**, 0,756 g, 5 mmol, 1 eq.) em DCM (10 mL) foi adicionado 0,545 mL de isocianato de fenila. A mistura foi mantida em agitação constante a temperatura ambiente, em atmosfera inerte (argônio), por 16 h. A suspensão resultante foi filtrada a vácuo e lavada com DCM (3 x 30 mL) para a obtenção do composto final **6a** como um sólido branco (0,422 g, 31%).

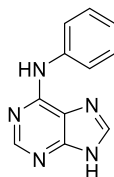
5.1.5 Procedimento geral E



3-(4-(3-fenilureido)fenil)propanoato de etila (**12a**): Em uma solução do intermediário **9a** (0,310 g, 1 mmol, 1 eq.) em etanol (15 mL), foi adicionado 0,120 g de paládio em carbono 10% (10% Pd/C) a 0 °C. Então, a reação foi mantida em agitação constante e temperatura ambiente, em

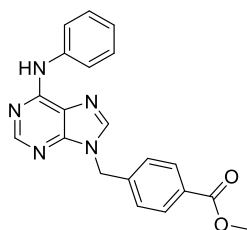
atmosfera de hidrogênio (H₂), por 16 h. O produto bruto foi filtrado em Celite[®] e concentrado, para obtenção do produto final como um sólido branco (0,312 g, quant.).

5.1.6 Caracterização dos intermediários de síntese e compostos finais



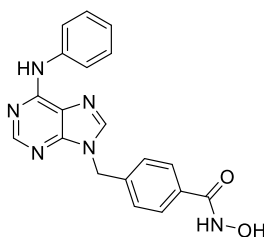
2a

N-fenil-9H-purin-6-amina (2a): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido verde (1,05 g, >99%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,72 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,99 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,35 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,04 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151,8, 151,5, 151,3, 140,2, 139,8, 128,4, 122,3, 120,5, 118,6.



3a

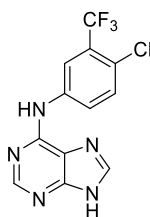
4-((6-(fenilamino)-9H-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3a): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido branco (0,432 g, 63%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,89 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,01 – 7,91 (m, 4H), 7,45 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H), 7,33 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 7,04 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,55 (s, 2H), 3,84 (s, 3H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,8, 152,1, 152,0, 149,7, 142,2, 141,8, 139,6, 129,6, 129,0, 128,3, 127,7, 122,6, 120,8, 119,7, 52,1, 46,0.



4a

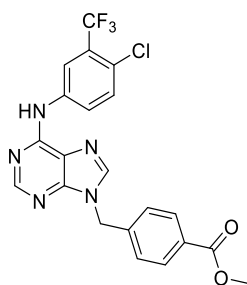
N-hidroxi-4-((6-(fenilamino)-9H-purin-9-il)metil)benzamida (4a): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,190 g, 69%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,19 (s, 1H), 9,87 (s, 1H), 9,04 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,96 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,74 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,40 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,33 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,04 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 5,51 (s, 2H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,8, 152,1, 152,0, 149,6, 141,7, 139,8, 139,6, 132,3,

128,3 (2C), 127,4 (2C), 127,3 (2C), 122,6, 120,8 (2C), 119,7, 46,0. ESI HRMS calc. para $C_{19}H_{17}N_6O_2$: $[M + H]^+$, m/z 361,1408. Achado 361,1414. Pureza: 98,9% (254 nm).



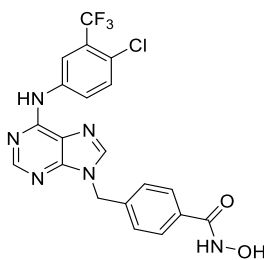
2b

N-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)-9*H*-purin-6-amina (2b): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido cinza (1,302 g, 83%). 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,25 (sl, 1H), 8,64 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,37 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,64 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 152,0, 151,3, 150,8, 141,4, 139,7, 131,6, 126,4 (d, $J = 31$ Hz, 1C), 122,9 (d, $J = 272$ Hz, 1C), 121,1, 119,1, 118,6.



3b

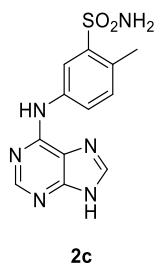
4-(((6-((4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)amino)-9*H*-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3b): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido amarelo claro (0,576 g, 62%). 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,41 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,35 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,94 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,66 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,45 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 5,57 (s, 2H), 3,84 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 151,9, 151,5, 150,0, 142,5, 142,0, 139,4, 131,6, 129,6 (2C), 129,1, 127,7 (2C), 126,7, 126,6, 124,9, 124,5 (d, $J = 262$ Hz, 1C), 120,0, 119,0, 52,1, 46,1.



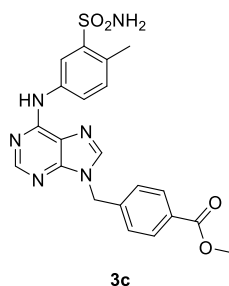
4b

4-(((6-((4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)amino)-9*H*-purin-9-il)metil)-*N*-hidroxibenzamida (4b): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,311 g, 67%). 1H

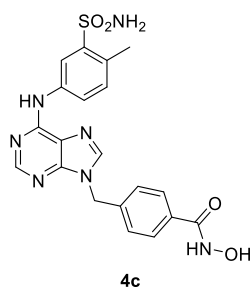
RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,22 (s, 1H), 10,45 (s, 1H), 9,07 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,40 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,78 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,45 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 5,57 (s, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,8, 151,9, 151,4, 149,9, 142,5, 139,7, 139,4, 132,3, 131,6, 127,4 (2C), 127,3 (2C), 126,7, 124,9, 124,5 (d, $J = 260$ Hz, 1C), 121,1, 120,0, 118,9, 46,1. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 463,0892. Achado 463,0899. Pureza: 99,6% (254 nm).



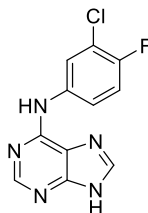
5-((9H-purin-6-yl)amino)-2-metilbenzenosulfonamida (2c): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido marrom (1,381 g, 91%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,96 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,02 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H), 7,50 – 7,10 (m, 3H), 2,56 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 151,7, 151,6, 151,2, 142,0, 140,5, 137,8, 132,2, 129,2, 123,5, 119,3, 118,5, 19,2.



4-(((6-((4-metil-3-sulfamoilfenil)amino)-9H-purin-9-yl)metil)benzoato de metila (3c): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido branco (0,404 g, 45%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,15 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,04 – 7,91 (m, 3H), 7,45 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,38 – 7,27 (m, 3H), 5,56 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,56 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,9, 152,1, 151,9, 149,8, 142,1, 142,0, 137,6, 132,1, 129,6, 129,5, 129,1, 127,7, 123,8, 119,7, 119,6, 52,1, 46,0, 19,2.

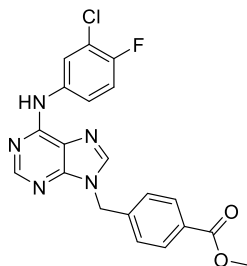


N-hidroxi-4-((6-((4-metil-3-sulfamoilfenil)amino)-9*H*-purin-9-il)metil)benzamida(4c): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,301 g, 90%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,19 (s, 1H), 10,14 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,01 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,40 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,33 – 7,30 (m, 3H), 5,52 (s, 2H), 2,57 (s, 3H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,8, 152,0, 151,9, 149,7, 142,0, 141,9, 139,8, 137,6, 132,3, 132,1, 129,5, 127,4 (2C), 127,3 (2C), 123,8, 119,8, 119,7, 46,1, 19,2. ESI HRMS calc. para C₂₀H₂₀N₇O₄S: [M + H]⁺, *m/z* 454,1292. Achado 454,1299. Pureza: 98,2% (254 nm).



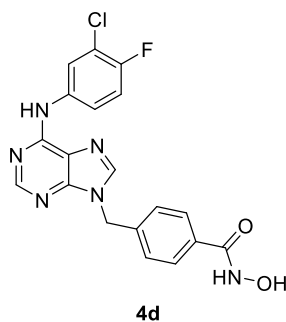
2d

N-(3-cloro-4-fluorofenil)-9*H*-purin-6-amina (2d): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido cinza (1,1 g, 83%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,03 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,41 – 8,32 (m, 2H), 8,00 – 7,91 (m, 1H), 7,39 (t, *J* = 9,1 Hz, 1H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152,6 (d, *J* = 240 Hz, 1C), 151,7, 151,1, 140,5, 137,2 (d, *J* = 3 Hz, 1C), 121,4, 120,5, 120,4, 118,8, 118,6, 116,4 (d, *J* = 21 Hz, 1C).

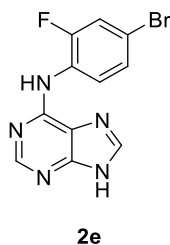


3d

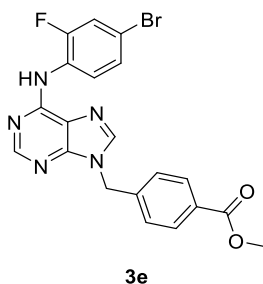
4-((6-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)-9*H*-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3d): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido branco (0,592 g, 72%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,15 (s, 1H), 8,58 – 8,41 (m, 2H), 8,44 – 8,28 (m, 1H), 8,04 – 7,88 (m, 3H), 7,57 – 7,33 (m, 3H), 5,56 (s, 2H), 3,84 (s, 3H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,4, 152,7 (d, *J* = 240 Hz, 1C), 152,0, 151,6, 149,8, 142,1 (d, *J* = 8 Hz, 1C), 137,0 (d, *J* = 1,5 Hz, 1C), 129,6 (2C), 129,1, 127,7 (2C), 121,8, 120,8 (d, *J* = 7 Hz, 1C), 119,7, 118,7 (d, *J* = 18 Hz, 1C), 116,5 (d, *J* = 22 Hz, 1C), 52,1, 46,1.



4-(((6-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)-9H-purin-9-il)metil)-N-hidroxi-benzamida (4d): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,375 g, 89%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,19 (s, 1H), 10,14 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,33 (dd, $J_1 = 6,6$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H), 7,98 – 7,88 (m, 1H), 7,74 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,46 – 7,34 (m, 3H), 5,52 (s, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,8, 152,7 (d, $J = 240$ Hz, 1C), 152,0, 151,6, 149,7, 142,1, 139,8, 137,0 (d, $J = 3$ Hz, 1C), 132,3, 128,6 (d, $J = 163$ Hz, 1C), 127,4 (2C), 127,3 (2C), 121,8, 120,8 (d, $J = 7$ Hz, 1C), 119,7, 118,7 (d, $J = 18$ Hz, 1C), 116,5 (d, $J = 22$ Hz, 1C), 46,1. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClFN}_6\text{O}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 413,0924. Achado 413,0926. Pureza: 98,2% (254 nm).

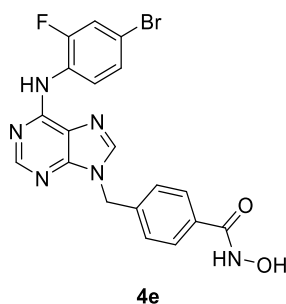


N-(4-bromo-2-fluorofenil)-9H-purin-6-amina (2e): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido branco (1,54 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,42 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 7,81 (t, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,61 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 155,6 (d, $J = 250$ Hz, 1C), 151,7, 151,3, 140,9, 127,7, 127,3, 127,2, 126,4 (d, $J = 12$ Hz, 1C), 119,1, 118,8, 116,2 (d, $J = 9$ Hz, 1C).

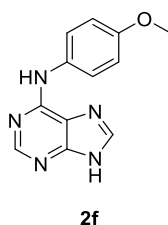


4-(((6-((4-bromo-2-fluorofenil)amino)-9H-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3e): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido branco (0,886 g, 69%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,65 – 8,58 (m, 2H), 8,03 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,86 (s, 1H), 7,83 (sl, 1H), 7,35 – 7,31 (m, 4H), 5,47 (s, 2H), 3,91 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 166,4, 152,9, 152,8 (d, $J =$

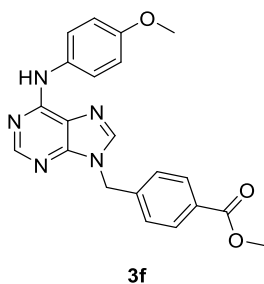
247 Hz, 1C), 151,8, 150,1, 140,8, 140,2, 130,5, 130,4 (2C), 127,6 (2C), 127,5, 126,5 (d, $J = 10$ Hz, 1C), 123,2, 120,7, 118,6 (d, $J = 22$ Hz, 1C), 114,8, 52,3, 47,0.



4-(((6-((4-bromo-2-fluorophenyl)amino)-9H-purin-9-yl)methyl)-N-hydroxibenamide (4e): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,356 g, 88%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,18 (s, 1H), 9,59 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 7,81 – 7,54 (m, 4H), 7,48 – 7,34 (m, 3H), 5,51 (s, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,8, 156,2 (d, $J = 250$ Hz, 1C), 152,2, 152,1, 150,0, 142,2, 139,8, 132,3, 128,4 (d, $J = 2$ Hz, 1C), 127,4 (2C), 127,3 (2C), 126,2 (d, $J = 12$ Hz, 1C), 119,6, 119,2, 118,9, 116,8 (d, $J = 9$ Hz, 1C), 46,1. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{BrFN}_6\text{O}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 457,0418. Achado 457,0422. Pureza: 97,8% (254 nm).

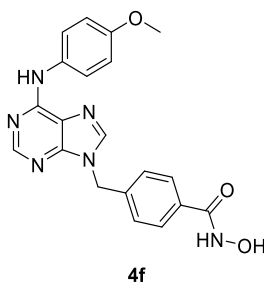


N-(4-metoxifenil)-9H-purin-6-amina (2f): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido cinza (0,880 g, 73%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,07 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 7,79 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,94 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 3,75 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 155,4, 150,9, 150,9, 150,8, 150,7, 140,8, 132,1, 122,6 (2C), 113,8 (2C), 55,2.

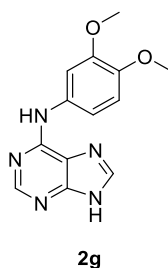


4-(((6-((4-metoxifenil)amino)-9H-purin-9-yl)methyl)benzoato de metila (3f): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido branco (0,549 g, 70%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,73 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,94 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,79 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,44 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 6,92 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 5,54 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,75 (s, 3H).

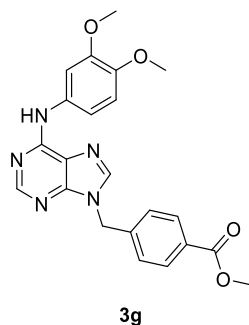
^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,9, 155,1, 152,3, 152,2, 149,4, 142,2, 141,4, 132,5, 129,6 (2C), 129,0, 127,6 (2C), 122,7 (2C), 119,4, 113,6 (2C), 55,2, 52,1, 46,0.



N-hidroxi-4-((6-((4-metoxifenil)amino)-9*H*-purin-9-il)methyl)benzamida (**4f**): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,342 g, 98%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,19 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,80 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,74 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 6,92 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 5,50 (s, 2H), 3,75 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164,4, 155,6, 152,7, 152,6, 149,9, 141,9, 140,4, 133,0, 132,8, 127,9 (2C), 127,8 (2C), 123,2 (2C), 119,9, 114,1 (2C), 55,7, 46,5. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 391,1513. Achado 391,1514. Pureza: 95,2% (254 nm).

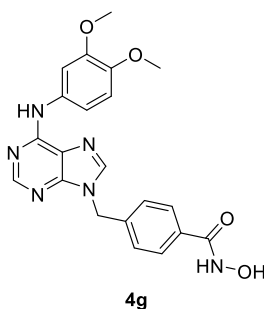


N-(3,4-dimetoxifenil)-9*H*-purin-6-amina (**2g**): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido roxo (1,0 g, 74%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,11 (sl, 1H), 9,55 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,53 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 6,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,74 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 151,9, 150,2, 148,5, 144,5, 139,7, 139,6, 133,4, 119,3, 112,7, 112,2, 106,4, 55,9, 55,5.

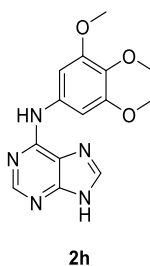


4-((6-((3,4-dimetoxifenil)amino)-9*H*-purin-9-il)metil)benzoato de metila (**3g**): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido branco (0,631 g, 75%). ^1H RMN (300

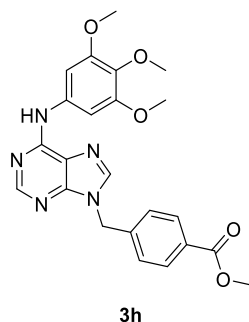
MHz, DMSO- d_6) δ 9,70 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,62 (s, 1H), 7,53 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,93 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 5,54 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,75 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,9, 152,2, 152,1, 149,4, 148,5, 144,7, 142,2, 141,5, 133,2, 129,6(2C), 129,0, 127,6 (2C), 119,5, 113,0, 112,1, 106,6, 55,8, 55,5, 52,1, 46,0.



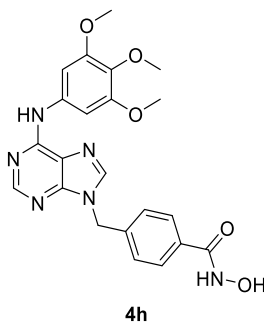
4-(((6-((3,4-dimetoxifenil)amino)-9H-purin-9-il)metil)-N-hidroxibenzamida (4g): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,388 g, 96%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,19 (s, 1H), 9,68 (s, 1H), 9,04 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,74 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,61 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,52 (dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H), 7,39 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 6,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 5,50 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,75 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,9, 152,2, 152,1, 149,5, 148,4, 144,7, 141,5, 139,9, 133,1, 132,3, 127,4 (2C), 127,3 (2C), 119,5, 113,0, 112,0, 106,6, 55,8, 55,5, 46,0. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_4$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 421,1619. Achado 421,1610. Pureza: 95,8% (254 nm).



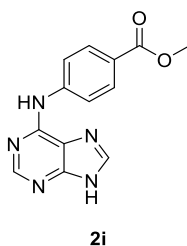
N-(3,4,5-trimetoxifenil)-9H-purin-6-amina (2h): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido amarelo (1,37 g, 91%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,64 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,44 (s, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,64 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 152,5, 151,8 (2C), 151,3, 151,2, 151,1, 140,3, 136,0, 133,0, 98,5 (2C), 60,1, 55,8 (2C).



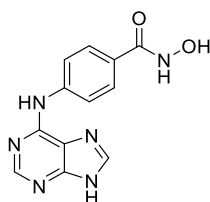
4-((6-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)-9H-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3h): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral B. Sólido amarelo claro (0,655 g, 73%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9,75 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,96 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,50 – 7,42 (m, 4H), 5,56 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,80 (s, 6H), 3,67 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,9, 152,5 (2C), 152,1, 152,0, 149,5, 142,2, 141,7, 135,7, 133,2, 129,6 (2C), 129,0, 127,6 (2C), 119,7, 98,8 (2C), 60,1, 55,8 (2C), 52,1, 46,0.



N-hidroxi-4-((6-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)-9H-purin-9-il)metil)benzamida (4h): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,335 g, 78%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,19 (s, 1H), 9,73 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,74 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,46 (s, 2H), 7,40 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 5,51 (s, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,66 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163,8, 152,5 (2C), 152,1, 152,0, 149,5, 141,7, 139,9, 135,7, 133,2, 132,3, 127,4 (2C), 127,3 (2C), 119,7, 98,8 (2C), 60,1, 55,8 (2C), 46,0. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_5$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 451,1724. Achado 451,1717. Pureza: 99,7% (254 nm).

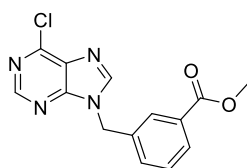


4-((9H-purin-6-il)amino)benzoate de metila (2i): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido branco (0,506 g, 94%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,33 (s, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,18 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,95 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 3,84 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,9, 151,5, 151,3, 150,7, 144,4, 141,2, 130,0 (2C), 122,9, 119,3 (2C), 118,3, 51,8.



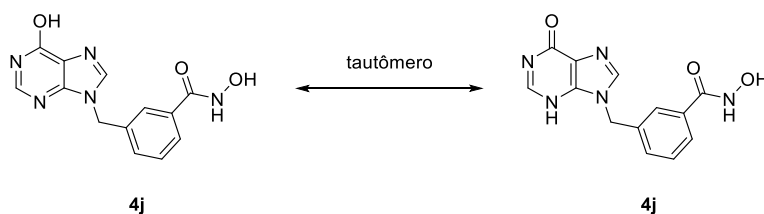
4i

4-((9H-purin-6-yl)amino)-N-hydroxybenzamide (4i): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,166 g, 75%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,23 (sl, 1H), 11,07 (s, 1H), 9,99 (s, 1H), 8,90 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 8,07 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,74 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164,2, 151,7, 151,5, 150,7, 142,6, 140,3, 127,3 (2C), 126,1, 119,7, 119,4 (2C). ESI HRMS calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_6\text{O}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 271,0938. Achado 271,0940. Pureza: 98,1% (254 nm).



3j

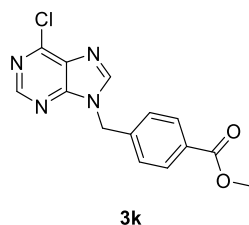
3-((6-cloro-9H-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3j): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido branco (0,112 g, 7%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,87 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,87 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,63 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,48 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 5,61 (s, 2H), 3,83 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 151,8, 151,7, 149,2, 147,4, 136,7, 132,6, 130,8, 130,1, 129,3, 128,8, 128,4, 52,2, 46,7.



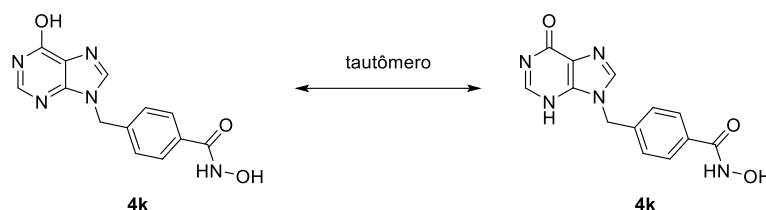
4j

4j

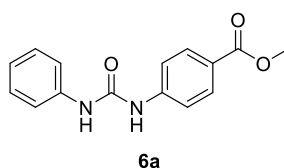
N-hidroxi-3-((6-hidroxi-9H-purin-9-il)metil)benzamida (4j): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,270 g, 55%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,29 (sl, 1H), 11,20 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,71 – 7,62 (m, 2H), 7,47 – 7,38 (m, 2H), 5,42 (s, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,9, 156,6, 148,3, 145,8, 140,3, 137,1, 136,9, 133,3, 130,2, 128,8, 126,1, 124,0, 46,3. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 286,0935. Achado 286,0943. Pureza: 98,5% (254 nm).



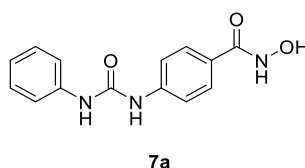
4-((6-cloro-9H-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3k): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral A. Sólido branco (0,284 g, 53%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,88 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 7,96 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,48 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 5,67 (s, 2H), 3,86 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 151,9, 151,8, 149,2, 147,5, 141,2, 130,9, 129,6 (2C), 129,2, 127,8 (2C), 52,1, 46,7.



N-hidroxi-4-((6-hidroxi-3,6-dihidro-9H-purin-9-il)metil)benzamida (4k): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,124 g, 56%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,28 (sl, 1H), 11,18 (s, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,72 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 7,35 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 5,43 (s, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,8, 156,6, 148,3, 145,8, 140,3, 139,7, 132,3, 127,3 (2C), 127,2 (2C) 124,0, 46,2. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_3\text{Na}$: $[\text{M} + \text{Na}]^+$, m/z 308,0760. Achado 308,0785. Pureza: 99,7% (254 nm).

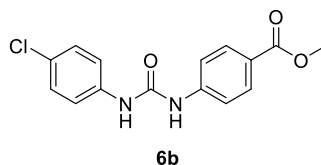


4-(3-fenilureido)benzoato de metila (6a): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido branco (0,422 g, 31%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,08 (s, 1H), 8,79 (s, 1H), 7,91 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,61 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H), 7,49 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,31 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,01 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H), 3,83 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,9, 152,1, 144,4, 139,3, 130,4 (2C), 128,8 (2C), 122,4, 122,2, 118,4 (2C), 117,3 (2C), 51,7.

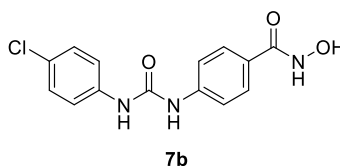


N-hidroxi-4-(3-fenilureido)benzamida (7a): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,270 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,07 (s,

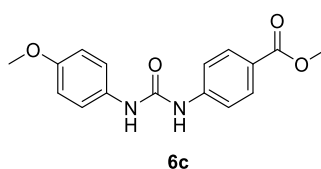
1H), 8,90 (s, 2H), 8,74 (s, 1H), 7,72 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,53 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,47 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,30 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 6,99 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164,1, 152,3, 142,4, 139,4, 128,8 (2C), 127,8 (2C), 125,8, 122,1, 118,3 (2C), 117,3 (2C). ESI HRMS calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 272,1030. Achado 272,1025. Pureza: 98,3% (254 nm).



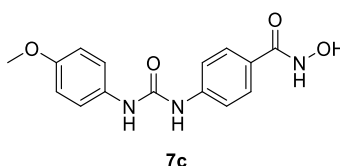
4-(3-(4-clorofenil)ureido)benzoato de metila (6b): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido branco (0,845 g, 55%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,11 (s, 1H), 8,92 (s, 1H), 7,90 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,59 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,50 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 3,83 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,9, 152,1, 144,2, 138,3, 130,4 (2C), 128,6 (2C), 125,8, 122,6, 120,0 (2C), 117,4 (2C), 51,7.



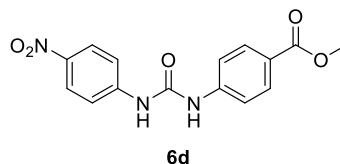
4-(3-(4-clorofenil)ureido)-N-hidroxibenzamida (7b): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,215 g, 70%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,06 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,90 (sa, 2H), 7,71 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,57 – 7,46 (m, 4H), 7,35 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164,1, 152,2, 142,2, 138,4, 128,6 (2C), 127,8 (2C), 125,9, 125,6, 119,9 (2C), 117,4 (2C). Pureza: 98,3% (254 nm).



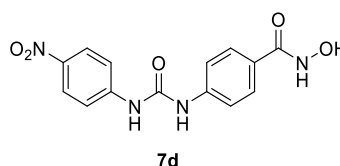
4-(3-(4-metoxifenil)ureido)benzoato de metila (6c): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido branco (0,308 g, 20%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,99 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,89 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,58 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 6,89 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,73 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168,3, 154,4, 152,8, 137,9, 134,1, 132,9, 128,4 (2C), 119,9 (2C), 118,2 (2C), 113,9 (2C), 55,1, 51,7.



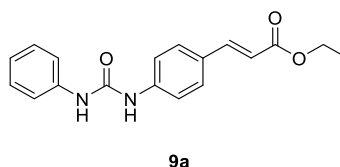
N-hidroxi-4-(3-(4-metoxifenil)ureido)benzamida (7c): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,233 g, 85%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,04 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 7,70 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,51 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,88 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 3,73 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164,2, 154,6, 152,5, 142,6, 132,4, 127,8 (2C), 125,5, 120,2 (2C), 117,1 (2C), 114,0 (2C), 55,2. Pureza: 97,8% (254 nm).



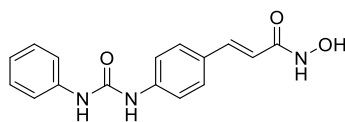
4-(3-(4-nitrofenil)ureido)benzoato de metila(6d): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido amarelo (1,109 g, 70%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9,50 (s, 1H), 9,29 (s, 1H), 8,20 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,92 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,62 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 3,83 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,8, 151,7, 145,9, 143,6, 141,3, 130,4 (2C), 125,1 (2C), 123,1, 117,9 (2C), 117,7 (2C), 51,8.



N-hidroxi-4-(3-(4-nitrofenil)ureido)benzamida (7d): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido amarelo (0,269 g, 85%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,10 (s, 1H), 9,49 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 8,93 (s, 1H), 8,20 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,73 (ta, $J = 9,4$ Hz, 4H), 7,55 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164,5, 152,3, 146,6, 142,2, 141,7, 128,3 (2C), 127,0, 125,6 (2C), 118,2 (2C), 118,1 (2C). Pureza: 99,7% (254 nm).

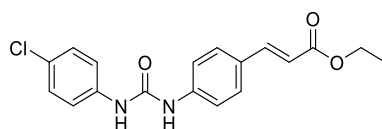


(*E*)-3-(4-(3-fenilureido)fenil)acrilato de etila (9a): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido branco (1,296 g, 83%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,92 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 7,71 – 7,43 (m, 7H), 7,30 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,01 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,49 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H), 4,19 (q, $J = 6,9$ Hz, 2H), 1,26 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,4, 152,2, 144,2, 141,9, 139,4, 129,3 (2C), 128,8 (2C), 127,5, 122,0, 118,3 (2C), 117,9 (2C), 115,5, 59,8, 14,2.



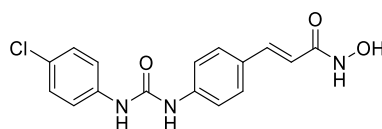
10a

(E)-N-hidroxi-3-(4-(3-fenilureido)fenil)acrilamida (10a): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,296 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,68 (s, 1H), 8,97 (sl, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,57 – 7,42 (m, 7H), 7,29 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,99 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 6,36 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,2, 152,3, 141,0, 139,5, 138,1, 129,1, 128,8 (2C), 128,3 (2C), 122,0, 118,3 (2C), 118,1 (2C), 116,6. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 298,1186. Achado 298,1193. Pureza: 97,0% (254 nm).



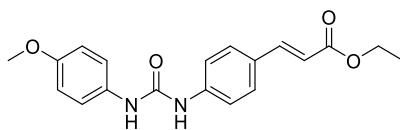
9b

(E)-3-(4-(3-(4-clorofenil)ureido)fenil)acrilato de etila (9b): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido branco (1,223 g, 71%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,95 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 7,70 – 7,45 (m, 7H), 7,34 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,49 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 4,18 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166,4, 152,1, 144,1, 141,7, 138,4, 129,3 (2C), 128,6 (2C), 127,6, 125,6, 119,9 (2C), 118,1 (2C), 115,6, 59,8, 14,2.



10b

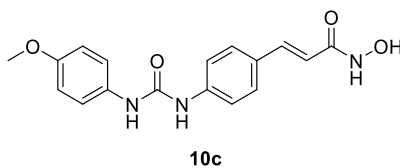
(E)-3-(4-(3-(4-clorofenil)ureido)fenil)-N-hidroxiacrilamida (10b): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido amarelo claro (0,331 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,27 (sl, 1H), 9,97 (sl, 1H), 9,87 (s, 1H), 9,71 (s, 1H), 7,62 – 7,26 (m, 9H), 6,37 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,2, 152,5, 141,2, 139,0, 138,0, 128,5 (2C), 128,2 (2C), 125,2, 119,8 (2C), 119,6, 118,2 (2C), 116,7. Pureza: 98,9% (254 nm).



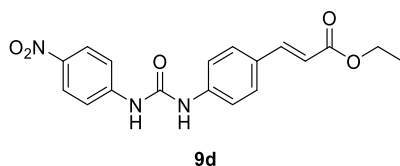
9c

(E)-3-(4-(3-(4-metoxifenil)ureido)fenil)acrilato de etila (9c): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido branco (1,619 g, 95%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,85 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,71 – 7,46 (m, 5H), 7,38 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,89 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H),

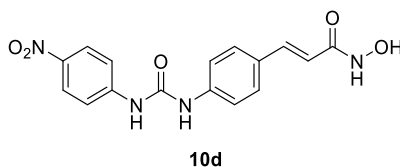
6,48 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 4,19 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,73 (s, 3H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,4, 154,7, 152,4, 144,2, 142,2, 132,4, 129,3 (2C), 127,2, 120,2 (2C), 117,8 (2C), 115,3, 114,0 (2C), 59,7, 55,1, 14,2.



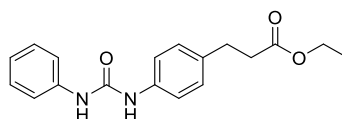
(E)-N-hidroxi-3-(4-(3-(4-metoxifenil)ureido)fenil)acrilamida (10c): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,327 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,67 (s, 1H), 9,00 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,61 – 7,26 (m, 7H), 6,89 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,36 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 3,73 (s, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163,2, 154,6, 152,5, 141,2, 138,2, 132,5, 128,3 (2C), 128,1, 120,2 (2C), 118,0 (2C), 116,5, 114,0 (2C), 55,2. Pureza: 99,9% (254 nm).



(E)-3-(4-(3-(4-nitrofenil)ureido)fenil)acrilato de etila (9d): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido amarelo (1,599 g, 90%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9,46 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 8,19 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 7,76 – 7,60 (m, 5H), 7,59 – 7,50 (m, 2H), 6,49 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 4,18 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,4, 151,7, 146,1, 144,0, 141,2, 129,3 (2C), 128,1, 125,0 (2C), 118,4 (2C), 117,9, 117,6 (2C), 115,9, 59,8, 14,2.

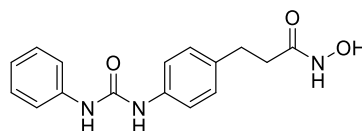


(E)-N-hidroxi-3-(4-(3-(4-nitrofenil)ureido)fenil)acrilamida (10d): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido amarelo (0,324 g, 95%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,71 (br s, 1H), 9,51 (s, 1H), 9,14 (s, 1H), 9,03 (sl, 1H), 8,19 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,65 – 7,39 (m, 5H), 6,39 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163,1, 151,8, 146,2, 141,1, 140,2, 129,0, 128,3 (2C), 125,1 (2C), 118,6 (2C), 117,9, 117,5 (2C), 117,0. Pureza: 99,8% (254 nm).



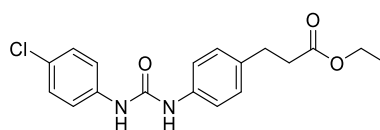
12a

3-(4-(3-fenilureido)fenil)propanoato de etila (12a): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral E. Sólido branco (0,312 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,68 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 7,46 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,28 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 7,14 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 6,97 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H), 4,06 (q, $J = 6,9$ Hz, 2H), 2,80 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,60 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,17 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166,4, 152,2, 144,2, 141,9, 139,4, 129,3 (2C), 128,8 (2C), 127,5, 122,0, 118,3 (2C), 117,9 (2C), 115,5, 59,8, 14,2.



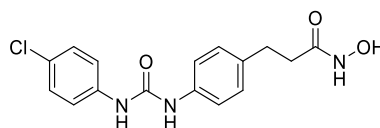
13a

N-hidroxi-3-(4-(3-fenilureido)fenil)propanamida (13a): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,220 g, 73%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,48 (sl, 1H), 8,84 – 8,82 (m, 2H), 7,50 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,40 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,31 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,14 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 6,99 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 3,39 (sl, 1H), 2,80 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,28 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168,3, 152,7, 139,9, 137,8, 134,3, 128,7 (2C), 128,4 (2C), 121,6, 118,3 (2C), 118,1 (2C), 34,1, 30,2. ESI HRMS calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 300,1343. Achado 300,1345. Pureza: 98,1% (254 nm).



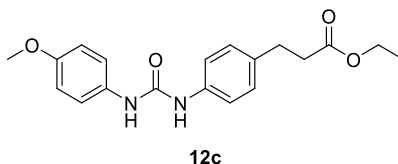
12b

3-(4-(3-(4-clorofenil)ureido)fenil)propanoato de etila (12b): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral E. Sólido branco (0,326 g, 94%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,64 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,49 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,40 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,17 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 6,99 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 4,09 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,84 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,62 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172,2, 152,6, 139,8, 137,8, 133,9, 128,8 (2C), 128,5 (2C), 121,7, 118,3 (2C), 118,2 (2C), 59,8, 35,3, 29,7, 14,1.

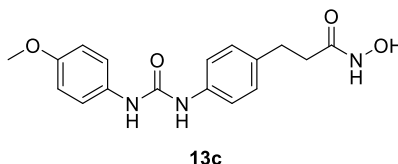


13b

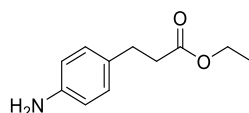
3-(4-(3-(4-clorofenil)ureido)fenil)-*N*-hidroxipropanamida (13b): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,189 g, 86%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,23 (sl, 1H), 9,97 (sl, 1H), 9,14 (s, 1H), 9,09 (s, 1H), 7,49 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,40 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 7,17 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 6,99 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,84 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,62 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168,3, 152,7, 139,9, 137,8, 134,3, 128,7 (2C), 128,4 (2C), 121,6, 118,3 (2C), 118,1 (2C), 34,1, 30,3. Pureza: 97,8% (254 nm).



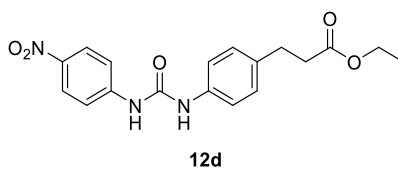
3-(4-(3-(4-metoxifenil)ureido)fenil)propanoato de etila (12c): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral E. Sólido branco (0,341 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,51 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,40 – 7,32 (m, 4H), 7,12 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,87 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 4,05 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,72 (s, 3H), 2,79 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,57 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,17 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172,2, 154,4, 152,8, 138,0, 133,6, 132,8, 128,5 (2C), 119,9 (2C), 118,2 (2C), 114,0 (2C), 59,7, 55,2, 35,3, 29,7, 14,1.



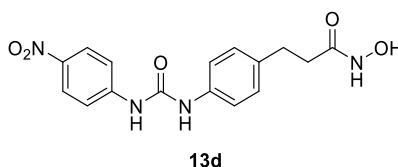
N-hidroxi-3-(4-(3-(4-metoxifenil)ureido)fenil)propanamida (13c): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido branco (0,216 g, 90%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,36 (sl, 1H), 9,81 (sl, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 7,46 - 7,30 (m, 4H), 7,10 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 6,87 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,73 (s, 3H), 2,77 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,26 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 168,3, 154,4, 152,8, 137,9, 134,1, 132,9, 128,4 (2C), 119,9 (2C), 118,2 (2C), 113,9 (2C), 55,1, 34,1, 30,2. Pureza: 99,8% (254 nm).



3-(4-aminofenil)propanoato de etila (11): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral E. Líquido amarelo claro (0,386 g, quant.). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,19 (s, 2H), 7,31 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,04 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,86 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,62 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,15 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172,0, 139,6, 130,9, 129,3 (2C), 122,6 (2C), 59,8, 34,9, 29,7, 14,0.



3-(4-(3-(4-nitrofenil)ureido)fenil)propanoato de etila (12d): Intermediário sintetizado de acordo com o procedimento geral D. Sólido amarelo (0,553 g, 90%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,46 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 8,20 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,76 – 7,67 (m, 4H), 7,55 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,18 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,84 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,63 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166,4, 151,8, 146,2, 141,1, 140,3, 129,0 (2C), 128,3, 125,1 (2C), 118,6 (2C), 117,6 (2C), 59,8, 34,1, 30,2, 14,2.



N-hidroxi-3-(4-(3-(4-nitrofenil)ureido)fenil)propanamida (13d): Produto final sintetizado de acordo com o procedimento geral C. Sólido amarelo (0,250 g, 85%). ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,28 (sl, 1H), 9,51 (s, 1H), 9,14 (s, 1H), 9,03 (sl, 1H), 8,19 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 7,17 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 6,99 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,84 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,62 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,4, 151,8, 146,2, 141,1, 140,2, 129,0, 128,3 (2C), 125,1 (2C), 118,6 (2C), 117,6 (2C), 34,1, 30,2. Pureza: 99,4% (254 nm).

5.2 Ensaios biológicos

A citotoxicidade dos compostos sintetizados foi avaliada por meio de ensaio *in vitro* de MTT, em sextuplicata, a fim de se aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos. Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo, com o Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto, e a mestranda Larissa Costa de Almeida, lotados no Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP).

A linhagens celulares de tumores sólidos (HCT 116 e MCF-7) foram plaqueadas com concentrações de 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços (5×10^4 células/mL, em 200 μL de meio). Após 24 horas, os compostos finais e o vorinostat (SAHA) foram adicionados em concentrações de 50 μM a 0,0032 μM , cada concentração em duplicata, e incubadas por 69 horas. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo. Após 69 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Após incubação por três horas, o sobrenadante foi removido e, após secagem da placa, o precipitado contendo formazana de MTT foi dissolvida em 150 μL de DMSO. A absorbância

dos poços foi medida a 570 nm conforme preconizado por Mosmann (1983).¹³⁰ Os valores de concentração inibitória 50% (IC₅₀) foram calculados usando programa GraphPad Prism 5, com concentrações das substâncias de 0,0032 a 50 µM.

As linhagens de tumores leucêmicas (Jurkat e Namalwa) foram plaqueadas em uma concentração de 2x10⁴ células por poço, em placas de 96 poços, seguidas de tratamento com os compostos finais e o vorinostat (SAHA), nas concentrações de 50 µM a 0,00064 µM, cada concentração em duplicata, e incubadas por 69 horas. Após 69 horas de incubação, foi adicionado MTT (0,5 mg/mL) e incubado por três horas. Posteriormente, a formazana de MTT foi dissolvida com a adição de 100 µL de isopropanol contendo 0,1 N de HCl por poço, e a absorbância foi medida a 570 nm.¹³⁰ Os valores de concentração inibitória média (IC₅₀) foram calculados usando programa GraphPad Prism 5, com concentrações das substâncias de 0,00064 a 50 µM.

Os estudos macanísticos de citotoxicidade foram monitorados por citometria de fluxo com os marcadores anexina V (ligada a FITC) e 7AAD, para contagem de células em processo apoptótico e células viáveis, respectivamente. Para o monitoramento da taxa de proliferação celular foi utilizado Ki67 como marcador e monitoramento por citometria de fluxo. As linhagens Jurkat e Namalwa foram plaqueadas em uma concentração de 2x10⁴ células por poço, em placas de 96 poços, seguidas de tratamento com os compostos **4d-f**, doxorubicina e vorinostat (SAHA), nas concentrações de IC₅₀ e IC₅₀/2 determinadas nos ensaios prévios de citotoxicidade. Cada concentração foi testada em triplicata, e incubadas por 24, 48 e 72 horas. Após os tempos de incubação, foram adicionados os marcadores para posterior monitoramento. Os resultados foram apresentados como média ± SD de três experimentos independentes. Análise estatísticas efetuadas por teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni, sendo todos os pares analisados e as diferenças estatisticamente significantes indicadas nas figuras.

5.3 Estudos *in silico*

Os estudos *in silico* deste trabalho contaram com a co-orientação do Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna, do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os compostos finais tiveram suas estruturas tridimensionais construídas e otimizadas por mecânica molecular, utilizando o campo de força MMFF (*Merck Molecular Force Field*),¹³¹ no programa Spartan'14. A seguir, os modelos construídos tiveram suas estruturas reotimizadas com minimização de energia e cálculo de cargas utilizando o método semiempírico PM6,¹³² também no programa Spartan'14.

Os métodos das simulações de *docking* nas enzimas HDAC6 e HER1 foram selecionados por simulações de *redocking* (cada uma em triplicata). As simulações de *redocking* para a enzima HDAC6

utilizaram o cocrystal desta enzima complexada ao nexturastate A, disponível no *Protein Data Bank* – PDB (código PDB: 5g0i, resolução = 1,99 Å).⁶² As simulações de *redocking* para a enzima HER1 utilizaram o cocrystal da enzima ligada ao osimertinibe, também disponível no PDB (código PDB: 4zau, resolução = 2,8 Å).¹¹⁵ As estruturas cristalografadas foram manipuladas no programa Swiss PDB-Viewer 4.1, para se verificar a integridade da estrutura proteica e corrigir possíveis cadeias laterais total, ou parcialmente, ausentes na estrutura retirada do PDB. Para os *redockings* foram testadas todas as funções de escore presentes no programa GOLD 5.4, a saber: ASP, ChemPLP, GoldScore, ChemScore). Foi utilizado como origem do sítio de ancoramento o ligante cocrystalografado, variando-se o tamanho do raio do sítio (6, 10, 15 Å). Foi utilizado a velocidade lenta de busca do algoritmo genético. Estes estudos foram realizados sem a presença de moléculas de água cocrystalografadas. O método escolhido foi aquele que apresentou o menor valor de raiz do desvio quadrático médio – RMSD – entre as estruturas empíricas (presentes no cristal) e as poses obtidas pela aplicação do método. O método selecionado para as simulações na HDAC6 utilizou a função GoldScore, com 10 Å de raio a partir do nexturastate A. Para a enzima HER1, o método de escolha utilizou a função ASP, com cavidade de 10 Å de raio a partir do osimertinibe, velocidade lenta de busca do algoritmo genético e ausência de moléculas de água. As simulações de docking foram feitas em sextuplicata e as poses de maior escore e frequência de cada composto foram isoladas. As imagens finais de cada pose foram geradas pelo programa PyMOL 1.3 (Schrödinger, LLC).

6. Referências

- (1) World Health Organization: Cancer. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> (Acesso em Jan 16, 2019).
- (2) American Cancer Society: What is cancer? <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>> (Acesso em Jan 16, 2019).
- (3) INCA. Instituto Nacional do Câncer - O que é? <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> (Acesso em Jan 16, 2019).
- (4) Guerra, M. R.; Gallo, C. V.; Mendonça, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: Tendências e Estudos Epidemiológicos Mais Recentes. *Rev. Bras. Cancerol.* **2005**, *51* (3), 227–234.
- (5) IARC. International Agency For Research On Cancer - Globocan 2018. <<https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>> (Acesso em Jan 16, 2019).
- (6) DATASUS. Indicadores de Mortalidade. <<https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml;jsessionid=C954AFB70CB63FFB214D4D83EB6C7E48#panelResultado>> (Acesso em Jan 16, 2019).
- (7) EMA. European Medicines Agency - Cancer in Europe. <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/landing/cancer_disease_area.jsp&mid=WC0b01ac058034ed06> (Acesso em Jun 28, 2016).
- (8) FDA. Food and Drug Administration - Novel Drug Approvals for 2018 <<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm430302.htm>> (Acesso em Jan 16, 2019).
- (9) IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil 2009. <<http://cidades.ibge.gov.br>> (Acesso em Jan 17, 2019).
- (10) Rosner, K.; Kasprzak, M. F.; Horenstein, A. C. J.; Thurston, H. L.; Abrams, J.; Kerwin, L. Y.; Mehregan, D. A.; Mehregan, D. R. Engineering a Waste Management Enzyme to Overcome Cancer Resistance to Apoptosis: Adding DNaseI to the Anti-Cancer Toolbox. *Cancer Gene Ther.* **2011**, *18* (5), 346–357.
- (11) Ward, L. S. Entendendo o Processo Molecular Da Tumorigênese. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2002**, *46* (4), 351–360.
- (12) Tachibana, K. E. K.; Gonzalez, M. A.; Coleman, N. Cell-Cycle-Dependent Regulation of DNA Replication and Its Relevance to Cancer Pathology. *J. Pathol.* **2005**, *205* (2), 123–129.
- (13) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.
- (14) Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36* (3), 131–149.
- (15) Cárcer, G.; Castro, I. P.; Malumbres, M. Targeting Cell Cycle Kinases for Cancer Therapy. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14* (9), 969–985.
- (16) Fraga, M. F.; Ballestar, E.; Villar-Garea, A.; Boix-Chornet, M.; Espada, J.; Schotta, G.; Bonaldi, T.; Haydon, C.; Ropero, S.; Petrie, K.; Iyer, N. G.; Pérez-Rosado, A.; Calvo, E.; Lopez, J. A.; Cano, A.; Calasanz, M. J.; Colomer, D.; Piris, M. Á.; Ahn, N.; Imhof, A.; Caldas, C.; Jenuwein, T.; Esteller, M. Loss of Acetylation at Lys16 and Trimethylation at Lys20 of Histone H4 Is a Common Hallmark of Human Cancer. *Nat. Genet.* **2005**, *37* (4), 391–400.

-
- (17) Ropero, S.; Esteller, M. The Role of Histone Deacetylases (HDACs) in Human Cancer. *Mol. Oncol.* **2007**, *1* (1), 19–25.
- (18) Zhang, L.; Han, Y.; Jiang, Q.; Wang, C.; Chen, X.; Li, X.; Xu, F.; Jiang, Y.; Wang, Q.; Xu, W. Trend of Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy: Isoform Selectivity or Multitargeted Strategy. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35* (1), 63–84.
- (19) Carew, J. S.; Giles, F. J.; Nawrocki, S. T. Histone Deacetylase Inhibitors: Mechanisms of Cell Death and Promise in Combination Cancer Therapy. *Cancer Lett.* **2008**, *269* (1), 7–17.
- (20) Liu, B.; Lin, Y.; Darwanto, A.; Song, X.; Xu, G.; Zhang, K. Identification and Characterization of Propionylation at Histone H3 Lysine 23 in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (47), 32288–32295.
- (21) Bao, X.; Wang, Y.; Li, X.; Li, X. M.; Liu, Z.; Yang, T.; Wong, C. F.; Zhang, J.; Hao, Q.; Li, X. D. Identification of “erasers” for Lysine Crotonylated Histone Marks Using a Chemical Proteomics Approach. *Elife* **2014**, *3*, 1–18.
- (22) Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. Histone Deacetylase 6 in Health and Disease. *Epigenomics* **2015**, *7* (1), 103–118.
- (23) Zhang, X.; Yuan, Z.; Zhang, Y.; Yong, S.; Salas-Burgos, A.; Koomen, J.; Olashaw, N.; Parsons, J. T.; Yang, X. J.; Dent, S. R.; Yao, T. P.; Lane, W. S.; Seto, E. HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Mol. Cell* **2007**, *27* (2), 197–213.
- (24) Kovacs, J. J.; Murphy, P. J. M.; Gaillard, S.; Zhao, X.; Wu, J. T.; Nicchitta, C. V.; Yoshida, M.; Toft, D. O.; Pratt, W. B.; Yao, T. P. HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Mol. Cell* **2005**, *18* (5), 601–607.
- (25) Mortenson, J. B.; Heppler, L. N.; Banks, C. J.; Weerasekara, V. K.; Whited, M. D.; Piccolo, S. R.; Johnson, W. E.; Thompson, J. W.; Andersen, J. L. Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Promotes the pro-Survival Activity of 14-3-3 ζ via Deacetylation of Lysines within the 14-3-3 ζ Binding Pocket. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (20), 12487–12496.
- (26) Parmigiani, R. B.; Xu, W. S.; Venta-Perez, G.; Erdjument-Bromage, H.; Yaneva, M.; Tempst, P.; Marks, P. A. HDAC6 Is a Specific Deacetylase of Peroxiredoxins and Is Involved in Redox Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (28), 9633–9638.
- (27) Aldana-Masangkay, G. I.; Sakamoto, K. M. The Role of HDAC6 in Cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 1–10.
- (28) Li, T.; Zhang, C.; Hassan, S.; Liu, X.; Song, F.; Chen, K.; Zhang, W.; Yang, J. Histone Deacetylase 6 in Cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11* (1), 1–10.
- (29) Tavares, M. T.; Shen, S.; Knox, T.; Hadley, M.; Kutil, Z.; Bařinka, C.; Villagra, A.; Kozikowski, A. P. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors in Melanoma Models. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (10), 1031–1036.
- (30) Zhang, L.; Sheng, S.; Qin, C. The Role of HDAC6 in Alzheimer’s Disease. *J. Alzheimer’s Dis.* **2013**, *33* (2), 283–295.
- (31) Zhang, L.; Liu, C.; Wu, J.; Tao, J. J.; Sui, X. L.; Yao, Z. G.; Xu, Y. F.; Huang, L.; Zhu, H.; Sheng, S. L.; Qin, C. Tubastatin A/ACY-1215 Improves Cognition in Alzheimer’s Disease Transgenic Mice. *J. Alzheimer’s Dis.* **2014**, *41* (4), 1193–1205.
-

-
- (32) Zhang, Y.; Kwon, S.; Yamaguchi, T.; Cubizolles, F.; Rousseaux, S.; Kneissel, M.; Cao, C.; Li, N.; Cheng, H.-L.; Chua, K.; Lombard, D.; Mizeracki, A.; Matthias, G.; Alt, F. W.; Khochbin, S.; Matthias, P. Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (5), 1688–1701.
- (33) Batchu, S. N.; Brijmohan, A. S.; Advani, A. The Therapeutic Hope for HDAC6 Inhibitors in Malignancy and Chronic Disease. *Clin. Sci.* **2016**, *130* (12), 987–1003.
- (34) Arora, A.; Scholar, E. M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315* (3), 971–979.
- (35) Knight, Z. A.; Lin, H.; Shokat, K. M. Targeting the Cancer Kinome. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 130–137.
- (36) Engelman, J. A.; Zejnullahu, K.; Mitsudomi, T.; Song, Y.; Hyland, C.; Park, J. O.; Lindeman, N.; Gale, C.-M.; Zhao, X.; Christensen, J.; Kosaka, T.; Holmes, A. J.; Rogers, A. M.; Cappuzzo, F.; Mok, T.; Lee, C.; Johnson, B. E.; Cantley, L. C.; Jänne, P. A. MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science* (80-.). **2007**, *316* (5827), 1039–1043.
- (37) Sergina, N. V.; Rausch, M.; Wang, D.; Blair, J.; Hann, B.; Shokat, K. M.; Moasser, M. M. Escape from HER-Family Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy by the Kinase-Inactive HER3. *Nature* **2007**, *445* (7126), 437–441.
- (38) Stommel, J. M.; Kimmelman, A. C.; Ying, H.; Nabioullin, R.; Ponugoti, A. H.; Wiedemeyer, R.; Stegh, A. H.; Bradner, J. E.; Ligon, K. L.; Brennan, C.; Chin, L.; DePinho, R. A. Coactivation of Receptor Tyrosine Kinases Affects the Response of Tumor Cells to Targeted Therapies. *Science* **2007**, *318* (5848), 287–290.
- (39) Delamain, M. T.; Conchon, M. Os Inibidores de Tiroso Quinase de Segunda Geração. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2010**, *30* (19), 37–40.
- (40) Leite, C. A. V. G.; Costa, J. V. G.; Callado, R. B.; Torres, J. N. L.; Lima-Júnior, R. C. P.; Ribeiro, R. A. Receptor Tyrosine Kinases: Therapeutic Implications in Cancer. *Rev. Bras. Oncol. Clínica* **2012**, *8* (29), 130–142.
- (41) Apse, B.; Blair, J. A.; Gonzalez, B.; Nazif, T. M.; Feldman, M. E.; Aizenstein, B.; Hoffman, R.; Williams, R. L.; Shokat, K. M.; Knight, Z. A. Targeted Polypharmacology: Discovery of Dual Inhibitors of Tyrosine and Phosphoinositide Kinases. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (11), 691–699.
- (42) Sawyers, C. L. Cancer: Mixing Cocktails. *Nature* **2007**, *449* (7165), 993–996.
- (43) Vulpetti, A.; Bosotti, R. Sequence and Structural Analysis of Kinase ATP Pocket Residues. *Farm.* **2004**, *59* (10), 759–765.
- (44) Nicolini, F. E.; Ibrahim, A. R.; Soverini, S.; Martinelli, G.; Müller, M. C.; Hochhaus, A.; Inge H. Dufva, D.-W. K.; Cortes, J.; Mauro, M. J.; Chuah, C.; Labussière, H.; Morisset, S.; Roche-Lestienne, C.; Lippert, E.; Hayette, S.; Peter, S.; Zhou, W.; Maguer-Satta, V.; Michallet, M.; Goldman, J.; Apperley, J. F.; Mahon, F.-X.; Marin, D.; Etienne, G. The BCR-ABL T315I Mutation Compromises Survival in Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia Patients Resistant to Tyrosine Kinase Inhibitors, in a Matched Pair Analysis. *Haematologica* **2013**, *98* (10), 1510–1516.
- (45) Lightfoot, H. L.; Goldberg, F. W.; Sedelmeier, J. Evolution of Small Molecule Kinase Drugs. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (2), 153–160.
- (46) Duvic, M.; Vu, J. Vorinostat: A New Oral Histone Deacetylase Inhibitor Approved for
-

Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, *16* (7), 1111–1120.

- (47) Grant, C.; Rahman, F.; Piekarczyk, R.; Peer, C.; Frye, R.; Robey, R. W.; Gardner, E. R.; Figg, W. D.; Bates, S. E. Romidepsin: A New Therapy for Cutaneous T-Cell Lymphoma and a Potential Therapy for Solid Tumors. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2010**, *10* (7), 997–1008.
- (48) Poole, R. M. Belinostat: First Global Approval. *Drugs* **2014**, *74* (13), 1543–1554.
- (49) Fenichel, M. P. FDA Approves New Agent for Multiple Myeloma. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107* (6), djv165-djv165.
- (50) Wang, X. X.; Wan, R. Z.; Liu, Z. P. Recent Advances in the Discovery of Potent and Selective HDAC6 Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1406–1418.
- (51) Thurn, K. T.; Thomas, S.; Moore, A.; Munster, P. N. Rational Therapeutic Combinations with Histone Deacetylase Inhibitors for the Treatment of Cancer. *Futur. Oncol.* **2011**, *7* (2), 263–283.
- (52) Rosik, L.; Niegisch, G.; Fischer, U.; Jung, M.; Schulz, W. A.; Hoffmann, M. J. Limited Efficacy of Specific HDAC6 Inhibition in Urothelial Cancer Cells. *Cancer Biol. Ther.* **2014**, *15* (6), 742–757.
- (53) Fu, R.; Sun, Y.; Sheng, W.; Liao, D. Designing Multi-Targeted Agents: An Emerging Anticancer Drug Discovery Paradigm. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *136*, 195–211.
- (54) Yee, A. J.; Bensinger, W.; Voorhees, P. M.; Berdeja, J. G.; Richardson, P. G.; Supko, J.; Tamang, D.; Jones, S. S.; Wheeler, C.; Markelewicz, R. J.; Raje, N. S. Ricolinostat (ACY-1215), the First Selective HDAC6 Inhibitor, in Combination with Lenalidomide and Dexamethasone in Patients with Relapsed and Relapsed-and-Refractory Multiple Myeloma: Phase 1b Results (ACE-MM-101 Study). *Blood* **2015**, *126* (23), 3055.
- (55) Yee, A. J.; Bensinger, W. I.; Supko, J. G.; Voorhees, P. M.; Berdeja, J. G.; Richardson, P. G.; Libby, E. N.; Wallace, E. E.; Birrer, N. E.; Burke, J. N.; Tamang, D. L.; Yang, M.; Jones, S. S.; Wheeler, C. A.; Markelewicz, R. J.; Raje, N. S. Ricolinostat plus Lenalidomide, and Dexamethasone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: A Multicentre Phase 1b Trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17* (11), 1569–1578.
- (56) Niesvizky, R.; Richardson, P. G.; Gabrail, N. Y.; Madan, S.; Yee, A. J.; Quayle, S. N.; Almeciga-Pinto, I.; Jones, S. S.; Houston, L.; Hayes, D.; Van Duzer, J.; Wheeler, C.; Trede, N. S.; Raje, N. S. ACY-241, a Novel, HDAC6 Selective Inhibitor: Synergy with Immunomodulatory (IMiD®) Drugs in Multiple Myeloma (MM) Cells and Early Clinical Results (ACE-MM-200 Study). *Blood* **2015**, *126* (23), 3040.
- (57) NCT: NIH Clinical Trials - Safety, Tolerability and MTD KA2507 (HDAC6 Inhibitor) in Patients With Solid Tumours | NCT: 03008018.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03008018> (accessed Dec 4, 2018).
- (58) Butler, K. V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B.; Kozikowski, A. P. Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (31), 10842–10846.
- (59) Bergman, J. A.; Woan, K.; Perez-Villaruel, P.; Villagra, A.; Sotomayor, E. M.; Kozikowski, A. P. Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Bearing Substituted Urea Linkers Inhibit Melanoma Cell Growth. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9891–9899.
- (60) Tavares, M. T.; Shen, S.; Knox, T.; Hadley, M.; Kutil, Z.; Bařinka, C.; Villagra, A.; Kozikowski, A. P. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors in Melanoma Models. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (10), 1031–

1036.

- (61) Lee, H.-Y.; Fan, S.-J.; Huang, F.-I.; Chao, H.-Y.; Hsu, K.-C.; Lin, T. E.; Yeh, T.-K.; Lai, M.-J.; Li, Y.-H.; Huang, H.-L.; Yang, C.-R.; Liou, J.-P. 5-Aroylindoles Act as Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Ameliorating Alzheimer's Disease Phenotypes. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (16), 7087–7102.
- (62) Miyake, Y.; Keusch, J. J.; Wang, L.; Saito, M.; Hess, D.; Wang, X.; Melancon, B. J.; Helquist, P.; Gut, H.; Matthias, P. Structural Insights into HDAC6 Tubulin Deacetylation and Its Selective Inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (9), 748–754.
- (63) Barreiro, E. J. Estratégia de Simplificação Molecular No Planejamento Racional de Fármacos: A Descoberta de Novo Agente Cardioativo. *Química Nov. Nov.* **2002**, *25* (6B), 1172–1180.
- (64) Amzel, L. M. Structure-Based Drug Design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9* (4), 366–369.
- (65) Erlanson, D. A.; McDowell, R. S.; O'Brien, T. Fragment-Based Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (14), 3463–3482.
- (66) Sant'Anna, C. M. R. Glossário de Termos Usados No Planejamento de Fármacos (Recomendações Da Iupac Para 1997). *Quim. Nova* **2002**, *25* (3), 505–512.
- (67) Aparoy, P.; Reddy, K. K.; Reddanna, P. Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5-LOX Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19* (22), 3763–3778.
- (68) Lounnas, V.; Ritschel, T.; Kelder, J.; McGuire, R.; Bywater, R. P.; Foloppe, N. Current Progress in Structure-Based Rational Drug Design Marks a New Mindset in Drug Discovery. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**, *5* (6), 1–14.
- (69) De-Sá-Júnior, P. L.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, A. K.; Tavares, M. T.; Damião, M. C. F. C. B.; De Azevedo, R. A.; Câmara, D. A. D.; Pereira, A.; De Souza, D. M.; Parise Filho, R. RPF101, A New Capsaicin-like Analogue, Disrupts the Microtubule Network Accompanied by Arrest in the G2/M Phase, Inducing Apoptosis and Mitotic Catastrophe in the MCF-7 Breast Cancer Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *266* (3), 385–398.
- (70) Shim, J.; Mackerell, A. D. Computational Ligand-Based Rational Design: Role of Conformational Sampling and Force Fields in Model Development. *Medchemcomm* **2011**, *2* (5), 356–370.
- (71) Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Structure- and Ligand-Based Drug Design Approaches for Neglected Tropical Diseases Structure-and Ligand-Based Drug Design Approaches for Neglected Tropical Diseases. *Pure Appl. Chem* **2012**, *84* (9), 1857–1866.
- (72) Sant'Anna, C. M. R. Molecular Modeling Methods in the Study and Design of Bioactive Compounds: An Introduction. *Rev. Virtual Química* **2009**, *1* (1), 49–57.
- (73) Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (1), 23–49.
- (74) Patrick, G. L. Chapter 23: Drugs Acting on the Adrenergic Nervous System. In *An Introduction to Medicinal Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, 2008; pp 615–618.
- (75) Résimont, M.; Liégeois, J.-F. Synthesis and in Vitro Binding Studies of Piperazine-Alkyl-Naphthamides: Impact of Homology and Sulphonamide/Carboxamide Bioisosteric Replacement on the Affinity for 5-HT_{1A}, A_{2A}, D_{4.2}, D₃ and D_{2L} Receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (17), 5199–5202.

-
- (76) Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V. da S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14* (17), 1829–1852.
- (77) Cai, X.; Zhai, H.-X.; Wang, J.; Forrester, J.; Qu, H.; Yin, L.; Lai, C.-J.; Bao, R.; Qian, C. Discovery of 7-(4-(3-Ethynylphenylamino)-7-Methoxyquinazolin-6-Yloxy)-N-Hydroxyheptanamide (CUDC-101) as a Potent Multi-Acting HDAC, EGFR, and HER2 Inhibitor for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 2000–2009.
- (78) Beckers, T.; Mahboobi, S.; Sellmer, A.; Winkler, M.; Eichhorn, E.; Pongratz, H.; Maier, T.; Ciossek, T.; Baer, T.; Kelter, G.; Fiebig, H.-H.; Schmidt, M. Chimerically Designed HDAC- and Tyrosine Kinase Inhibitors. A Series of Erlotinib Hybrids as Dual-Selective Inhibitors of EGFR, HER2 and Histone Deacetylases. *Medchemcomm* **2012**, *3* (7), 829.
- (79) CUDC-101 Clinical trials (NCT01171924). <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01171924?term=CUDC-101&rank=3>> (Acesso em Fev 25, 2019).
- (80) Zang, J.; Liang, X.; Huang, Y.; Jia, Y.; Li, X.; Xu, W.; Chou, C. J.; Zhang, Y. Discovery of Novel Pazopanib-Based HDAC and VEGFR Dual Inhibitors Targeting Cancer Epigenetics and Angiogenesis Simultaneously. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (12), 5304–5322.
- (81) Chen, D.; Soh, C. K.; Goh, W. H.; Wang, H. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Fused Pyrimidine-Based Hydroxamates for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (4), 1552–1575.
- (82) Qian, C.; Lai, C.-J.; Bao, R.; Wang, D.-G.; Wang, J.; Xu, G.-X.; Atoyán, R.; Qu, H.; Yin, L.; Samson, M.; Zifcak, B.; Ma, A. W. S.; DellaRocca, S.; Borek, M.; Zhai, H.-X.; Cai, X.; Voi, M. Cancer Network Disruption by a Single Molecule Inhibitor Targeting Both Histone Deacetylase Activity and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (15), 4104–4113.
- (83) Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3rd ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, 2008.
- (84) To, K. K. W.; Fu, L. CUDC-907, a Dual HDAC and PI3K Inhibitor, Reverses Platinum Drug Resistance. *Invest. New Drugs* **2018**, *36* (1), 10–19.
- (85) Luan, Y.; Li, J.; Bernatchez, J. A.; Li, R. Kinase and Histone Deacetylase Hybrid Inhibitors for Cancer Therapy. *J. Med. Chem.* **2018**, DOI: [acs.jmedchem.8b00189](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00189).
- (86) Pinacho Crisóstomo, F. R.; Carrillo, R.; León, L. G.; Martín, T.; Padrón, J. M.; Martín, V. S. Molecular Simplification in Bioactive Molecules: Formal Synthesis of (+)-Muconin. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (6), 2339–2345.
- (87) Alonso, H.; Bliznyuk, A. A.; Gready, J. E. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Med. Res. Rev.* **2006**, *26* (5), 531–568.
- (88) Taft, C. A.; da Silva, V. B.; da Silva, C. H. T. de P. Current Topics in Computer-Aided Drug Design. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (3), 1089–1098.
- (89) Xiang-Qun, X. Molecular Modeling and in Silico Drug Design. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2008; pp 54–84.
- (90) Salum, L. B.; Andricopulo, A. D. Fragment-Based QSAR: Perspectives in Drug Design. *Mol. Divers. Mol Divers* **2009**, *13* (3), 277–285.
- (91) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual
-

- Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
- (92) Yuriev, E.; Ramsland, P. A. Latest Developments in Molecular Docking: 2010–2011 in Review. *J. Mol. Recognit.* **2013**, *26* (5), 215–239.
- (93) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins* **2003**, *52* (4), 609–623.
- (94) Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (1), 84–96.
- (95) Corbeil, C. R.; Williams, C. I.; Labute, P. Variability in Docking Success Rates Due to Dataset Preparation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2012**, *26* (6), 775–786.
- (96) Guedes, I. A.; Magalhães, C. S. de; Dardenne, L. E. Atracamento Molecular. In *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular*; Verli, H., Ed.; SBBq: São Paulo, 2014; pp 189–208.
- (97) Warren, G. L.; Andrews, C. W.; Capelli, A. M.; Clarke, B.; LaLonde, J.; Lambert, M. H.; Lindvall, M.; Nevins, N.; Semus, S. F.; Senger, S.; Tedesco, G.; Wall, I. D.; Woolven, J. M.; Peishoff, C. E.; Head, M. S. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (20), 5912–5931.
- (98) Antolin, A.; Workman, P.; Mestres, J.; Al-Lazikani, B. Polypharmacology in Precision Oncology: Current Applications and Future Prospects. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *22* (46), 6935–6945.
- (99) Reguart, N.; Rosell, R.; Cardenal, F.; Cardona, A. F.; Isla, D.; Palmero, R.; Moran, T.; Rolfo, C.; Pallarès, M. C.; Insa, A.; Carcereny, E.; Majem, M.; De Castro, J.; Queralt, C.; Molina, M. A.; Taron, M. Phase I/II Trial of Vorinostat (SAHA) and Erlotinib for Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients with Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations after Erlotinib Progression. *Lung Cancer* **2014**, *84* (2), 161–167.
- (100) Bruzzese, F.; Leone, A.; Rocco, M.; Carbone, C.; Piro, G.; Caraglia, M.; Di Gennaro, E.; Budillon, A. HDAC Inhibitor Vorinostat Enhances the Antitumor Effect of Gefitinib in Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck by Modulating ErbB Receptor Expression and Reverting EMT. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226* (9), 2378–2390.
- (101) Han, J.-Y.; Lee, S. H.; Lee, G. K.; Yun, T.; Lee, Y. J.; Hwang, K. H.; Kim, J. Y.; Kim, H. T. Phase I/II Study of Gefitinib (Iressa®) and Vorinostat (IVORI) in Previously Treated Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *75* (3), 475–483.
- (102) Lachenmayer, A.; Toffanin, S.; Cabellos, L.; Alsinet, C.; Hoshida, Y.; Villanueva, A.; Mínguez, B.; Tsai, H.-W.; Ward, S. C.; Thung, S.; Friedman, S. L.; Llovet, J. M. Combination Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Additive Preclinical Efficacy of the HDAC Inhibitor Panobinostat with Sorafenib. *J. Hepatol.* **2012**, *56* (6), 1343–1350.
- (103) Sahakian, E.; Rock-Klotz, J.; Shah, B. D.; Powers, J.; Cultrera, J. L.; Deng, S.; Woods, D. M.; Nguyen, M.; Cheng, F.; Wang, H.; Perez-Villarroel, P.; Lienlaf, M.; Knox, T.; Chen-Kiang, S.; Villagra, A.; Tao, J.; Pinilla-Ibarz, J.; Jones, S. S.; Sotomayor, E. M. Combination of ACY1215, a Selective Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Inhibitor with the Bruton Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib, Represents a Novel Therapeutic Strategy in Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Blood* **2012**, *120* (21), 1660–1660.
- (104) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*, 2nd ed.; Oxford University Press:

Oxford, 2012.

