

ALINE RENATA PAVAN

Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores (*PROteolysis TARgeting Chimera* – PROTAC) de histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme

Volume I

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos
Santos

Araraquara

2023

P337p Pavan, Aline Renata
Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores
(PROteolysis TArgeting Chimera – PROTAC) de histonas
deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme / Aline
Renata Pavan. -- Araraquara, 2023
655 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Anemia falciforme. 2. Hemoglobinopatia. 3. Epigenética. 4.
Síntese orgânica. 5. Hemoglobina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores (*PROteolysis TArgeting Chimera* – PROTAC) de histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme "

AUTORA: ALINE RENATA PAVAN

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Química, pela Comissão Examinadora:

Jean Leandro dos
Santos:29736821854

Assinado de forma digital por Jean
Leandro dos Santos:29736821854
Dados: 2023.06.12 09:06:00 -03'00'

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de
Araraquara da Unesp



Documento assinado digitalmente
CAROLINA LANARO
Data: 21/06/2023 11:56:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Drª. CAROLINA LANARO (Participação Presencial)
Hemocentro da UNICAMP / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Documento assinado digitalmente
CHUNG MAN CHIN
Data: 19/06/2023 10:01:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de
Araraquara da Unesp

Profª. Drª. LILIAN SIBELLE CAMPOS BERNARDES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Lilian Sibelle Campos Bernardes
Data: 14/06/2023 10:58:50-0300
CPF: ***.487.066-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profª. Drª. DANIARA CRISTINA FERNANDES (Participação Presencial)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - IFSP - Matão



Documento assinado digitalmente
DANIARA CRISTINA FERNANDES
Data: 16/06/2023 19:47:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Araraquara, 06 de junho de 2023

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

A pesquisa desenvolvida e apresentada nesta tese apresenta impactos no âmbito científico, educacional e, a longo prazo, social e econômico. Durante o desenvolvimento do trabalho foram escritos e publicados em periódicos internacionais artigos científicos relacionados aos resultados obtidos e revisões bibliográficas sobre o tema, os quais fornecem à sociedade científica informações relevantes para consulta e direcionamento. Além disso, o estágio internacional realizado pela aluna proporcionou o aprendizado sobre uma nova classe de compostos, as *PROteolysis TArgeting Chimera* (PROTACs), que atualmente têm se mostrado como um tópico de grande procura dentro da área de Química Medicinal devido ao grande interesse acadêmico e de indústrias farmacêuticas. Com intuito de se divulgar o conhecimento adquirido, foram proferidos seminários sobre o tema dentro do grupo de pesquisa e em grupo de pesquisa parceiro no Hemocentro da UNICAMP, e têm-se como perspectiva a preparação e oferecimento para pós-graduação de uma disciplina sobre o tópico. Em relação ao impacto social, destaca-se a escassez de medicamentos existentes para tratamento da anemia falciforme e a não abrangência desses em relação, principalmente, aos pacientes residentes na África Subsaariana, os quais compreendem 70% dos pacientes acometidos com anemia falciforme. Sendo assim, a constante busca de novos compostos que possam ser úteis para o tratamento dessa doença e a publicação de dados referentes a esse trabalho contribuem para que futuramente se obtenha um novo medicamento que seja efetivo, e que garanta uma melhor qualidade de vida desses pacientes.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research developed and presented in this Thesis presents impacts in the scientific area, teaching and social area. During the development of this work, papers about the results obtained and reviews about the topic were written and published in international journals, providing the scientific community with relevant information for consultation and direction. Furthermore, the international fellowship provided the student with the knowledge of a new class of compounds, the PROteolysis TArgeting Chimera (PROTACs), which nowadays is an area of great relevance in the Medicinal Chemistry field due to the great interest of the pharmaceutical industry. Aiming to spread the knowledge, seminars were presented in our research group and also in a research group of a collaborator in the Hematology center at the UNICAMP. It is expected to offer a discipline about the topic to the post-graduate students. Regarding the social impact, it is important to highlight the lack of medicines for the treatment of sickle cell disease and the lack of coverage of these in relation to those who needs it the most. Therefore, the persistent search for new compounds that would be able to treat this disease and the publication of the data obtained in this work increase the possibility for the obtention of a new medicine in the future that is effective, safe and that contemplate all the people who need it.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: Aline Renata Pavan

Nome em citações bibliográficas: PAVAN, A. R.; PAVAN, ALINE; PAVAN, AR.; PAVAN, ALINE RENATA; RENATA PAVAN, ALINE.

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

UNESP – Campus de Araraquara

Rodovia Araraquara-Jaú Km 01 – s/n

Campos Ville

CEP 14800-903 – Araraquara-SP – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

2018 – 2023

Doutorado em Química.

Instituto de Química – UNESP Araraquara, IQ/Ar, Brasil.

Título: Planejamento e síntese de novos inibidores e degradadores (*PROteolysis TArgeting Chimera* – PROTAC) de histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 para anemia falciforme.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2018/19523-7

2016 – 2018

Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara, FCFAr, Brasil.

Título: Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados ftalimídicos inibidores de histona deacetilase para anemia falciforme.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2015/21252-3

2010 – 2015

Graduação em Farmácia – Bioquímica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara, FCFAr, Brasil.

Título: Síntese, caracterização e avaliação biológica de quelatos metálicos contendo ligantes de origem natural.

Orientador: Prof. Dra. Regina Célia Galvão Frem

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2012/15639-4.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

12/2021 – 11/2022

Doutorado Sanduíche

University of Leicester, Leicester, Reino Unido

Projeto: Synthesis and pharmacological evaluation of PROTAC-HDAC inhibitors-based compounds for Sickle Cell Disease

Supervisor: Prof. Dr. James T. Hodgkinson

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Processo nº 2021/10059-9

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA:

Artigos completos publicados em periódicos:

1. PAVAN, ALINE RENATA; LOPES, JULIANA ROMANO; LIMA IMPERADOR, CARLOS HENRIQUE; MAN CHIN, CHUNG; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Perspectives and challenges to discovering hemoglobin-inducing agents in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1, 2022.

2. URIAS, BEATRIZ SILVA; PAVAN, ALINE RENATA; ALBUQUERQUE, GABRIELA RIBEIRO; PROKOPCZYK, IGOR MUCCILO; ALVES, TÂNIA MARA FERREIRA; DE MELO, THAIS REGINA FERREIRA; SARTORI, GERALDO RODRIGUES; DA SILVA, JOÃO HERMÍNIO MARTINS; CHIN, CHUNG

MAN; SANTOS, JEAN LEANDRO DOS. Optimization of Resveratrol Used as a Scaffold to Design Histone Deacetylase (HDAC-1 and HDAC-2) Inhibitors. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 1260, 2022.

3. TERRONI, BARBARA; MORAES, LUIS HENRIQUE OLIVEIRA DE; **PAVAN, ALINE RENATA**; RODRIGUES, GERSON JHONATAN; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO DOS. Vascular Effects of the Fetal Hemoglobin Inducer Agent 3-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl) Benzyl Nitrate. **Pharmaceuticals**, v. 15, p. 1311, 2022.

4. **PAVAN, ALINE RENATA**; LOPES, JULIANA ROMANO; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. The state of the art of fetal hemoglobin-inducing agents. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, p. 1279-1293, 2022.

5. LOURENÇO DE FREITAS, NATÁLIA; DEBERALDINI, MARIA GABRIELA; GOMES, DIANA; **PAVAN, ALINE RENATA**; SOUSA, ÂNGELA; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO; SOARES, CHRISTIANE P. Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Interventions on Cervical Cancer Induced by Human Papillomavirus. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 1, 2021.

6. **PAVAN, ALINE RENATA**; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Advances in Sickle Cell Disease Treatments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 2008-2032, 2021.

7. PRATES, JOÃO LUCAS BRUNO; **PAVAN, ALINE RENATA**; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Boron in Medicinal and Organic Chemistry. **Current Organic Chemistry**, v. 25, p. 1853-1867, 2021.

8. FERNANDES, GUILHERME FELIPE DOS SANTOS; CAMPOS, DÉBORA LEITE; CRISTIANE DA SILVA, ISABEL; BRUNO PRATES, JOÃO LUCAS; **PAVAN, ALINE RENATA**; PAVAN, FERNANDO ROGÉRIO; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Discovery of Benzofuroxan Derivatives as Potent Agents Active Against Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis. **ChemMedChem**, v. 16, p. 1, 2021.

9. LONGHIN BOSQUESI, PRISCILA; CASTANHO BOLOGNESI MELCHIOR, AYLIME; **RENATA PAVAN, ALINE**; LANARO, CAROLINA; MARIA DE SOUZA, CRISTIANE; RUSINOVA, RADDIA; CONSOLIN CHELUCCI, RAFAEL; PEREIRA BARBIERI, KARINA; DOS SANTOS FERNANDES, GUILHERME FELIPE; ZEPONE CARLOS, IRACILDA; SPARRE ANDERSEN, OLAF; FERREIRA COSTA, FERNANDO; LEANDRO DOS SANTOS, JEAN. Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as fetal hemoglobin inducers. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, p. 103948, 2020.

10. DOS SANTOS FERNANDES, GUILHERME FELIPE; **PAVAN, ALINE RENATA**; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Heterocyclic N-oxides - A Promising Class of Agents Against Tuberculosis, Malaria and Neglected Tropical Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 1-16, 2018.

11. PAVAN, A. R.; FERNANDES, G. S. F.; SANTOS, J. L. Clinical Pharmacology: Epigenetic Drugs at a Glance. **Biochemistry & Pharmacology**: OPEN ACCESS, v. 7, p. 1, 2018.

12. FERNANDES, GUILHERME; SILVA, GABRIEL; **PAVAN, ALINE**; CHIBA, DIEGO; CHIN, CHUNG; DOS SANTOS, JEAN. Epigenetic Regulatory Mechanisms Induced by Resveratrol. **Nutrients**, v. 9, p. 1201, 2017.

13. PAVAN, ALINE; SILVA, GABRIEL; JORNADA, DANIELA; CHIBA, DIEGO; FERNANDES, GUILHERME; MAN CHIN, CHUNG; DOS SANTOS, JEAN. Unraveling the Anticancer Effect of Curcumin and Resveratrol. **Nutrients**, v. 8, p. 628, 2016.

14. ROSSETO, LEANDRO; PIRES, MARIA; MELCHIOR, AYLIME; BOSQUESI, PRISCILA; **PAVAN, ALINE**; MARCONDES, SISI; CHUNG, MAN; SANTOS, JEAN. Synthesis and Preliminary Evaluation of N-Oxide Derivatives for the Prevention of Atherothrombotic Events. **Molecules**, v. 20, p. 18185-18200, 2015.

15. MELCHIOR, A. C. B.; **PAVAN, A. R.**; BOSQUESI, PRISCILA; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Bromodomain as New Targets in Drug Discovery. **Biochemistry & Pharmacology**, v. 4, p. 1000e176, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:

1. PAVAN, A. R.; DOS SANTOS, JEAN LEANDRO. Design, synthesis and enzymatic evaluation of HDAC 1 and HDAC2 selective inhibitors. *XXVII International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC)*, Nice, France, 2022.

2. PAVAN, A. R.; ALBUQUERQUE, GABRIELA RIBEIRO; URIAS, BEATRIZ SILVA; PROKOPCZYK, I. M.; Alves, T.; DE MELO, THAIS REGINA FERREIRA; SANTOS, J. L. Design, synthesis, and enzymatic evaluation of new HDAC 1 and 2 orto-aminobenzamides inhibitors. *GP2A Annual Conference*, Dublin, Ireland, 2022.

- 3. PAVAN, A. R.;** SANTOS, J. L. Estudo de Modelagem molecular de inibidores de histonas deacetilases da Classe I. *IX Congresso Científico da UNESP, Araraquara, Brasil, 2019.*
- 4. PAVAN, A. R.;** DELGADO, I. L. L. ; DUTRA, L. ; SCARIM, C. B. ; SALGADO, H. R. N. ; ALMEIDA, A. M. F. ; CARLOS, I. Z. ; SANTOS, J. L. . Avaliação do efeito antimicrobiano e antiinflamatório de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos como alternativa para o tratamento da acne vulgar. *IX Congresso Científico da UNESP, Araraquara, Brasil, 2019.*
- 5. PAVAN, A. R.;** CHELUCCI, R. C. ; LANARO, C. ; BARBIERI, K. P. ; BOSQUESI, PRISCILA ; CARLOS, I. Z. ; COSTA, F. F. ; SANTOS, J. L. . Analgesic activity and inhibition of neutrophil adhesion induced by resveratrol in sickle cell disease. *CONGRESO INTERNACIONAL RESVERATROL, Mendoza, Argentina, 2017.*
- 6. REIS, J. S.;** **PAVAN, A. R.;** FERREIRA, L. M. B.; CHIARI, B. G.; REIS JR, M. A.; ISAAC, V. L. B.; CORREA, M. A.; SANTOS, J. L. Synthesis, antioxidant and photoprotection of resveratrol derivatives useful to prevent skin cancer. *CONGRESO INTERNACIONAL RESVERATROL, Mendoza, Argentina, 2017.*
- 7. PAVAN, A. R.;** ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G. ; GRAMINHA, M.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Síntese e avaliação biológica de novas moléculas guanidínicas com potencial atividade anti-leishmania. *VI Congresso Farmacêutico da Unesp, Araraquara, Brasil, 2016.*
- 8. PAVAN, A. R.;** ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; GRAMINHA, M.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Synthesis and biological evaluation of novel guanidine derivatives as leishmanicidal compounds. *8th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Armação dos búzios, Brasil, 2016.*
- 9. ALMEIDA, L.;** PASSALACQUA, T. G.; DUTRA, L.; **PAVAN, A. R.;** Martinez, I.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G.; THOMAS, A.; MAN CHIN, CHUNG; SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M. Potent in vivo leishmanicidal activity of N-oxide derivatives. *8th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Armação dos búzios, Brasil, 2016.*
- 10. PAVAN, A. R.;** ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; GRAMINHA, M.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Síntese e avaliação biológica de novos derivados furoxânicos com potencial atividade anti-leishmania. *II Simpósio de Química Medicinal – “Inovação e Empreendedorismo em Fármacos”, São José do Rio Preto, Brasil, 2016.*

- 11. PAVAN, A. R.;** MELCHIOR, A. C. B.; FERNANDES, G.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Obtenção de insaturações partindo-se de grupamentos aldeídicos. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 12. DUTRA, L.;** **PAVAN, A. R.;** MELCHIOR, A. C. B.; FERNANDES, G.; PIRES, M.; SANTOS, J. L. Síntese, caracterização e avaliação farmacológica de novos compostos para tratamento e prevenção de aterotrombose. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 13. Yamasaki, P. R.;** **PAVAN, A. R.;** MELCHIOR, A. C. B.; NASCIMENTO, D.; CHELUCCI, R.; PLACERES, M.; CARLOS, I. Z.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Preparation and evaluation of dapsone-thalidomide hybrids for the treatment of type 2 leprosy reactions. *7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry*, Campos do Jordão, Brasil, 2014.
- 14. PAVAN, A. R.;** FERNANDES, G.; SANTOS, J. L. Síntese de novos candidatos a fármacos úteis para o tratamento de tuberculose. *Congresso de Iniciação Científica da Unesp*, Águas de Lindoia, 2014.
- 15. FERNANDES, G. S. F.;** MARINO, L. B.; SOUZA, P. C.; MELCHIOR, A. C. B.; **PAVAN, A. R.;** SANTOS, J. L. Avaliação antiMycobacterium tuberculosis de derivados furoxânicos. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 16. FERNANDES, G. S. F.;** MARINO, L. B.; SOUZA, P. C.; MELCHIOR, A. C. B.; **PAVAN, A. R.;** CHIN, C. M.; PAVAN, F. R.; SANTOS, J. L. Avaliação antiMycobacterium tuberculosis de derivados N-acil hidrazônicos. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.
- 17. MELCHIOR, A. C. B.;** PIRES, M. E. L. LANARO, C.; **PAVAN, A. R.;** COSTA, F. F.; CHUNG, M. C.; CARLOS, I. Z.; PLACERES, M.; SANTOS, J. L. Avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos úteis ao tratamento dos sintomas da anemia falciforme. *IV Congresso Farmacêutico da Unesp*, Araraquara, Brasil, 2014.

PARTICIPAÇÕES EM BANCAS:

Trabalho de Conclusão de Curso:

1. PAVAN, ALINE RENATA; BONJORNO, A. F.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Beatriz Meduqui Rodrigues. Modelagem molecular e síntese de novos agentes reversores de latência dos reservatórios do vírus HIV. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2. PAVAN, ALINE RENATA; PRATES, J. L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Andressa Francielli Bonjorno. Síntese de novos derivados nitroimidazooxazina planejados para o tratamento da tuberculose. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

3. PAVAN, A. R.; PRATES, J. L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Felipe Eduardo Bazilio. Tecnologias e suas aplicações na promoção do uso racional de medicamentos: uma revisão bibliográfica. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

4. PAVAN, A. R.; PRATES, J. L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Max Gerlack. Síntese de inibidores duais como agentes reversores de latência para HIV. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

5. PROKOPCZYK, I. M.; **PAVAN, A. R.;** SANTOS, J. L. Participação em banca de Johnny Wallef Leite Martins. Síntese de derivados de quinoxalinas 1,4-di-N-óxidos planejados contra leishmaniose. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

6. PAVAN, A. R.; SOUZA, L. B.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Carolina Bozza Matheus. Atenção farmacêutica em pacientes com problemas renais. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

7. PAVAN, A. R.; CHIBA, D. E.; SANTOS, J. L. Participação em banca de Gabriela Ribeiro Albuquerque. Síntese de derivados 2-aminobenzamídicos planejados como indutores de hemoglobina fetal. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

8. PAVAN, A. R.; DOS SANTOS FERNANDES, GUILHERME FELIPE; SANTOS, J. L. Participação em banca de Andressa Mayumi Ocubaro. O efeito placebo e suas implicações na medicina alternativa e complementar. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SUPERVISÃO CIENTÍFICA:

Trabalho de Conclusão de Curso:

1. Aluna: Ana Clara Scomparin

Título: Estudo de modelagem molecular e síntese de derivados borônicos inibidores de histona deacetilase.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2022

Bolsa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan.

2. Aluna: Raquel dos Santos Rauber

Título: Síntese de derivados do voxelotor como agentes ligantes covalentes irreversíveis de hemoglobina

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2022

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan.

3. Aluna: Beatriz Silva Urias.

Título: Síntese de inibidores seletivos HDAC 1 e 2 para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2020

Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan

4. Aluno: Mateus Greco de Oliveira

Título: Síntese de novos derivados da pomalidomida doadores de óxido nítrico para tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Araraquara, FCF/Ar, Araraquara – SP, Brasil. 2019

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Co-orientadora: Ma. Aline Renata Pavan

Dedico esta Tese à minha família por terem me dado todo o amor e carinho, por sempre estarem ao meu lado para superar todos os problemas e dificuldades, e sem a qual este trabalho não existiria.

Dedico esta Tese aos amigos que estiveram comigo, perto ou longe, e que foram minha base no dia a dia.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos com as pessoas mais importantes e essenciais da minha vida: Nadir e Nelson. Mãe e Pai, por muitas vezes já lhes disse isso, mas dessa vez vai ficar registrado...sem vocês, nada deste trabalho existiria. Vocês foram meus maiores incentivadores desde que eu saí de casa. Todas as vezes que busquei ajuda vocês estavam ali para me dar suporte e me ajudar a continuar caminhando. Houve situações em que me vi sem saída, e foram vocês que souberam me guiar e me iluminar. Toda a luta que vocês sempre travaram durante toda a vida resultou em tudo que vocês têm hoje, e em tudo que vocês plantaram em mim e nos meus irmãos. Se hoje podemos colher sucesso, é porque vocês plantaram uma sementinha e nos ajudaram a regar. Obrigada por tudo que sempre fizeram e por tudo que fazem por mim. Essa conquista é de vocês também! Amo vocês.

Paulo e Monica, o significado de vocês na minha vida é de força e proteção. Durante esses últimos cinco anos eu posso dizer que tive uma equipe me dando suporte, e cada um com um papel diferente. O de vocês foi o de me manter forte e de me sentir protegida. Paulo, por ser meu irmão mais velho e por sua personalidade forte sempre me senti segura ao seu lado, mas esses últimos anos me fizeram entender que mesmo crescendo, mesmo indo morar do outro lado do mundo, vou ter meu “tato” comigo para sempre. Com você aprendi que o que nos move na vida é a perseverança e coragem, e levo isso comigo em tudo que faço. Monica, ainda não consigo encontrar o ponto em que nossa história começou, porque a sensação é que você sempre esteve ali. Seus puxões de orelha e conselhos assertivos sempre me fizeram olhar as coisas de uma forma diferente, e me ajudaram a escolher meus caminhos. Obrigado por tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Essa conquista é de vocês também! Amo vocês.

Fer e Andreia, meus conselheiros da vida acadêmica (e da vida). Por muitas vezes recorri a vocês com dúvidas, inseguranças e medos e sempre recebi em troca apoio e encorajamento. Olho para vocês como exemplos da profissional que quero um dia ser. Fer, você me deu suporte e abrigo quando eu mais precisei, e isso nunca será esquecido. Todo o apoio e conselhos que vieram de você me ajudaram a tomar decisões importantes e me ajudaram a construir quem eu sou hoje. Andreia, junto com o Fer você me acolheu e me deu suporte. Nossas conversas sempre me fazem

olhar a vida com outros olhos e me ajudam a me entender como ser humano. Todas as trocas de experiências que tivemos me deram base para buscar ajuda e construir tijolinho por tijolinho a Aline que quero ser. Obrigado por tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Essa conquista é de vocês também! Amo vocês.

Ga, Valen e Soso...meus amorzinhos. Agradeço a honra de ser tia de vocês. O nascimento de vocês abriu um espaço no meu coração que eu nem sabia que existia, e me fez entender o que é o amor incondicional. Obrigada por existirem, amo vocês demais!

Chibiiiiinha! Dizem que depois de 7 anos de amizade as pessoas não se separam mais...Estamos completando 10 anos, ou seja, você não se livra mais de mim! Chiba, obrigada por ser esse companheiro para tudo. Agradeço todos os conselhos (acadêmicos ou não), por todas as conversas, por todas as ajudas, por todos os almoços e as idas à barzinhos. Sua calma e habilidade de ser uma pessoa centrada sempre me inspiraram. Obrigada por tudo, Chibinha, amo você!

João, você chegou no lab todo quietinho, mas mal sabíamos o furacão de alegria que seria liberado em pouco tempo. Migo, obrigada por ser esse amigo de todas as horas e para todas as ocasiões. Obrigada por todas as vezes que me escutou, que me ajudou e que esteve do meu lado. Obrigada por todas as brejas que tomamos juntos. Nos conhecemos dentro do lab, mas você é um amigo para a vida. Agradeço por ter você em meu caminho, migo, amo você!

Juliana (Juuuu)... eu lembro da primeira vez que te vi numa defesa de doutorado do lab, toda quietinha e longe da gente e ninguém sabia quem era você. Aí corta para hoje...você se tornou uma das pessoas que a gente não quer mais que saia do lab. Ju, você tem uma das características que eu mais admiro em uma pessoa, que é a sinceridade. Todas as vezes que preciso de uma opinião sincera e honesta é para você que eu recorro. Você é uma amiga para a vida e agradeço demais ter encontrado você e ter tido a chance de trabalhar com alguém tão competente, determinada e parceira. Obrigada por tudo, Ju, amo você!

Agradeço à Beatriz Urias, Mateus Greco, Ana Scomparin e Raquel Rauber pela honra de estar ao lado de vocês como co-orientadora. Vocês me deram a oportunidade de aprender mais sobre a docência e me ajudaram a crescer como profissional e ser humano.

Agradeço a todos os amigos do Lapdesf: Andressa, Ana, Any, Bianca, Diogo, Fernanda, Felipe, Guilherme, Gustavo, Igor, Livia, Maria, Maiara, Mateus, Pamela e Thuany pelo tempo que sempre passamos juntos.

Joshua (Josh)...you were by my side since day one at Uni, and I could not even imagine how important you would be to me during my year in Leicester and after that. You are one of the most lovely and thoughtful human beings I've ever known. Thank you for introducing me the Tinybakery, Mr. Whippy, and all the other food and drinks we had together. Thank you for being so kind to me. If you need anything from me, at any time, I'll be here for you. Love you and miss you (and your songs) every day!

Wiktoría (Wik)...one of my biggest fears when travelling abroad was about not being able to find a friend that I could talk about everything (good/bad/weird stuff) without being worried about anything....and then I met you. Thank you for all our talks about chemistry, food in Brazil and Poland, Tv shows, life, kinder chocolate... You always made my days happy, and I hope to see you soon again. Love you and miss you!

Urvashi...we worked together for only a few months, but I feel that I know you for way longer. Thank you for being such a lovely and supportive friend! You are the kind of person that is a pleasure to work with and to be able to call a friend. I hope to see you soon! One more Portuguese word for you: amigo/amiga = friend. Love you and miss you!

Meg...you were always the person that was in the lab to help me with everything. As I said once, I would love to have a "Meg" in Brazil, because life would be so much easier. When I first met you, I saw you as a serious person...after a while I realized that you were really a serious person, but with a lovely and warm heart. Thank you for the time we spent together. Love you and miss you!

Camila...Calinda, obrigada por sempre, mesmo de longe, se fazer perto. Obrigada por ser a amiga que topa tudo e que faz de tudo para nos fazer bem. Obrigada por todos os momentos que vivemos juntas e por tudo que ainda viveremos. Te amo e sinto muita saudade de você!!

Thais...Vods, saudades do seu abraço de urso e de tomar umas boas caipirinhas enquanto fofocamos. Sinto muita falta de ter você aqui pertinho. Te amo e estou com saudades.

Fernanda...Felinda, você sempre me incentivou muito e me direcionou palavras de carinho e apoio. Poder ter você como amiga me deixa feliz e honrada, pois tenho muito orgulho de você! Ainda precisamos marcar nosso mochilão! Te amo e estou com saudades.

Agradeço à Patrícia Bento por me apresentar a vida acadêmica e por sempre me inspirar. Paty, você ajudou nos meus primeiros passos dentro de um laboratório de pesquisa e estive do meu lado desde então. Obrigada por ser essa pessoa excepcional e por ser um dos melhores exemplos que eu poderia ter. Amo você.

Agradeço à Carol Lanaro pela realização dos ensaios de indução de γ -globina, por ter me recebido tão bem no laboratório e se mostrado uma pessoa sensacional. Agradeço também ao prof. Dr. Fernando Ferreira Costa por me receber em seu laboratório e autorizar a realização dos ensaios.

Agradeço aos meus orientadores Jean e James:

James, thank you for having me in your lab, for trusting me and for giving me the opportunity to develop such a beautiful work with you. Thank you for all the coffees and the talks that we had together. The time I spent in your lab was essential for me to grow as a professional and human being.

Jean...trabalhamos juntos há 10 anos e ainda não tenho palavras suficientes para agradecer tudo que fez por mim. Você é um dos meus exemplos dentro da área acadêmica, e sempre foi uma inspiração. Agradeço a liberdade que você sempre me deu dentro do laboratório e por confiar no meu trabalho e potencial. Todos esses anos você me ajudou a crescer e entender o papel que temos dentro e fora da universidade. Obrigada por ter sido a minha base dentro da área acadêmica. Obrigada por todas as vezes que me incentivou a ir além e a alcançar voos cada vez mais altos. Tenho orgulho e me sinto lisonjeada de ter você como orientador. Obrigada por tudo!

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

Agradeço à FAPESP pela concessão das bolsas no país e no exterior, às quais possibilitaram a execução do trabalho (Processos FAPESP nº 2018/19523-7 e 2021/10059-9)

“If we want to achieve our goal, then let us empower ourselves with the weapon of knowledge
and let us shield ourselves with unity and togetherness.”

(Malala Yousafzai: 16th birthday speech at the United Nations, 2013)

“One child, one teacher, one book and one pen can change the world.”

(Malala Yousafzai)

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia causada por uma mutação pontual no gene da β -globina. Essa mutação resulta na formação de uma hemoglobina mutada (HbS) que polimeriza e causa mudanças irreversíveis na morfologia das hemácias, a qual adquire a forma de foice e é responsável pela fisiopatologia da doença. Dentre as estratégias descritas para tratamento da AF está a indução de expressão de γ -globina e produção de hemoglobina fetal (HbF), a qual é capaz de diminuir os sintomas da doença por reduzir as taxas de polimerização, dentre outros efeitos, e foi a estratégia selecionada para o presente trabalho. As enzimas epigenéticas histonas deacetilases (HDACs) 1 e 2 foram os alvos explorados para desenvolvimento de novos indutores de expressão de γ -globina e produção de HbF. Sendo assim, este trabalho foi dividido em duas partes: 1) Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos inibidores de HDAC 1 e 2; 2) Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novas PROTACs para degradação de HDAC 1 e 2. Na primeira parte foram sintetizados 24 intermediários e 7 produtos finais inéditos com rendimentos que variaram entre 29 e 85%. Os dois compostos mais promissores ((**21**) e (**31**)) apresentaram valores de IC_{50} variando entre 17 e 950 nM e importante seletividade contra as HDACs 1 e 2. Em um ensaio preliminar utilizando-se células eritroleucêmicas (K562) ambos os compostos foram capazes de aumentar em, aproximadamente, 7x a expressão de gama-globina a 1 μ M após o tempo de tratamento de 72h e 96 h sendo superior ao fármaco utilizado na terapia, a hidroxiureia. Na segunda parte, 40 intermediários e 13 moléculas inéditas foram sintetizadas com rendimentos que variaram entre 30 e 65%. Todos os compostos foram avaliados quanto a degradação das HDACs 1-3 e, de forma geral, os compostos apresentaram degradação seletiva contra HDAC-1. Destacam-se os compostos **ARP-26**, **ARP-37** e **ARP-49**, com valores de degradação que variaram de 41 a 60% contra HDAC-1. Os valores de DC_{50} dos compostos **ARP-26** e **ARP-49** foram determinados, e apresentaram aproximadamente 50% de degradação à 2,5 μ M. Sendo assim, foi possível sintetizar e obter novos inibidores de HDAC seletivos contra HDAC-1 e HDAC-2 e capazes de induzir a expressão de γ -globina a níveis acima do que o fármaco atualmente no mercado e que podem ser úteis como candidatos à fármacos para o tratamento da anemia falciforme. Foi possível também sintetizar e obter PROTACs inéditas com seletividade de degradação contra HDAC-1.

Palavras-chave: anemia falciforme, hemoglobinopatia, epigenética, síntese orgânica, hemoglobina

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary hemoglobinopathies caused by a single mutation in the gene of β -globin. Due to this mutation, a mutated hemoglobin is formed (HbS) leading to polymerization and causing irreversible changes in the morphology of red blood cells, which get a sickle shape and is responsible for the pathophysiology of the disease. Among the strategies described in the literature for the treatment of SCA is the induction of the expression of γ -globin and production of fetal hemoglobin (HbF), which is able to diminish the symptoms by reducing the polymerization and was the chosen strategy in this work. Epigenetic enzymes called histone deacetylases (HDACs) 1 and 2 were explored as targets for the development of new γ -globin and HbF inducers. Therefore, this work was divided into two parts: 1) Design, synthesis and pharmacological evaluation of new HDAC 1 and 2 inhibitors; 2) Design, synthesis and pharmacological evaluation of new PROTACs for degradation of HDAC 1 and 2. In the part 1, it was synthesized 24 intermediates and 7 final products in yields ranging from 29 and 85%. Two of the most promising compounds presented IC_{50} values ranging from 17 to 950 nM and interesting selectivity towards HDACs 1 and 2. Preliminary assay in erythroleukemic cells (K562) demonstrated that both compounds were able to increase γ -globin expression by, approximately, 7-fold at 1 μ M in a period of time of 72 and 96 hours, being most promising than the drug used in therapy, hydroxyurea (increase by 2.5-fold at 30 μ M). In the part 2, it was synthesized 45 intermediates and 13 new final PROTACs with yields ranging from 30 to 65%. All compounds were evaluated towards HDAC 1-3 degradation and, in general, all of them presented selective degradation of HDAC-1. Compounds ARP-26, ARP-37 and ARP-49 presented the better degradation levels ranging from 41 to 60% against HDAC-1. DC_{50} values from compounds ARP-26 and ARP-49 were determined and shown approximately 50% of degradation at 2.5 μ M. Therefore, in this work was possible to synthesize and characterize new HDAC inhibitors with interesting selectivity against HDAC- 1 and 2 with ability of induction of γ -globin in levels that exceed the results seen for the standard drug. It was also possible to synthesize and characterize new PROTACs with degradation selectivity against HDAC-1.

Key-words: sickle cell anemia, hemoglobinopathies, epigenetic, organic synthesis, hemoglobin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de representação da hemoglobina normal e das hemoglobinas geradas a partir da mutação do gene da globina β	32
Figura 2. Representação da polimerização da HbS e modificações da forma da hemácia	33
Figura 3. Processo de vaso-oclusão e exemplos das principais complicações encontradas em pacientes falciformes	35
Figura 4. Curvas de tendência de incidência de morte de pacientes falciformes no Brasil	36
Figura 5. Estrutura química dos fármacos hidroxiureia, L-glutamina e voxelotor	39
Figura 6. Síntese de globinas durante a gestação e desenvolvimento do neonato	40
Figura 7. Papel dos fatores de transcrição e das HDACs na regulação da expressão de γ -globina	41
Figura 8. Estrutura química dos inibidores de LSD-1 e DNMT	43
Figura 9. Mecanismo de atuação das HDACs	44
Figura 10. Estrutura do sítio ativo das HDACs Classe I	45
Figura 11. Sobreposição HDAC 2 (rosa) e 3 (dourado)	46
Figura 12. Sobreposição das HDACs 2 (rosa), 3 (dourado) e 8 (azul)	46
Figura 13. Ciclo de ubiquitinação de proteínas	51
Figura 14. Mecanismo de ação das PROTACs	52
Figura 15. Estrutura das PROTACs 1-4 e Western blot da avaliação da degradação das HDACs 1-3	53
Figura 16. Estrutura da molécula JSRF5 e seus valores de inibição enzimática contra as HDACs 1 e 2	54
Figura 17. Esquema do planejamento estrutural dos inibidores de HDAC	55
Figura 18. Planejamento estrutural das PROTACs e estrutura química do composto ARP-26	57
Figura 19. Rota sintética para obtenção dos compostos (18) a (21)	61
Figura 20. Rota sintética para obtenção dos compostos (26) -(28)	62
Figura 21. Etapa de obtenção do ligante de E3-ligase (ARP-01)	63
Figura 22. Rota sintética de obtenção dos intermediários ARP-04 , ARP-07 , ARP-17 , ARP-32 e ARP-35	63
Figura 23. Rota sintética de obtenção dos intermediários ARP-23 e ARP-36	64
Figura 24. Rotas sintéticas de obtenção das subunidades dos inibidores de HDAC ARP-14 e ARP-45	65
Figura 25. Rota sintética de obtenção das séries I e II das PROTACs	67
Figura 26. Esquema das moléculas utilizadas no estudo de modelagem molecular	72
Figura 27. Modo de interação com o sítio ativo da HDAC-2	74
Figura 28. Representação da ocupação da cavidade interna do sítio ativo da HDAC-2	74

Figura 29. Interação adicional realizada pelos compostos avaliados no docking	76
Figura 30. Sobreposição das poses da Figura 29	76
Figura 31. Estrutura química dos compostos selecionados para síntese	77
Figura 32. Valor de IC ₅₀ e porcentagem de inibição enzimática contra as HDACs 1-3, 6, 8 e 11 do composto (21)	103
Figura 33. Valor de IC ₅₀ e porcentagem de inibição enzimática contra as HDACs 1-3, 6, 8 e 11 do composto (31)	104
Figura 34. Número de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) após tratamento com composto (21)	106
Figura 35. Número de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) após tratamento com composto (31)	106
Figura 36. Expressão de γ -globina pós-tratamento com composto (21)	107
Figura 37. Expressão de γ -globina pós-tratamento com composto (31)	108
Figura 38. Mecanismo da reação de obtenção do composto ARP-01	109
Figura 39. Espectro de massas do composto ARP-01	111
Figura 40. Esquema do mecanismo de reação da S _N Ar	112
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H do subproduto obtido na S _N Ar	113
Figura 42. Esquema do mecanismo de reação com brometo de tionila	119
Figura 43. Espectro de massas de alta resolução dos compostos ARP-17 e ARP-35	121
Figura 44. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	173
Figura 45. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	174
Figura 46. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	175
Figura 47. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	175
Figura 48. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	176
Figura 49. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	177
Figura 50. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M	178
Figura 51. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac	178
Figura 52. Avaliação de DC ₅₀ do composto ARP-26	179
Figura 53. Avaliação de DC ₅₀ do composto ARP-49	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos CI-994, MGCD-0103 e MS-275 em μM	47
Tabela 2. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos (I) , (II) , BRD4884 e ACY-957 em μM	48
Tabela 3. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (1)	78
Tabela 4. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (2) - (5)	80
Tabela 5. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (6) - (9)	82
Tabela 6. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (10) e (11)	84
Tabela 7. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (12) e (13)	85
Tabela 8. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (14) e (15)	88
Tabela 9. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (16) e (17)	89
Tabela 10. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (18) e (19)	92
Tabela 11. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (20) e (21)	93
Tabela 12. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (22) e (23)	94
Tabela 13. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (24) e (25)	96
Tabela 14. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos finais (29) a (31)	98
Tabela 15. Porcentagem de inibição da atividade das HDACs 1 e 2 a $1\ \mu\text{M}$	100
Tabela 16. Deslocamento químico e constantes de acoplamento do composto ARP-01	110
Tabela 17. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-04 , ARP-07 e ARP-16	114
Tabela 18. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-32 e ARP-33	117
Tabela 19. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-17 e ARP-35	119
Tabela 20. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-02 , ARP-03 e ARP-06	122
Tabela 21. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-23 , ARP-29 e ARP-30	124

Tabela 22. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-31 , ARP-36 e ARP-05	126
Tabela 23. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-11 e ARP-12	129
Tabela 24. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-10 , ARP-13 e ARP-14	131
Tabela 25. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-28 , ARP-41 , e ARP-43	134
Tabela 26. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários ARP-44 e ARP-45	135
Tabela 27. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-18 e ARP-20	138
Tabela 28. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-21 e ARP-26	141
Tabela 29. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-22 e ARP-25	144
Tabela 30. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-24 e ARP-27	144
Tabela 31. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-34 e ARP-37	150
Tabela 32. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-38 e ARP-39	153
Tabela 33. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-40 e ARP-42	156
Tabela 34. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-46 e ARP-47	160
Tabela 35. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-48 e ARP-49	162
Tabela 36. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-50 e ARP-53	164
Tabela 37. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-51 e ARP-58	166
Tabela 38. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-52 e ARP-54	168
Tabela 39. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos ARP-55 e ARP-56	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-AzaC - 5-azacitidina

ADMA - dimetilarginina assimétrica

AF - anemia falciforme

ATCC - *American Type Culture Collection*

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

DNMT - DNA metil transferase

DS - *docking score*

HAT - histona acetiltransferase

Hb - hemoglobina

HbA - hemoglobina adulta

HbF - hemoglobina fetal

HDAC - histona deacetilase

HU - hidroxiureia

LigPrep - *Ligand Preparation*

LSD-1 - lisina demetilase 1

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PDB - protein Data Bank

PROTAC - Proteolysis Targeting Chimera

RMN - ressonância magnética nuclear

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

ROS - espécies reativas de oxigênio

sGC - guanilato ciclase solúvel

S_N2 – substituição nucleofílica bimolecular

S_NAr - substituição nucleofílica aromática

TCP - tranilcipromina

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

VHL - Von Hippel-Lindau

Sumário

1. INTRODUÇÃO	31
1.1 Anemia falciforme.....	31
1.1.1. Aspectos gerais.....	31
1.1.2. Fisiopatologia.....	31
1.1.3. Tratamento	37
1.2. Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos	39
1.2.1. Indução de expressão de gama-globina e produção de HbF	39
1.3. Histonas deacetilases.....	43
1.3.1. Aspectos gerais e estruturais e o mecanismo de ação das HDACs	43
1.3.2. Estrutura dos inibidores de HDAC.....	46
1.3.4. Inibidores de HDACs na indução da expressão de gama-globina	49
1.4. PROTACs.....	50
1.4.1. Aspectos gerais e mecanismo de ação.....	50
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo geral.....	53
2.2. Objetivos específicos	53
3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	54
3.1. Inibidores de HDAC	54
3.2. PROTACs.....	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1. Reagentes e solventes	57
4.2. Modelagem molecular	59
4.3. Metodologia sintética	60
4.3.1. Inibidores de HDAC	60
4.3.2. PROTACs	63
4.4. Métodos analíticos.....	68
4.5. Ensaio biológicos	69
4.5.1. Ensaio enzimático.....	69
4.5.2. Ensaio de degradação	69

4.5.3. Avaliação da viabilidade celular e número de células viáveis K562	70
4.5.4. Avaliação da expressão de gama-globina em células K562	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1. Modelagem Molecular	72
5.2. Síntese dos inibidores de HDAC	77
5.3. Inibição enzimática	100
5.4. Avaliação da viabilidade celular e números de células viáveis, e indução de gama-globina pelos inibidores de HDAC em K562	105
5.5. Síntese das PROTACs	109
5.6. Ensaio de degradação de HDACs 1-3	173
6. CONCLUSÃO	181
7. REFERÊNCIAS	182

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anemia falciforme

1.1.1. Aspectos gerais

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica formada por quatro cadeias globínicas e associada com um cofator heme, o qual tem como função o transporte de oxigênio. As diversas combinações de cadeias globínicas encontradas na Hb resultam nos diferentes tipos de tetrâmero que são produzidos durante três diferentes estágios de vida do ser humano: embrionário, fetal e adulto. A hemoglobina embrionária são três: Gower I (duas cadeias zeta (ζ) e duas cadeias épsilon (ϵ)), Gower II (duas cadeias alfa (α), e duas cadeias ϵ) e a Portland (duas cadeias ζ e duas cadeias gama (γ)), tendo sua atuação nos estágios iniciais da gestação. A hemoglobina fetal, ou HbF, apresenta duas cadeias globínicas α e duas cadeias γ , tem sua produção iniciada nos primeiros meses de gestação e é produzida majoritariamente até a troca de hemoglobinas que ocorre entre seis meses e um ano após o nascimento, quando a hemoglobina predominante passa a ser a hemoglobina adulta (HbA). A HbA apresenta duas cadeias globínicas α e duas cadeias beta (β). Uma simples troca de nucleotídeos no gene que codifica a cadeia globínica β da HbA pode resultar na formação de uma cadeia globínica e hemoglobina alteradas, as quais serão as responsáveis pela fisiopatologia e sintomas que caracterizam a hemoglobinopatia mais prevalente no mundo, denominada de anemia falciforme (AF).

1.1.2. Fisiopatologia

A AF foi descrita pela primeira vez pelo médico James Herrick em 1910 e é uma das primeiras doenças genéticas entendidas molecularmente (PAULING *et al.*, 1949). É caracterizada como uma hemoglobinopatia causada por uma mutação no gene que codifica a cadeia β da HbA. Como demonstrado na Figura 1, o sexto códon do gene da globina β normal é composto por guanina-adenina-guanina (GAG) e é responsável por codificar um ácido glutâmico (INGRAM, 1956; KATO *et al.*, 2018). Esse aminoácido está posicionado na região superficial da globina e, em pH fisiológico, sua subunidade ácido carboxílico apresenta-se desprotonada e causa repulsão ao se aproximar de outras cadeias globínicas, mantendo assim a hemoglobina “solúvel” no interior da

hemácia. Na AF, há uma mutação que resulta na troca da adenina por uma timina, gerando o códon GTG, o qual codifica uma valina. A valina é um aminoácido hidrofóbico e que não apresenta carga, sendo assim, em ambientes de baixa tensão de oxigênio será capaz de interagir com outros aminoácidos como alanina, fenilalanina e leucina de outras cadeias globínicas, resultando na aproximação das hemoglobinas e consequente polimerização das mesmas (VEKILOV, 2007) (Figura 1). Quando essa mutação ocorre em apenas uma das fitas de DNA denomina-se traço falciforme e quando ocorre em ambas as fitas se denomina AF (Figura 1). A hemoglobina mutada presente nos pacientes falciformes apresenta duas cadeias α e duas cadeias mutadas chamadas β^S e é denominada de HbS (*sickle hemoglobin*).

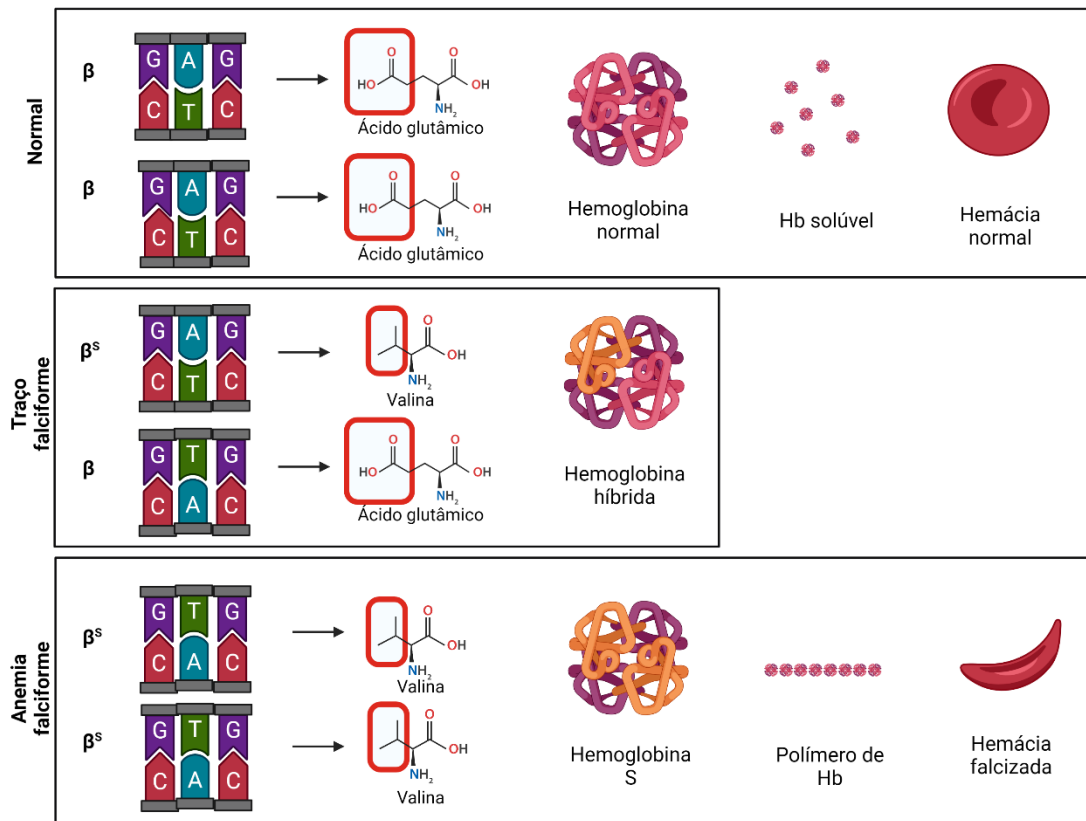


Figura 1. Esquema de representação da hemoglobina normal e das hemoglobinas geradas a partir da mutação do gene da globina β

Fonte: Criado com BioRender.com

Quando em seu estado oxigenado (estado relaxado ou estado R), a HbS se mantém solúvel dentro da hemácia. Em ambientes de baixa tensão de oxigênio, a hemoglobina adota a sua conformação desoxigenada (estado tenso ou estado T) e polimeriza-se formando fibras helicoidais de 14 filamentos organizados em fita dupla que são estabilizadas por interações secundárias com outras moléculas de HbS (HARRINGTON *et al.*, 1997) (Figura 2). Diminuição de pH, concentrações elevadas de HbS, baixas temperaturas e presença de hemoglobinas normais também influenciam nas taxas de polimerização da HbS. Essas fibras forçam a mudança de formato da hemácia, alterando suas propriedades mecânicas e reológicas de forma significativa (BRIEHL, 1983; FRENETTE; ATWEH, 2007) e dando à hemácia a forma de foice (Figura 2).

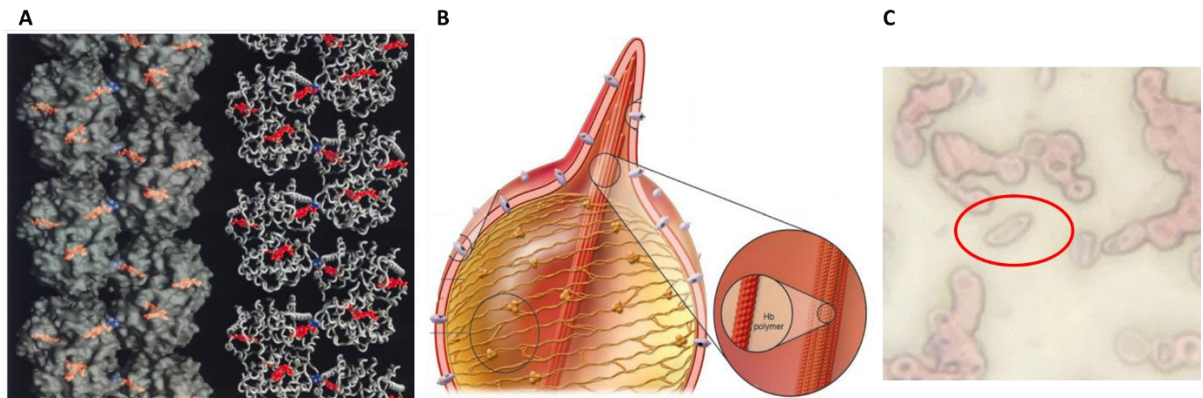


Figura 2. Representação da polimerização da HbS e modificações da forma da hemácia. (A) Representação da fita dupla de HbS encontrada no cristal, onde a valina da cadeia β apresenta cor azul e é possível identificar as interações desse aminoácido com as cadeias adjacentes; (B) Crescimento da fibra de hemoglobinas e a alteração causada na membrana da hemácia; (C) Imagem de lâmina de esfregaço sanguíneo de um paciente falciforme destacando-se a hemácia falciforme.

Fonte: (A) Imagem retirada de (HARRINGTON *et al.*, 1997); (B) Imagem retirada e adaptada de (FRENETTE; ATWEH, 2007)

Devido às alterações na membrana da hemácia, as taxas de hemólise intra- e extra-vascular aumentam, o que é responsável pela diminuição da vida da hemácia em até 75% (KATO *et al.*, 2018; QUINN *et al.*, 2016). A hemólise tem como consequência a liberação do conteúdo intracelular, dentre os quais destacam-se a hemoglobina, enzima L-arginase e dimetilarginina assimétrica (ADMA). A enzima L-arginase converte arginina em ornitina e uréia, e reduz a

concentração plasmática de arginina que atua como substrato da enzima óxido nítrico sintase (NOS) para produção de óxido nítrico (NO), enquanto a ADMA atua como inibidor de NOS. Esses fatores fazem com que a NOS não altere sua conformação, o que seria essencial para síntese de NO, e comece a produzir espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, as moléculas de hemoglobinas livres são capazes de sequestrar o NO circulante, diminuindo assim a biodisponibilidade do mesmo (KATO *et al.*, 2017; ZENNADI *et al.*, 2008). A baixa disponibilidade de NO resulta em um processo denominado disfunção vascular e efeitos como a ativação de células endoteliais, ativação de plaquetas e vasoconstrição (KATO *et al.*, 2017).

A ativação das células endoteliais na AF ocorre devido à interação das hemácias falciformes, hemoglobina e grupo heme livres com o endotélio, e também devido à hipoxia que é induzida pela maior concentração de ROS (HEBBEL, 1997, 2008). Além disso, as baixas taxas de NO induzem o aumento da produção de endotelina-1 e da expressão de moléculas de adesão, como VCAM1, ICAM1, P-selectina, E-selectina, entre outras, resultando no aumento da adesão dos eritrócitos e leucócitos (INCALZA *et al.*, 2018; STORCH *et al.*, 2017). Os eritrócitos falciformes apresentam uma taxa de adesão celular aumentada quando comparada aos eritrócitos normais devido a um aumento da expressão de moléculas de adesão em sua superfície (HEBBEL, 2008).

Destaca-se ainda na doença o processo inflamatório crônico, com aumento dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL) IL-1 β e IL-6 (MALAVÉ *et al.*, 1993; OWUSU-ANSAH *et al.*, 2015). O TNF- α aumenta as propriedades quimiotáticas, induz mudanças nas propriedades coagulantes e anticoagulantes, aumenta a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, e contribui para o aumento das moléculas de adesão (ICAM, VCAM). Estimula ainda, a produção de radicais livres e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 β e PGE2 (LANARO *et al.*, 2009; MALAVÉ *et al.*, 1993).

A Figura 3 apresenta uma representação da formação do agregado heterocelular formado entre eritrócito falciforme, plaquetas ativadas e neutrófilos. Esse agregado é responsável pelo processo de vaso-oclusão que causa as crises vaso-oclusivas dolorosas em pacientes falciformes, e representa a manifestação clínica mais frequente da doença. A vaso-oclusão resulta em infarto

de pequenos e médios vasos que irão gerar dores crônicas, infarto e lesão de órgãos e tecidos, e aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Dentre as complicações agudas e crônicas do indivíduo pode-se destacar as dores crônicas, hipertensão pulmonar, anemia hemolítica, priapismo, infarto do baço, da medula óssea e da retina, crise torácica aguda, entre outros (KATO *et al.*, 2007).

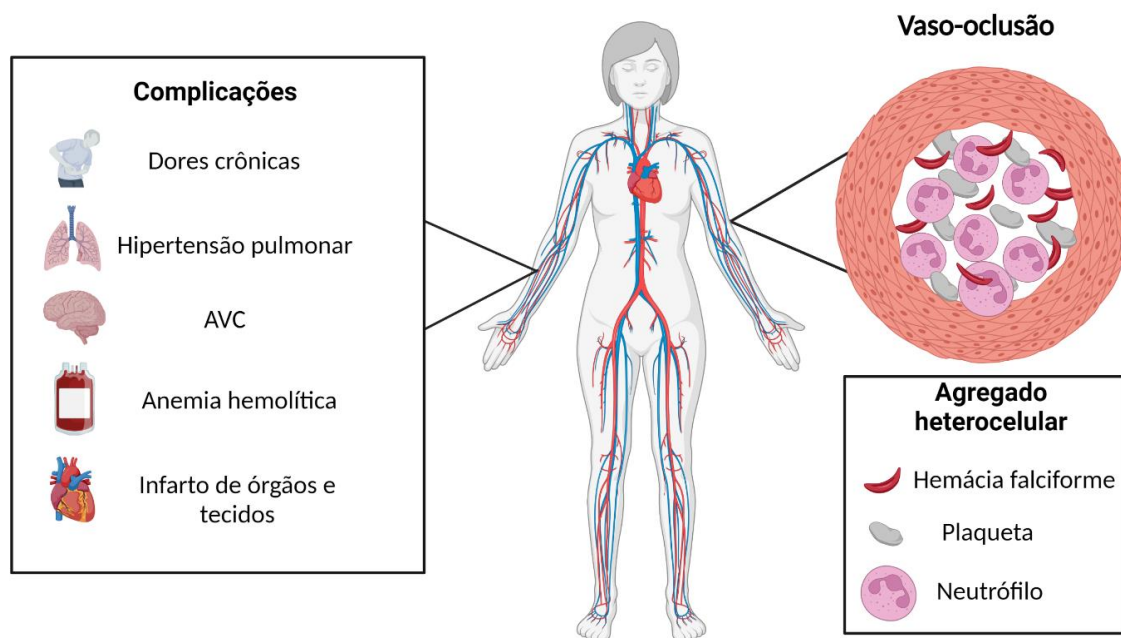


Figura 3. Processo de vaso-oclusão e exemplos das principais complicações encontradas em pacientes falciformes

Fonte: Criado com BioRender.com

Estima-se que mundialmente nasçam cerca de 5.476.407 crianças com o traço falciforme e 312.302 com a AF por ano. Aproximadamente 75% dos nascidos com AF são da região da África Subsaariana, enquanto que nos EUA a taxa é de 3 mil nascimentos e no Reino Unido cerca de 300 nascimentos por ano (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015; PIEL *et al.*, 2013). No Brasil, dados do ministério da saúde de 2016 apontaram o nascimento de 1071 indivíduos com doença falciforme, e em 2020 60.094 casos de pacientes heterozigotos e 964 casos de doença falciforme. Os custos diretos e indiretos relacionados à AF no Brasil foram estimados em 1,5 bilhão de reais em 2018 (PINTO *et al.*, 2020).

Em relação às taxas de mortalidade, foram registrados no Brasil 6.813 óbitos de pacientes falciformes entre 1997 e 2017. A região sudeste compreendeu 48,39% desse número, seguida das regiões Nordeste (31,92%), Centro-Oeste (10,3%), Norte (4,96%) e Sul (4,39%). Como demonstrado na Figura 4, dentre os anos 2001 e 2014 houve tendência de aumento na incidência de mortes, enquanto a partir de 2015 o gráfico mostra um declínio. A tendência de aumento em anos anteriores à 2015 pode ser explicada devido à subnotificação ocorrida devido à dificuldade de diagnóstico e/ou falta de registros hospitalares. O programa nacional de triagem neonatal (PNTN) no Brasil teve início em 2001, e a evolução crescente dos óbitos mostrados na Figura 4 seguiu o aumento da cobertura do programa. Em relação às regiões brasileiras, todas seguiram a mesma tendência nacional, com exceção do centro-oeste onde se visualiza uma maior variação dentre os anos (MOTA *et al.*, 2022).

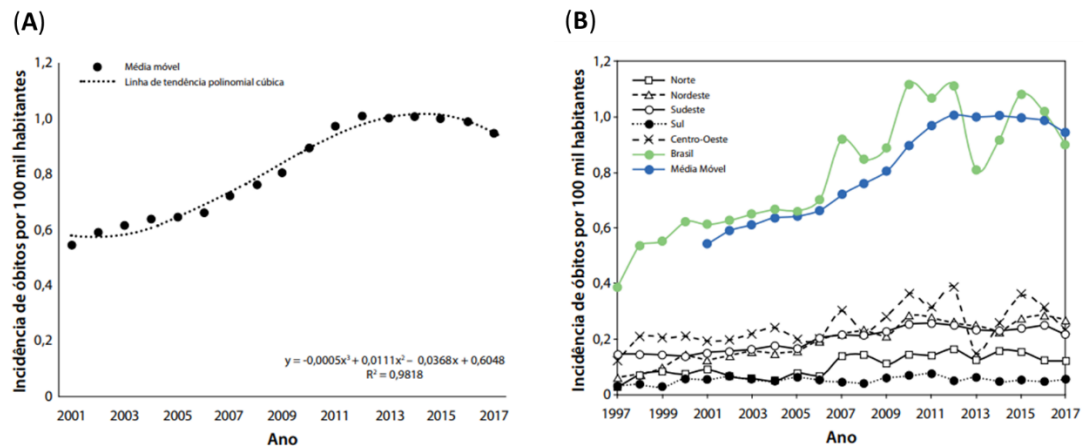


Figura 4. Curvas de tendência de incidência de morte de pacientes falciformes no Brasil (A) e em relação às regiões do país (B).

Fonte: Imagens retiradas e adaptadas de (MOTA *et al.*, 2022).

A faixa etária entre 15 e 34 anos foi a mais predominante dentro os óbitos registrados, dado que reflete a baixa expectativa de vida de pacientes falciformes no Brasil (MOTA *et al.*, 2022). Nos EUA, por exemplo, a expectativa de vida de um paciente falciforme é de cerca de 54 anos, enquanto de um indivíduo sadio chega a 75 anos (LUBECK *et al.*, 2019).

1.1.3. Tratamento

Atualmente, existem 4 fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento da AF, sendo eles: hidroxiureia (HU), L-glutamina, voxelotor e crizanlizumab (PAVAN; DOS SANTOS, 2021).

A HU (Figura 5) foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da AF pelo FDA (1998) e Europa (2007). O principal mecanismo de ação da HU aplicado à AF é através da indução da expressão da γ -globina e aumento da produção de HbF através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) (COKIC *et al.*, 2003). É proposto que o mecanismo de ativação da sGC seja através da reação da HU com a enzima, resultando no aumento dos níveis de cGMP e indução de γ -globina (COKIC *et al.*, 2008; COKIC, V. P. *et al.*, 2003). Além disso, a HU também atua através da doação de óxido nítrico por ser capaz de reagir com a hemoglobina (HUANG *et al.*, 2002), peroxidase (HUANG *et al.*, 2002) e enzimas catalase (HUANG *et al.*, 2004). Apesar desses efeitos benéficos, a HU apresenta sérios efeitos adversos como a mielossupressão e efeito genotóxico em tratamentos a longo prazo (NAHAVANDI *et al.*, 2000).

A L-glutamina (Figura 5) foi o segundo fármaco a ser aprovado pelo FDA (2017) para o tratamento da AF. Foi demonstrado que pacientes tratados com L-glutamina apresentaram redução nas taxas de hospitalização e da frequência de crises dolorosas. Esse aminoácido é substrato para a síntese de glutathione, NAD(H) e NADP(H), e óxido nítrico, sendo então essencial para o mecanismo antioxidante do eritrócito (SADAF; QUINN, 2020). Quatro ensaios clínicos foram realizados utilizando-se a L-glutamina em pacientes falciformes: o primeiro contou com uma amostra pequena de 7 pacientes, mas foi capaz de demonstrar que a suplementação com 30g de L-glutamina administrada diariamente aumentou o potencial redox ($47.2 \pm 3.7\%$ to $62.1 \pm 11.8\%$) e os níveis de NADH nos eritrócitos falciformes (47.5 ± 6.3 to 72.1 ± 15.1 nmol/mL) (NIIHARA *et al.*, 1998); o segundo estudo foi realizado com vinte e sete crianças e adolescentes utilizando 600mg/kg por dia de L-glutamina por 24 semanas, apresentando redução de 6% no gasto energético em repouso e aumento dos parâmetros nutricionais (WILLIAMS *et al.*, 2004); num estudo de fase II randomizado, duplo-cego, com controle de placebo e multicêntrico conduzido com doses de L-glutamina de 0.3 g/kg duas vezes ao dia por 48 semanas resultou numa redução de 40% da frequência de hospitalização e mais de 50% de redução de crises dolorosas

(NIIHARA, 2014); o último estudo, de fase III, multicêntrico, randomizado e duplo-cego com 230 pacientes e mesmo regime de dose do estudo anterior, mostrou novamente redução da frequência de hospitalização e de crises dolorosas, o que levou então a aprovação da L-glutamina (NIIHARA *et al.*, 2018).

O voxelotor (Figura 5) é um fármaco oral aprovado pelo FDA em 2019. Seu mecanismo de ação é através de sua reação com a amina terminal das cadeias α da HbS formando uma ligação covalente reversível e aumentando a estabilidade da HbS em sua forma oxigenada. O tratamento *in vitro* da HbS com voxelotor foi capaz de atrasar o processo de polimerização (DUFU *et al.*, 2018). Estudo *in vitro* e *in vivo* foram capazes de demonstrar que voxelotor apresenta alta especificidade pela cadeia α da HbS e necessita apenas de uma dose diária, o que aumentaria a aceitação dos pacientes ao tratamento (HUTCHALEELAHA *et al.*, 2019). Em estudos clínicos de fase 1/2, 16 pacientes tratados com 700 ou 900 mg de voxelotor por 90 dias apresentaram níveis aumentados de Hb, redução da falcização das hemácias e da taxa de hemólise (HOWARD *et al.*, 2019). Pacientes que apresentavam sintomas graves da doença foram tratados com 900 mg de voxelotor por 6-17 meses e foi possível visualizar níveis aumentados de Hb e da saturação de oxigênio, o que diminuiu as taxas de hospitalização devido às crises vaso-oclusivas. Os pacientes não apresentaram efeitos adversos (BLYDEN *et al.*, 2018). Resultados similares foram observados em ensaio clínico de fase 3 com doses de 900 e 1500 mg (NCT03036813).

O último fármaco aprovado pelo FDA foi o crizanlizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado, responsável por se ligar à P-selectina e bloquear sua interação com a glicoproteína-1, diminuindo assim a adesão celular e o processo vaso-oclusivo. Em um estudo clínico de fase 2, doses de 5 mg/kg de crizanlizumabe foram capazes de reduzir em até 45,3% a taxa média de crises dolorosas após 52 semanas de tratamento (ATAGA *et al.*, 2017). Foi também demonstrado que o tratamento com crizanlizumabe foi capaz de atrasar o tempo da primeira crise vaso-oclusiva, passando de 1,38 meses no grupo placebo para 4,07 meses no grupo tratado (KUTLAR *et al.*, 2019). Crizanlizumabe foi aprovado em 2019 com o objetivo de reduzir as crises vaso-oclusivas em pacientes adultos e pediátricos maiores de 16 anos (BLAIR, 2020).

No cenário brasileiro, a HU é o único fármaco que faz parte das diretrizes do SUS para o tratamento da AF. O voxelotor e L-glutamina ainda não estão registrados na ANVISA e o crizanlizumabe obteve registro em 2020, porém ainda não foi incluído nas diretrizes (CONITEC, 2022).

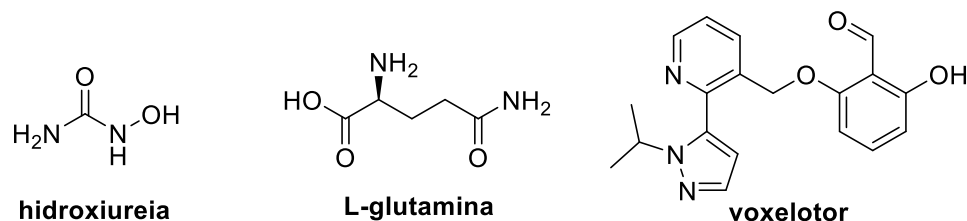


Figura 5. Estrutura química dos fármacos hidroxiureia, L-glutamina e voxelotor

Fonte: Própria autora

1.2. Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos

1.2.1. Indução de expressão de gama-globina e produção de HbF

Devido ao caráter genético da AF, as estratégias para o tratamento farmacológico da doença se baseiam no controle e minimização dos sintomas. No Brasil, por exemplo, a terapia preconizada nas diretrizes do SUS engloba a HU como fármaco para prevenir crises e complicações da doença por ser capaz de induzir a produção de HbF e, assim, diminuir as taxas de hemólise, de expressão de moléculas de adesão e aumentar as taxas de hemoglobina. Utiliza-se também antibióticos como a penicilina para profilaxia de infecções, e analgésicos e anti-inflamatórios como adjuvantes (PCDT, 2018).

Na literatura existem diversas abordagens sendo estudadas para o tratamento da AF, como estudo de compostos antioxidantes (DO NASCIMENTO *et al.*, 2013; FIBACH *et al.*, 2012) e doadores de óxido nítrico (ABID *et al.*, 2018; CANALLI *et al.*, 2008) com foco no controle da disfunção endotelial; compostos que são capazes de diminuir a desidratação do eritrócito ajudando no controle da polimerização da HbS (ABU-SALAH; GAMBO, 2002; BRUGNARA *et al.*, 1996); ligantes covalentes (ABDULMALIK *et al.*, 2020) e não covalentes (GOPALSAMY *et al.*, 2021) de hemoglobina para inibição da polimerização e compostos capazes de induzir a expressão de γ -globina e produção de HbF (PAVAN *et al.*, 2022), sendo esta última a mais estudada.

Um dos fatores que influencia na polimerização da HbS é sua concentração dentro da hemácia. Sendo assim, quando os níveis de HbF estão aumentados, a taxa de polimerização é reduzida, pois a HbF não é capaz de polimerizar (EATON, 2020). Esses resultados já foram visualizados em pacientes falciformes que naturalmente expressavam níveis aumentados de γ -globina e níveis maiores de HbF. Esse fator inclusive é determinante na gravidade dos sintomas dos pacientes, ou seja, pacientes que apresentam níveis aumentados de HbF apresentam sintomas menos severos da doença (PLATT *et al.*, 1994; REES *et al.*, 2022).

Como descrito anteriormente, a HbF é produzida dentre os meses iniciais de gestação até os primeiros meses pós nascimento (Figura 6) e seu mecanismo de regulação tem sido extensivamente estudado.