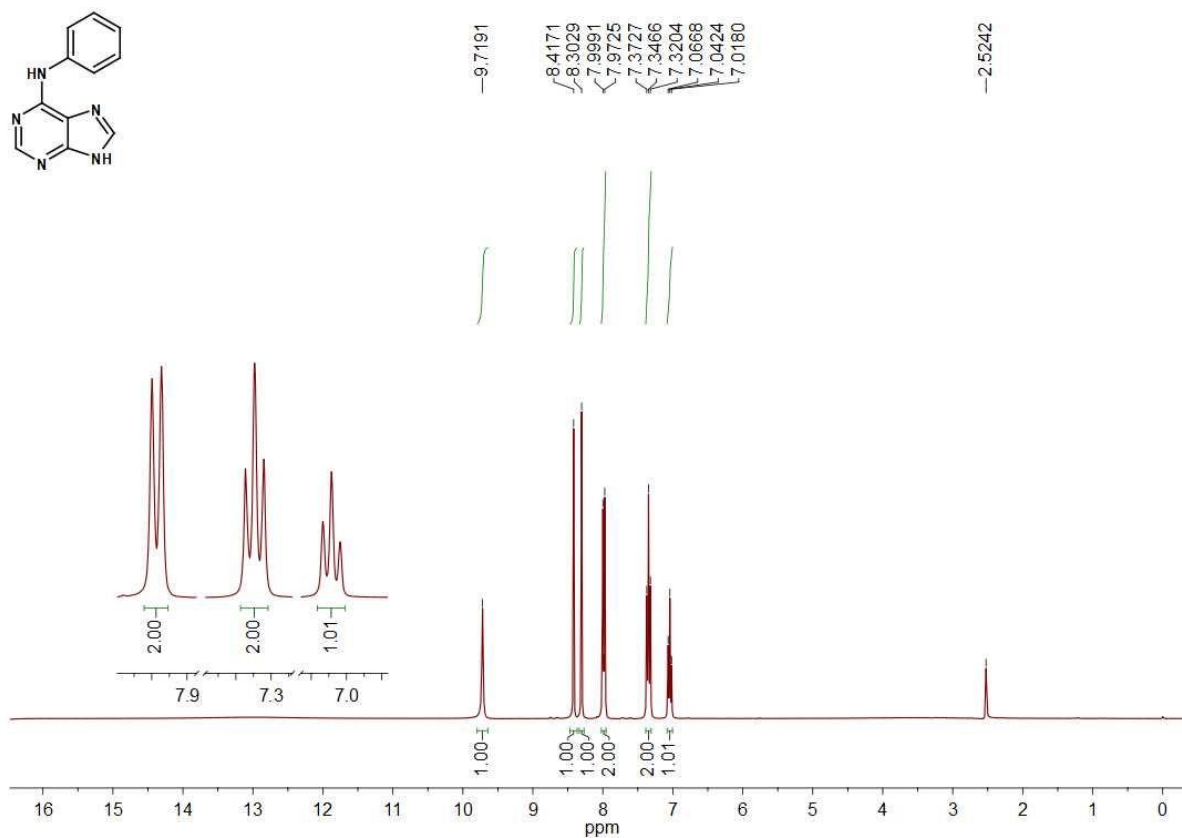
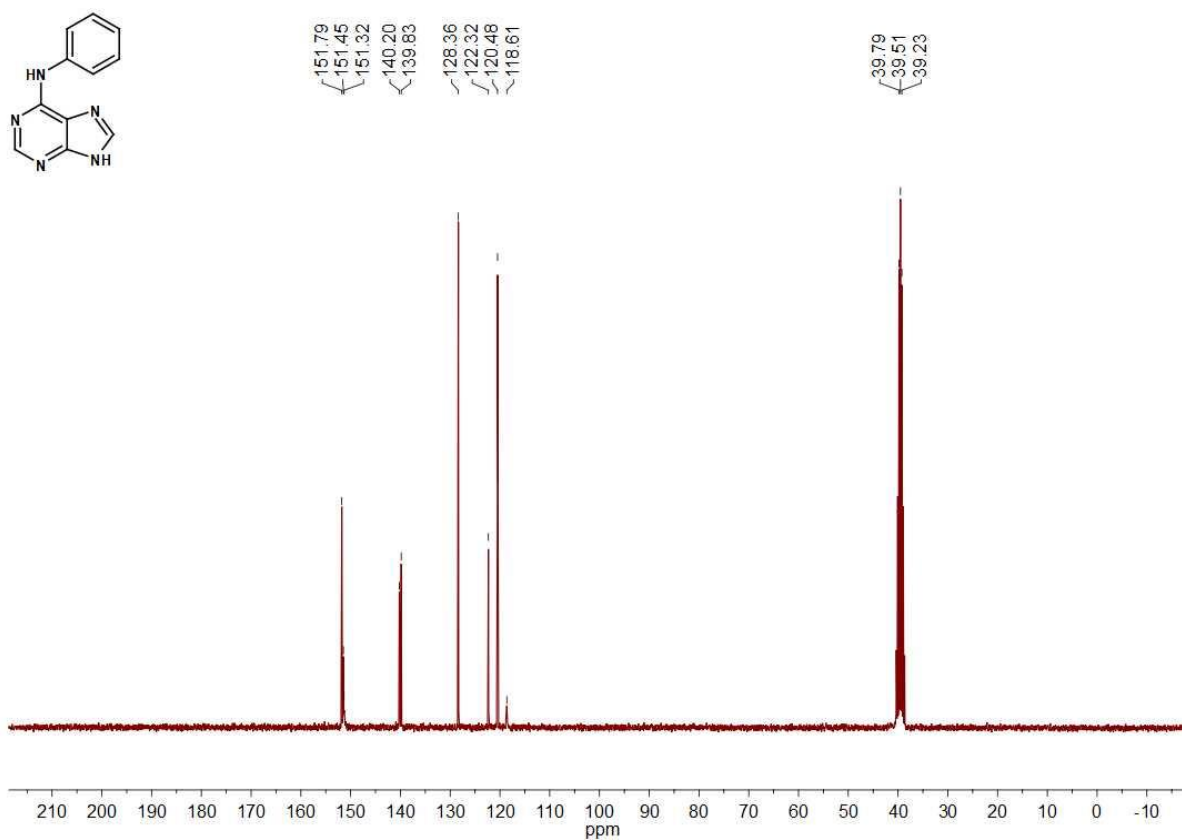
- (105) Aziz, D. M. Assessment of Bovine Sperm Viability by MTT Reduction Assay. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, *92* (1–2), 1–8.
- (106) Scherließ, R. The MTT Assay as Tool to Evaluate and Compare Excipient Toxicity in Vitro on Respiratory Epithelial Cells. *Int. J. Pharm.* **2011**, *411* (1–2), 98–105.
- (107) Meers, P.; Mealy, T. Phospholipid Determinants for Annexin V Binding Sites and the Role of Tryptophan 187. *Biochemistry* **1994**, *33* (19), 5829–5837.
- (108) Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T.; van Oers, M. H. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood* **1994**, *84* (5), 1415–1420.
- (109) Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184* (1), 39–51.
- (110) Bullwinkel, J.; Baron-Lühr, B.; Lüdemann, A.; Wohlenberg, C.; Gerdes, J.; Scholzen, T. Ki-67 Protein Is Associated with Ribosomal RNA Transcription in Quiescent and Proliferating Cells. *J. Cell. Physiol.* **2006**, *206* (3), 624–635.
- (111) Kitano, H. Cancer as a Robust System: Implications for Anticancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (3), 227–235.
- (112) Chabner, B. A.; Roberts, T. G. Chemotherapy and the War on Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (1), 65–72.
- (113) Gillet, J.-P.; Gottesman, M. M. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer; 2010; pp 47–76.
- (114) Wan-Chow-Wah, D.; Monette, J.; Monette, M.; Sourial, N.; Retornaz, F.; Batist, G.; Puts, M. T. E.; Bergman, H. Difficulties in Decision Making Regarding Chemotherapy for Older Cancer Patients: A Census of Cancer Physicians. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2011**, *78* (1), 45–58.
- (115) Yosaatmadja, Y.; Silva, S.; Dickson, J. M.; Patterson, A. V.; Smaill, J. B.; Flanagan, J. U.; McKeage, M. J.; Squire, C. J. Binding Mode of the Breakthrough Inhibitor AZD9291 to Epidermal Growth Factor Receptor Revealed. *J. Struct. Biol.* **2015**, *192* (3), 539–544.
- (116) Simard, J. R.; Getlik, M.; Grütter, C.; Pawar, V.; Wulfert, S.; Rabiller, M.; Rauh, D. Development of a Fluorescent-Tagged Kinase Assay System for the Detection and Characterization of Allosteric Kinase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (37), 13286–13296.
- (117) Okamoto, K.; Ikemori-Kawada, M.; Jestel, A.; von König, K.; Funahashi, Y.; Matsushima, T.; Tsuruoka, A.; Inoue, A.; Matsui, J. Distinct Binding Mode of Multikinase Inhibitor Lenvatinib Revealed by Biochemical Characterization. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (1), 89–94.
- (118) Chen, S.; Qiu, Y.; Guo, P.; Pu, T.; Feng, Y.; Bu, H. FGFR1 and HER1 or HER2 Co-Amplification in Breast Cancer Indicate Poor Prognosis. *Oncol. Lett.* **2018**, *15* (6), 8206–8214.
- (119) Pérez-Soler, R. HER1/EGFR Targeting: Refining the Strategy. *Oncologist* **2004**, *9* (1), 58–67.

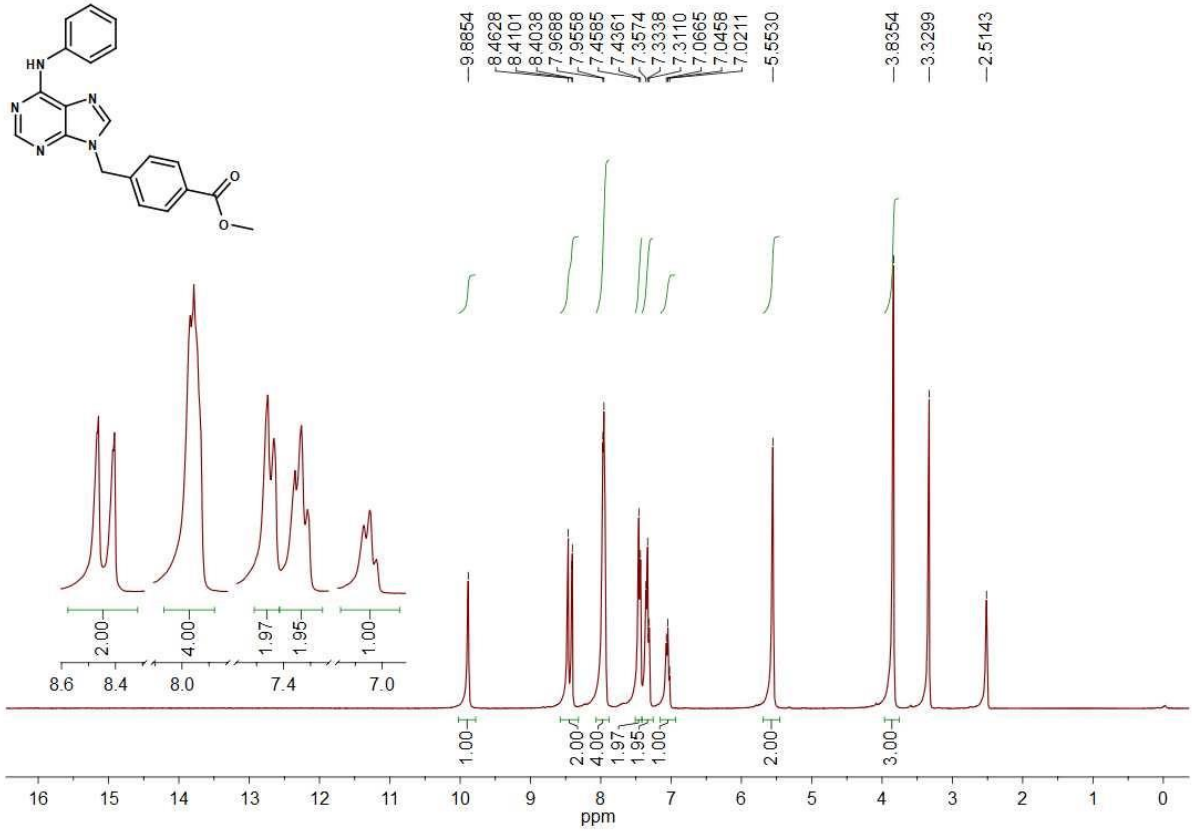
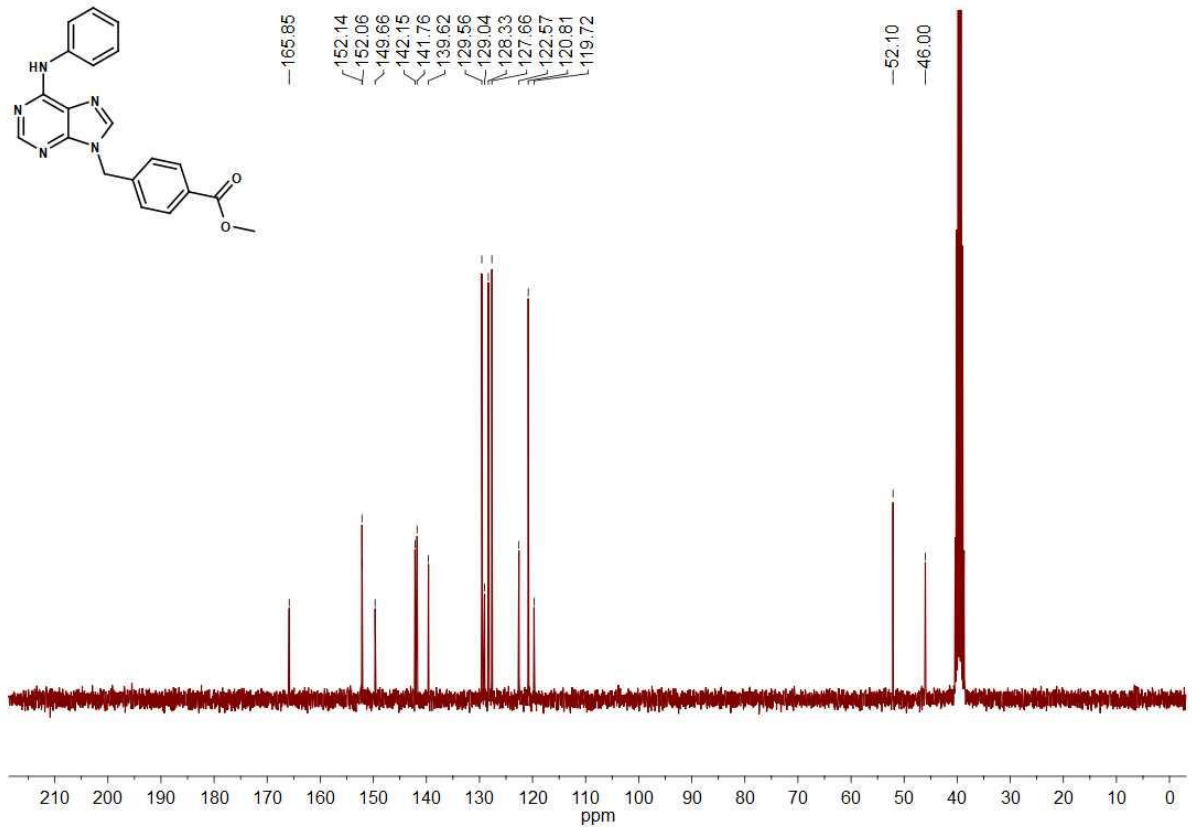
-
- (120) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245* (1), 43–53.
- (121) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking 1 Edited by F. E. Cohen. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727–748.
- (122) Mooij, W. T. M.; Verdonk, M. L. General and Targeted Statistical Potentials for Protein-Ligand Interactions. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *61* (2), 272–287.
- (123) Cross, J. B.; Thompson, D. C.; Rai, B. K.; Baber, J. C.; Fan, K. Y.; Hu, Y.; Humblet, C. Comparison of Several Molecular Docking Programs: Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (6), 1455–1474.
- (124) McGaughey, G. B.; Sheridan, R. P.; Bayly, C. I.; Culberson, J. C.; Kreatsoulas, C.; Lindsley, S.; Maiorov, V.; Truchon, J.-F.; Cornell, W. D. Comparison of Topological, Shape, and Docking Methods in Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47* (4), 1504–1519.
- (125) Porter, N. J.; Wagner, F. F.; Christianson, D. W. Entropy as a Driver of Selectivity for Inhibitor Binding to Histone Deacetylase 6. *Biochemistry* **2018**, *57* (26), 3916–3924.
- (126) Foster, S. A.; Whalen, D. M.; Özen, A.; Wongchenko, M. J.; Yin, J.; Yen, I.; Schaefer, G.; Mayfield, J. D.; Chmielecki, J.; Stephens, P. J.; Albacker, L. A.; Yan, Y.; Song, K.; Hatzivassiliou, G.; Eigenbrot, C.; Yu, C.; Shaw, A. S.; Manning, G.; Skelton, N. J.; Hymowitz, S. G.; Malek, S. Activation Mechanism of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell* **2016**, *29* (4), 477–493.
- (127) Chaires, J. B. Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37* (1), 135–151.
- (128) Cross, D. A. E.; Ashton, S. E.; Ghiorghiu, S.; Eberlein, C.; Nebhan, C. A.; Spitzler, P. J.; Orme, J. P.; Finlay, M. R. V.; Ward, R. A.; Mellor, M. J.; Hughes, G.; Rahi, A.; Jacobs, V. N.; Brewer, M. R.; Ichihara, E.; Sun, J.; Jin, H.; Ballard, P.; Al-Kadhimi, K.; Rowlinson, R.; Klinowska, T.; Richmond, G. H. P.; Cantarini, M.; Kim, D.-W.; Ranson, M. R.; Pao, W. AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov.* **2014**, *4* (9), 1046–1061.
- (129) Finlay, M. R. V.; Anderton, M.; Ashton, S.; Ballard, P.; Bethel, P. A.; Box, M. R.; Bradbury, R. H.; Brown, S. J.; Butterworth, S.; Campbell, A.; Chorley, C.; Colclough, N.; Cross, D. A. E.; Currie, G. S.; Grist, M.; Hassall, L.; Hill, G. B.; James, D.; James, M.; Kemmitt, P.; Klinowska, T.; Lamont, G.; Lamont, S. G.; Martin, N.; McFarland, H. L.; Mellor, M. J.; Orme, J. P.; Perkins, D.; Perkins, P.; Richmond, G.; Smith, P.; Ward, R. A.; Waring, M. J.; Whittaker, D.; Wells, S.; Wrigley, G. L. Discovery of a Potent and Selective EGFR Inhibitor (AZD9291) of Both Sensitizing and T790M Resistance Mutations That Spares the Wild Type Form of the Receptor. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (20), 8249–8267.
- (130) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63.
- (131) Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17* (5–6), 490–519.
- (132) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13* (12), 1173–1213.
-

Apêndices

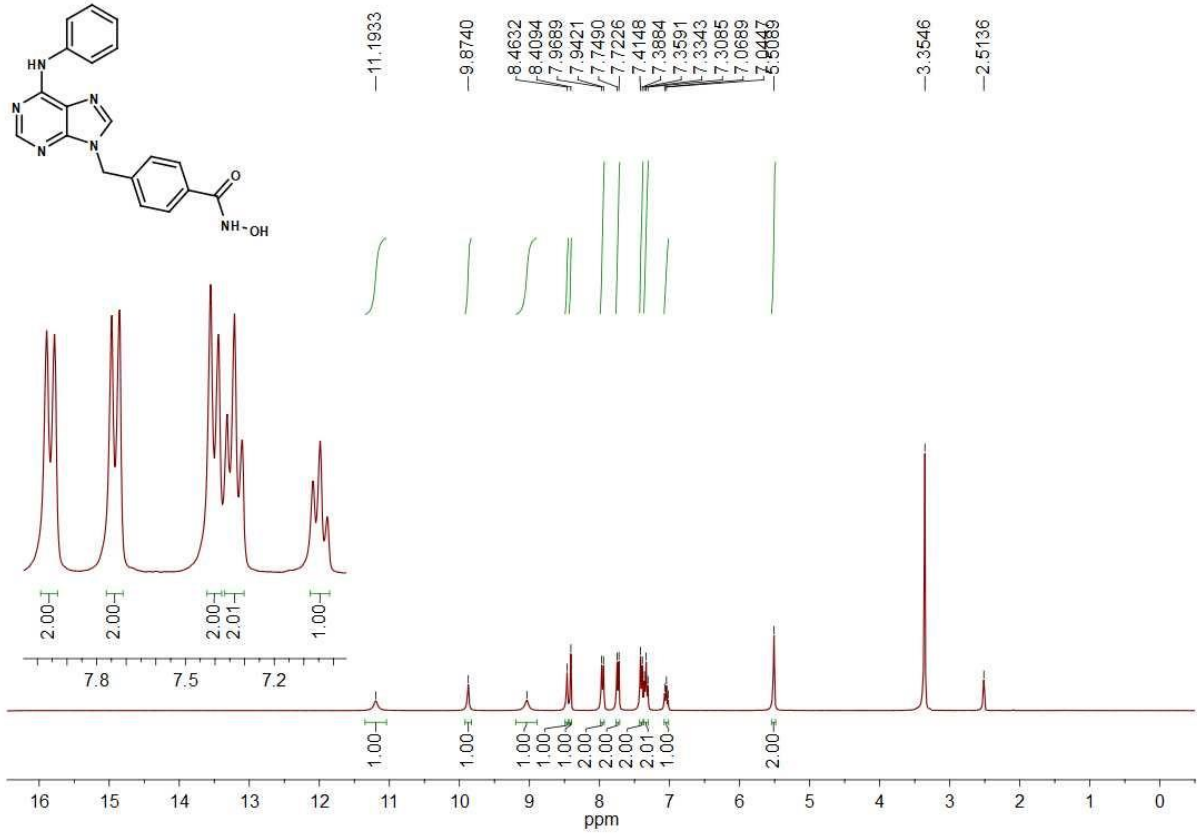
Apêndice 1

Espectros e Cromatogramas

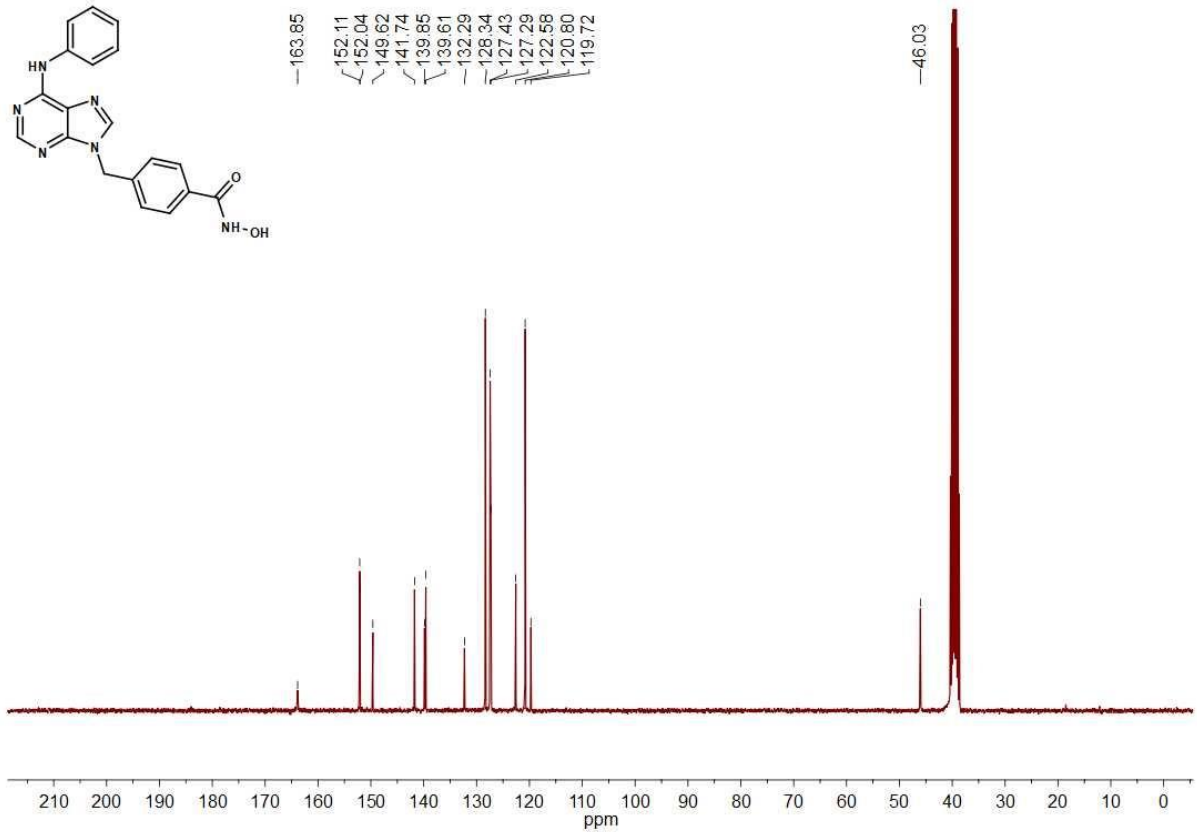
Espectro de ^1H RMN do intermediário 2aEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2a

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3aEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3a

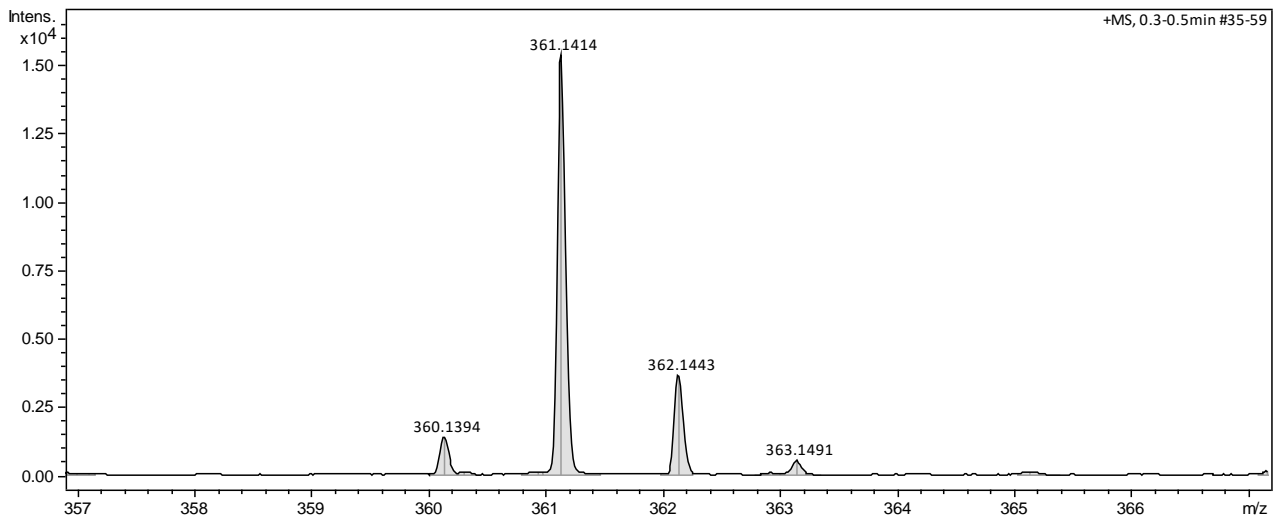
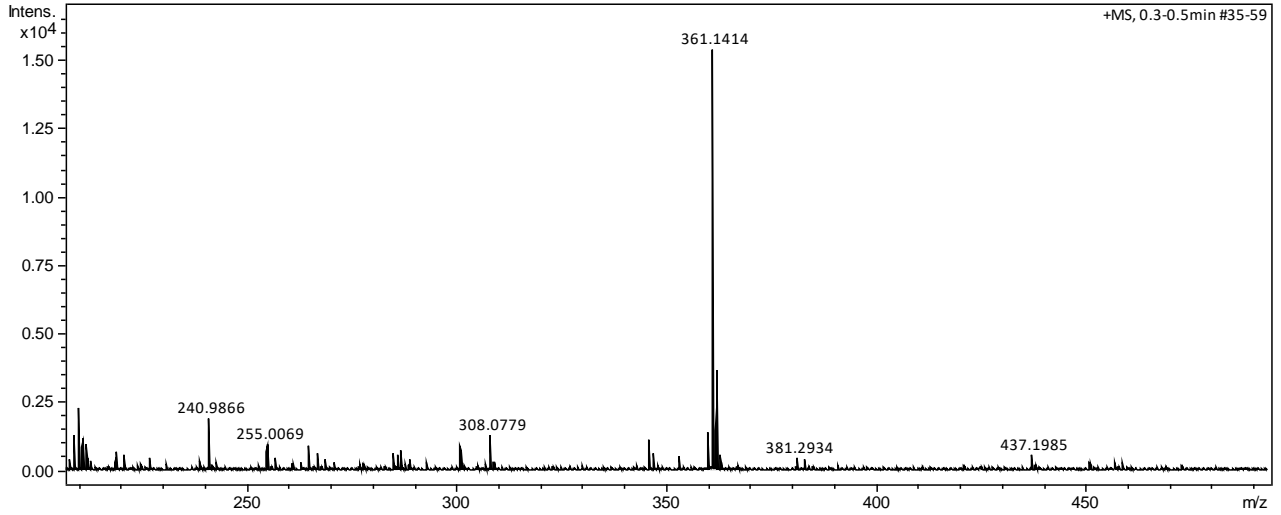
Espectro de ¹H RMN do composto final 4a



Espectro de ¹³C RMN do composto final 4a



Espectro de HRMS do composto final 4a

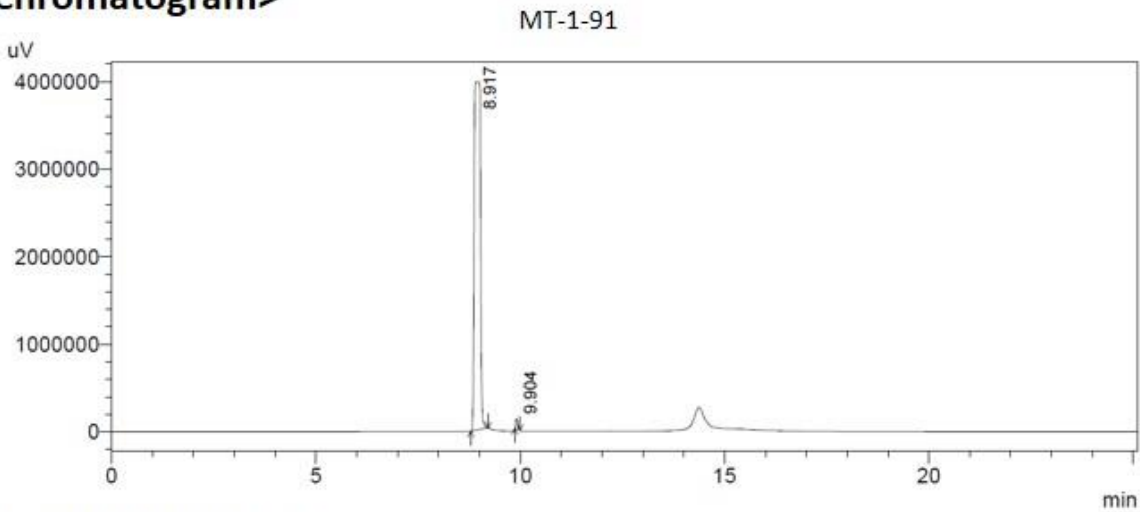


Cromatograma de CLAE do composto final 4a

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-91
Vail # : 3
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : MT-1-91.lcd
Method File Name : acetonitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 05/12/2018 13:57:01
Data Processed : 13/12/2018 16:17:17

<Chromatogram>



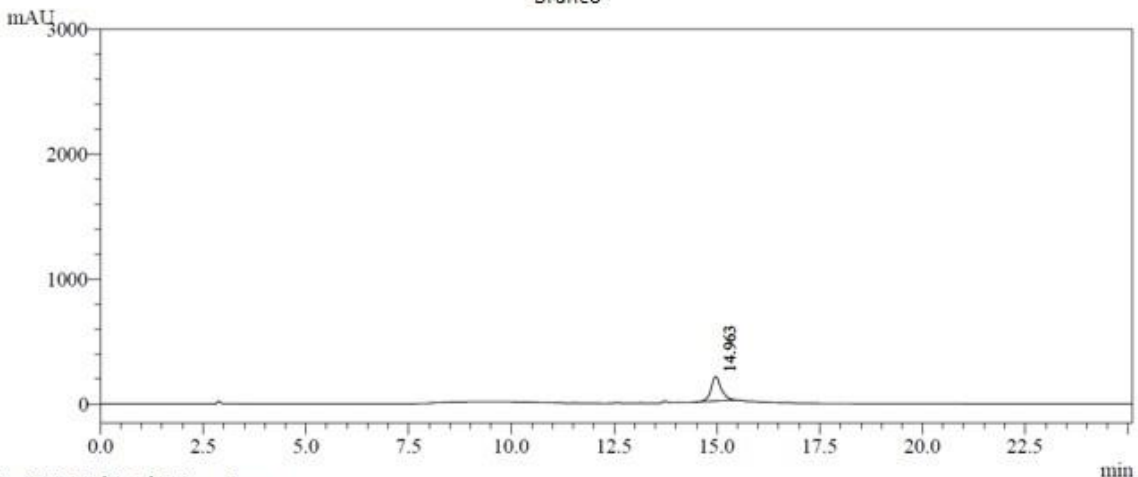
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

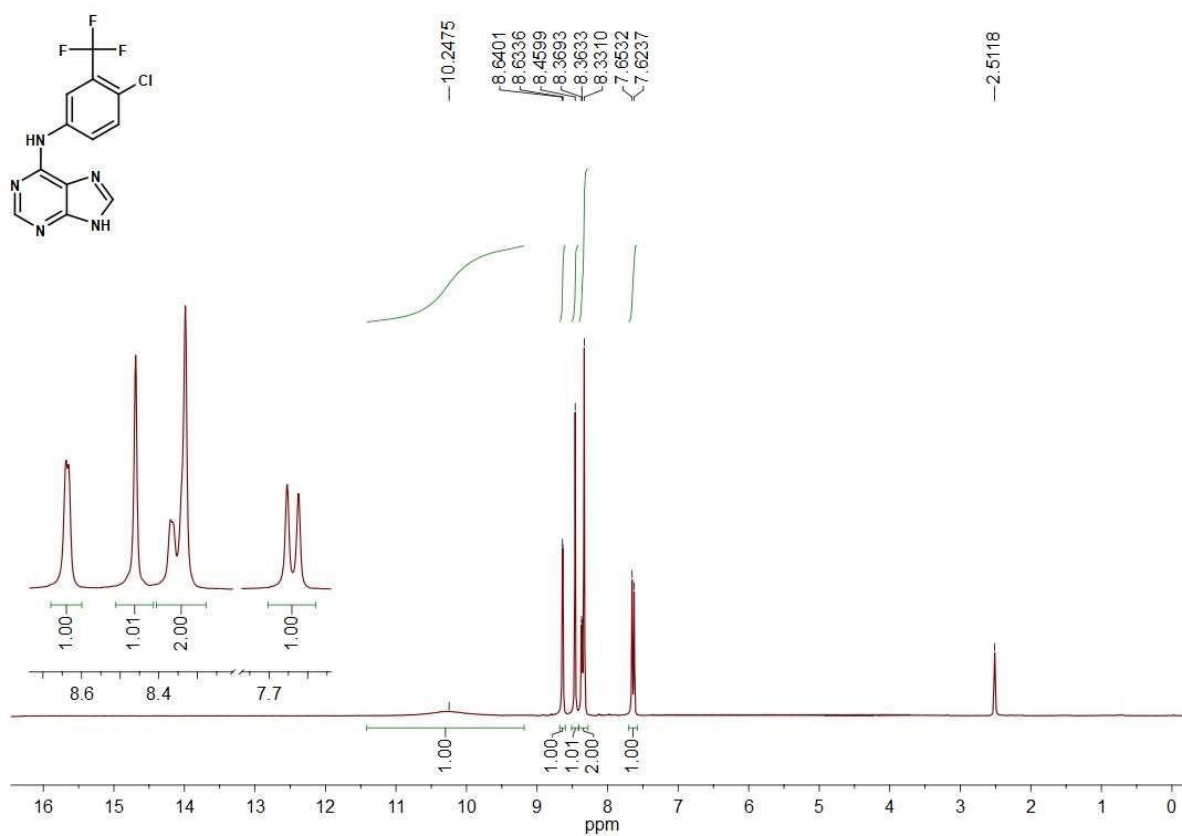
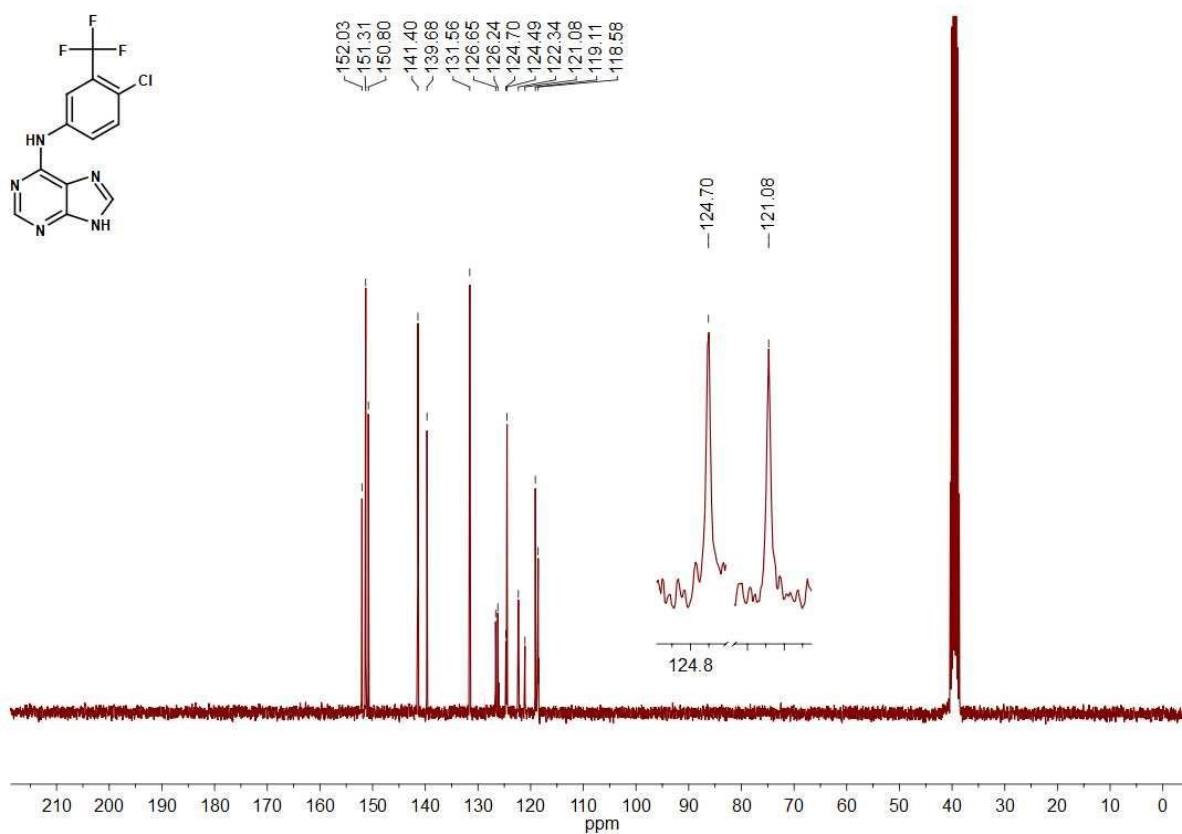
PDA Ch1 254nm 4nm

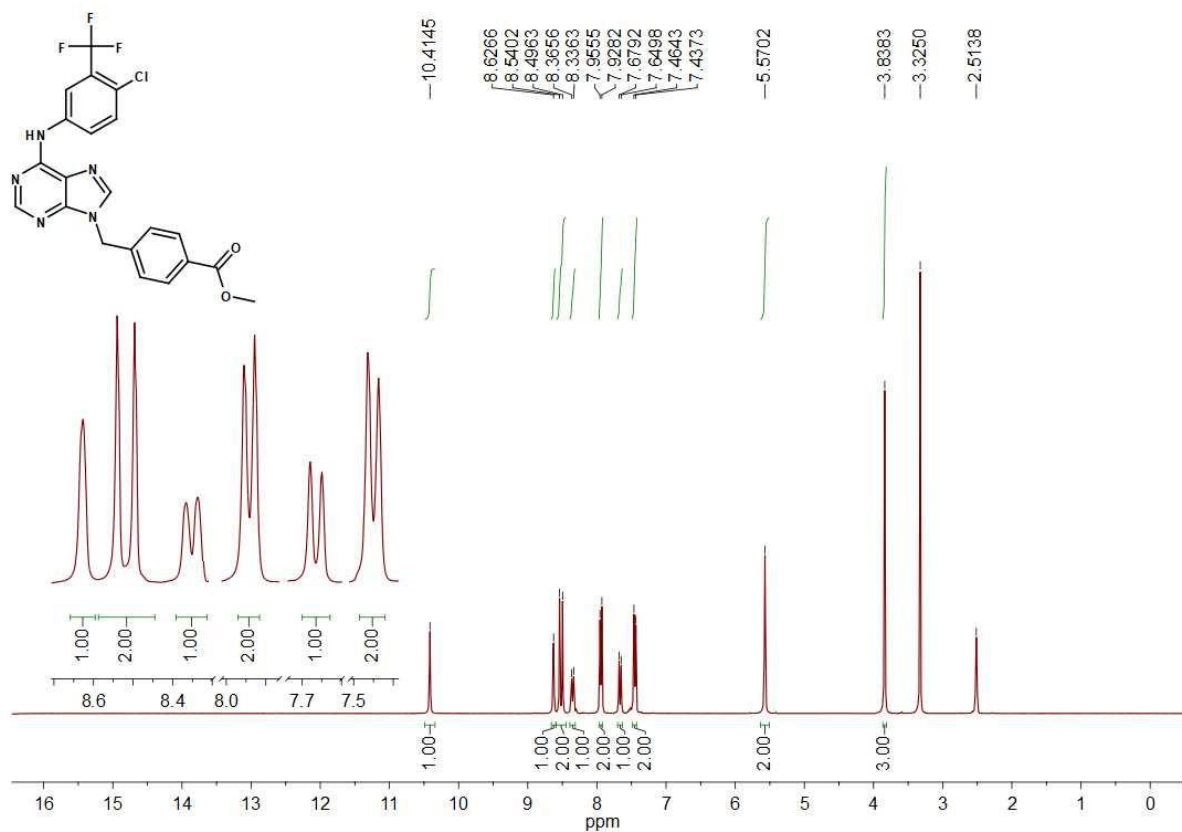
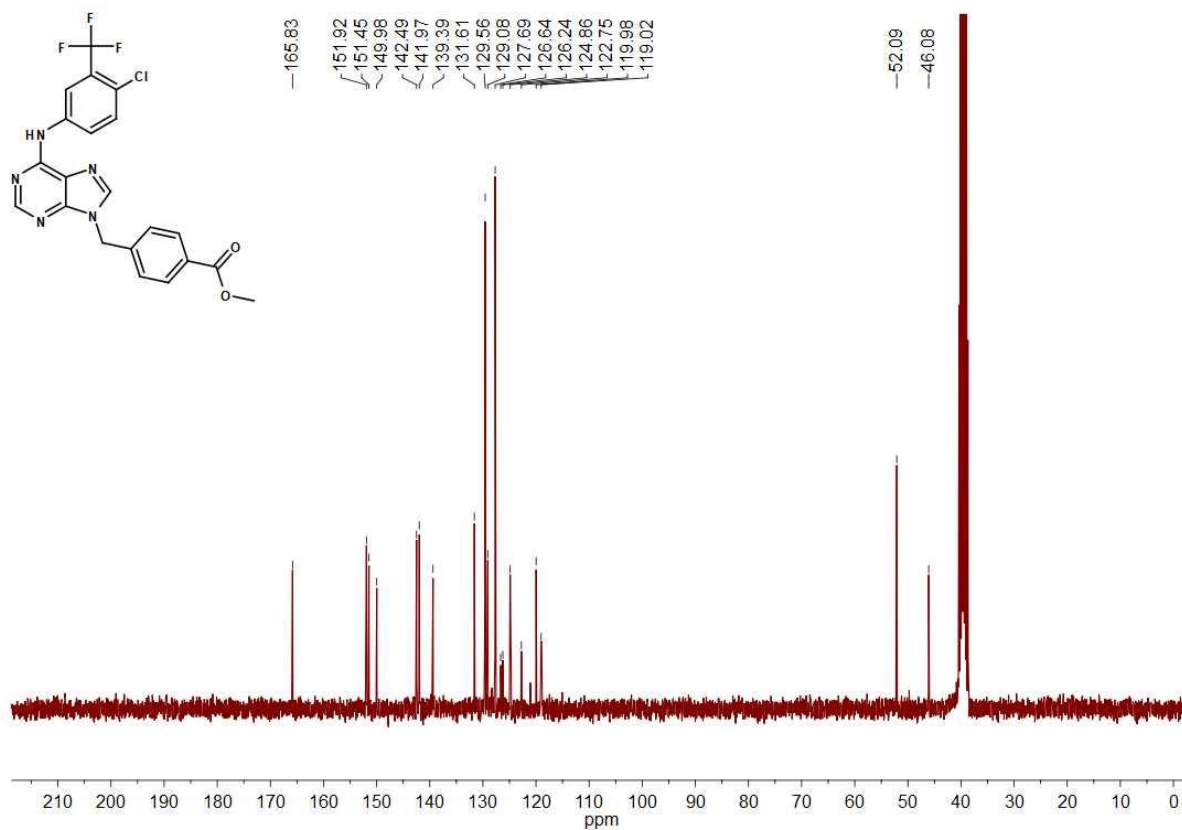
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.917	41090304	3981189	98.909	97.081
2	9.904	453181	119702	1.091	2.919
Total		41543485	4100891	100.000	100.000

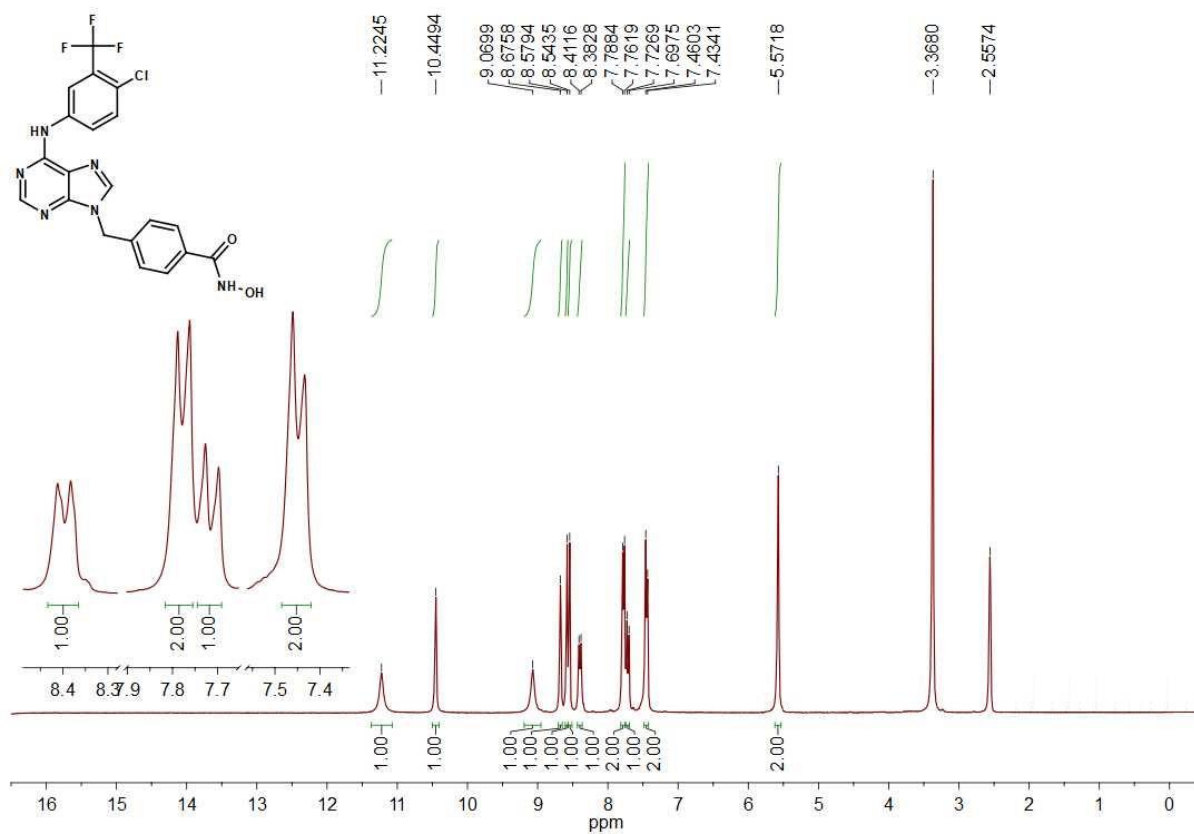
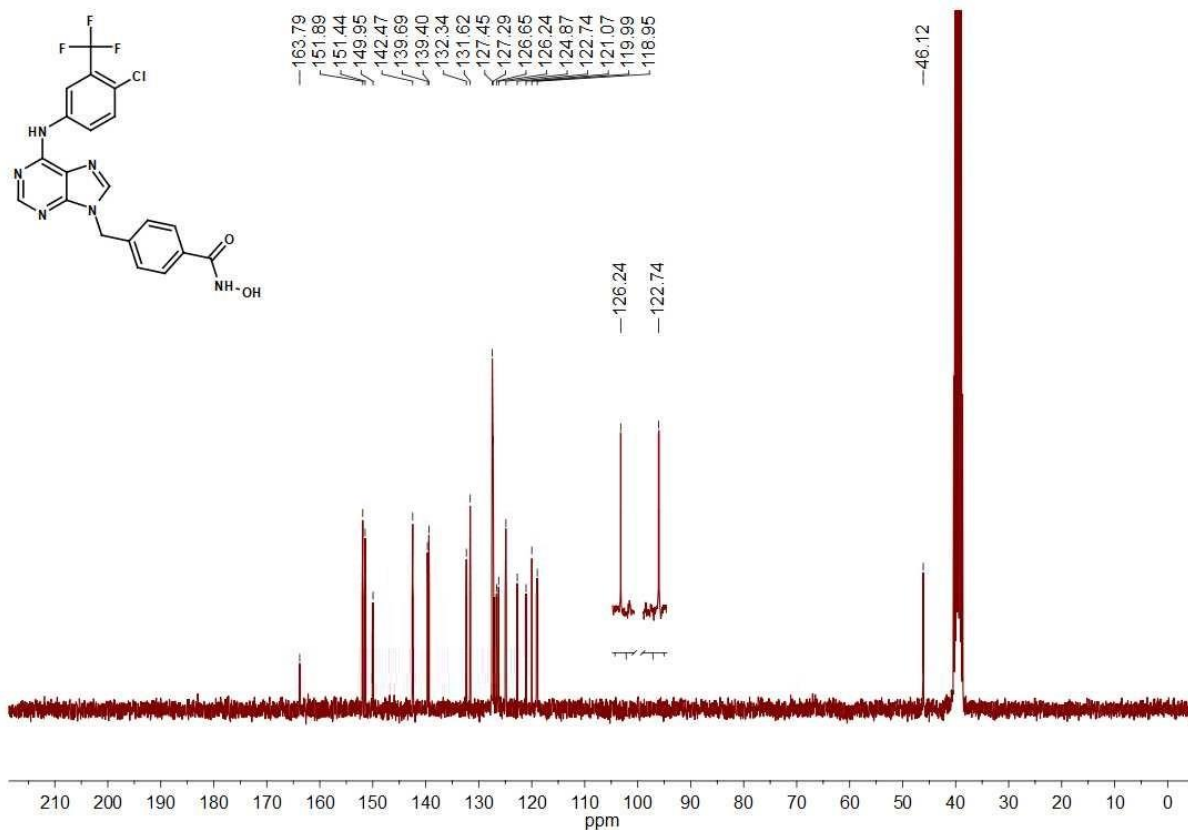
Chromatogram Branco



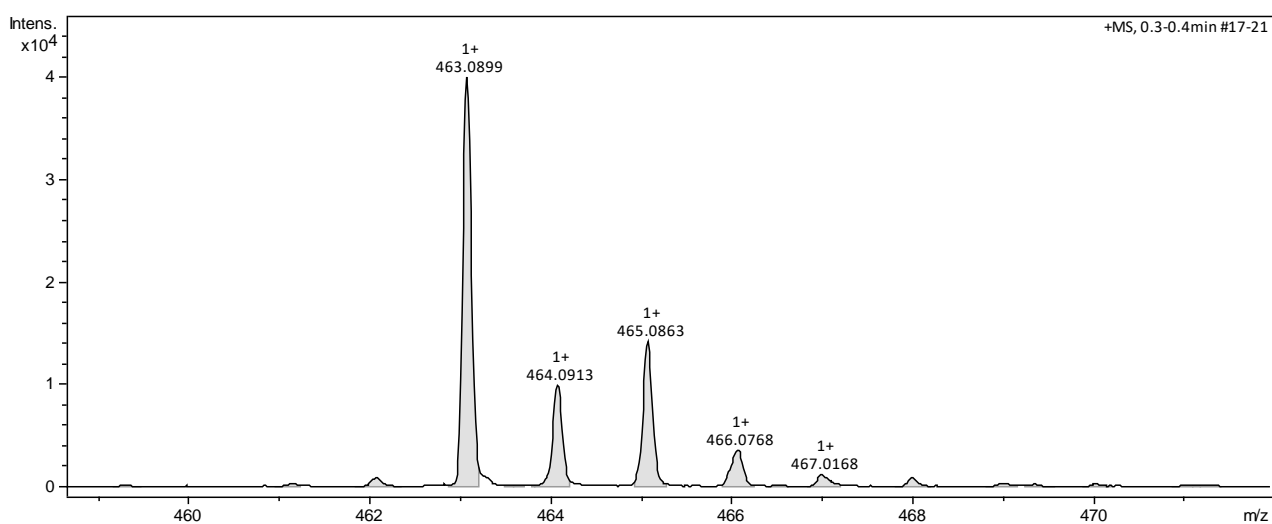
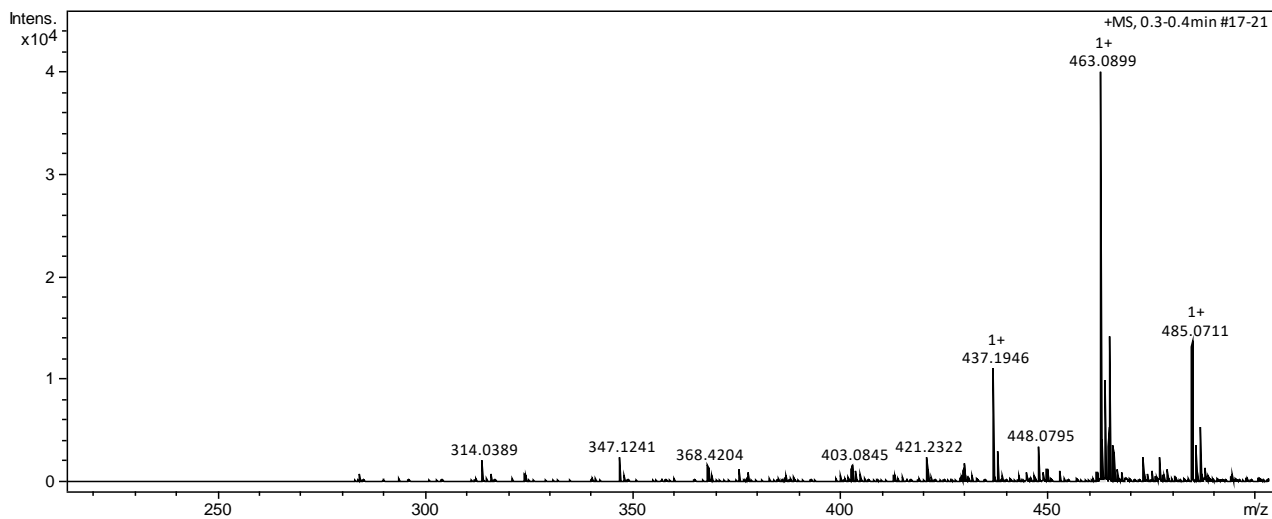
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2bEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2b

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3bEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3b

Espectro de ^1H RMN do composto final 4bEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4b

Espectro de HRMS do composto final 4b

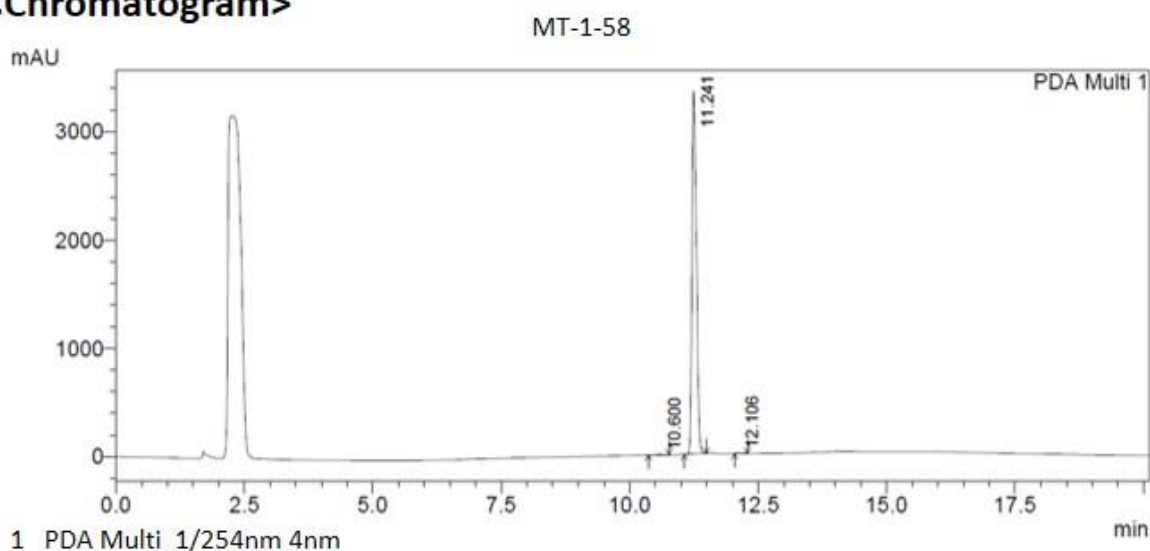


Cromatograma de CLAE do composto final 4b

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-58
Vial # : 23
Injection Volume : 20 μ L
Data File Name : MT-1-58.lcd
Method File Name : acetonitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 27/6/2018 04:36:28
Data Processed : 28/6/2018 09:47:50

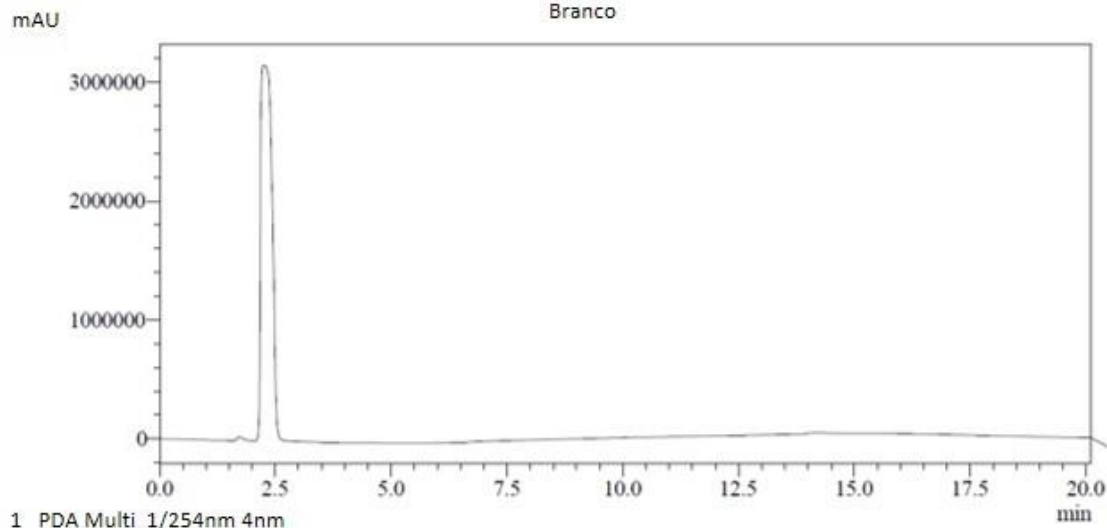
<Chromatogram>

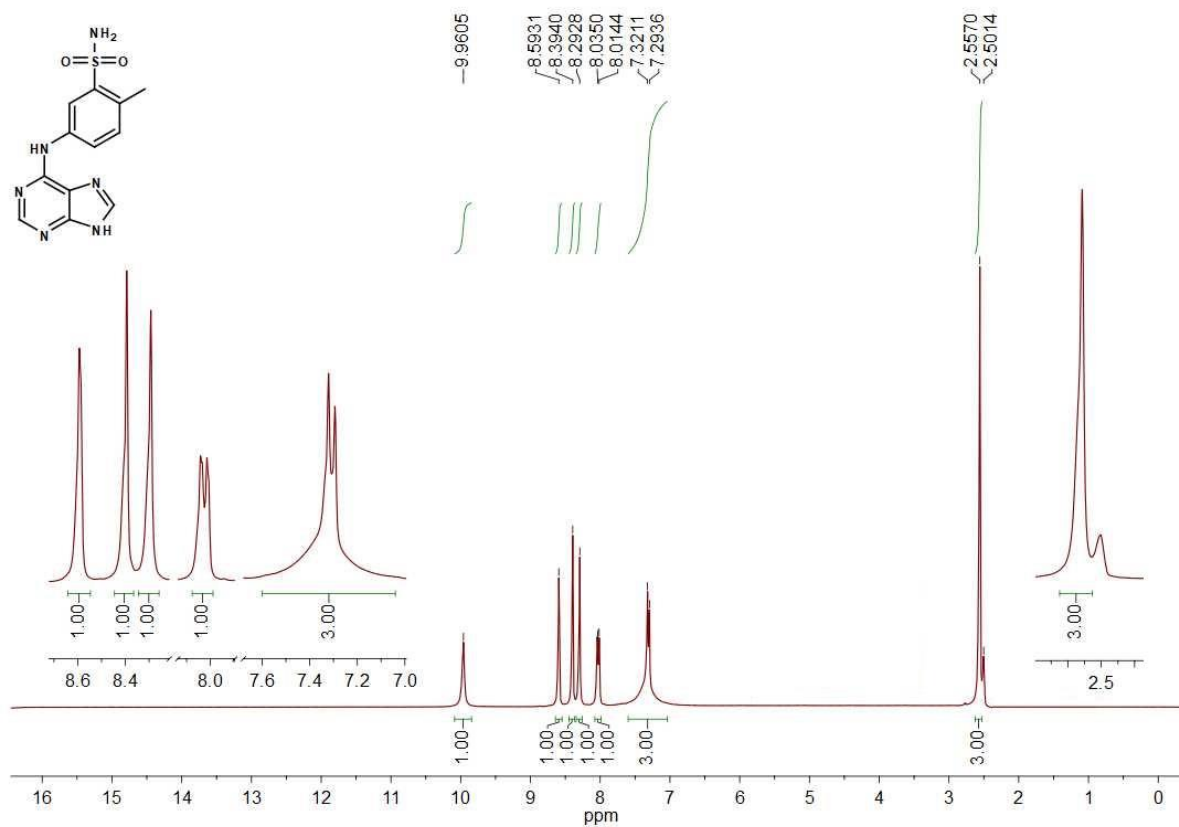
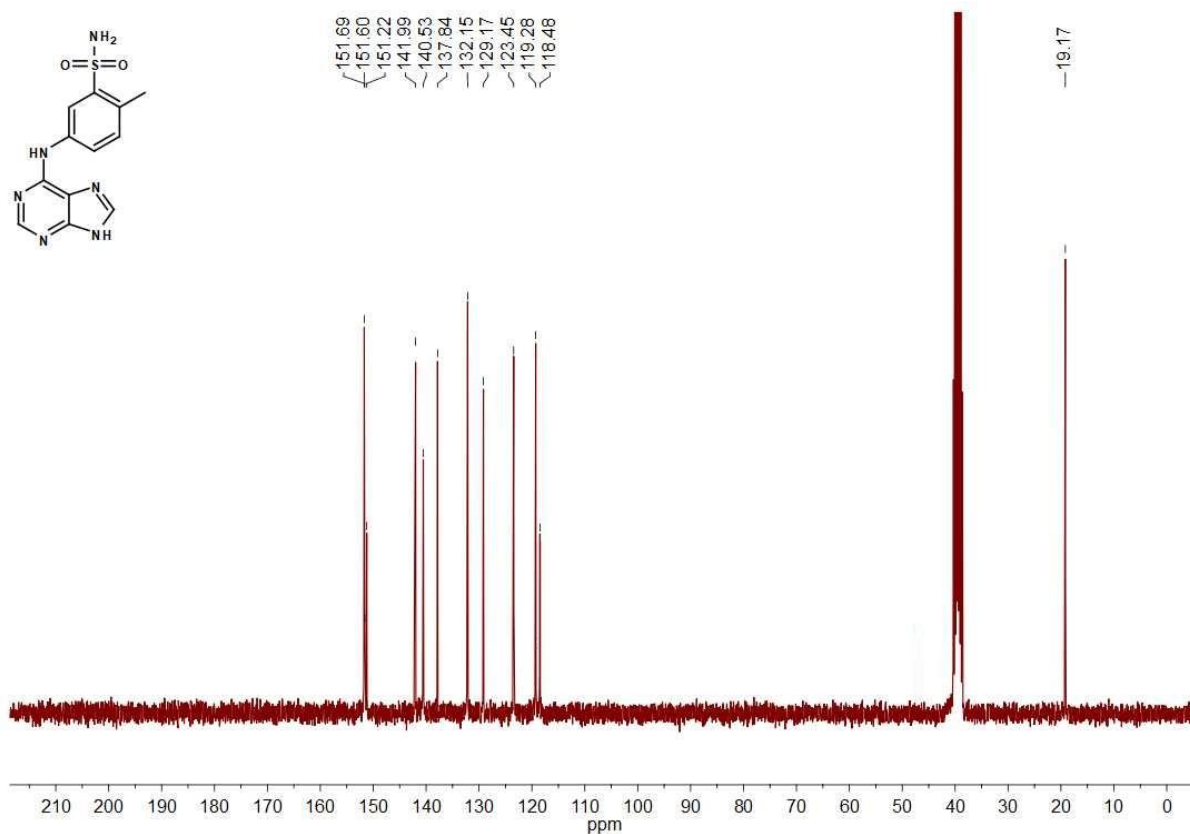


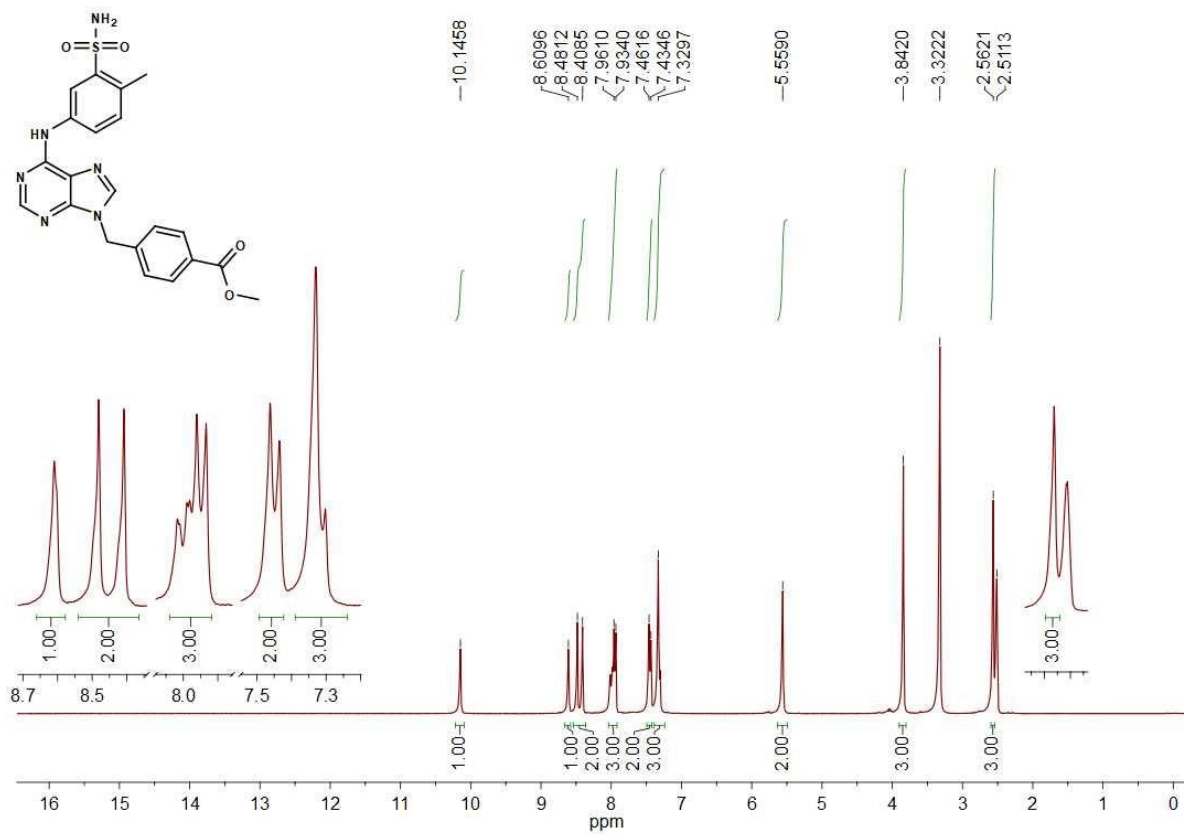
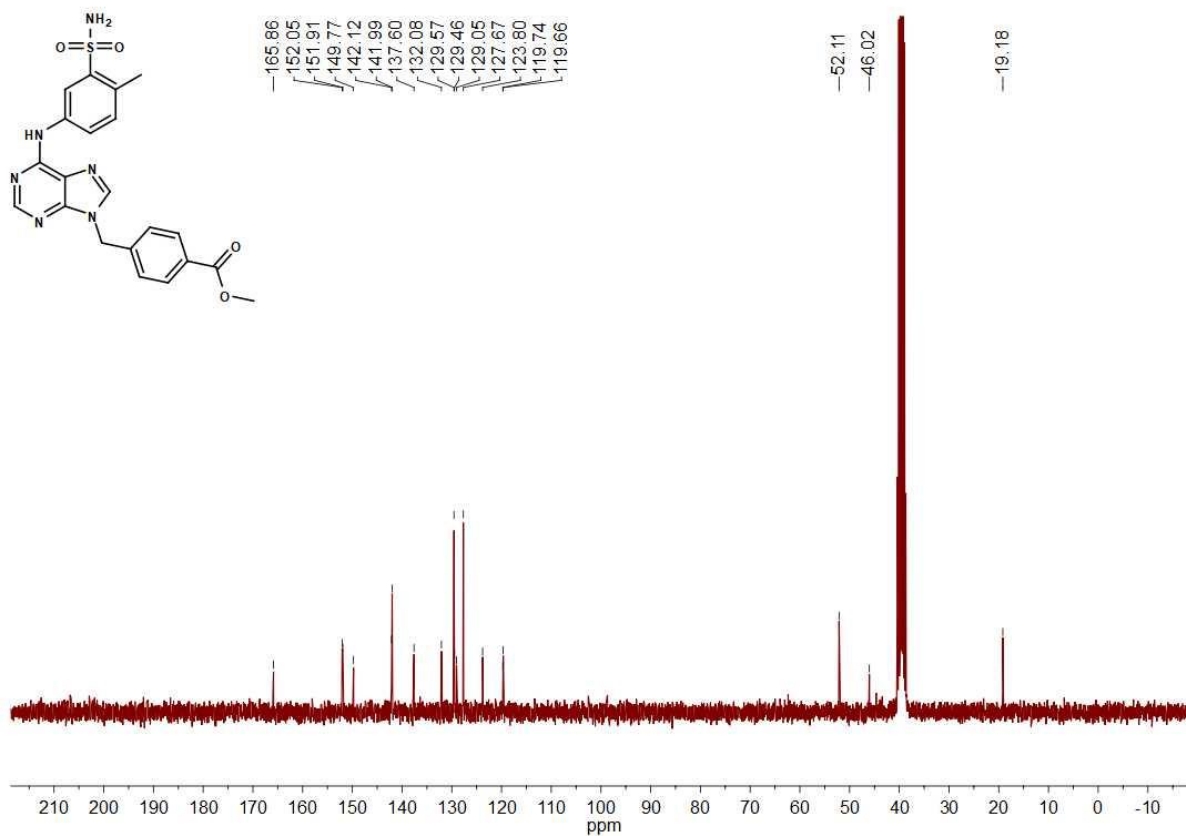
Peak Table