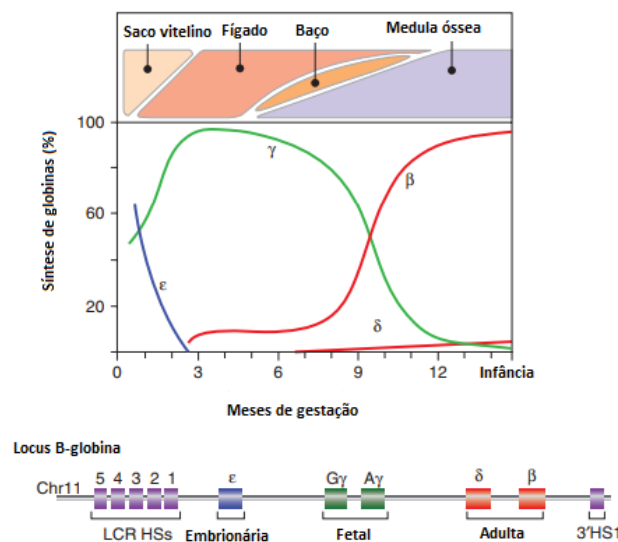


Figura 6. Síntese de globinas durante a gestação e desenvolvimento do neonato

Fonte: Figura retirada e adaptada de (SANKARAN; ORKIN, 2013)

Um dos motivos que explica a diminuição da expressão da γ -globina é o silenciamento do gene dessa globina presente no locus da globina β . A Figura 7 apresenta um resumo dos fatores de transcrição, complexos e enzimas epigenéticas que atuam na regulação da expressão desse gene os quais tem sido explorado como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos.

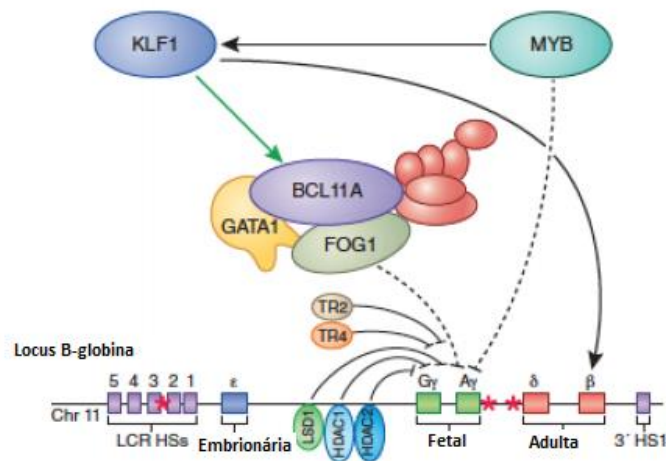


Figura 7. Papel dos fatores de transcrição e das HDACs na regulação da expressão de γ -globina (KLF1 - Kruppel Like Factor 1; BCL11A - B cell lymphoma/leukemia 11A; FOG-1- Friend of GATA-1; HDAC – Histona deacetilase).

Fonte: Figura retirada e adaptada de (SANKARAN; WEISS, 2015).

Dentre as enzimas epigenéticas envolvidas nesse processo de silenciamento destacam-se a DNA metil transferase (DNMT) que atua diretamente no DNA, e a lisina demetilase 1 (LSD1), e as histonas deacetilases 1 e 2 (HDAC1 e HDAC2) que atuam nos nucleossomos.

Tem sido descrito que sequências CpG do DNA em tecidos eritropoiéticos são metiladas na região do gene da γ -globina, sugerindo que a metilação do DNA é um dos reguladores epigenéticos da expressão desse gene (VAN DER PLOEG; FLAVELL, 1980). Baseado nessa informação, o uso de moléculas capazes de incorporar no DNA e evitar a metilação, como a 5-azacitidina (5-azaC) (Figura 8), se tornou uma abordagem interessante. A 5-azaC é um agente hipometilante capaz de se ligar covalentemente à DNMT, evitando a metilação do DNA e, consequentemente, o silenciamento gênico. O primeiro estudo *in vivo* realizado com essa molécula foi realizado com 13 babuínos anêmicos utilizando-se diferentes regimes posológicos. Os resultados iniciais demonstraram que a 5-azaC foi capaz de aumentar a produção de HbF e o número de células F (células que contém HbF), alcançando as maiores taxas entre os dias 5 e 7 após a descontinuação do tratamento. Em contrapartida, o número de leucócitos reduziu pela metade, mostrando também o efeito citotóxico desse composto (DESIMONE *et al.*, 1982). Ensaios clínicos foram também realizados com a 5-azaC demonstrando seu potencial em induzir a

expressão de γ -globina e HbF, porém essa molécula demonstrou ser carcinogênica tornando inviável a continuação do seu estudo para aplicação na AF (CARR *et al.*, 1984, 1988).

A decitabina (Figura 8) é análoga à 5-azaC, porém aparentemente não apresenta os mesmos efeitos deletérios quando administrada em baixas doses. Em estudos clínicos de fase 1/2 com 8 pacientes falciformes não-responsivos à HU onde as taxas de γ -globina aumentaram de 3,19% para 13,66%, os níveis de HbF subiram de 3,55% para 13,45% e a porcentagem de células F subiu de 21% para 55% (KOSHY *et al.*, 2000). Resultados similares foram encontrados em outros estudos, porém a decitabina tem como inconveniente a necessidade de sua administração ser realizada por via endovenosa ou subcutânea, o que diminui a taxa de aceitação dos pacientes (DESIMONE *et al.*, 2002; SAUNTHARARAJAH *et al.*, 2003). Já foram também realizados aprimoramentos na estrutura da decitabina de forma que sua utilização em forma de sal fosse utilizada (LAVELLE *et al.*, 2007).

A LSD-1 é uma enzima epigenética responsável pela remoção dos grupamentos metila do lisinas mono- e di-metiladas (H3K4), resultando no silenciamento gênico (SHI *et al.*, 2004). Em um estudo conduzido por Shi e colaboradores foi demonstrado que durante a diferenciação celular de células CD34⁺, a LSD-1 se liga ao promotor das globinas ϵ -, β - e γ . Com o tratamento dessas células utilizando-se inibidores de LSD-1 como tranilcipromina (TCP – IC₅₀ 2 μ M) (Figura 8), houve um aumento significativo da taxa de metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4) do promotor do gene da γ -globina, indução da expressão da γ -globina em 9,4 vezes e aumento de 4,6% da produção de HbF. Para comprovação dos dados obtidos foi realizado o knockdown da LSD-1, com o qual obteve resultados semelhantes, comprovando a atuação da LSD-1 no silenciamento da γ -globina (SHI *et al.*, 2013).

As HDACs são as enzimas epigenéticas mais estudadas e descritas na literatura. Seu mecanismo de controle epigenético é bem estabelecido e, portanto, sua utilização como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças como câncer, HIV e AF, por exemplo, é vasta. Sendo as HDACs o alvo escolhido para o desenvolvimento deste trabalho, sua estrutura, mecanismo de ação e aplicação para AF serão descritas no tópico a seguir.

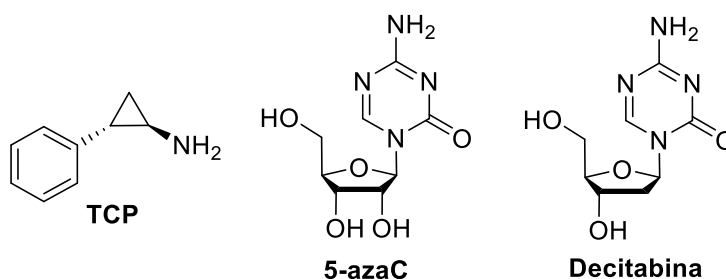


Figura 8. Estrutura química dos inibidores de LSD-1 e DNMT

Fonte: Própria autora

1.3. Histonas deacetilases

1.3.1. Aspectos gerais e estruturais e o mecanismo de ação das HDACs

A transcrição em células eucarióticas é influenciada pela forma como o material genético se organiza. Em estado de repouso, o DNA está altamente compactado na cromatina a fim de evitar o acesso ao material genético por fatores de transcrição. A subunidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, um octâmero constituído por 4 tipos diferentes de histonas (H3/H4 e H2A/H2B) envolvidos por 146 pares de base do DNA (Figura 9). Durante a transcrição gênica, modificações no nucleossomo como, por exemplo, acetilação de histonas, favorecem a ligação de proteínas e fatores de transcrição ao DNA (LUGER *et al.*, 1998).

A acetilação e deacetilação de resíduos de lisina em histonas são modificações pós-translacionais cruciais para regulação epigenética (KOUZARIDES, 2007). Os efeitos opostos das enzimas histona acetiltransferase (HAT) e HDAC mantêm o controle do processo de transcrição. A HAT é responsável por transferir grupos acetil à amina ϵ do resíduo de lisina em histonas neutralizando a carga desse aminoácido. Com a neutralização da carga, a interação da cauda da histona com o DNA é diminuída, o que resulta no relaxamento da cromatina e, consequentemente, na indução da transcrição gênica. Já a HDAC é responsável pela remoção dos grupamentos acetil introduzidos pela HAT, restaurando a carga do aminoácido e a interação da cauda com o DNA. Como consequência, a cromatina volta a se condensar e resulta no silenciamento gênico da região (Figura 9) (BOLDEN *et al.*, 2006; THIAGALINGAM *et al.*, 2003).

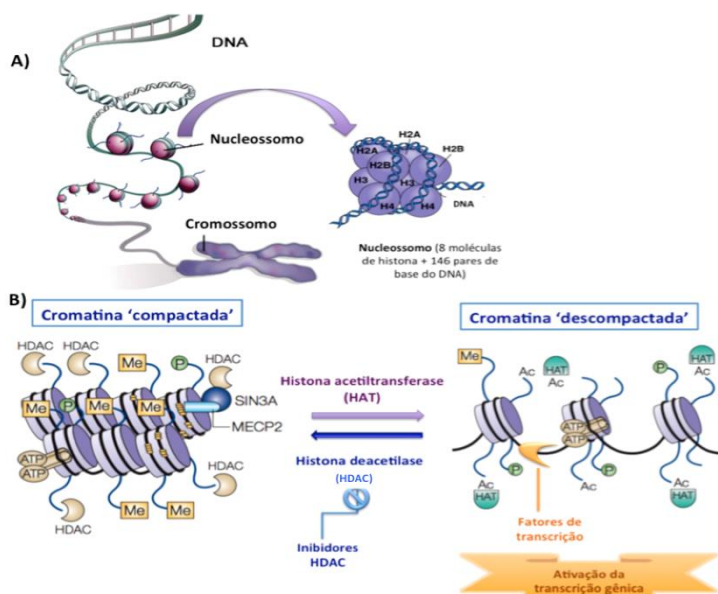


Figura 9. Mecanismo de atuação das HDACs A) Estrutura do nucleossomo; B) Mecanismo da acetilação de histonas mantendo a estrutura da cromatina condensada, impedindo por exemplo, o acesso ao DNA pelos fatores de transcrição.

Fonte: Figura adaptada de (JOHNSTONE, 2002).

Em humanos são descritas 18 isoformas de HDAC, divididas em 4 classes principais (JOHNSTONE, 2002). A classe I é constituída pelas HDACs 1, 2, 3 e 8; a classe II é constituída pelas HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10; a classe III inclui as SirT 1-7 e a classe IV apresenta HDAC 11. As HDACs pertencentes às classes I, II e IV são enzimas zinco dependentes, enquanto a HDACs da classe III são NAD^+ dependentes (BOLDEN *et al.*, 2006).

Como será discutido em tópico adiante, as HDACs de Classe I estão relacionadas com a aplicação desse alvo para o tratamento da AF, sendo assim, apenas os aspectos estruturais desta classe serão discutidos aqui. Os aspectos estruturais das outras classes podem ser encontrados em diversos artigos científicos disponíveis na literatura (BIELIAUSKAS *et al.*, 2008; BUTLER; KOZIKOWSKI, 2008; DI MICCO *et al.*, 2013; ESTIU *et al.*, 2008).

O sítio ativo das HDACs Classe I apresenta regiões bem definidas. A análise por cristalografia de raios-X para HDAC de Classe I mostra a presença de uma cavidade interna de 14 Å abaixo do canal de hidrofóbico de 11 Å, próximo ao sítio ativo contendo o átomo de zinco (WANG *et al.*,

2004). HDACs de classe I apresentam ainda uma carbonila de um resíduo glicina e a cadeia lateral da tirosina no canal hidrofóbico de 11 Å. Para HDAC-1, verifica-se a Gly-149 e Tyr-303; para HDAC-2, Gly-154 e Tyr-308; para HDAC-3, Gly-143 e Tyr-298 e para HDAC-8, Gly-151 e Tyr-306 (DI MICCO *et al.*, 2013). As diferenças estruturais entre HDAC-1 e HDAC-2 são pequenas. Entre elas foi relatado 93% de similaridade na sequência de aminoácidos, conferindo formatos similares em todas as regiões da proteína (Figura 10). Entretanto, substituições na Met-233, Pro-361 e Met-364 na HDAC-2 por Leu-228, Asn-356 e Leu-359 em HDAC-1 conferem menor acesso das moléculas ao sítio catalítico de HDAC-1 comparado com HDAC-2 (Figura 10).

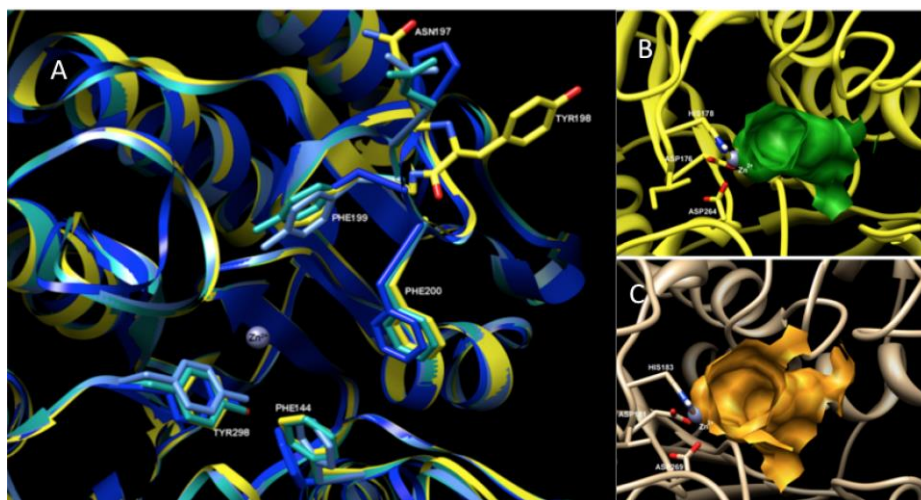


Figura 10. Estrutura do sítio ativo das HDACs Classe I A) Sobreposição HDAC-1 (azul claro), HDAC-2 (ciano), HDAC-3 (amarelo) e HDAC-8 (azul escuro) destacando a presença do átomo de zinco central presente no sítio catalítico. B) Visão superior do canal hidrofóbico de 11 Å da HDAC-1 e C) da HDAC-2. O painel B e C mostram as pequenas diferenças entre HDAC-1 e HDAC-2.

Fonte: Figuras retiradas e adaptadas de (DI MICCO *et al.*, 2013).

Já para HDAC-3 e HDAC-8, também pertencentes a classe I, diferenças menos sutis são observadas. No sítio ativo dessas duas HDACs são visualizados aminoácidos volumosos na região da cavidade de 14 Å. Como apresentado nas Figuras 11 e 12, na HDAC-3 um resíduo de tirosina substitui a serina da HDAC-2, forçando o resíduo de leucina para o centro da cavidade, resultando em impedimento estérico (Figura 11). No caso da HDAC-8, um triptofano substitui a leucina, também resultando em impedimento estérico (Figura 12) (DI MICCO *et al.*, 2013). Tais diferenças

estruturais auxiliam e possibilitam o desenvolvimento de moléculas com melhor perfil de seletividade durante o planejamento de inibidores de HDAC de classe I.

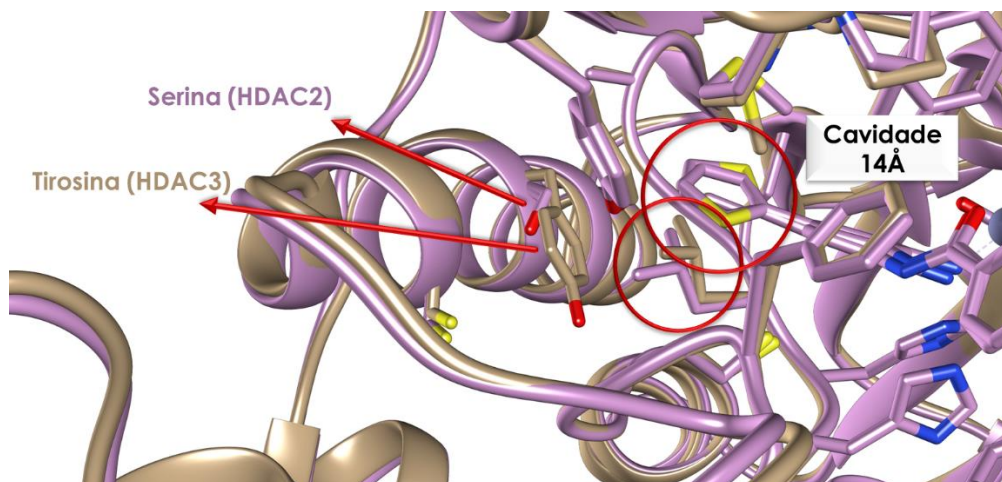


Figura 11. Sobreposição HDAC 2 (rosa) e 3 (dourado).

Fonte: Própria autora

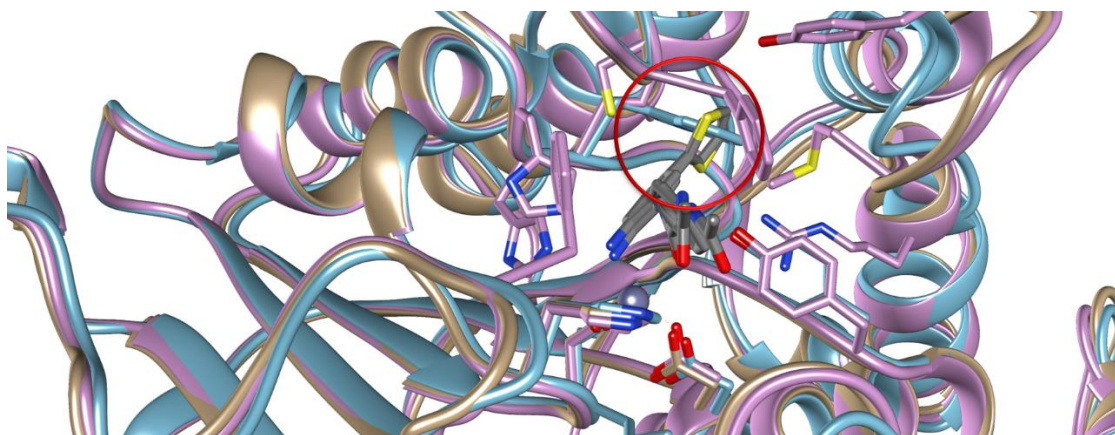


Figura 12. Sobreposição das HDACs 2 (rosa), 3 (dourado) e 8 (azul).

Fonte: Própria autora

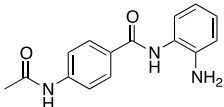
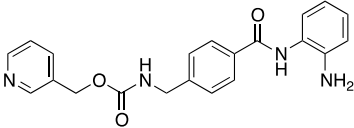
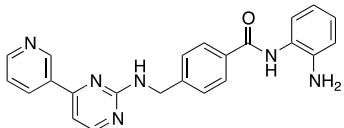
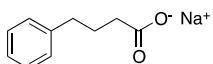
1.3.2. Estrutura dos inibidores de HDAC

Moléculas como fenilbutirato sódico são descritos como sendo capazes de aumentar em humanos os níveis de HbF devido inibição de HDAC (Tabela 1) (DOVER *et al.*, 1994). Em estudos clínicos, o derivado dimetilbutirato (HQB-1001) aumentou HbF em cerca de 80% dos voluntários (KUTLAR *et al.*, 2013). Entretanto, alta variabilidade nas respostas clínicas ainda são observadas,

e a terapia usando ‘pulsos’ de butiratos (doses menores e mais frequentes) parecem ser mais efetivas que doses únicas diárias (REID *et al.*, 2014).

O uso de inibidores de HDAC não seletivos pode levar ao bloqueio do ciclo celular e a efeitos adversos graves, entretanto, foi demonstrado que a inibição seletiva (HDAC-1 e HDAC-2) aumenta expressão de gama-globina sem causar alteração no ciclo e proliferação celular (ESRICK *et al.*, 2015). Os derivados 2-amino-benzamidas (CI-994, MS-275 e MGCD0103) (Tabela 1) demonstraram efeito inibitório seletivos às HDAC-1 e 2, sem efeitos nas HDAC 4-9. Interessantes artigos discutindo as bases estruturais para seletividade entre os diversos subtipos de HDAC têm sido publicados (BUTLER; KOZIKOWSKI, 2008; DI MICCO *et al.*, 2013; ESTIU *et al.*, 2008; ITOH *et al.*, 2008).

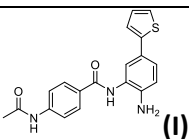
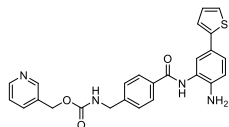
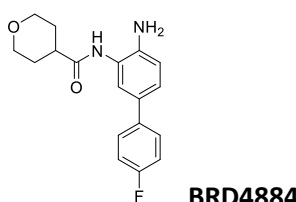
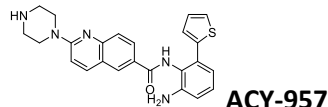
Tabela 1. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos CI-994, MS-275 e MGCD-0103 em μM (BRADNER *et al.*, 2010).

Moléculas	HDAC-1 (IC ₅₀)	HDAC-2 (IC ₅₀)	HDAC-3 (IC ₅₀)	HDAC 4 –9 (IC ₅₀)
 CI-994	0.1	0.42	1.2	> 10
 MS-275	0.02	0.06	0.5	> 10
 MGCD-0103	0.04	0.15	0.8	> 10
 Fenilbutirato	92	108	904	>1000 (HDAC-4,5, 7 e 9)

Do ponto de vista estrutural, tem sido verificado que compostos apresentando o grupo 2-amino-benzamida como ligante do metal zinco presente no sítio catalítico apresentam maior

seletividade às HDAC de classe I, principalmente HDAC-1 e HDAC-2 devido a melhores interações na cavidade interna de 11 Å presente no sítio ativo (Tabela 1) (HAMBLETT *et al.*, 2007; METHOT *et al.*, 2008; SAITO *et al.*, 1999). Além do grupamento quelante de zinco (MORADEI *et al.*, 2007; SHEARSTONE *et al.*, 2016) demonstrou-se que subunidades específicas adicionadas à posição 4 do grupo 2-amino-benzamida proporcionam um aumento na seletividade frente às HDACs 1 e 2, devido à ocupação da cavidade interna de 14 Å presente no sítio ativo dessas enzimas (MORADEI *et al.*, 2007; SHEARSTONE *et al.*, 2016; WAGNER *et al.*, 2013, 2016). A Tabela 2 apresenta as moléculas **(I)** análoga do CI-994, a molécula **(II)** análoga do MS-275, BRD4884 (WAGNER *et al.*, 2015) e ACY-957, e seus respectivos IC₅₀.

Tabela 2. Inibição de HDAC 1-9 pelos compostos **(I)**, **(II)**, BRD4884 e ACY-957 em µM.

Moléculas	HDAC-1 (IC ₅₀)	HDAC-2 (IC ₅₀)	HDAC-3 (IC ₅₀)	HDAC 3 –8 (IC ₅₀)
 (I)	0.02	0.1	-	> 20
 (II)	0.04	0.1		> 20
 BRD4884	0.029	0.062	1.09	-
 ACY-957	0.007	0.018	1.3	>20 (HDAC-4,5, 7 e 9)

Através da Tabela 2, é possível observar um aumento significativo tanto na atividade inibitória quanto na seletividade das moléculas que são capazes de ocupar a cavidade interna do sítio ativo, principalmente quando se analisa a molécula BRD4884 e ACY-957. De maneira geral, os inibidores de HDAC compartilham algumas características estruturais como, por exemplo: a) presença de

um grupo ligante responsável pela coordenação com o átomo de zinco do sítio catalítico; b) cadeia hidrofóbica responsável por ocupar uma longa e estreita cadeia em forma tubular; c) presença de um grupo de reconhecimento superficial responsável por reconhecer e interagir com os resíduos de aminoácidos presentes na ‘entrada’ do sítio ativo das HDACs (CAI *et al.*, 2015) e, por fim, d) subunidade responsável por ocupar a cavidade interna.

1.3.4. Inibidores de HDACs na indução da expressão de gama-globina

Em 2010, Bradner e colaboradores desenvolveram um sistema de *high-throughput screening* que seria capaz de detectar a expressão de sete diferentes tipos de mRNA de globinas em células CD34⁺ utilizando microesferas fluorescentes. Inicialmente, foi realizado um *screening* com pequenas moléculas que identificaram um grupo de inibidores de HDAC, como os compostos com maior capacidade de indução de γ -globina. No estudo subsequente de correlação, foi percebido que inibidores de HDAC-1 e HDAC-2, da Classe I, eram os responsáveis pelo silenciamento do gene da γ -globina e seriam, então, importantes alvos para a indução da expressão desse gene (BRADNER, 2010a). Os compostos CI-994, MS-275 e MGCD-0103 demonstraram correlação entre inibição da HDAC e indução de γ -globina. A 1 μ M, CI-994 foi capaz de aumentar a razão γ/β mRNA em 1,3 vezes, enquanto MGCD-0103 aumentou essa razão em 1.6 vezes e MS-275 em 1.5 vezes. O mais potente inibidor de HDAC, MGCD-0103, também demonstrou-se como o mais promissor indutor de expressão de γ -globina (BRADNER, 2010).

A Acetylon Pharmaceuticals desenvolveu e avaliou uma biblioteca de inibidores de HDAC-1 e HDAC-2, chegando à estrutura do composto promissor ACY-957 (Tabela 2). Ensaios *in vitro* conduzidos por Shearstone e colaboradores demonstraram que este composto apresentou IC₅₀ de 7 nM contra HDAC-1 e 18 nM contra HDAC-2 quando avaliado em enzimas isoladas, e IC₅₀ de 304 nM contra HDAC-2 quando avaliado em CD34⁺ (SHEARSTONE *et al.*, 2012). Essa molécula foi capaz de aumentar o mRNA de γ -globina em 3,5 vezes à 1 μ M e aumento o número de células positivas para HbF em 2-3 vezes, ao mesmo tempo em que foi capaz de reduzir a expressão dos genes das globinas δ e β . Em células oriundas de pacientes falciformes, o ACY-957 aumentou a expressão da γ -globina de 12 para 58% (SHEARSTONE *et al.*, 2016). Devido ao sucesso do tratamento das células CD34⁺ com este composto, a empresa seguiu os estudos para modelos *in*

vivo em ratos e macacos. Resultados do segundo modelo mostraram que tratamento com 25 ou 75 mg/kg do composto diariamente por cinco dias foi capaz de aumentar a expressão da γ -globina em até 2,2 e 7,2 vezes, respectivamente (SHEARSTONE *et al.*, 2015). Esses resultados demonstram que a utilização de inibidores seletivos de HDAC-1 e HDAC-2 são promissores para o tratamento da anemia falciforme via indução de γ -globina.

Atualmente, têm sido publicados inúmeros papers na literatura discutindo-se a aplicação de uma nova tecnologia na área de desenvolvimento de fármacos: a degradação de proteínas (BÉKÉS *et al.*, 2022). Na última década tem crescido exponencialmente o interesse por essa tecnologia e se tornou um “hot topic” dentro da química medicinal. Nos últimos anos, apenas no PUBMED, mais de 1400 artigos foram publicados relacionados ao tema. A degradação de proteínas via utilização de Proteolysis Targeting Chimera (PROTACs) tem sido vista como uma solução para os obstáculos que existem na utilização de inibidores, como por exemplo o fato de que apenas se é possível desenhar inibidores para proteínas que apresentem sítio ativo, ou seja, enzimas, o que faz com que proteínas estruturais e fatores de transcrição não estejam no escopo dos alvos selecionados para trabalho (SAMARASINGHE; CREWS, 2021). Esse panorama tem sido transformado com o desenvolvimento da tecnologia de degradação de proteínas.

Sendo assim, devido ao crescente interesse por essa abordagem para o desenvolvimento de novos fármacos, decidiu-se neste trabalho explorar não apenas o desenvolvimento de novos inibidores de HDACs 1 e 2, mas também a aplicação do sistema de PROTACs para a degradação das HDACs 1 e 2. Os aspectos gerais e mecanismo de ação das PROTACs serão apresentados e discutidos a seguir.

1.4. PROTACs

1.4.1. Aspectos gerais e mecanismo de ação

De forma geral, PROTACs são moléculas heterobifuncionais capazes de ancorar em uma enzima denominada E3-ligase e em uma proteína de interesse, simultaneamente, levando a poliubiquitinação e degradação da proteína de interesse. Estruturalmente falando, a PROTAC apresenta três componentes estruturais básicos: a) um ligante da proteína de interesse; b) ligante de E3 ligase e c) um espaçador.

E3-ligases são enzimas que participam do ciclo catalítico de ubiquitinação de proteínas, as quais serão reconhecidas pelo proteossoma e degradadas. O sistema ubiquitina-proteossoma é um mecanismo intracelular primário para destruição de proteínas danificadas ou que não são mais necessárias (AMM *et al.*, 2014). A Figura 13 apresenta o ciclo de ubiquitinação de proteínas.

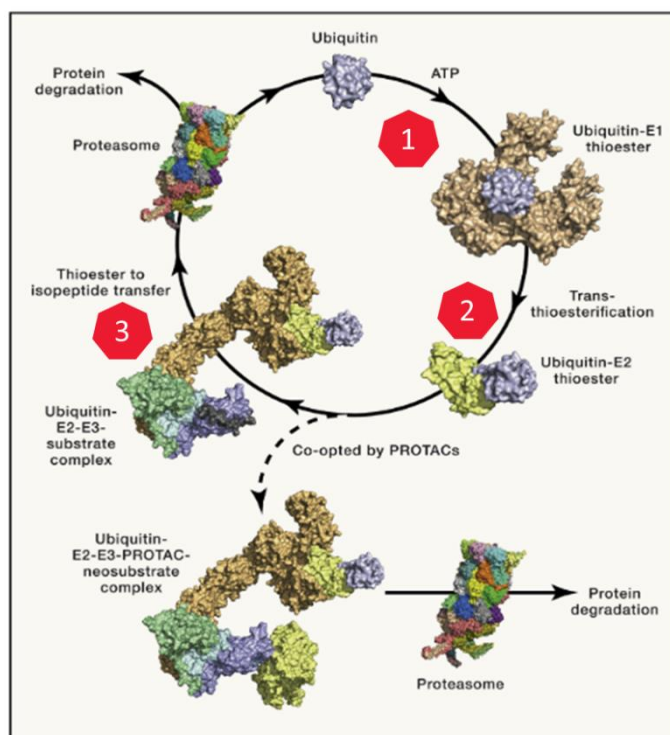


Figura 13. Ciclo de ubiquitinação de proteínas

Fonte: Figura retirada e adaptada de (BURSLEM; CREWS, 2020)

Na primeira etapa, a molécula livre de ubiquitina é ativada pela enzima E1 através da conversão do C-terminal a um tioéster. Em seguida, uma reação de transesterificação transfere a molécula de ubiquitina da enzima E1 para a enzima E2. Por fim, o complexo E2-E3 vai ser o responsável pela transferência da ubiquitina para uma molécula de lisina presente na proteína que deverá ser reconhecida pelo proteossoma e degradada (BURSLEM; CREWS, 2020). Existem mais de 600 enzimas E3-ligases descritas na literatura, porém apenas duas delas tem sido amplamente utilizadas até o momento para utilização no sistema PROTAC: cereblon e a Von Hippel-Lindau (VHL) (SAMARASINGHE; CREWS, 2021). Talidomida e derivados são conhecidos ligantes de cereblon e tem sido utilizados para o sistema PROTAC, assim como foi desenvolvido um ligante de VHL para tal função (BUCKLEY *et al.*, 2012).

O objetivo das PROTACs é utilizar desse sistema celular para o direcionamento da degradação para proteínas que sejam de interesse farmacêutico. Por serem capazes de se dissociar dos alvos após a ubiquitinação, as PROTACs apresentam um mecanismo de ação catalítico, sendo assim tem potencial para ser utilizada em pequenas doses. A Figura 14 apresenta o mecanismo de ação das PROTACs.

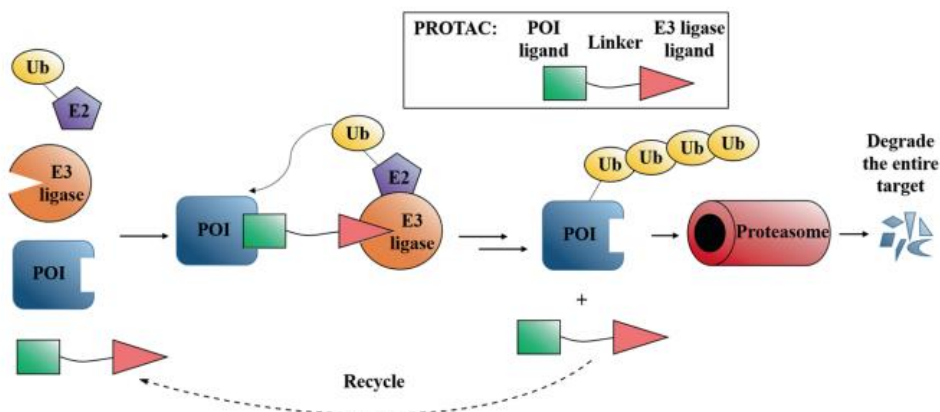


Figura 14. Mecanismo de ação das PROTACs

Fonte: Figura retirada de (SUN *et al.*, 2019)

Como visto na Figura 14, a molécula de PROTAC é capaz de interagir com a E3-ligase e a proteína de interesse (POI) simultaneamente, o que resulta na formação de um complexo ternário entre E3-ligase e a POI. Sendo assim, a PROTAC é capaz de direcionar a ubiquitinação realizada pela E3-ligase para a proteína de interesse do estudo. Após a poliubiquitinação, a proteína será reconhecida pelo proteossoma e degradada.