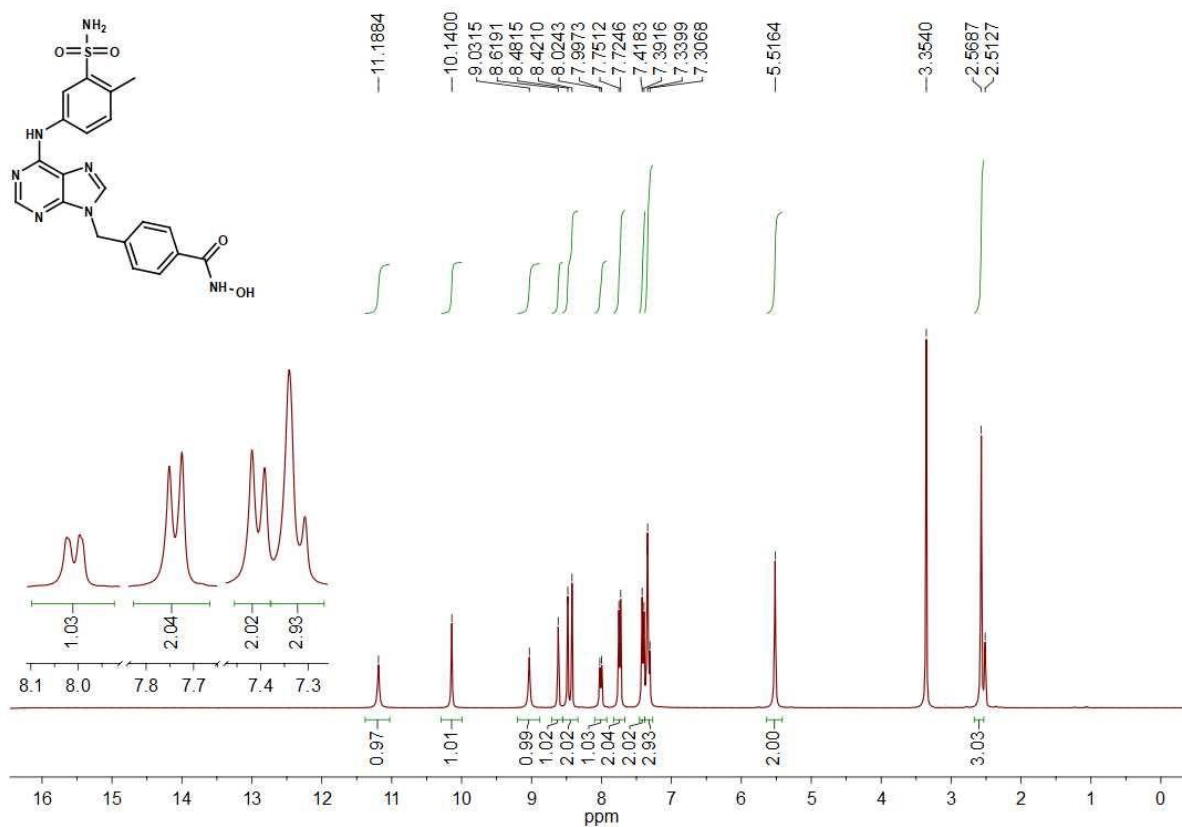
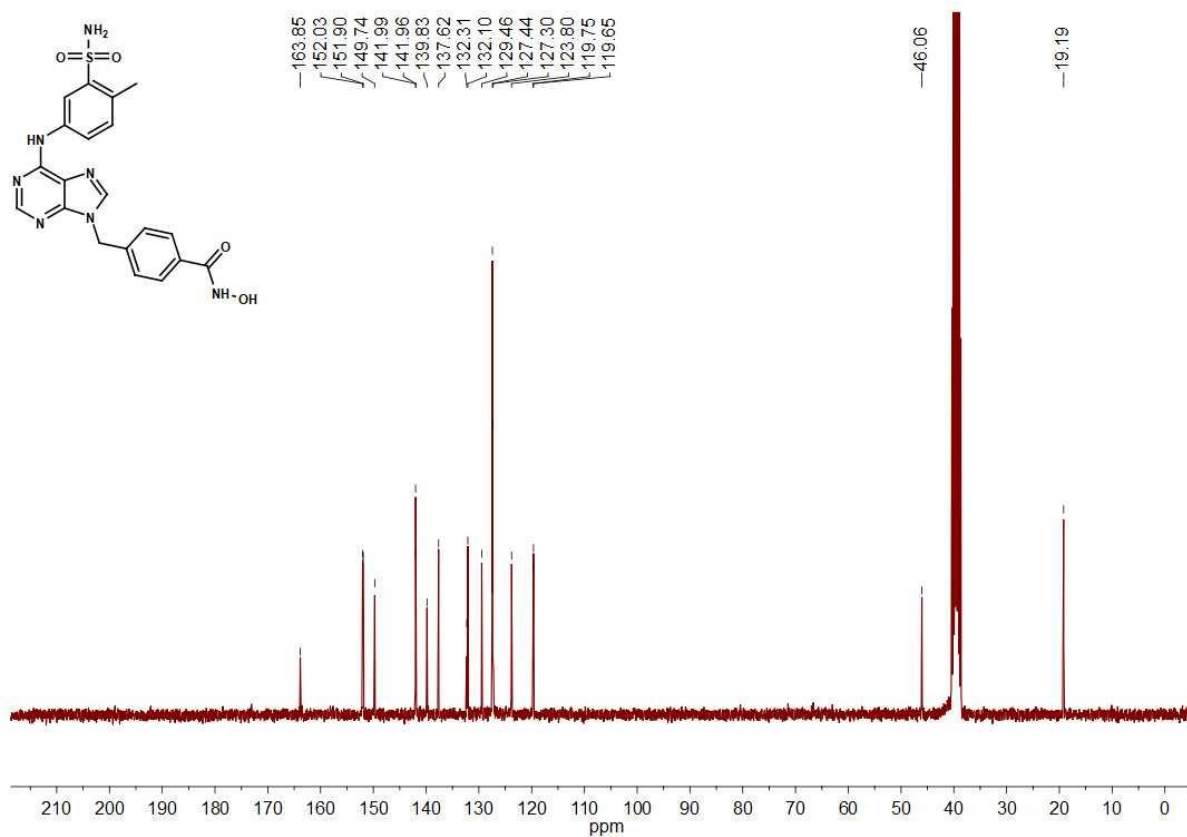
PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.600	49630	6605	0.244	0.196
2	11.241	20249237	3350048	99.559	99.572
3	12.106	40073	7808	0.197	0.232
Total		20338941	3364460	100.000	100.000

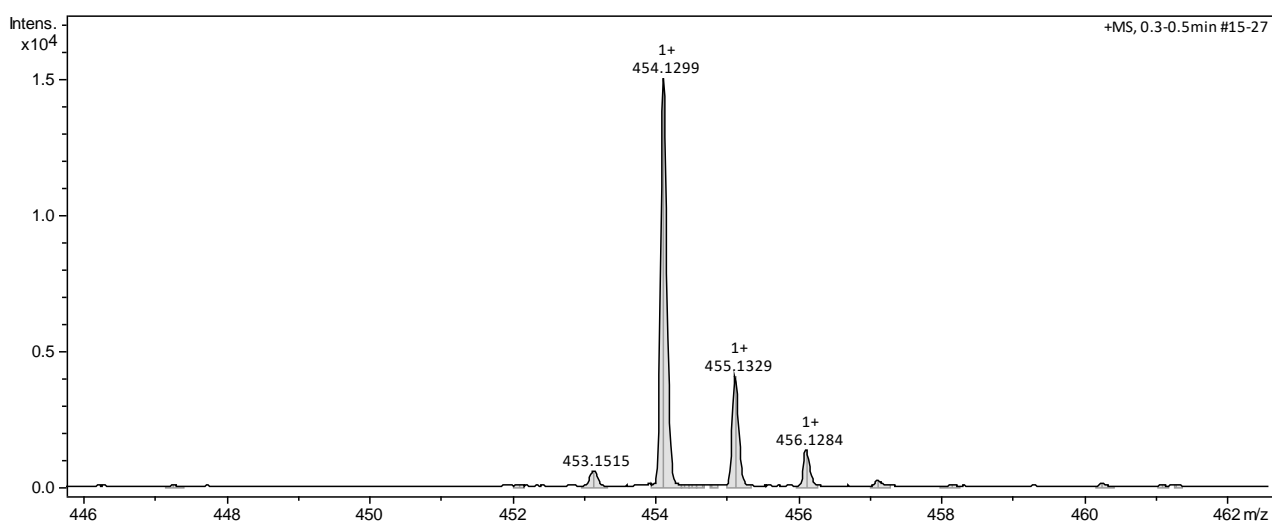
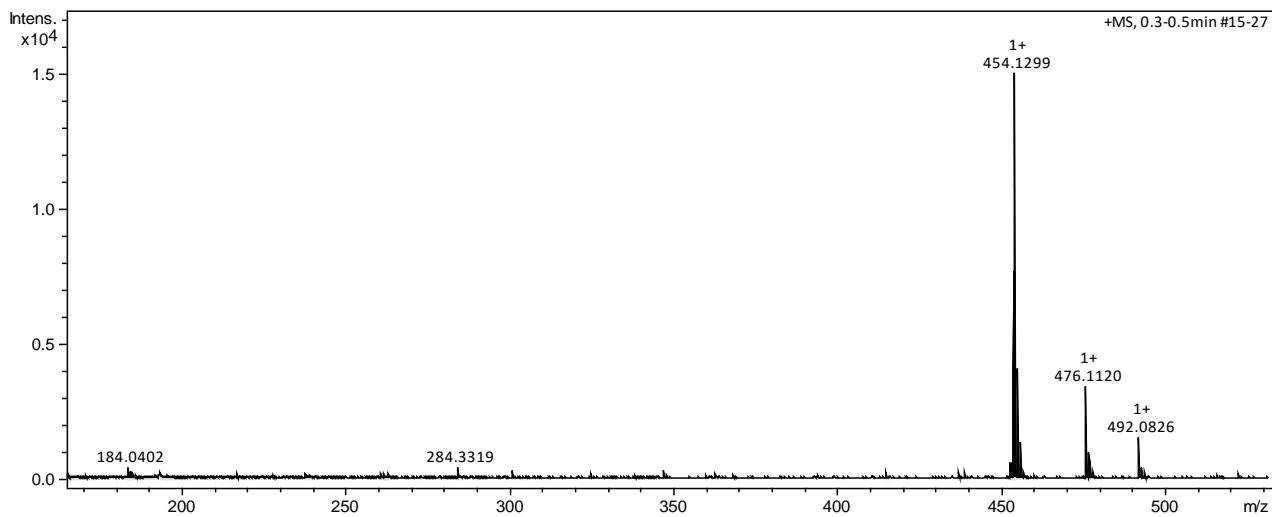
Chromatogram
Branco

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2cEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2c

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3cEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3c

Espectro de ^1H RMN do composto final 4cEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4c

Espectro de HRMS do composto final 4c

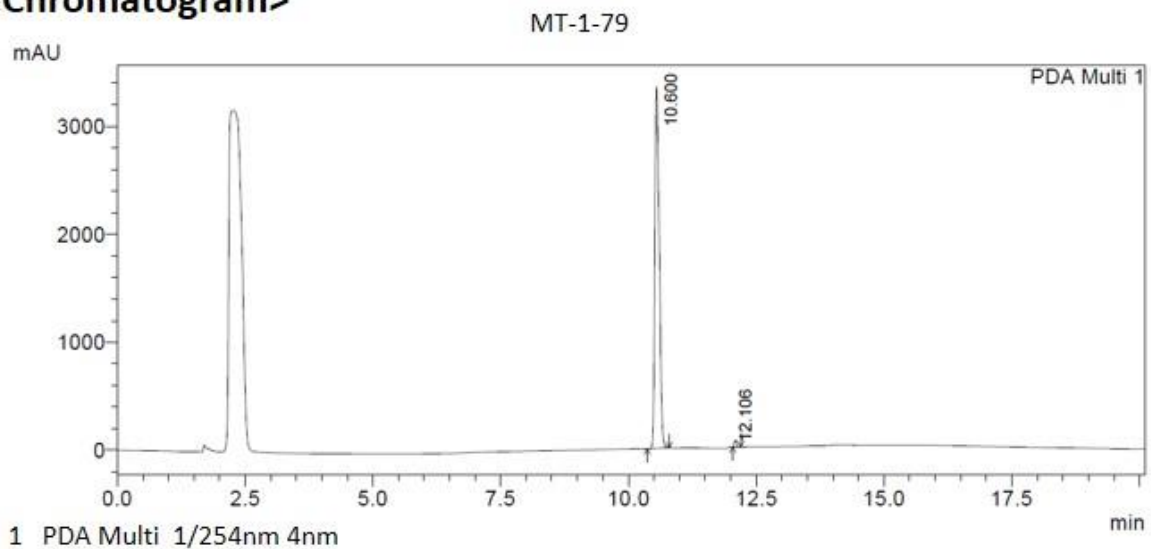


Cromatograma de CLAE do composto final 4c

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-79
Vail # : 24
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : MT-1-79.lcd
Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 27/6/2018 05:10:36
Data Processed : 01/2/2019 19:53:09

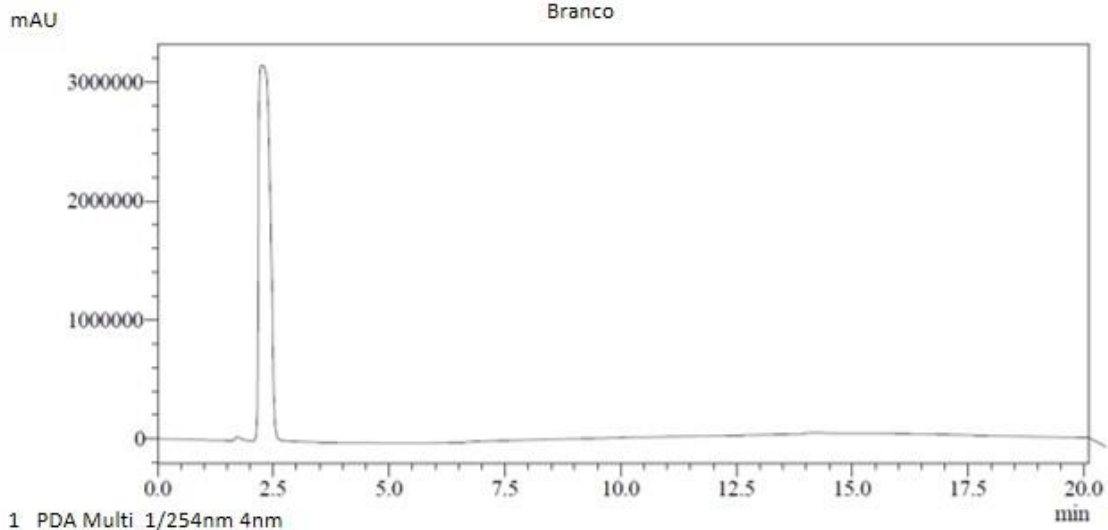
<Chromatogram>

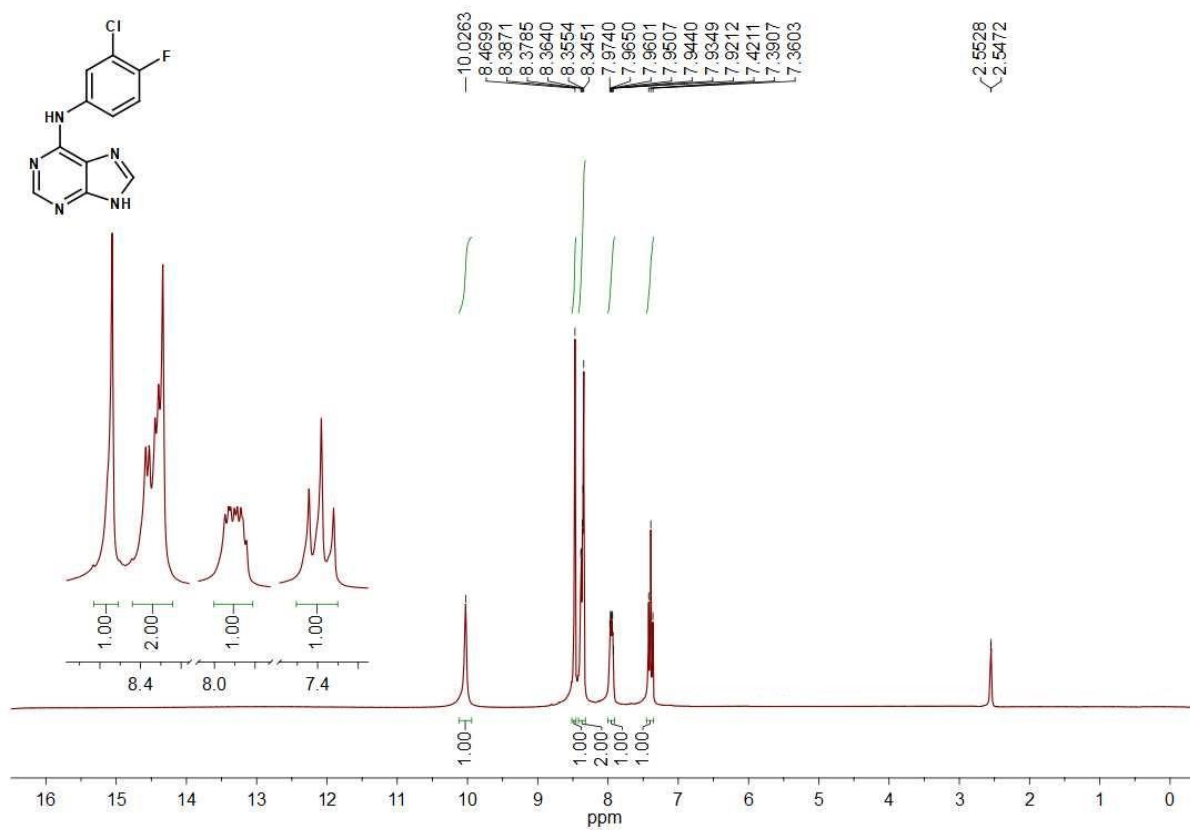
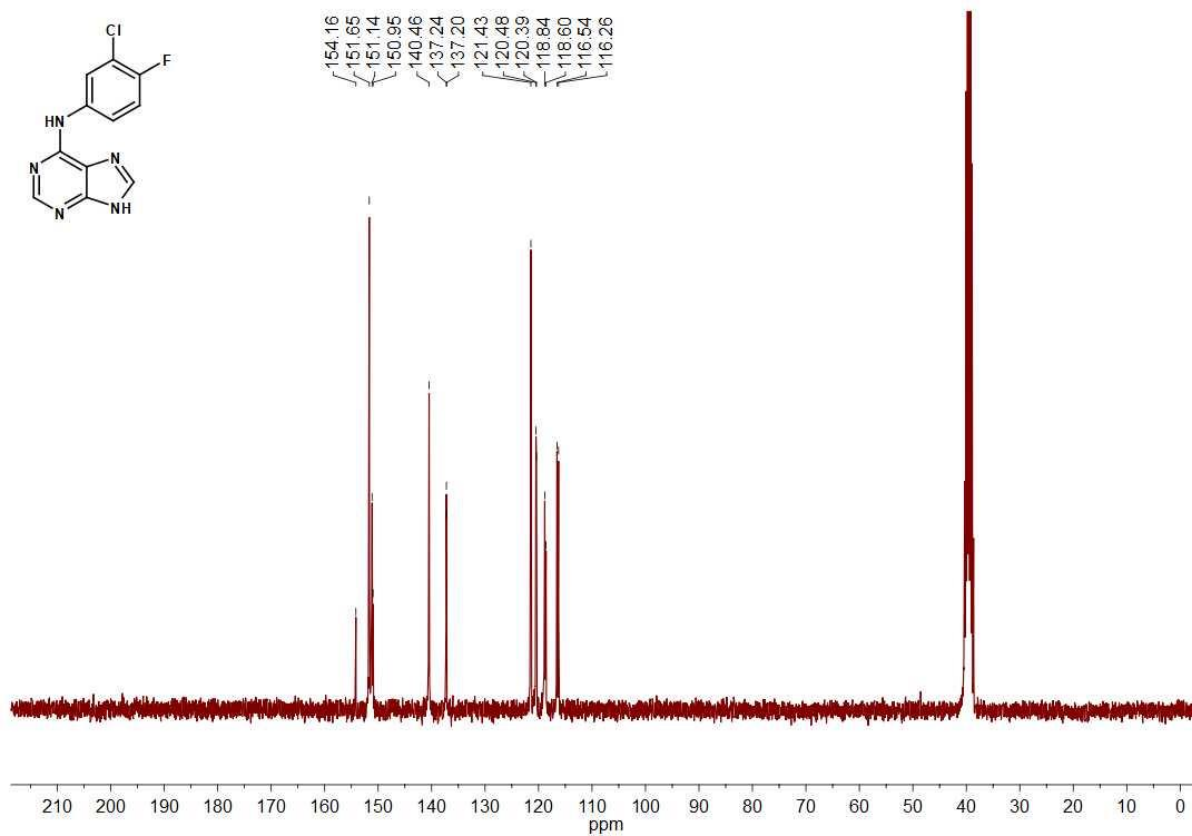


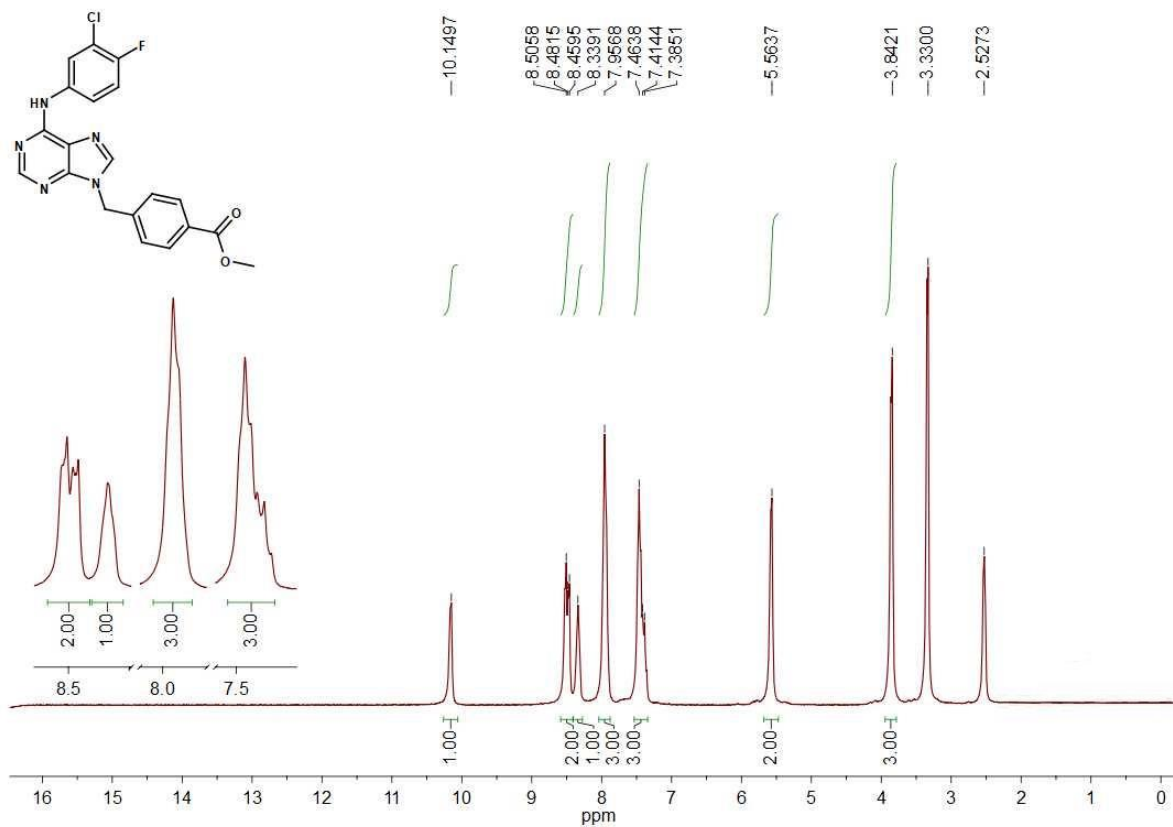
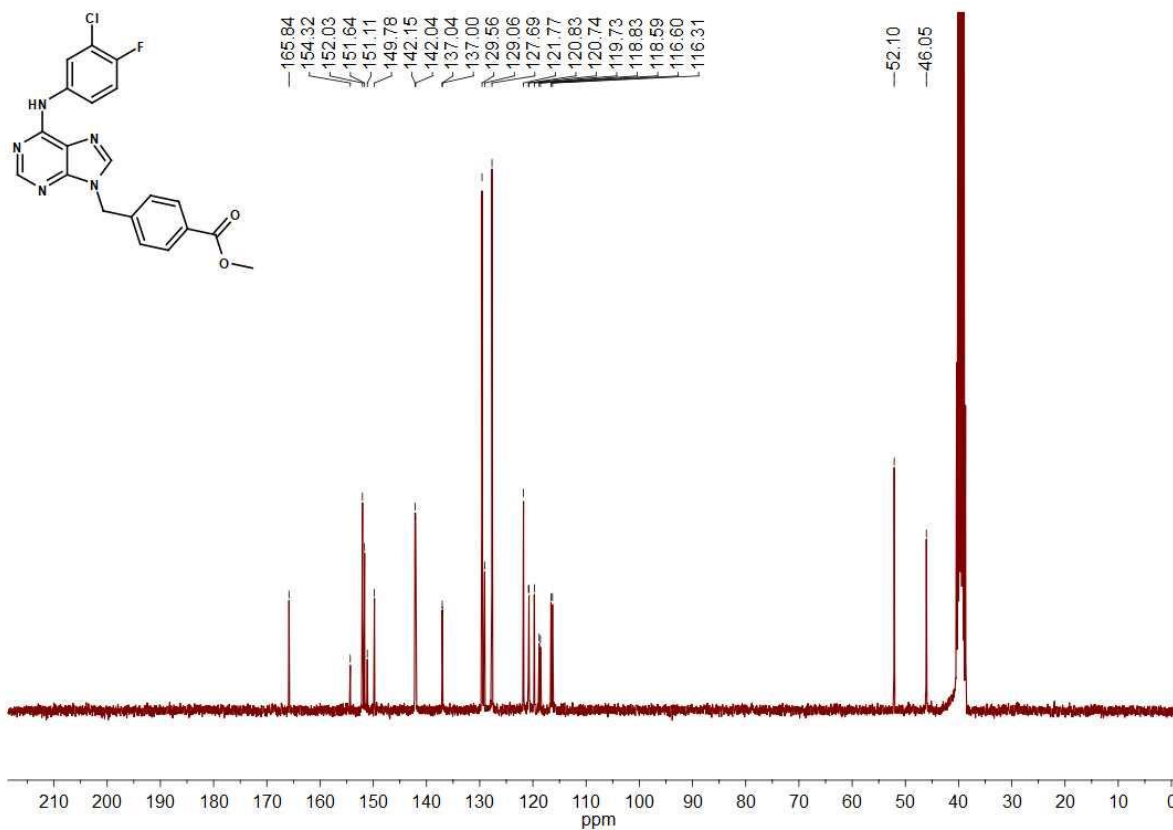
Peak Table

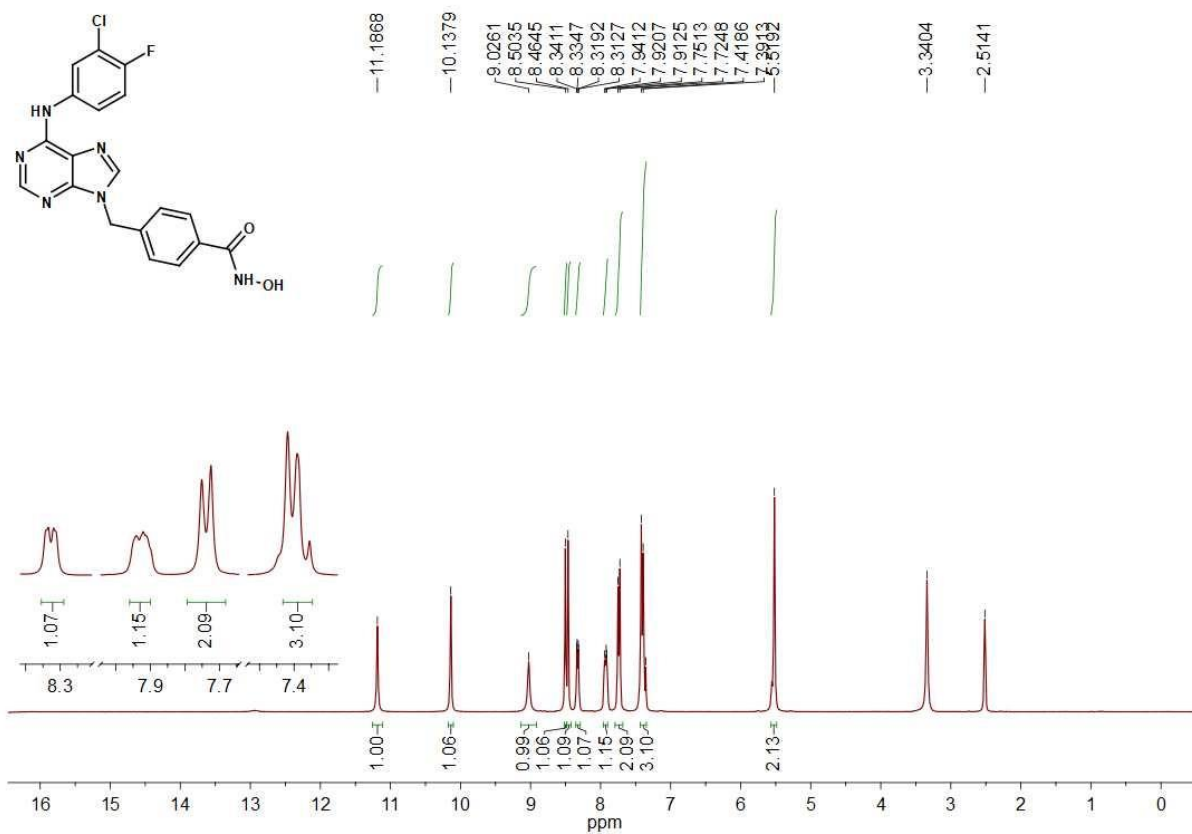
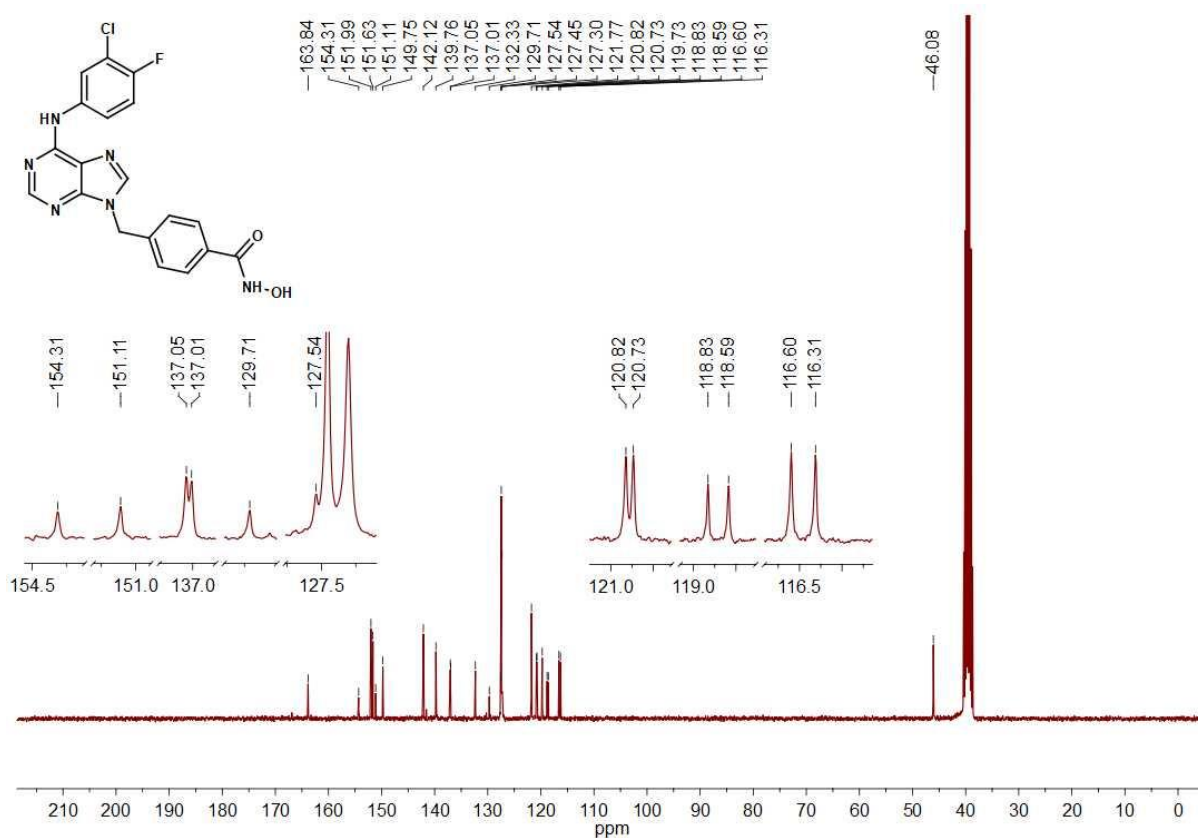
PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.600	15189825	3363501	98.198	97.534
2	12.106	278745	85038	1.802	2.466
Total		15468570	3448539	100.000	100.000

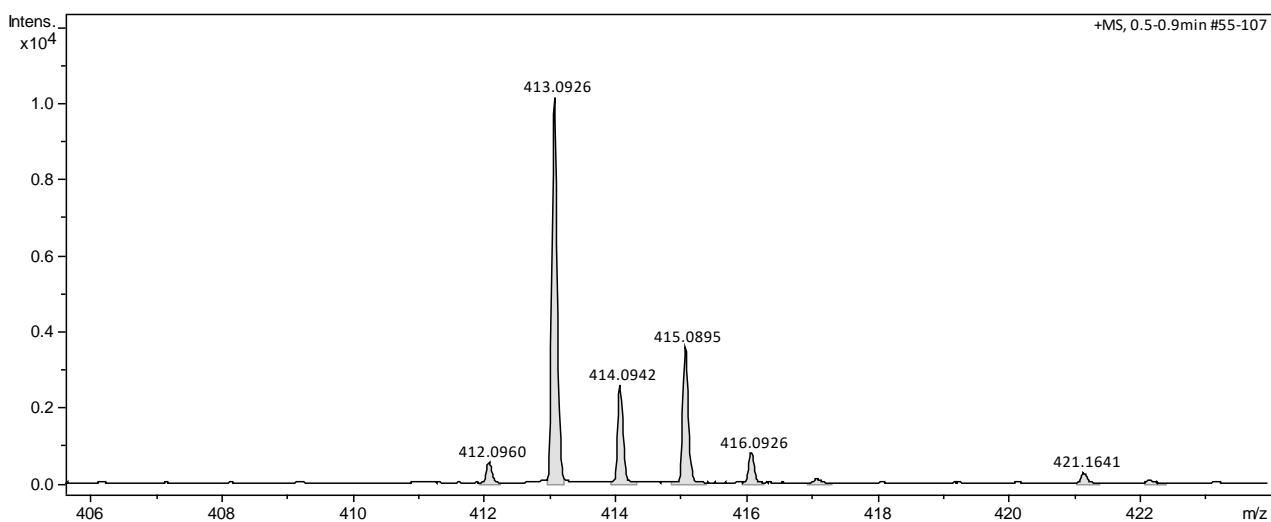
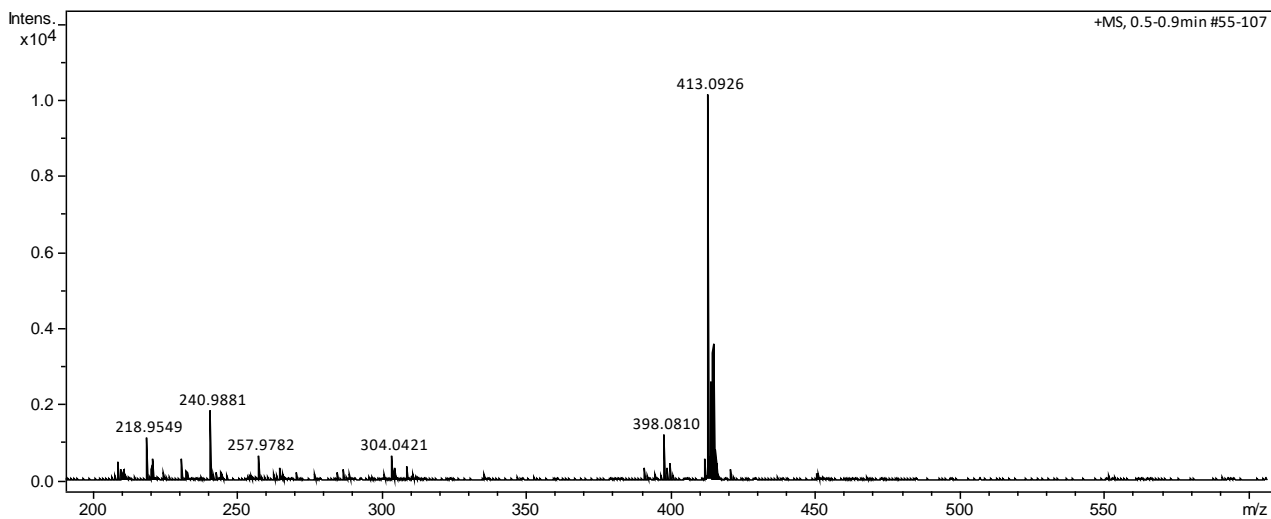
Chromatogram
Branco

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2dEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2d

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3dEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3d

Espectro de ^1H RMN do composto final 4dEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4d

Espectro de HRMS do composto final 4d

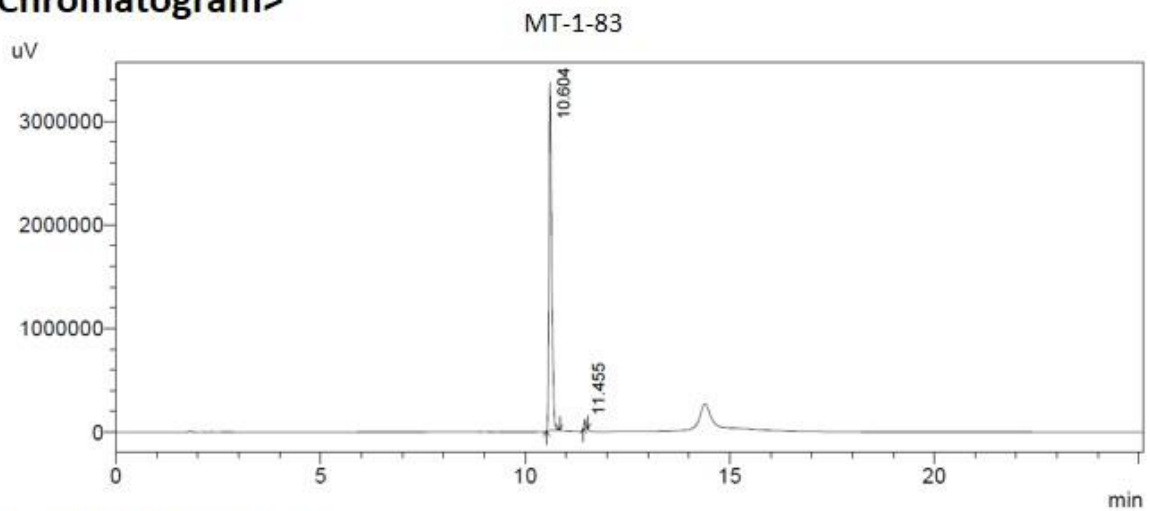


Cromatograma de CLAE do composto final 4d

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-83
Vial # : 8
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : MT-1-83.lcd
Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 14/12/2018 10:04:01
Data Processed : 15/12/2018 13:40:45

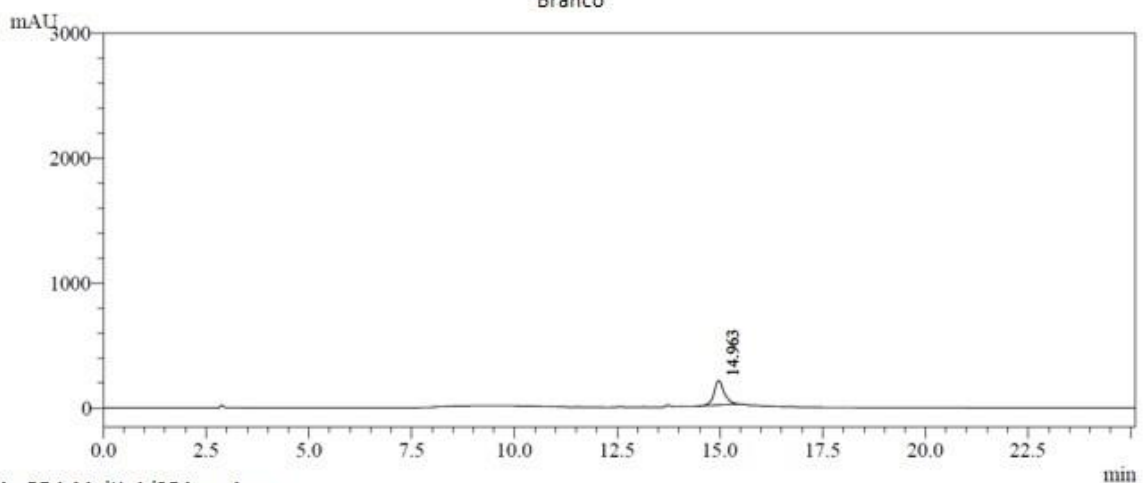
<Chromatogram>

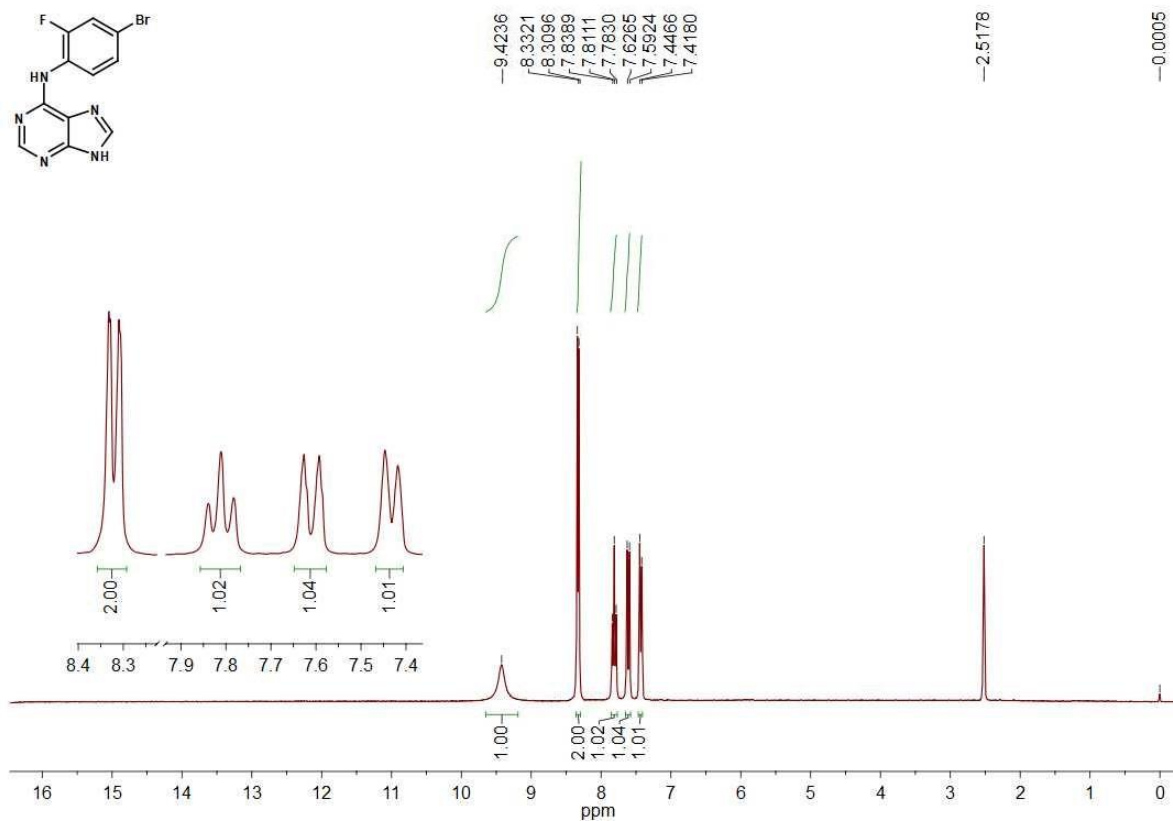
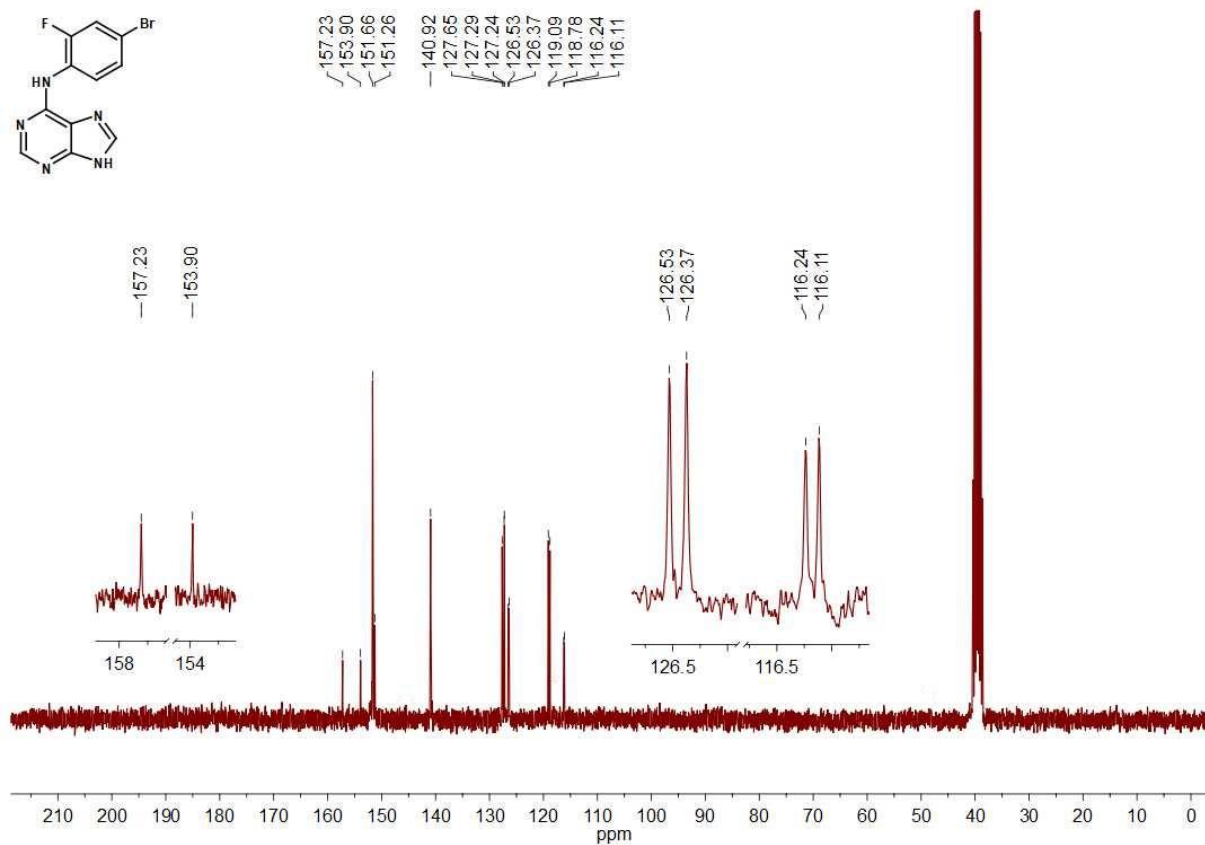


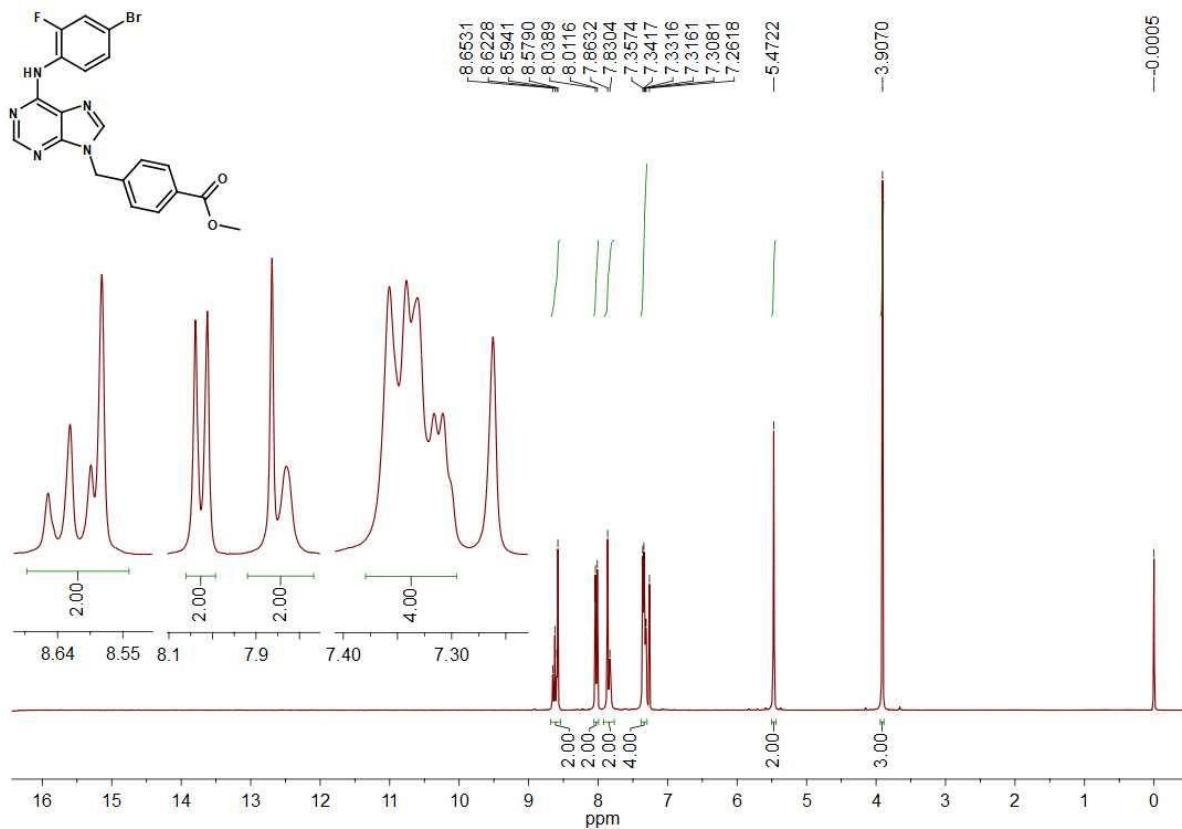
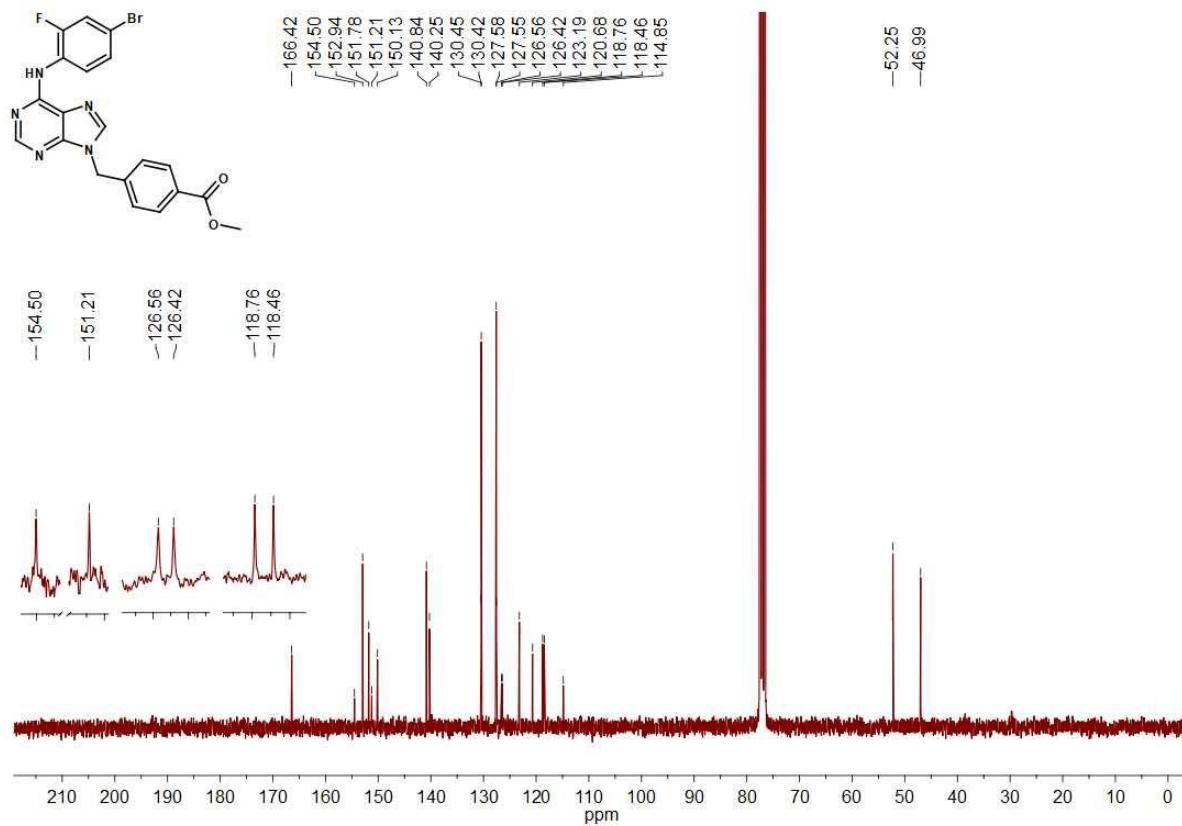
Peak Table

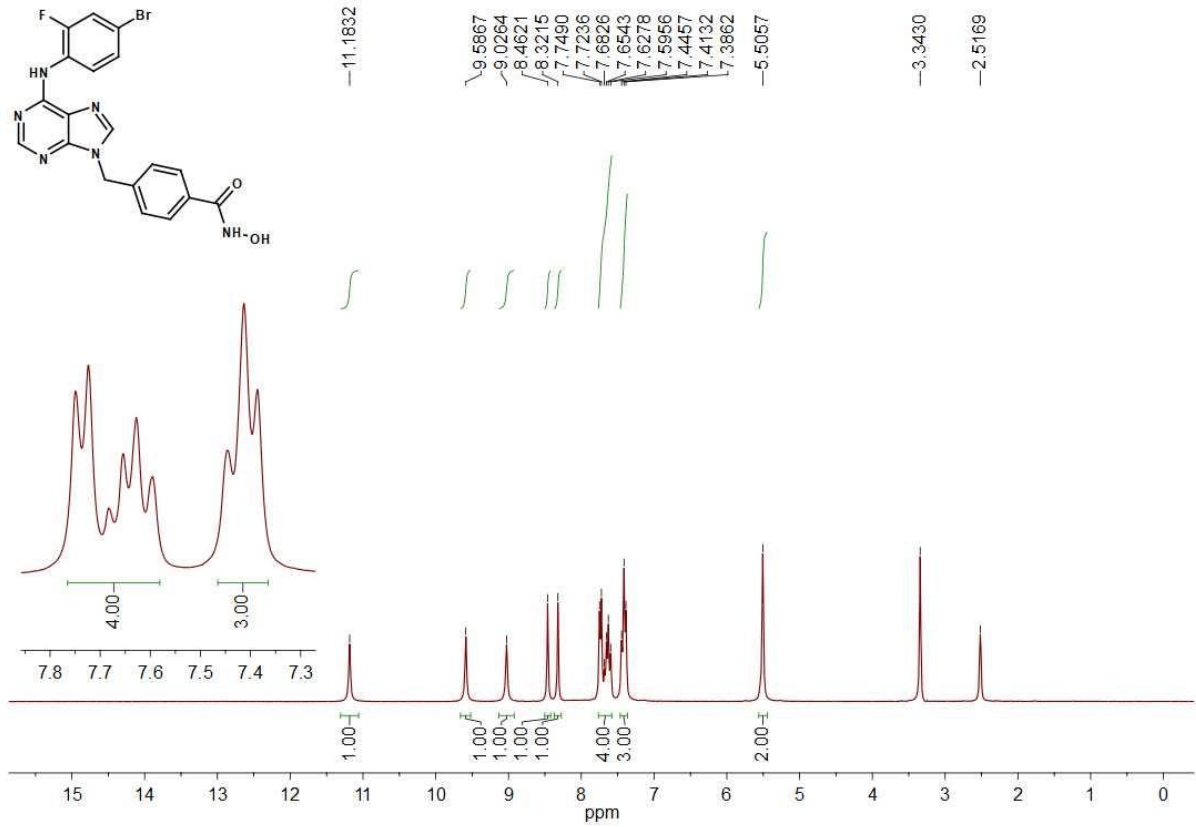
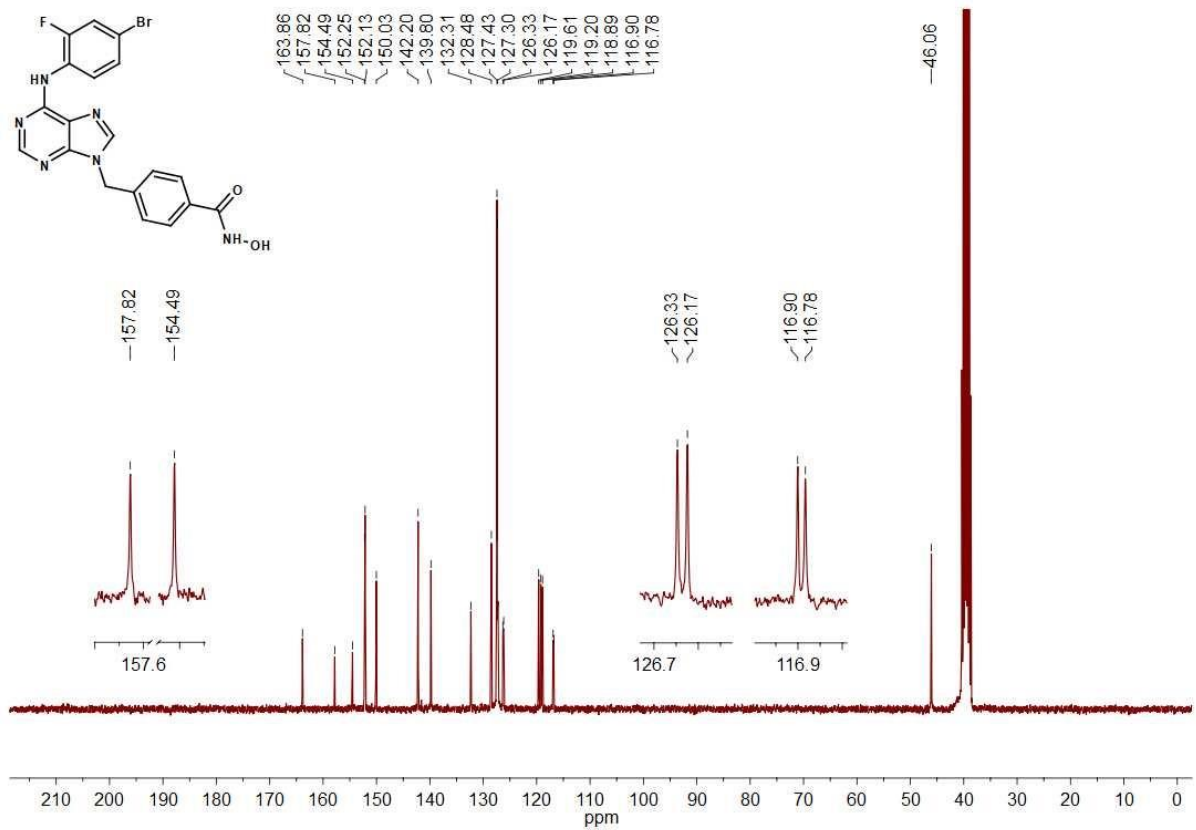
PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.604	15189825	3363501	98.198	97.534
2	11.455	278745	85038	1.802	2.466
Total		15468570	3448539	100.000	100.000

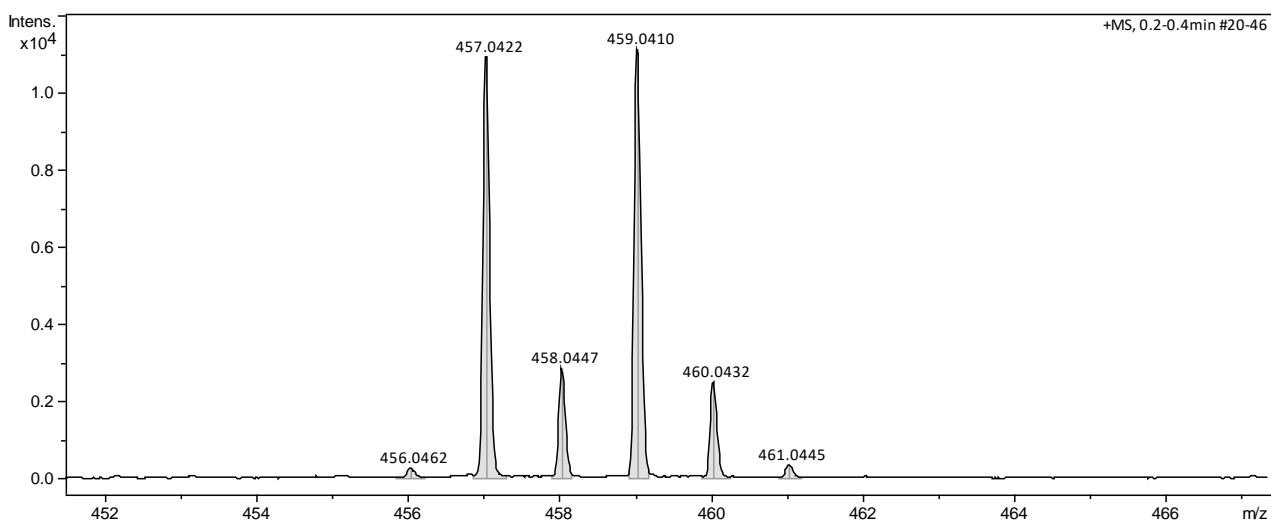
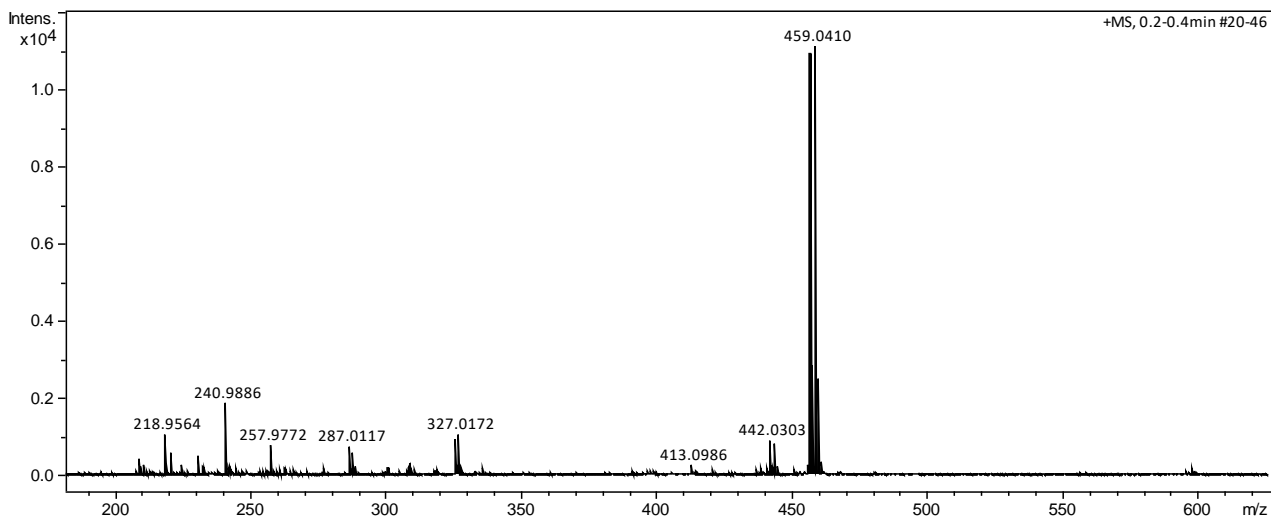
Chromatogram
Branco

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2eEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2e

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3eEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3e

Espectro de ^1H RMN do composto final 4eEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4e

Espectro de HRMS do composto final 4e

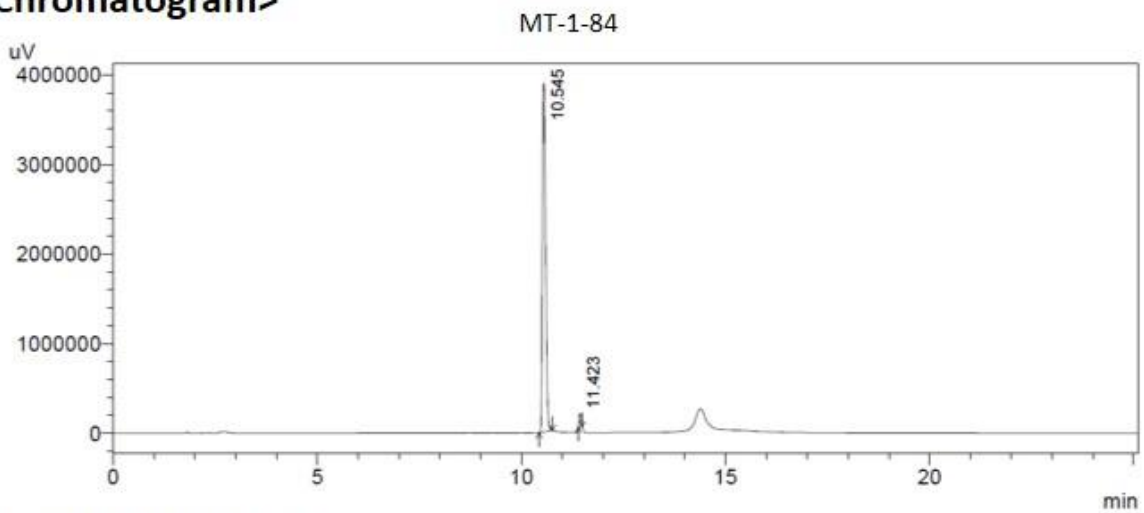


Cromatograma de CLAE do composto final 4e

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-84
 Vail # : 1
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-84.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 11/12/2018 11:46:56
 Data Processed : 14/12/2018 14:13:51

<Chromatogram>



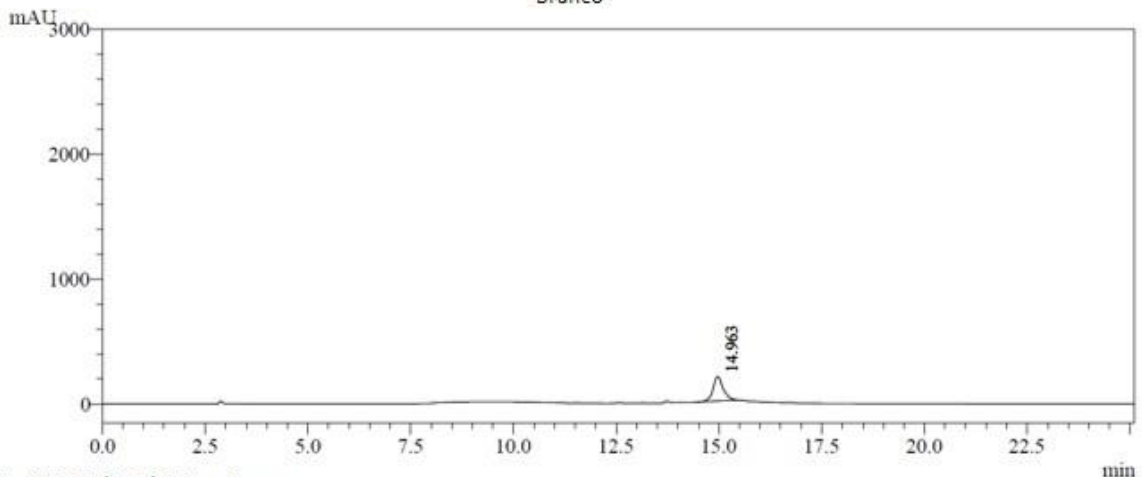
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

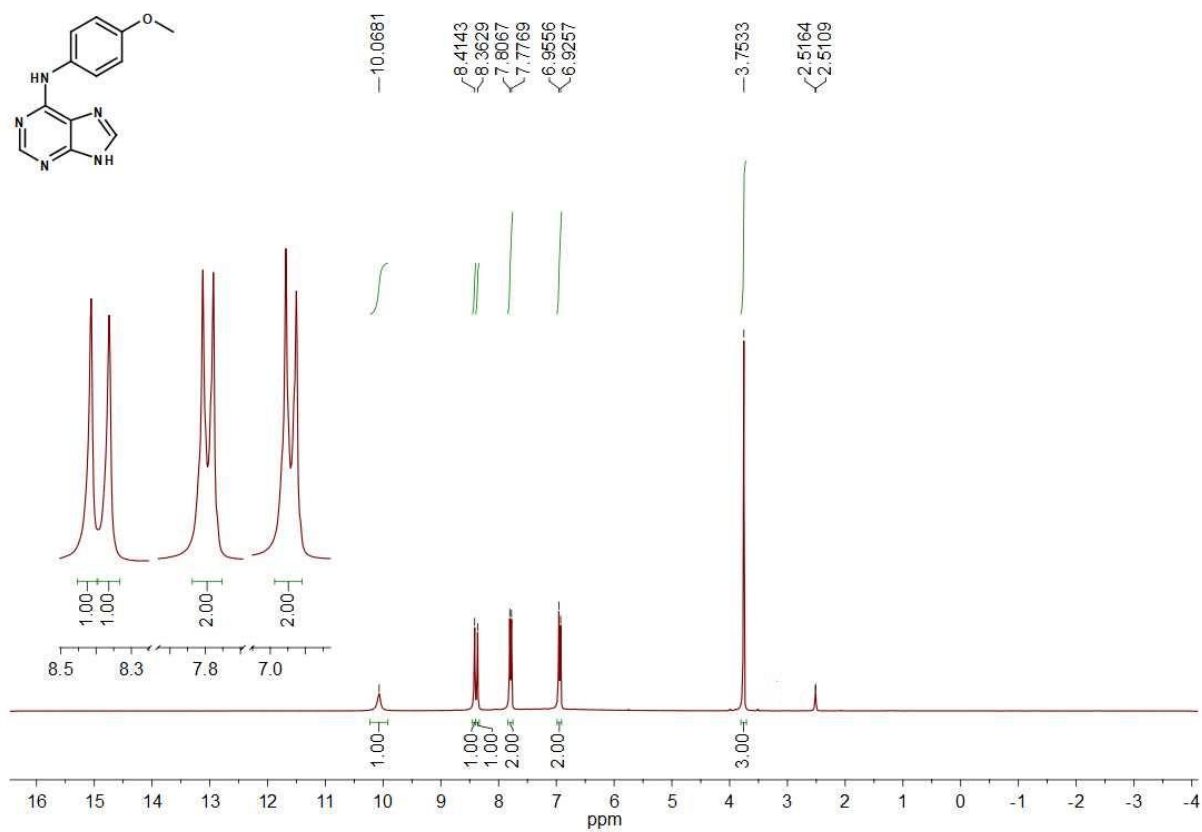
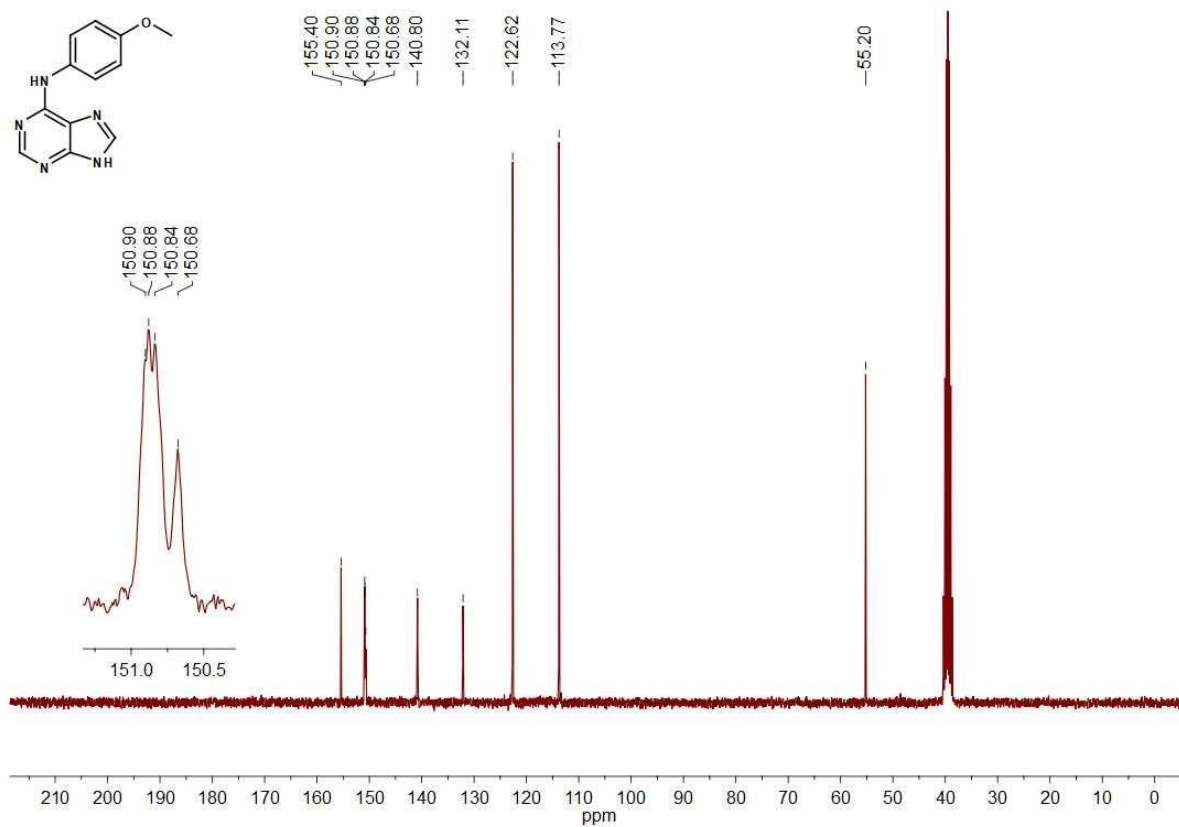
PDA Ch1 254nm 4nm

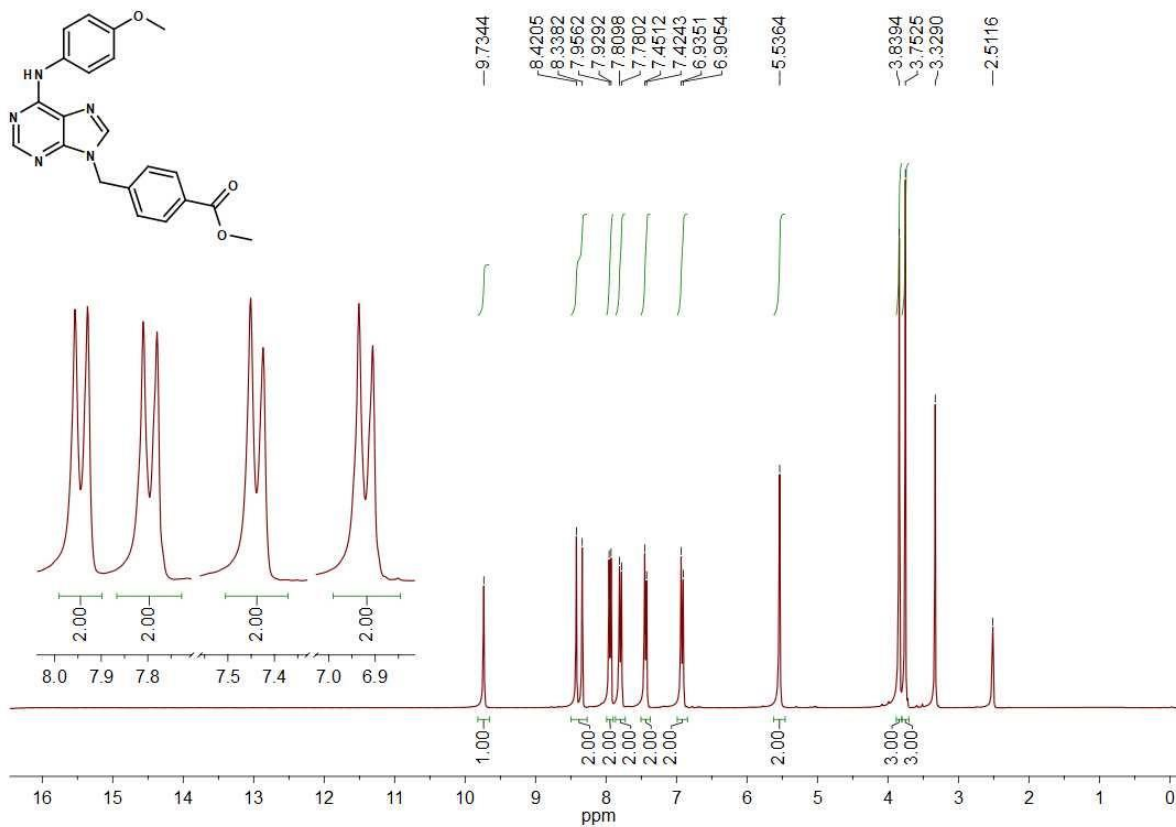
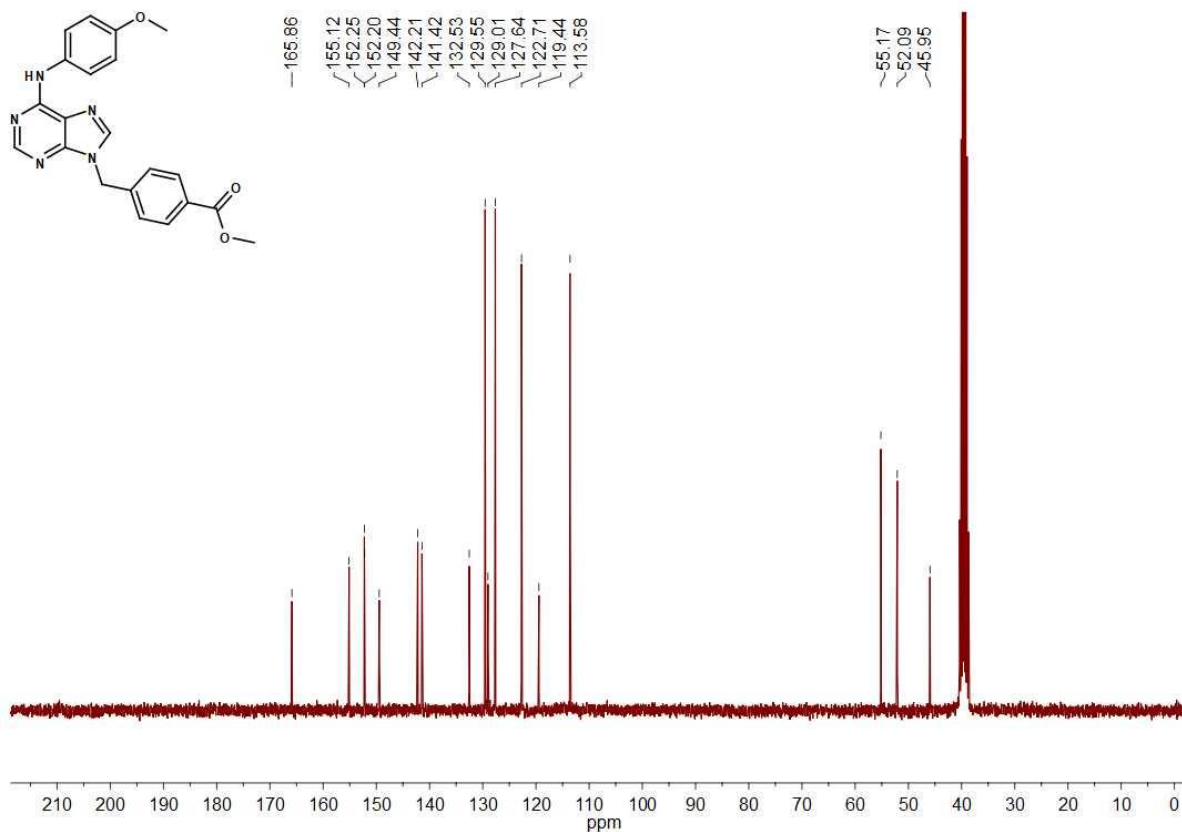
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.545	21758083	3892626	97.806	96.169
2	11.423	488162	155063	2.194	3.831
Total		22246245	4047689	100.000	100.000

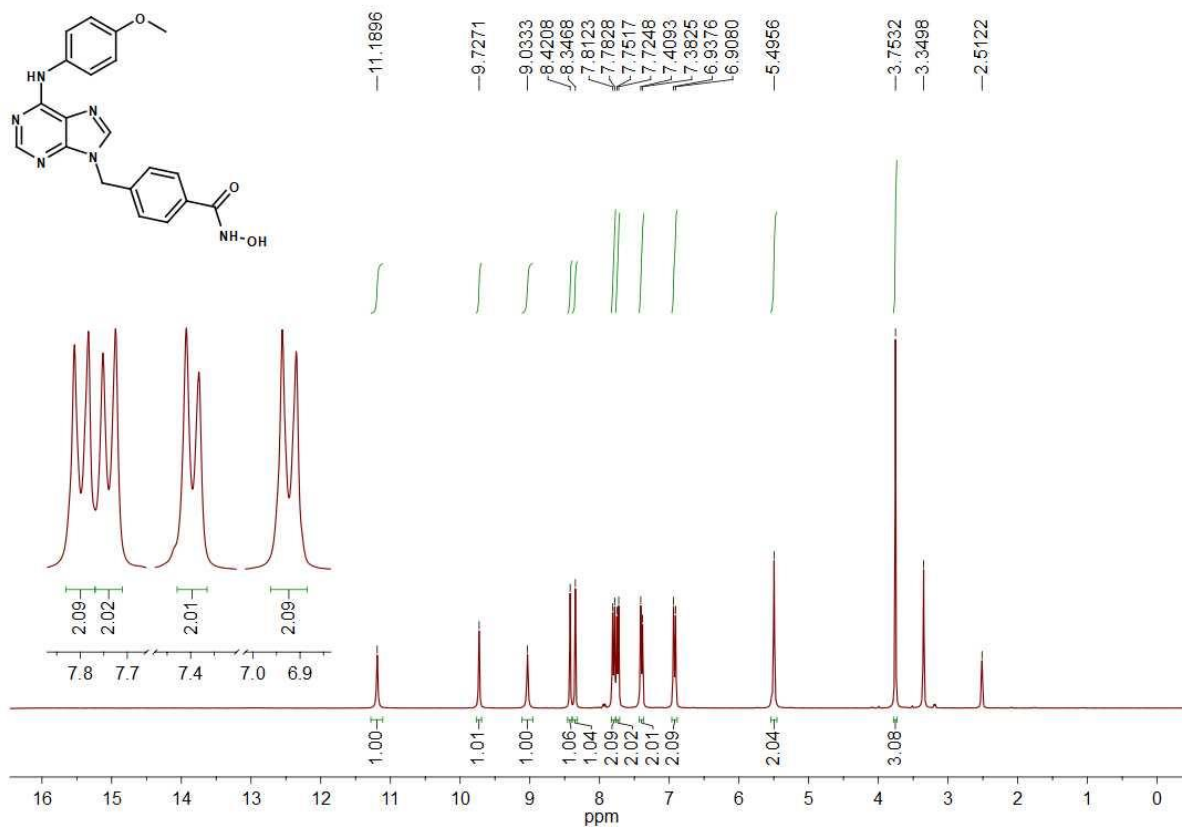
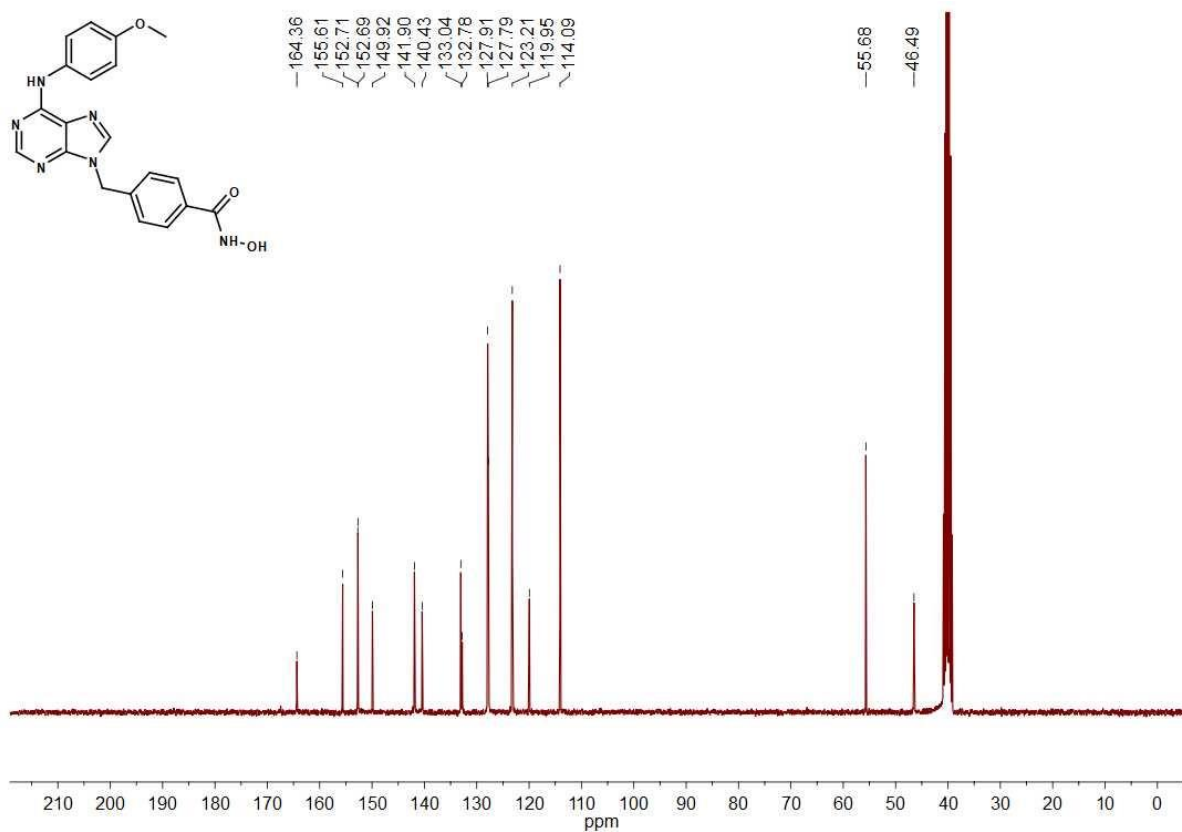
Chromatogram Branco



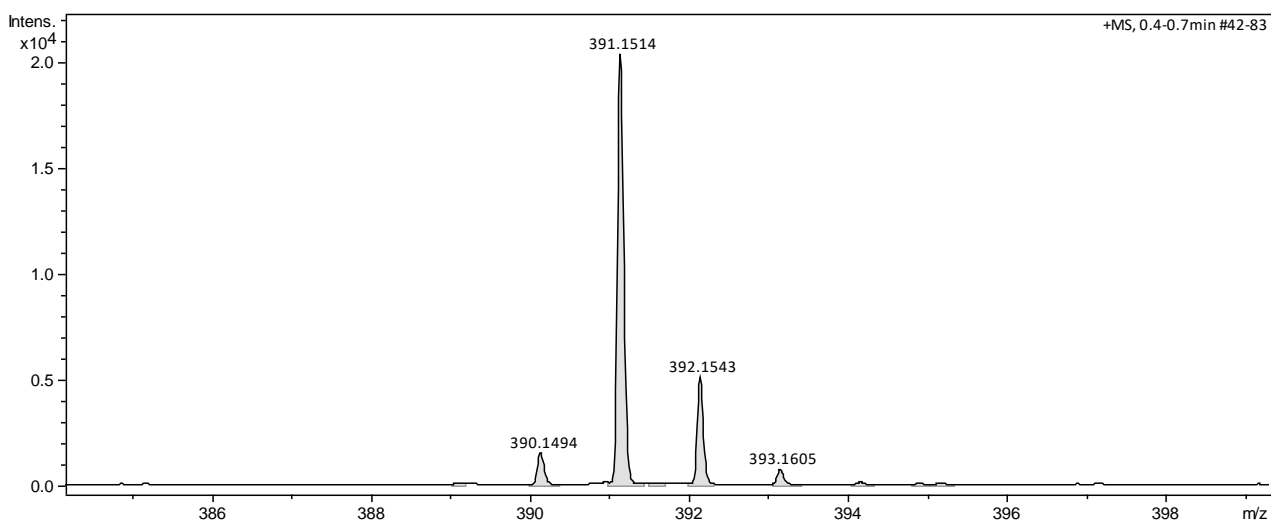
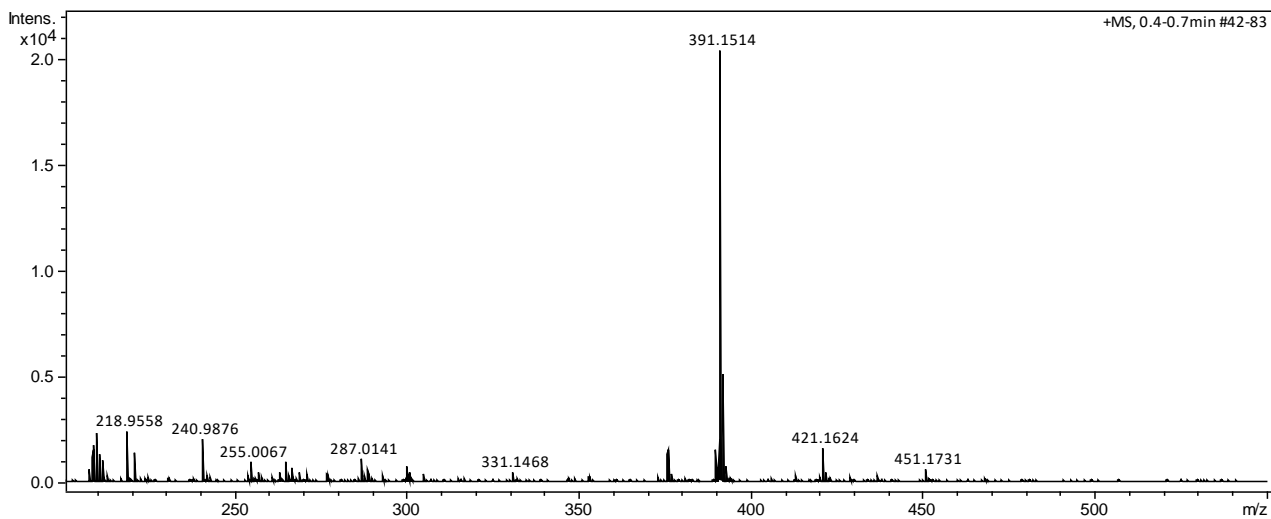
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2fEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2f

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3fEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3f

Espectro de ^1H RMN do composto final 4fEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4f

Espectro de HRMS do composto final 4f

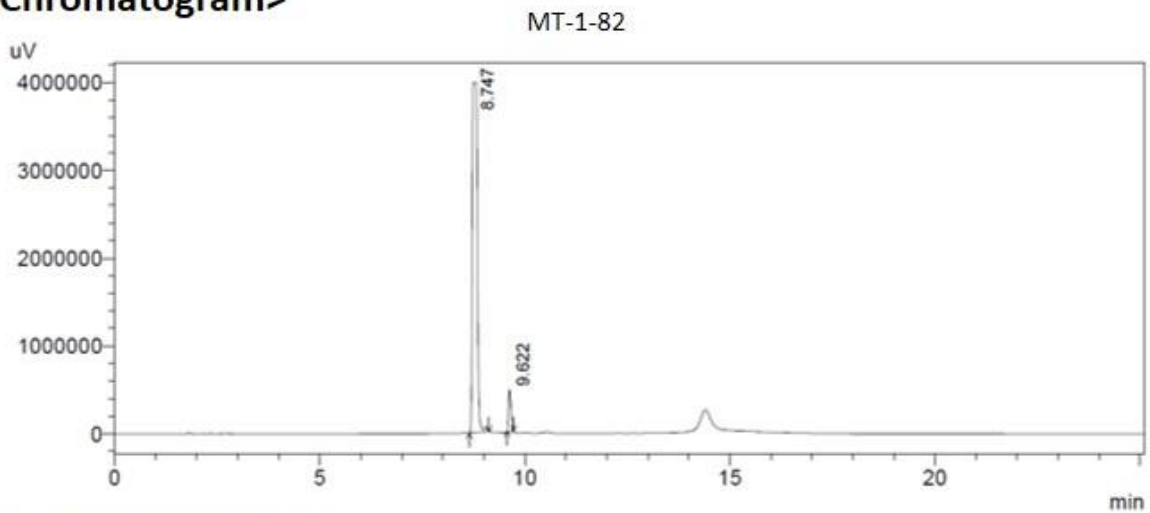


Cromatograma de CLAE do composto final 4f

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-82
 Vail # : 7
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-82.lcd
 Method File Name : acetonitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 13/12/2018 07:14:08
 Data Processed : 14/12/2018 16:00:37

<Chromatogram>



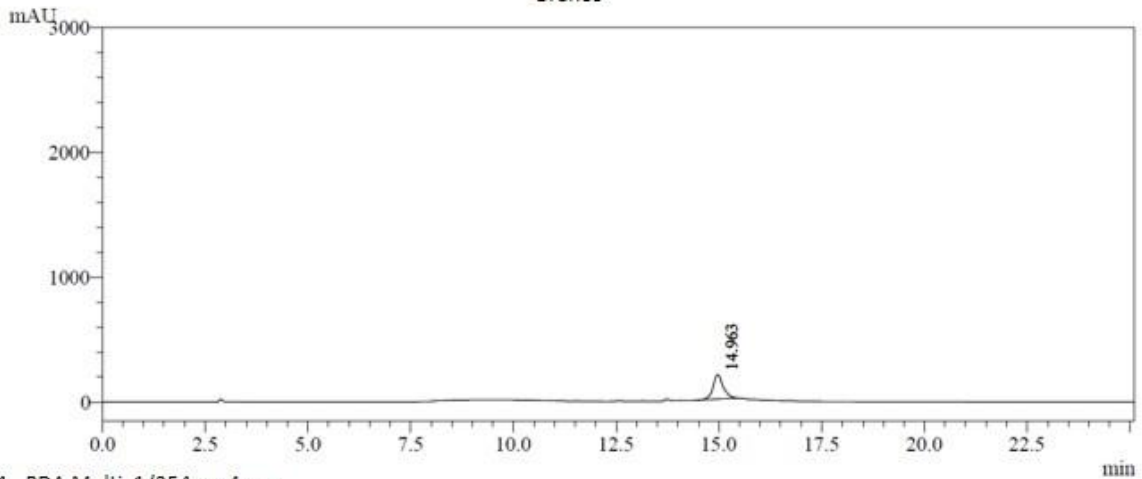
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

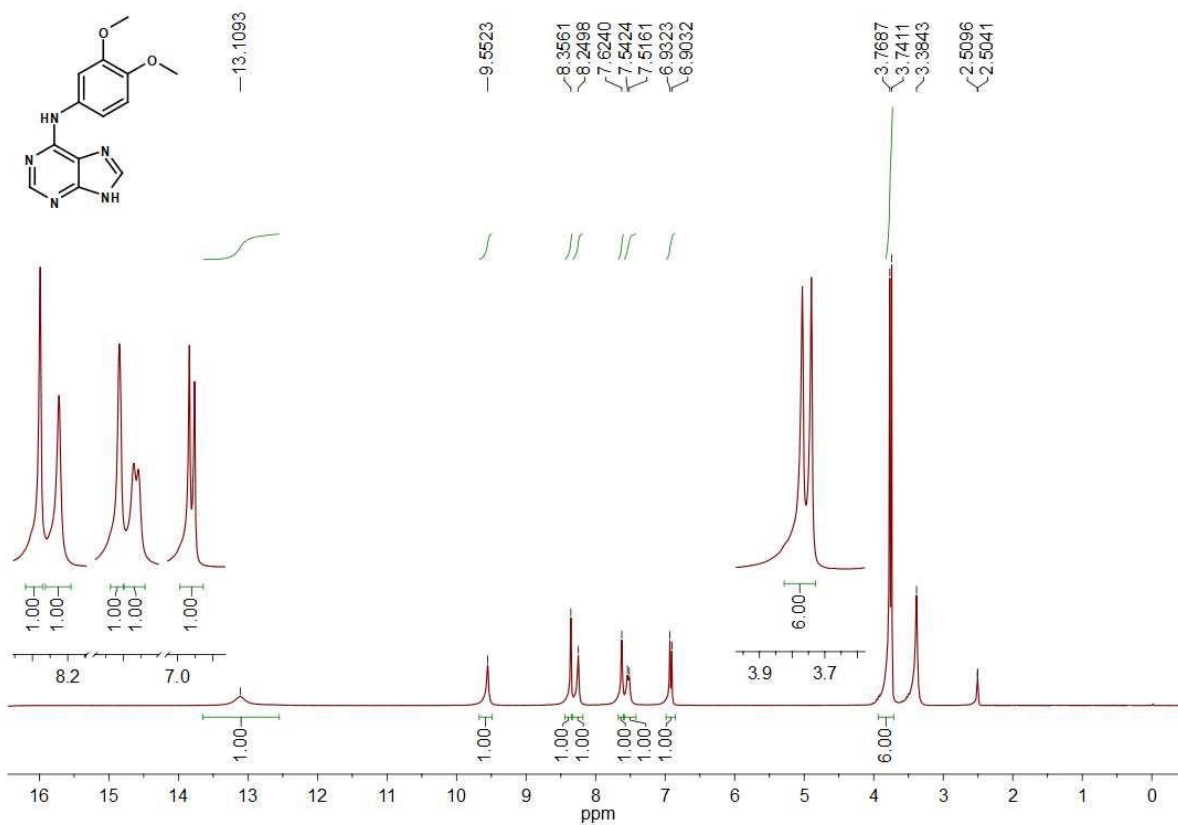
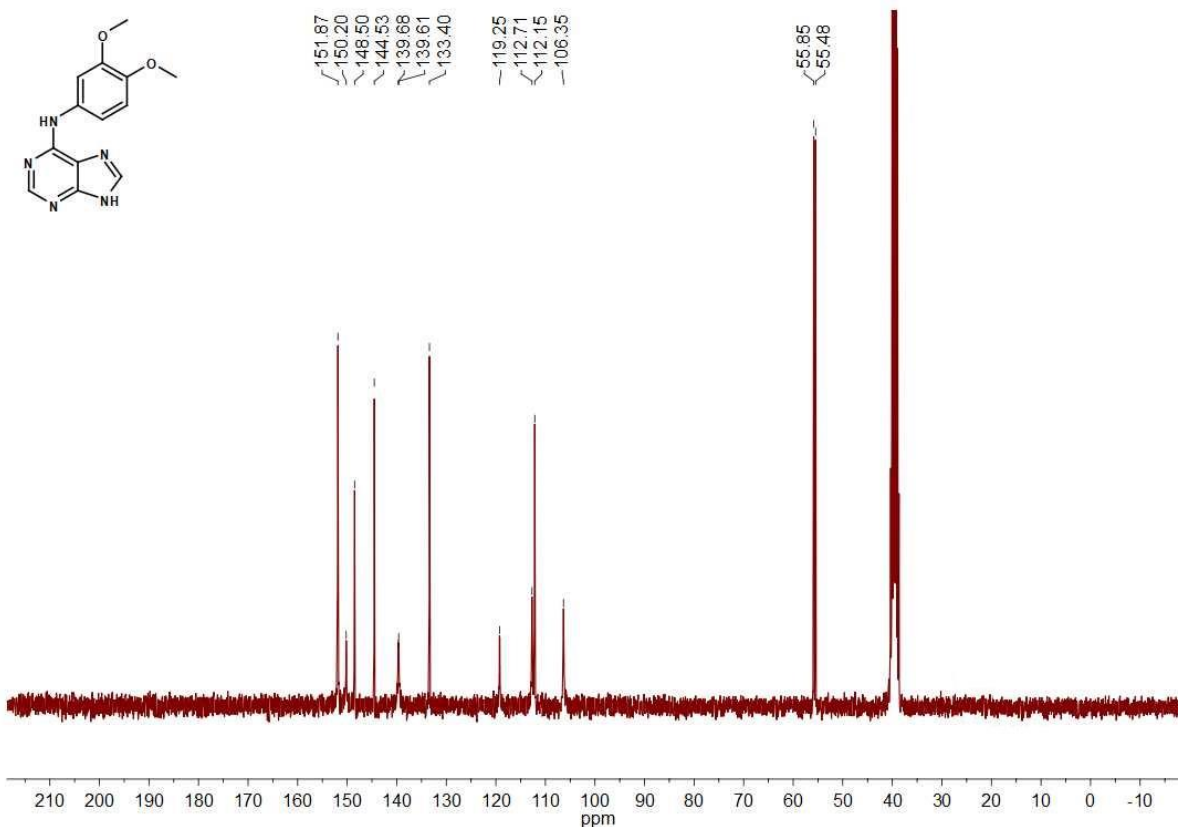
PDA Ch1 254nm 4nm

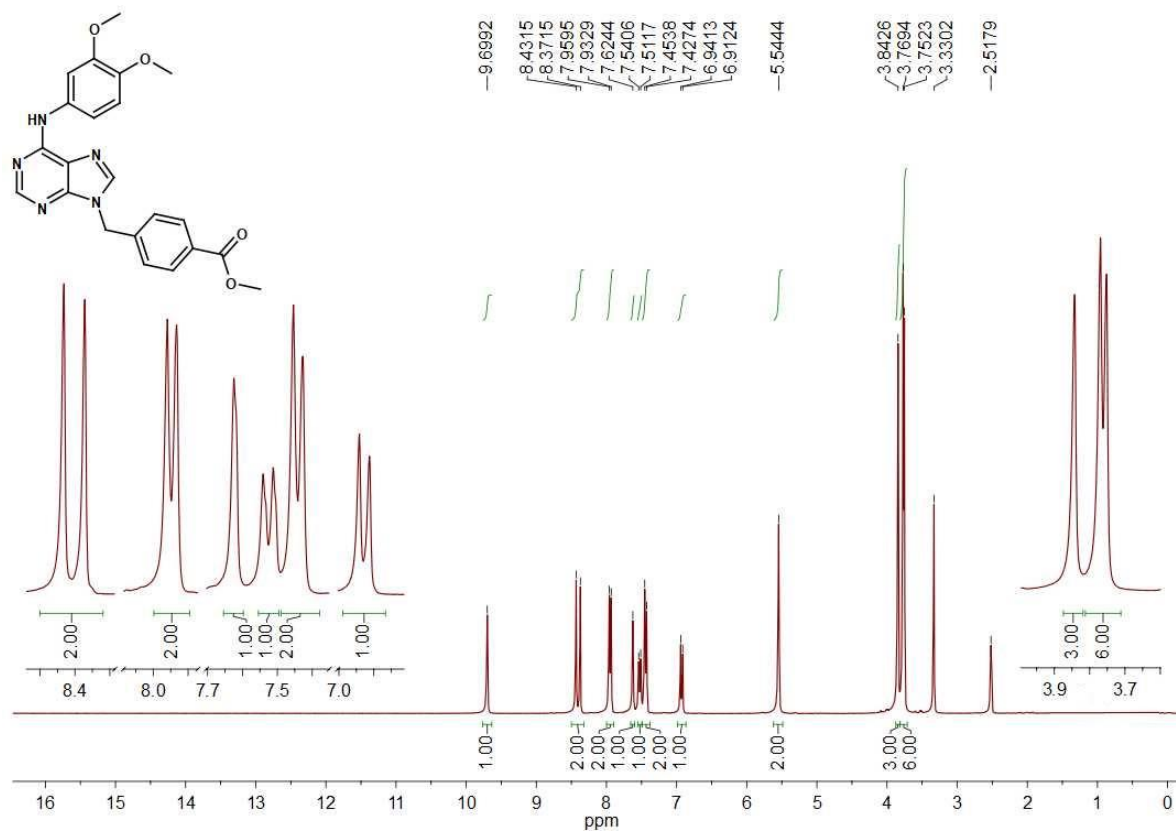
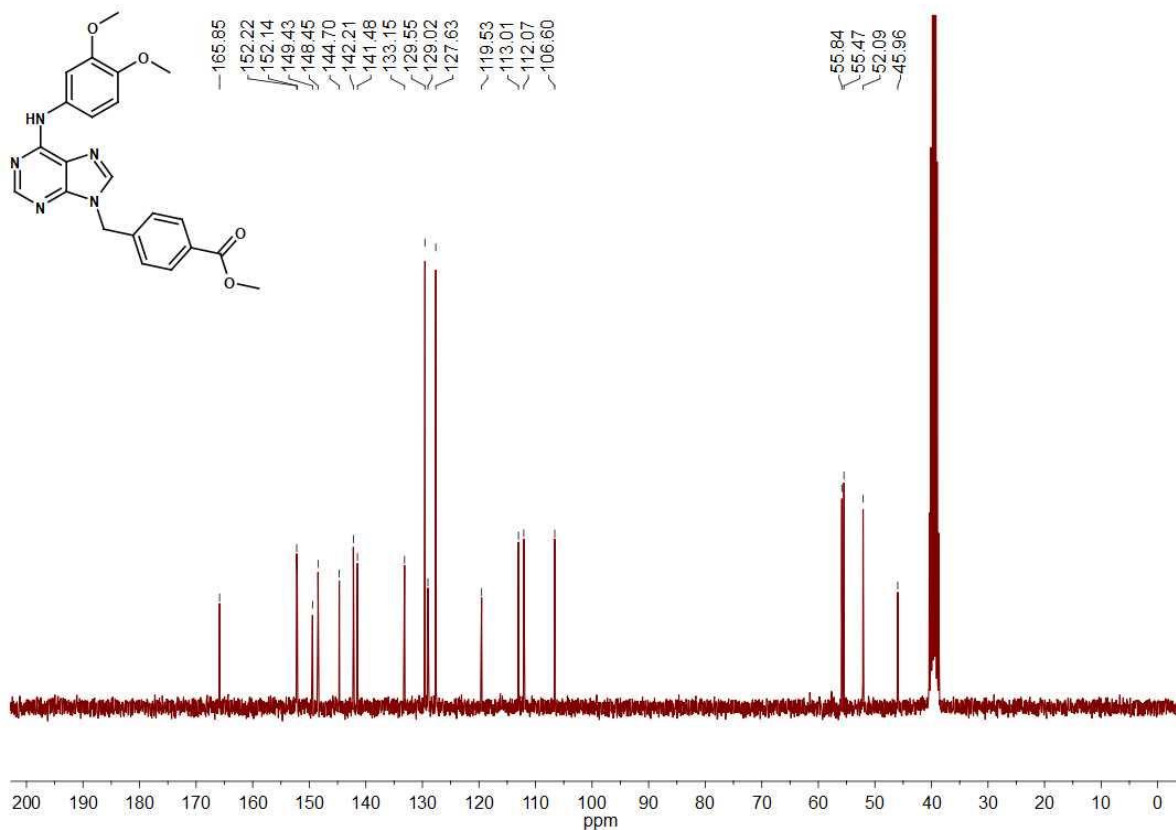
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.747	32999114	3988106	95.174	89.471
2	9.622	2041555	469314	4.826	10.529
Total		35040669	4457419	100.000	100.000

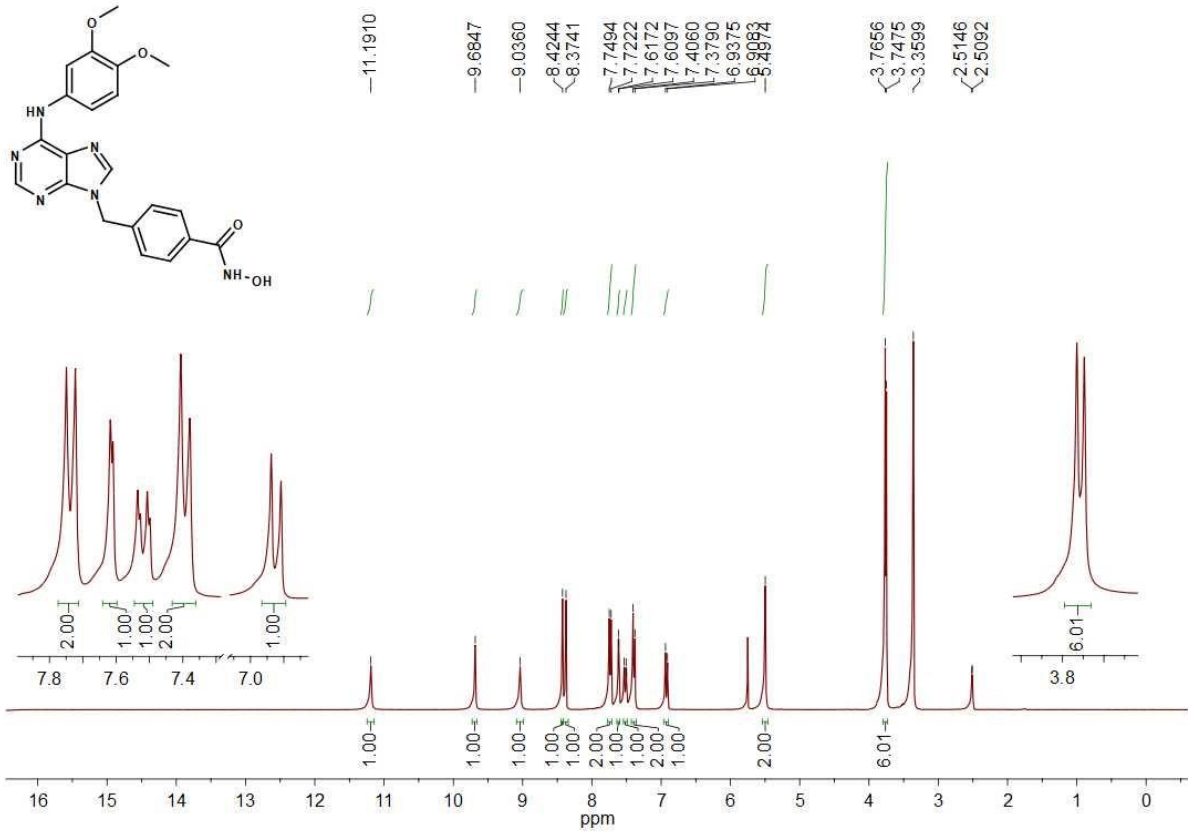
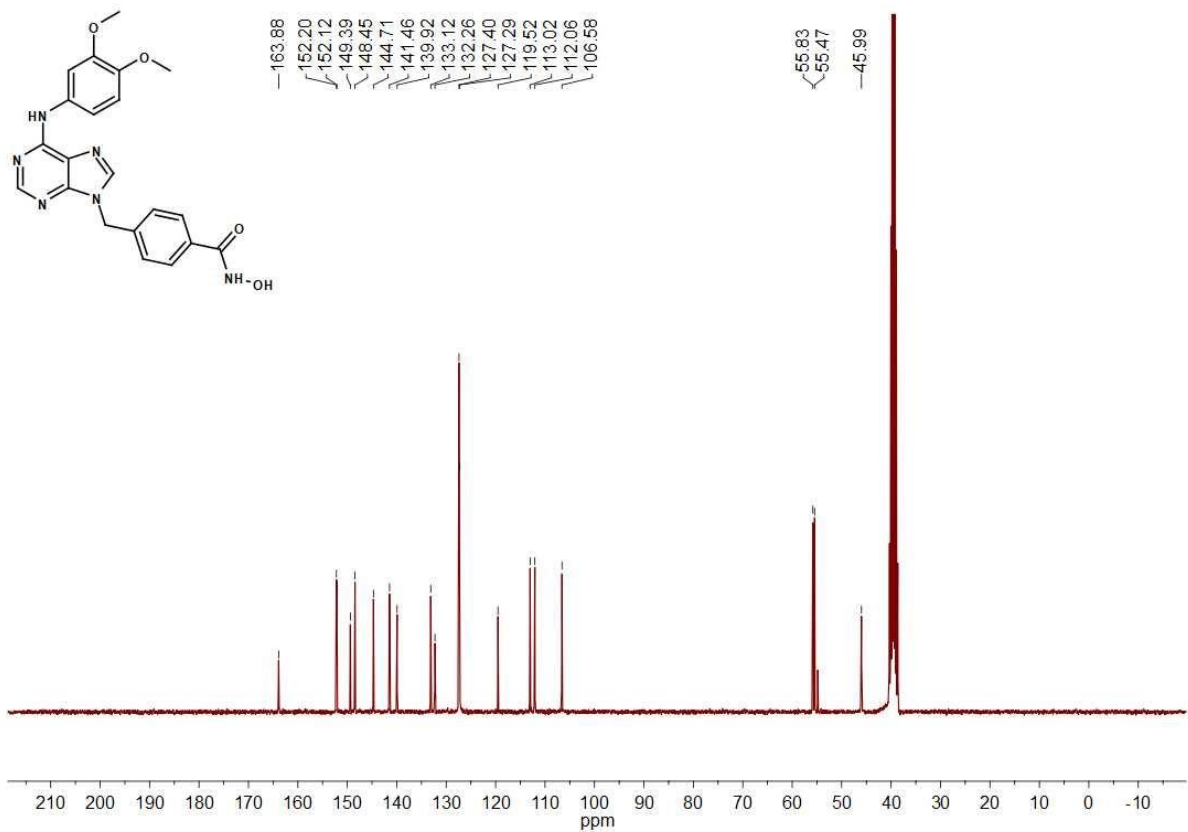
Chromatogram Branco



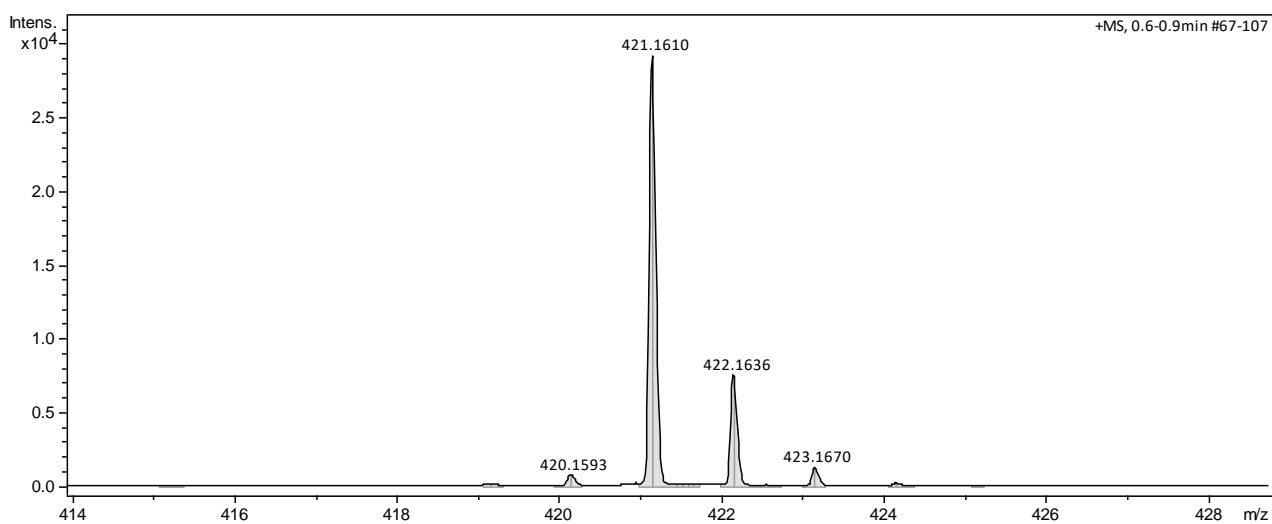
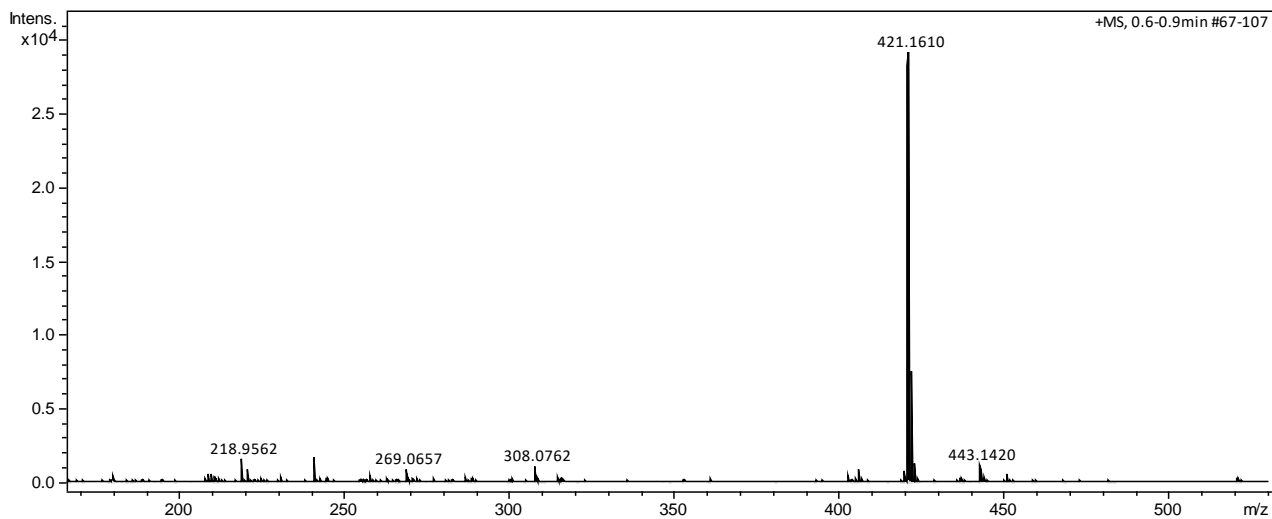
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2gEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2g

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3gEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3g

Espectro de ^1H RMN do composto final 4gEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4g

Espectro de HRMS do composto final 4g

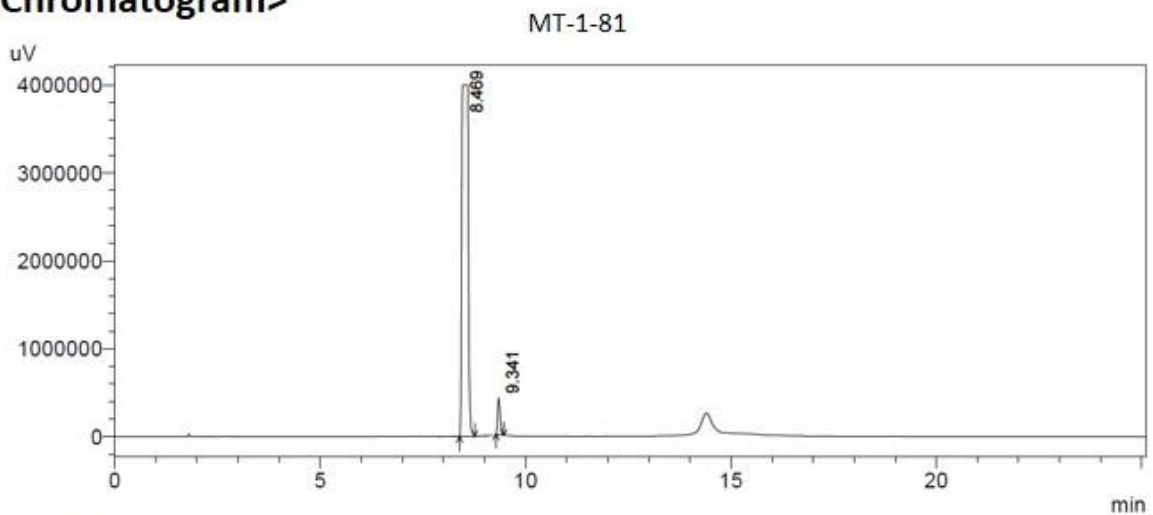


Cromatograma de CLAE do composto final 4g

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-81
 Vail # : 6
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-81.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 13/12/2018 06:48:37
 Data Processed : 14/12/2018 15:32:10

<Chromatogram>



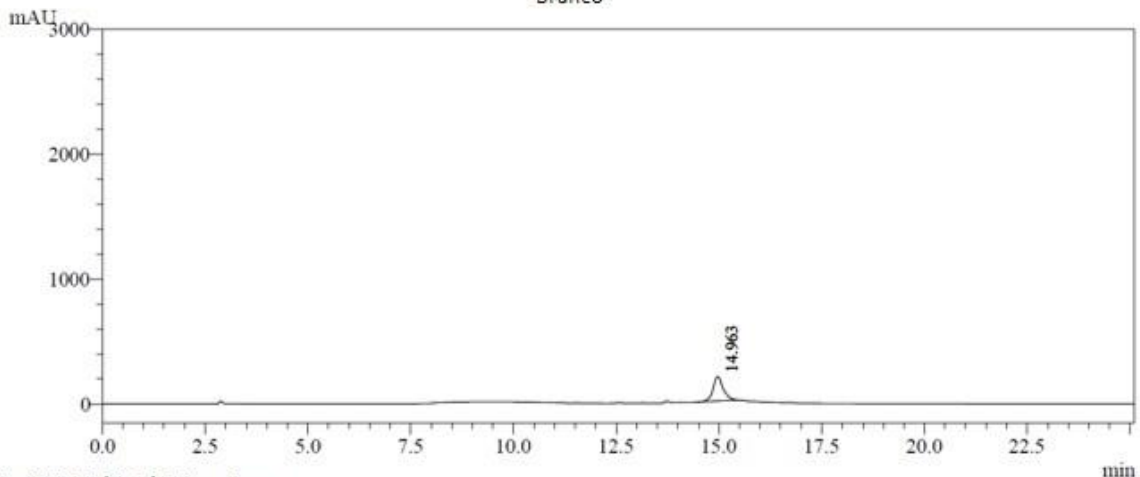
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

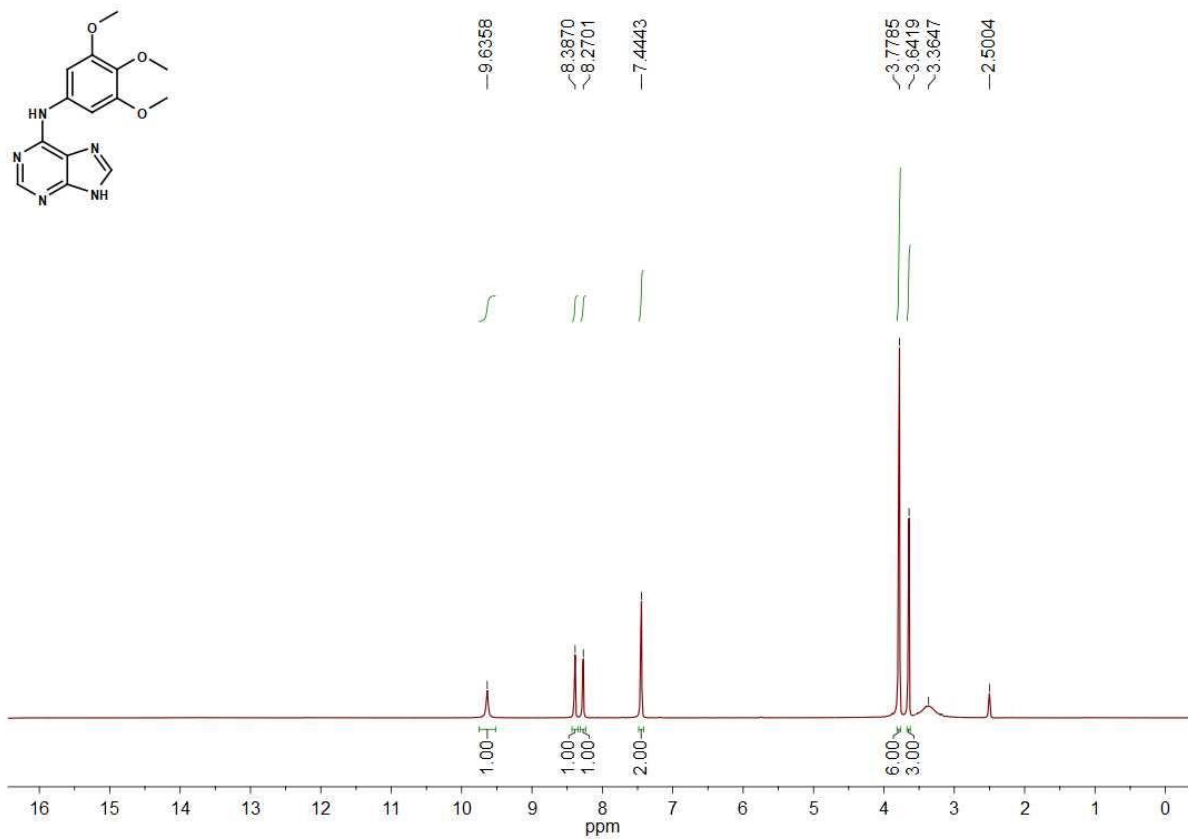
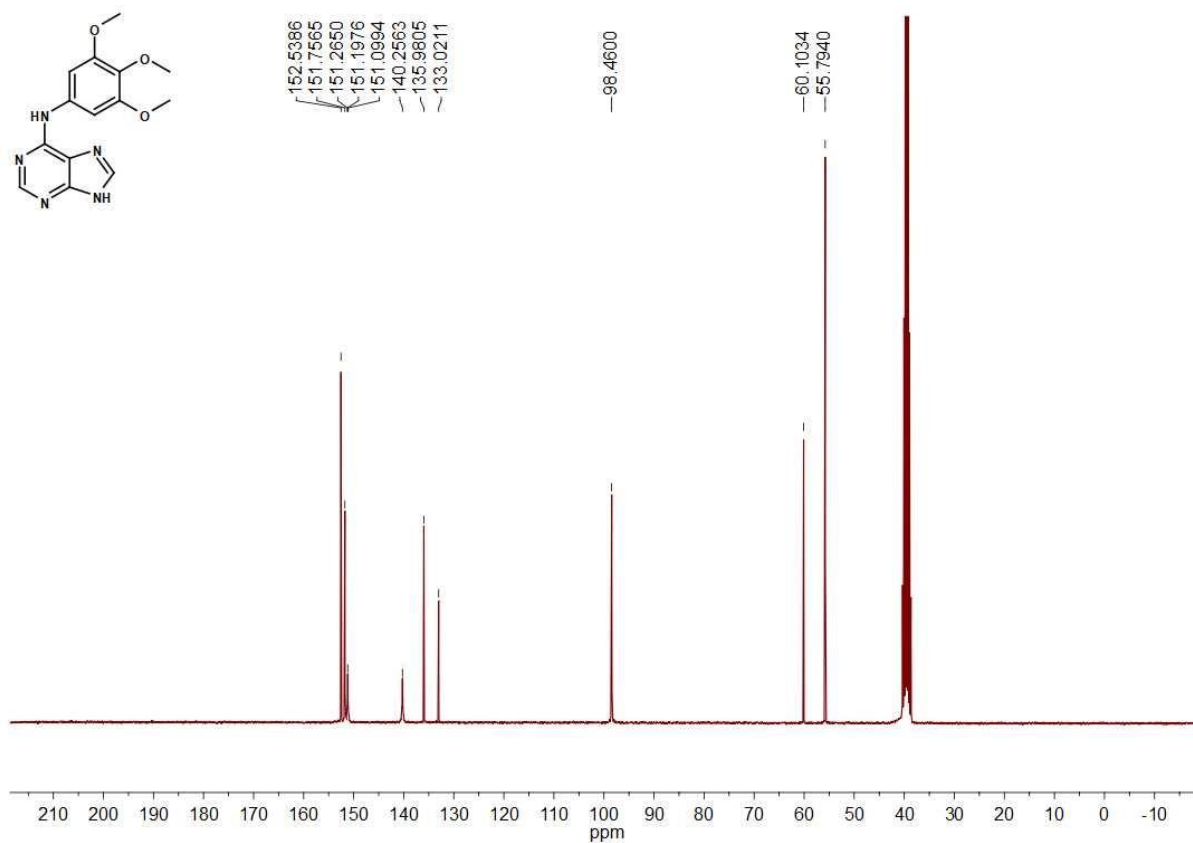
PDA Ch1 254nm 4nm

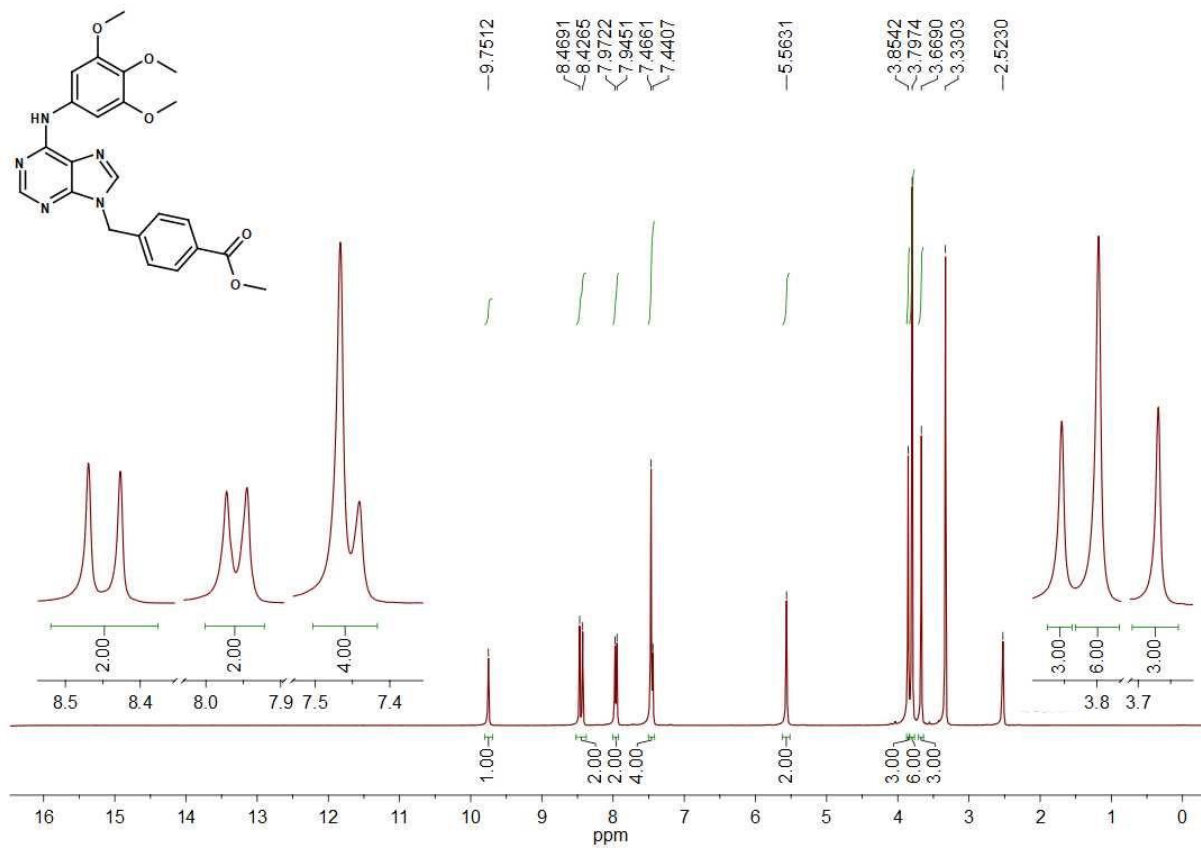
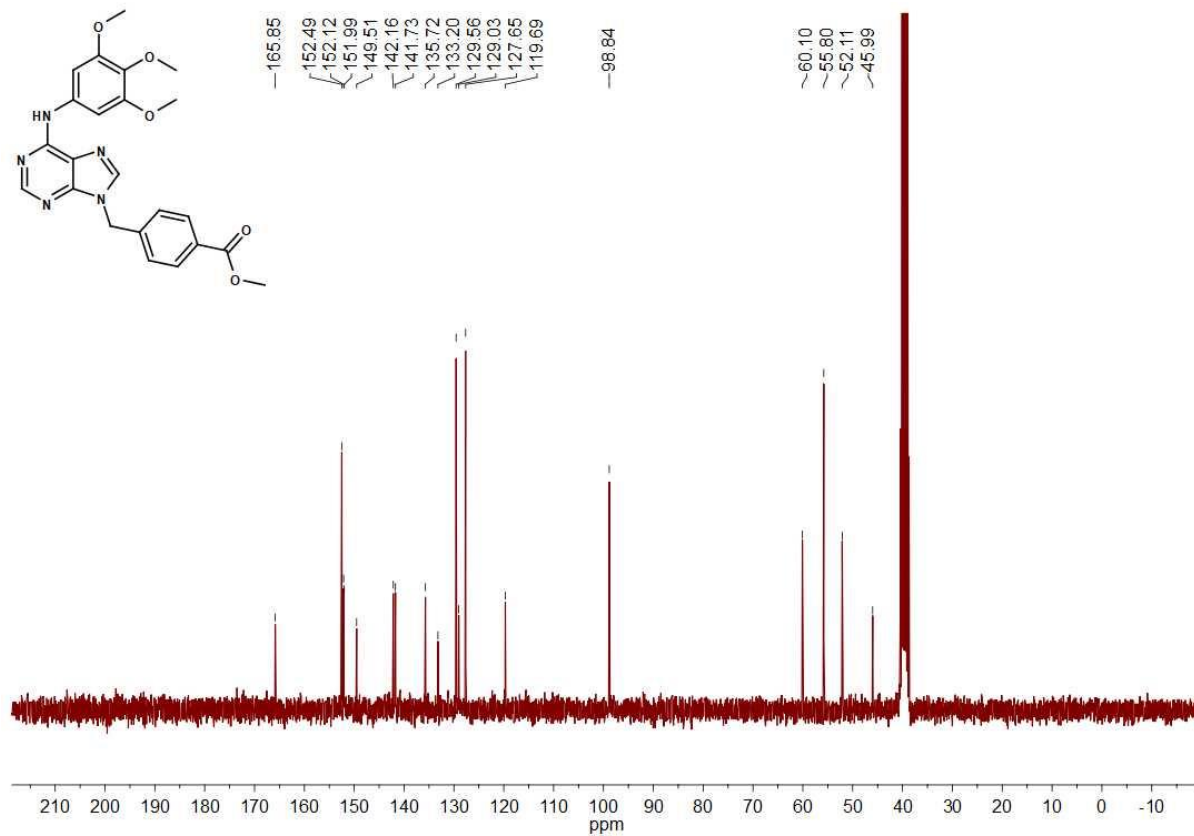
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.469	42925969	3965936	95.827	90.478
2	9.341	1869160	417357	4.173	9.522
Total		44795129	4383294	100.000	100.000

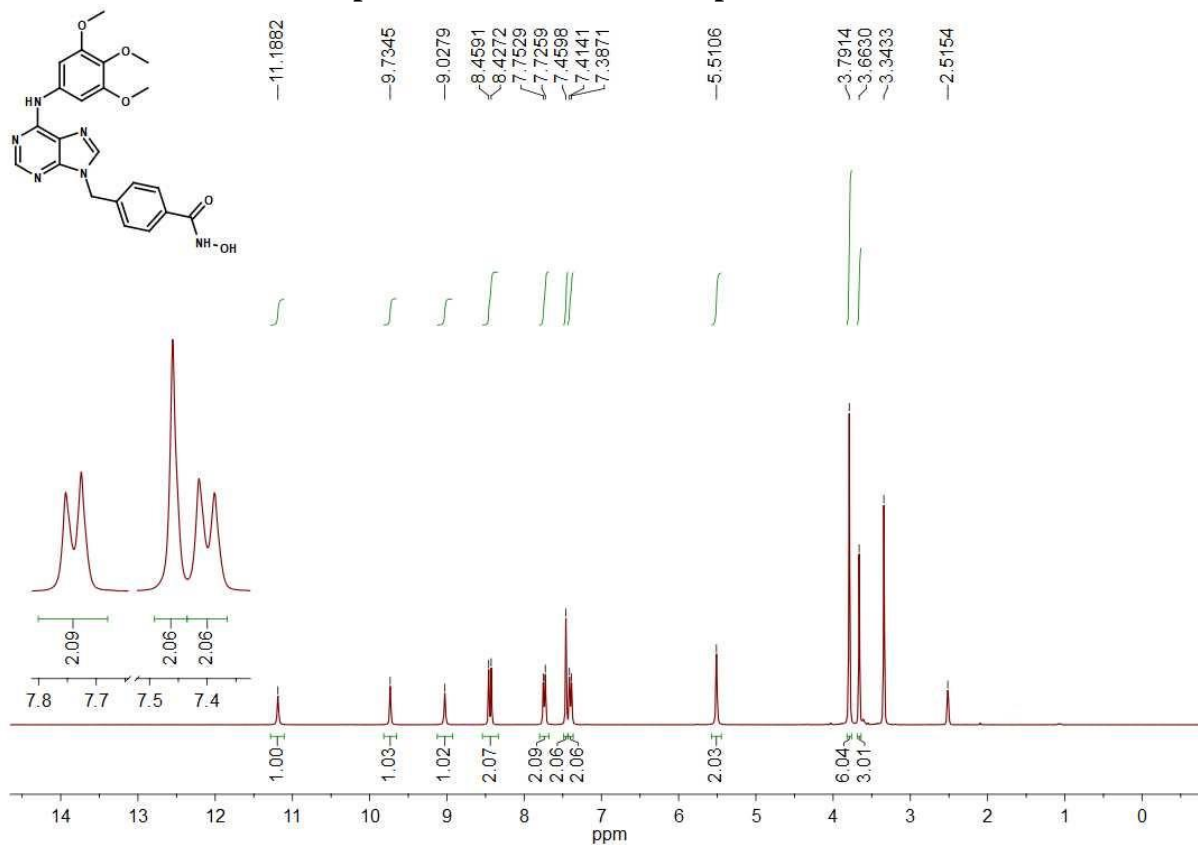
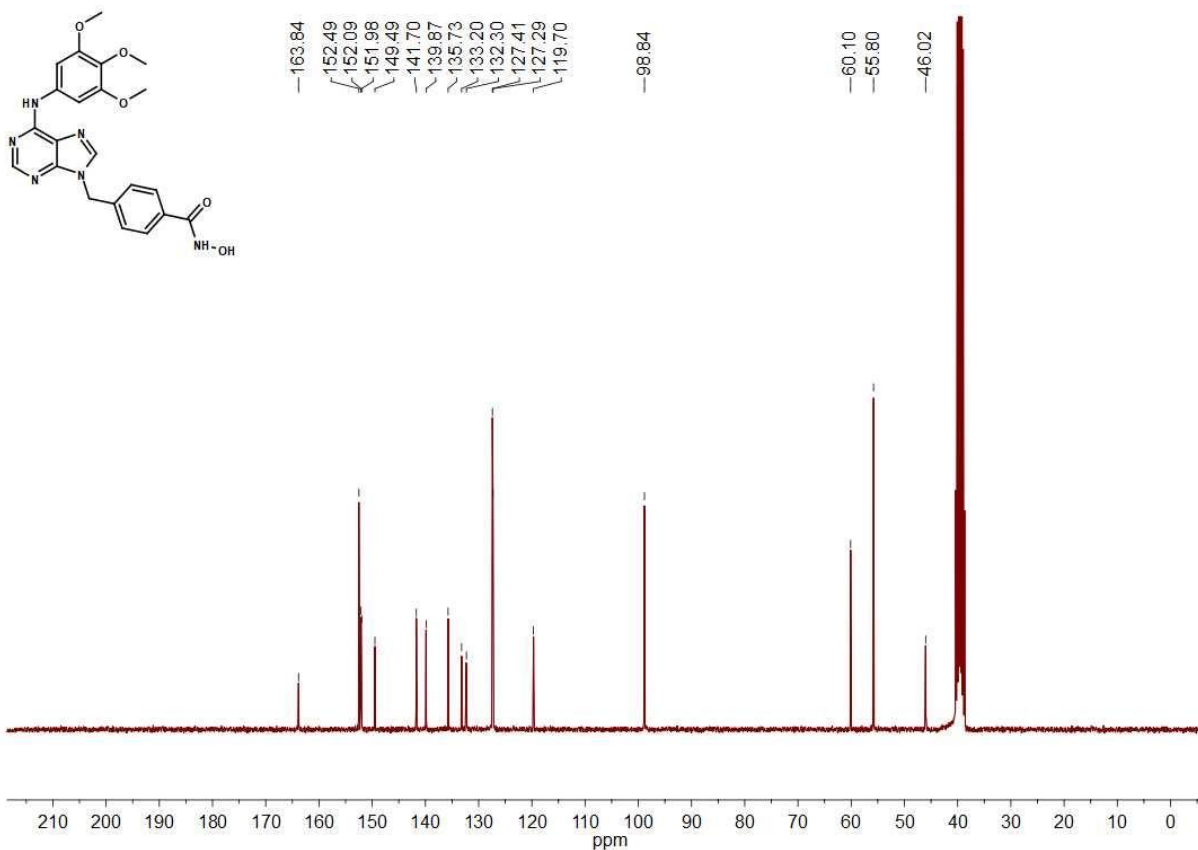
Chromatogram Branco



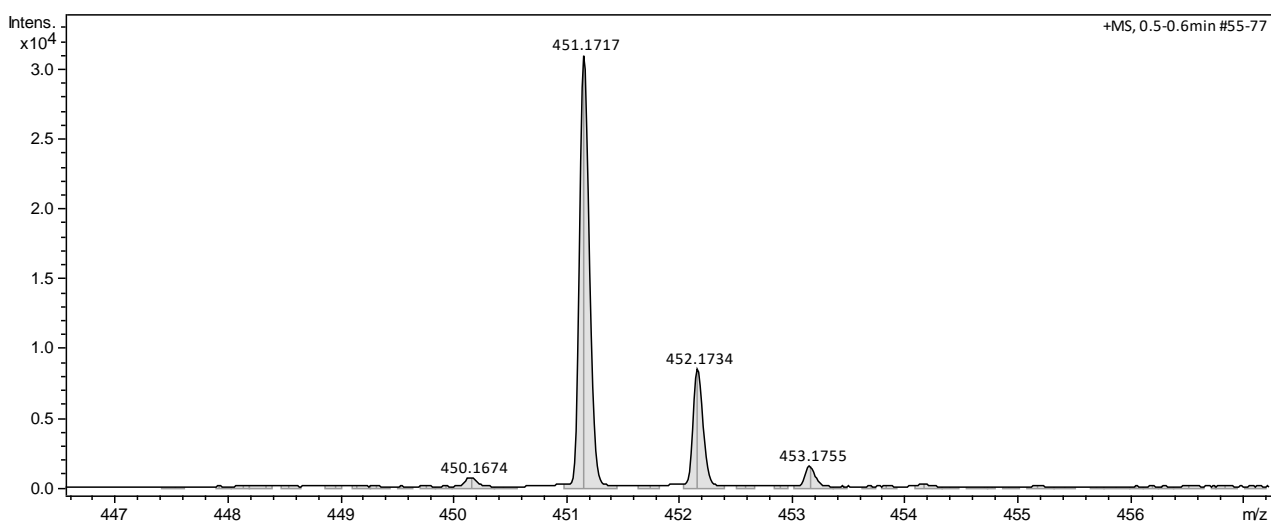
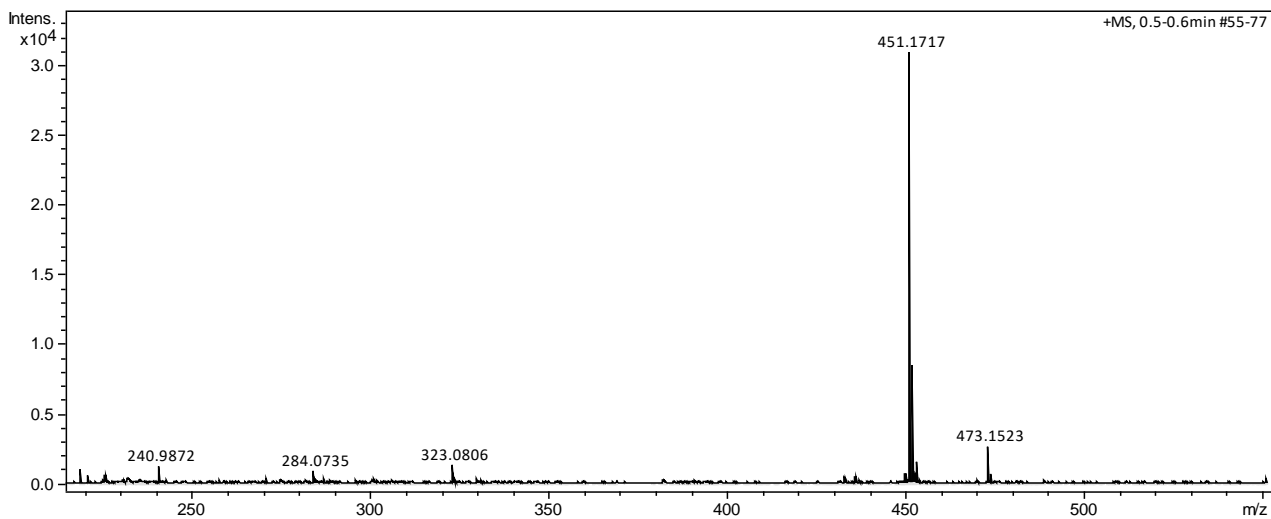
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2hEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2h