Já foi descrito na literatura a síntese e avaliação de PROTACs baseadas na estrutura do CI-994. Talidomida e VHL foram utilizados como ligantes de E3-ligase. A fusão das duas subunidades foi realizada utilizando-se espaçadores contendo uma cadeia alifática de 6 e 12 carbonos. Nesse trabalho, as PROTACs apresentaram valores de IC_{50} de 16,8 e 0,8 μM contra o complexo LSD1-CoREST-HDAC1, sendo que os maiores valores de IC_{50} resultantes dos espaçadores mais longos. Curiosamente, o ensaio celular para quantificação de acetilação da lisina H3K56 demonstrou que os compostos com maiores valores de IC_{50} apresentaram os maiores níveis de acetilação, o que pode ser explicado pelo fato desses compostos apresentarem cadeias alifáticas mais longas, sendo assim, provavelmente melhor perfil de permeabilidade. O mesmo perfil de resultado foi

visualizado em relação à degradação das HDAC 1-3, sendo o composto com espaçador mais longo o mais promissor em relação à degradação das enzimas (SMALLEY *et al.*, 2020). A Figura 15 apresenta a estrutura química das PROTACs 1-4 e o resultado obtido em relação à degradação das HDACs 1-3.

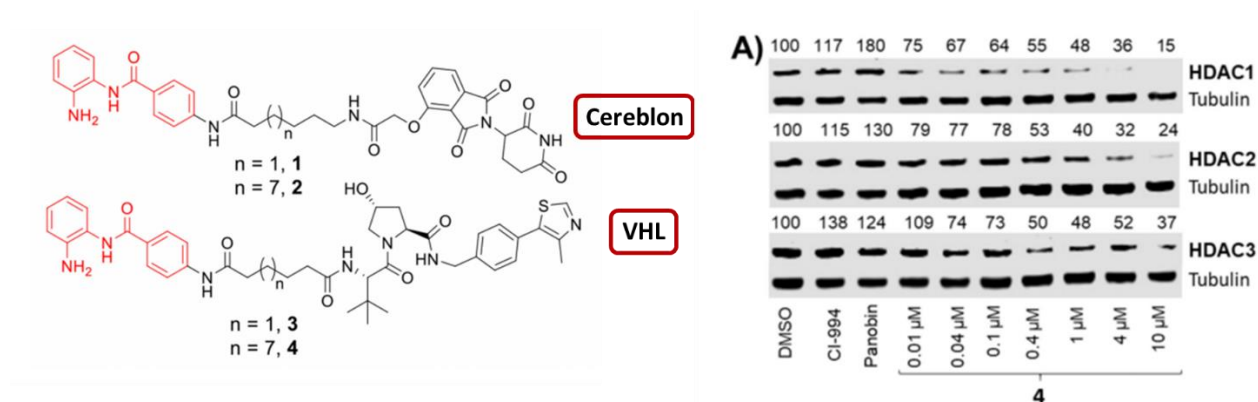


Figura 15. Estrutura das PROTACs 1-4 e Western blot da avaliação da degradação das HDACs 1-3.

Fonte: Figura retirada e adaptada de (SMALLEY *et al.*, 2020)

Verheul e colaboradores publicaram uma interessante revisão demonstrando que a regulação epigenética da HbF envolve uma série de alvos enzimáticos que podem ser utilizadas como alvo para degradação via PROTAC. Porém, até o momento, ainda não existe na literatura nenhum trabalho sobre a investigação da indução de expressão de γ -globina da degradação de HDACs através da utilização de PROTACs (THIJS *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de HDAC e PROTACs para degradação de HDACs para serem utilizados como indutores de γ -globina.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Modelagem molecular de uma série de compostos contra HDAC-2 para visualização e seleção das moléculas para síntese dos inibidores;

2.2.2. Síntese, purificação e caracterização dos inibidores de HDAC;

2.2.3. Avaliação enzimática dos compostos contra HDACs 1 e 2 em concentração única e posterior determinação de IC_{50} e avaliação de seletividade;

2.2.4. Ensaio de viabilidade celular e indução de γ -globina em células K562;

2.2.5. Planejamento, síntese e caracterização das PROTACs para degradação das HDACs 1 e 2;

2.2.6. Ensaio de degradação das HDACs 1-3 via Western blot.

3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

3.1. Inibidores de HDAC

Estudos realizados por nosso grupo identificaram diversas moléculas como estruturas inéditas com promissora atividade de inibição contra as HDACs 1 e 2, em especial o composto JSRF5 (Figura 16) (URIAS *et al.*, 2022). Avaliações enzimáticas *in vitro* demonstraram que à 10 μ M, a molécula JSRF5 foi capaz de inibir a atividade da HDAC 1 em 93% e HDAC 2 em 92%, além disso, quando avaliada frente às outras HDACs de classes I, II e IV, demonstrou importante seletividade em relação às enzimas de interesse. O IC_{50} da molécula JSRF5 contra HDAC 1 apresentou valor de 0,44 μ M, enquanto contra HDAC 2 apresentou valor de 0,37 μ M (URIAS *et al.*, 2022). A estrutura dessa molécula e seus respectivos valores de inibição enzimática estão apresentados na Figura 16.

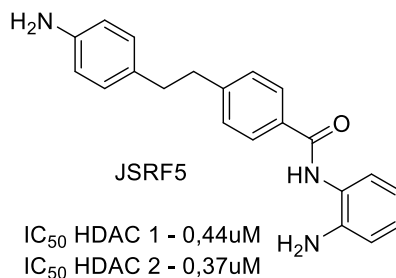


Figura 16. Estrutura da molécula JSRF5 e seus valores de inibição enzimática contra as HDACs 1 e 2.

Fonte: Própria autora

Com os dados apresentados até o momento, utilizou-se o composto JSRF5 como base para otimização dos inibidores de HDAC trabalhando-se em três pontos diferentes da molécula: a) bioisosterismo do átomo de carbono presente no espaçador através da substituição por enxofre,

oxigênio e nitrogênio; b) adição de heterociclos na posição para em relação à amina do grupo 2-aminobenzamida e c) simplificação molecular. A Figura 17 apresenta o esquema do planejamento estrutural.

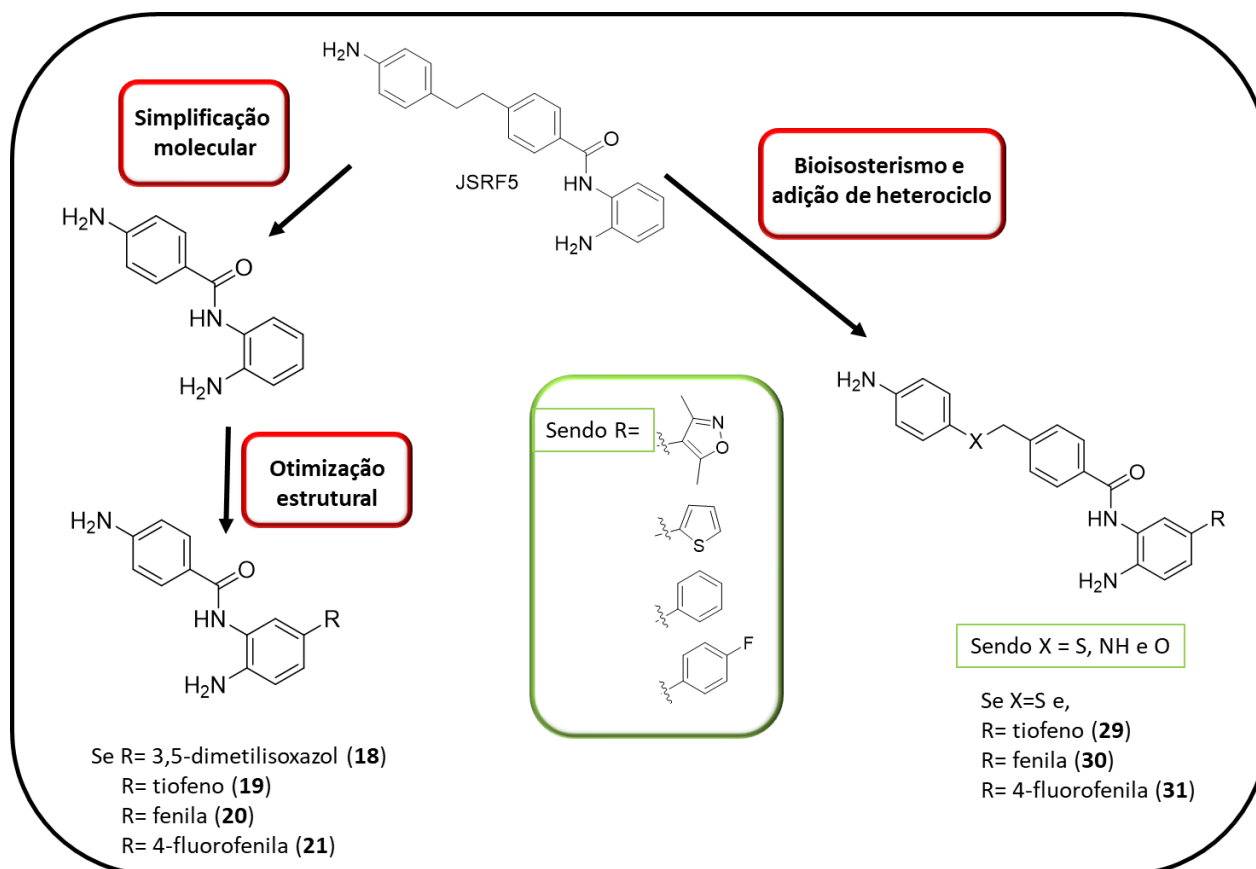


Figura 17. Esquema do planejamento estrutural dos inibidores de HDAC

Fonte: Própria autora

O bioisosterismo aplicado tem como objetivo entender a contribuição de átomos polares (oxigênio e nitrogênio) e apolares moles (enxofre) na interação da molécula no canal hidrofóbico de 11 Å. A adição dos heterociclos tem como objetivo o aumento da seletividade e potência desses compostos contra as HDACs 1 e 2 e a simplificação molecular visa entender a contribuição do espaçador em relação à atividade e seletividade, e se seria possível uma molécula simplificada manter a atividade e seletividade contra as enzimas alvo.

Todos os compostos propostos no planejamento estrutural foram posteriormente submetidos ao estudo de *docking* para seleção das moléculas para síntese.

3.2. PROTACs

A pomalidomida foi selecionada como ligante de E3 ligase devido à viabilidade sintética dessa molécula, ao número crescente de PROTACs de sucesso publicadas e em ensaios clínicos que contém a pomalidomida (BÉKÉS *et al.*, 2022) e também devido ao fato desta molécula já ser descrita na literatura como indutora de γ - globina (DULMOVITS *et al.*, 2016).

O espaçador é uma subunidade extremamente importante para o planejamento de PROTACs (BEMIS *et al.*, 2021). O espaçador pode melhorar a formação do complexo ternário ou abolir a formação do mesmo, o que significa que uma modificação sutil dessa subunidade em relação à composição ou tamanho pode extinguir a atividade da PROTAC. O critério de seleção dos espaçadores deste trabalho foi baseado no tamanho, tipo de ligação e a restrição conformacional. Baseando-se nos conhecimentos prévios do prof. Dr. James T. Hodgkinson (SMALLEY *et al.*, 2020, 2022), dois tamanhos foram selecionados para os espaçadores: sete e treze átomos de carbono. Amidas e aminas foram exploradas na estrutura dos espaçadores e a introdução de anéis piperazínicos tiveram como objetivo diminuir a flexibilidade dessa subunidade.

As PROTACs são moléculas de alto peso molecular, sendo assim sua solubilidade e permeabilidade em células acabam sendo um problema a ser resolvido (POONGAVANAM; KIHLEBERG, 2021). Baseando-se nesses dados, foi desenvolvido uma nova subunidade de inibidor de HDAC, com intuito de aumentar a solubilidade em água desses compostos através da estratégia de bioisosterismo, substituindo então os átomos de carbono por nitrogênio através da introdução de anéis de pirazina e piperazina à estrutura do inibidor. Tais modificações foram previamente publicadas na literatura (IBRAHIM *et al.*, 2022), e demonstrou-se que mesmo com tais modificações, a estrutura mantinha a capacidade de inibição das HDACs 1 e 2.

A Figura 18 apresenta o esquema do planejamento estrutural das PROTACs e a estrutura química do composto **ARP-26**.

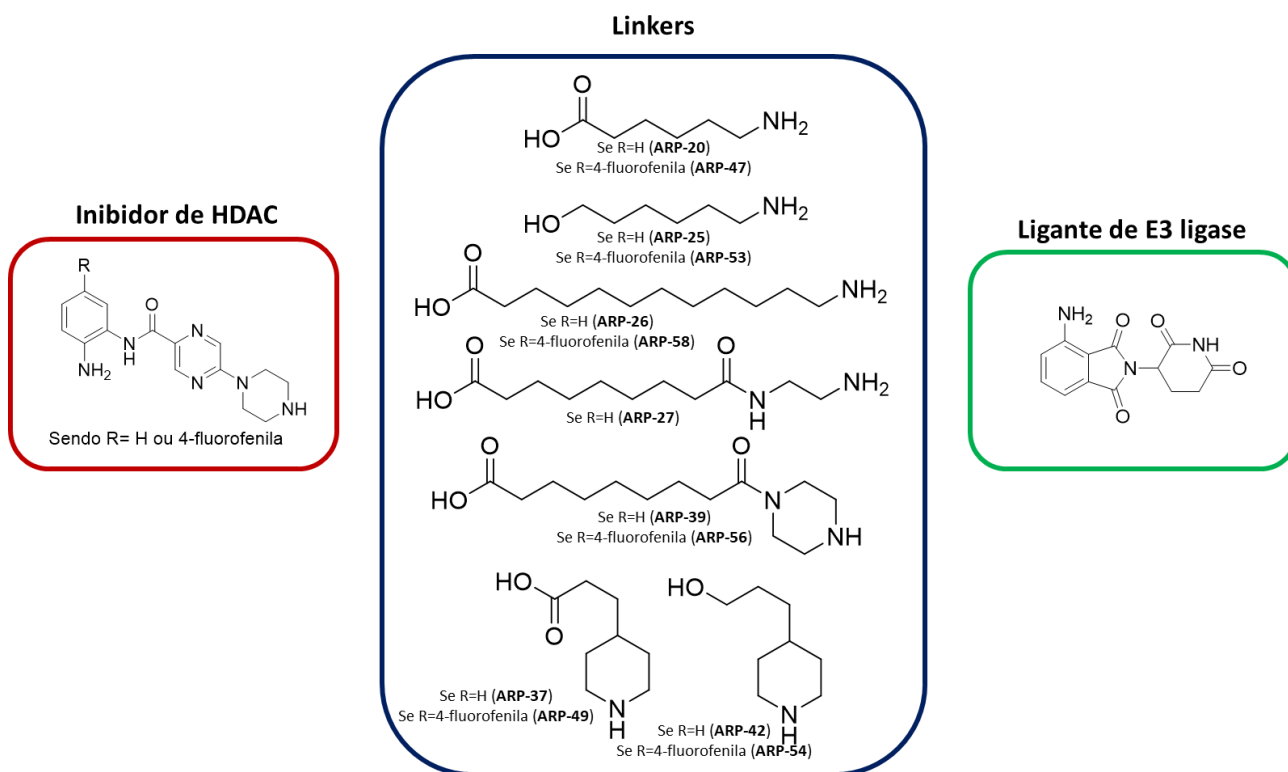


Figura 18. Planejamento estrutural das PROTACs e estrutura química do composto **ARP-26**.

Fonte: Própria autora

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados nas metodologias de síntese e purificação foram:

- 1-Boc-piperazina – CAS: 57260-71-6;
- 1-Cbz-piperazina – CAS: 31166-44-6;
- 1,4-dioxano – CAS: 123-91-1;
- 3-(piperidin-4-il)propano-1-ol – CAS: 7037-49-2;
- 3,5-dimetilisoxazol-4-borônico pinacol ester – CAS: 832114-00-8;
- 4-bromo-2-nitroanilina – CAS: 875-51-4;
- 4-(dimetilamino)piridina – CAS: 1122-58-3;
- 4-metilmorfolina – CAS: 109-02-4;
- 6-aminohexan-1-ol – CAS: 4048-33-3;
- Acetato de etila P.A. – CAS: 141-78-6;

- Acetato de sódio – CAS: 127-09-3;
- Acetonitrila P.A. – CAS: 75-05-8;
- Ácido 2-tiofeno-borônico – CAS: 6165-68-0;
- Ácido 3-(piperidin-4-il)propanoico – CAS: 1822-32-8;
- Ácido 4-fluorofenil-borônico – CAS: 1765-93-1;
- Ácido 4-nitrobenzoico – CAS: 62-23-7;
- Ácido 6-aminohexanoico – CAS: 60-32-2;
- Ácido 12-aminododecanoico – CAS: 693-57-2;
- Ácido acético glacial P.A. - CAS: 64-19-7;
- Ácido azelaico – CAS: 123-99-9;
- Ácido fenil-borônico – CAS: 98-80-6;
- Ácido trifluoroacético – CAS: 76-05-1;
- Água destilada;
- Anidrido 3-fluoroftálico – CAS: 652-39-1;
- Bicarbonato de sódio P.A. - CAS: 144-55-8;
- Bissulfato de potássio – CAS: 7676-93-7;
- Bis(trimetilsilil)amida de sódio – CAS 1070-89-9;
- Brometo de benzila – CAS: 100-39-0;
- Brometo de tionila – CAS: 507-16-4;
- Carbonato de cézio – CAS: 534-17-8;
- Celite 545 P.A. - CAS: 68855-54-9;
- Cloreto de amônio – CAS: 12125-02-9;
- Cloreto de oxalila – CAS: 79-37-8;
- Cloreto de sódio P.A. - CAS: 7647-14-5;
- Diclorometano – CAS: 75-09-2;
- Dimetilsulfóxido P.A. – CAS: 67-68-5;
- Di-terc-butil dicarbonato – CAS: 24424-99-5;
- Ferro metálico – CAS: 7439-89-6;
- HATU – CAS: 148893-10-1;

- Hidróxido de sódio P.A. - CAS: 1310-73-2;
- Hexano P.A. - CAS: 110-54-3;
- Hidrocloridrato de 3-aminopiperidina-2,6-diona – CAS: 24666-56-6;
- Iodeto de potássio – CAS: 7681-11-0;
- Metanol P.A. – CAS: 67-56-1;
- Metil 5-cloro-2-pirazinacarboxilato – CAS: 33332-25-1;
- N,N-diisopropiletilamina - CAS: 7087-68-5;
- N, N - Dimetilformamida P.A. – CAS: 68-12-2;
- o-fenilenodiamina – CAS: 95-54-5;
- Palladium on carbon – CAS: 7440-05-3;
- Sílica gel cromatografia em coluna 40-60 μm – CAS: 7631-86-9;
- Sulfato de sódio anidro – CAS: 7757-82-6;
- Terc-butil-N-(2-aminoetilcarbamato) – CAS: 57260-73-8;
- Tetraidrofurano P.A. – CAS: 109-99-9
- Tetrakis(trifenilfosfina)paládio (0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) – CAS: 14221-01-3;
- Trietilamina – CAS: 121-44-8.

4.2. Modelagem molecular

O estudo de modelagem molecular foi realizado utilizando-se a estrutura cristalográfica da HDAC-2, obtida do bando de dados PDB (protein Data Bank), sob o código de 4LY1, resolução de 1,57 Å e cristalizada com o inibidor 4-(acetilamino)-N-[2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil]benzamida. Para os estudos de modelagem molecular, a proteína obtida foi importada para o programa Maestro® (MaestroSCHRÖDINGER, 2017) e preparada para os estudos de docking molecular utilizando-se a função *Protein Preparation Wizard*. O protocolo utilizado seguiu os seguintes passos: (i) remoção das moléculas de água; (ii) adição de átomos de hidrogênio; (iii) preenchimento das cadeias laterais incompletas; (iv) minimização de energia utilizando o campo de força OPLS3. A caixa de interação (grid), onde encontra-se o sítio ativo da enzima, foi definida através do Glide (GlideSCHRÖDINGER, 2017), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å.

As moléculas propostas e os inibidores descritos na literatura (SAHA, MGCD-0103, MS-275) foram preparados utilizando-se a função *Ligand Preparation* (LigPrep) a fim de se realizar a minimização de energia utilizando campo de força OPLS3, e obter a simulação dos possíveis estados de ionização em pH 7 ± 2 (LigPrepSCHRÖDINGER, 2017).

A validação deste procedimento foi realizada através da redocagem, em que o vorinostat (ligante cristalizado no sítio ativo da HDAC-2) foi removido da estrutura da proteína e novamente ancorado. A posição original do ligante no cristal é comparada com a posição proposta pela ancoragem e esta análise é realizada através do cálculo *Root Mean Square Deviation* (RMSD), onde o valor obtido é considerado de confiança quando o RMSD for inferior a 2 Å (DASTMALCHI; HAMZEH-MIVEHROUD; SOKOUTI, 2016).

O *docking score* (DS) é um termo absoluto gerado pelo *software* que se relaciona com a energia livre de ligação do ligante. Diferentes contribuições são levadas em consideração para gerar esse valor, como campo de força (interações eletrostáticas e de *Van der Waals*) e penalidades ou contribuições que influenciam na interação do ligante com enzima (FRIESNER *et al.*, 2006).

4.3. Metodologia sintética

4.3.1. Inibidores de HDAC

Após a análises dos resultados de modelagem molecular, duas rotas sintéticas foram propostas e utilizadas para obtenção dos sete produtos finais. A Figura 19 apresenta a rota sintética de obtenção dos compostos **(18)** a **(21)**, e a Figura 20 apresenta a rota sintética para obtenção dos compostos **(26)** a **(28)**.

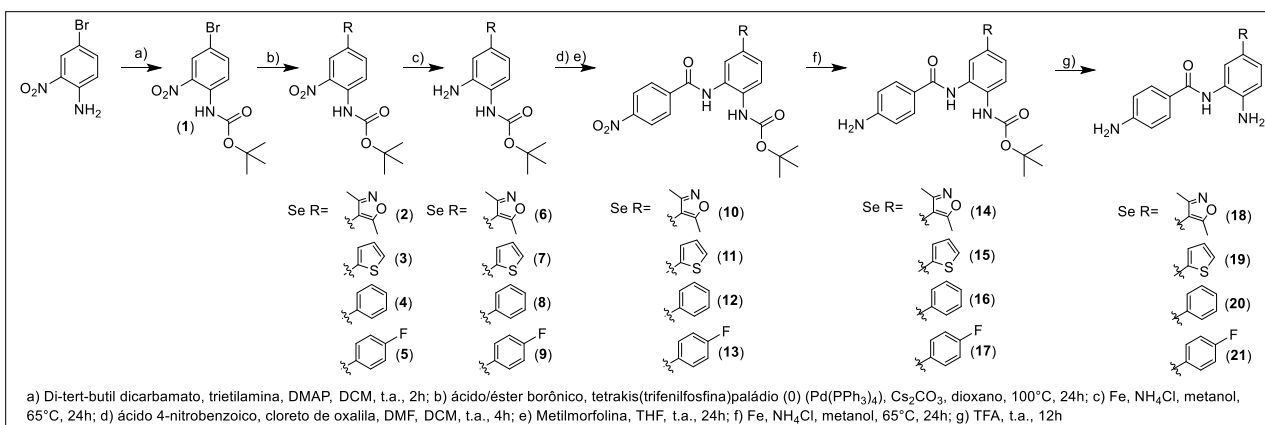


Figura 19. Rota sintética para obtenção dos compostos (18) a (21)

Fonte: Própria autora

Para obtenção dos compostos (18) a (21) iniciou-se a rota sintética com a proteção da amina livre do 4-bromo-2-nitroanilina através de sua reação com o di-*tert*-butil dicarbamato para obtenção do composto (1) com rendimento de 33%. Seguiu-se com a reação de acoplamento de Suzuki entre o composto (1) e ácido 3,5-dimetilisoxazol-4-borônico pinacol ester ou ácido 2-tiofeno-borônico ou ácido fenil-borônico ou ácido 4-fluorofenil-borônico, utilizando-se tetrakis(trifenilfosfina)paládio (0) (Pd(PPh₃)₄) como catalisador e carbonato de cério como base para obtenção dos compostos (2)-(5) com rendimentos que variaram entre 82,9 e 66%. Posteriormente, utilizou-se ferro metálico e cloreto de amônio para a redução do grupamento nitro e obtenção das moléculas (6)-(9) com rendimentos que variaram entre 57,4 e 77% que seriam em seguidas submetidas à reação de acoplamento de amida com o ácido 4-nitrobenzoico. Para obtenção dos compostos (10)-(13) tratou-se o ácido 4-nitrobenzoico com cloreto de oxalila e DMF para obtenção do cloreto de acila correspondente que, posteriormente, foi submetido à reação com as anilinas aromáticas (6)-(9) para então obtenção das amidas (10)-(13) com rendimentos que variaram entre 50 e 86%. As duas últimas etapas consistiram na redução do grupamento nitro das moléculas obtidas na etapa anterior, utilizando-se novamente do ferro metálico e cloreto de amônio para obtenção dos compostos (14)-(17) com rendimentos que variaram entre 65 e 76% e, por fim, a desproteção do grupamento protetor Boc através do tratamento dos compostos com ácido trifluoroacético (TFA) para obtenção dos compostos finais (18)-(21) com rendimentos que variaram entre 29 e 94%.

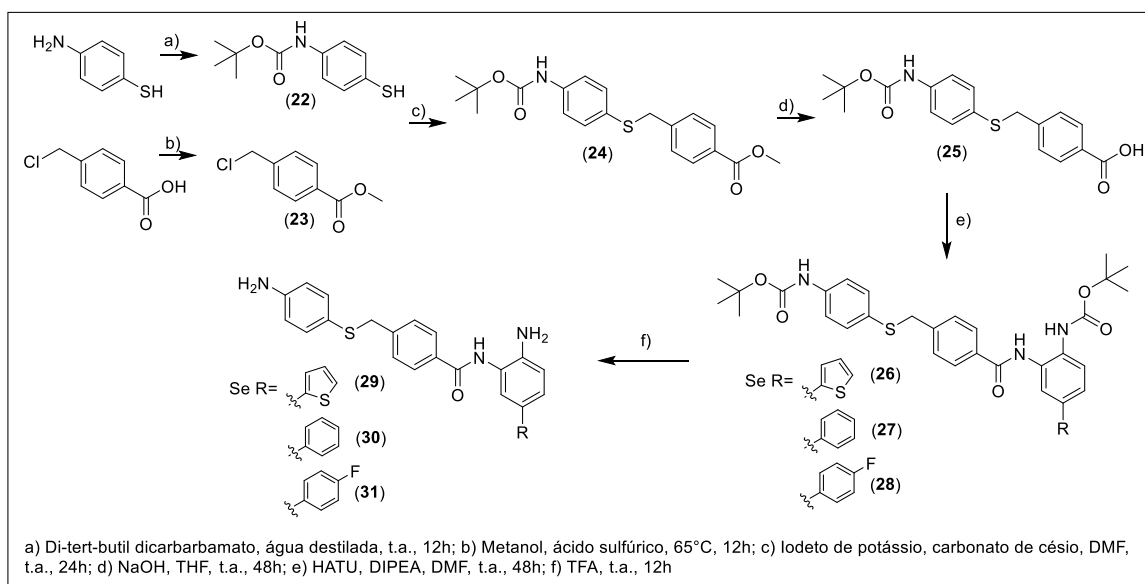


Figura 20. Rota sintética para obtenção dos compostos (26)-(28)

Fonte: Própria autora

Nesta série de compostos não se trabalhou com o substituinte 3,5-dimetilisoxazol devido aos resultados de avaliação enzimática recebidos em relação ao composto (18), o qual demonstrou não ser capaz de inibir as enzimas alvo. Sendo assim, para obtenção dos compostos (29)-(31) iniciou-se a rota sintética com a proteção da amina livre do 4-aminotiofenol através de sua reação com o di-*tert*-butil dicarbamato para obtenção do composto (22) com rendimento de 93%. Em seguida realizou-se a esterificação do ácido 4-clorometilbenzoico utilizando-se ácido sulfúrico como catalisador em meio contendo metanol para obtenção do composto (23) com rendimento de 85%. Seguiu-se com a reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) entre as moléculas (22) e (23) em meio contendo iodeto de potássio, carbonato de céσιο como base e DMF anidro como solvente para obtenção do composto (24) com rendimento de 60%. A etapa seguinte consistiu-se na hidrólise básica do éster do composto (24) para obtenção do ácido carboxílico do composto (25) com rendimento de 83%, o qual foi submetido à reação de acoplamento de amida com os compostos (7)-(9) utilizando-se o agente acoplante 1-[Bis-(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridinium 3-óxido hexafluorofosfato (HATU), e DIPEA como base, para obtenção dos compostos (26)-(28). Por fim, realizou-se a desproteção do grupamento protetor Boc através do tratamento dos compostos com TFA para obtenção dos compostos finais (29)-(31) com rendimentos que variaram entre 50 e 67%.

4.3.2. PROTACs

Para obtenção das duas séries propostas de PROTACs foram utilizadas as seguintes etapas sintéticas: a) obtenção do ligante de E3-ligase (Figura 21); b) obtenção dos intermediários contendo o ligante de E3-ligase e os espaçadores (Figura 22 e 23); c) síntese dos inibidores de HDAC (Figura 24) e d) síntese dos compostos finais (Figura 25).

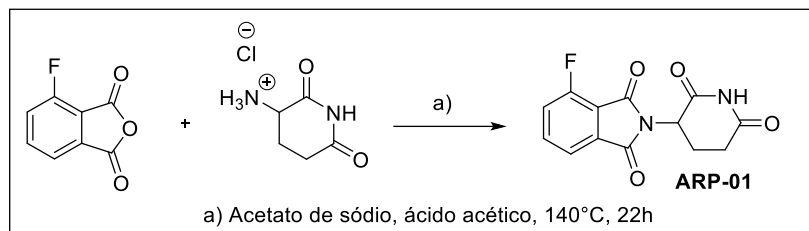


Figura 21. Etapa de obtenção do ligante de E3-ligase (**ARP-01**)

Fonte: Própria autora

A Figura 21 apresenta a primeira etapa sintética para obtenção das PROTACs que consistiu na reação de substituição nucleofílica acíclica, seguida de uma desidratação, entre o 3-anidrido fluoroftálico e o cloridrato de 2-amino-glutarimida para obtenção do intermediário **ARP-01** com um rendimento de 77,7%.

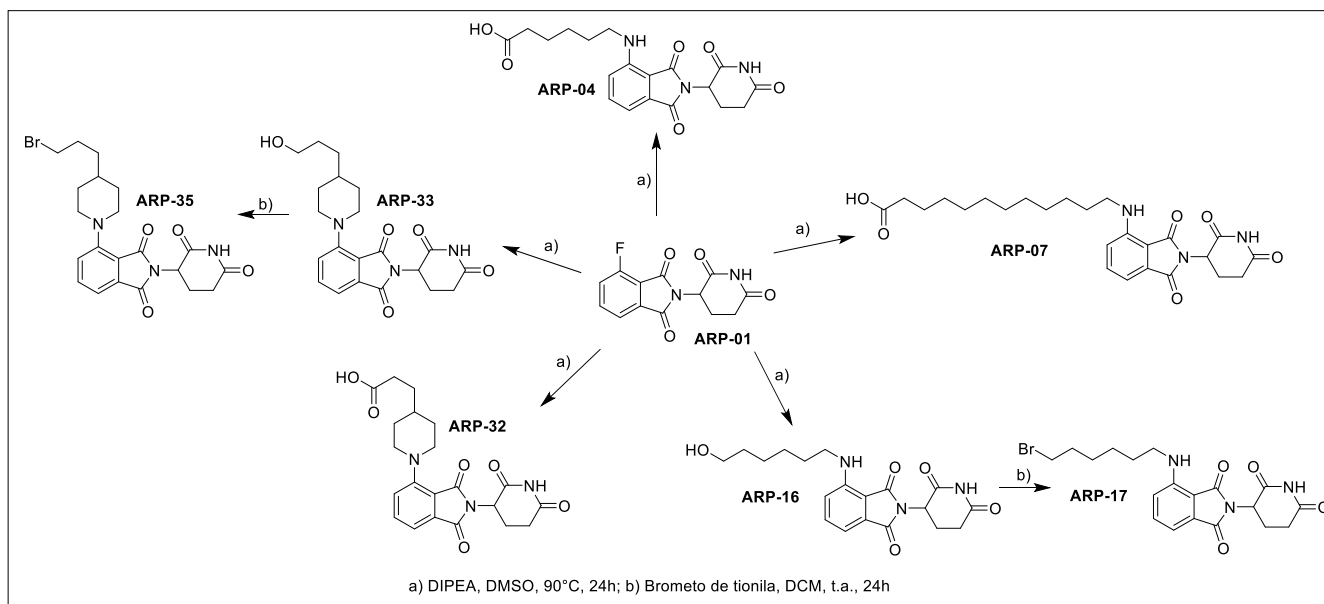


Figura 22. Rota sintética de obtenção dos intermediários **ARP-04**, **ARP-07**, **ARP-17**, **ARP-32** e **ARP-35**.

Fonte: Própria autora

Para obtenção dos intermediários **ARP-04**, **ARP-07** e **ARP-32** utilizou-se da substituição nucleofílica aromática (S_NAr) entre o intermediário **ARP-01** e o ácido 6-aminohexanoico, ácido 12-aminododecanoico e ácido 3-(piperidin-4-il)propanoico, respectivamente, utilizando-se DIPEA como base e DMSO anidro como solvente com rendimentos que variaram entre 20,1 e 81,6%. Os intermediários **ARP-16** e **ARP-33** foram obtidos através da reação entre o composto **ARP-01** e o 6-aminohexan-1-ol e 3-(piperidin-4-il)propano-1-ol, respectivamente, com rendimentos de 60% e 68,5%, os quais posteriormente foram tratados com brometo de tionila para obtenção dos derivados halogenados **ARP-17** e **ARP-35** com rendimentos de 89% e 64%, respectivamente.

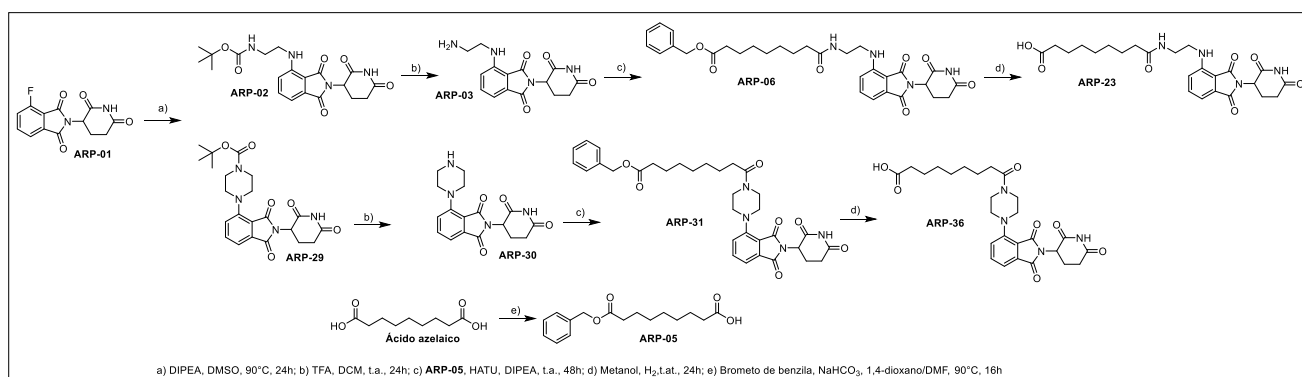


Figura 23. Rota sintética de obtenção dos intermediários **ARP-23** e **ARP-36**.

Fonte: Própria autora

Para obtenção dos intermediários **ARP-23** e **ARP-36** seguiu-se duas rotas sintéticas similares, como apresentado na Figura 23. Inicialmente, reagiu-se o composto **ARP-01** com *tert*-butil-N-(2-aminoetilcarbamato) e Boc-piperazina através da S_NAr para obtenção dos intermediários **ARP-02** e **ARP-29** com rendimentos de 27,6% e 67%, respectivamente. A etapa seguinte consistiu na desproteção do grupamento protetor Boc utilizando-se TFA para obtenção dos intermediários **ARP-03** e **ARP-30** com rendimentos quantitativos. Em uma síntese paralela, realizou-se a proteção de um dos ácidos carboxílicos do ácido azelaico utilizando-se de brometo de benzila para obtenção do intermediário **ARP-05** em um rendimento de 31,3% que, posteriormente, foi utilizado no acoplamento de amida com os compostos **ARP-03** e **ARP-30** para obtenção dos intermediários **ARP-06** e **ARP-31** com rendimentos de 42% e 54%, respectivamente. A última etapa consistiu na desproteção do ácido carboxílico através da hidrogenação catalítica utilizando-

se Pd/C como catalisador para obtenção dos intermediários **ARP-23** e **ARP-36** com rendimentos de 93% e 95%, respectivamente.

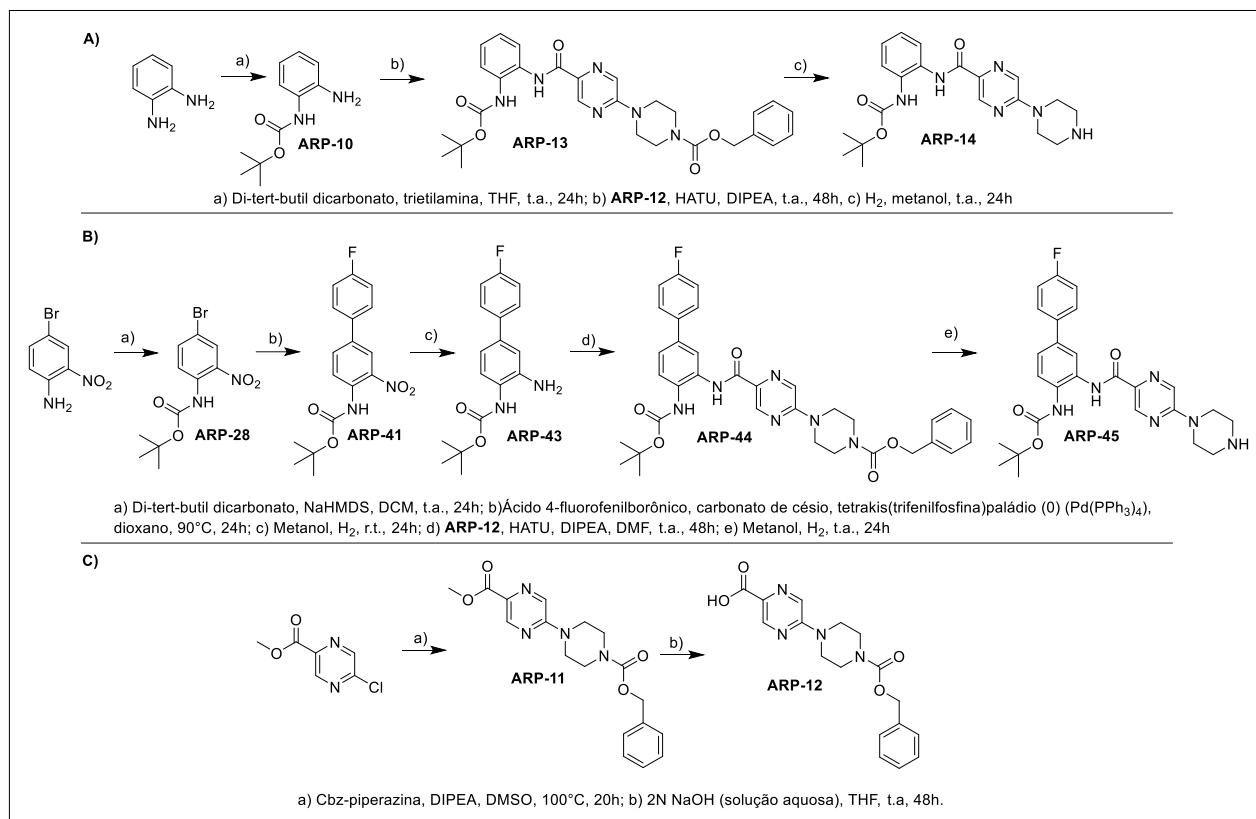


Figura 24. Rotas sintéticas de obtenção das subunidades dos inibidores de HDAC **ARP-14** e **ARP-45**.

Fonte: Própria autora

Após a obtenção dos intermediários contendo o ligante de E3-ligase e os espaçadores, iniciou-se a síntese das subunidades dos inibidores de HDAC que seriam utilizados nas PROTACs. Como apresentado na Figura 24 (Item C), o intermediário **ARP-12** foi sintetizado em duas etapas, sendo a primeira através da reação de S_NAr entre o metil 5-cloropirazina-2-carboxilato e o Cbz-piperazina obtendo-se o intermediário **ARP-11** com rendimento de 78,3%, e seguida da hidrólise básica do éster presente na estrutura, para obtenção do intermediário chave **ARP-12** com rendimento de 82%. A subunidade do inibidor de HDAC, **ARP-14** (Figura 24, item A), foi obtida através, primeiramente, da proteção de uma das aminas livres do reagente *orto*-fenilenodiamina, obtendo-se o intermediário **ARP-10** com rendimento de 69%. Seguiu-se, então, com o acoplamento de amida entre os intermediários **ARP-10** e **ARP-12** utilizando-se HATU como agente acoplante para obtenção do intermediário **ARP-13** com rendimento de 75%, o qual foi

então submetido à hidrogenação catalítica para clivagem do grupo protetor Cbz e obtenção da molécula **ARP-14** com rendimento de 70%. Para a obtenção da subunidade do inibidor de HDAC **ARP-45**, iniciou-se rota sintética com a proteção da amina livre do reagente 4-bromo-2-nitroanilina para obtenção do intermediário **ARP-28** com rendimento de 33%. Seguiu-se com a reação de acoplamento C-C (Suzuki), assim como foi descrito anteriormente, para obtenção do intermediário **ARP-41** com rendimento de 54%, o qual foi submetido à hidrogenação catalítica para obtenção do derivado amino **ARP-43** com rendimento de 93%. A etapa seguinte consistiu no acoplamento de amida entre os intermediários **ARP-12** e **ARP-43** para obtenção do intermediário **ARP-44** com rendimento de 67%, o qual foi por fim submetido à hidrogenação catalítica para obtenção da molécula **ARP-45** com um rendimento de 89%.

Fonte: Própria autora

Para obtenção dos compostos finais foram utilizadas as reações de S_N2 para obtenção dos intermediários **ARP-22**, **ARP-40**, **ARP-50** e **ARP-52** em rendimentos que variaram entre 36% e 53%, posteriormente foram tratadas com TFA para clivagem do grupamento protetor Boc e obtenção dos compostos finais **ARP-25**, **ARP-42**, **ARP-53** e **ARP-54** com rendimentos que variaram entre 13% e 72%. Para síntese dos intermediários **ARP-18**, **ARP-21**, **ARP-24**, **ARP-34**, **ARP-38**, **ARP-46**, **ARP-48**, **ARP-51** e **ARP-55** foi utilizado o acoplamento de amida utilizando-se o agente acoplante HATU resultando-se nos intermediários pretendidos com rendimentos que variaram entre 24% e 69,4%, os quais foram posteriormente tratados com TFA para clivagem do grupamento protetor Boc e obtenção dos compostos finais **ARP-20**, **ARP-26**, **ARP-27**, **ARP-37**, **ARP-39**, **ARP-47**, **ARP-49**, **ARP-56** e **ARP-58** com rendimentos que variaram entre 35% e 82,4%.

4.4. Métodos analíticos

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas usando cromatoplas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 (Merck®). A visualização das cromatoplas foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).

Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão dos intermediários e compostos finais foram determinadas em um aparelho de ponto de fusão capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram realizados na Universidade de Leicester (Bruker 400MHz - ^1H , 400 MHz; ^{13}C 101 MHz) e no Instituto de Química da UNESP-Araraquara (Bruker Avance III 600 MHz (14,1 T)). Os deslocamentos químicos foram apresentados em partes por milhão (ppm; δ) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram representadas por *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete) e *m* (multiplete).

Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

Os espectros de massas foram obtidos na Universidade de Leicester (Water Aquity XEVO Q ToF machine) e medidos em m/z.

4.5. Ensaios biológicos

4.5.1. Ensaio enzimático

O ensaio de inibição enzimática contra as HDACs foi realizado pela empresa BPS Bioscience (San Diego - EUA) de acordo com o seguinte protocolo:

Uma série de diluições das moléculas a serem testadas foram preparadas utilizando-se 10% de DMSO e tampão. Posteriormente, 5 µL desta diluição foram adicionados à 50 µL da reação para que concentração final de DMSO fosse 1%. As reações enzimáticas foram realizadas em duplicata à 37°C por 30 minutos em uma mistura contendo 50 µL do tampão, 5 µg de BSA, um substrato da HDAC, e a enzima a ser avaliada. Ao final da reação, 50 µL do revelador foi adicionado e o meio foi incubado à temperatura ambiente por mais 15 minutos. A fluorescência foi medida à 360 nm utilizando o leitor de microplaca Tecan Infinite M1000. Os dados de fluorescência foram analisados utilizando o software Graphpad Prism. Na ausência da molécula teste, a intensidade de fluorescência foi definida como 100% de atividade (F_t). Na ausência da enzima HDAC, a intensidade de fluorescência foi definida como 0% de atividade (F_b). A porcentagem de atividade na presença de cada molécula foi calculada de acordo com a seguinte equação: $\%atividade = (F - F_b) / (F_t - F_b)$, onde F é a intensidade da fluorescência na presença da molécula teste.

4.5.2. Ensaio de degradação

O ensaio de degradação de proteínas para avaliação da atividade das PROTACs foi realizado na Universidade de Leicester – UK pelo Dr. Joshua P. Smalley sob supervisão do Prof. Dr. James T. Hodgkinson de acordo com o seguinte protocolo:

Linhagem celular e materiais: Células de carcinoma de colon humano (HCT116) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO, 41965-039) suplementada com 10% de soro fetal bovino e glutamina/penicilina/estreptomicina (GIBCO,

10378-016) e incubadas à 37°C e com 5% de CO₂. As células foram tratadas com as PROTACs nas concentrações de 0,001 µM, 0,1 µM, 1,0 µM e 10 µM, juntamente com o inibidor de HDAC CI-994 e a PROTAC JPS004 (controle positivo interno).

Western blotting: as células HCT116 foram tratadas com os compostos 24 horas após plaqueamento. 24 horas após o tratamento, as células foram coletadas, lisadas em buffer (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100) com inibidor de protease (Sigma, P8340), incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 18.000 rpm por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi quantificada via Bradford Assay utilizando-se Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD). Para extração da histona, um volume igual de 0,4N H₂SO₄ foi adicionado aos pellets e o extrato mantido à 4°C overnight. Posteriormente, os tubos foram centrifugados à 18.000 rpm por 15 minutos à 4°C e o sobrenadante coletado. Os *western blots* foram feitos em NuPAGETM 4-12% Bis-Tris gels com 20-30 µg da proteína usando NuPAGETM LDS Sample Buffer (4X). Foi realizada eletroforese à 140V por 75-90 minutos e então as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose à 30V por 60 minutos. As membranas foram tratadas com os anticorpos primários (α-tubulin - Sigma, t5168 (1:10.000 dilution) HDAC1 - Abcam, 109411 (1:2.000 dilution) HDAC2 - Merck Millipore, 05-814 (1:2.000 dilution) HDAC3 - Abcam, 32369 (1:2.000 dilution)) por 60-90 minutos. Os blots foram desenvolvidos com anticorpos complementares (complimentary IRDye conjugated secondary antibodies) e as bandas visualizadas utilizando-se Odyssey Infrared Imaging System. O processamento das imagens e a quantificação da intensidade das bandas foi realizado utilizando-se Image Studio Lite.

4.5.3. Avaliação da viabilidade celular e número de células viáveis K562

A avaliação da viabilidade celular e número de células viáveis foi realizada no Hemocentro da Universidade de Campinas (UNICAMP) pela Dra. Carolina Lanaro sob supervisão do prof. Dr. Fernando Ferreira Costa de acordo com o seguinte protocolo:

Foi usada a linhagem celular de leucemia humana K562 ATCC (*American Type Culture Collection*), Filadélfia, PA, EUA. As células foram cultivadas em meio DMEM e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Para os experimentos as células foram incubadas na densidade de

1 x 10⁵ células/mL. Os compostos **(21)** e **(31)** foram adicionados nas concentrações de 0,1 µM, 1,0 µM e 10 µM e incubados por até 96 horas sem nova adição de composto ou troca do meio. As coletas foram realizadas nos tempos de 48, 72 e 96 horas e a viabilidade celular foi realizada pela contagem de células vivas e mortas em câmara de Neubauer utilizando-se do azul de trypan.

4.5.4. Avaliação da expressão de gama-globina em células K562

A avaliação da expressão de gama-globina foi realizada no Hemocentro da Universidade de Campinas (UNICAMP) pela Dra. Carolina Lanaro sob supervisão do prof. Dr. Fernando Ferreira Costa de acordo com o seguinte protocolo:

Extração de RNA: A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e então 200 µL de clorofórmio foi adicionado e agitado vigorosamente sendo realizada nova incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 13.500 rpm à 4°C, o sobrenadante foi retirado e transferido para novo eppendorf, adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado, incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se à 13.500 rpm por 10 minutos à 4°C. O pellet formado foi lavado com etanol 75% e centrifugado à 11.800 rpm por 5 minutos à 4°C e então seco por inversão em contato com gaze por 10 minutos. O pellet foi solubilizado com água estéril e dietilpirocarbonato (DEPC) e levado ao termociclador por 10 minutos à 55°C para secagem completa do etanol. Em seguida foram armazenados a -80°C.

Síntese de DNA complementar (cDNA): As amostras de RNA obtidas, foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit RevertAid H minus First Strand (Thermo Scientific). Após leitura em espectrofotômetro (Nano drop) e quantificação, 1 µg de RNA total foram tratados com a enzima DNase I, para remoção de DNA contaminante. Foi adicionado 1,0 µL de 1 u/µL DNase I, 1,0 µL de 10x DNase I Reaction Buffer (200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µL de reação. Os tubos contendo as amostras, DNase e tampão foram incubados no termociclador a 37°C por 30 minutos e em seguida foram incubados por 10 minutos a 65°C. Para a síntese do cDNA adicionou-se a seguir 1,0 µL de 50 µM oligo (dT). As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C, seguidos por 1 minuto a 4°C. A cada amostra adicionou-se 8,0 µL da seguinte mistura de reação: 4 µL de 5x RT buffer, 1

μL Ribo Lock RNase inibitor, 2 μL DNTP mix e 1 μL Revert Acid H Minus, misturou-se e incubou-se a 42°C por 60 minutos e então a 70°C por 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1 μL de EDTA, seguido de incubação a 65°C por 10 minutos.

Avaliação da expressão gênica de γ - globina por qPCR: As reações realizadas continham 6 μL do reagente SYBERGreen PCR Master Mix®, 1 ng (3 μL) inicial de amostra de cDNA e a concentração ótima dos primers utilizados (3 μL), perfazendo um volume final de 12 μL . Em todas as placas foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/ 10 minutos, seguido de 45 ciclos: 95°C/ 15 segundos – 60°C/ 1 minuto. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de degradação durante o qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de T_M (melting temperature) entre os produtos de PCR amplificados, essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto. GAPDH e β -actina foram utilizados como genes endógenos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Modelagem Molecular

A Figura 26 apresenta o esquema dos compostos que foram utilizados para o estudo de modelagem molecular.

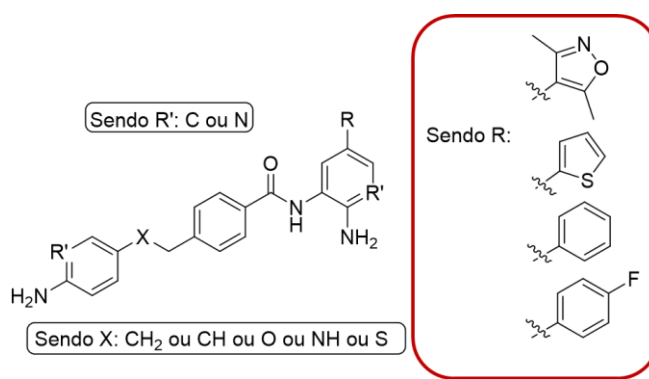


Figura 26. Esquema das moléculas utilizadas no estudo de modelagem molecular

Fonte: Própria autora

A série utilizada nesse estudo compreendeu 88 estruturas, incluindo as que foram propostas no planejamento estrutural. Foram propostas substituições na posição R, a qual ocuparia a cavidade adicional de 14 Å utilizando-se os anéis aromáticos 3,5-dimetilisoxazol, tiofeno, fenila e 4-fluorofenila. Na posição R' explorou-se a introdução de anéis piridínicos com intuito de avaliar se haveria contribuição dessa substituição para o modo de interação dos compostos com o sítio ativo. E, por fim, explorou-se também a introdução de átomos polares na posição X (nitrogênio e oxigênio), apolares (carbono e enxofre), além de se utilizar da restrição conformacional conferida pela ligação dupla carbono-carbono.

De forma geral, os valores de DS de todas as poses dos compostos variaram entre -14.921 e -8.650 kJ/mol. Em relação ao modo de interação dos compostos no sítio ativo da HDAC-2, foi possível perceber que a maioria dos compostos eram capazes de interagir com os aminoácidos His145, His146, Gly154, Phe155 e Tyr308 através de ligações de hidrogênios e interação π . Os compostos propostos por simplificação molecular foram selecionados para síntese, pois apresentaram interação com os aminoácidos percebidos como essenciais e básicos para inibição da HDAC. A Figura 27 apresenta a molécula proposta no planejamento estrutural através da simplificação molecular contendo o anel tiofeno dentro do sítio ativo da HDAC-2 demonstrando a interação com os aminoácidos citados. O estudo de *docking* realizado teve como restrição a coordenação com o átomo de zinco dentro do sítio ativo, o qual é crucial para atividade da HDAC. Sendo assim, todos os compostos mencionados nestes resultados apresentam capacidade de coordenar com o átomo de zinco.

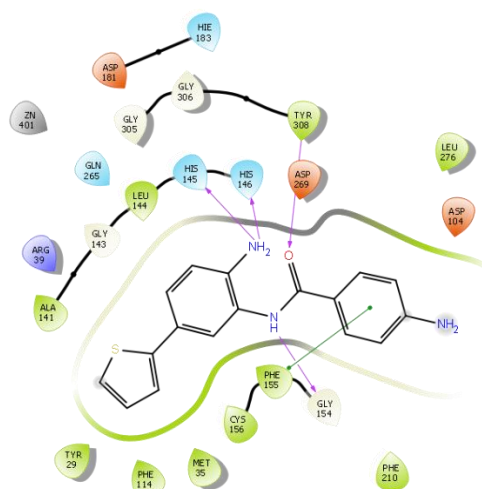


Figura 27. Modo de interação com o sítio ativo da HDAC-2.

Fonte: Própria autora

Avaliando-se as modificações propostas neste estudo, pode se perceber que das 300 poses analisadas, 40% delas (120) apresentava as moléculas contendo como R o grupo 3,5-dimetilisoaxazol, 20% (61) apresentava o tiofeno, 18% (54) o grupamento fenil e 22% (65) o anel 4-fluorofenila. Baseando-se nesses dados, selecionou-se os quatro anéis para comporem as moléculas a serem sintetizadas. Apesar do 3,5-dimetilisoaxazol compor uma porcentagem alta das poses, os outros anéis apresentaram valores similares na frequência e por isso também foram incluídos. A Figura 28 apresenta um exemplo dos compostos do estudo de *docking*, mostrando que o anel tiofeno, assim como os outros anéis, são responsáveis por ocupar a cavidade interna do sítio ativo da HDAC-2.

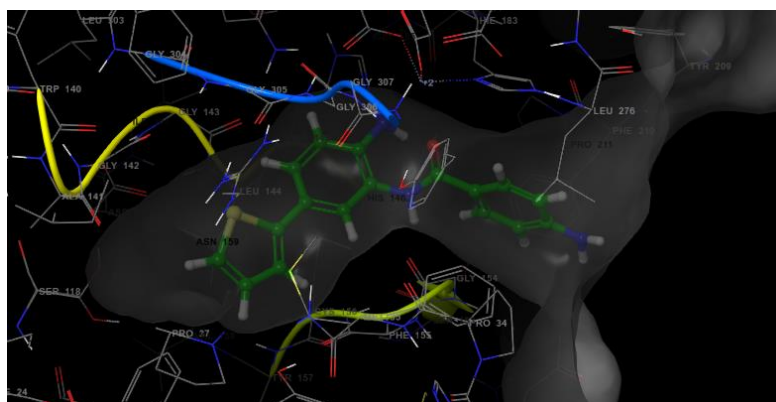


Figura 28. Representação da ocupação da cavidade interna do sítio ativo da HDAC-2.

Fonte: Própria autora

Em relação às modificações propostas no espaçador, das 300 poses avaliadas 30% (89) delas apresentava moléculas com o átomo de enxofre, 19% (58) apresentavam o átomo de carbono (sp^3), 22% delas apresentava oxigênio, 20% delas apresentava nitrogênio e 7% apresentava carbono (sp^2). A partir desses dados, selecionou-se o átomo de enxofre para compor o espaçador e descartou-se o carbono em ligação dupla. Em relação aos átomos polares, estudos realizados pelo nosso laboratório concomitantemente à este trabalho, mostraram que a introdução dessa polaridade na região que ficaria próxima ao canal hidrofóbico de 11 Å diminuía a atividade de inibição de HDAC 1 e 2 quase a metade (URIAS *et al.*, 2022). Sendo assim, optou-se por não se utilizar esses átomos como espaçador. Ainda se avalia a utilização do átomo de carbono sp^3 como espaçador, pois apesar de apresentar frequência menor que a do enxofre, seria um bom comparativo entre átomos apolares e a contribuição para a atividade enzimática. Além disso, optou-se por inicialmente não se trabalhar com os anéis piridínicos pelo mesmo motivo.

Foi possível visualizar que devido à flexibilidade do espaçador, o grupo amino é capaz de interagir com o aminoácido Glu208 através de ligação de hidrogênio (Figura 29-B) e/ou o anel aromático ligado à essa amina é capaz de interagir com o aminoácido Tyr209 através de interação π (Figura 29-A). Essas interações são adicionais quando comparadas ao composto apresentado na Figura 27, por exemplo, o que explica os valores de DS mais promissores desses compostos, sendo em torno de -12.500 kJ/mol para os compostos simplificados e -13.400 kJ/mol para os demais.

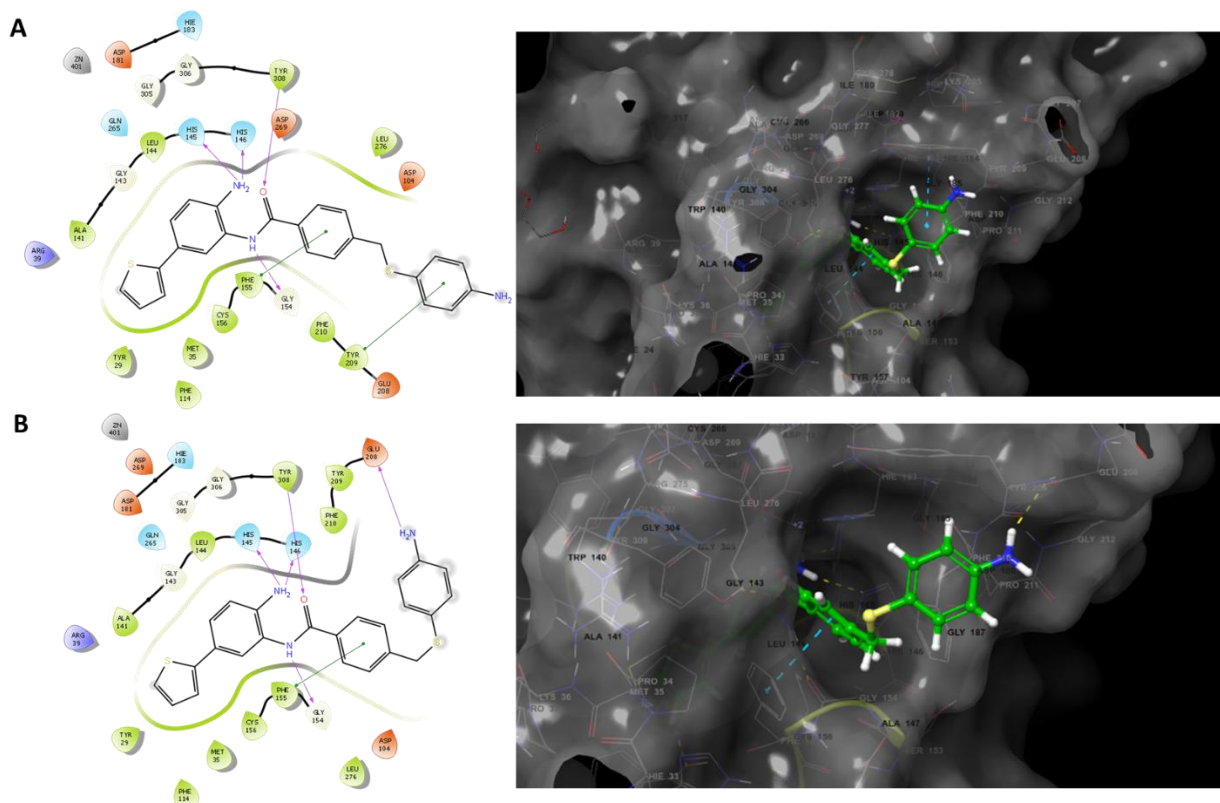


Figura 29. Interação adicional realizada pelos compostos avaliados no *docking*

Fonte: Própria autora

A Figura 30 apresenta a sobreposição das duas poses apresentadas na Figura 29.

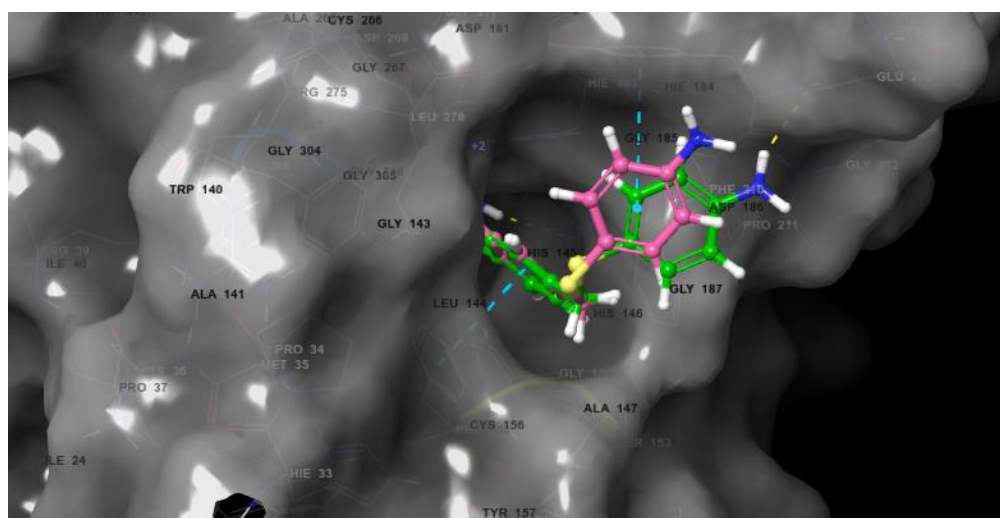


Figura 30. Sobreposição das poses da Figura 29.

Fonte: Própria autora

Sendo assim, os compostos selecionados para síntese como inibidores de HDAC deste trabalho estão apresentados na Figura 31.

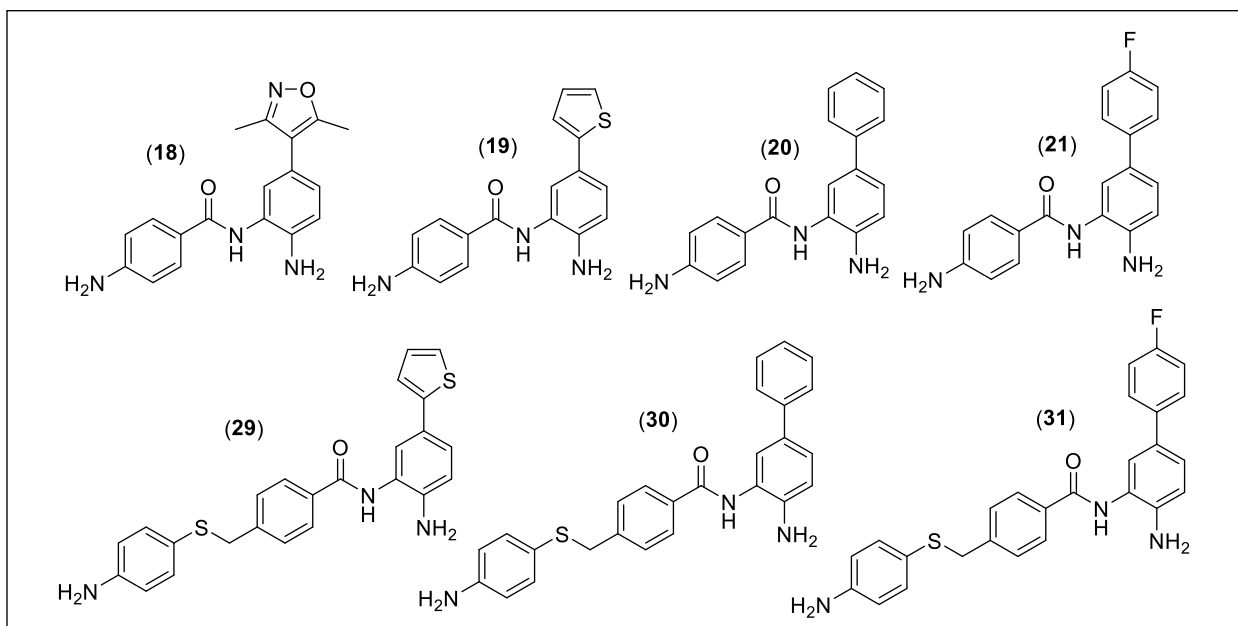


Figura 31. Estrutura química dos compostos selecionados para síntese

Fonte: Própria autora

5.2. Síntese dos inibidores de HDAC

Iniciou-se a síntese dos inibidores de HDAC pela proteção do grupamento amino do reagente 4-bromo-2-nitroanilina, utilizando-se para isso o grupo protetor Boc, obtendo-se então o composto (1). Tal proteção é realizada com intuito de facilitar a purificação dos intermediários subsequentes e evitar a ocorrência de reações paralelas que poderiam resultar em subprodutos. O rendimento desta reação é de, aproximadamente, 33%. Isso se deve ao fato de que após a primeira reação entre o di-*tert*-butil dicarbonato com o grupo NH_2 do reagente uma segunda reação pode acontecer nessa mesma posição, o que resultaria na formação de um produto dissustituído e com rendimento de, aproximadamente, 33%. Esse subproduto foi caracterizado através de RMN de ^1H , onde visualizou-se um sinal em 1.46 ppm integrando para dezoito hidrogênios (espectro não apresentado). A Tabela 3 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C deste composto.

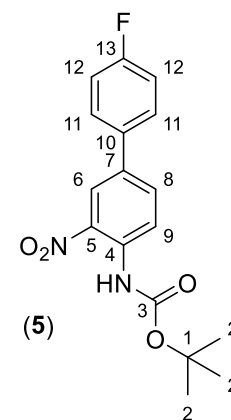
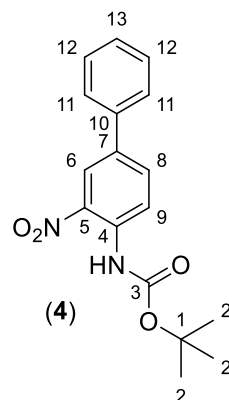
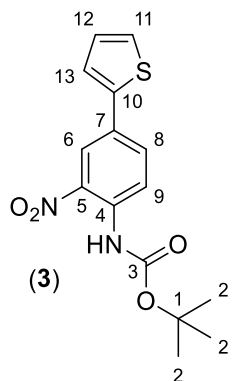
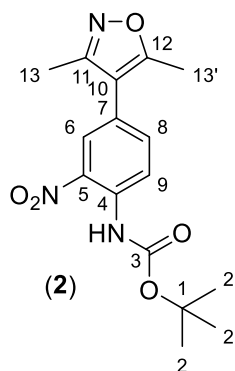
Tabela 3. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**1**).