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3hEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3h

Espectro de ^1H RMN do composto final 4hEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4h

Espectro de HRMS do composto final 4h

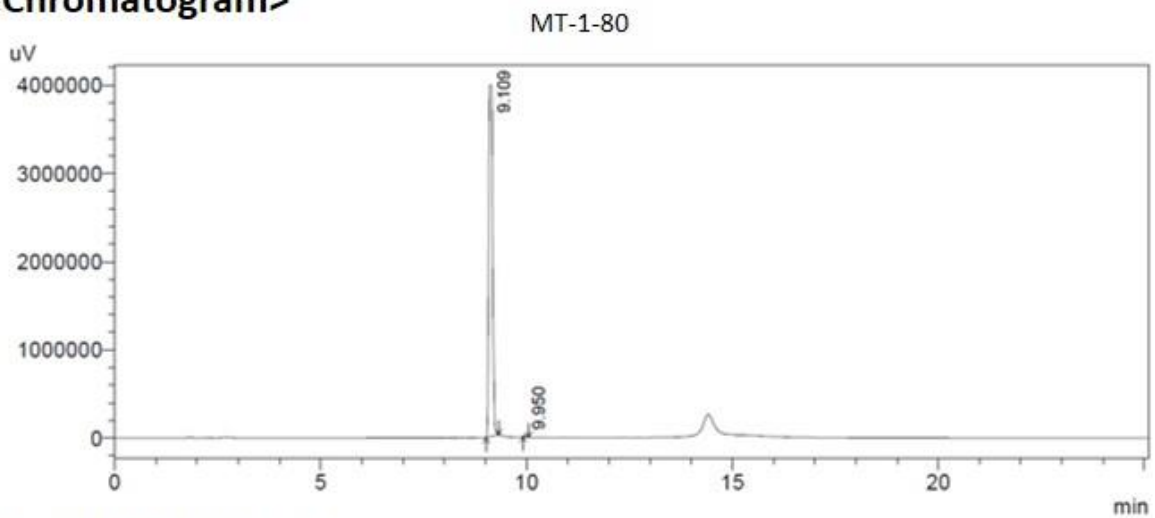


Cromatograma de CLAE do composto final 4h

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-80
 Vail # : 5
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-80.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 13/12/2018 08:20:13
 Data Processed : 15/12/2018 12:07:58

<Chromatogram>



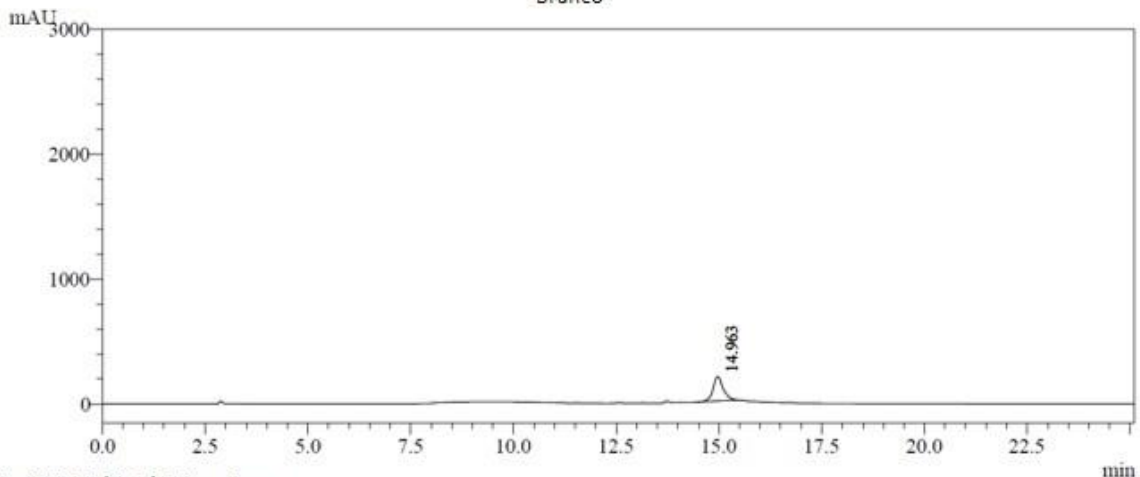
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

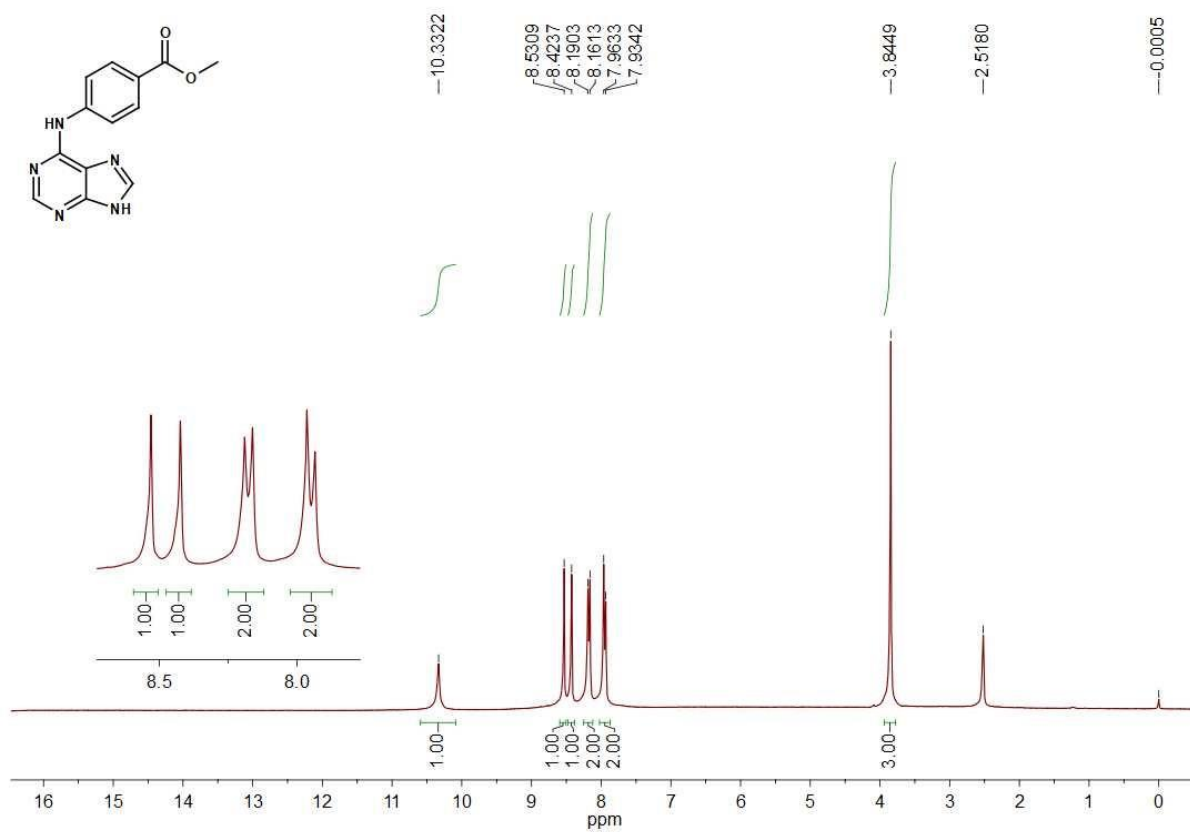
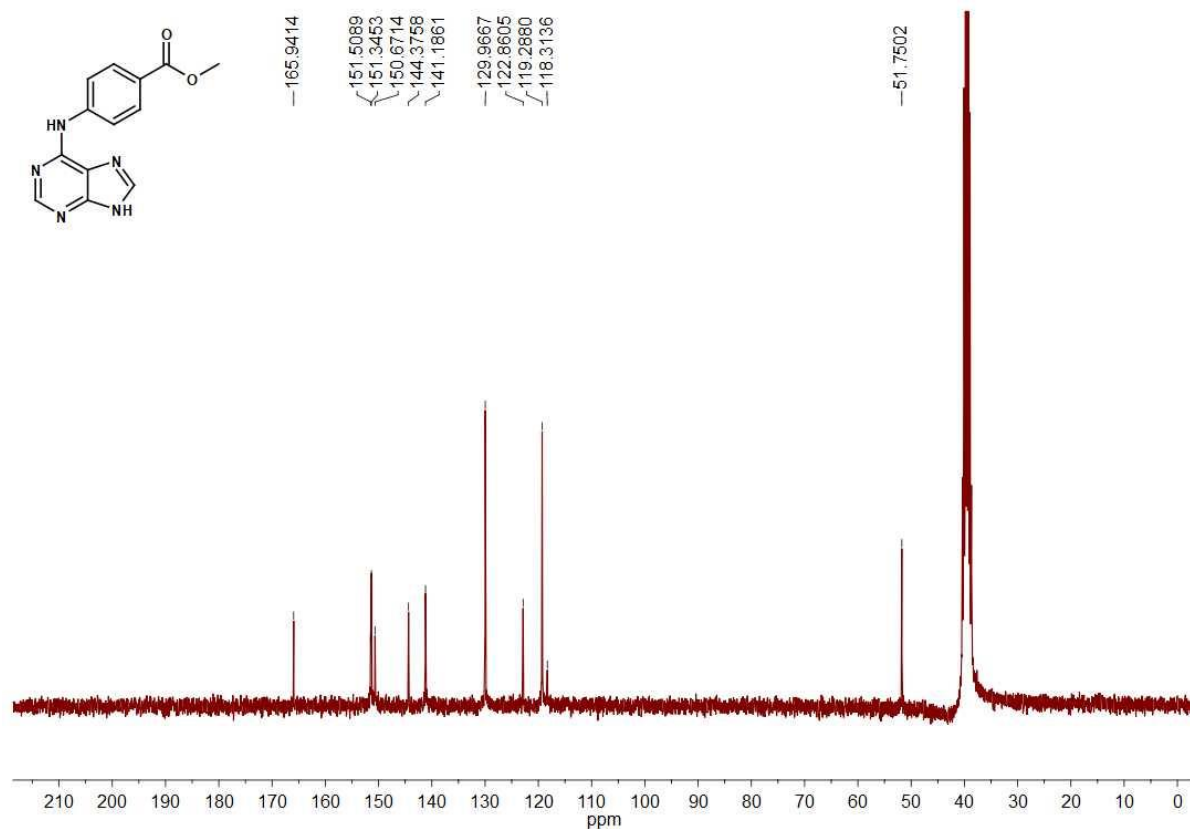
PDA Ch1 254nm 4nm

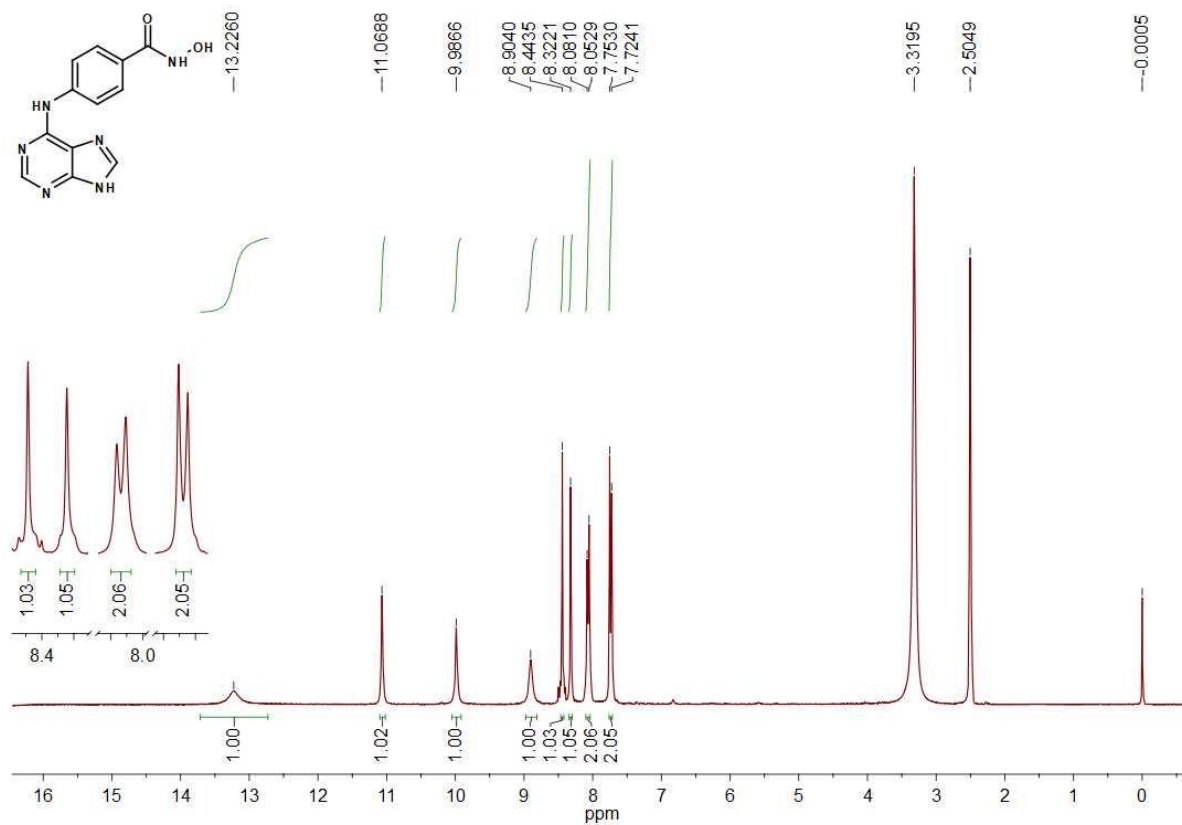
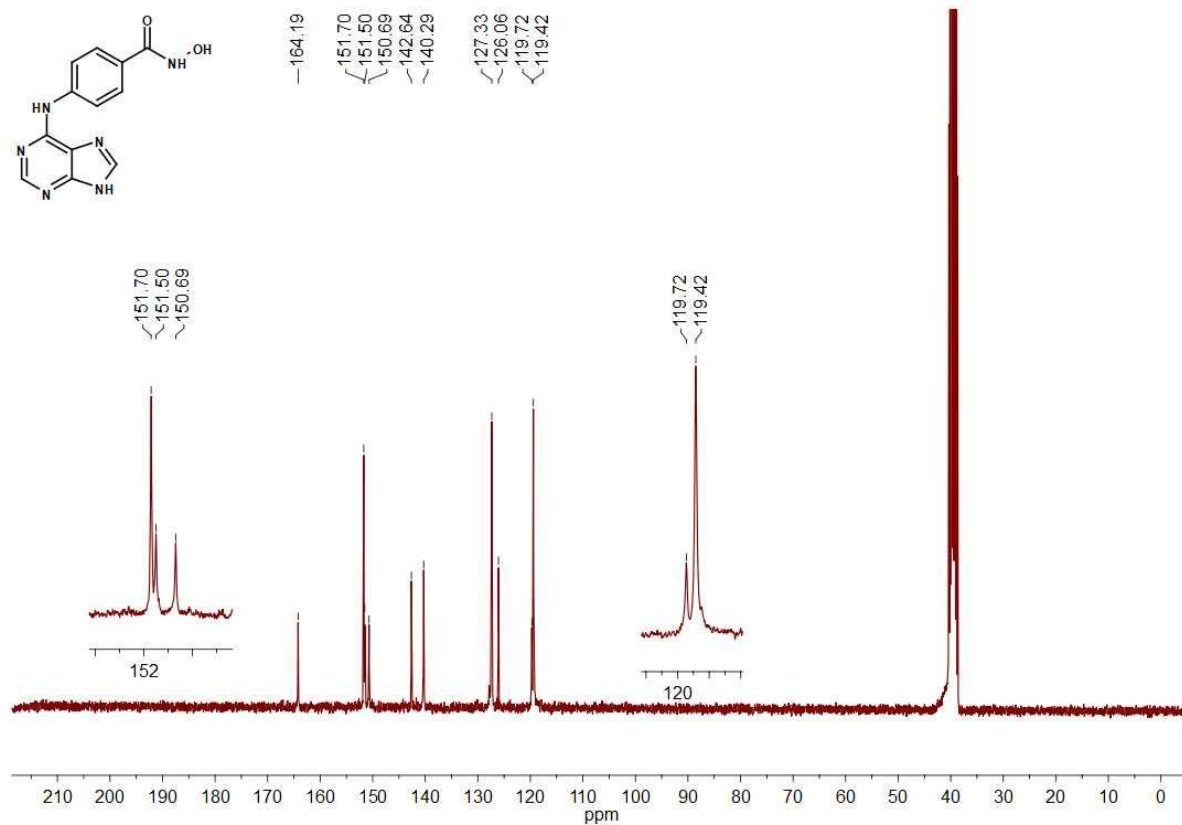
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.109	26677470	3982897	99.695	99.451
2	9.950	81679	21986	0.305	0.549
Total		26759149	4004883	100.000	100.000

Chromatogram Branco

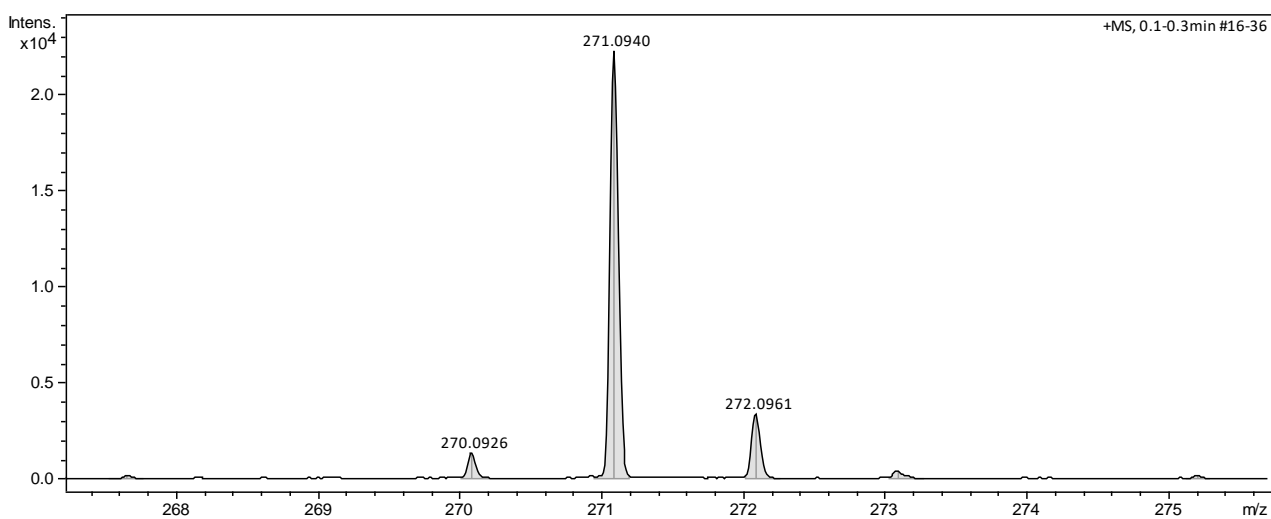
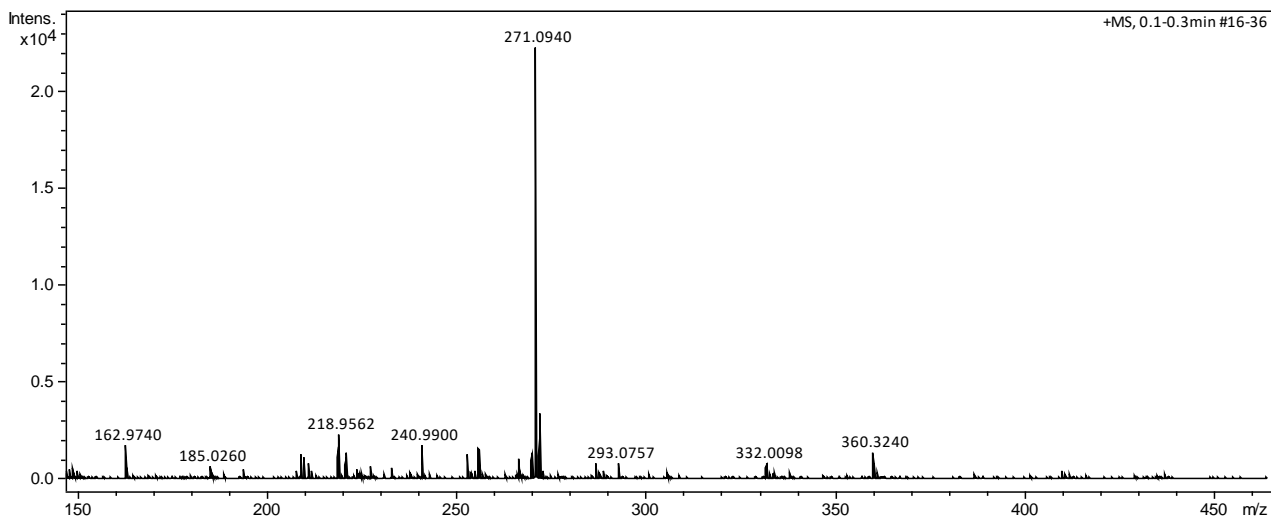


1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 2iEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 2i

Espectro de ^1H RMN do composto final 4iEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4i

Espectro de HRMS do composto final 4i

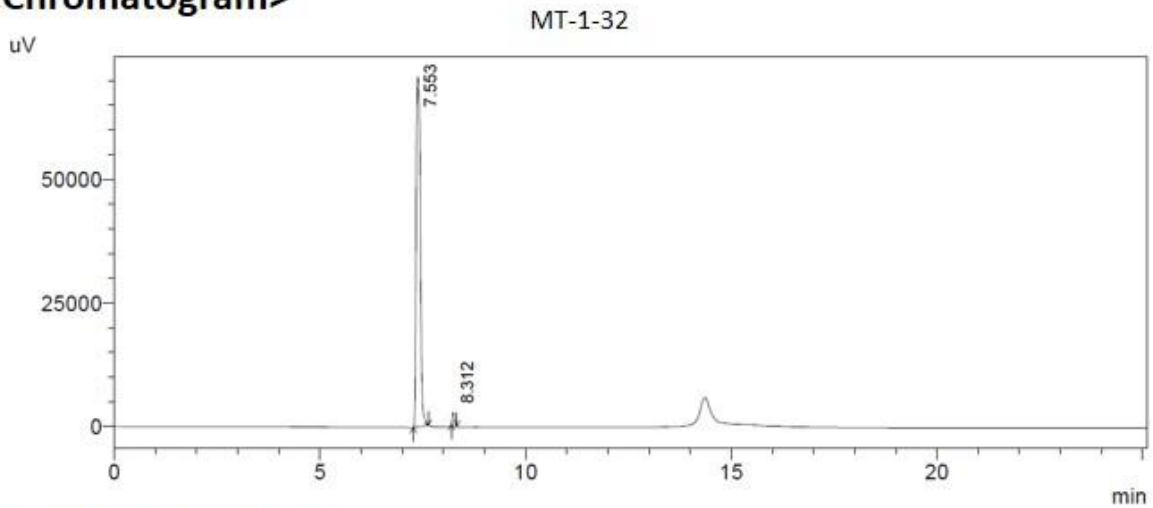


Cromatograma de CLAE do composto final 4i

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-32
Vial # : 22
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : MT-1-32.lcd
Method File Name : acetonitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 27/6/2018 03:58:34
Data Processed : 28/6/2018 09:57:11

<Chromatogram>



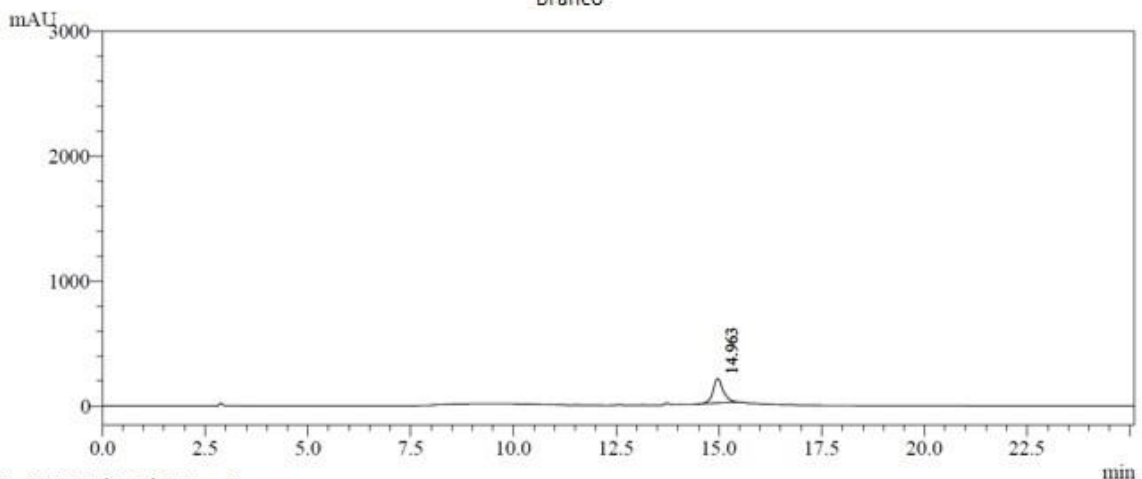
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

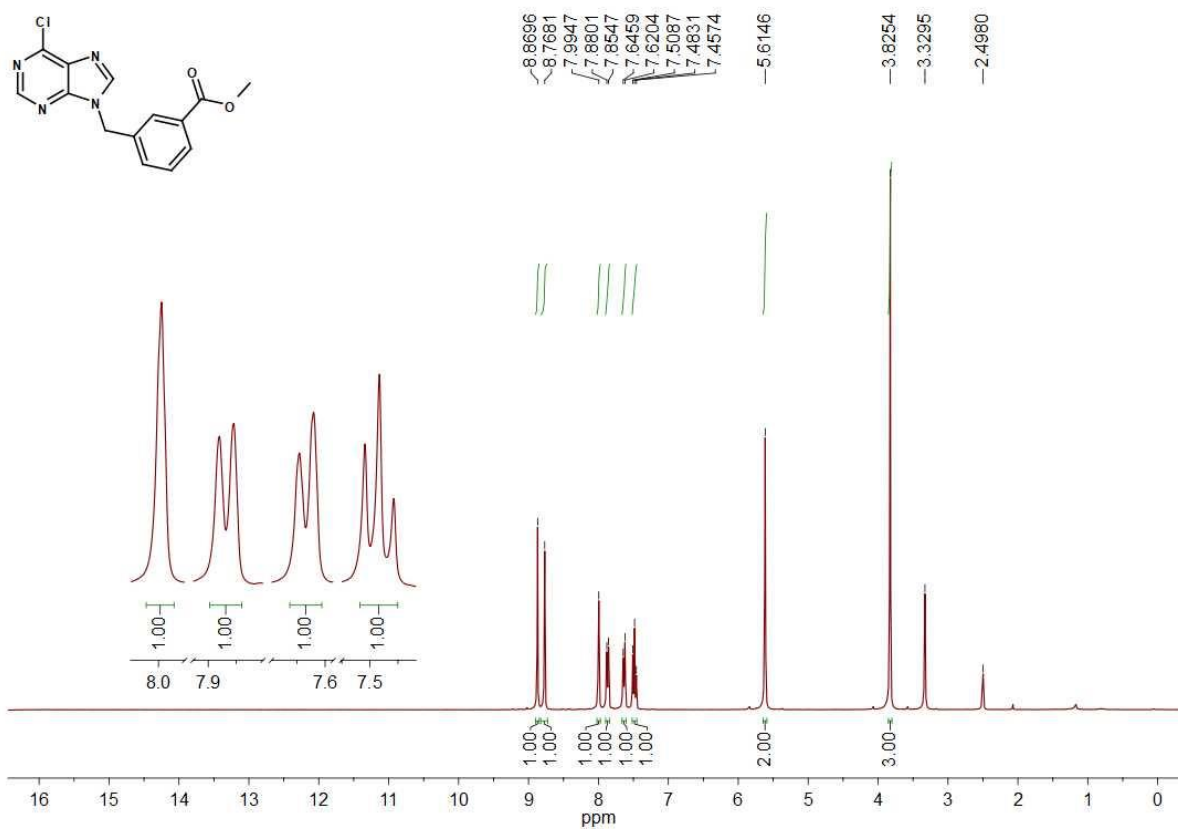
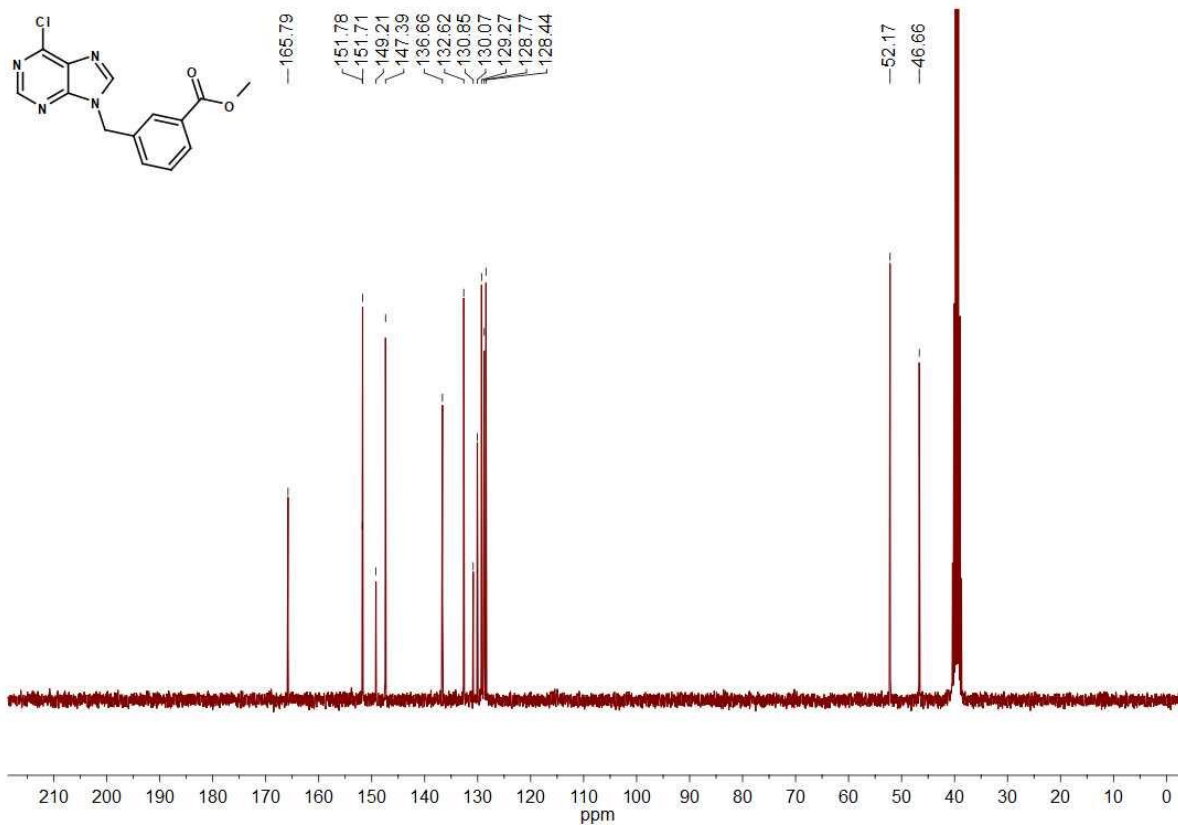
PDA Ch1 254nm 4nm

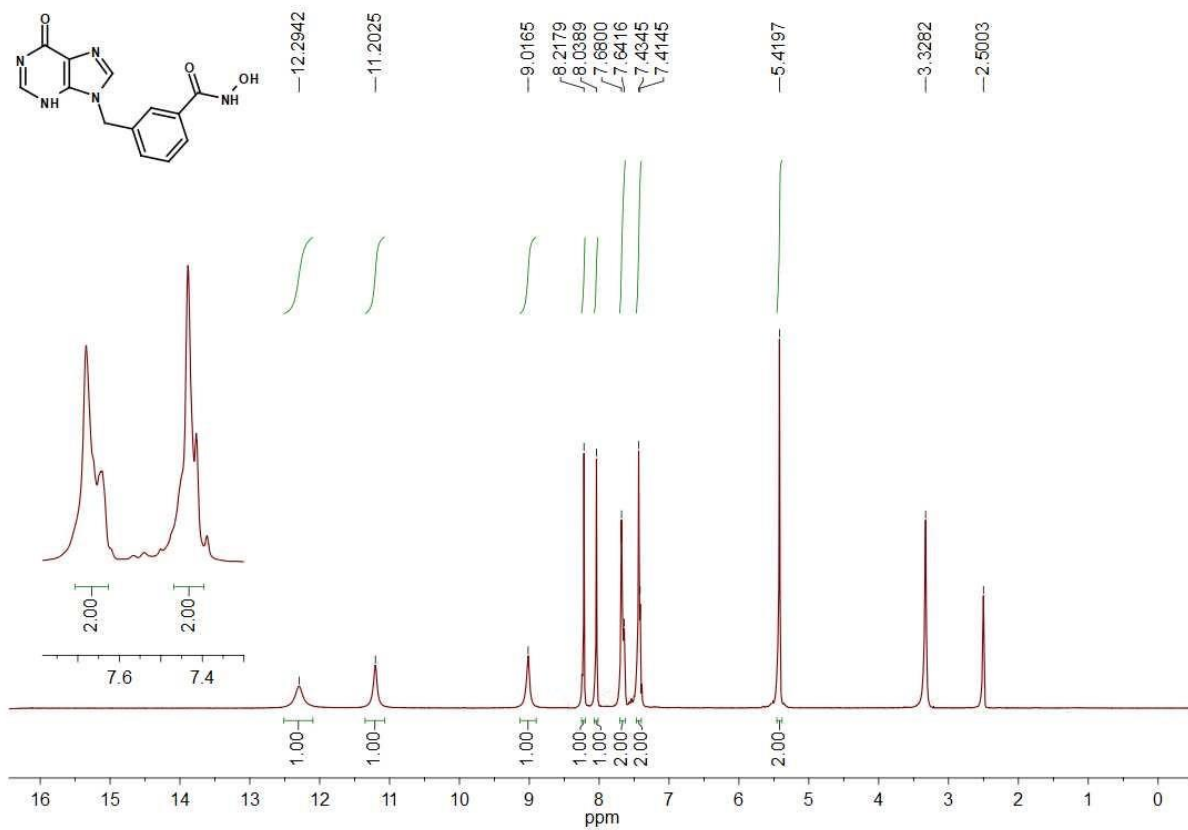
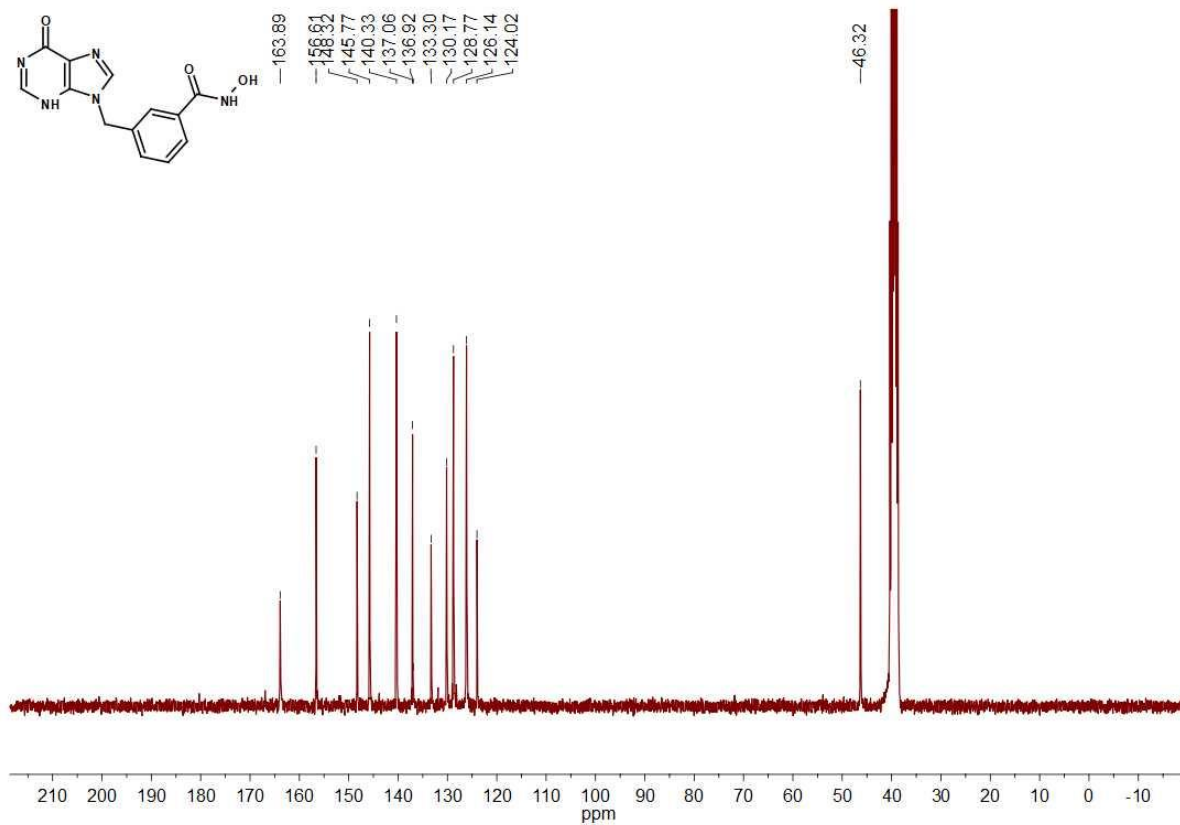
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.553	23391255	3254100	98.068	96.459
2	8.312	460740	119475	1.932	3.541
Total		23851996	3373575	100.000	100.000

Chromatogram Branco

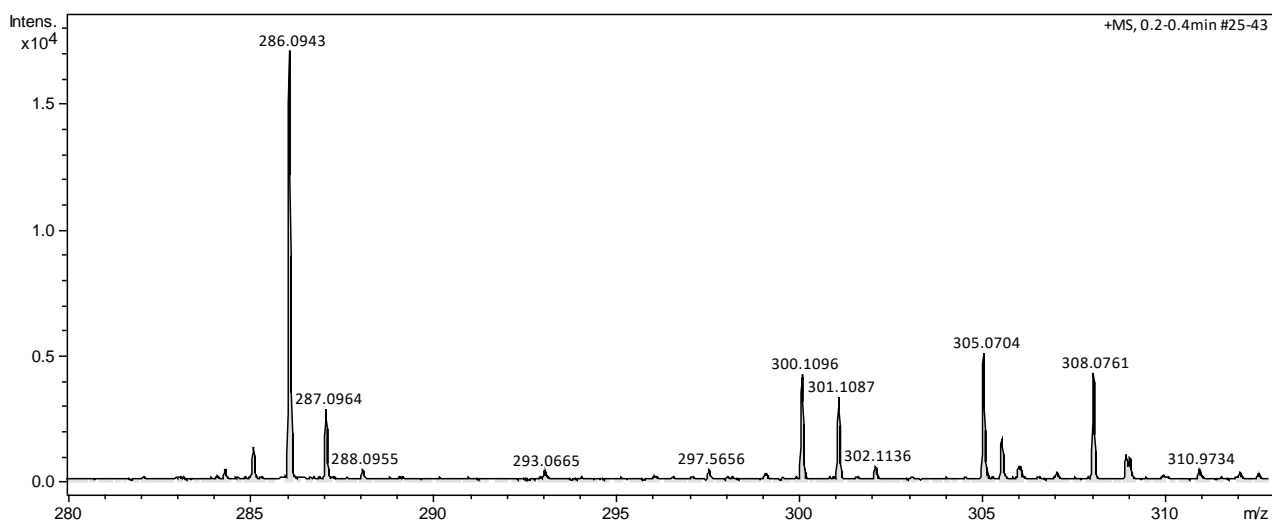
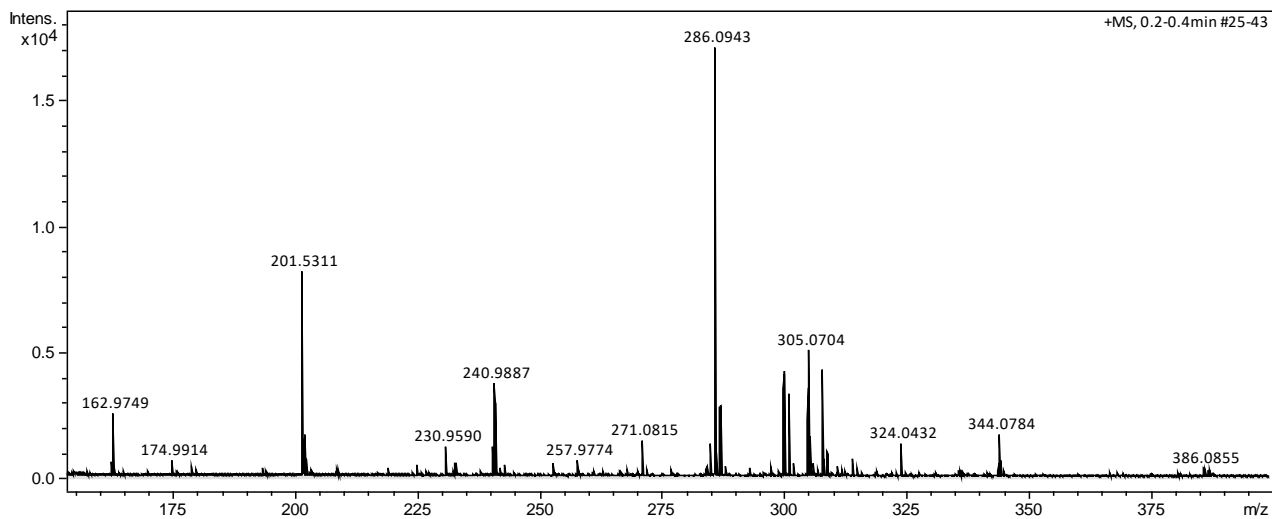


1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do composto final 3jEspectro de ^{13}C RMN do composto final 3j

Espectro de ^1H RMN do composto final 4jEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4j

Espectro de HRMS do composto final 4i

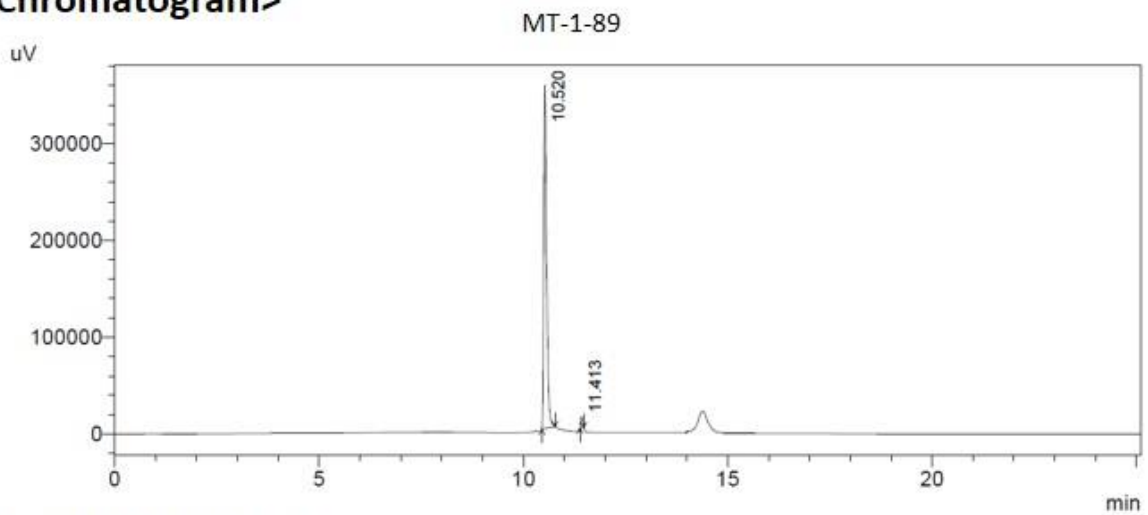


Cromatograma de CLAE do composto final 4i

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-89
Vail # : 1
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : MT-1-89.lcd
Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 05/12/2018 13:12:06
Data Processed : 13/12/2018 19:27:17

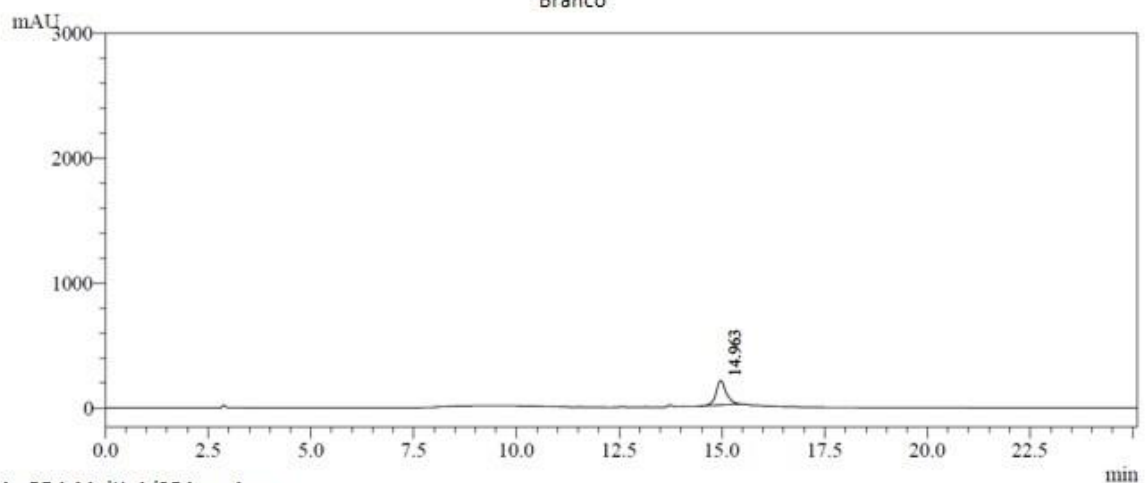
<Chromatogram>

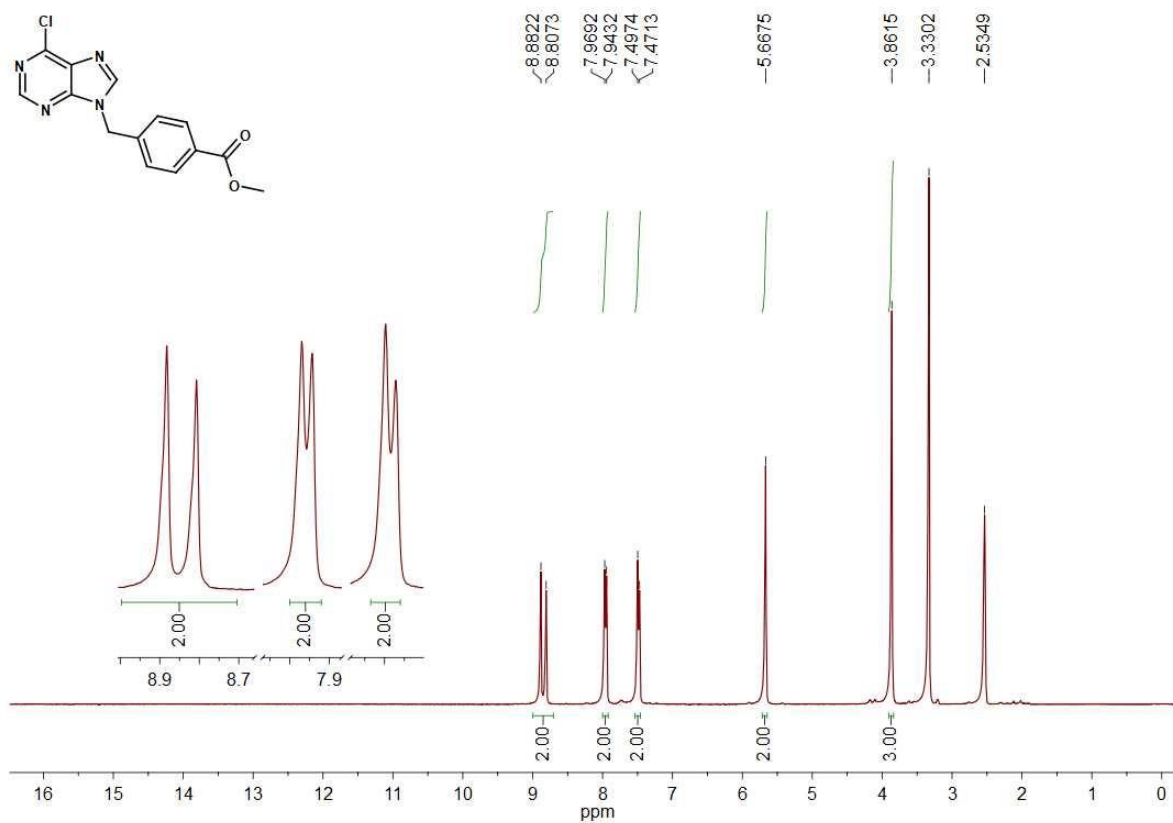
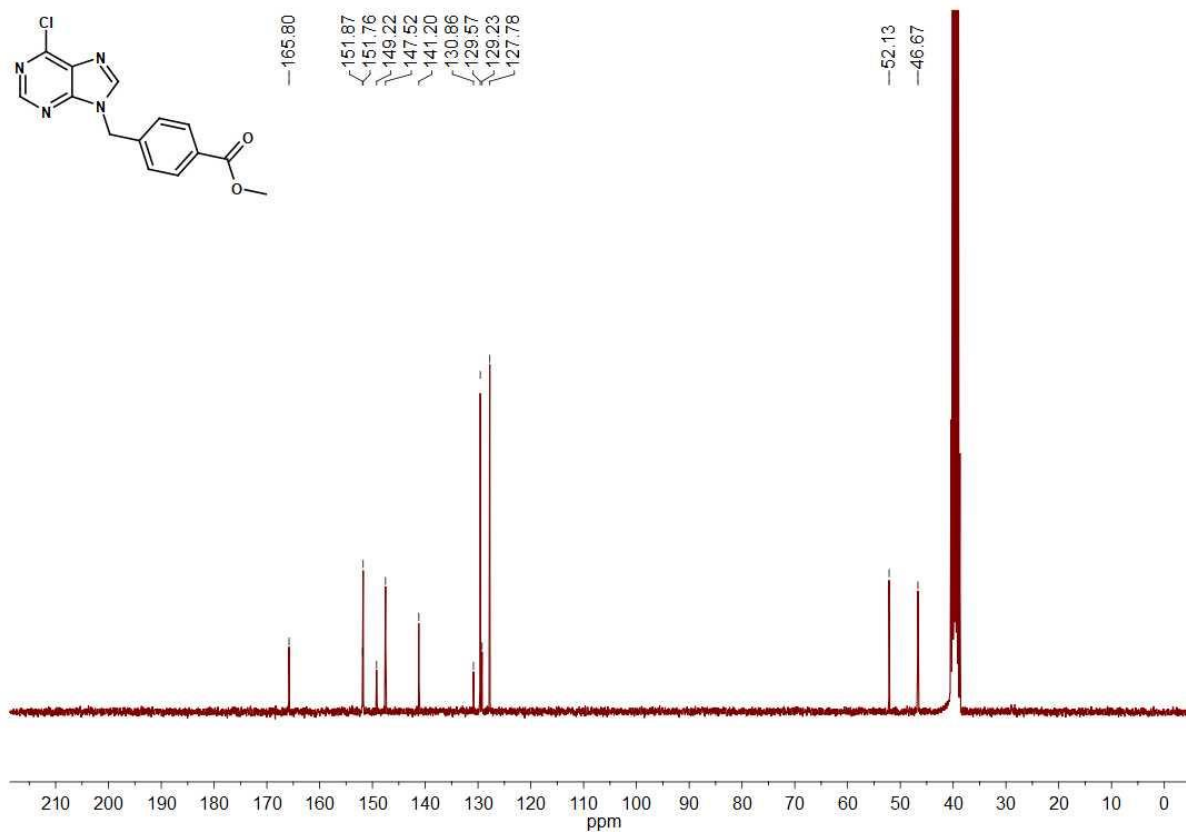


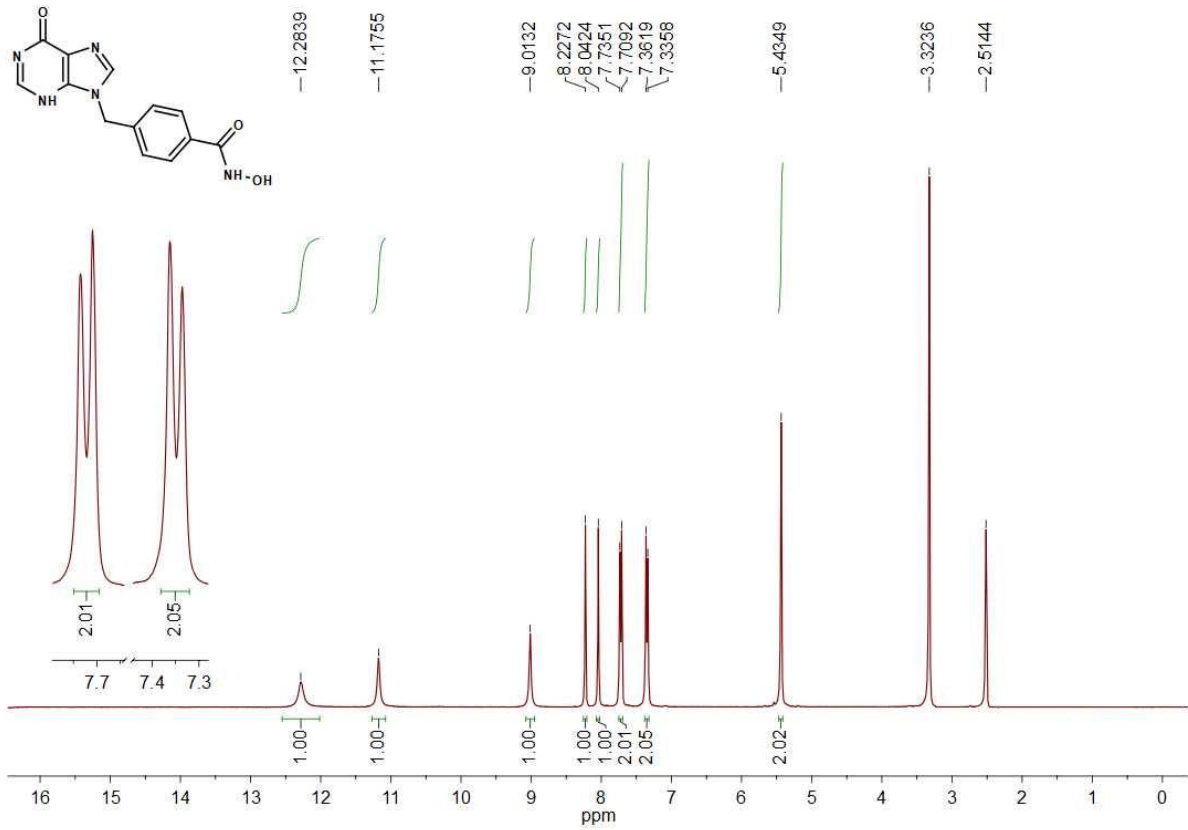
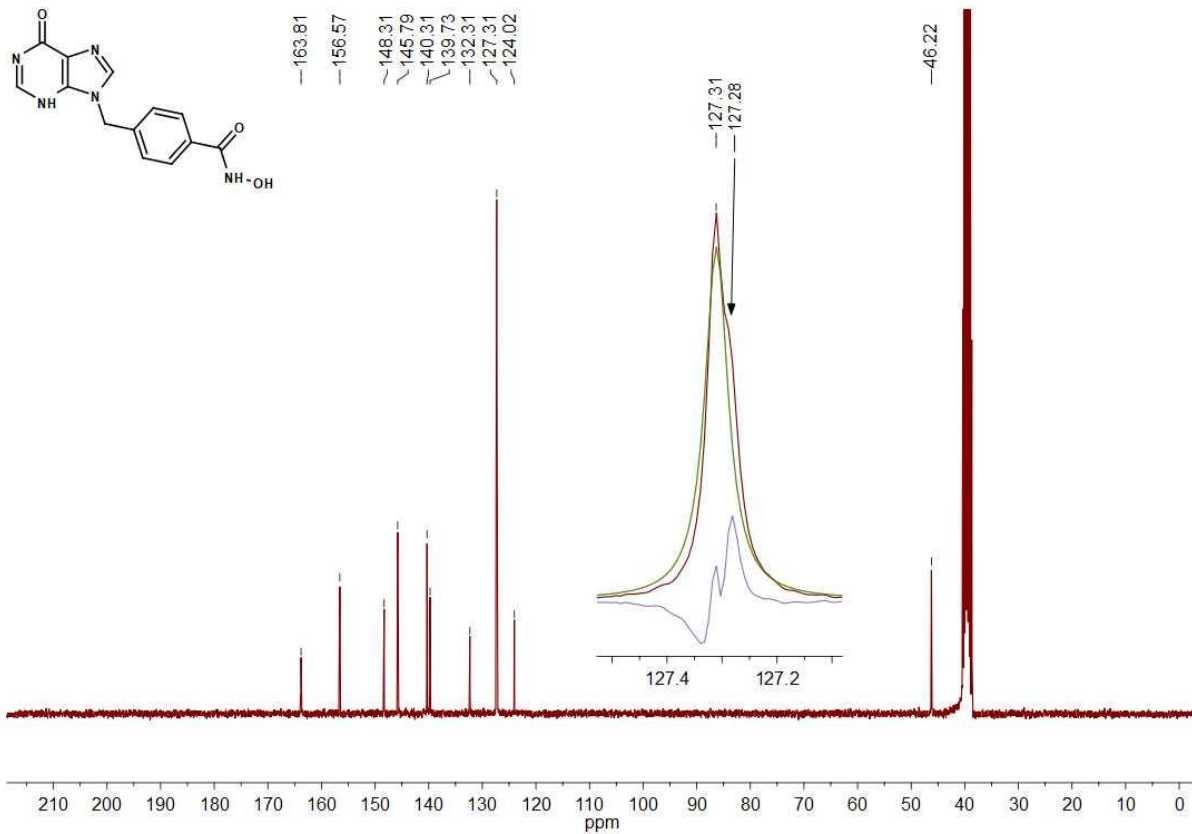
Peak Table

PDA Ch1 254nm 4nm

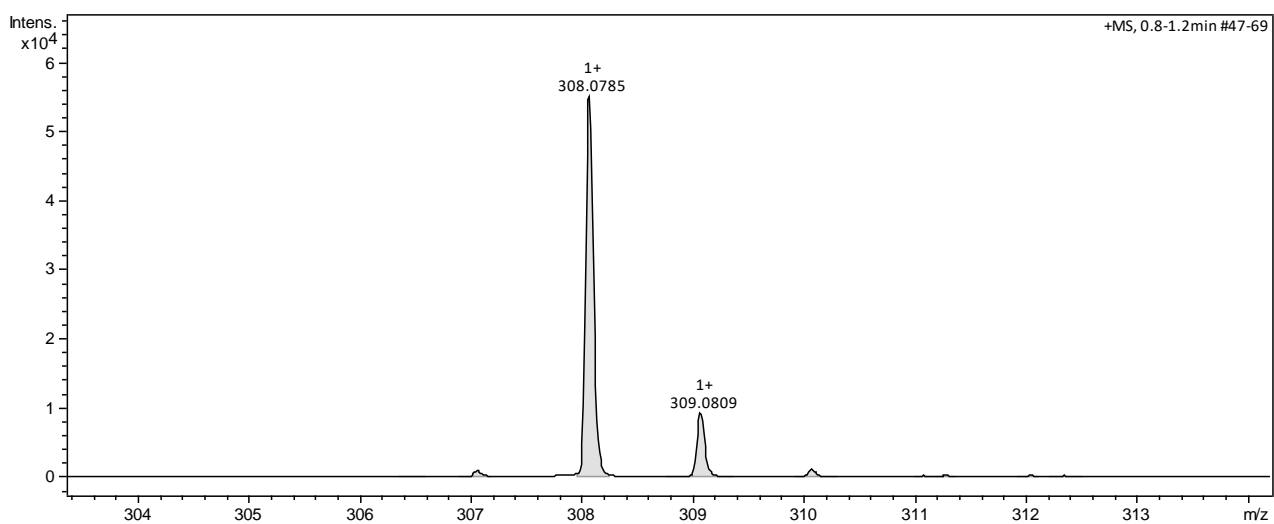
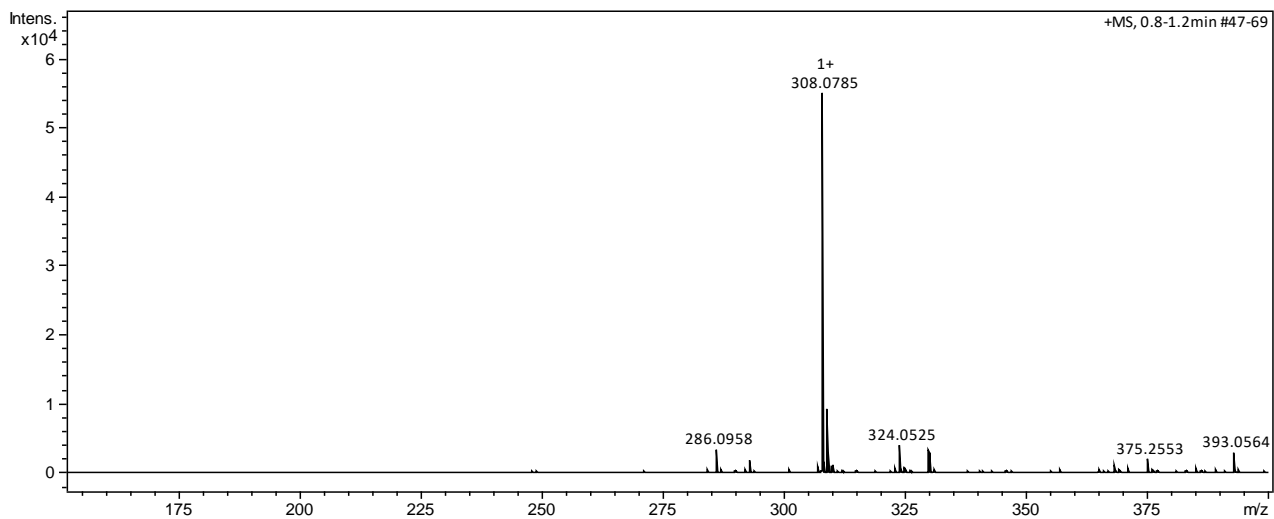
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.520	1058820	217536	98.468	97.665
2	11.413	16478	5201	1.532	2.335
Total		1075298	222737	100.000	100.000

Chromatogram
Branco

Espectro de ^1H RMN do intermediário 3kEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 3k

Espectro de ^1H RMN do composto final 4kEspectro de ^{13}C RMN do composto final 4k

Espectro de HRMS do composto final 4k

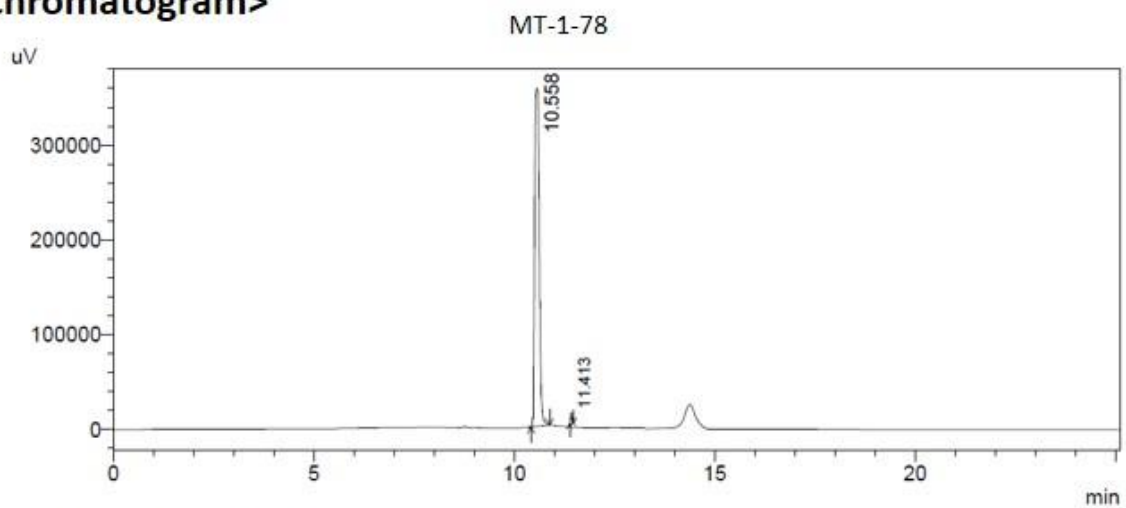


Cromatograma de CLAE do composto final 4k

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-78
Vial # : 25
Injection Volume : 20 μ L
Data File Name : MT-1-78.lcd
Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 18/01/2019 11:02:29
Data Processed : 18/01/2019 13:04:26

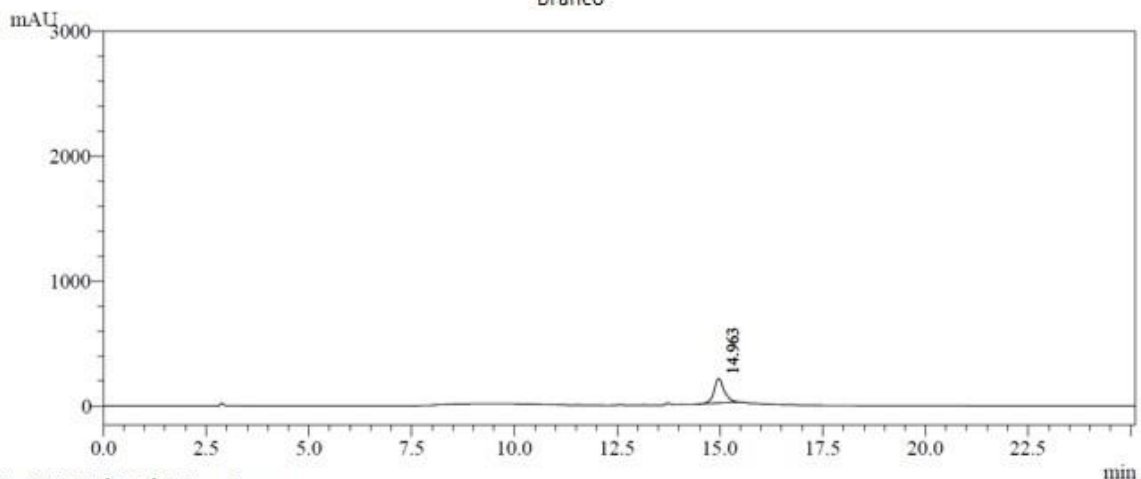
<Chromatogram>

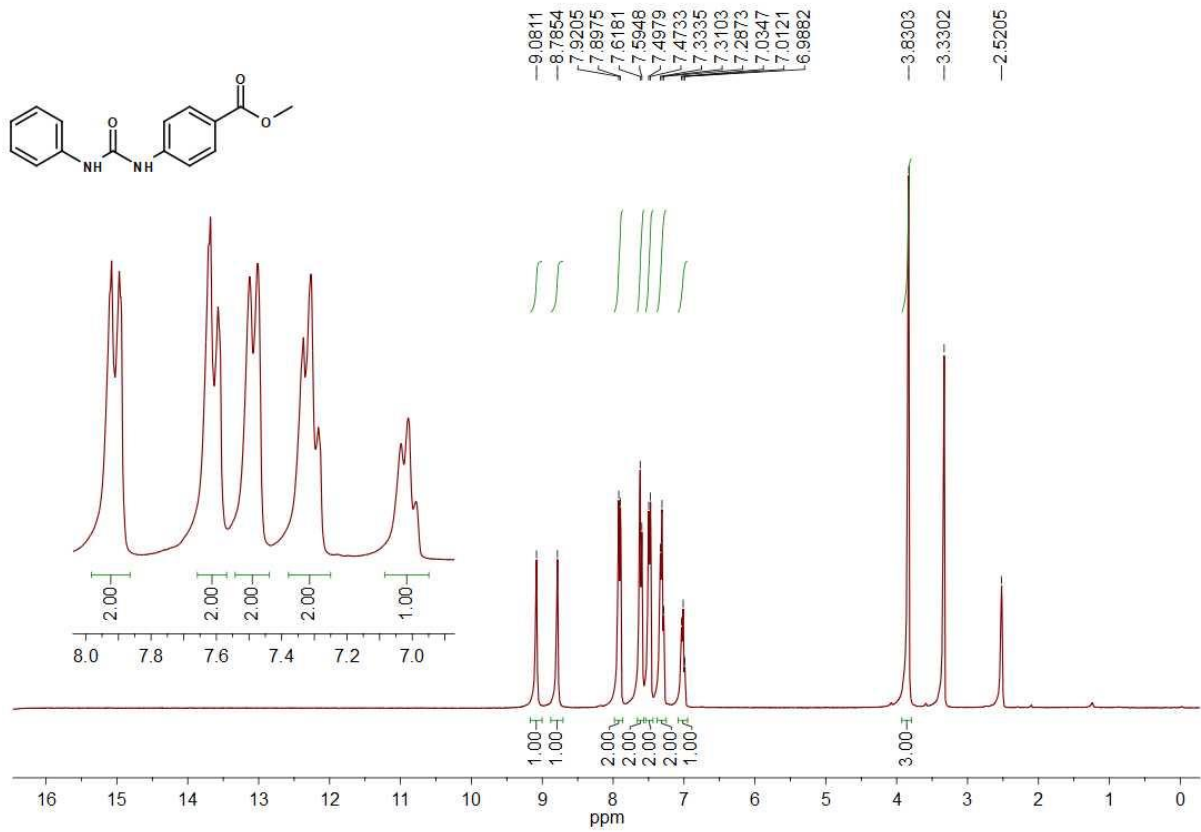
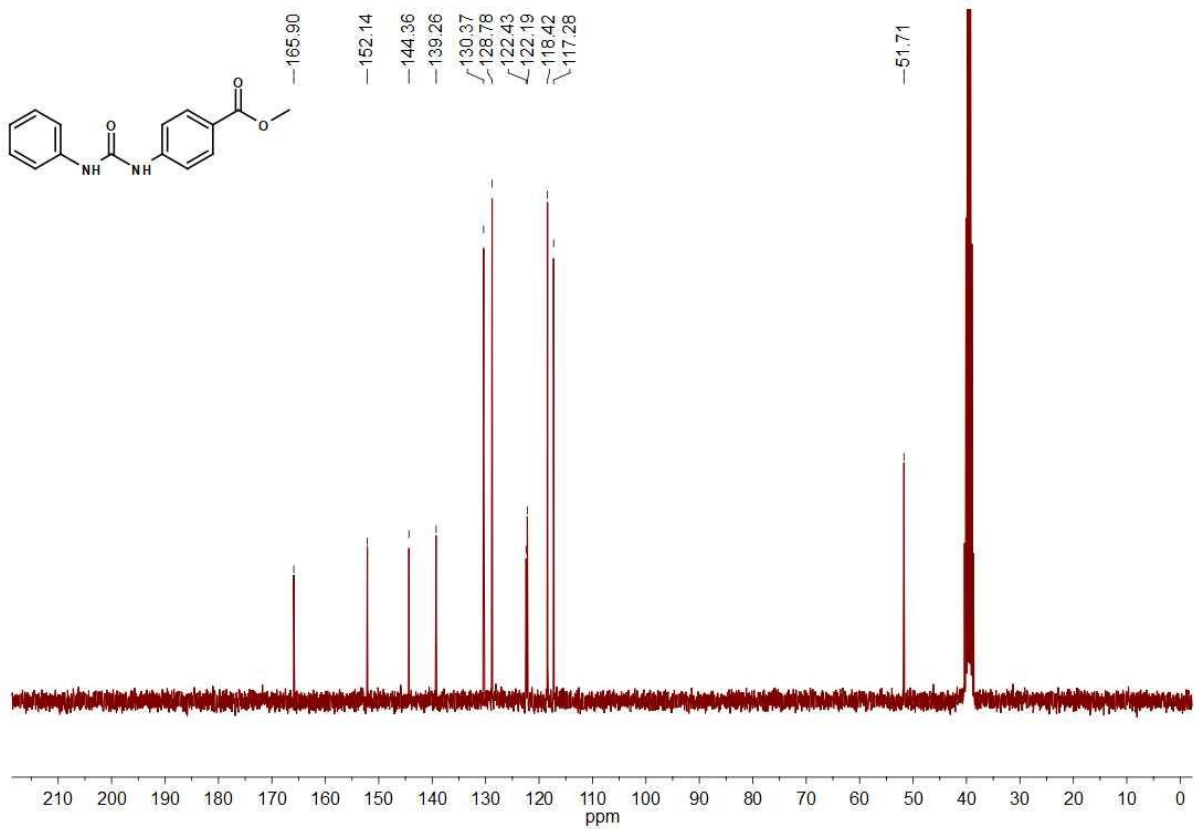