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	114.95
2	8.12 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H)	127.57
3	-	131.93
4	-	141.72
5	7.58 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H)	125.84
6	7.86 (dd, $J=8.8$ e 2.3Hz , 1H)	136.77
7	-	152.29
8	-	80.87
9	1.43 (s, 9H)	27.90
NH _{Boc}	9.68 (s, 1H)	-

Os hidrogênios H_2 , H_5 e H_6 são visualizados como duplete, duplete e duplo duplete, respectivamente, em 8.12, 7.58 e 7.86 ppm, todos integrando para um hidrogênio. As determinações desses hidrogênios foram realizadas através da análise das constantes de acoplamento, onde visualiza-se o hidrogênio H_2 com constante de acoplamento de 2.3Hz (acoplamento em *meta* com H_6), hidrogênio H_5 com constante de acoplamento em 8.8Hz (acoplamento em *orto* com H_6) e os hidrogênios H_6 com constantes de 8.8Hz e 2.3Hz (acoplamento em *orto* com H_5 e em *meta* com H_2). Os hidrogênios do grupamento Boc é visualizado como um simpleto em 1.43ppm integrando para nove hidrogênios, o hidrogênio do grupo carbamato é visualizado em 9.68ppm, enquanto seus carbonos são visualizados em 152.29 ppm (C_7), 80.87 ppm (C_8) e 27.90 ppm (C_9).

Em seguida foram realizadas as reações de acoplamento de Suzuki para obtenção dos compostos (**2**), (**3**), (**4**) e (**5**). Os rendimentos obtidos para as reações de Suzuki foram compatíveis com o que era esperado, variando entre 66% e 82.9%, e sem formação significativa de

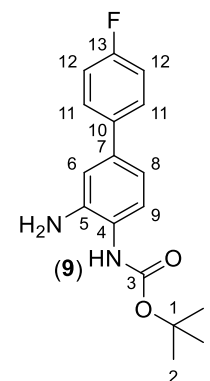
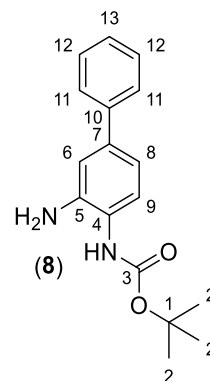
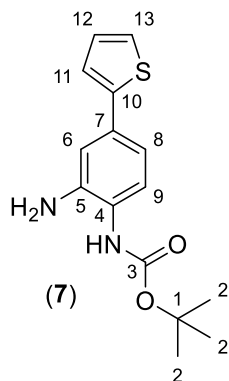
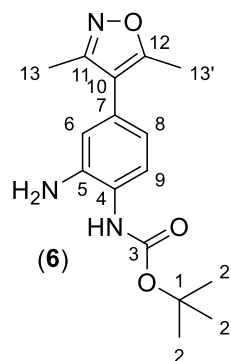
subprodutos. A Tabela 4 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários **(2)**-**(5)**.

Tabela 4. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (2)-(5)

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	80.69	-	80.64	-	80.76	-	80.60
2	1.45 (s, 9H)	27.92	1.45 (s, 9H)	27.90	1.46 (s, 9H)	27.97	1.46 (s, 9H)	27.90
3	-	152.50	-	152.36	-	152.52	-	152.42
4	-	131.68	-	131.94	-	135.87	-	134.75
5	-	141.43	-	141.41	-	141.55	-	141.51
6	7.91 (s, 1H)	125.10	8.14 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H)	125.01	8.18 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H)	122.83	8.17 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H)	122.78
7	-	125.74	-	129.68	-	137.53	-	131.62
8	7.72-7.68 (m, 2H)	134.37	7.94 (dd, $J=8.6$, 2.2Hz, 1H)	130.65	7.99 (dd, $J=8.6$, 2.2Hz, 1H)	132.11	7.97 (dd, $J=8.6$, 2.2Hz, 1H)	131.93
9	7.72-7.68 (m, 2H)	124.51	7.69 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H)	124.66	7.76-7.70 (m, 3H)	124.56	7.72 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H)	124.47
10	-	114.04	-	140.54	-	131.77	-	134.00 (d, $J=3.1\text{Hz}$)
11	-	158.15	7.63-7.62 (m, 2H)	128.80	7.76-7.70 (m, 3H)	126.67	7.78 (dd, $J=8.9$, 5.4Hz, 2H)	128.78 (d, $J=8.3\text{Hz}$)
12	-	166.00	7.17 (dd, $J=5.0$, 3.6Hz, 1H)	126.72	7.49 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H)	129.27	7.32 (t, $J=8.9\text{Hz}$, 2H)	115.97 (d, $J=21.5\text{Hz}$)
13	2.23 (s, 3H)	10.35	7.63-7.62 (m, 2H)	121.26	7.44-7.38 (m, 1H)	128.27	-	162.23 (d, $J=245.8\text{Hz}$)
13'	2.41 (s, 3H)	11.34	-	-	-	-	-	-
NH_{Boc}	9.69 (s, 1H)	-	9.65 (s, 1H)	-	9.66 (s, 1H)	-	9.66 (s, 1H)	-

Em todos os intermediários é possível visualizar os hidrogênios H₂ do grupo protetor Boc em 1.45 ppm integrando para nove hidrogênios, assim como seus carbonos C₁, C₂ e C₃ nas regiões de 80, 27, e 152 ppm, respectivamente. Os hidrogênios H₆, H₈ e H₉ mostram-se nas regiões de 8.0, 7.9 e 7.7 ppm como duplete, duplo duplete e duplete, respectivamente, integrando para um hidrogênio. Em relação aos heterociclos inseridos na posição 7, é possível visualizar os hidrogênios H₁₃ e H_{13'} do 3,5-dimetilisoxazol (**2**) como dois simpletos em 2.3 e 2.41 ppm integrando para três hidrogênios, e seus carbonos C₁₀ a C_{13'} em 114.04, 158.15, 166.0, 10.35 e 11.34 ppm, respectivamente. Os carbonos C₁₁ e C₁₂ apresentam sinais deslocados à esquerda do espectro por sofrerem desblindagem devido à proximidade aos átomos de nitrogênio e oxigênio, assim como os sinais dos carbonos C₁₃ e C_{13'} estão em regiões características dos grupos metilas, nas regiões de 10ppm. O composto (**3**), apresentando o anel tiofeno, apresenta os sinais dos hidrogênios aromáticos H₁₁ a H₁₃ como duplo duplete e multiplete entre 7.17 e 7.63 ppm, totalizando três hidrogênios, e seus carbonos C₁₁ a C₁₃ em 128.80, 126.72 e 121.26 ppm, respectivamente. Os anéis fenil (**4**) e 4-fluorofenil (**5**) apresentam seus hidrogênios aromáticos em regiões similares (entre 7.3 e 7.7 ppm). Os hidrogênios do composto (**4**) H₁₁ a H₁₃ são vistos como multiplete, tripleto e multiplete entre 7.38 e 7.76 ppm, totalizando cinco hidrogênios, enquanto os hidrogênios H₁₁ e H₁₂ do composto (**5**) são vistos como duplo duplete e tripleto, respectivamente, em 7.78 e 7.32 ppm, totalizando quatro hidrogênios. É importante destacar que os carbonos C₁₀ a C₁₃ apresentam-se como dupletos no espectro e com constantes de acoplamento (descritas na tabela 4), devido ao acoplamento com o átomo de flúor da posição 13.

Seguindo-se a rota sintética, submeteu-se os compostos (**2**) a (**5**) à reação de redução em meio contendo ferro metálico a cloreto de amônio, com intuito de reduzir o grupamento nitro da posição 5 à amino, obtendo-se então os compostos (**6**) a (**9**). Os rendimentos para obtenção desses compostos foram 57,4 e 77,0%. A Tabela 5 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos (**6**)-(9).

Tabela 5. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (6)-(9).

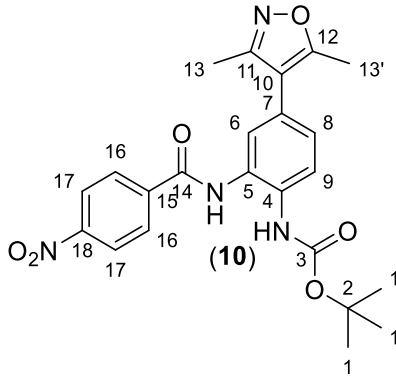
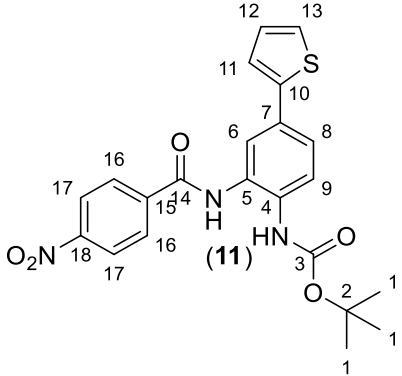
Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	79.00	-	78.90	-	78.97	-	78.81
2	1.46 (s, 9H)	28.22	1.46 (s, 9H)	28.17	1.47 (s, 9H)	28.28	1.47 (s, 9H)	28.18
3	-	153.74	-	153.55	-	153.74	-	153.56
4	-	141.40	-	123.52	-	141.36	-	124.48
5	-	126.29	-	141.27	-	123.54	-	141.23
6	6.68 (s, 1H)	115.97	6.97 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	112.44	6.99 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	113.86	6.95 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	113.65
7	-	123.25	-	130.25	-	140.57	-	135.63
8	6.51 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)	116.99	6.84 (dd, $J=8.2$, 2.1Hz , 1H)	113.72	6.83 (dd, $J=8.2$, 2.1Hz , 1H)	114.95	6.80 (dd, $J=8.2$, 2.1Hz , 1H)	114.71
9	7.27 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H)	124.72	7.26 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	124.62	7.32-7.38 (m, 2H)	124.72	7.30 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	123.42
10	-	116.15	-	144.02	-	136.86	-	137.00 (d, $J=2.6\text{Hz}$)
11	-	158.23	7.44 (dd, $J=5.1$, 1.0Hz , 1H)	122.50	7.54 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 2H)	126.33	7.56 (dd, $J=8.8$, 5.5Hz , 2H)	128.06 (d, $J=8.0\text{Hz}$)
12	-	164.58	7.08 (dd, $J=5.1$, 3.6Hz , 1H)	128.28	7.42 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H)	128.90	7.24 (t, $J=8.9\text{Hz}$, 2H)	115.54 (d, $J=21.5\text{Hz}$)
13	2.19 (s, 3H)	10.63	7.29 (dd, $J=3.6$, 1.1Hz , 1H)	124.62	7.32-7.28 (m, 2H)	127.02	-	161.51 (d, $J=243.7\text{Hz}$)
13'	2.36 (s, 3H)	11.41	-	-	-	-	-	-
NH ₂	4.95 (s, 2H)	-	5.00 (s, 2H)	-	4.96 (s, 2H)	-	4.97 (s, 2H)	-
NH _{Boc}	8.36 (s, 1H)	-	8.34 (s, 1H)	-	8.36 (s, 1H)	-	8.36 (s, 1H)	-

De forma geral, é possível perceber que os sinais dos hidrogênios H₆, H₈ e H₉ de todos os intermediários apresentam deslocamento à direita do espectro de ¹H devido à presença do grupamento amino na posição 5, responsável pela maior blindagem desses hidrogênios. O maior deslocamento é visualizado nas posições *orto* e para em relação ao grupo amino (H₆ e H₈), e os hidrogênios H₆, H₈ e H₉ são visualizados de forma geral como duplete, duplo duplete e duplete na região compreendida entre 7.38 e 6.68 ppm, enquanto o derivado contendo grupo nitro apresentava os mesmos hidrogênios na região entre 8.0 e 7.7 ppm. Visualiza-se também um simpleto na região de 5.00 ppm integrando para dois hidrogênios, caracterizando o grupo NH₂, e confirmando o sucesso da reação.

Na etapa seguinte foi realizado o acoplamento de amida entre os compostos **(6)** a **(9)** com o ácido 4-nitrobenzoico. Inicialmente, tratou-se o ácido 4-nitrobenzoico utilizando-se cloreto de oxalila para obtenção de um grupo funcional mais reativo, o cloreto de acila. Esse intermediário foi utilizado sem purificação para a então reação com os derivados **(6)** a **(9)** em meio contendo metil-morfolina como base e DMF como solvente para obtenção dos intermediários **(10)** a **(13)**. Os rendimentos dessas reações foram altos, variando entre 50 e 86%.

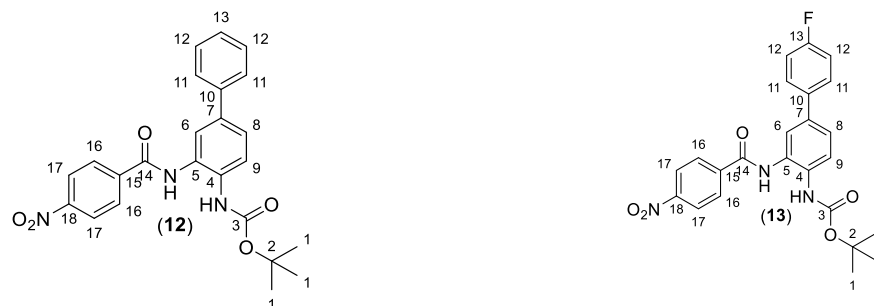
As Tabelas 6 e 7 apresentam os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos intermediários **(10)** a **(13)**.

Tabela 6. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (10) e (11)

 (10)  (11)				
Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.46 (s, 9H)	28.05	1.45 (s, 9H)	28.05
2	-	79.74	-	79.70
3	-	153.27	-	153.15
4	-	140.14	-	-
5	-	125.13	-	140.13
6	7.52 (s, 1H)	126.40	7.79 (s, 1H)	123.16
7	-	123.66	-	131.97
8	7.25 (dd, $J=8.4, 1.7\text{Hz}$, 1H)	126.87	7.55-7.53 (m, 1H)	123.38
9	7.72 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H)	128.97	7.69 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H)	123.43
10	-	115.19	-	142.57
11	-	158.23	7.52 (dd, $J=5.2\text{Hz}$, 1H)	123.76
12	-	165.06	7.13 (dd, $J=5.0, 3.7\text{Hz}$, 1H)	129.13
13	2.25 (s, 3H)	10.46	7.46 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H)	125.44
13'	2.43 (s, 3H)	11.29	-	-
14	-	164.01	-	164.10
15	-	131.66	-	128.52
16	8.21 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H)	129.28	8.23 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	123.54
17	8.39 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	123.56	8.40 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	129.34
18	-	149.27	-	149.27

NH_{amida}	10.14 9s, 1H)	10.16 (s, 1H)
NH_{Boc}	8.86 (s, 1H)	8.79 (s, 1H)

Tabela 7. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos intermediários (12) e (13)

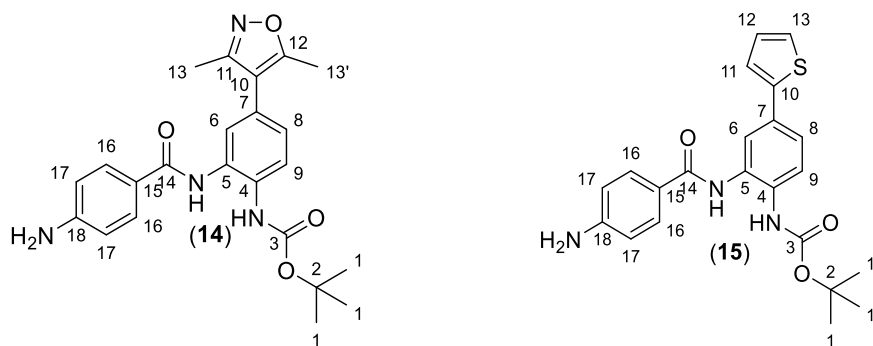


Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	1.46 (s, 9H)	28.09	1.46 (s, 9H)	28.06
2	-	79.71	-	79.69
3	-	153.28	-	153.24
4	-	131.95	-	131.91
5	-	135.53	-	129.07
6	7.82 (d, $J=2.1$ Hz, 1H)	123.72	7.80 (d, $J=1.3$ Hz, 1H)	123.72
7	-	139.23	-	134.46
8	7.56 (dd, $J=8.5, 2.1$ Hz, 1H)	124.31	7.53 (dd, $J=8.5, 1.3$ H 1H)	124.22
9	7.73 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	124.66	7.73 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	124.58
10	-	139.23	-	135.71
11	7.65 (d, $J=7.6$ Hz, 2H)	126.36	7.69 (dd, $J=8.4, 5.5$ Hz, 2H)	128.30
12	7.47 (t, $J=7.7$ Hz, 2H)	129.02	7.29 (t, $J=8.7$ Hz, 2H)	115.76 (d, $J=21.5$ Hz)
13	7.36 (t, $J=7.4$ Hz, 1H)	127.39	-	161.77 (d, $J=245.6$ Hz)
14	-	164.12	-	164.10
15	-	140.24	-	140.18
16	8.23 (d, $J=8.6$ Hz, 2H)	129.32	8.22 (d, $J=8.3$ Hz, 2H)	129.26
17	8.41 (d, $J=8.7$ Hz, 2H)	123.60	8.40 (d, $J=8.6$ Hz, 2H)	123.58

18	-	149.29	-	149.28
NH_{amida}	10.18 (s, 1H)	-	10.16 (s, 1H)	-
NH_{Boc}	8.83 (s, 1H)	-	8.82 (s, 1H)	-

Após o acoplamento de amida do ácido 4-nitrobenzoico com os intermediários **(6)** a **(9)**, é possível visualizar nos espectros de RMN de ^1H dos produtos os sinais correspondentes aos hidrogênios H_{16} e H_{17} como dois dupletos em 8.2 e 8.4 ppm, respectivamente, integrando para dois hidrogênios e com constantes de acoplamento em torno de 8.6Hz, caracterizando o acoplamento em *orto* entre os hidrogênios citados. Percebe-se também que o simpleto em 5.00 ppm do grupo NH_2 dos reagentes não é mais visualizado, e pode ser visto agora um simpleto em 10.1 ppm, integrando para um hidrogênio, característico de hidrogênio de amida, comprovando o sucesso da reação. Em relação aos carbonos, visualiza-se dois carbonos adicionais nas regiões de 129.3 e 123.5 ppm, característicos de carbonos aromáticos (C_{16} e C_{17}), um sinal em 164.12 ppm característico de carbono carbonílico de amidas (C_{14}), e um sinal em 149.29 ppm, oriundo do carbono quaternário C_{18} ligado diretamente ao grupo nitro.

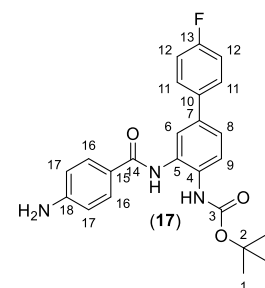
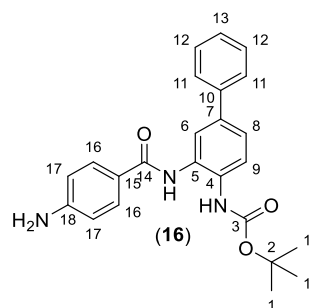
A reação de redução utilizando-se ferro metálico e cloreto de amônio foi mais uma vez utilizada com os compostos **(10)** a **(13)**, para obtenção dos derivados de anilina **(14)** a **(17)**. Novamente os rendimentos obtidos foram altos, variando entre 65 e 76%, sendo o derivado de 3,5-metilisoxazol o de menor rendimento. A reação não apresentou formação de subprodutos. As Tabelas 8 e 9 apresentam os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários **(14)** a **(17)**.

Tabela 8. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (**14**) e (**15**).

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.47 (s, 9H)	28.03	1.46 (s, 9H)	28.04
2	-	79.88	-	79.83
3	-	153.55	-	153.38
4	-	130.69	-	-
5	-	130.38	-	-
6	7.54 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H)	125.27	7.81 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	120.01
7	-	124.20	-	130.82
8	7.18 (dd, $J=8.3$, 2.1Hz , 1H)	125.91	7.47 (dd, $J=8.4$, 2.2Hz , 1H)	122.03
9	7.57 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H)	125.59	7.55 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	122.41
10	-	115.32	-	142.78
11	-	158.08	7.52 (dd, $J=5.1$, 1.0Hz , 1H)	123.37
12	-	165.26	7.13 (dd, $J=5.0$, 3.6Hz , 1H)	128.49
13	2.25 (s, 3H)	10.51	7.44 (dd, $J=3.6$, 1.1Hz , 1H)	125.40
13'	2.42 (s, 3H)	11.32	-	-
14	-	165.03	-	165.39
15	-	130.69	-	124.28
16	7.68 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	129.30	7.70 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	129.37
17	6.61 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	112.61	6.61 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	112.61
18	-	152.54	-	152.55
NH₂	5.84 s, 2H)	-	5.84 9s, 2H)	-

NH_{amida}	9.54 (s, 1H)	-	9.57 (s, 1H)	-
NH_{Boc}	8.80 (s, 1H)	-	8.70 (s, 1H)	-

Tabela 9. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos intermediários (16) e (17)



Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	1.47 (s, 9H)		1.47 (s, 9H)	28.04
2	-		-	79.81
3	-		-	153.47
4	-		-	130.62
5	-		-	130.77
6	7.84 (d, $J=2.1$ Hz, 1H)		7.82 (d, $J=2.1$ Hz, 1H)	123.12
7	-		-	134.94
8	7.49-7.45 (m, 3H)		7.45 (dd, $J=8.8, 2.2$ Hz, 1H)	123.67
9	7.58 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)		7.58 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	124.23
10	-		-	135.92
11	7.64 (d, $J=7.2$ Hz, 2H)		7.67 (dd, $J=8.8, 5.4$ Hz, 2H)	128.33 (d, $J=8.0$ Hz)
12	7.49-7.45 (m, 3H)		7.29 (t, $J=8.9$ Hz, 2H)	115.74 (d, $J=21.2$ Hz)
13	7.35 (t, $J=6.9$ Hz, 1H)		-	161.74 (d, $J=247.2$ Hz)
14	-		-	165.32
15	-		-	120.09
16	7.70 (d, $J=8.6$ Hz, 2H)		7.70 (d, $J=8.6$ Hz, 2H)	129.31
17	6.62 (d, $J=8.7$ Hz, 2H)		6.62 (d, $J=8.6$ Hz, 2H)	112.62

18	-	-	152.52
NH₂	5.85 (s, 2H)	5.84 (s, 2H)	-
NH_{amida}	9.59 (s, 1H)	9.57 (s, 1H)	-
NH_{Boc}	8.76 (s, 1H)	8.75 (s, 1H)	-

Assim como demonstrado nas tabelas 8 e 9, após a redução do grupamento nitro à amino, os hidrogênios H₁₆ e H₁₇ apresentam significativo deslocamento à direita do espectro, devido ao efeito de proteção do grupo NH₂. O maior deslocamento é visto nos hidrogênios H₁₇ (posição *orto* em relação à amina), os quais são visualizados na região de 8.4 ppm nos derivados que apresentam grupo nitro, e agora deslocam-se quase 2ppm, sendo visualizados na região de 6.6 ppm. O mesmo comportamento é percebido no espectro de RMN de ¹³C, em que o carbono C₁₇ passa de 129.3 ppm para 112.6 ppm. Os hidrogênios da amina também são visualizados no espectro como um simpleto em 5.8 ppm, demonstrando o sucesso da reação.

A última etapa da rota sintética para obtenção dos compostos finais **(18)**-**(21)** consistiu na clivagem do grupamento protetor Boc através do tratamento dos intermediários **(14)** a **(17)** com TFA. Os rendimentos observados para esta reação foram altos, variando-se entre 77 e 94%. As Tabelas 10 e 11 apresentam os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos produtos finais **(18)** a **(21)**.

Tabela 10. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários **(18)** e **(19)**.

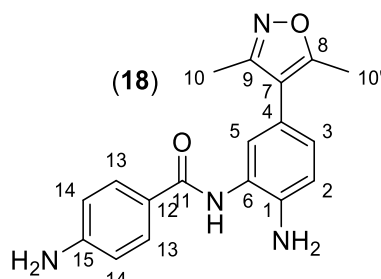
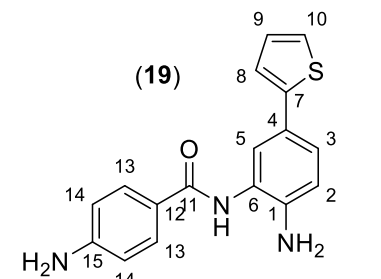
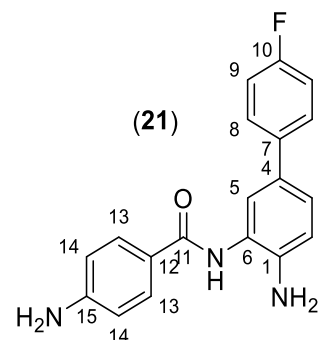
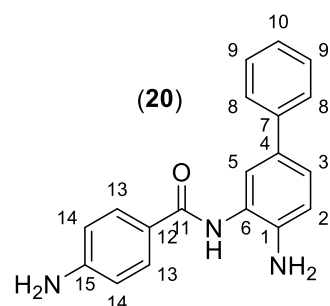
 (18)  (19)				
Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	142.27	-	147.59
2	6.85 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	116.45	6.80 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	115.92
3	6.94 (dd, $J=8.2$, 1.9Hz , 1H)	126.72	7.26 (dd, $J=8.4$, 2.2Hz , 1H)	126.91
4	-	124.33	-	130.87
5	7.15 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H)	126.40	7.45 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	121.40
6	-	120.80	-	127.69
7	-	115.97	-	140.80
8	-	163.99	7.35 (dd, $J=5.1$, 0.9Hz , 1H)	120.82
9	-	158.23	7.05 (dd, $J=5.0$, 3.7Hz , 1H)	128.80
10	2.20 (s, 3H)	10.59	7.23 (dd, $J=3.1$, 1.0Hz , 1H)	132.02
10'	2.37 (s, 3H)	11.32	-	-
11	-	165.27	-	166.67
12	-	117.38	-	122.42
13	7.71 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	129.49	7.73 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	130.93
14	6.59 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	112.52	6.59 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	114.35
15	-	152.08	-	152.59
1-NH ₂	5.02 (s, 2H)	-	5.06 (s, 2H)	-
15-NH ₂	5.73 (s, 2H)	-	5.72 (s, 2H)	-
NH _{amida}	9.30 (s, 1H)	-	9.33 (s, 1H)	-

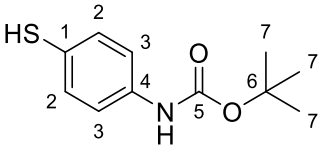
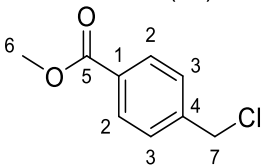
Tabela 11. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários (20) e (21)

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	142.63	-	142.52
2	6.85 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	116.68	6.85 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	116.66
3	7.29 (dd, $J=8.3$, 2.2Hz, 1H)	124.51	7.26 (dd, $J=8.3$, 2.2Hz, 1H)	124.47
4	-	124.57	-	124.56
5	7.50 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	124.15	7.47 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	124.09
6	-	140.34	-	127.50
7	-	128.31	-	136.87 (d, $J=2.9\text{Hz}$)
8	7.39 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 2H)	125.55	7.57 (dd, $J=8.7$, 5.5Hz, 2H)	127.34 (d, $J=8.0\text{Hz}$)
9	7.55 (dd, $J=8.3$, 1.1Hz, 2H)	128.84	7.21 (t, $J=8.9\text{Hz}$, 2H)	115.53 (d, $J=21.2\text{Hz}$)
10	7.24 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H)	126.04	-	161.02 (d, $J=242.5\text{Hz}$)
11	-	165.33	-	165.31
12	-	120.88	-	120.86
13	7.74 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	129.49	7.74 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	129.48
14	6.60 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	112.57	6.60 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H)	112.55
15	-	152.06	-	152.05
1-NH ₂	5.01 (s, 2H)	-	5.02 (s, 2H)	-
15-NH ₂	5.72 (s, 2H)	-	5.72 (s, 2H)	-
NH _{amida}	9.35 (s, 1H)	-	9.34 (s, 1H)	-

De forma geral, visualiza-se que após a clivagem do grupamento protetor Boc, a amina resultante é agora visualizada como um simpleto em 5.02 ppm integrando para dois hidrogênios. Além disso, os hidrogênios H₂, H₃ e H₅ sofrem um deslocamento à direita do espectro, como esperado, sendo o deslocamento mais significativo o do hidrogênio H₂, na posição *orto* em relação à amina, o qual passa da região de 7.5 para 6.8 ppm. O mesmo comportamento é visualizado no espectro de RMN de ¹³C, onde o carbono C₂ passa de 124.3 para 116.6 ppm. A presença do sinal da amina e o deslocamento dos sinais dos hidrogênios vizinhos comprovam o sucesso da reação e obtenção dos produtos finais (**18**) a (**21**).

Iniciando-se a rota sintética da segunda série dos inibidores de HDAC, realizou-se a proteção dos grupamentos ácido e amina dos reagentes ácido 4-clorometilbenzoico e 4-aminotiofenol através de esterificação e inserção do grupamento Boc, respectivamente. Tais proteções foram realizadas com intuito de facilitar a purificação dos produtos que seriam obtidos em seguida, e diminuir as chances do acontecimento de reações paralelas. Os rendimentos obtidos foram 93 e 85% e a Tabela 12 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos intermediários (**22**) e (**23**).

Tabela 12. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos intermediários (**22**) e (**23**)

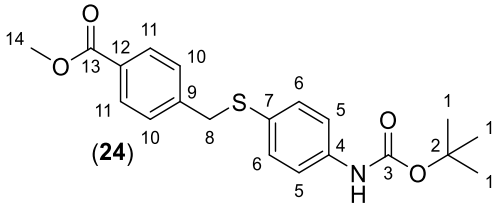
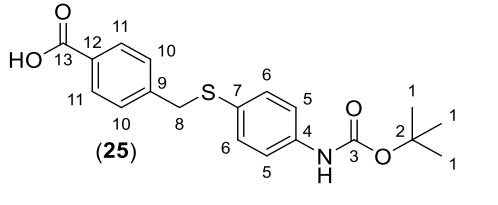
(22)  (23) 				
Posição	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)
1	-	128.33	-	142.87
2	7.37 (d, J=8.6Hz, 2H)	130.71	7.97 (d, J=8.3Hz, 2H)	129.53
3	7.46 (d, J=8.6Hz, 2H)	118.73	7.58 (d, J=8.3Hz, 2H)	129.12
4	-	139.99	-	129.41
5	-	152.61	-	165.87
6	-	79.41	3.86 (s, 3H)	52.26
7	1.46 (s, 9H)	28.06	4.84 (s, 2H)	42.22

NH_{amida}	9.51 (s, 1H)	-	-	-
---------------------------	--------------	---	---	---

Em relação ao composto (**22**), visualizam-se os hidrogênios H₇ característicos do grupamento Boc como um simpleto em 1.46 ppm integrando para nove hidrogênios, um simpleto em 9.51 ppm integrando para um hidrogênio característico do NH da amida e, por fim, os carbonos C₅, C₆ e C₇ são visualizados em 152.61, 79.41 e 28.06 ppm, respectivamente, demonstrando o sucesso da reação. A esterificação que resulta no composto (**23**) pode ser visualizada através do grupamento metila como um simpleto em 3.86 ppm integrando para três hidrogênios, comprovando o sucesso da reação.

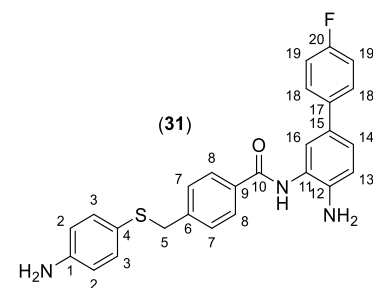
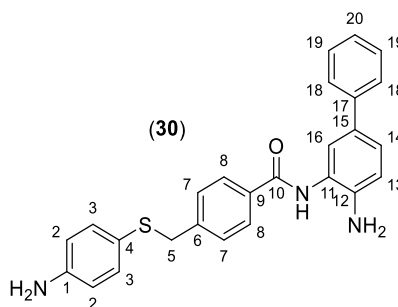
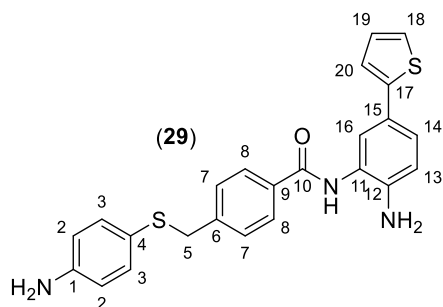
As etapas seguintes foram caracterizadas pela reação de S_N2 entre os compostos (**22**) e (**23**), resultando no composto (**24**), e pela subsequente hidrólise básica do grupamento éster, resultando no ácido carboxílico (**25**). Os rendimentos obtidos foram de 60 e 83%, e a Tabela 13 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos intermediários (**24**) e (**25**).

Tabela 13. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários **(24)** e **(25)**.

 (24)  (25)				
Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.46 (s, 9H)	28.08	1.45 (s, 9H)	28.11
2	-	79.17	-	79.21
3	-	152.62	-	152.69
4	-	138.61	-	138.65
5	7.38-7.36 (m, 4H)	118.40	7.37-7.35 (m, 4H)	128.97
6	7.21 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	128.14	7.21 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	129.33
7	-	131.31	-	126.92
8	4.18 (s, 2H)	38.00	4.17 (s, 2H)	37.99
9	-	143.88	-	118.53
10	7.38-7.36 (m, 4H)	131.28	7.37-7.35 (m, 4H)	129.33
11	7.84 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H)	129.13	7.82 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H)	131.18
12	-	126.73	-	143.38
13	-	165.99	-	167.11
14	3.82 (s, 3H)	52.06	-	-
COOH	-	-	12.87 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.38 (s, 1H)	-	9.39 (s, 1H)	-

Como apresentado na Tabela 13, os hidrogênios aromáticos H₂, H₃, H₉ e H₁₀ do composto **(24)** são visualizados como duplete, multiplete e duplete em 7.84 ppm, 7.38-7.36 ppm (4H) e 7.21 ppm, totalizando oito hidrogênios. Os hidrogênios H₆ da metila do éster são visualizados como um simpleto em 3.82 ppm integrando para três hidrogênios, enquanto os hidrogênios H₁₄ das metilas do Boc apresentam-se como um simpleto em 1.46 ppm integrando para nove hidrogênios. Além disso, os hidrogênios H₇ são visualizados como um simpleto em 4.18 ppm, deslocado à direita do espectro quando comparado ao composto **(23)**, por estar sob a influência de um átomo menos eletronegativo (enxofre) que o do intermediário **(23)** (cloro). Após a hidrólise básica e obtenção do composto **(25)**, percebe-se que os hidrogênios da metila não são mais vistos no espectro, o qual agora apresenta um simpleto em 12.87 ppm característico de ácido carboxílico, sugerindo o sucesso da reação.