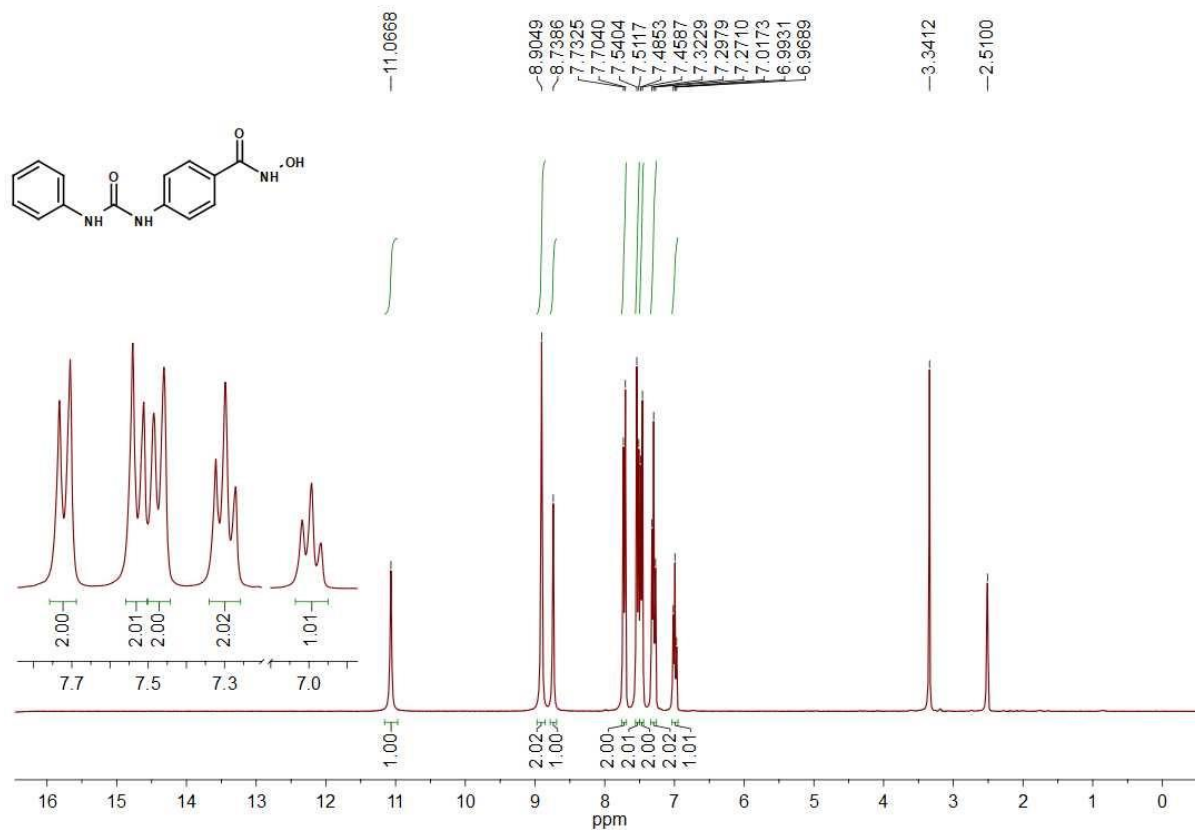
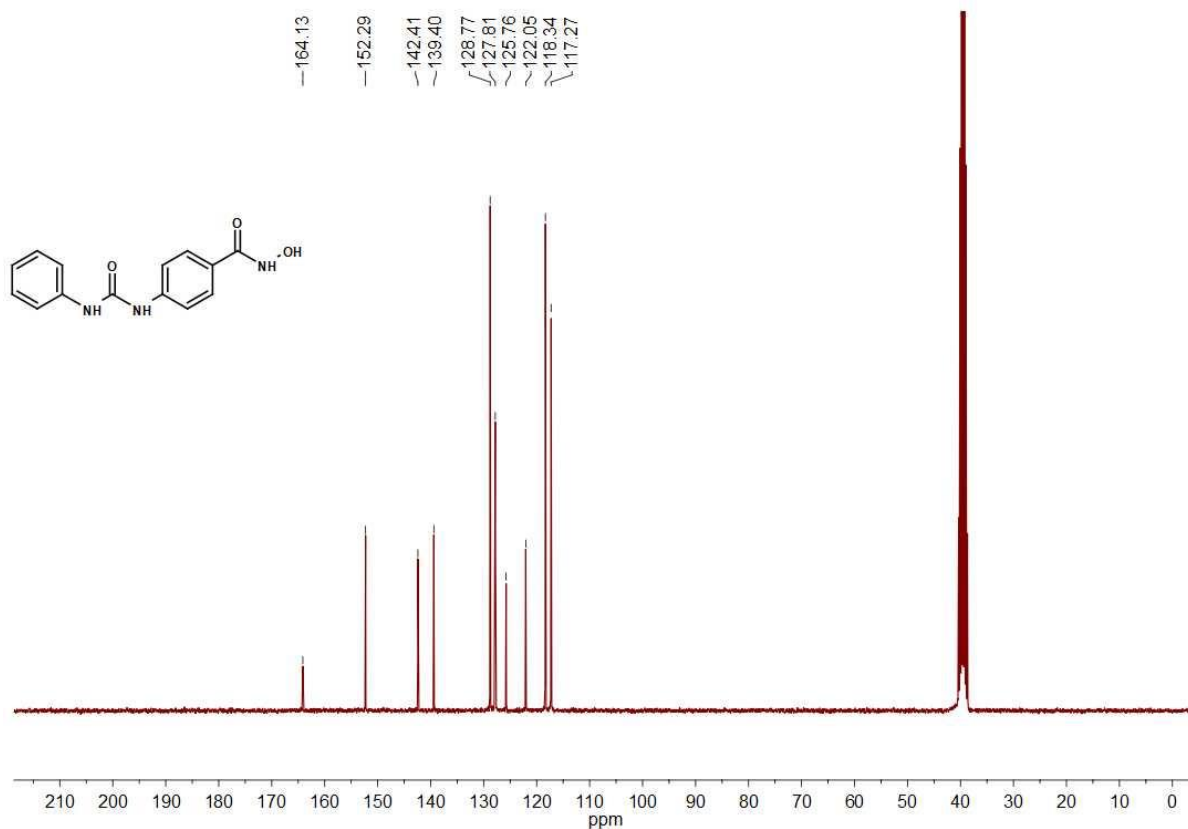
Peak Table

PDA Ch1 254nm 4nm

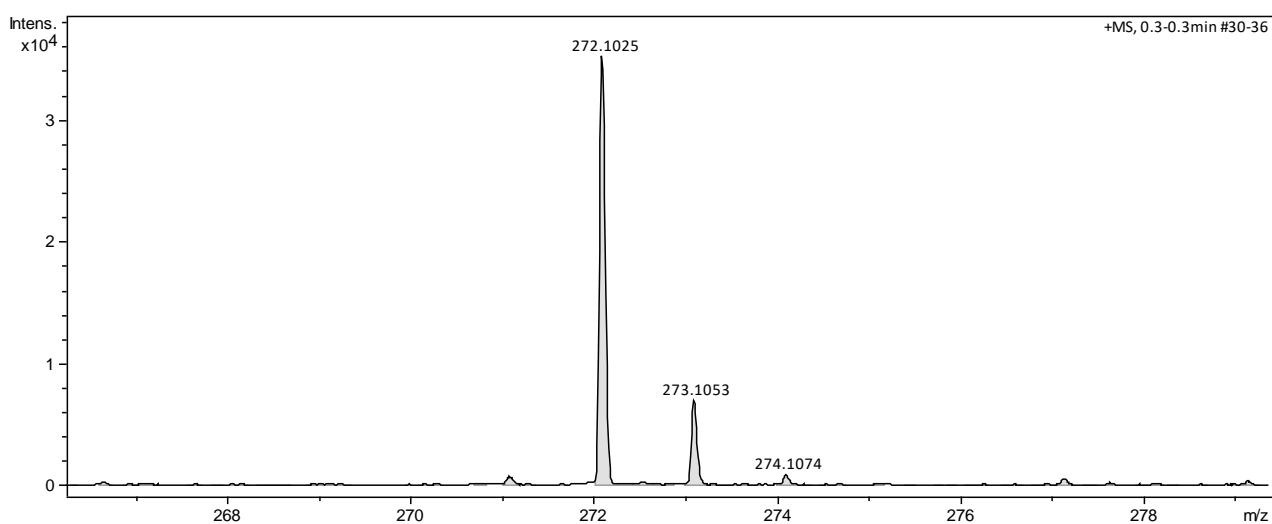
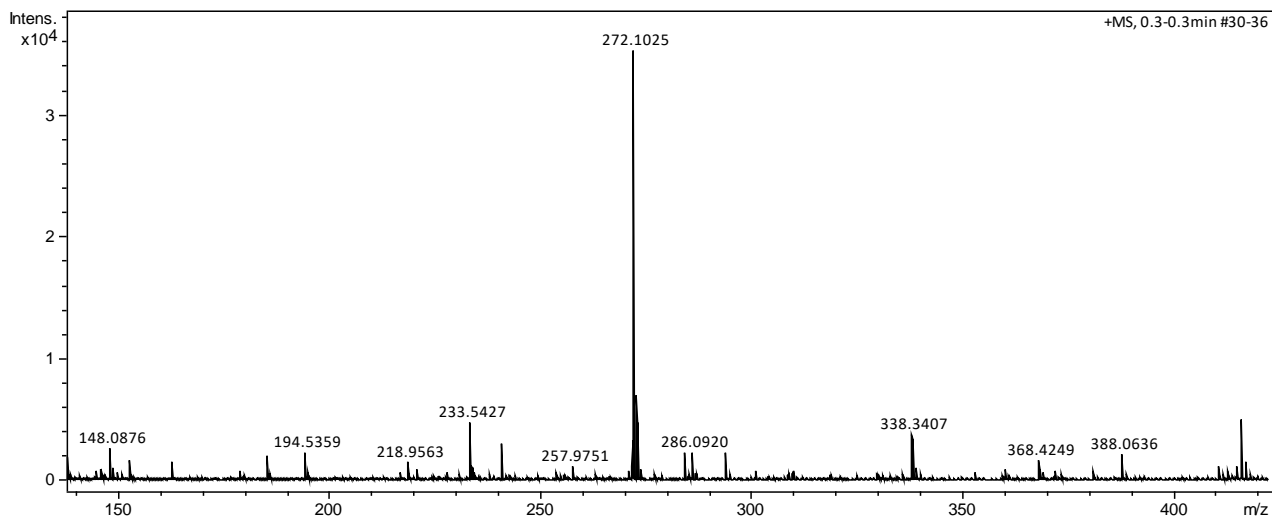
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.558	26677470	3982897	99.695	99.451
2	11.413	81679	21986	0.305	0.549
Total		26759149	4004883	100.000	100.000

Chromatogram
Branco

Espectro de ^1H RMN do intermediário 6aEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 6a

Espectro de ^1H RMN do composto final 7aEspectro de ^{13}C RMN do composto final 7a

Espectro de HRMS do composto final 7a

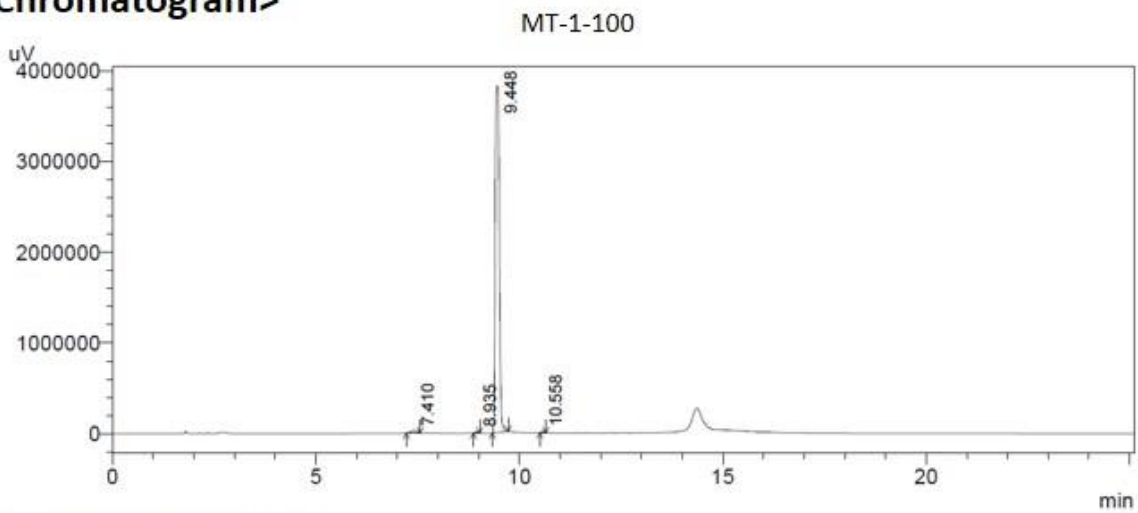


Cromatograma de CLAE do composto final 7a

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-100
 Vail # : 38
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-100.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 05/12/2018 13:57:01
 Data Processed : 01/02/2019 13:25:07

<Chromatogram>

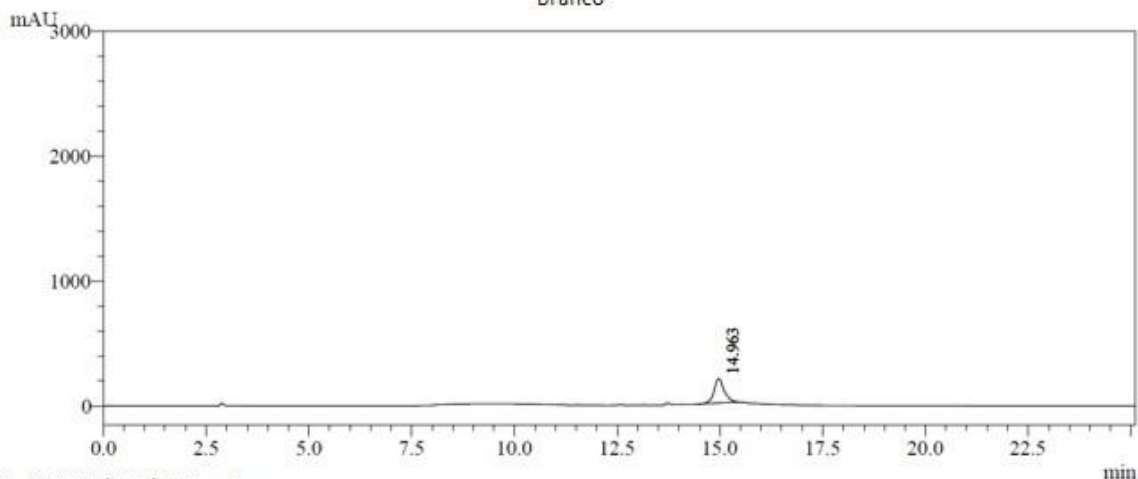


1 PDA Multi 1/254nm 4nm

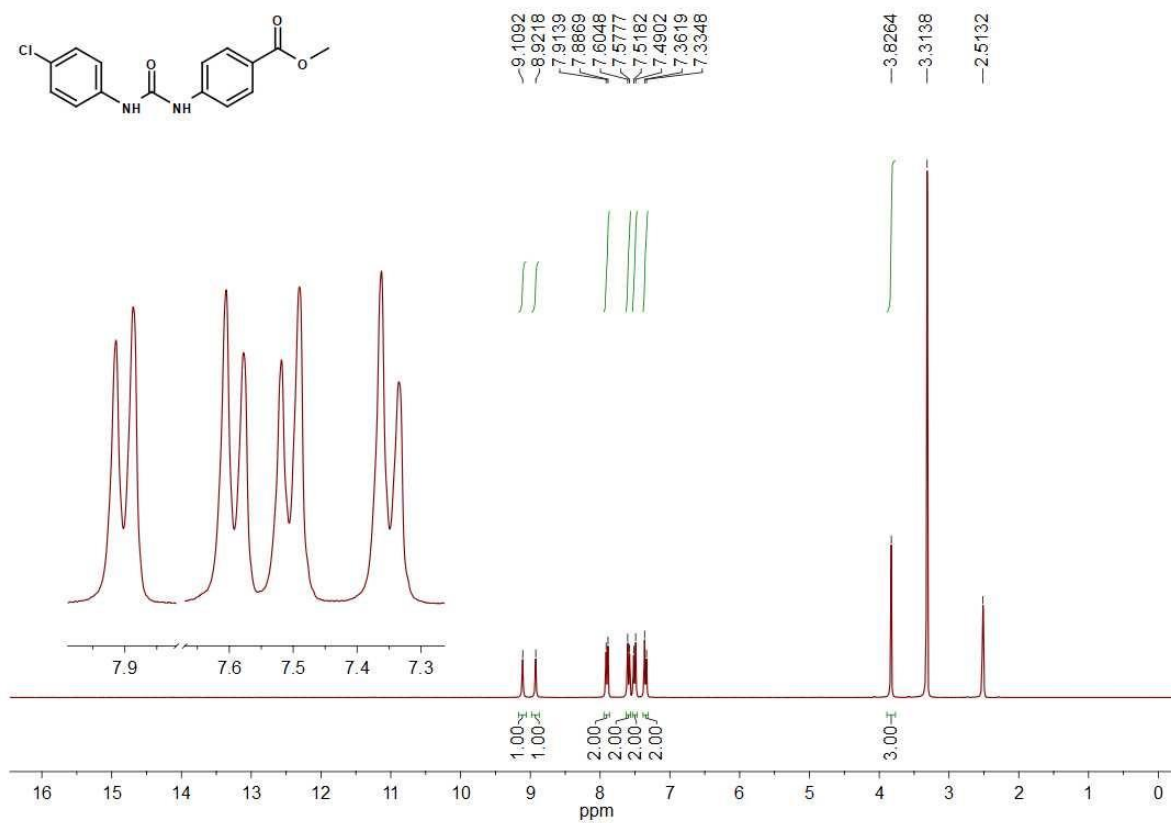
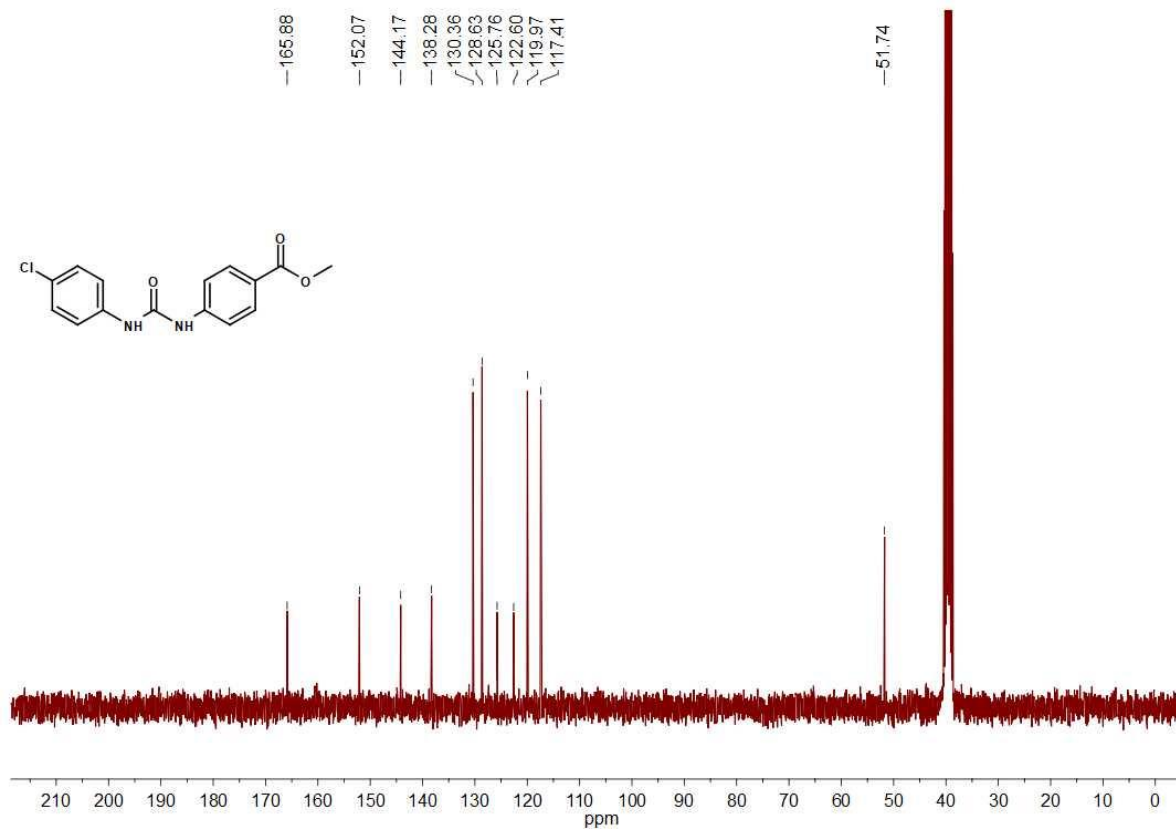
Peak Table

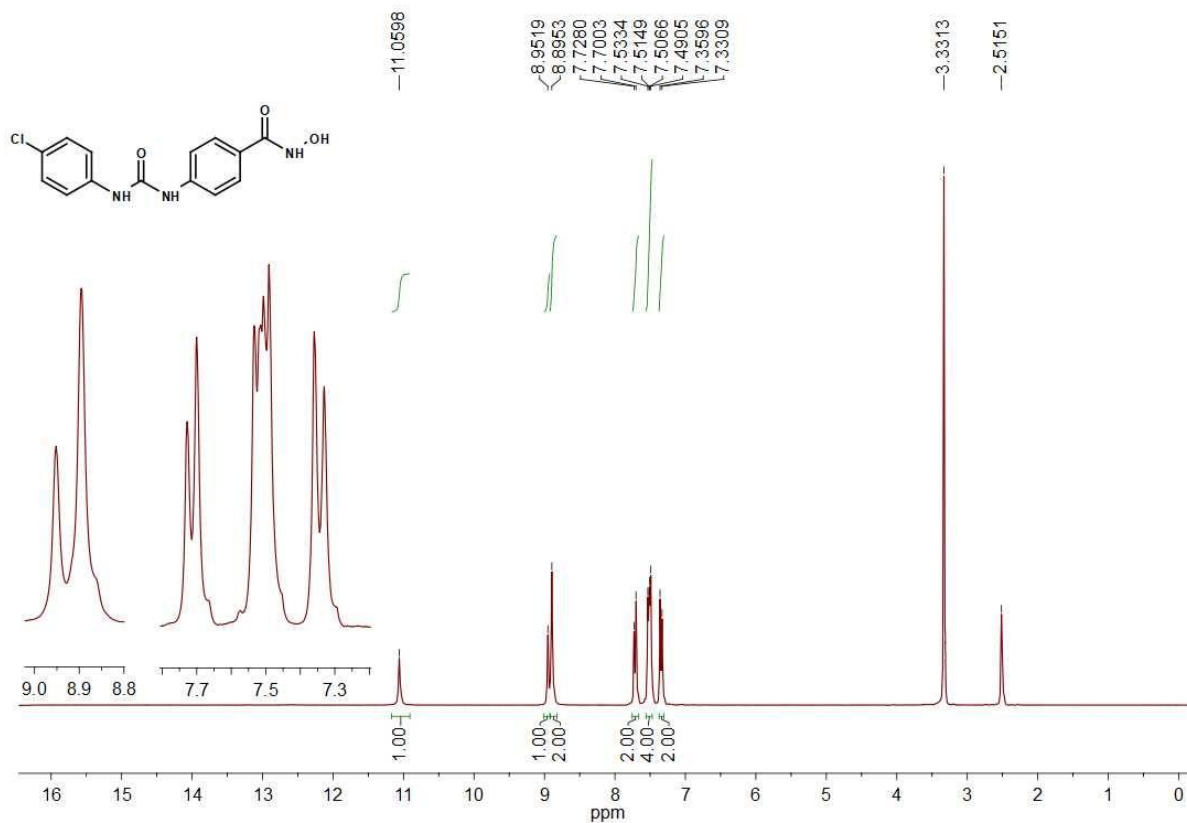
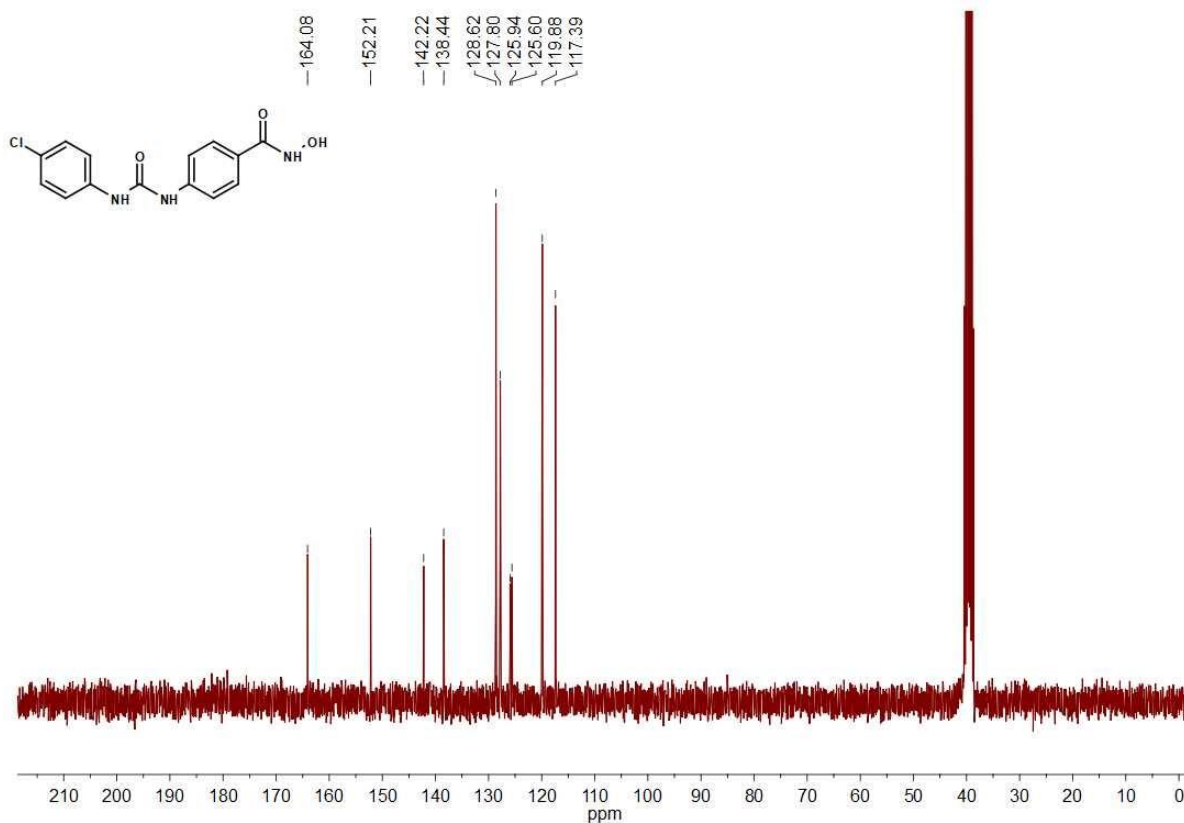
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.410	306962	31048	1.112	0.796
2	8.935	74114	17439	0.268	0.447
3	9.448	27137551	3827469	98.284	98.170
4	10.558	92695	22862	0.336	0.586
Total		27611322	3898818	100.000	100.000

Chromatogram Branco



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 6bEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 6b

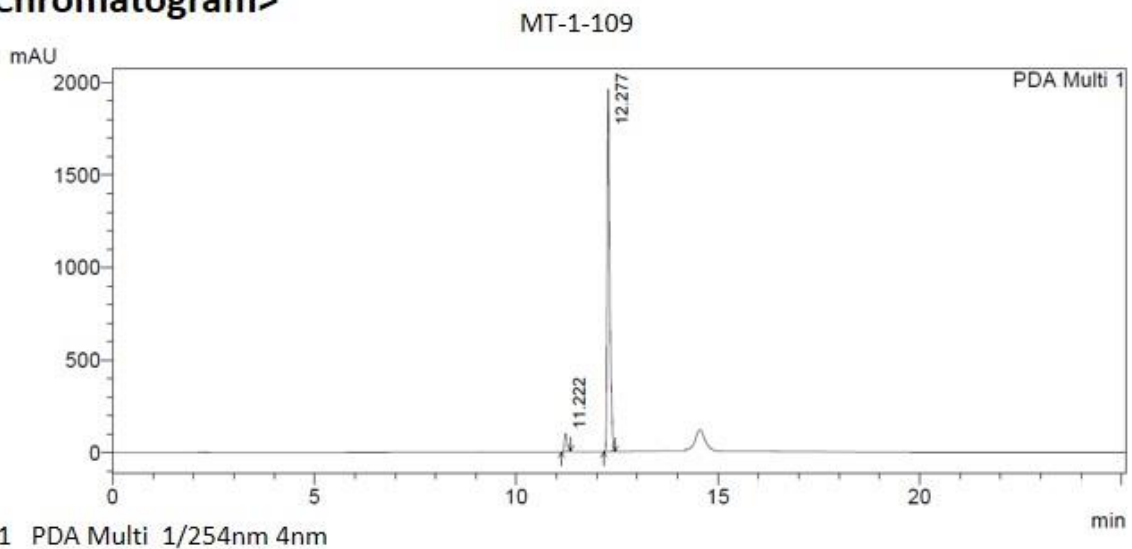
Espectro de ^1H RMN do composto final 7bEspectro de ^{13}C RMN do composto final 7b

Cromatograma de CLAE do composto final 7b

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-109
 Vial # : 4
 Injection Volume : 25 uL
 Data File Name : MT-1-109.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 13/12/2018 15:42:19
 Data Processed : 13/12/2018 16:07:30

<Chromatogram>

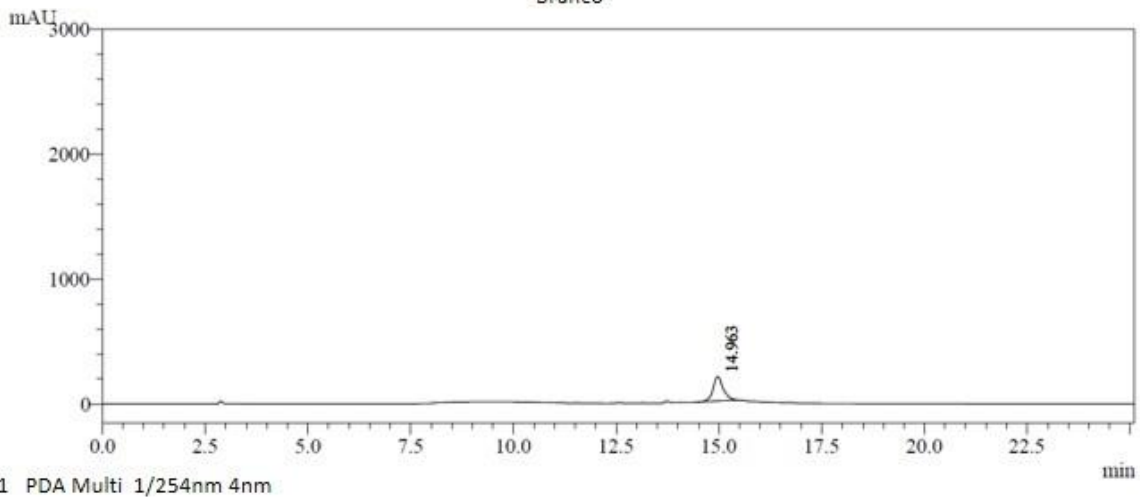


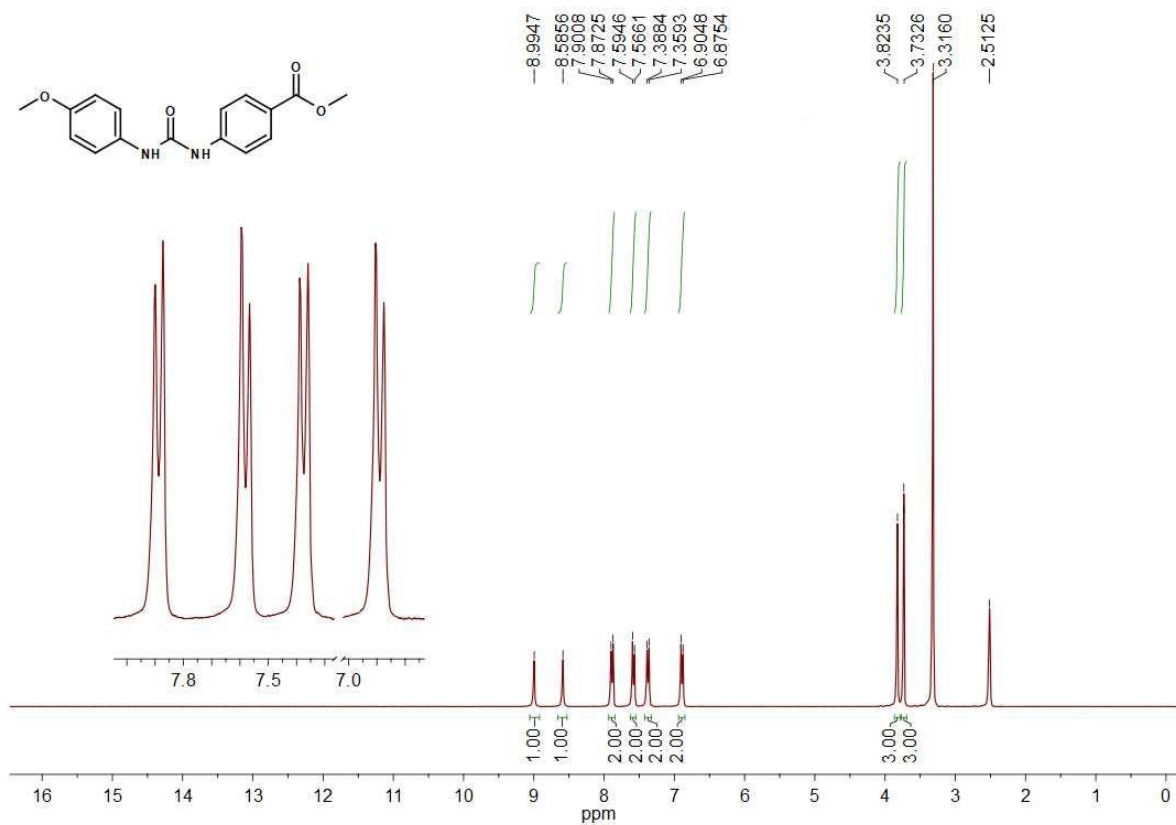
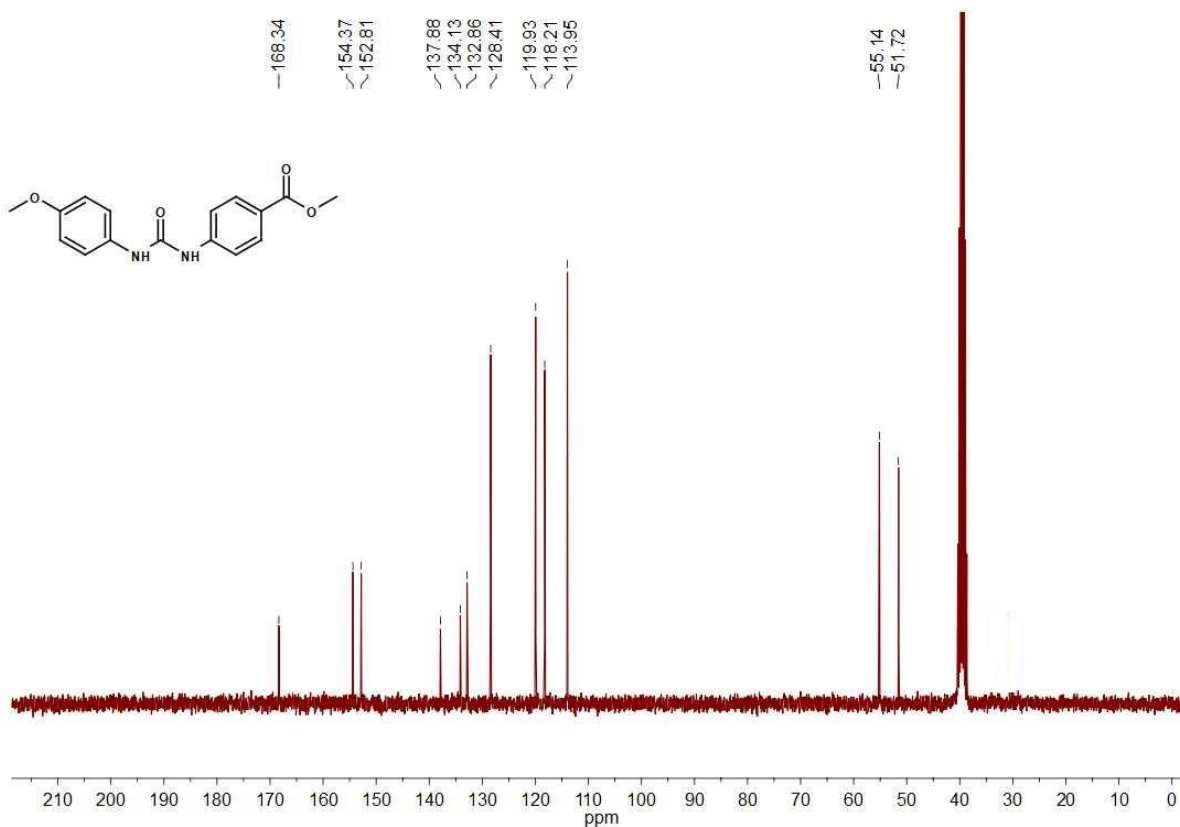
Peak Table

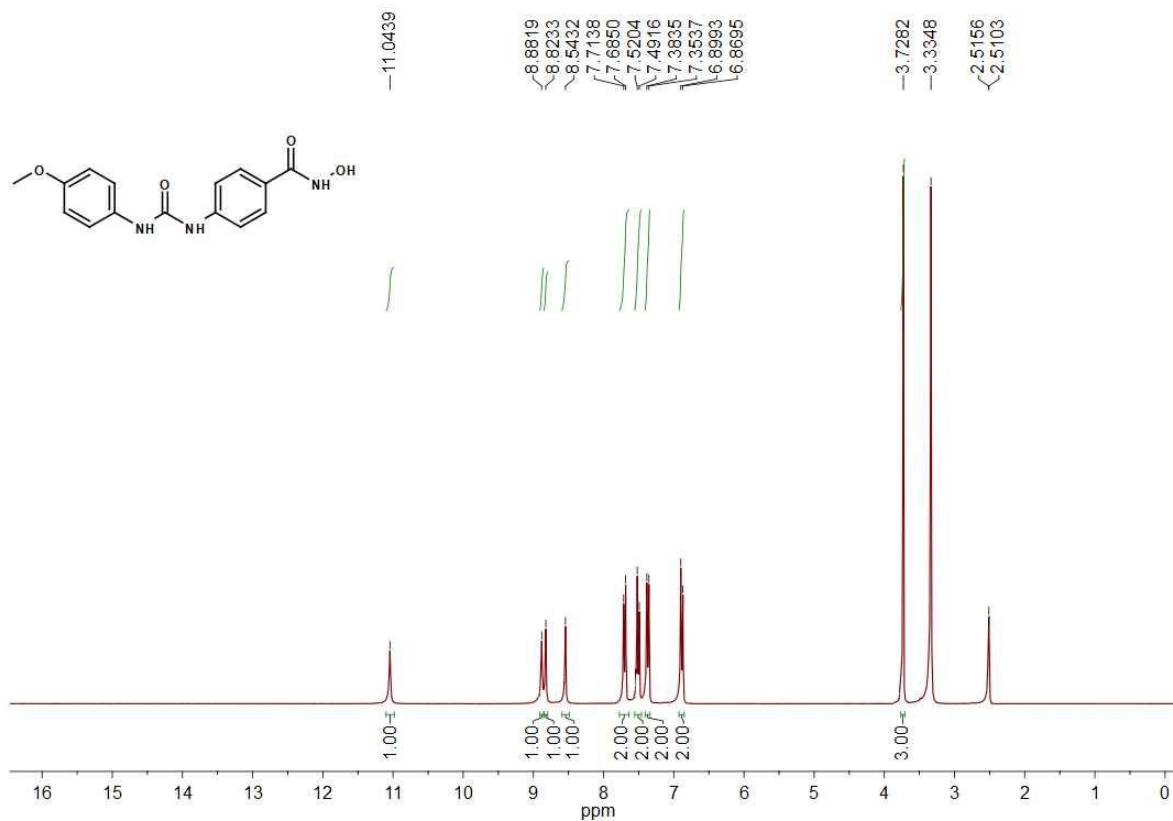
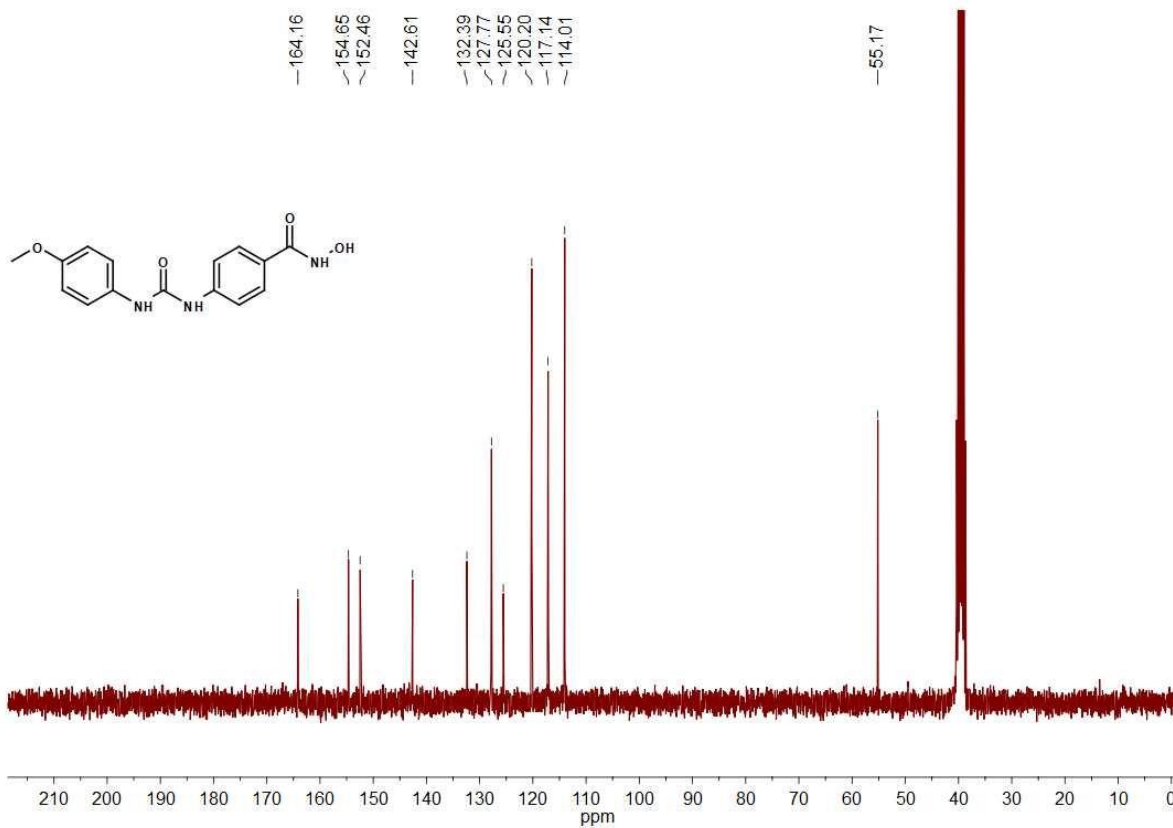
PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	11.222	150282	53905	1.678	2.679
2	12.277	8805583	1958147	98.322	97.321
Total		8955865	2012052	100.000	100.000

Chromatogram Branco



Espectro de ^1H RMN do intermediário 6cEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 6c

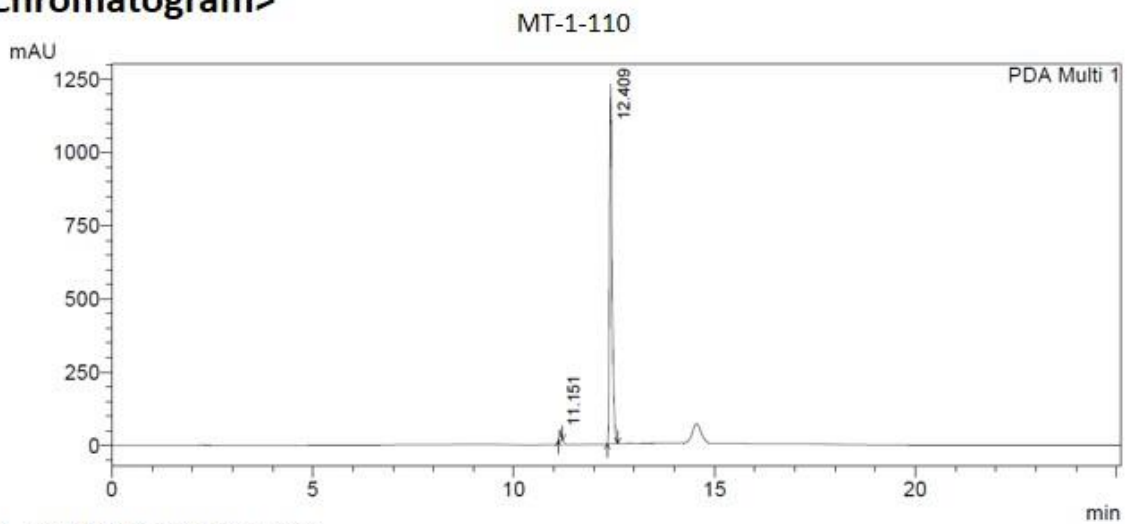
Espectro de ^1H RMN do composto final 7cEspectro de ^{13}C RMN do composto final 7c

Cromatograma de CLAE do composto final 7c

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-110
 Vial # : 5
 Injection Volume : 25 uL
 Data File Name : MT-1-110.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 13/12/2018 16:09:19
 Data Processed : 13/12/2018 17:59:15

<Chromatogram>

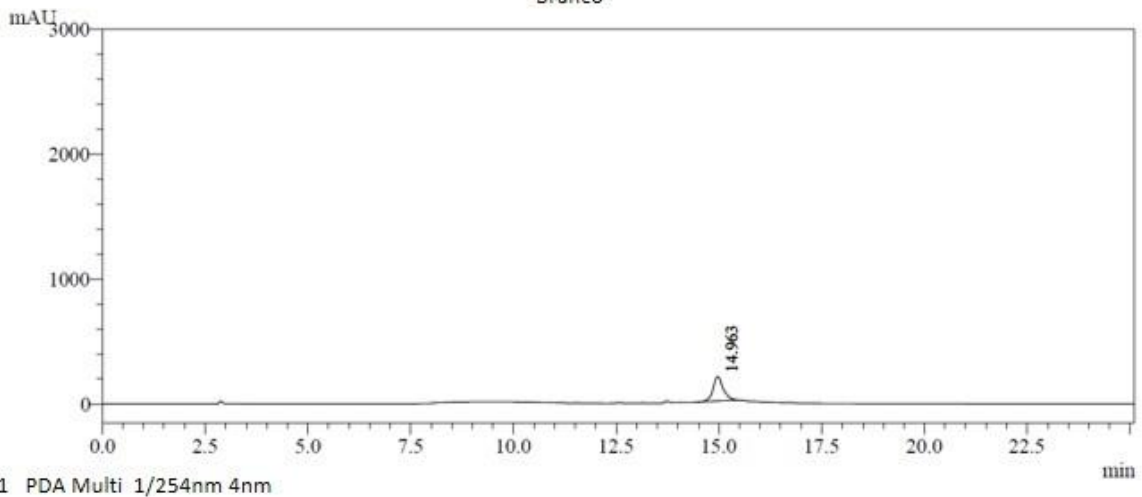


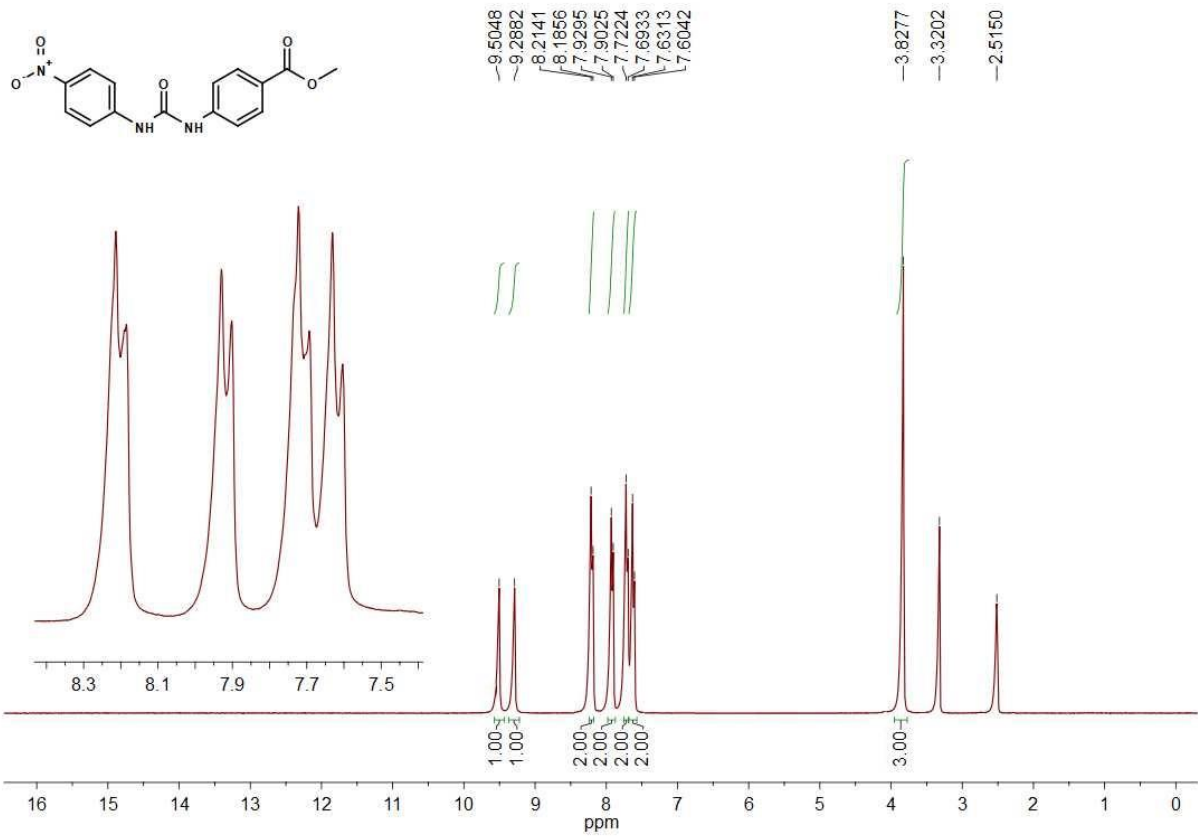
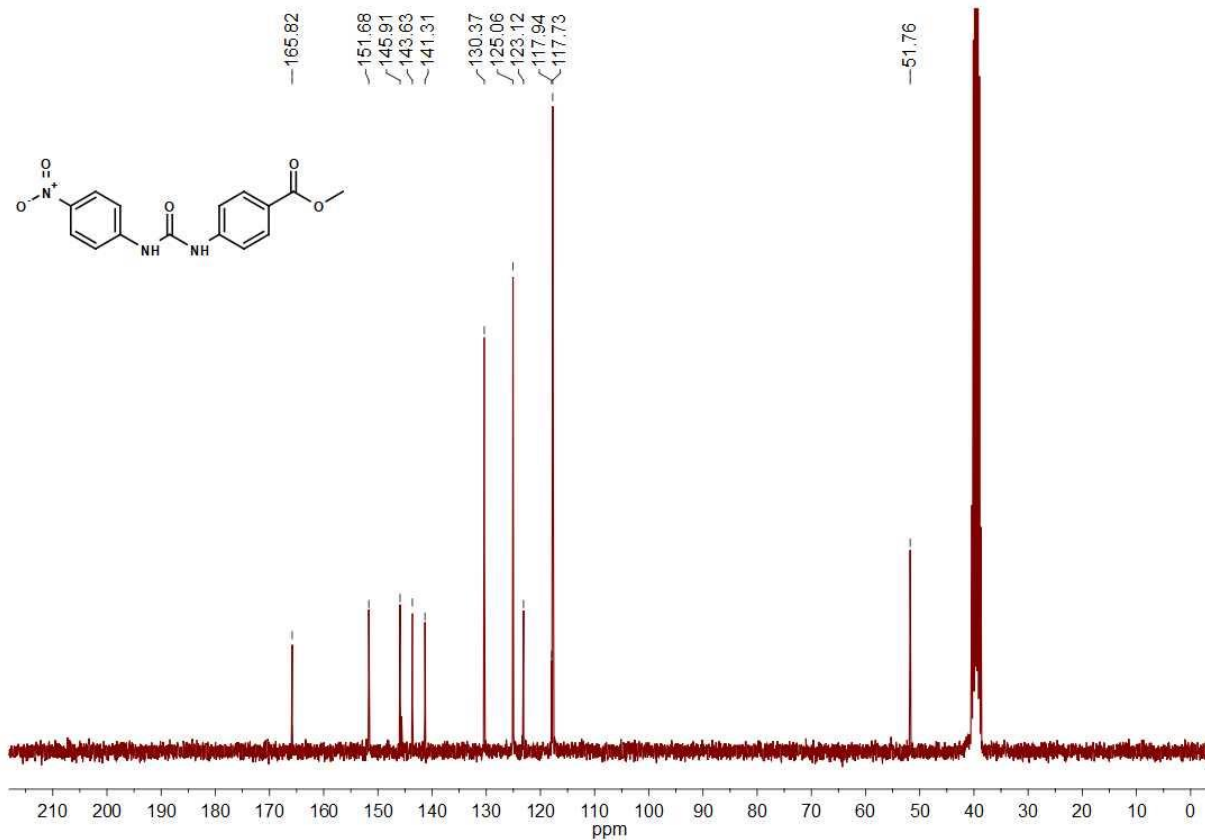
Peak Table

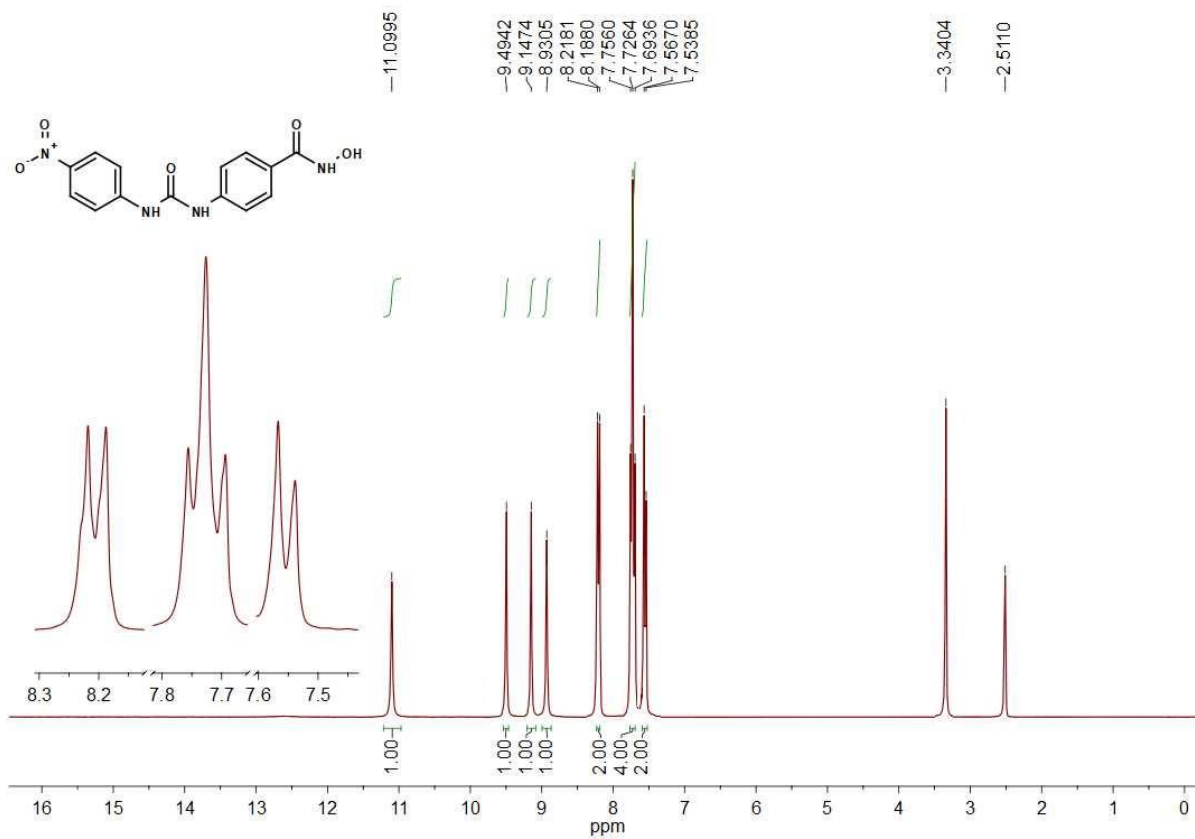
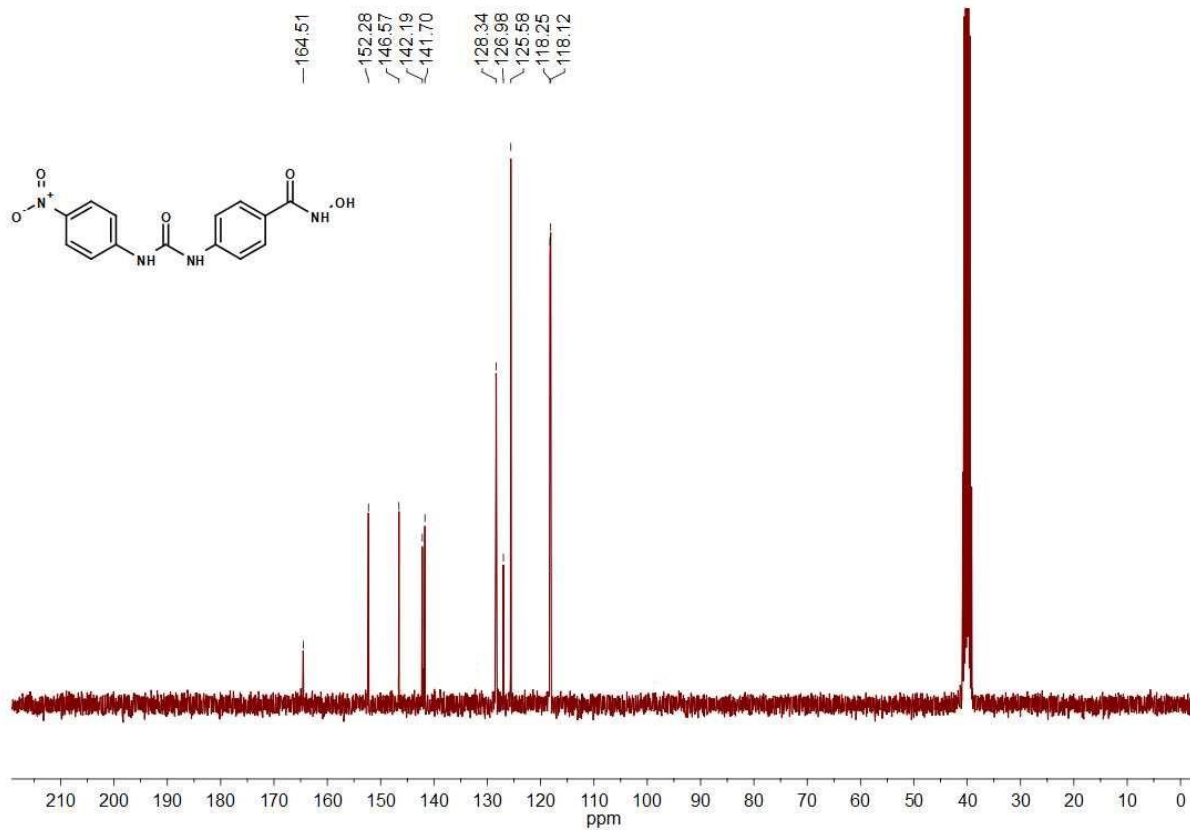
PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	11.151	122464	35992	2.225	2.846
2	12.409	5381161	1228480	97.775	97.154
Total		5503625	1264472	100.000	100.000

Chromatogram Branco



Espectro de ^1H RMN do intermediário 6dEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 6d

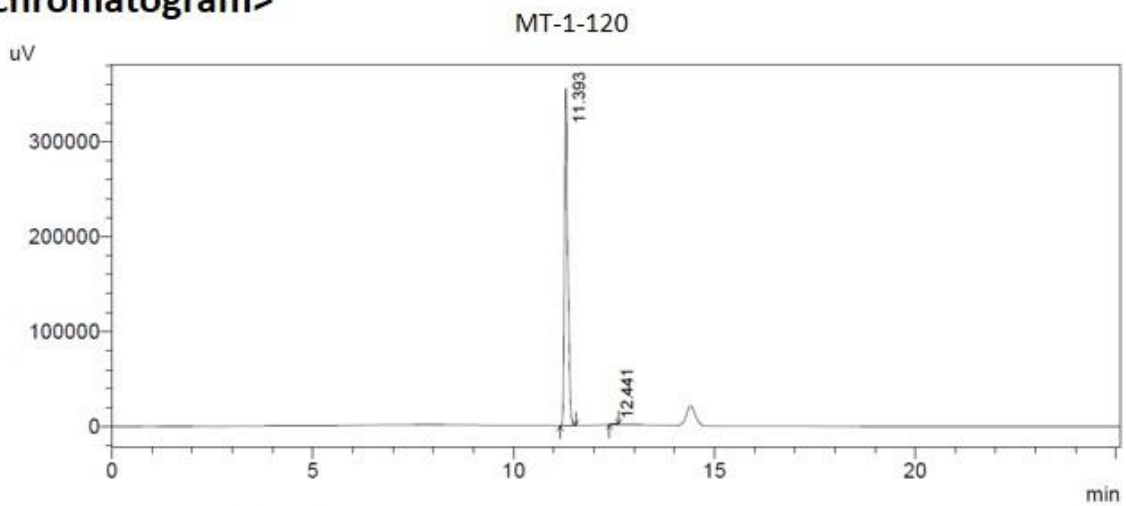
Espectro de ^1H RMN do composto final 7dEspectro de ^{13}C RMN do composto final 7d

Cromatograma de CLAE do composto final 7d

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-120
 Vail # : 54
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-120.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 16/12/2018 15:09:43
 Data Processed : 17/01/2019 10:17:06

<Chromatogram>



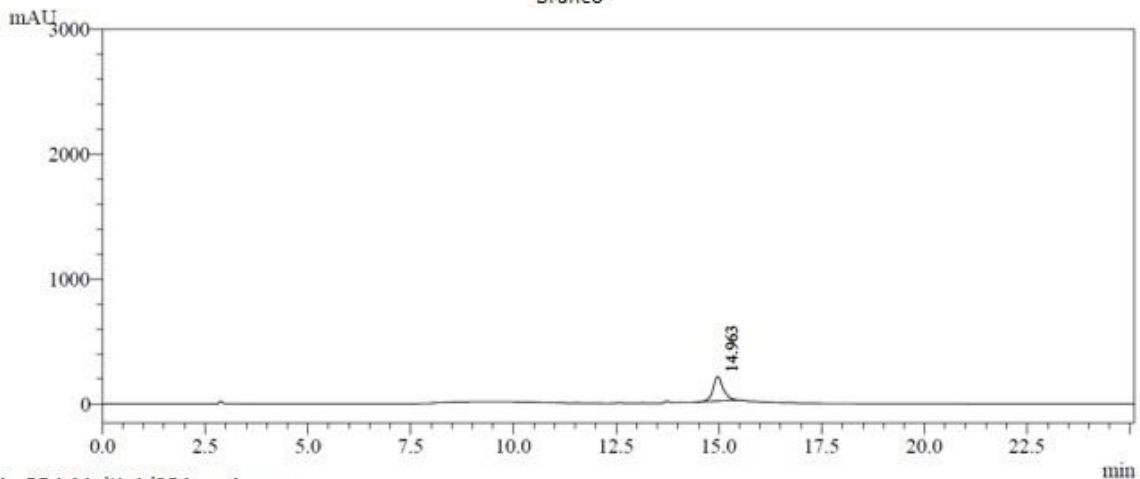
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

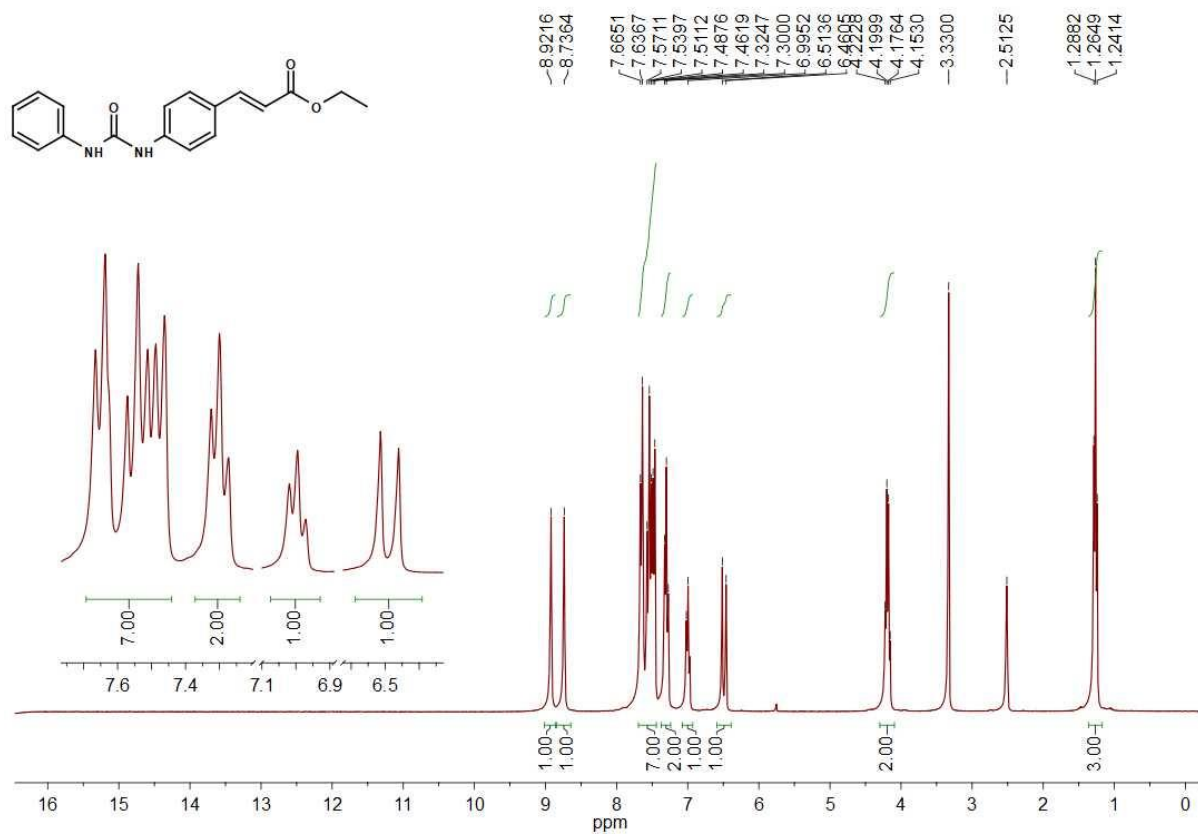
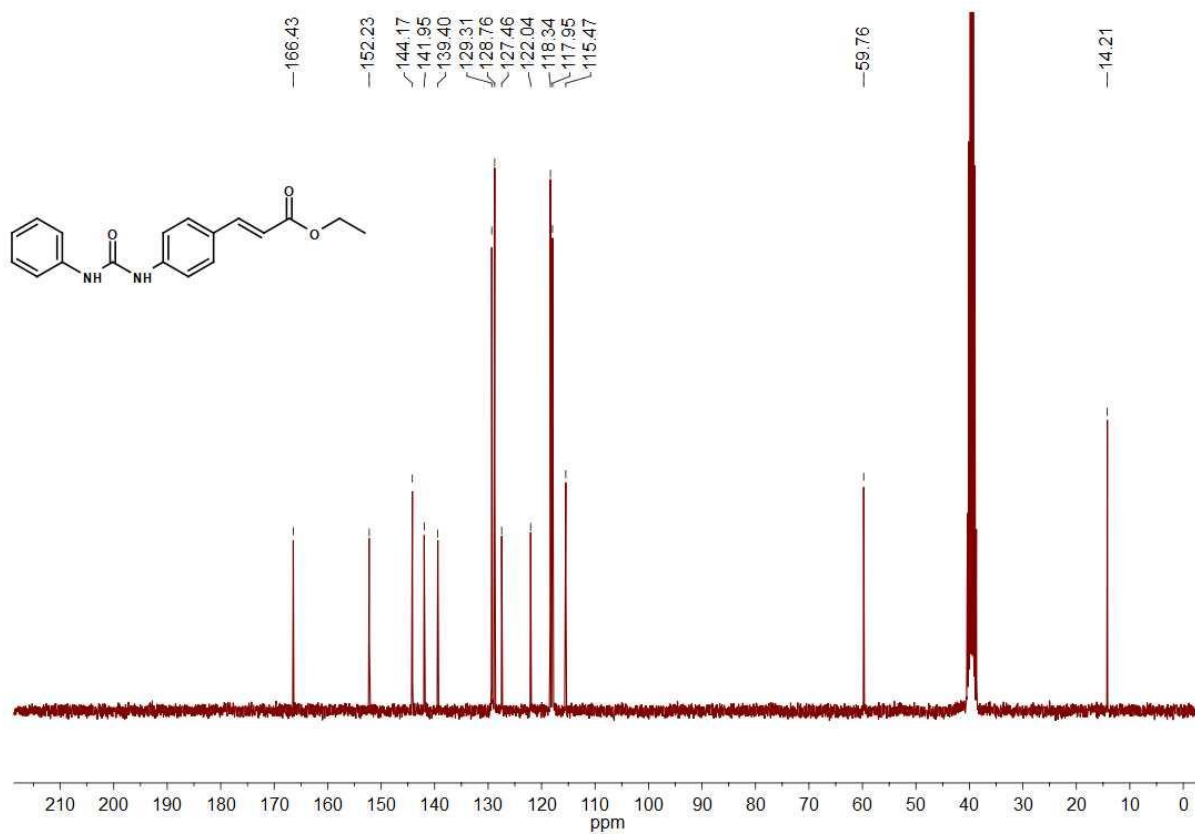
PDA Ch1 254nm 4nm

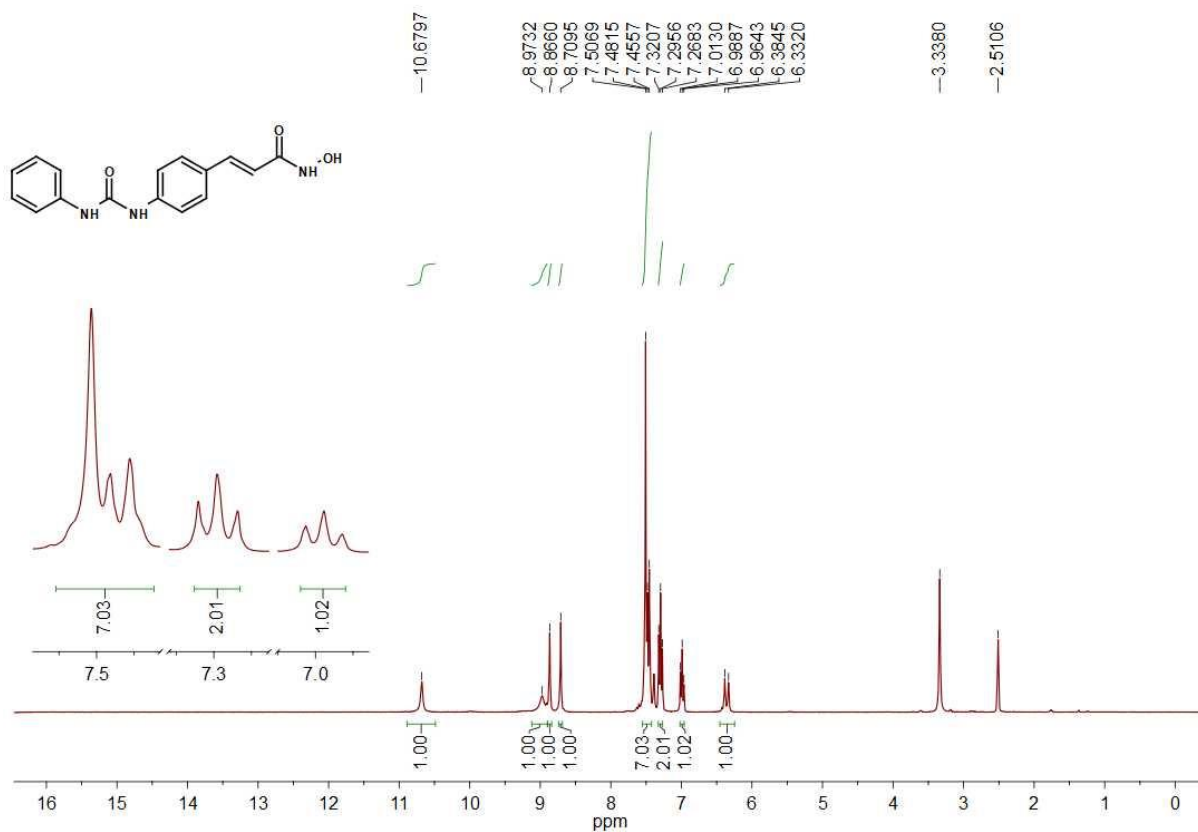
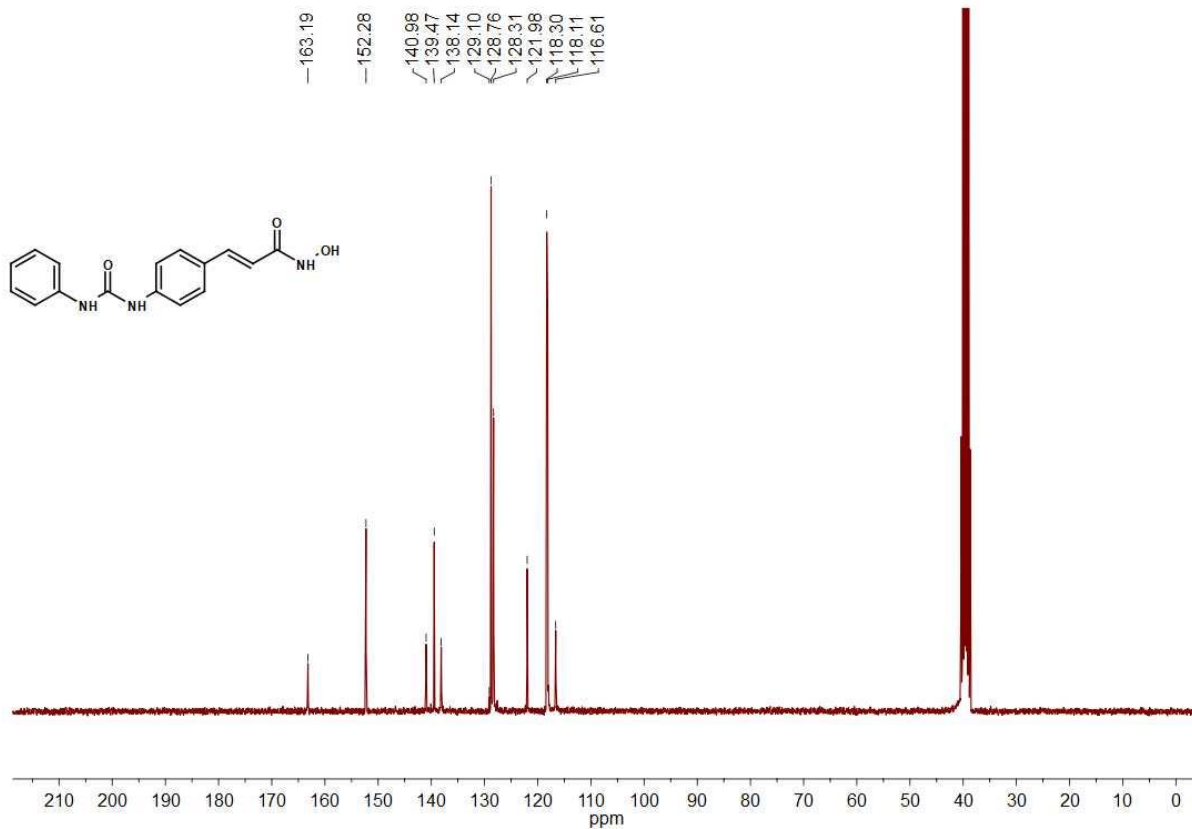
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	11.393	8413431	1713014	99.731	99.788
2	12.441	22656	3643	0.269	0.212
Total		8436086	1716657	100.000	100.000

Chromatogram Branco

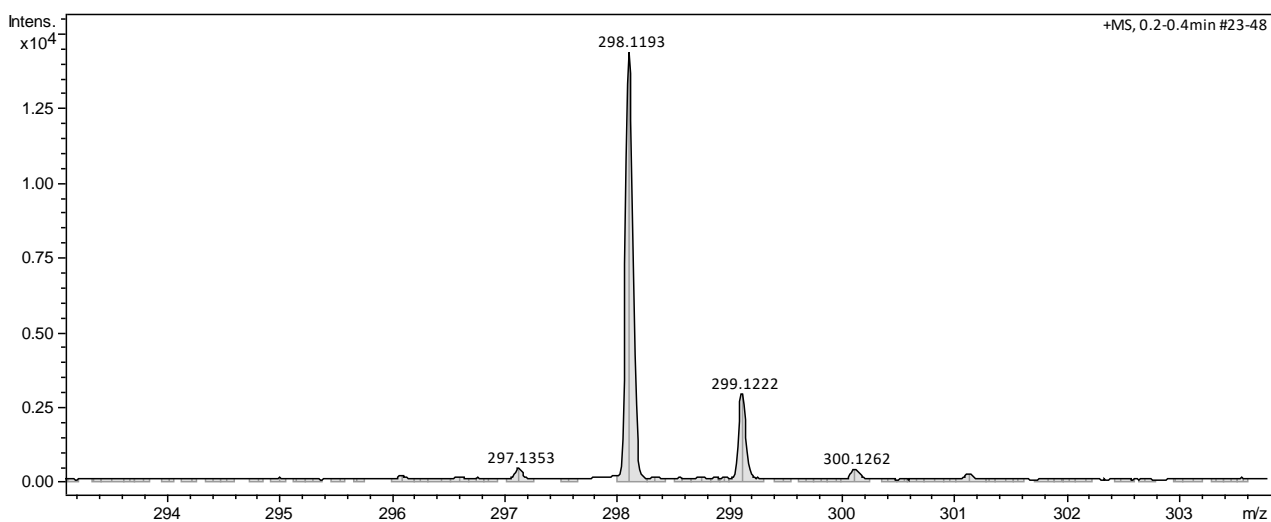
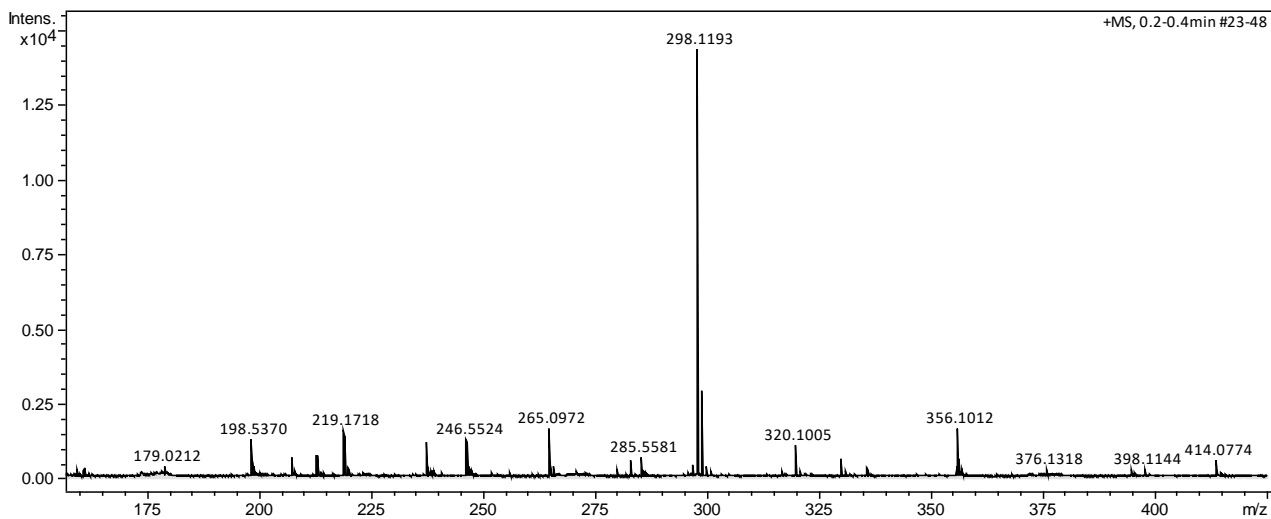


1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 9aEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 9a

Espectro de ^1H RMN do composto final 10aEspectro de ^{13}C RMN do composto final 10a

Espectro de HRMS do composto final 10a

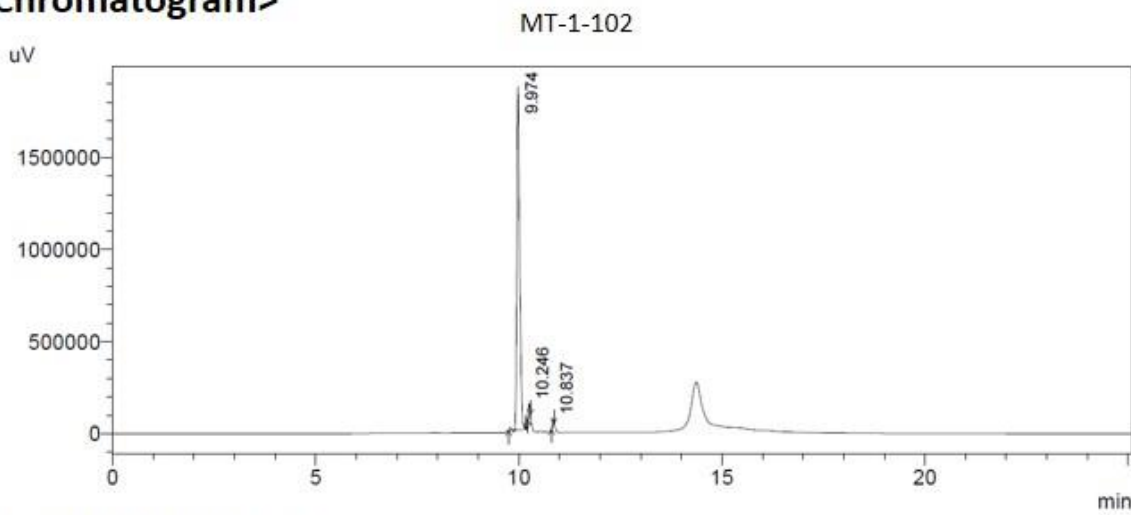


Cromatograma de CLAE do composto final 10a

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-102
 Vial # : 39
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-102.lcd
 Method File Name : acetonitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 05/12/2018 14:37:00
 Data Processed : 01/02/2019 13:58:46

<Chromatogram>



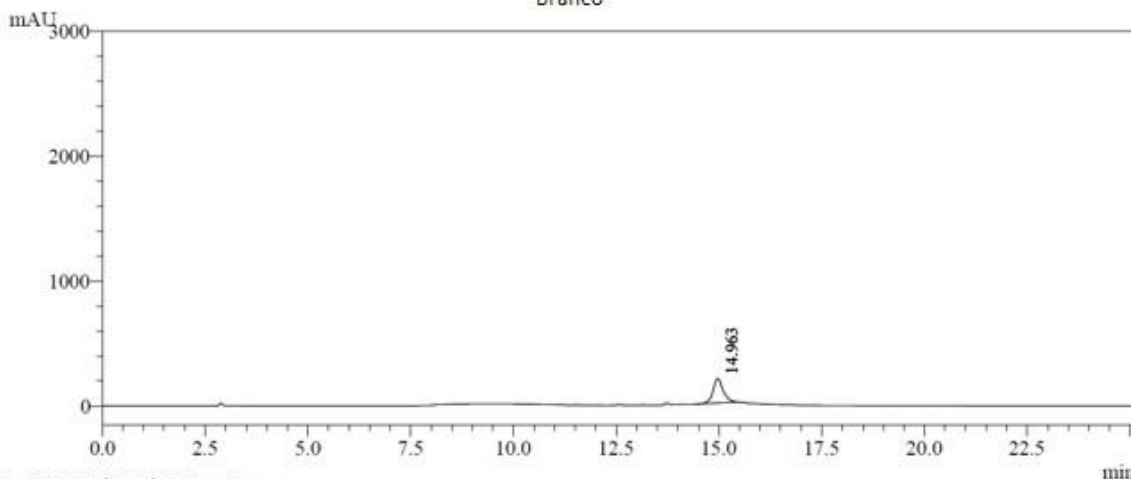
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

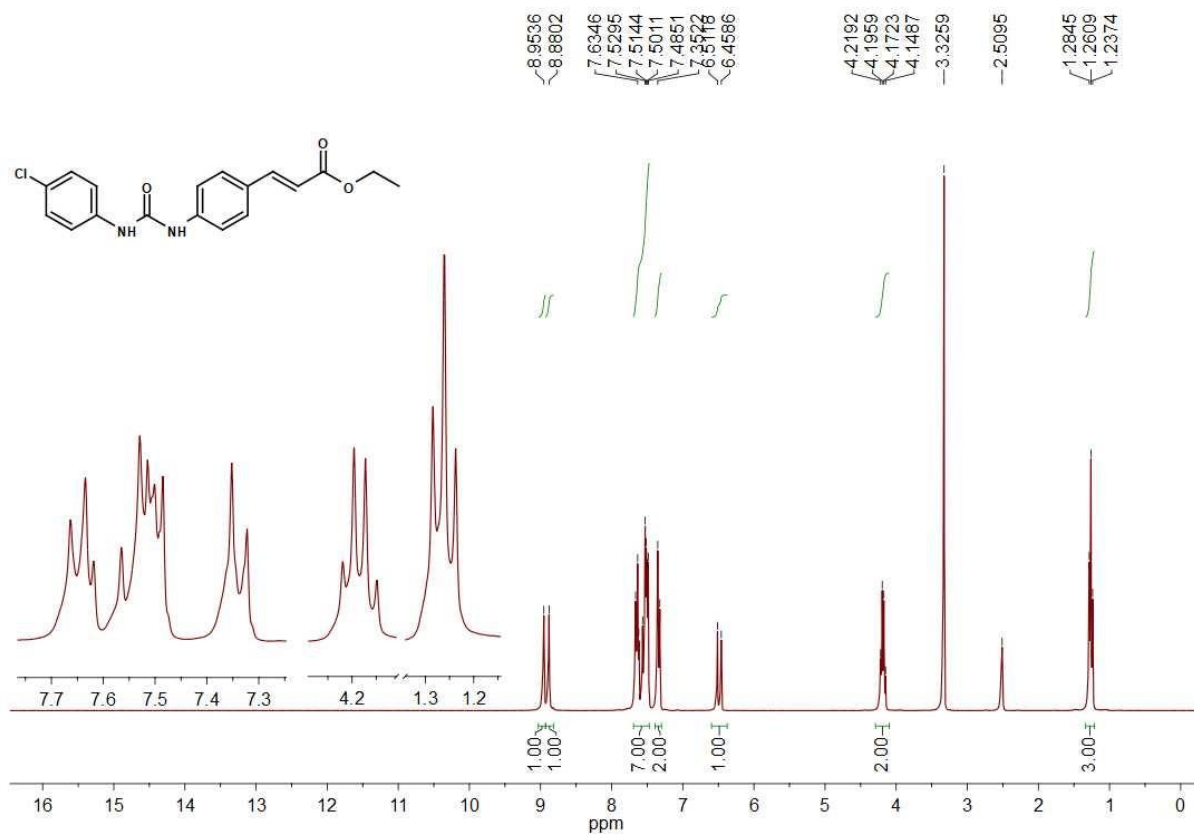
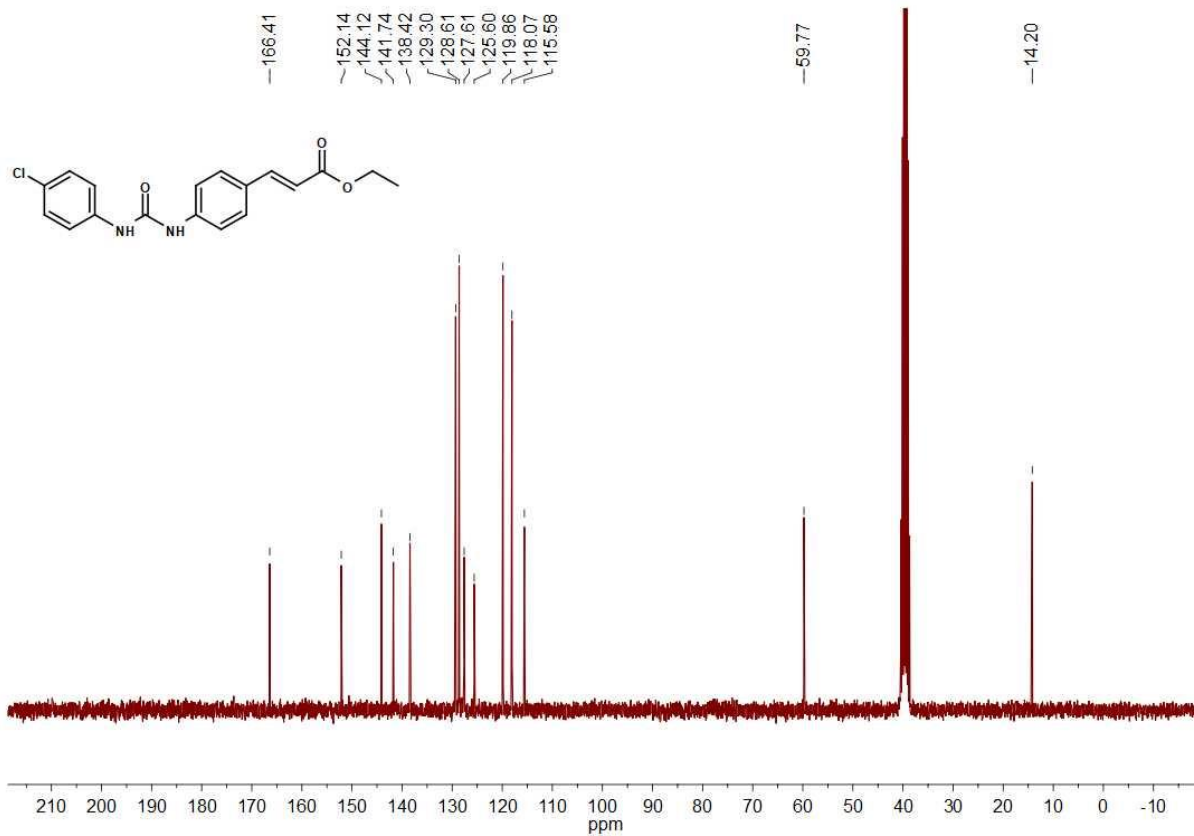
PDA Ch1 254nm 4nm

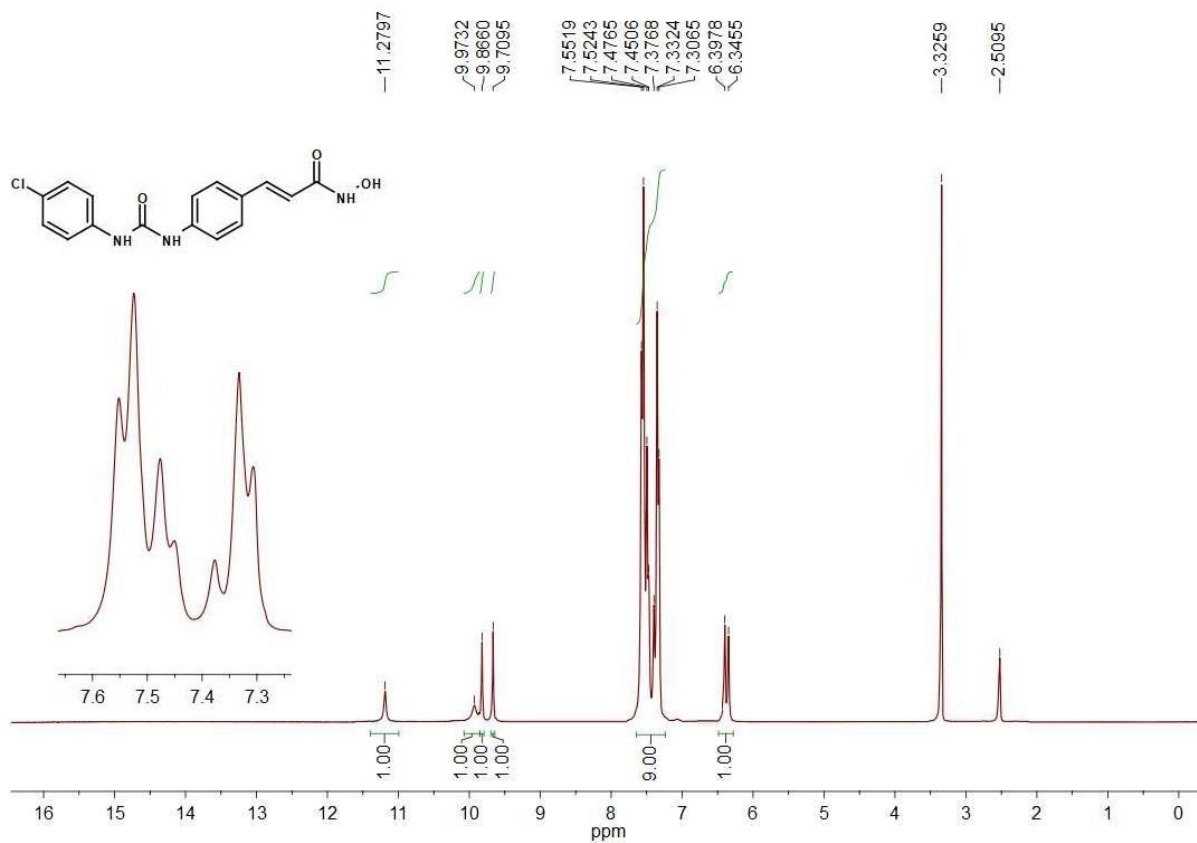
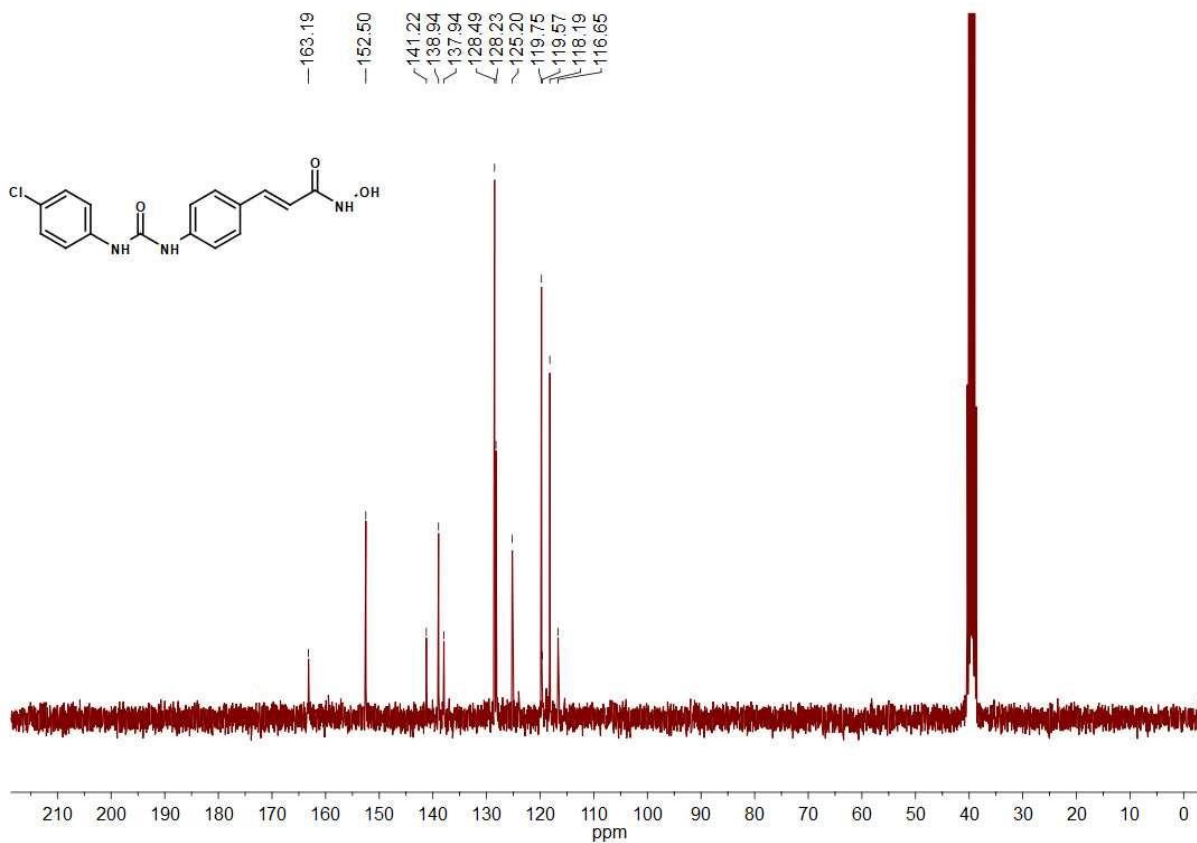
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.974	8862225	1867214	96.981	94.161
2	10.246	177801	76160	1.946	3.841
3	10.837	98125	39623	1.074	1.998
Total		9138151	1982996	100.000	100.000

Chromatogram Branco



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 9bEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 9b

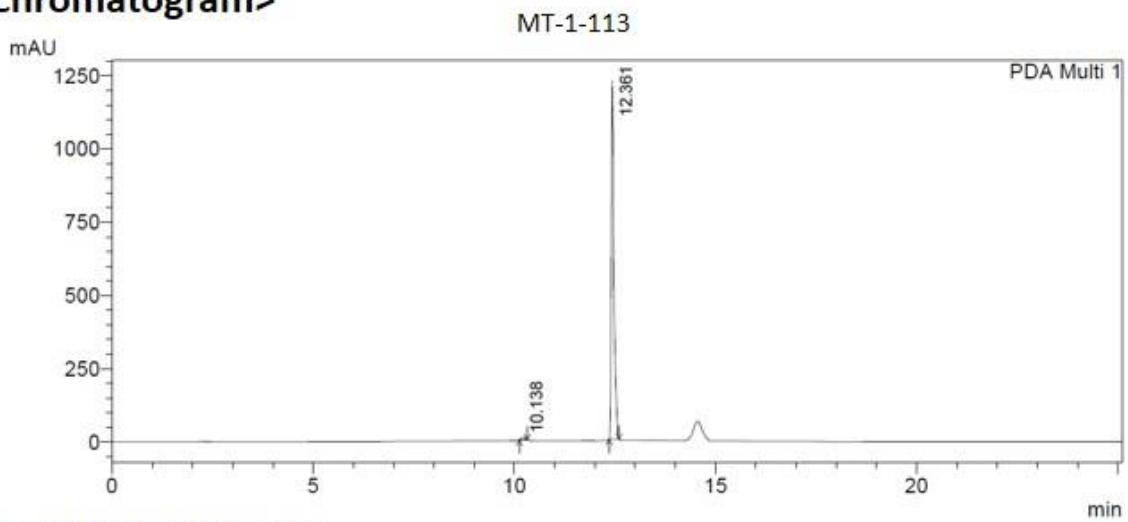
Espectro de ^1H RMN do composto final 10bEspectro de ^{13}C RMN do composto final 10b

Cromatograma de CLAE do composto final 10b

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-113
Vail # : 53
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : MT-1-113.lcd
Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 16/12/2018 14:22:36
Data Processed : 17/01/2019 11:49:03

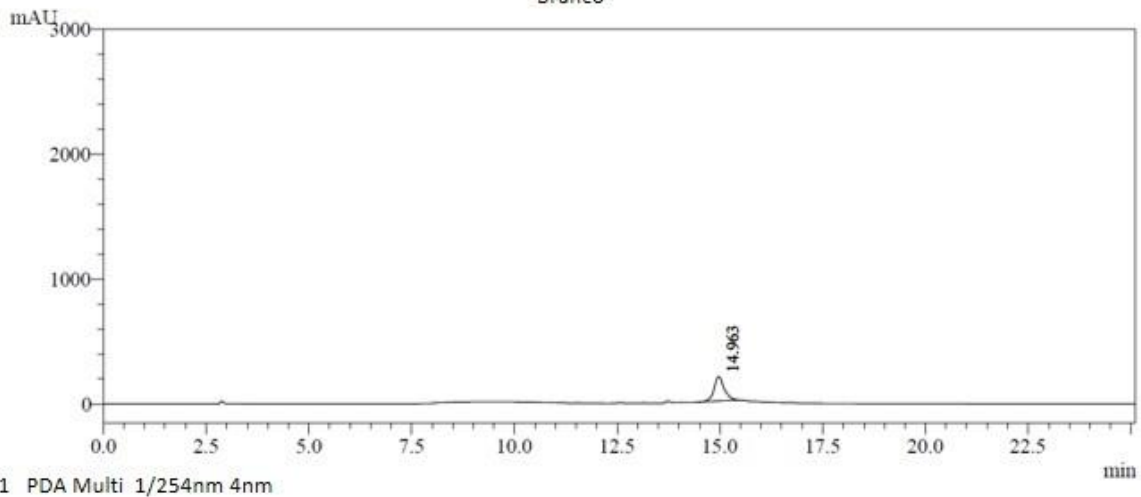
<Chromatogram>

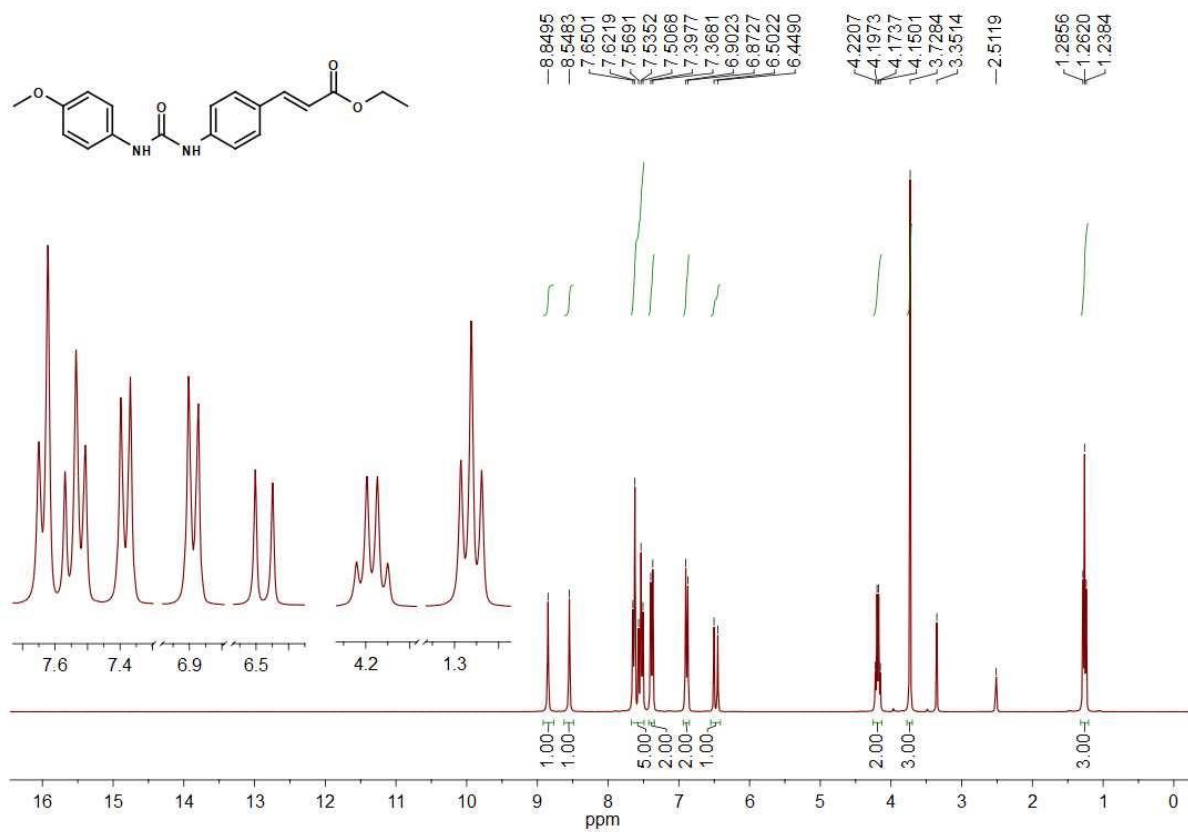
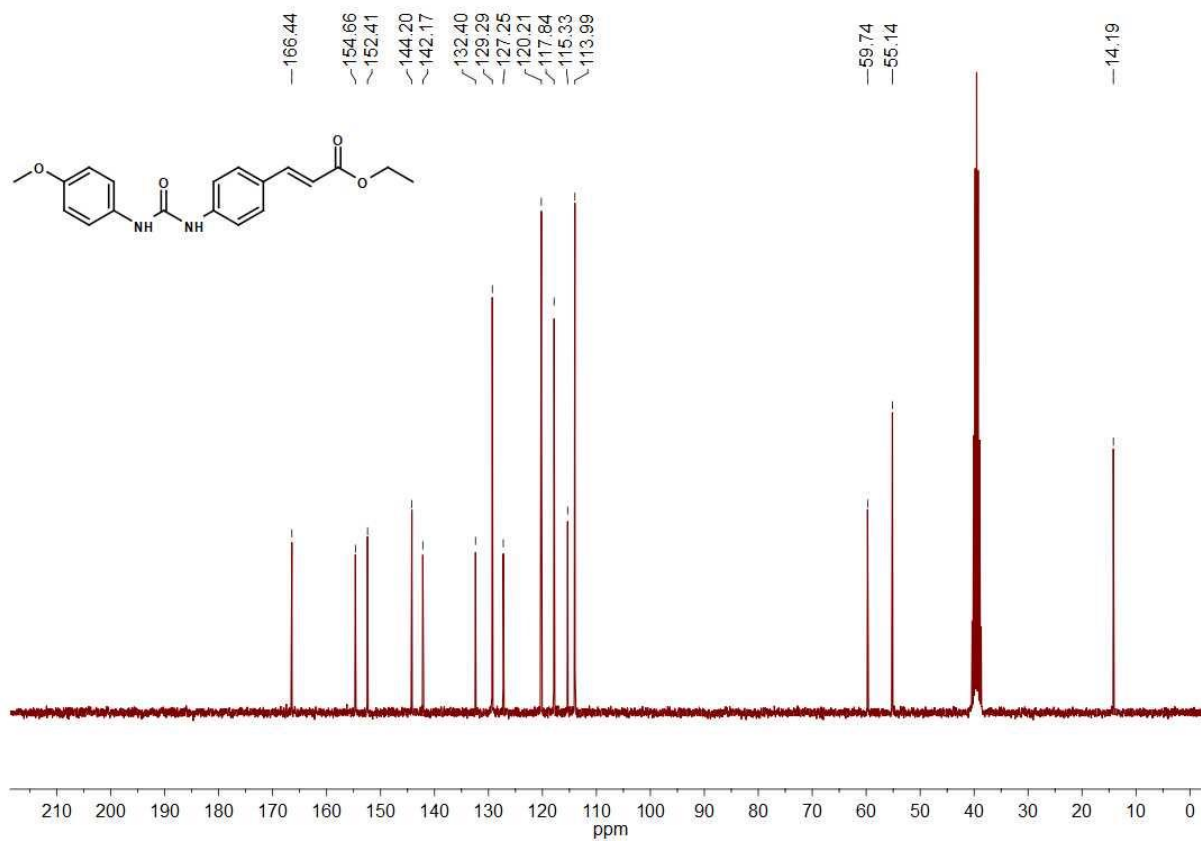


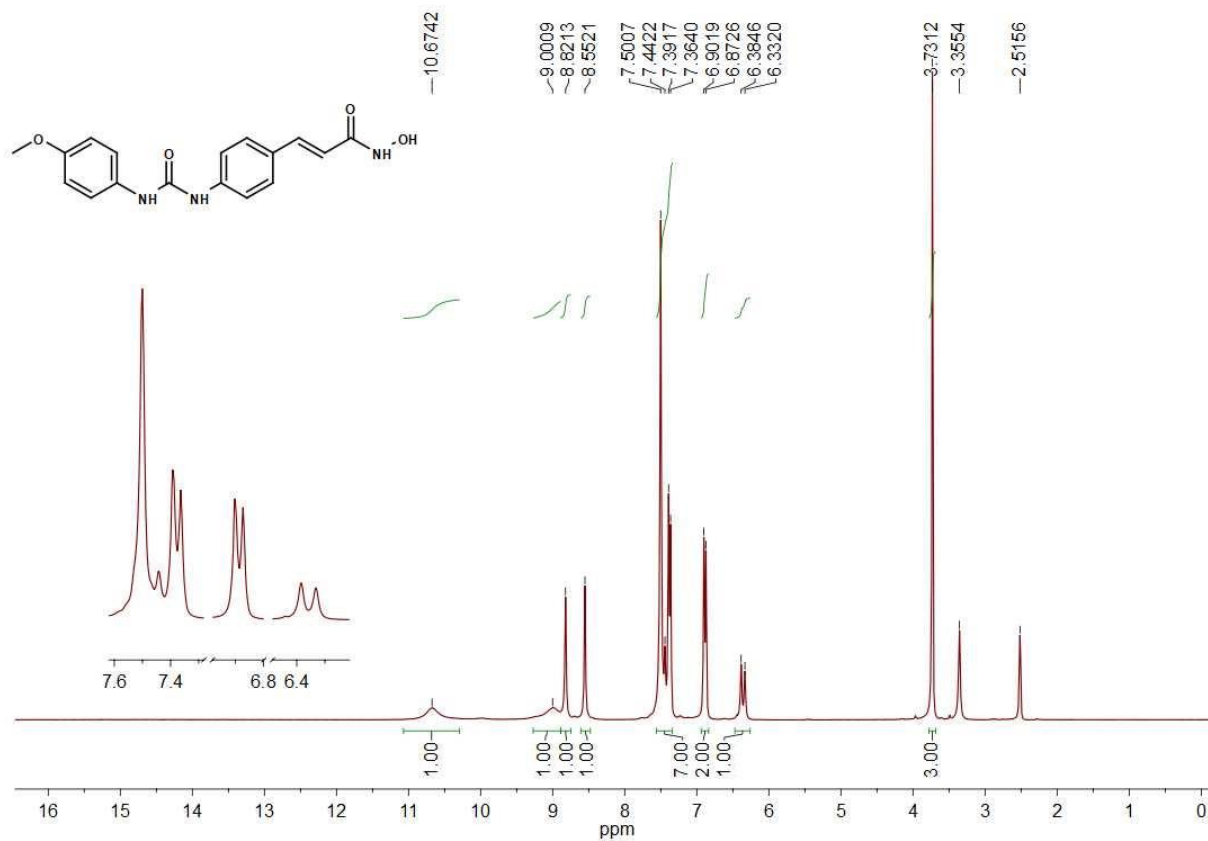
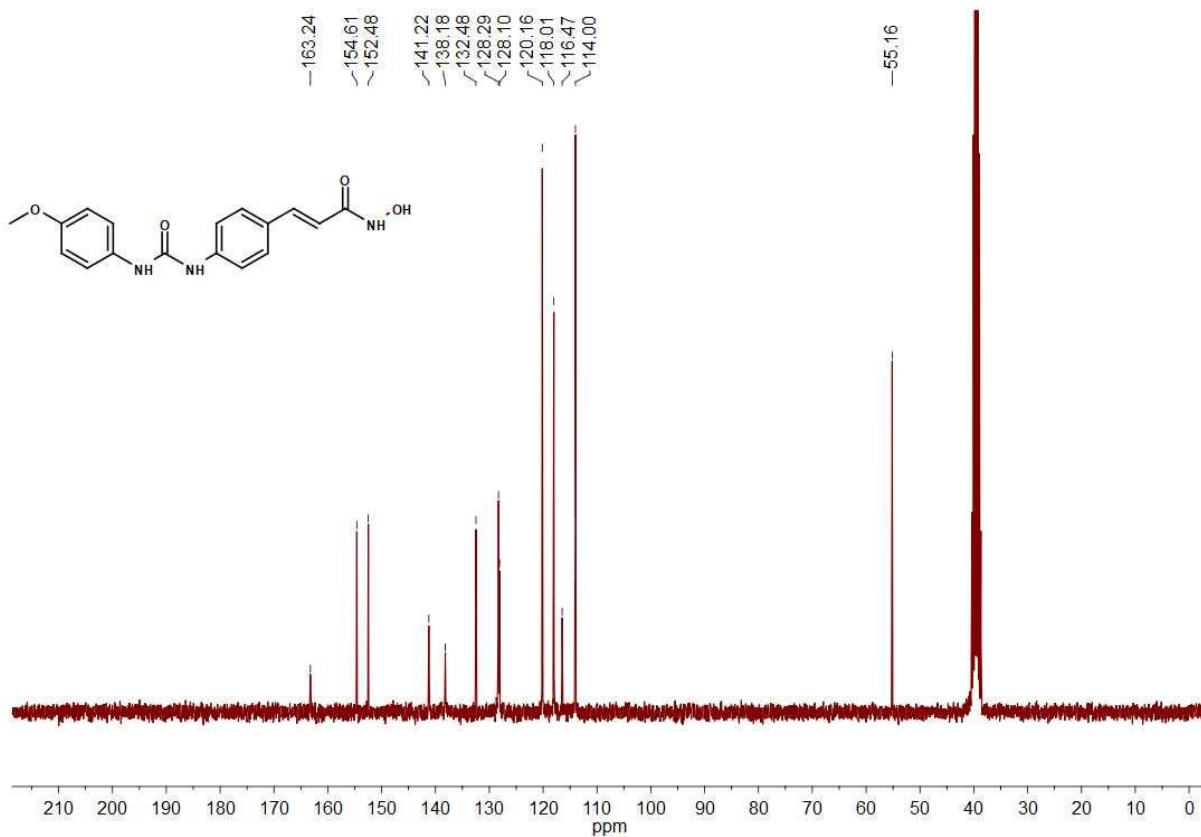
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.138	41544	5821	1.072	0.694
2	12.361	3832617	833245	98.928	99.306
Total		3874161	839066	100.000	100.000

Chromatogram Branco



Espectro de ^1H RMN do intermediário 9cEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 9c

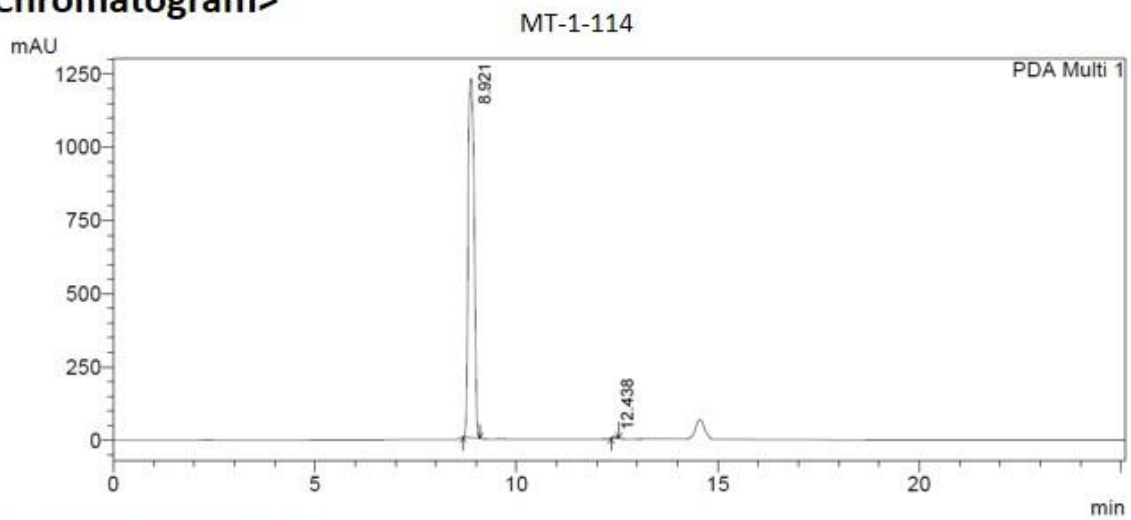
Espectro de ^1H RMN do composto final 10cEspectro de ^{13}C RMN do composto final 10c

Cromatograma de CLAE do composto final 10c

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : MT-1-114
Vial # : 57
Injection Volume : 25 uL
Data File Name : MT-1-114.lcd
Method File Name : acetonitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
Batch File Name : batch.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 16/12/2018 16:09:01
Data Processed : 17/01/2019 12:51:35

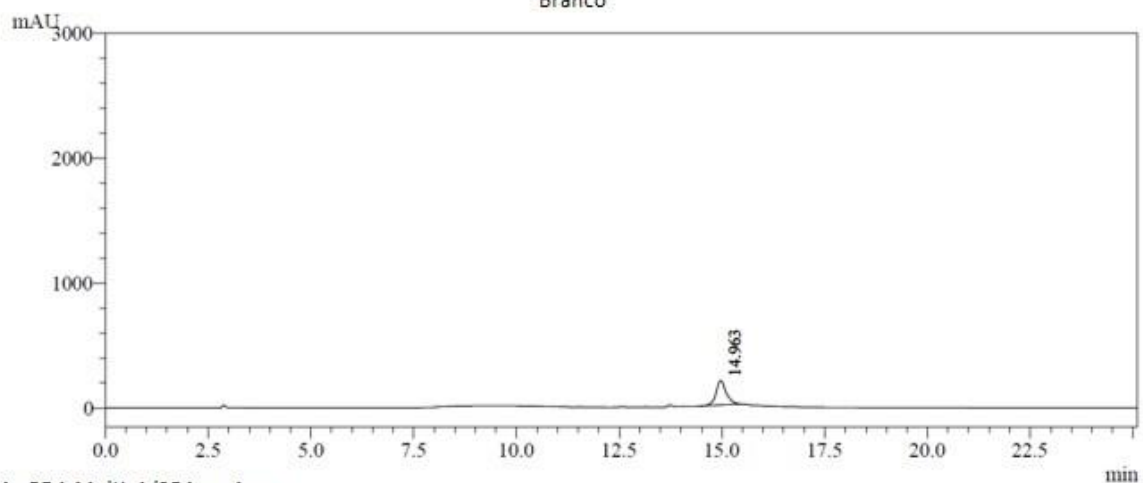
<Chromatogram>

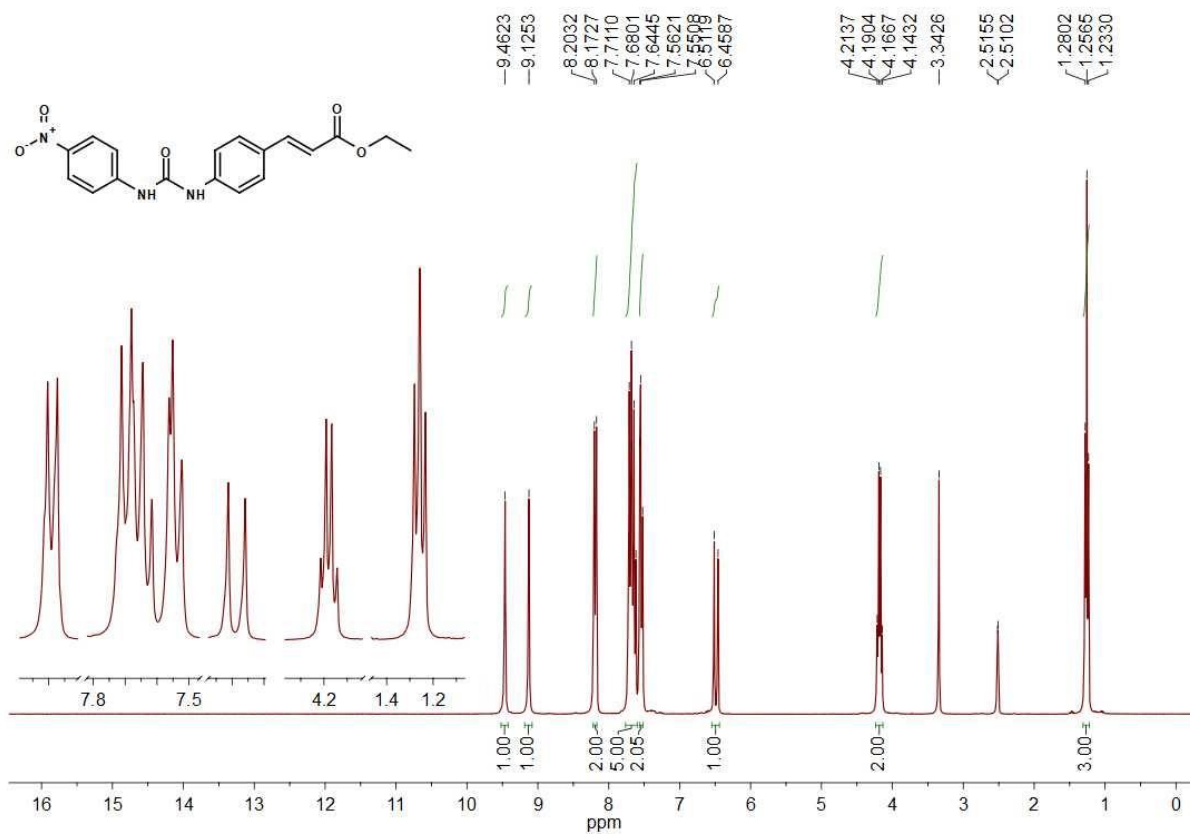
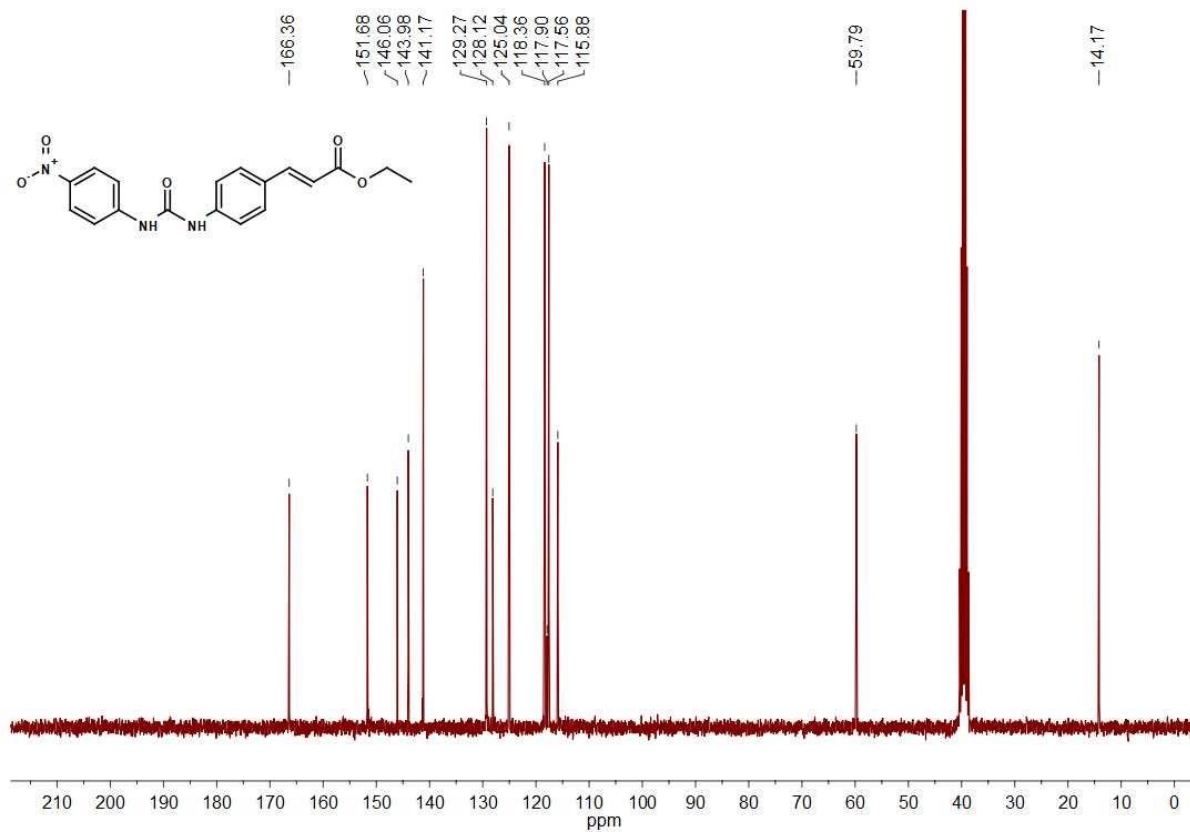


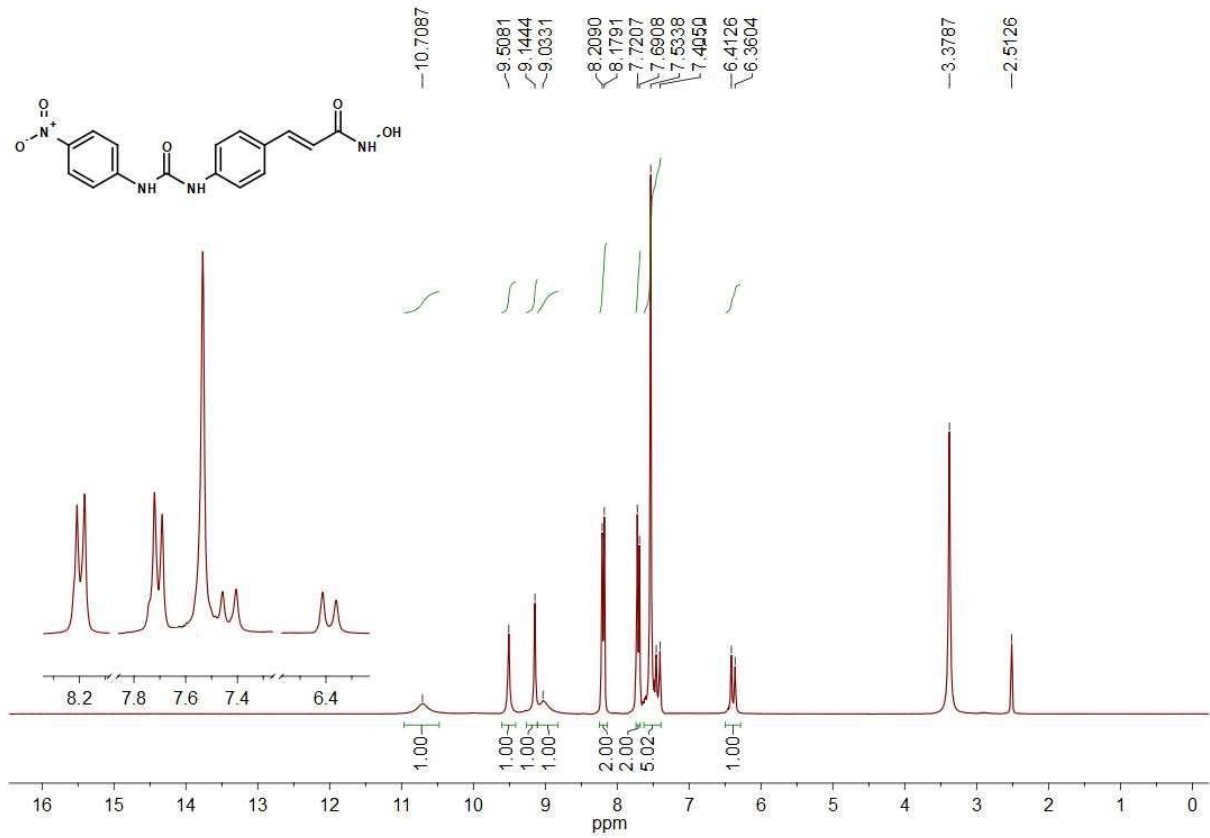
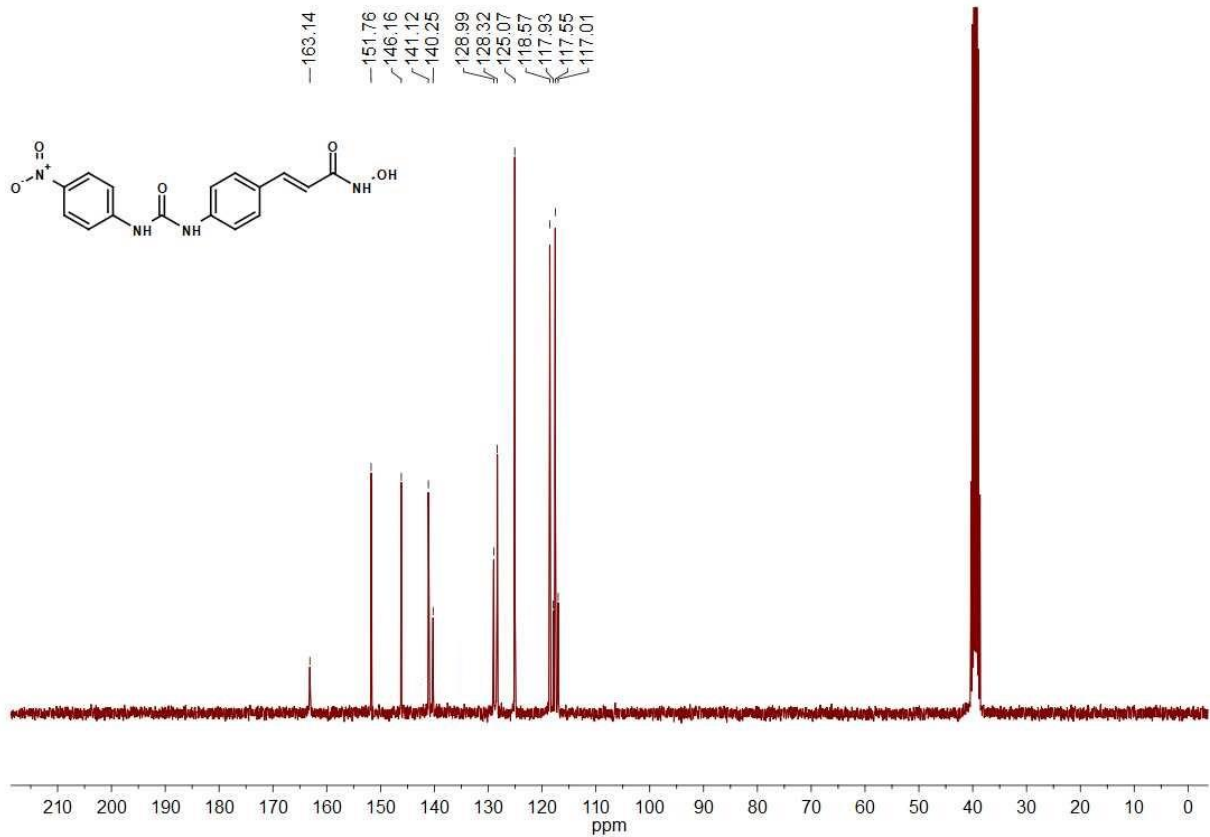
Peak Table

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.921	20892812	2517972	99.885	99.856
2	12.438	24121	3630	0.115	0.144
Total		20916933	2521602	100.000	100.000

Chromatogram
Branco

Espectro de ^1H RMN do intermediário 9dEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 9d

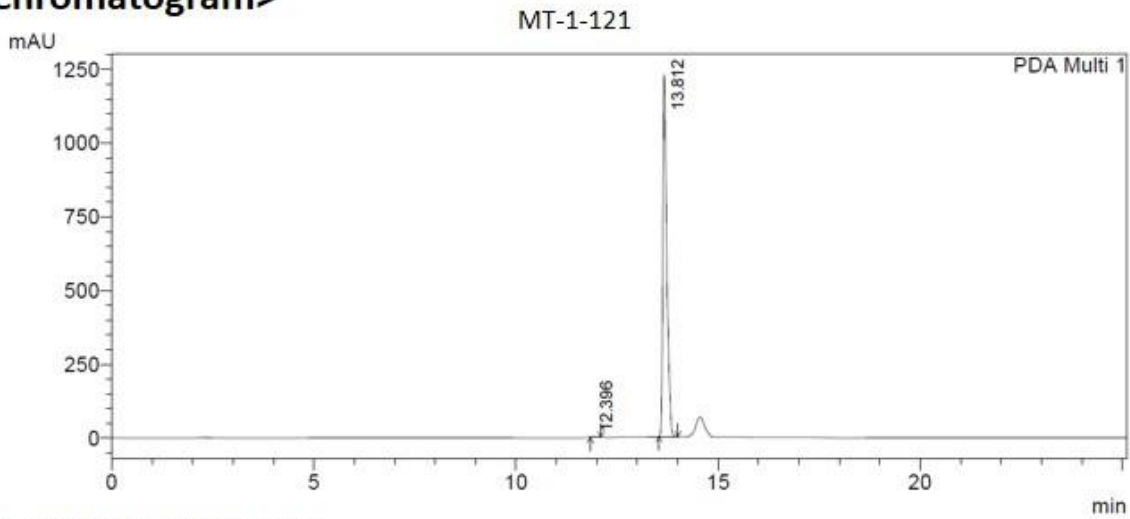
Espectro de ^1H RMN do composto final 10dEspectro de ^{13}C RMN do composto final 10d

Cromatograma de CLAE do composto final 10d

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-121
 Vial # : 47
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-121.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 16/12/2018 14:26:01
 Data Processed : 17/01/2019 13:47:44

<Chromatogram>

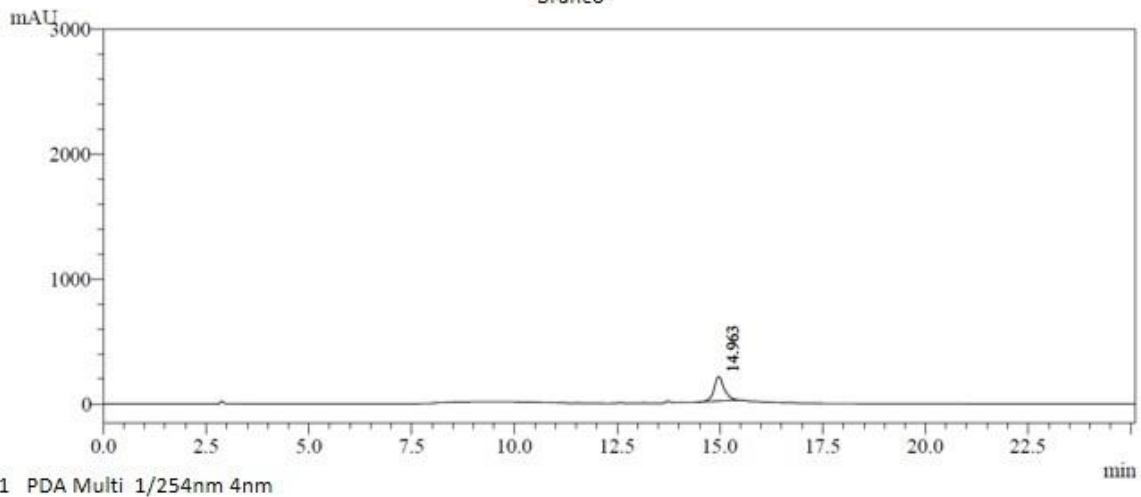


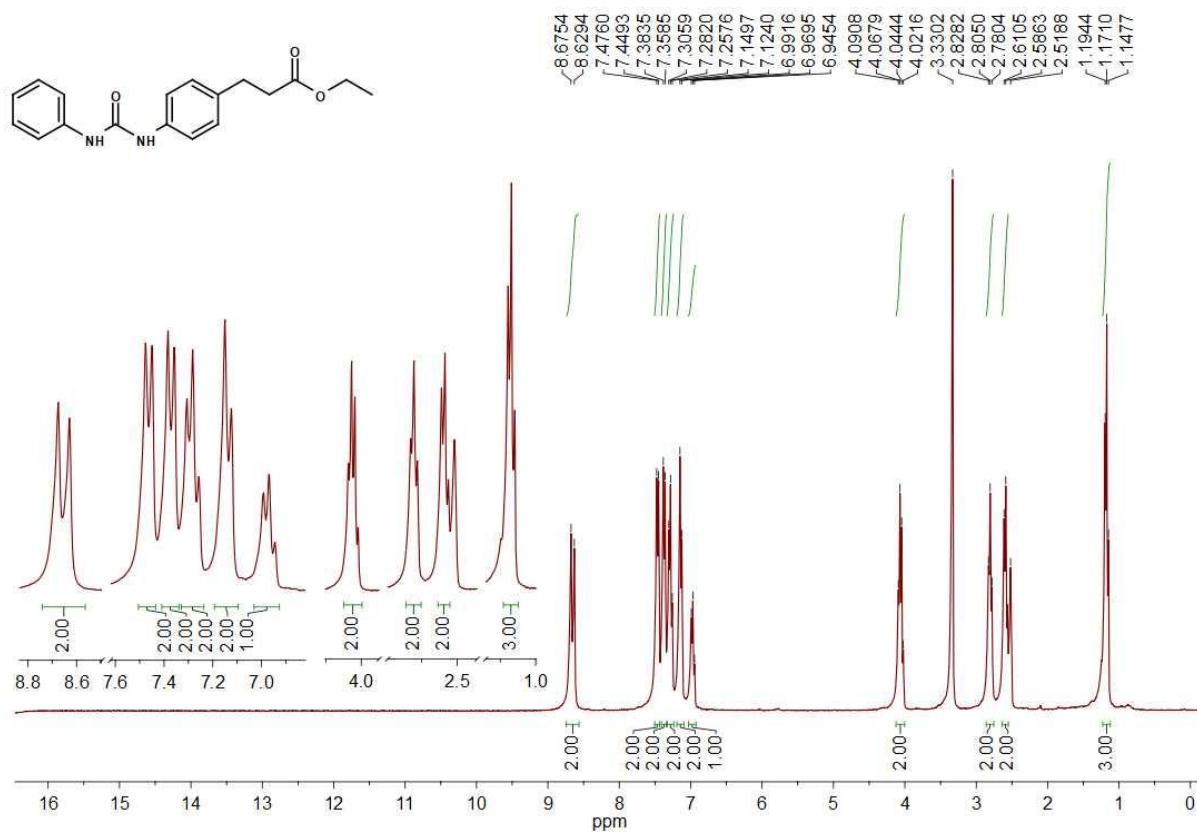
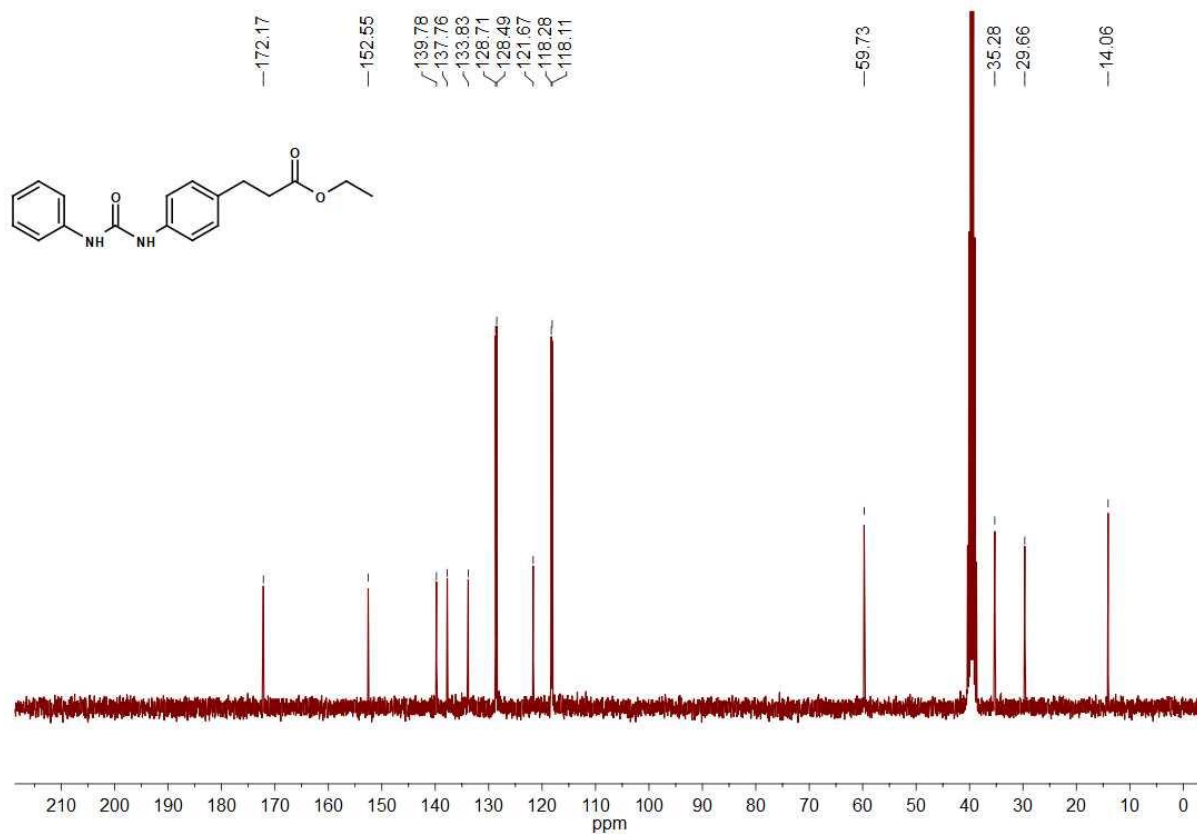
Peak Table