Após a obtenção do intermediário chave **(25)**, prosseguiu-se com o acoplamento de amida entre este intermediário e as aminas aromáticas **(7)** a **(9)**. Não se utilizou o intermediário **(6)**, derivado do 3,5-dimetilisoxazol, para a síntese desta série de compostos, pois nesta etapa do trabalho já haviam sido avaliados os compostos **(18)** a **(21)** contra as HDACs 1 e 2 e o composto **(18)** não apresentou capacidade de inibição das enzimas (dados que serão discutidos em tópico adiante). Após o acoplamento de amida obteve-se os compostos **(26)** a **(28)**, os quais foram purificados e submetidos ao tratamento com TFA para clivagem do grupamento Boc e obtenção dos produtos finais desta série **(29)** a **(31)**. A Tabela 14 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos **(29)** a **(31)**.

Tabela 14. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos finais (29) a (31).

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	148.67	-	148.70	-	148.66
2	6.48 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H)	114.32	6.46 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H)	114.37	6.48 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H)	114.34
3	7.02 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H)	128.63	7.02 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H)	128.68	7.02 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H)	128.66
4	-	118.12	-	118.14	-	118.12
5	4.02 (s, 2H)	40.10	4.02 (s, 2H)	40.13	4.01 (s, 2H)	30.73
6	-	143.06	-	142.86	-	142.80
7	7.31-7.28 (m, 3H)	134.03	7.30 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H)	134.09	7.30-7.29 (m, 3H)	134.07
8	7.88 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H)	127.76	7.89 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H)	127.79	7.88 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H)	127.77
9	-	132.77	-	140.22	-	136.74
10	-	165.23	-	165.26	-	162.24
11	-	128.22	-	128.13	-	127.13
12	-	142.47	-	142.47	-	142.45
13	6.80 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	116.34	6.86 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	116.54	6.85 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	116.51
14	7.31-7.28 (m, 3H)	123.90	7.32 (d, $J=8.3$, 2.2Hz, 1H)	124.71	7.0-7.29 (m, 3H)	124.66
15	-	122.22	-	123.63	-	123.60
16	7.46 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	123.21	7.51 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H)	124.85	7.48 (s, 1H)	124.82
17	-	144.25	-	132.90	-	132.88
18	7.35 (dd, $J=5.0$, 1.0Hz, 1H)	123.40	7.55 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 2H)	125.54	7.57 (dd, $J=8.5$, 5.5Hz, 2H)	127.33 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
19	7.05 (dd, $J=5.0$, 3.6Hz, 1H)	128.21	7.39 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 2H)	128.84	7.21 (t, 2H)	115.53 (d, $J=21.2\text{Hz}$)
20	7.24 (dd, $J=3.5$, 0.8Hz)	121.00	7.24 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 1H)	126.06	-	161.09
1-NH ₂	5.25 (s, 2H)	-	5.25 (s, 2H)	-	5.25 (s, 2H)	-

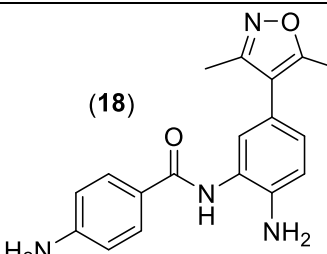
12-NH₂	5.14 (s, 2H)	-	5.09 (s, 2H)	-	5.09 (s, 2H)	-
NH_{amida}	9.68 (s, 1H)	-	9.70 (s, 1H)	-	9.69 (s, 1H)	-

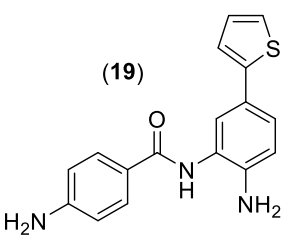
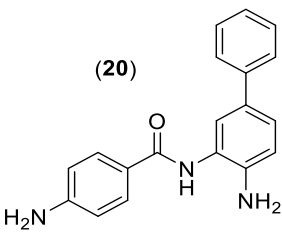
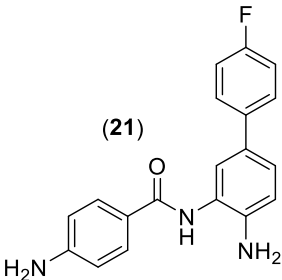
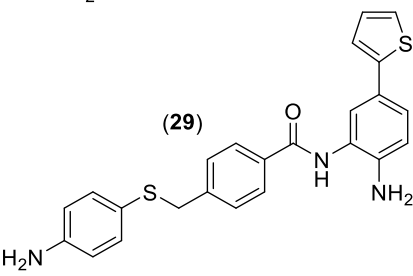
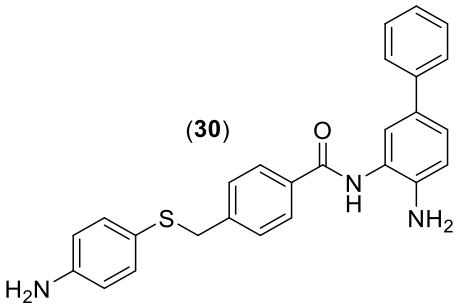
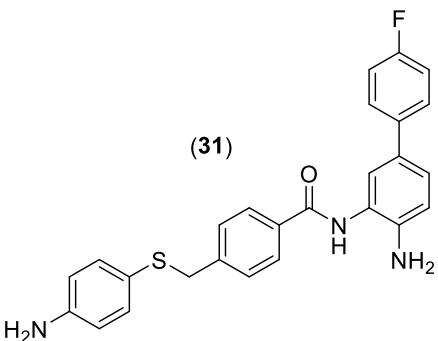
Como apresentado na Tabela 14, é possível visualizar em todos os compostos os simpletos em 5.25 e 5.1 ppm integrando para dois hidrogênios dos dois grupamentos NH_2 representando as aminas nas posições 1 e 12. Além disso, os hidrogênios aromáticos H_2 , H_3 , H_7 e H_8 são visualizados como quatro dupletos nas regiões e 6.4 e 7.0 ppm, integrando para dois hidrogênios cada e com constantes de acoplamento variando entre 8.3 e 8.5 Hz devido ao acoplamento em *orto* entre os pares de hidrogênios. Os hidrogênios H_{13} , H_{14} e H_{16} são vistos, de forma geral, como três dupletos em 6.8, 7.3 e 7.5, respectivamente, sendo determinados de acordo com as constantes de acoplamento, como discutido anteriormente. Os heterociclos adicionados à posição 15 dos compostos são determinados da seguinte forma: para o composto **(29)**, apresentando um tiofeno, é possível visualizar os hidrogênios H_{18} , H_{19} e H_{20} como duplo duplete, duplo duplete e duplo duplete em 7.35, 7.05 e 7.24 ppm, sendo determinados devido às suas constantes de acoplamento, as quais variam entre 0.8 e 5.0 Hz; o composto **(30)**, apresentando a fenila, tem seus hidrogênios H_{18} , H_{19} e H_{20} como duplete, tripleto e tripleto integrando para dois, dois e um hidrogênio e 7.55, 7.39 e 7.24 ppm e, por fim, o composto **(31)** contendo o anel 4-fluorofenila apresenta seus hidrogênios H_{18} e H_{19} como um duplete e um tripleto em 7.57 e 7.21 ppm totalizando quatro hidrogênios. Os deslocamentos descritos aqui sugerem a obtenção dos compostos finais propostos.

5.3. Inibição enzimática

Inicialmente, enviou-se os compostos **(18)** a **(21)** e **(29)** a **(31)** para avaliação enzimática contra as HDACs 1 e 2, alvos deste trabalho, para um *screening* inicial à 1 μM . Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Porcentagem de inibição da atividade das HDACs 1 e 2 a 1 μM

Composto	HDAC -1 (%)	HDAC-2 (%)
 (18)	5	3

(19)  <chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(N)cc2c3ccsc3</chem>	91	71
(20)  <chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(N)cc2c3ccccc3</chem>	96	63
(21)  <chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(N)cc2c3ccc(F)cc3</chem>	96	61
(29)  <chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(N)cc2c3ccc(N)cc3S</chem>	91	44
(30)  <chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(N)cc2c3ccc(N)cc3S</chem>	83	38
(31)  <chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)Nc2ccc(N)cc2c3ccc(N)cc3S</chem>	88	41

Como apresentado nos resultados da modelagem molecular, foi possível sugerir que o modo de interação de todos os compostos seguia um padrão em relação a quais aminoácidos interagiam com as moléculas e o tipo de interação realizada. Em relação à HDAC-2, compostos contendo o núcleo 3,5-dimetilisoxazol apresentavam maior frequência e melhores valores de DS, sendo assim, esperava-se que estes seria o composto com melhor interação com o sítio ativo. Na avaliação enzimática, percebeu-se que o composto **(18)** não foi capaz de inibir nenhuma das enzimas alvo. Buscando-se na literatura, e com dados obtidos em nosso laboratório em trabalhos realizados concomitantemente a este, foi possível entender que heterociclos contendo átomos polares (como o oxigênio e nitrogênio) não se acomodam de forma efetiva no bolsão de 14 Å, o que afeta de forma significativa a atividade dos compostos.

Em relação aos compostos **(19)** a **(21)**, percebeu-se uma similaridade dos resultados obtidos, pois os três compostos foram capazes de inibir a HDAC-1 em porcentagens entre 96 e 91%, e HDAC-2 em porcentagens entre 61 e 71%. Foi possível perceber um indicativo de que os compostos pudessem apresentar seletividade contra a HDAC-1, pois as porcentagens de inibição foram maiores contra esta enzima. Devido ao fato de que até este momento não se ter sido publicada a estrutura cristalográfica da HDAC-1 isolada, não foi possível prever o modo de interação desses compostos no sítio ativo da mesma. Os compostos **(29)** a **(31)** também apresentaram perfis similares de inibição em relação a ambas as enzimas, sendo capazes de inibir a HDAC-1 em porcentagens que variaram entre 83 e 91%, e HDAC-2 em porcentagens entre 38 e 44%. Com esses dados, foi possível perceber que ao estender-se a estrutura dos compostos através da adição do espaçador contendo o átomo de enxofre e um anel aromático, manteve-se a inibição da HDAC-1 em números significativos, ao mesmo tempo em que se obteve maior seletividade desses compostos em relação à mesma.

A partir desses dados, selecionou-se os compostos **(21)** e **(31)** para determinação de IC₅₀ e investigação da seletividade frente às outras classes de HDAC. Selecionou-se tais compostos devido ao fato de que as moléculas contendo tiofeno e fenila são passíveis de metabolismo. O primeiro pode ser oxidado a sulfóxidos e sulfonas, o que poderia diminuir sua meia vida. O mesmo pode ser descrito para o composto contendo o anel fenila, o qual apresenta o hidrogênio na

posição para deste anel como um ponto de metabolismo (hidroxilação, por exemplo). Sendo assim, o flúor do anel 4-fluorofenila atua não apenas para melhorar o modo de interação dos compostos com o sítio ativo, mas também como proteção contra o metabolismo.

As Figuras 32 e 33 apresentam os resultados obtidos na determinação do IC_{50} e os valores de inibição enzimática desses compostos quando avaliados contra as HDACs 3, 6, 8 e 11.

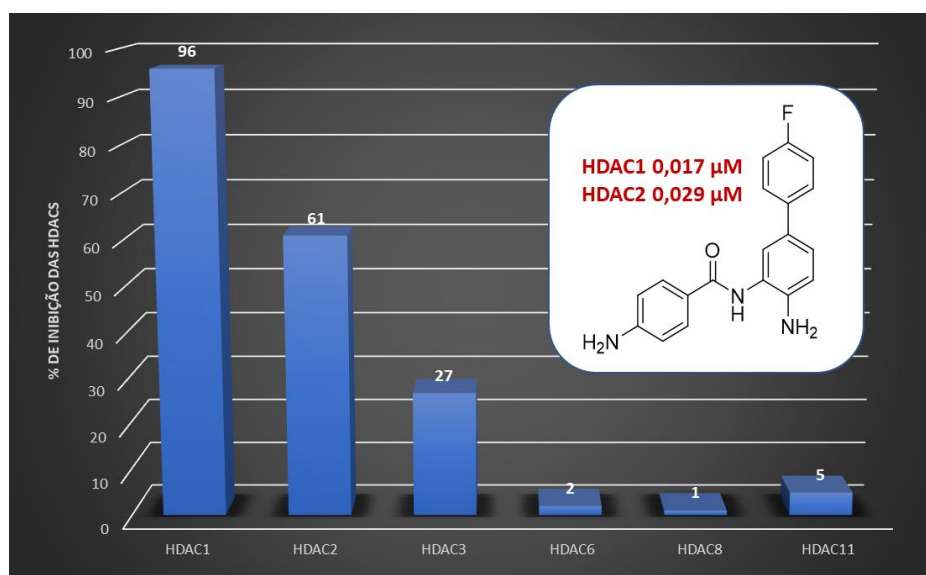


Figura 32. Valor de IC_{50} e porcentagem de inibição enzimática contra as HDACs 1-3, 6, 8 e 11 do composto (21).

Fonte: Própria autora

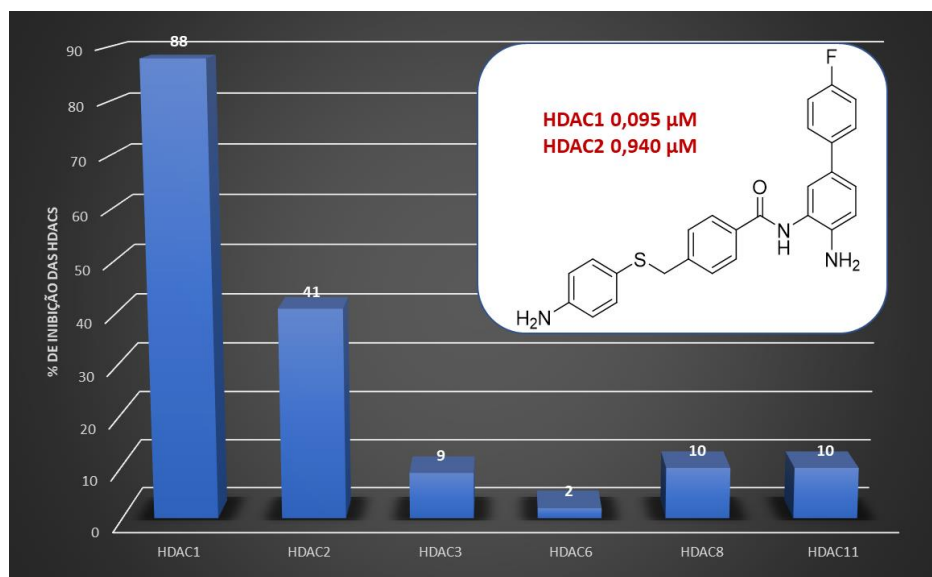


Figura 33. Valor de IC_{50} e porcentagem de inibição enzimática contra as HDACs 1-3, 6, 8 e 11 do composto (31).

Fonte: Própria autora

Foram selecionadas as HDACs 3 e 8 por serem da mesma classe das enzimas alvo deste trabalho, com intuito de mostrar seletividade entre as enzimas de mesma classe. Selecionou-se as HDACs 6 e 11 por serem das classes II e IV das HDACs, respectivamente, com intuito de demonstrar a seletividade dos compostos entre as classes de HDAC.

Como apresentado nas Figuras 32 e 33, o composto (21) apresentou IC_{50} na escala nanomolar, apresentando IC_{50} contra HDAC-1 de 17 nM e contra HDAC-2 de 29 nM. Os dados obtidos confirmam o que se foi visualizado no *screening* inicial desse composto em relação à seletividade contra a HDAC-1, sendo então este composto 1,7 vezes mais seletivo contra HDAC-1 em relação HDAC-2. Além disso, o composto apresentou inibição de 27% contra HDAC-3 a 1 μM, porém não foi capaz de inibir as HDACs 6, 8 e 11 de forma significativa. Pode-se dizer que tal composto apresenta seletividade contra as enzimas alvo deste trabalho.

Em relação ao composto (31) obteve-se valores de IC_{50} contra HDAC-1 de 95 nM e de 940 nM contra HDAC-2. Os dados do *screening* inicial indicavam a seletividade deste composto contra HDAC-1, o que foi comprovado e quantificado com o IC_{50} o qual demonstrou que o composto (31) é, aproximadamente, 10 vezes mais seletivo contra HDAC-1 em relação à HDAC-2. Além disso,

este composto não foi capaz de inibir as demais HDACs de forma significativa, o que demonstra a obtenção de um composto seletivo quanto às diferentes classes de HDACs, seletivo em relação à sua classe de HDACs e também em relação às duas enzimas alvo deste trabalho. É interessante perceber que a molécula **(31)** apresentou valores de IC_{50} menos promissores quando comparados aos da molécula **(21)**. Os dados de modelagem molecular mostraram que os compostos **(29)** a **(31)** apresentavam ponto adicionais de interação com o sítio ativo da HDAC-2, sendo assim, esperava-se que estes compostos apresentassem melhores modos de interação com o sítio ativo.

Para um melhor entendimento dos dados descritos em relação à inibição enzimática, uma das perspectivas deste trabalho é a realização do estudo de dinâmica molecular com todos os compostos avaliados.

As HDACs 1 e 2, como já discutido anteriormente, apresentam um alto índice de identidade e similaridade, o que torna difícil a obtenção de compostos seletivos em relação à uma delas. Além disso, ainda não se é muito claro na literatura os papéis individuais de cada uma dessas enzimas na epigenética, o que tornam os nossos compostos interessantes para tais estudos.

Em relação à anemia falciforme, os compostos publicados até o momento para indução de γ -globina utilizando-se da inibição das HDACs não apresentam grande diferença nos IC_{50} entre HDAC-1 e HDAC-2 ou, pelo menos, não tão significativa quanto o que foi obtido neste trabalho. Sendo assim, utilizou-se os compostos **(21)** e **(31)** nos estudos de indução de gama-globina utilizando-se as células K562, como será discutido a seguir.

5.4. Avaliação da viabilidade celular e números de células viáveis, e indução de gama-globina pelos inibidores de HDAC em K562

Esse ensaio foi realizado com $N=1$. Após o tratamento das células K562 com três concentrações diferentes dos compostos (0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M) e durante três tempos diferentes (48, 72 e 96 h), foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer. As Figuras 34 e 35 apresentam o número de células viáveis e a viabilidade celular de acordo com a concentração e o tempo de tratamento de cada composto.

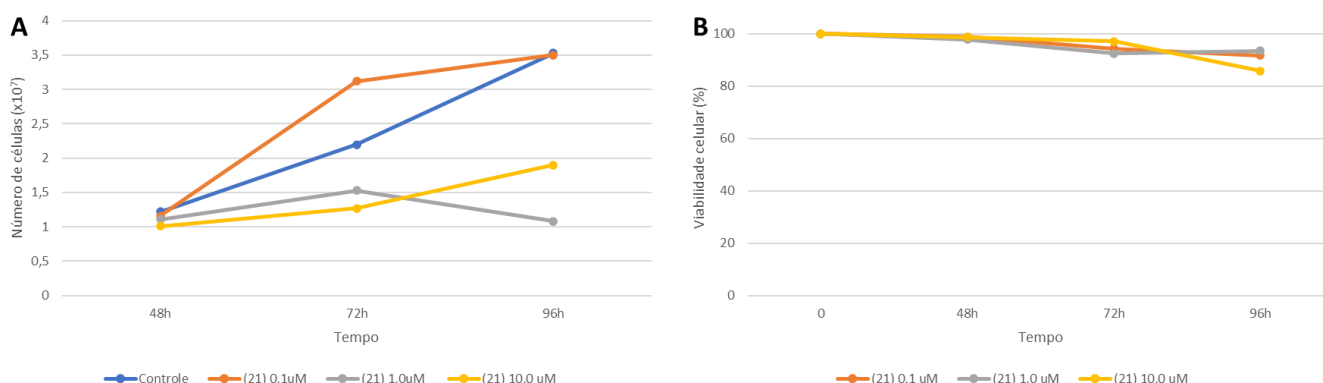


Figura 34. Número de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) após tratamento com composto (21) – (N=1)

Fonte: Própria autora

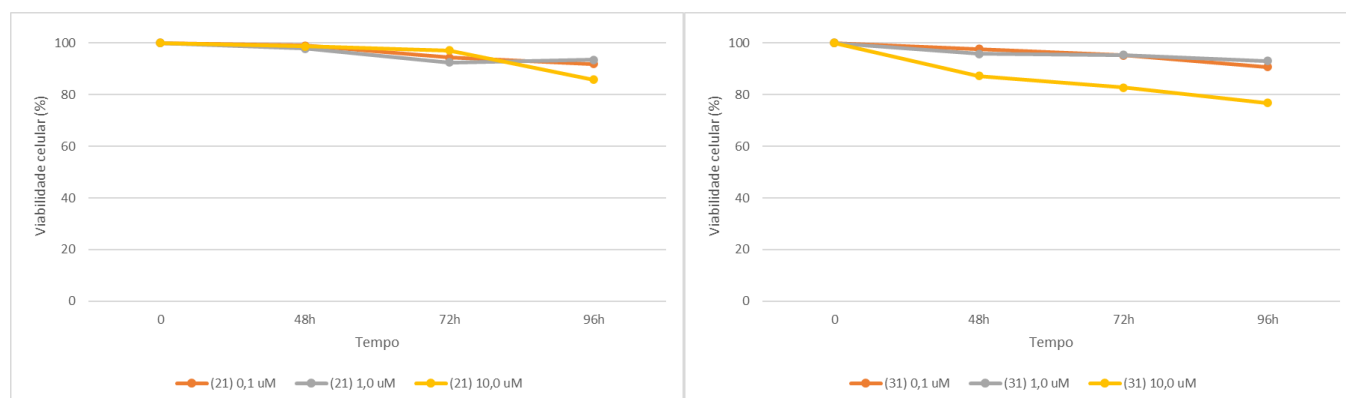


Figura 35. Número de células viáveis (A) e viabilidade celular (B) após tratamento com composto (31) – (N=1)

Fonte: Própria autora

Foi possível perceber que o composto (21) na concentração de 0,1 μ M aumenta a proliferação celular no tempo de 72 h, apresentando maior número de células quando comparado ao controle. No tempo de 96 h, tanto o controle quanto o composto (21) à 0,1 μ M apresentam número de células próximos, o que pode ser explicado pela falta de nutrientes para a continuação da proliferação celular, tendo em vista que o meio de cultura (DMEM) originalmente de coloração rosa/vermelho já se apresentava com tonalidade laranja/amarelo devido à mudança expressiva no pH. As concentrações de 1,0 μ M e 10 μ M apresentaram menores níveis de proliferação celular

quando comparados ao controle nos tempos de 72 e 96 h, sendo necessários ensaios adicionais para determinação do mecanismo pelo qual isso ocorre (citostático ou citotóxico). Analisando-se a viabilidade celular, a qual leva em consideração o número de células vivas e mortas contadas na câmara de Neubauer, todas as concentrações e períodos mantiveram as porcentagens de células viáveis acima de 80%.

Em relação ao composto **(31)**, na concentração de 0,1 μM em 72 h observou-se que o número de células viáveis era similar ao do controle. As concentrações de 1,0 e 10,0 μM apresentaram número de células viáveis nos tempos de 72 e 96 h menores do que os do controle, sendo necessários ensaios adicionais para determinação do mecanismo pelo qual isso ocorre (citostático ou citotóxico). Em relação à viabilidade celular, as concentrações de 0,1 e 1,0 μM apresentaram porcentagem de células viáveis acima de 80% e a concentração de 10,0 μM apresentou porcentagem de células viáveis pouco abaixo de 80%.

As Figuras 36 e 37 apresentam os gráficos da expressão de γ -globina após tratamento das células K562 com os compostos **(21)** e **(31)**.

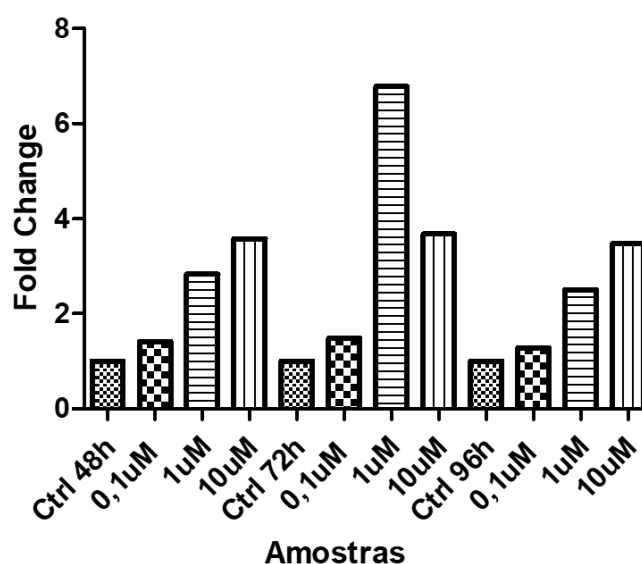


Figura 36. Expressão de γ -globina pós-tratamento com composto **(21)**

Fonte: Própria autora

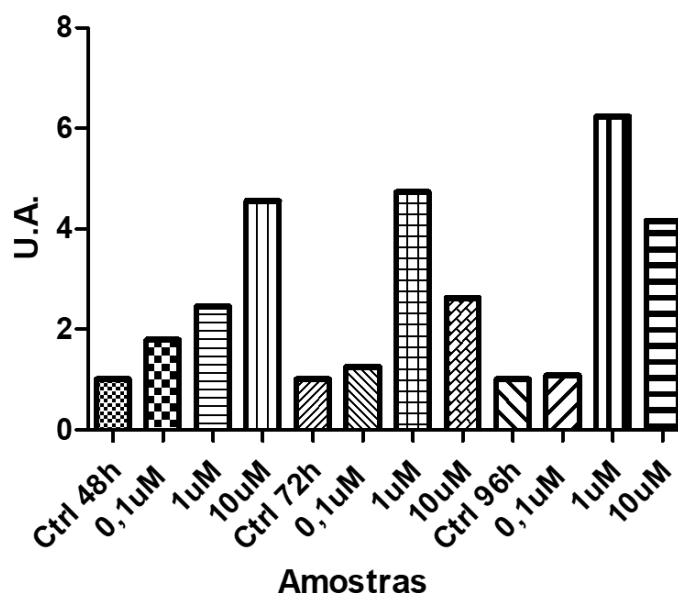


Figura 37. Expressão de γ -globina pós-tratamento com composto (31)

Fonte: Própria autora

Os tempos e concentrações dos tratamentos foram escolhidos baseando-se nos dados publicados previamente na literatura (BRADNER, 2010). Para ambos os compostos, a concentração de 0,1 μ M não foi capaz de aumentar a expressão de γ -globina de forma significativa em nenhum dos tempos de tratamentos avaliados. Aparentemente, essa concentração é capaz de alterar as taxas de proliferação da K562, porém não altera a expressão gênica da γ -globina.

A concentração de 1 μ M para ambos os compostos foi a responsável pelas maiores taxas de indução da expressão de γ -globina. O composto (21) com tempo de tratamento de 72 h aumentou as taxas de γ -globina em, aproximadamente, 7 vezes, enquanto o composto (31) com tempo de tratamento de 96 h aumentou as taxas de γ -globina em, aproximadamente, 6 vezes. Vale lembrar que o composto (31) apresenta significativa seletividade em relação à HDAC-1, porém sua atividade é menor quando comparada ao composto (21). O IC_{50} do composto (21) contra HDAC-1 é de 17 nM enquanto do composto (31) é de 95 nM, ou seja, o composto (21) é,

aproximadamente, 5 vezes mais ativo contra HDAC-1 do que o composto (**31**). Além disso, apesar da atividade do composto (**31**) contra a HDAC-2 não ter sido tão promissora quanto o composto (**21**), ainda se viu um efeito de indução de γ -globina similar ao do (**21**), sendo a única diferença entre eles o tempo de tratamento.

A concentração de 10 μ M em ambos os casos resultou em indução da expressão gênica da γ -globina com taxas similares (3-4 vezes) em todos os tempos de tratamento. Além disso, a viabilidade celular observada para o composto (**31**) foi a única que chegou a taxas menores do que 80% e, em relação ao composto (**31**), o número de células viáveis se manteve muito parecido no decorrer dos tempos de tratamento, e abaixo do observado para o controle. Sendo assim, pode-se sugerir que essa concentração é capaz de aumentar a taxa da expressão de γ -globina, porém devido ao seu efeito citotóxico não é possível visualizar variações durante os tempos de tratamento.

5.5. Síntese das PROTACs

O mecanismo da reação de obtenção dos derivados ftalimídicos é extensivamente descrito na literatura. No caso da obtenção do composto **ARP-01**, de forma geral, a reação inicia-se pelo ataque do par de elétrons do grupamento amino da 3-aminopiperidina-2,6-dione a um dos carbonos carbonílicos do anidrido 3-fluoroftálico resultando na abertura do anel de 5 membros. Posteriormente, o par de elétrons do nitrogênio é responsável por um segundo ataque nucleofílico, dessa vez ao outro carbono carbonílico, resultando na eliminação de uma molécula de água e o fechamento do anel.

O composto **ARP-01** foi obtido como um sólido de coloração branca em um alto rendimento (77,7%). A Figura 38 apresenta o esquema do mecanismo dessa reação.

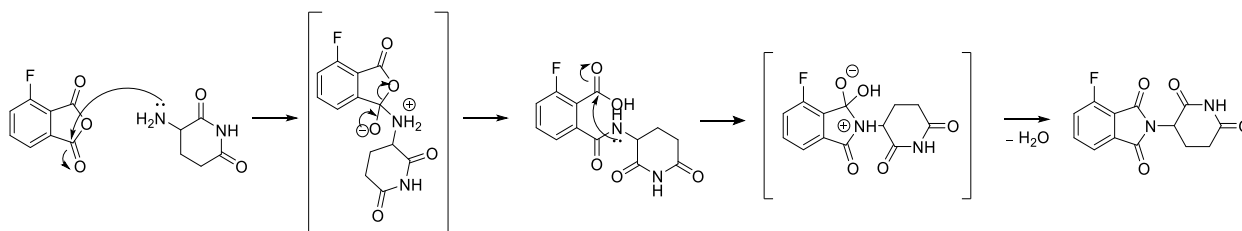
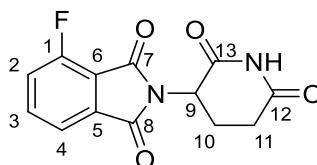


Figura 38. Mecanismo da reação de obtenção do composto **ARP-01**

Fonte: Própria autora

A Tabela 16 apresenta os deslocamentos químicos visualizados nos espectros de ^1H e ^{13}C para o composto **ARP-01**.

Tabela 16. Deslocamento químico e constantes de acoplamento do composto **ARP-01**.



	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	156.8 (d, $J=262.5\text{Hz}$)
2	7.73 (dd, $J=8.4\text{Hz}$, 1H)	123.00 (d, $J=19.5\text{Hz}$)
3	7.95 (ddd, $J=8.4$, 7.4, 4.6Hz, 1H)	138.05 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
4	7.79 (d, $J=7.4\text{Hz}$, 1H)	120.04 (d, $J=3.2\text{Hz}$)
5	-	133.45 (d, $J=1.3\text{Hz}$)
6	-	117.03 (d, $J=12.6\text{Hz}$)
7	-	166.10
8	-	163.97
9	5.16 (dd, $J=12.9$, 5.4Hz, 1H)	49.09
10	2.55-2.43 (m, 1H) / 2.10-2.03 (m, 1H)	21.84
11	2.89 (ddd, $J=17.1$, 13.9, 5.5Hz, 1H) / 2.64-2.57 (m, 1H)	30.90
12	-	172.73
13	-	169.68

Como visualizado na Tabela 16, os hidrogênios aromáticos H_2 , H_3 e H_4 são visualizados como um duplo duplete, duplo duplo duplete e um duplete em 7.73 ppm, 7.95 ppm e 7.79 ppm, respectivamente. É interessante observar que o duplo duplo duplete do hidrogênio H_3 apresenta três diferentes constantes de acoplamento, sendo duas delas resultantes do acoplamento em *orto* com os hidrogênios H_2 e H_4 (8.4Hz e 7.4Hz) e a terceira sendo do acoplamento com o átomo de flúor da posição 1, sendo esta no valor de 4.6Hz caracterizando o acoplamento em *meta*. O hidrogênio H_9 está ligado à um carbono quiral, sendo assim, acopla de forma diferente com os hidrogênios vizinhos, se apresentando como um duplo duplete com constantes de acoplamento nos valores de 12.9Hz e 5.4Hz. Os quatro hidrogênios do anel glutarimídico (H_{10} e H_{11}), por serem vizinhos à um centro quiral, apresentam-se de forma individual no espectro, sendo visualizados como dois multipletos, um duplo duplo duplete e um multiplete, na região entre 2.03 ppm e 2.89 ppm. Em relação ao RMN de ^{13}C , é possível visualizar que os carbonos aromáticos C_1 ao C_6

apresentam-se como dupletos com constantes de acoplamento variando entre 262.5 Hz e 1.3 Hz, o que se explica pelo fato desses carbonos serem capazes de acoplar com o átomo de flúor da posição 1. Os carbonos alifáticos do anel glutarimídico são visualizados em 21.84 ppm e 30.90 ppm, os quais foram atribuídos de acordo com a análise do RMN HSQC. Os carbonos quaternários das carbonilas C₇, C₈, C₁₂ e C₁₃ são visualizados em 166.10 ppm, 163.97 ppm, 172.73 ppm e 169.68 ppm, e o carbono quiral C₉ é visualizado em 49.09 ppm, devido ao fato de estar próximo a átomos eletronegativos, como os oxigênios das carbonilas e o nitrogênio da ftalimida.

A Figura 39 apresenta o espectro de massas do composto **ARP-01**, onde visualiza-se o pico em 277.0626, referente ao $[M+H]^+$.