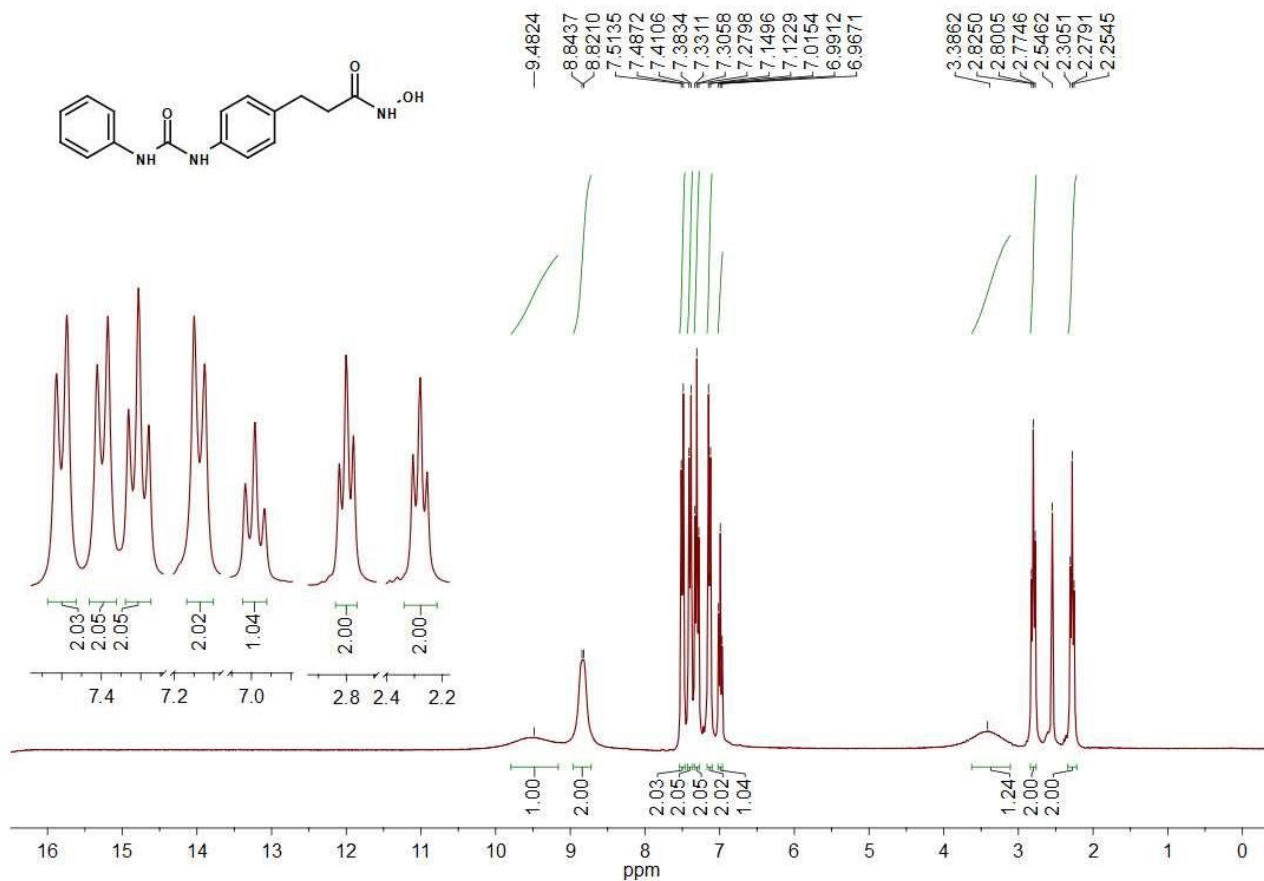
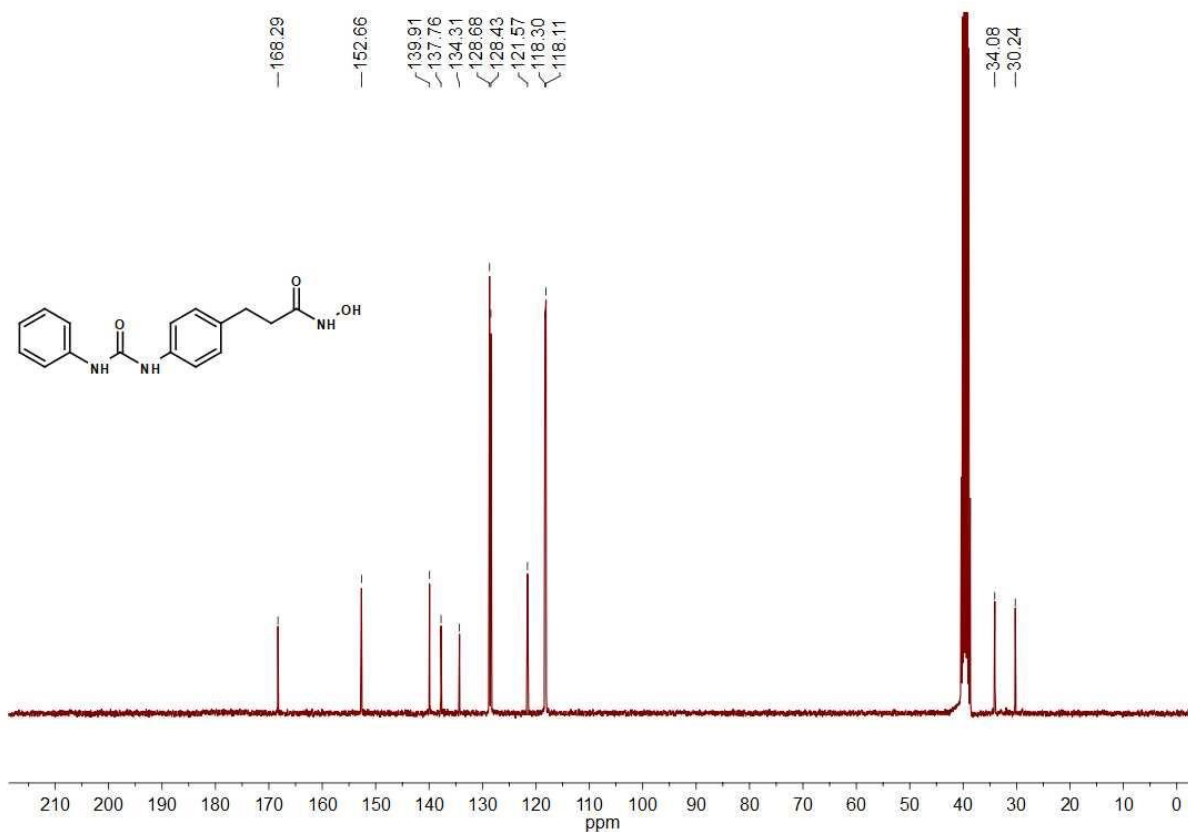
PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	12.396	32984	4564	0.188	0.142
2	13.812	17549266	3204655	99.812	99.858
Total		17582250	3209219	100.000	100.000

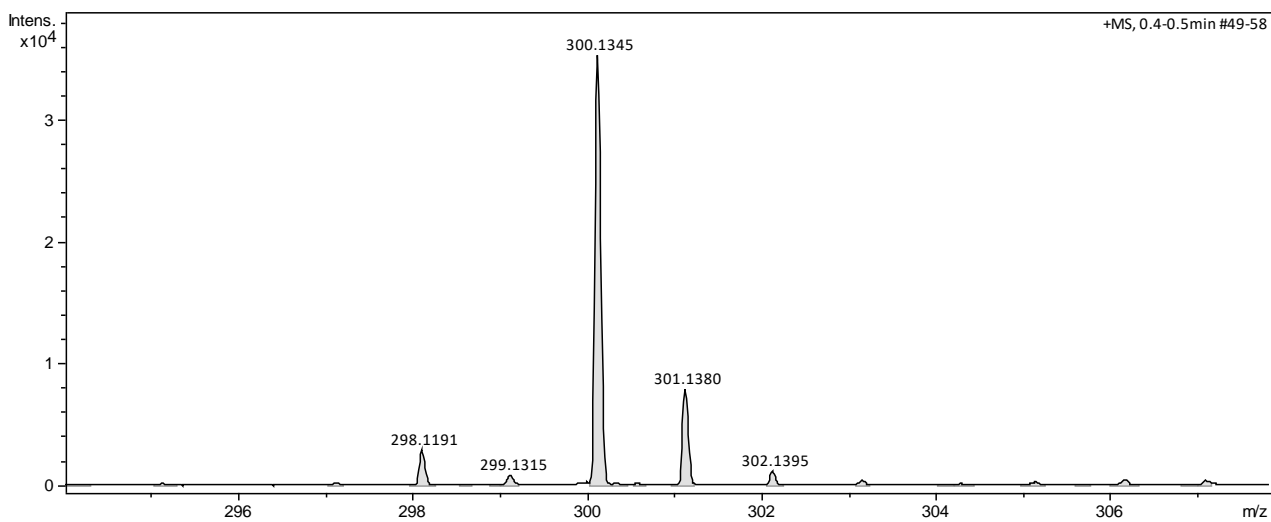
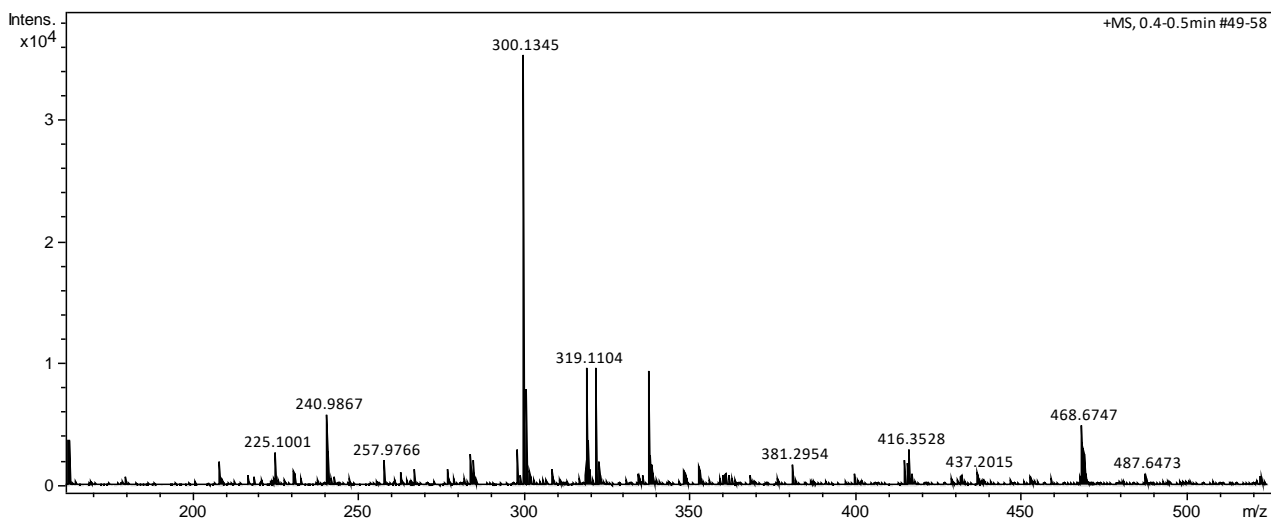
Chromatogram Branco



Espectro de ^1H RMN do intermediário 12aEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 12a

Espectro de ^1H RMN do composto final 13aEspectro de ^{13}C RMN do composto final 13a

Espectro de HRMS do composto final 13a

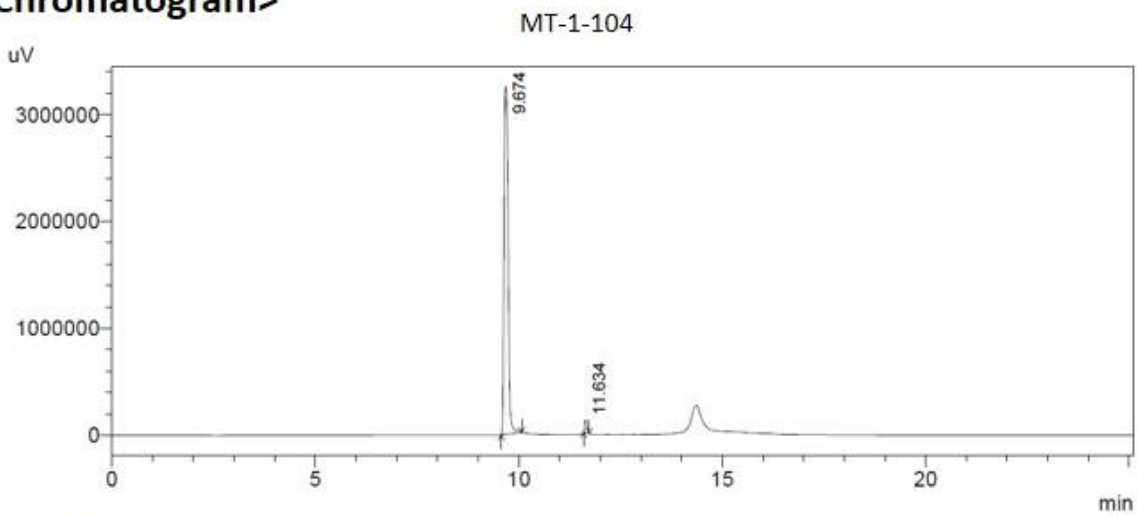


Cromatograma de CLAE do composto final 13a

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-104
 Vail # : 40
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-104.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 05/12/2018 15:49:42
 Data Processed : 31/01/2019 18:24:18

<Chromatogram>



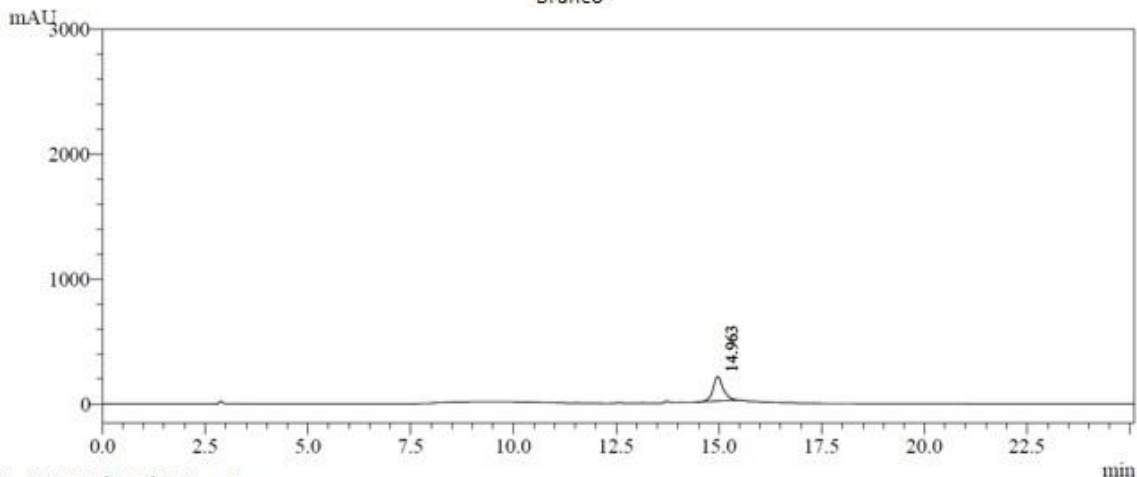
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Peak Table

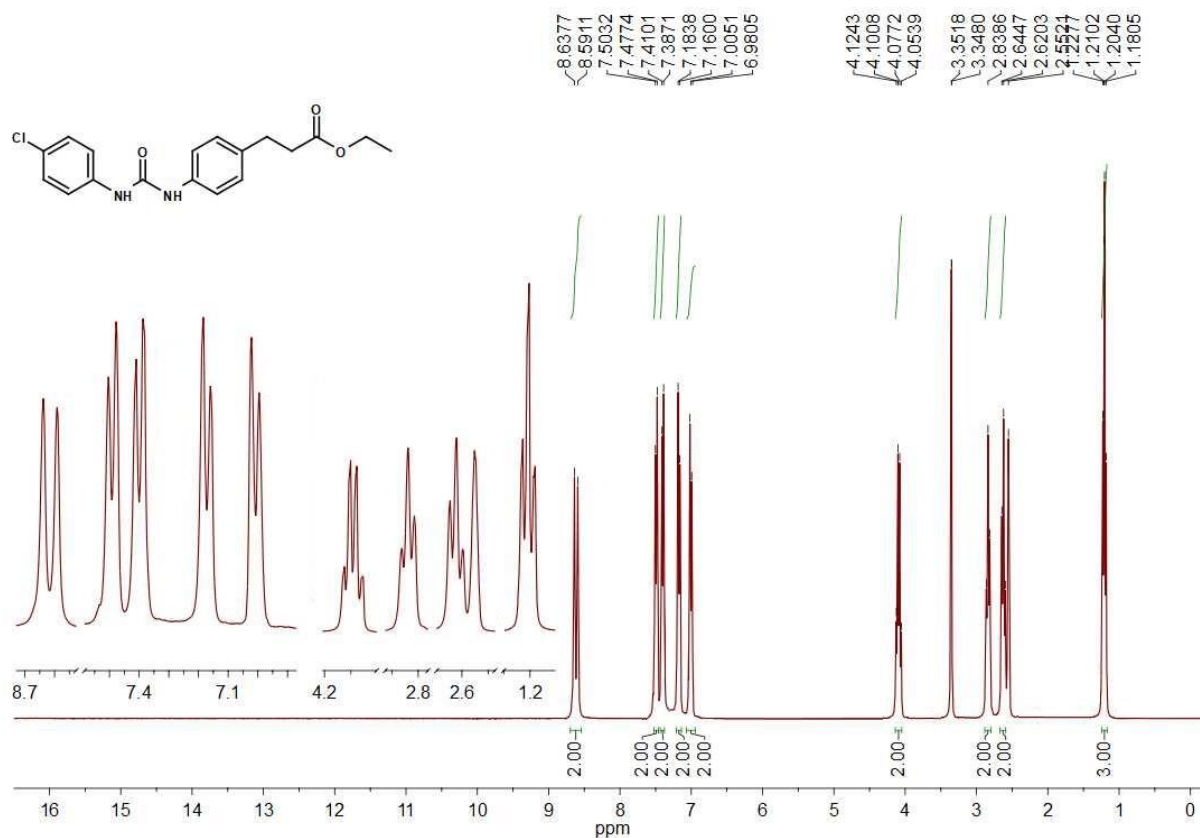
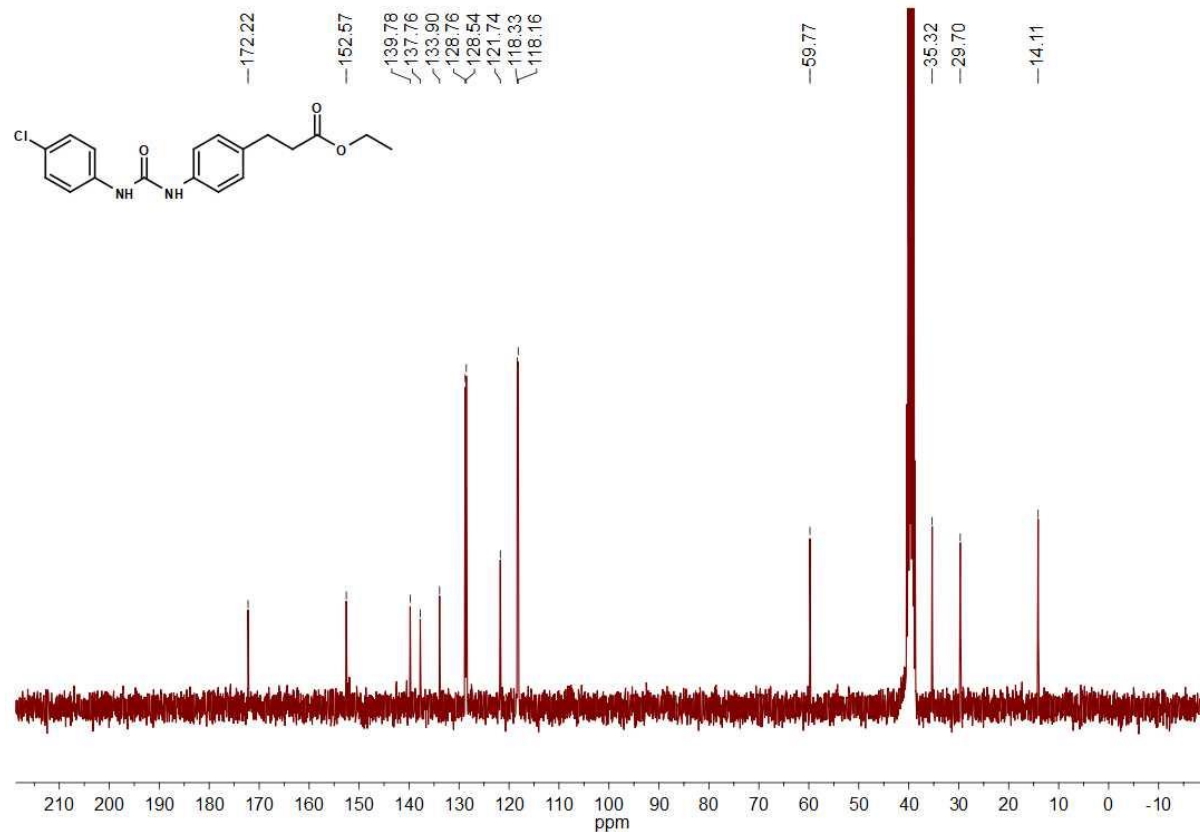
PDA Ch1 254nm 4nm

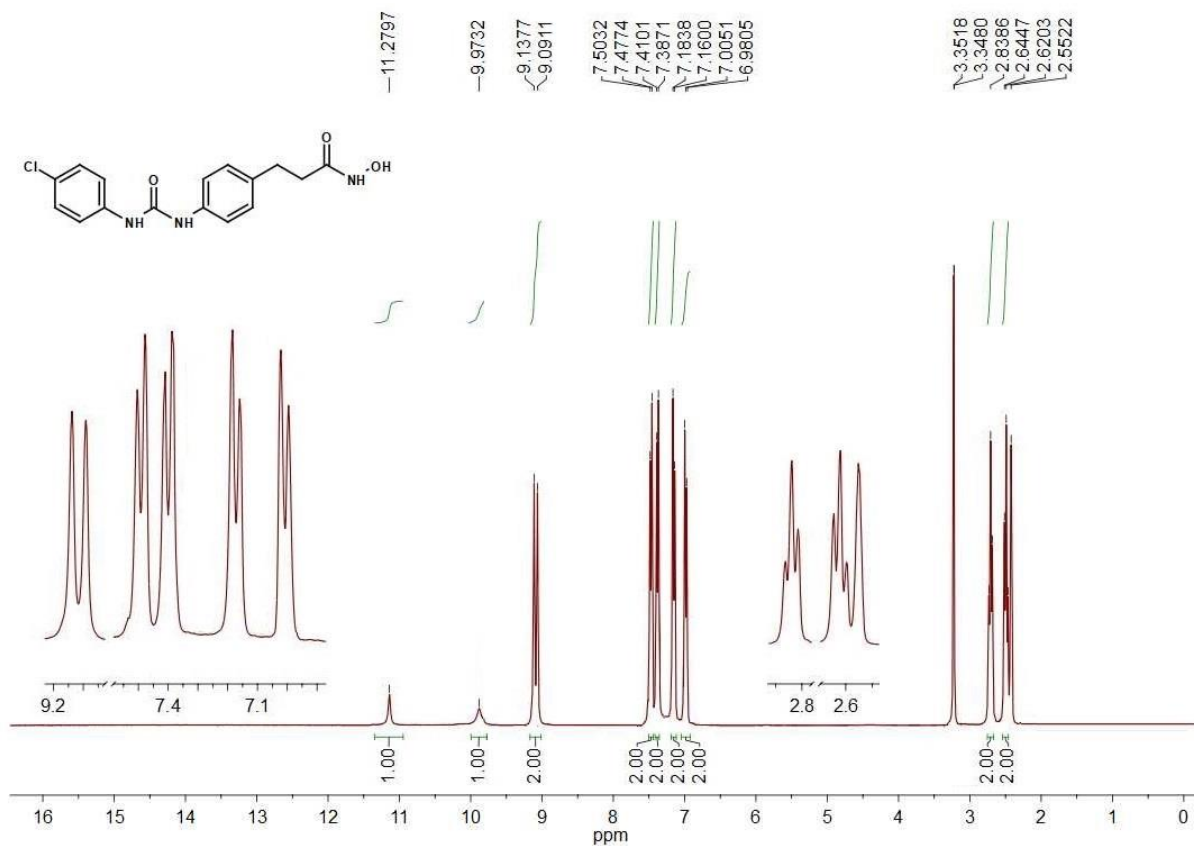
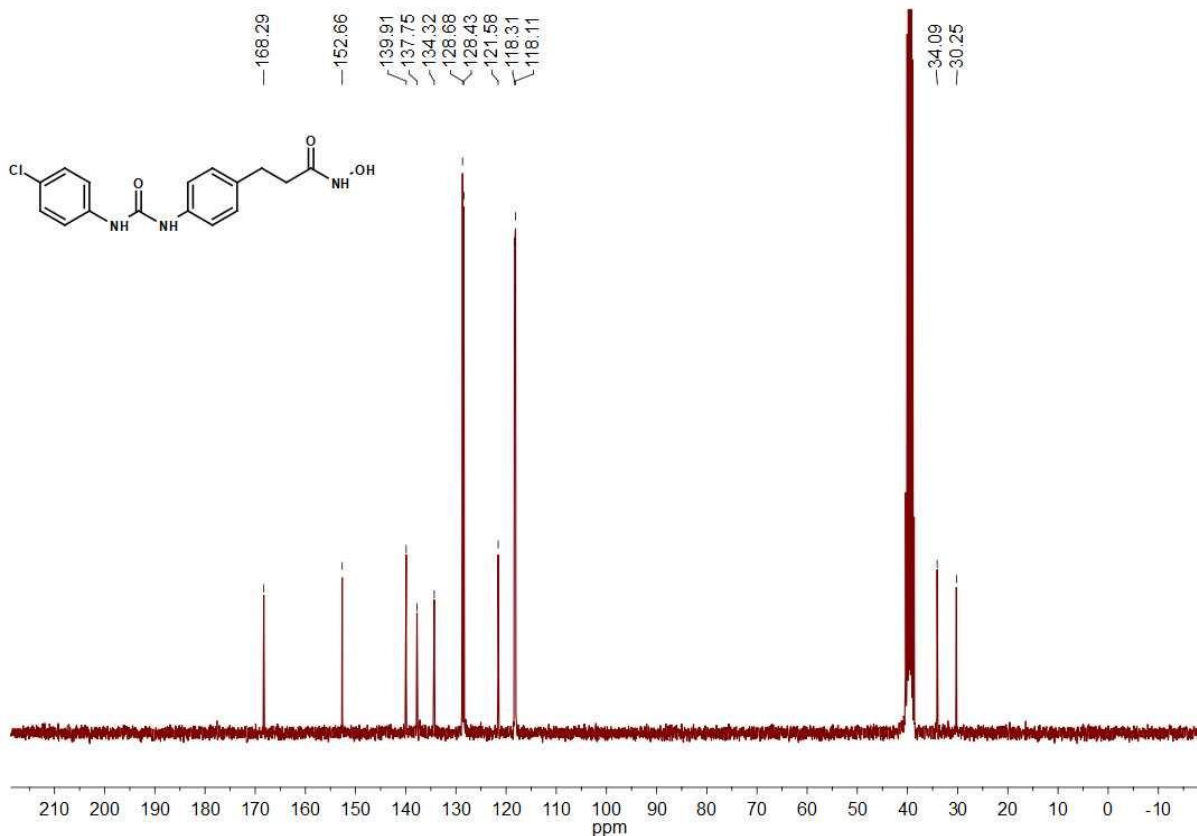
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	9.674	23391255	3254100	98.068	96.459
2	11.634	460740	119475	1.932	3.541
Total		23851996	3373575	100.000	100.000

Chromatogram Branco



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Espectro de ^1H RMN do intermediário 12bEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 12b

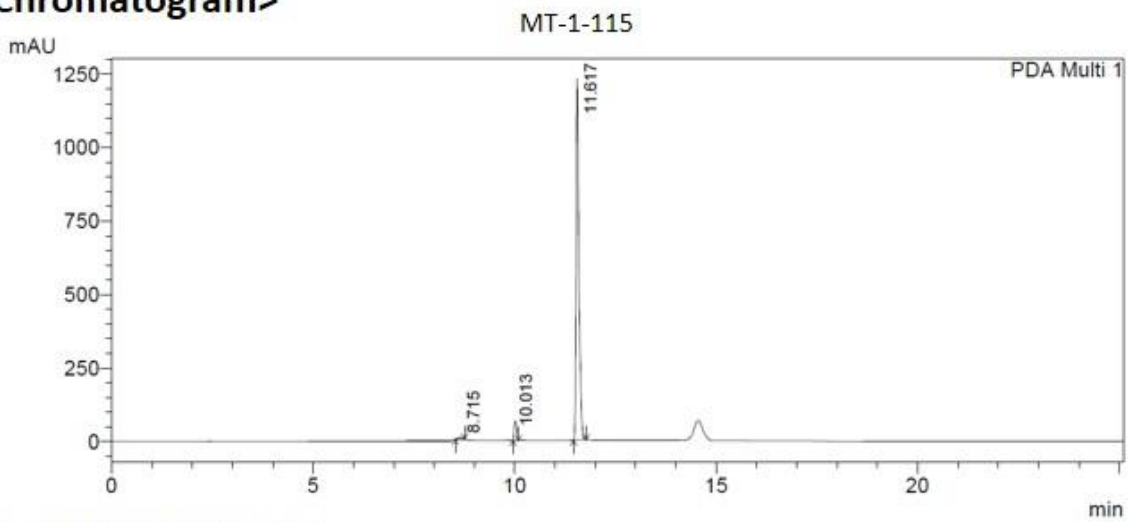
Espectro de ^1H RMN do composto final 13bEspectro de ^{13}C RMN do composto final 13b

Cromatograma de CLAE do composto final 13b

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-115
 Vial # : 59
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-115.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 16/01/2019 08:48:24
 Data Processed : 16/01/2019 10:21:29

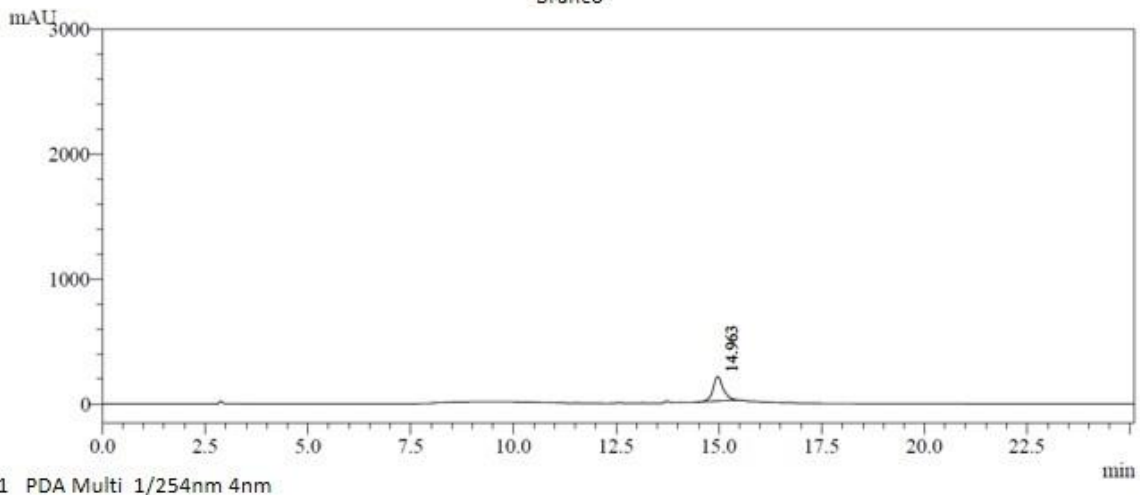
<Chromatogram>

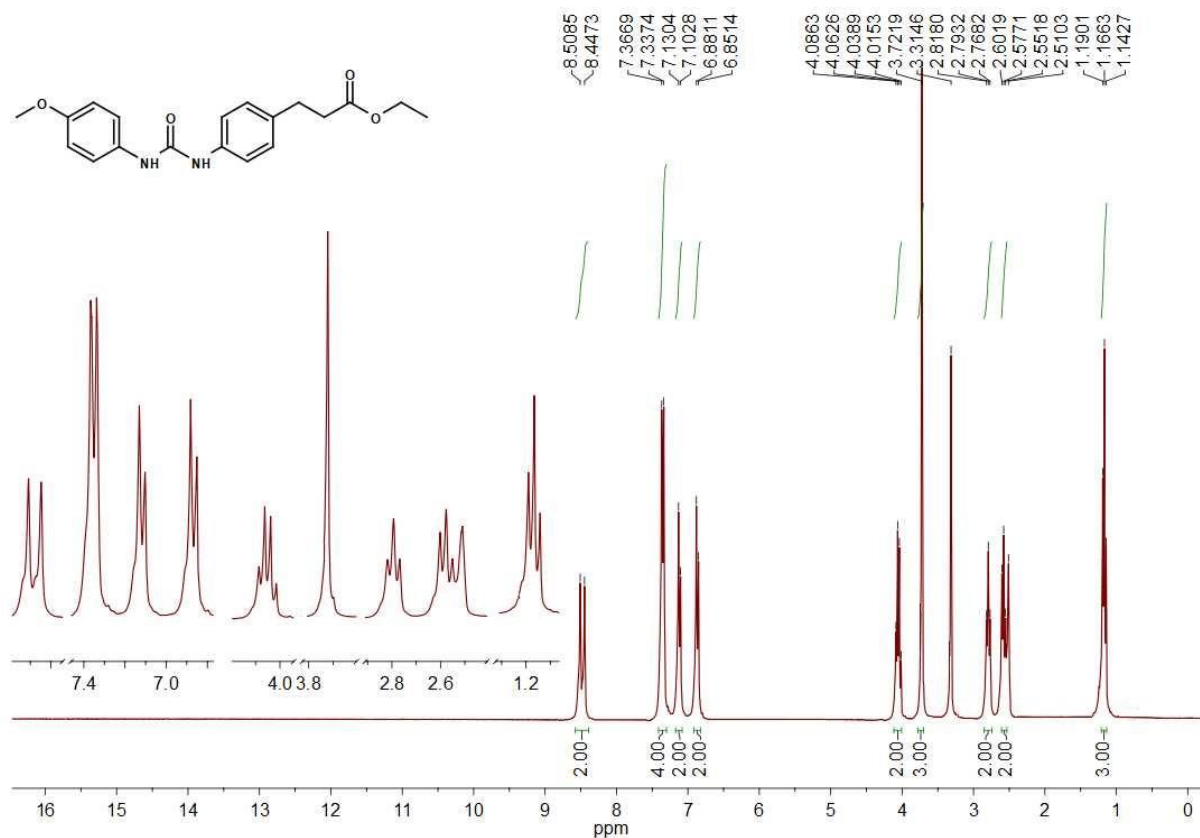
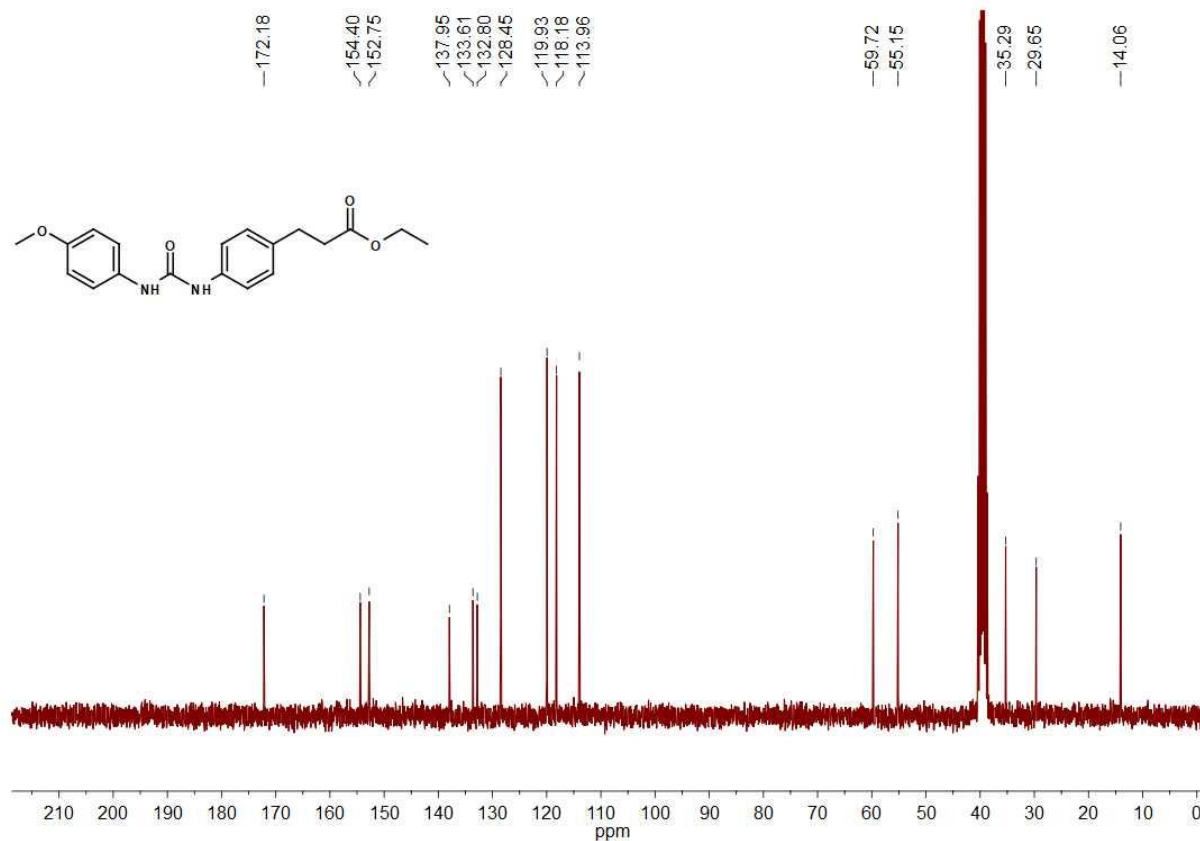


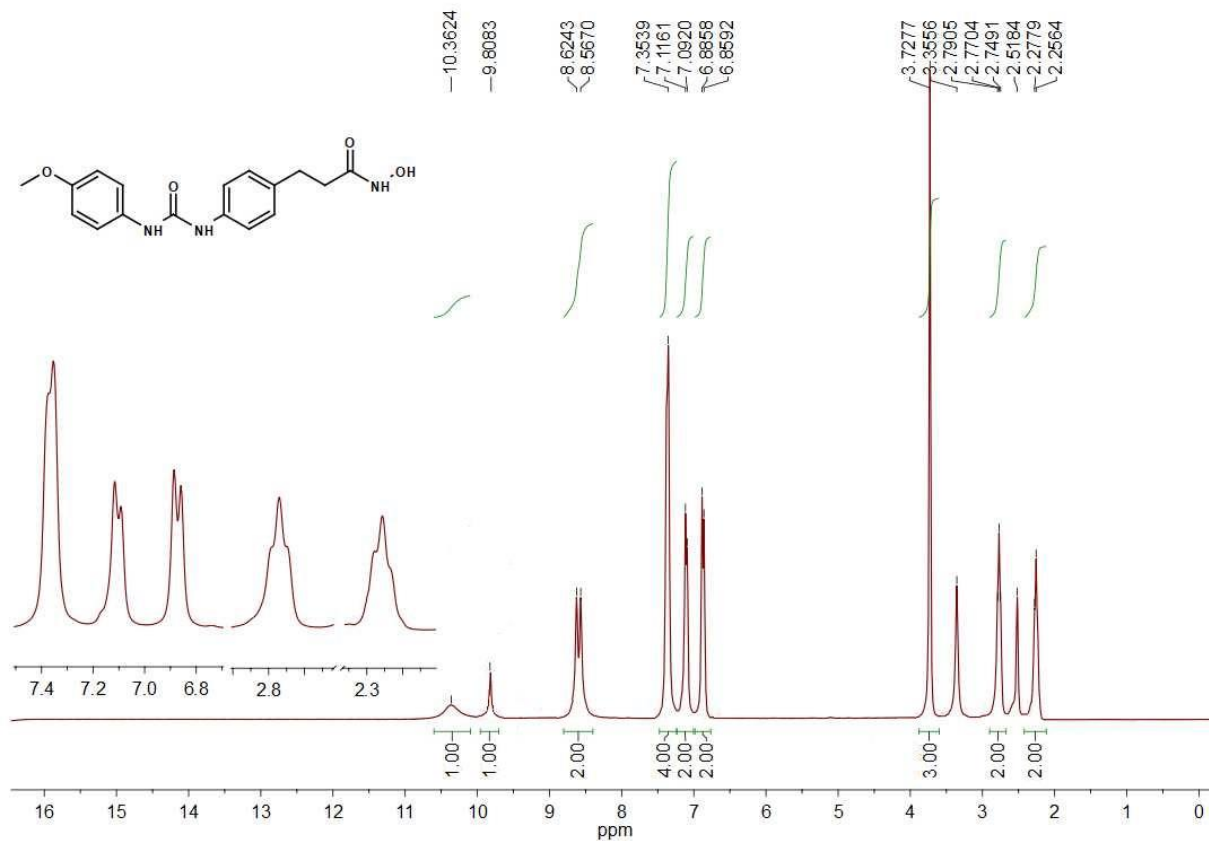
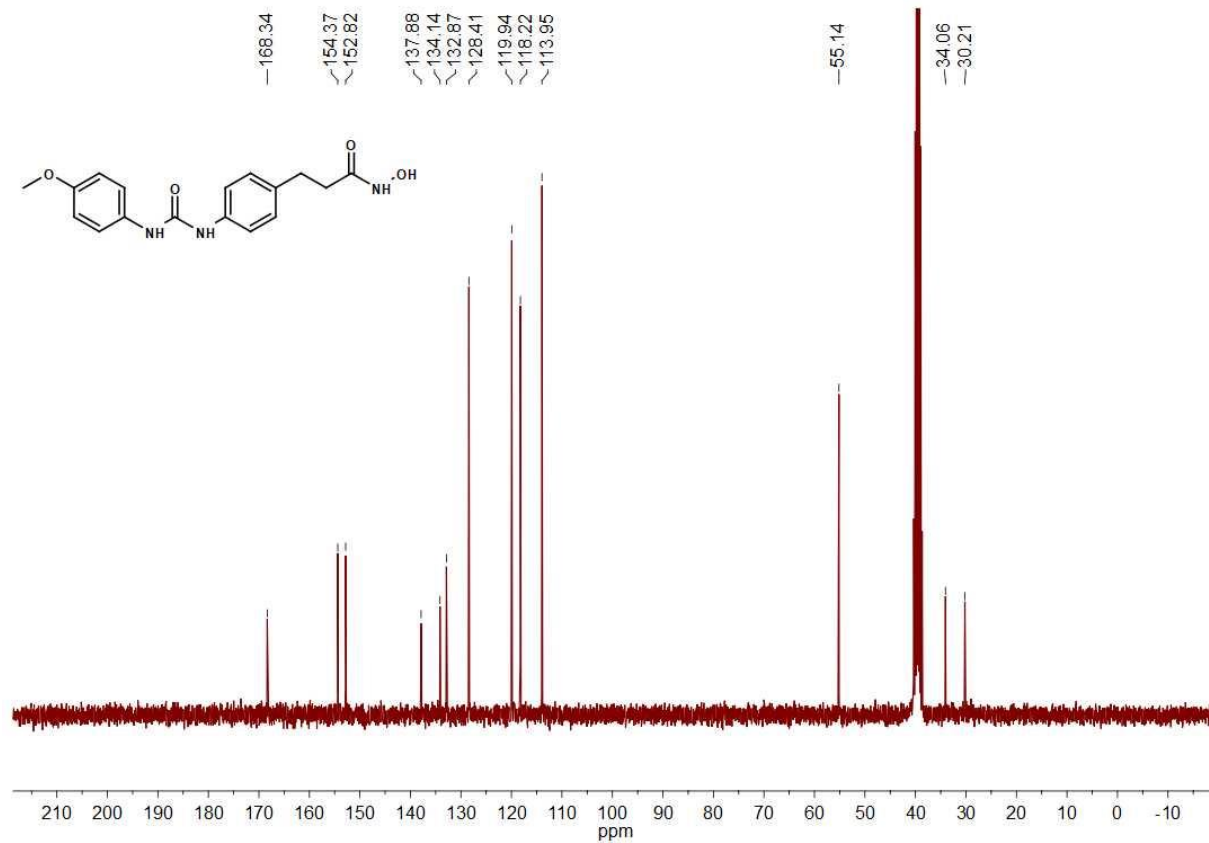
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	8.715	37171	5482	0.383	0.264
2	10.013	180486	57341	1.858	2.758
3	11.617	9496680	2015958	97.759	96.978
Total		9714338	2078780	100.000	100.000

Chromatogram Branco



Espectro de ^1H RMN do intermediário 12cEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 12c

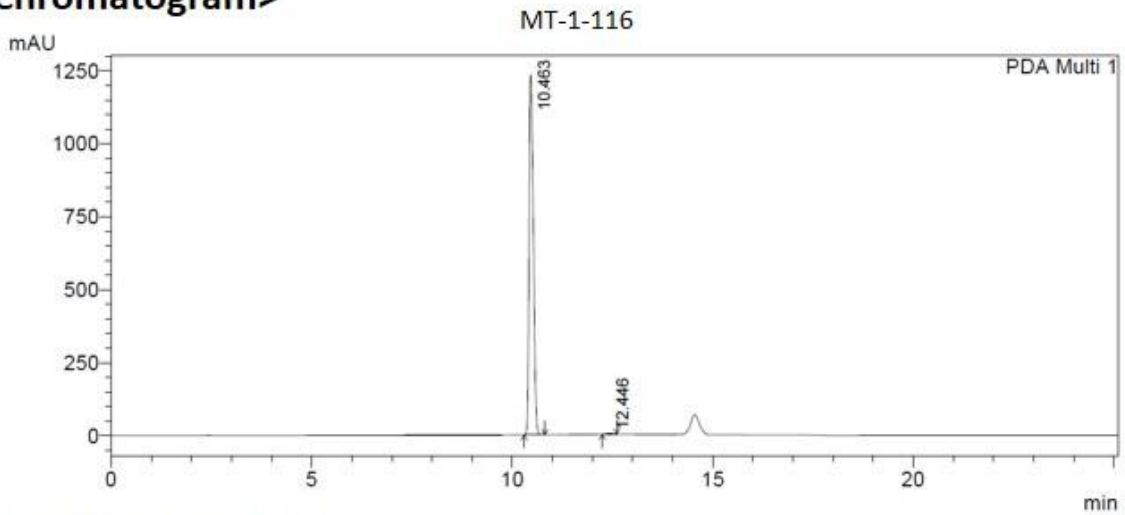
Espectro de ^1H RMN do composto final 13cEspectro de ^{13}C RMN do composto final 13c

Cromatograma de CLAE do composto final 13c

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-116
 Vail # : 43
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-116.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 16/01/2019 10:32:01
 Data Processed : 16/01/2019 22:07:46

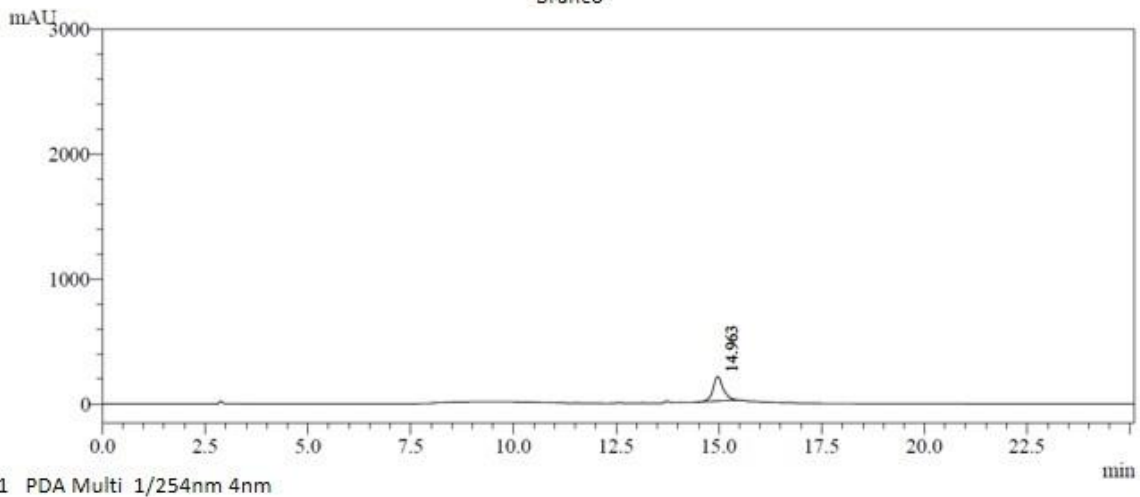
<Chromatogram>

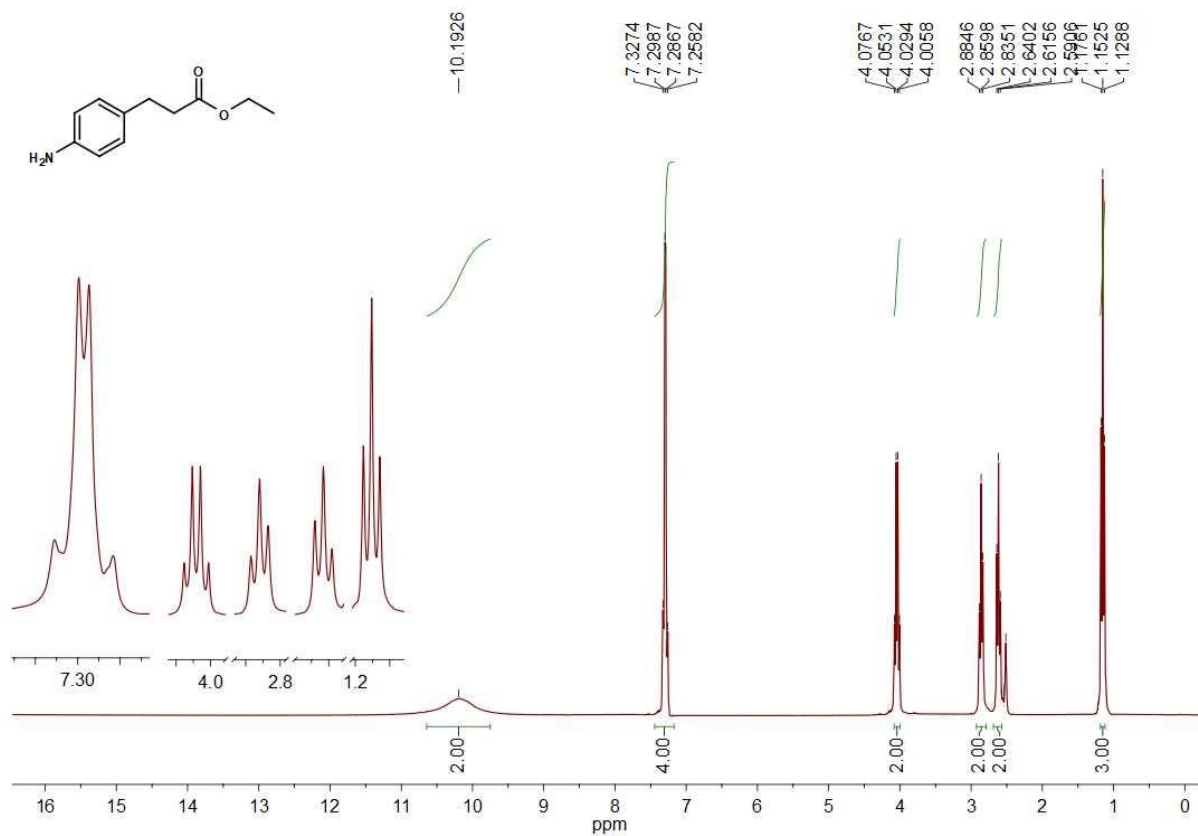
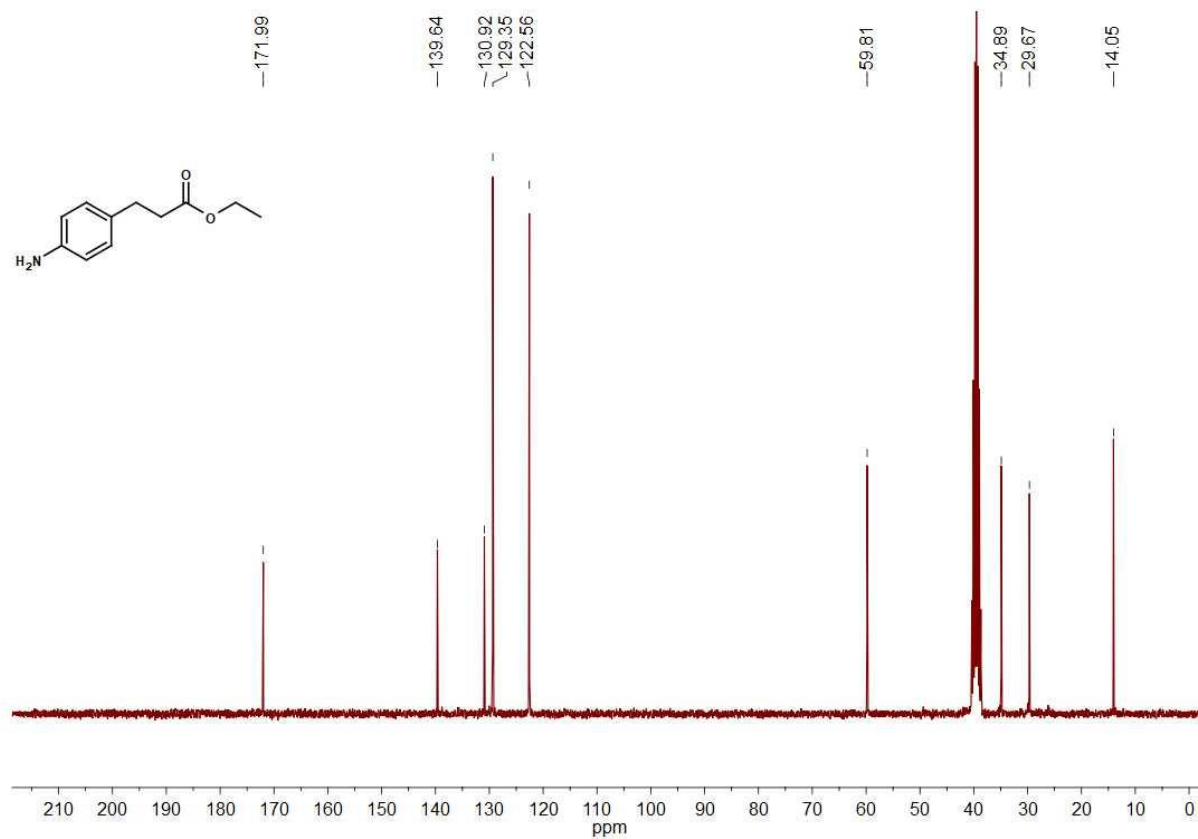


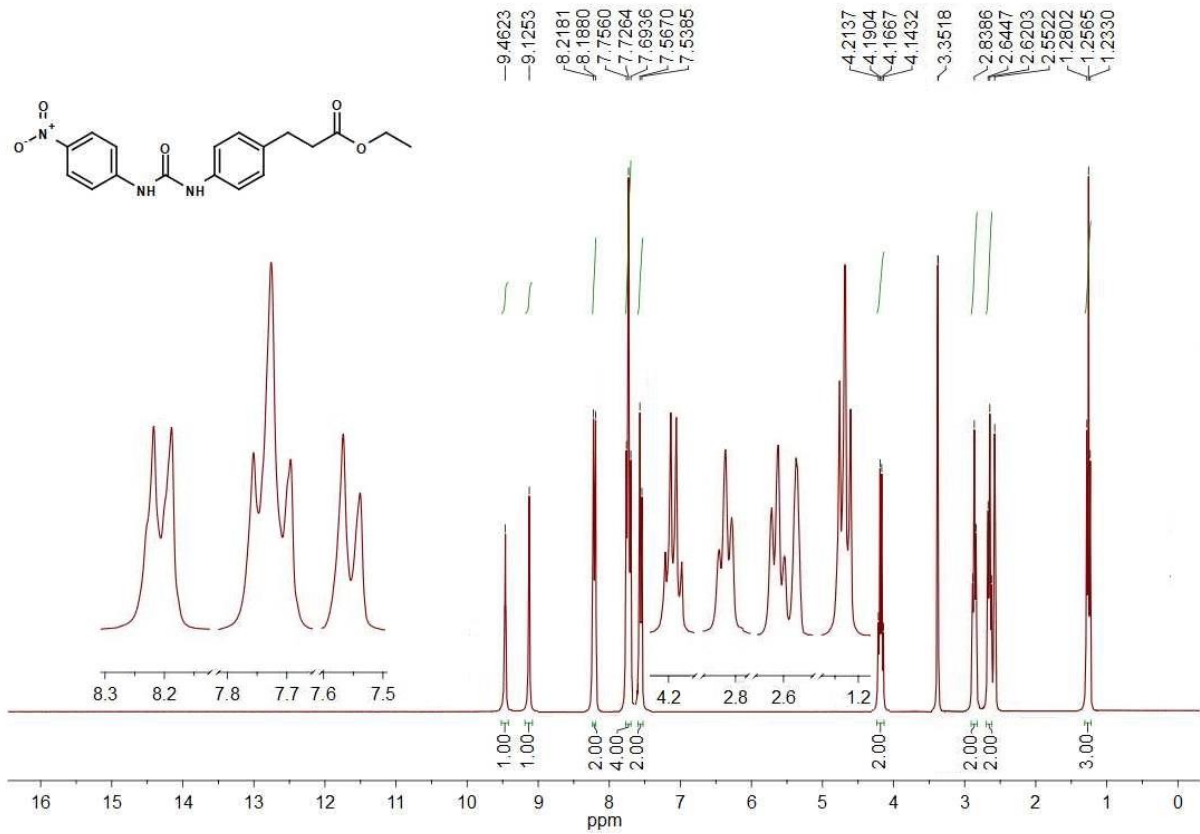
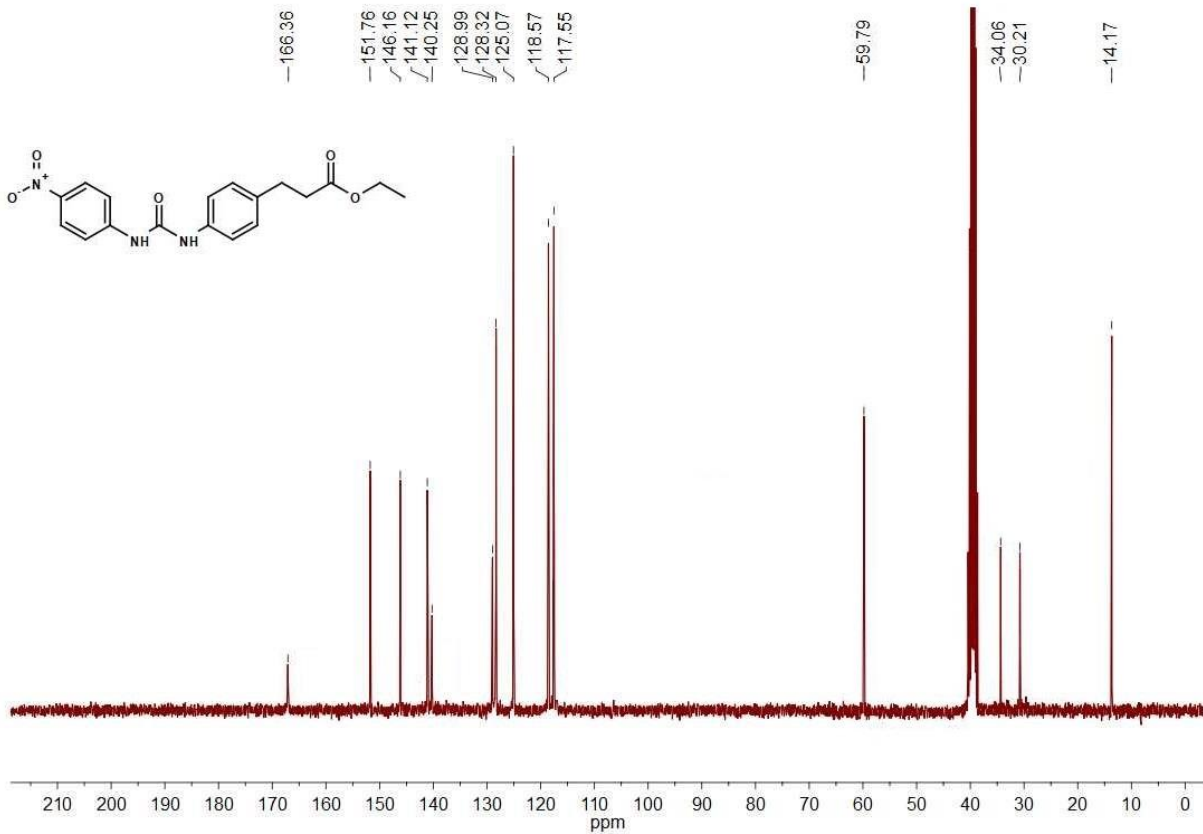
Peak Table

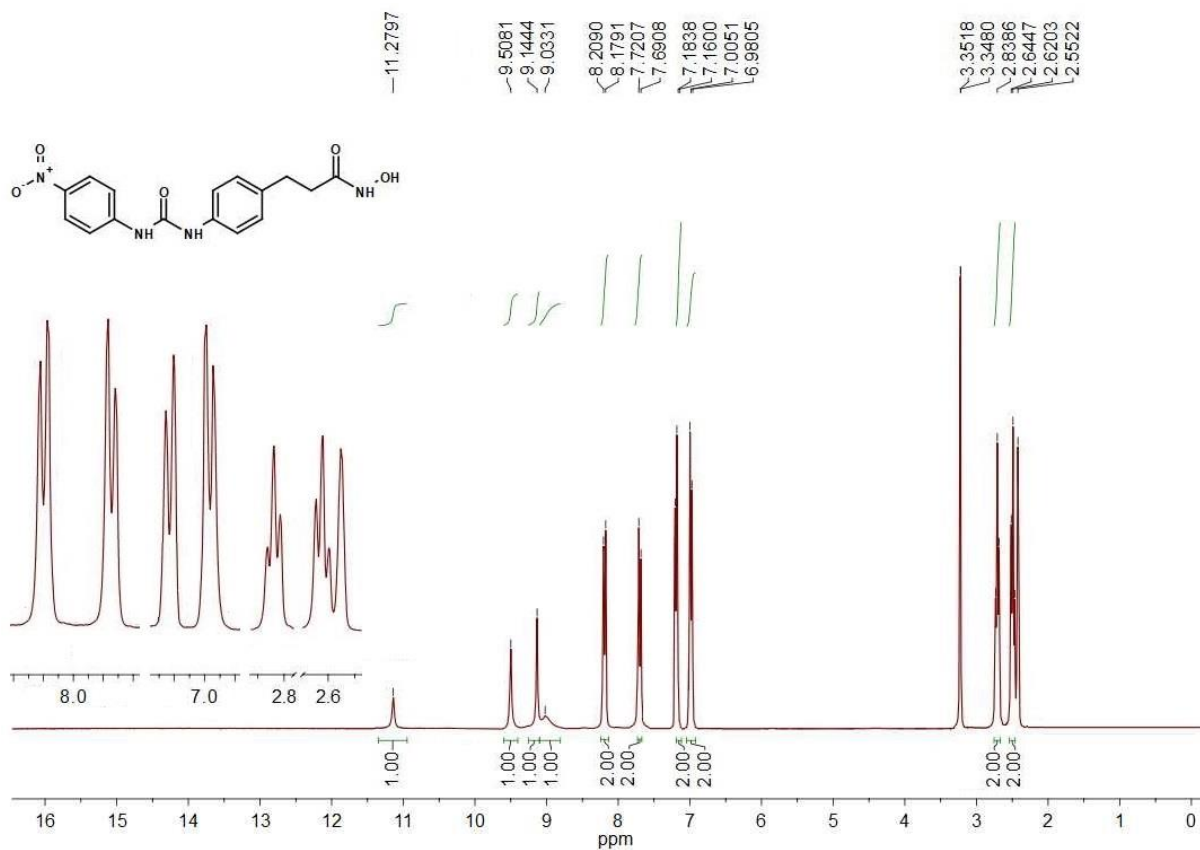
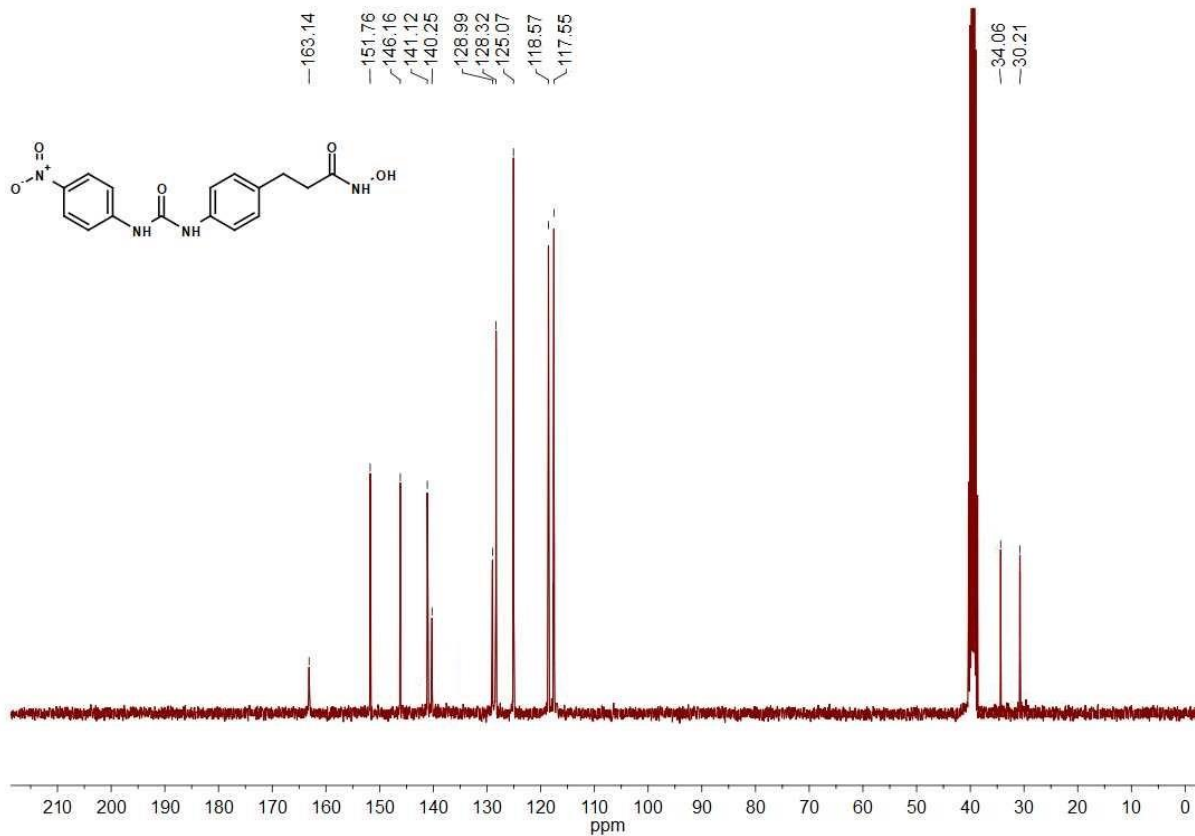
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.463	19702633	3263446	99.780	99.843
2	12.446	43460	5124	0.220	0.157
Total		19746093	3268570	100.000	100.000

Chromatogram Branco



Espectro de ^1H RMN do intermediário 11Espectro de ^{13}C RMN do intermediário 11

Espectro de ^1H RMN do intermediário 12dEspectro de ^{13}C RMN do intermediário 12d

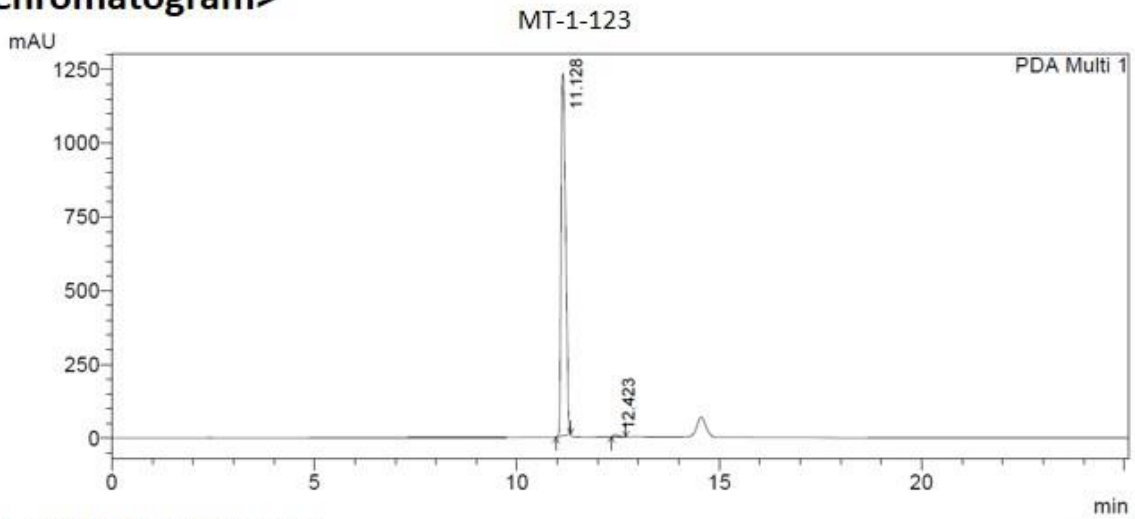
Espectro de ^1H RMN do composto final 13dEspectro de ^{13}C RMN do composto final 13d

Cromatograma de CLAE do composto final 13d

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : MT-1-123
 Vial # : 30
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : MT-1-121.lcd
 Method File Name : acetoneitrila-0.5-100-agua-0.95-0-25min.lcm
 Batch File Name : batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 15/01/2019 10:25:05
 Data Processed : 16/01/2019 12:06:34

<Chromatogram>

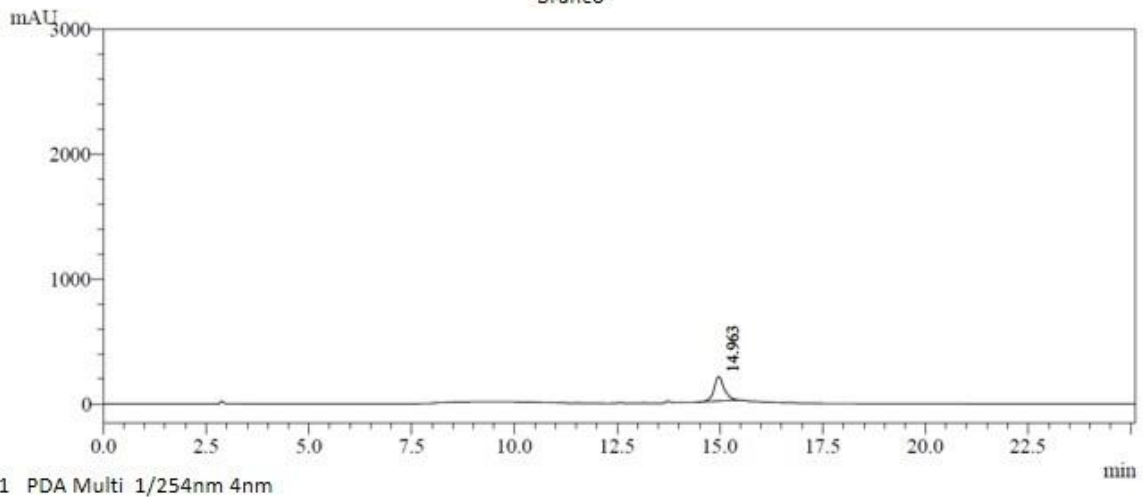


Peak Table

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	11.128	23604106	3738436	99.415	99.349
2	12.423	138909	24499	0.585	0.651
Total		23743015	3762935	100.000	100.000

Chromatogram Branco



Apêndice 2

Currículo Lattes

Apêndice 3

Ficha do Aluno