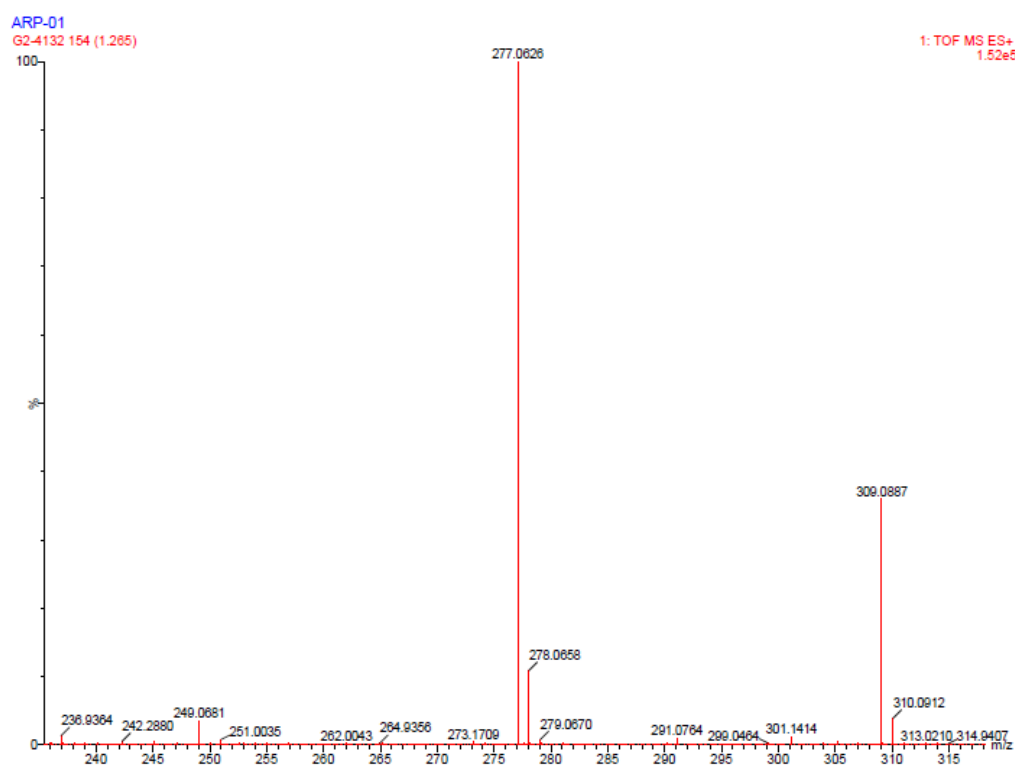


Figura 39. Espectro de massas do composto **ARP-01**

Fonte: Própria autora

Para obtenção dos intermediários **ARP-04**, **ARP-07**, **ARP-16**, **ARP-32** e **ARP-33**, utilizou-se da reação de S_NAr entre o composto **ARP-01** e os respectivos espaçadores. A reação de S_NAr para obtenção dos citados intermediários ocorre através do ataque do par de elétrons do grupamento

amino (oriundo dos espaçadores) ao carbono ligado ao flúor do composto **ARP-01**. Os elétrons são então delocalizados e estabilizados pela carbonila ligada na posição *orto* do anel aromático, caracterizando a etapa de adição da reação. Na sequência, a etapa de eliminação ocorre com a saída do grupo abandonador (flúor), fornecendo os compostos pretendidos. A Figura 40 apresenta um esquema do mecanismo de reação da S_NAr .

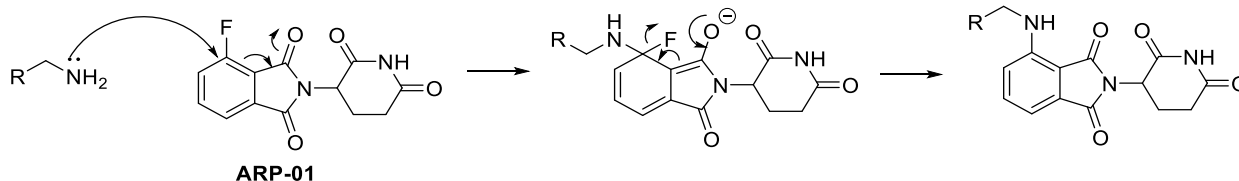


Figura 40. Esquema do mecanismo de reação da S_NAr

Fonte: Própria autora

O intermediário **ARP-04** foi inicialmente sintetizado em meio reacional contendo DMF e DIPEA à 90°C por 24 h, e o produto foi obtido com rendimento de aproximadamente 20%. Percebeu-se que havia dois produtos sendo obtidos nessa reação, sendo um deles o produto de interesse e o outro um subproduto, ambos com rendimentos similares. Buscando-se na literatura, encontrou-se relatos de que o DMF em meio contendo aminas e em altas temperaturas degrada e compete com a S_NAr (BROWNSEY *et al.*, 2021; ZHANG; CHEN, 2016), o que explica a formação do subproduto e o baixo rendimento obtido. A Figura 41 apresenta o espectro de RMN de ^1H que comprova a formação do subproduto. A partir desta informação, o solvente da reação foi trocado por DMSO e obteve-se então rendimentos acima de 60% para todos os intermediários sintetizados.

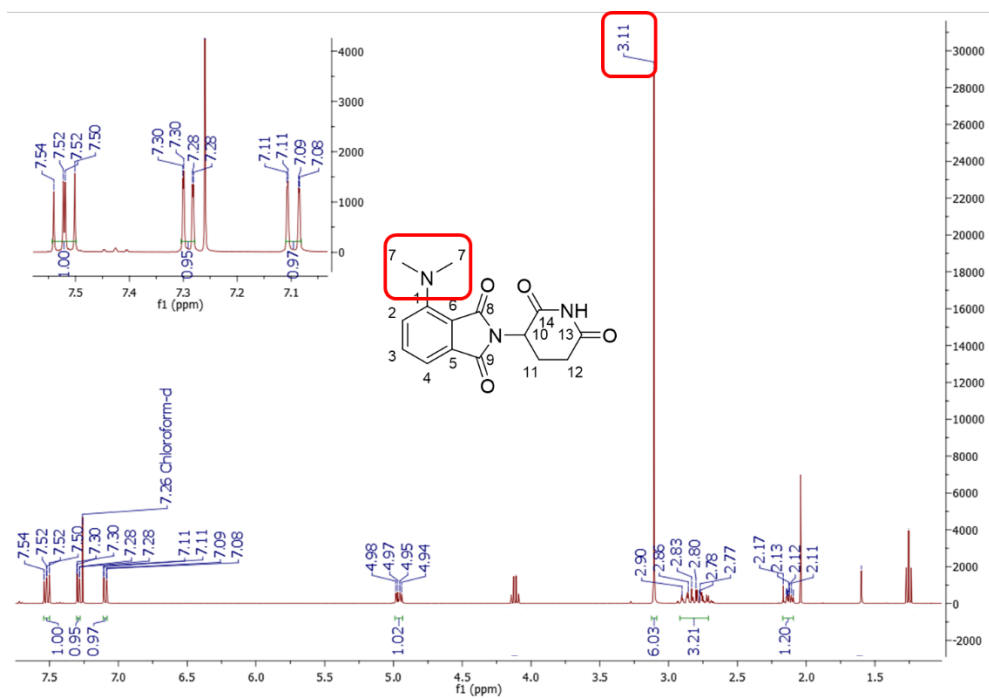
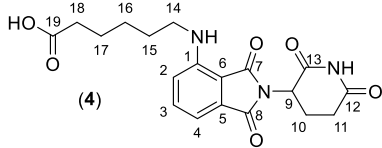
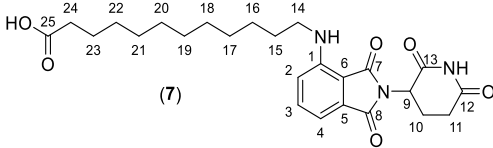
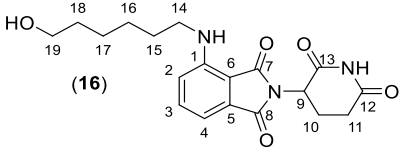


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H do subproduto obtido na $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$

Fonte: Própria autora

A Tabela 17 e 18 apresentam os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos intermediários **ARP-04**, **ARP-07**, **ARP-16**, **ARP-32** e **ARP-33**.

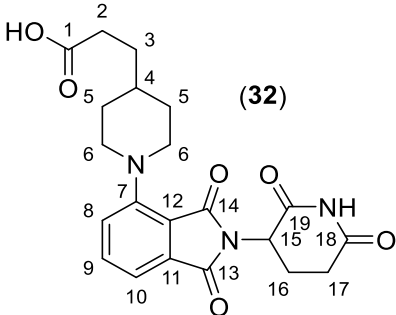
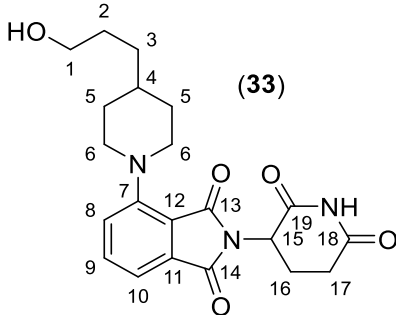
Tabela 17. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-04**, **ARP-07** e **ARP-16**.

	 (4)		 (7)		 (16)	
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	146.44	-	146.44	-	147.14
2	7.08 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	117.18	7.08 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	117.19	7.08 (dd, $J=7.1, 0.5\text{Hz}$, 1H)	111.56
3	7.57 (dd, $J=8.5, 7.2\text{Hz}$, 1H)	136.31	7.57 (dd, $J=8.5, 7.2\text{Hz}$, 1H)	136.27	7.48 (dd, $J=8.1, 7.2\text{Hz}$, 1H)	136.27
4	7.01 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H)	110.38	7.01 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H)	110.36	6.88 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	116.79
5	-	132.22	-	132.19	-	132.63
6	-	109.03	-	109.00	-	110.00
7	-	168.96	-	168.95	-	168.48
8	-	167.34	-	167.31	-	167.76
9	5.04 (dd, $J=12.8, 5.4\text{Hz}$, 1H)	48.54	5.05 (dd, $J=12.9, 5.4\text{Hz}$, 1H)	48.54	4.91 (dd, $J=12.1, 5.4\text{Hz}$, 1H)	49.00
10	2.55-2.51 (m, 1H)	22.18	2.63-2.52 (m, 2H)	22.15	2.92-2.67 (m, 3H)	22.95
	2.06-1.99 (m, 1H)		2.06-1.99 (m, 1H)		2.18-2.09 (m, 1H)	
	2.88 (ddd, $J=17.2, 14.0, 5.4\text{Hz}$, 1H)		2.90-2.81 (m, 1H)		2.92-2.67 (m, 3H)	
11	2.62-2.57 (m, 1H)	31.01	2.63-2.52 (m, 2H)	30.98		31.54
12	-	172.85	-	172.81	-	171.73
13	-	170.14	-	170.09	-	169.97
14	3.25 (dd, $J=13.3, 6.7\text{Hz}$, 2H)	41.76	2.18 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H)	41.83	3.27 (dd, $J=12.7, 7.0\text{Hz}$, 2H)	42.70
15	1.55 (tt, 4H)	28.48	1.47 (dt, $J=12.5, 6.3\text{Hz}$, 2H)	24.49	1.72-1.64 (m, 2H)	29.30
16	1.55 (tt, 4H)	24.29	1.33-1.2 (m, 14H)	29.02-28.51	1.48-1.41 (m, 4H)	25.62
17	1.40-1.30 (m, 2H)	25.93	1.33-1.2 (m, 14H)	29.02-28.51	1.48-1.41 (m, 4H)	26.86
18	2.21 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H)	33.68	1.33-1.2 (m, 14H)	29.02-28.51	1.60-1.55 (m, 2H)	32.68
19	-	174.44	1.33-1.2 (m, 14H)	29.02-28.51	3.65 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 2H)	62.91
20	-	-	1.33-1.2 (m, 14H)	29.02-28.51	-	-
21	-	-	1.33-1.2 (m, 14H)	29.02-28.51	-	-
22	-	-	1.33-1.2 (m, 14H)	29.02-28.51	-	-

23	-	-	1.56 (dt, $J=14.1, 7.1\text{Hz}$, 2H)	28.74	-	-
24	-	-	3.31-3.25 (m, 2H)	33.66	-	-
25	-	-	-	174.51	-	-
13-NH	11.09 (s, 1H)	-	11.08 (s, 1H)	-	8.16 (s, 1H)	-
1-NH	6.53 (t, $J=5.9\text{Hz}$, 1H)	-	6.52 (t, $J=5.9\text{Hz}$, 1H)	-	6.23 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H)	-
COOH	-	-	11.94 (s, 1H)	-	-	-

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos da subunidade ftalimídica dos compostos **ARP-04**, **ARP-07** e **ARP-16** são similares, pois estão localizados em ambientes químicos parecidos. O mesmo é visualizado nos hidrogênios alifáticos H_{10} e H_{11} da subunidade glutarimídica, com exceção da multiplicidade desses hidrogênios no espectro de RMN de ^1H do composto **ARP-16**, o que pode ser explicado devido ao fato de que os RMNs dos compostos **ARP-04** e **ARP-07** foram realizados em DMSO deuterado, enquanto do composto **ARP-16** foi realizado em clorofórmio. Nos três casos é possível visualizar um tripleto em 6.53 ppm, 6.52 ppm e 6.23 ppm integrando para um hidrogênio, correspondente ao grupo 1-NH, assim como é possível perceber que os carbonos aromáticos não mais apresentam constante de acoplamento, o que sugere que o flúor não está mais presente na estrutura, e que a reação ocorreu de forma efetiva. Em relação aos espaçadores, os hidrogênios H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{17} e H_{18} do intermediário **ARP-04** podem ser visualizados como um duplo duplete, tripleto, multiplete e tripleto, integrando para dois hidrogênios, quatro hidrogênios, dois hidrogênios e dois hidrogênios, na região entre 1.30 e 3.25 ppm, enquanto os carbonos C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} e C_{18} são visualizados em 41.76, 28.48, 25.93, 24.29, 33.68 ppm, respectivamente. Para o composto **ARP-07**, apresentando um espaçador com 12 carbonos, é possível visualizar os hidrogênios H_{14} a H_{24} como tripleto, duplo tripleto, multiplete, triplo duplete e multiplete, integrando para dois hidrogênios, dois hidrogênios, quatorze hidrogênios, dois hidrogênios e dois hidrogênios na região entre 1.20 e 3.31 ppm. Devido ao tamanho do espaçador, os hidrogênios e carbonos mais centrais estão sob um ambiente químico muito similar, e de proteção, sendo assim são visualizados como multiplete integrando para quatorze hidrogênios e apresentam-se deslocados mais à direita do espectro e, no caso do espectro de ^{13}C , são visualizados como um “multiplete” na região de 29.02-28.51. A confirmação de que os hidrogênios do espaçador estavam na região citada foi realizada através do espectro de HSQC. A região do espaçador do composto **ARP-16** é similar ao do composto **ARP-04**, porém, o último apresenta um ácido carboxílico em sua extremidade, enquanto o intermediário **ARP-16** apresenta uma hidroxila. Tal troca de grupos funcionais resulta na visualização do hidrogênio H_{19} como um tripleto em 3.65 ppm integrando para dois hidrogênios, e o carbono C_{19} está agora em 62.91 ppm, e não mais na região de carbonilas.

Tabela 18. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-32** e **ARP-33**.

			
δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	3.66 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H)	63.29
2	2.43 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H)	1.68-1.58 (m, 2H)	30.04
3	1.68 (dd, $J=12.7$, 7.5Hz, 2H)	1.38 (dd, $J=6.5$, 4.5Hz, 2H)	32.64
4	1.50 (s, 3H)	1.54-1.44 (m, 3H)	35.47
5	1.84 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H)/1.50 (s, 3H)	1.84 (d, $J=9.5\text{Hz}$, 2H)/1.54-1.44 (m, 3H)	32.50/32.48
6	3.73 (t, $J=10.4\text{Hz}$, 2H)/2.92-2.69 (m, 5H)	3.74 (t, $J=10.2\text{Hz}$, 2H)/2.93-2.67 (m, 5H)	52.28/51.94
7	-	-	150.99
8	7.36 (dd, $J=7.1\text{Hz}$, 1H)	7.35 (dd, $J=7.1\text{Hz}$, 1H)	115.48
9	7.56 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	7.55 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	135.64
10	7.16 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H)	7.17 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)	123.80
11	-	-	134.26
12	-	-	117.34
13	-	-	166.83
14	-	-	167.57
15	4.96 (dd, $J=12.3$, 5.3Hz, 1H)	4.96 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.23
16	2.92-2.69 (m, 5H)/2.15-2.07 (m, 1H)	2.93-2.67 (m, 5H)/2.16-2.06 (m, 1H)	22.82
17	2.92-2.69 (m, 5H)	2.93-2.67 (m, 5H)	31.08
18	-	-	171.40
19	-	-	168.57
18-NH	8.39 (s, 1H)	8.13 (s, 1H)	-

Como apresentado na Tabela 18, os hidrogênios aromáticos H_8 , H_9 e H_{10} dos compostos **ARP-32** e **ARP-33** são visualizados como duplo duplete, duplo duplete e duplete, respectivamente, entre 7.56 ppm e 7.16 ppm, integrando para um hidrogênio. O hidrogênio H_{15} , ligado ao carbono quiral, em ambos os casos é visualizado como um duplo duplete em 4.96 ppm integrando para um hidrogênio e com constantes de acoplamento de 12.3 Hz e 5.4 Hz. Os hidrogênios da subunidade glutarimídica H_{16} e H_{17} são visualizados como dois multipletos nas regiões de 2.93-

2.69 ppm e 2.16-2.06 ppm. Devido à similaridade estrutural dos espaçadores, o hidrogênio H₄ é visualizado na região de 1.50 ppm, confirmado através da análise do espectro de COSY. Os hidrogênios H₅ e H₆, apesar de enumerados como sendo simétricos, são visualizados individualmente no espectro de ¹H e ¹³C, devido a sua conformação cadeira/barco, a qual influencia de forma diferente o ambiente químico de cada um dos hidrogênios metilênicos. Sendo assim, os hidrogênios H₅ do composto **ARP-32** são visualizados como um duplete em 1.84 ppm integrando para dois hidrogênios e um simpleto em 1.50 ppm integrando para três hidrogênios. Para o composto **ARP-33**, os mesmos hidrogênios são visualizados como um duplete em 1.84 ppm integrando para dois hidrogênios e um multiplete em 1.54-1.44 ppm integrando para três hidrogênios. Os hidrogênios H₆ são visualizados como um triplete em 3.73 ppm integrando para dois hidrogênios e um multiplete em 2.92-2.69 ppm integrando para cinco hidrogênios em ambos os compostos. Os deslocamentos químicos visualizados no espectro de ¹³C dos carbonos C₅ e C₆ correspondem à 32.11 ppm e 32.55 ppm, e 52.11 e 51.76, respectivamente, para o composto **ARP-32** e 32.50 ppm e 32.48 ppm, e 52.28 e 51.94, respectivamente, para o composto **ARP-33**. A principal diferença do espectro de RMN de ¹H entre os compostos está nos hidrogênios H₁, H₂ e H₃, devido ao fato dos grupamentos funcionais dos compostos serem um ácido carboxílico, no caso do composto **ARP-32**, e um álcool primário, no caso do composto **ARP-33**. Sendo assim, os hidrogênios H₃ do composto **ARP-32** são visualizados como um duplo duplete em 1.68 ppm integrando para dois hidrogênios e os prótons H₂ são visualizados como um triplete em 2.43 ppm integrando para dois hidrogênios, devido ao fato deste último acoplar apenas com os hidrogênios H₃. No caso do composto **ARP-33**, os hidrogênio H₃ são visualizados como um duplo duplete em 1.38 ppm integrando para dois hidrogênios, apresentando-se mais protegido devido ao fato de sofrer menos influência do grupamento álcool; os hidrogênios H₂ apresentam-se como um multiplete em 1.68-1.58 ppm integrando para dois hidrogênios e os prótons H₁ são visualizados como um triplete integrando para dois hidrogênios em 3.66 ppm, em região menos blindada do espectro, devido à influência da hidroxila ligada diretamente ao carbono C₁.

Para obtenção dos compostos **ARP-17** e **ARP-35**, os intermediários **ARP-16** e **ARP-33** foram tratados com brometo de tionila para obtenção dos derivados de brometo de alquila, que então puderam ser utilizados na reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). A Figura 42

apresenta o esquema do mecanismo da reação do composto **ARP-16** com o brometo de tionila para obtenção dos brometos de alquila.

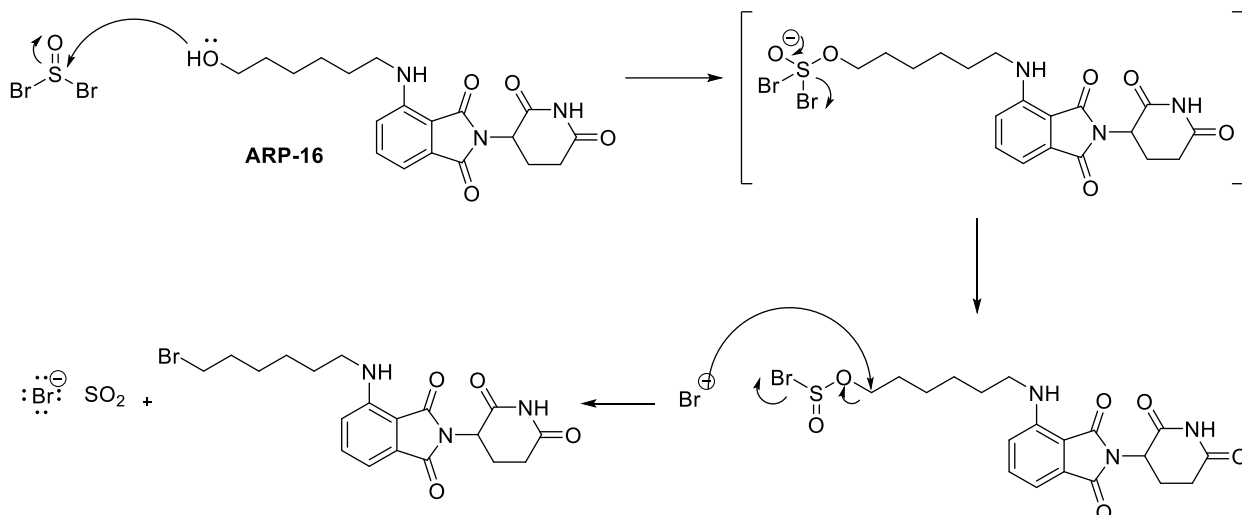


Figura 42. Esquema do mecanismo de reação com brometo de tionila

Fonte: Própria autora

A Tabela 19 apresenta os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-17** e **ARP-35**

Tabela 19. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-17** e **ARP-35**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)		δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
(17)			(35)		
1	-	146.41	1	3.42 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H)	34.07
2	7.09 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	117.19	2	2.94-2.64 (m, 5H)	52.20
3	7.58 (dd, $J=8.5$, 7.2Hz , 1H)	136.28	3	1.93 (dt, $J=12.1$, 5.9Hz , 2H)	30.21
4	7.02 (d, $J=6.7\text{Hz}$, 1H)	110.38	4	1.55-1.43 (m, 5H)	35.05
5	-	132.20	5	1.55-1.43 (m, 5H)	35.03 / 32.38
6	-	109.03	6	3.74 (t, $J=10.1\text{Hz}$, 2H) / 1.86-1.80 (, 2H)	51.87 / 32.40

7	-	168.93	-	151.02
8	-	167.30	7.17 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	123.78
9	5.05 (dd, $J=12.5$, 5.4Hz, 1H)	48.53	7.56 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	135.61
10	2.62-2.52 (m, 2H) / 2.07-1.98 (m, 1H)	22.15	7.36 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H)	115.41
11	2.88 (ddd, $J=17.3$, 14.0, 5.4Hz, 1H) / 2.62-2.52 (m, 2H)	30.97	-	134.27
12	-	172.81	-	117.29
13	-	170.09	-	167.55
14	3.31-3.26 (m, 2H)	41.74	-	166.82
15	1.63-1.53 (m, 2H)	28.50	4.96 9 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.24
16	1.47-1.33 (m, 4H)	25.41	2.94-2.64 (m, 5H) / 2.16-2.07 (m, 1H)	22.83
17	1.47-1.33 (m, 4H)	27.26	2.94-2.64 (m, 5H)	31.55
18	1.85-1.77 (m, 2H)	32.16	-	168.30
19	3.53 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 2H)	35.11	-	171.03
1-NH	6.54 (t, $J=5.9\text{Hz}$, 1H)	-		
13-NH	11.09 (s, 1H)	-		
19-NH	-	-		

O espectro de RMN de ^1H de ambos os compostos apresentam o deslocamento dos hidrogênios H_{19} (**ARP-17**) e H_1 (**ARP-35**) à direita do espectro, região mais protegida, devido à troca da hidroxila pelo átomo de bromo, o qual é menos eletronegativo que o oxigênio. Além disso, a Figura 43 apresenta os espectros de massas de alta resolução dos compostos, onde é possível visualizar o pico referente aos dois isótopos do bromo (^{79}Br e ^{81}Br). Para o composto **ARP-17** visualizam-se os picos 436.0871 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4^{79}\text{Br}$) e 438.0853 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4^{81}\text{Br}$) e para o composto **ARP-35** visualizam-se os picos 462.1025 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4^{79}\text{Br}$) e 464.1009 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4^{81}\text{Br}$).

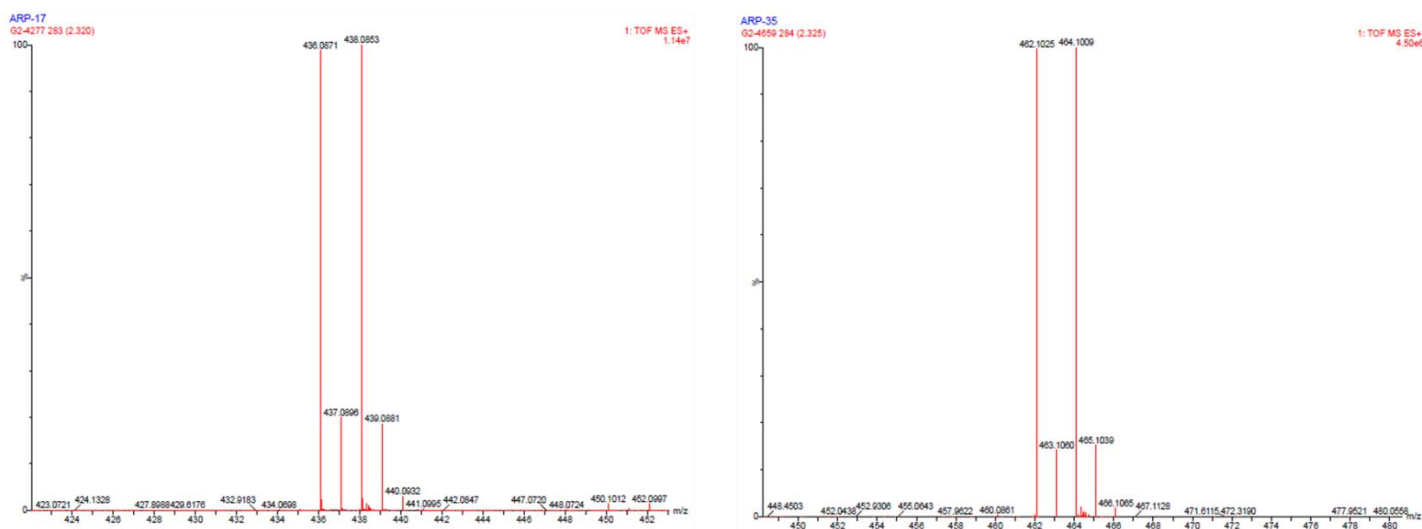
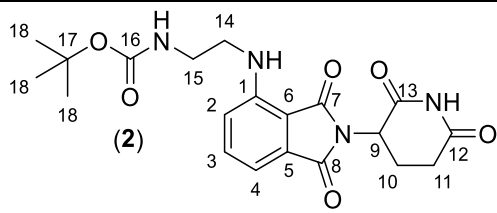
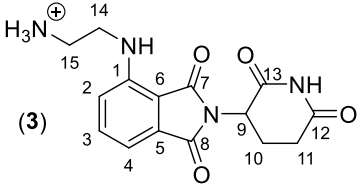
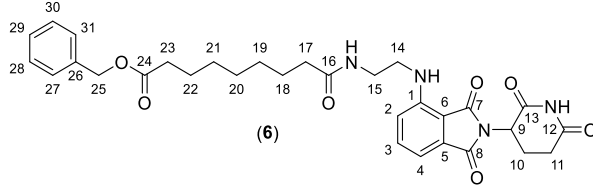


Figura 43. Espectro de massas de alta resolução dos compostos **ARP-17** e **ARP-35**

Fonte: Própria autora

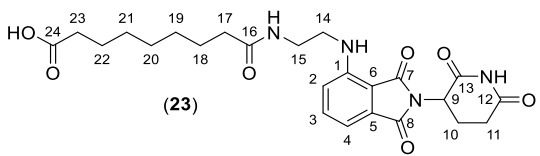
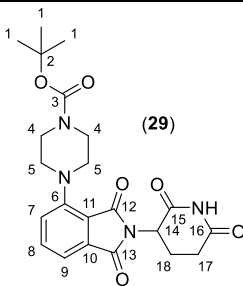
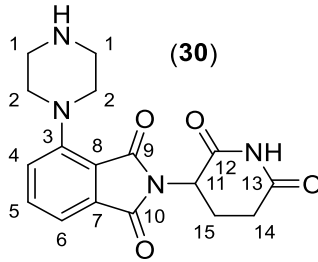
Os intermediários **ARP-23** e **ARP-36** foram sintetizados em uma rota sintética de quatro etapas, como apresentado na seção de metodologia. As Tabelas 20 a 22 apresentam os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-02**, **ARP-03**, **ARP-06**, **ARP-23**, **ARP-29**, **ARP-30**, **ARP-31** e **ARP-36**.

Tabela 20. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-02**, **ARP-03** e **ARP-06**

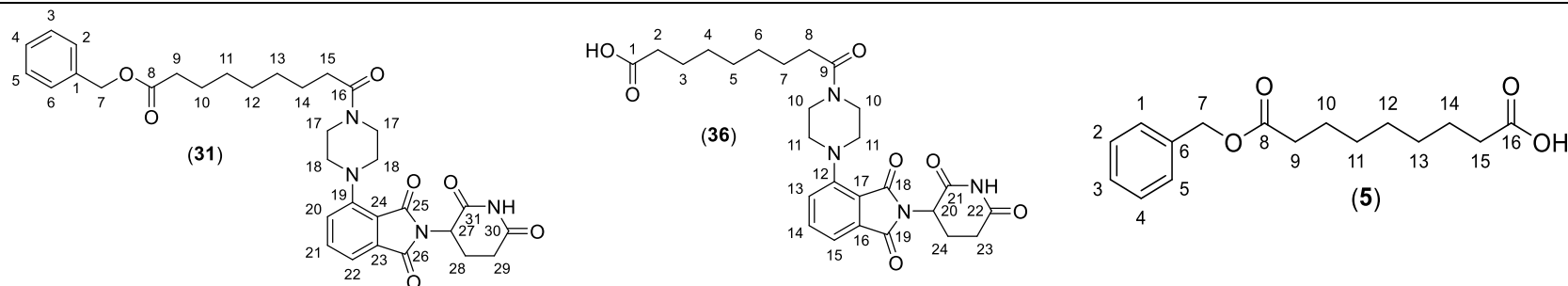
						
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	146.40	-	145.85	-	148.12
2	7.03-6.99 (m, 2H)	110.49	7.08 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H)	111.05	7.06 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H)	112.08
3	7.57 (dd, $J=8.3$, 7.3Hz, 1H)	136.17	7.61 (dd, $J=8.5$, 7.1Hz, 1H)	136.32	7.55 (dd, $J=8.5$, 7.1Hz, 1H)	137.22
4	7.14 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	117.07	7.26 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	117.34	7.13 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	118.01
5	-	132.22	-	132.29	-	133.96
6	-	109.23	-	110.02	-	111.42
7	-	167.30	-	167.29	-	169.27
8	-	168.71	-	168.60	-	170.56
9	5.05 (dd, $J=12.8$, 5.4Hz, 1H)	48.51	5.06 (dd, $J=12.8$, 5.4Hz, 1H)	48.57	5.06 (dd, $J=12.5$, 5.4Hz, 1H)	50.18
10	2.63-2.52 (m, 2H) / 2.06-1.97 (m, 1H)	22.17	2.63-2.52 (m, 2H) 2.08-1.99 (m, 1H)	22.20	2.79-2.69 (m, 2H) 2.14-2.05 (m, 1H)	23.79
11	2.89 (ddd, $J=17.2$, 13.9, 5.4Hz, 1H)/2.63-2.52 (m, 2H)	30.97	2.91-2.84 (m, 1H) 2.63-2.52 (m, 2H)	31.00	2.91-2.81 (m, 1H) 2.79-2.69 (m, 2H)	32.20
12	-	172.81	-	172.86	-	175.24
13	-	170.06	-	170.1	-	174.66
14	3.36 (q, $J=6.2\text{Hz}$, 2H)	41.57	3.63 (q, $J=6.2\text{Hz}$, 2H)	37.66	3.51-3.46 (m, 2H)	42.74
15	3.12 (q, $J=6.2\text{Hz}$, 2H)	39.61	2.97 (dd, $J=6.2\text{Hz}$, 2H)	-	3.45-3.41 (m, 2H)	39.76
16	-	155.88	-	-	-	176.85
17	-	77.78	-	-	2.17 (m, 2H)	37.03
18	1.36 (s, 9H)	28.20	-	-	1.64-1.54 (m, 4H)	25.95
19	-	-	-	-	1.31-1.25 (m, 6H)	29.93
20	-	-	-	-	1.31-1.25 (m, 6H)	29.93
21	-	-	-	-	1.31-1.25 (m, 6H)	29.93

22	-	-	-	-	1.64-1.54 (m, 4H)	26.83
23	-	-	-	-	2.35 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H)	35.00
24	-	-	-	-	-	171.55
25	-	-	-	-	5.11 (s, 2H)	67.11
26	-	-	-	-	-	137.74
27	-	-	-	-	7.38-7.29 (m, 5H)	129.18
28	-	-	-	-	7.38-7.29 (m, 5H)	129.53
29	-	-	-	-	7.38-7.29 (m, 5H)	129.18
30	-	-	-	-	7.38-7.29 (m, 5H)	129.53
31	-	-	-	-	7.38-7.29 (m, 5H)	129.18
1-NH	6.71 (t, $J=6.1\text{Hz}$, 1H)	-	6.83 (t, $J=6.3\text{Hz}$, 1H)	-	6.61 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H)	-
13-NH	11.08 (s, 1H)	-	11.10 (s, 1H)	-	-	-
15-NH	7.03-6.99 (m, 2H)	-	8.17 (s, 3H) – NH_3^+	-	-	-

Tabela 21. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-23**, **ARP-29** e **ARP-30**

						
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	146.42	1.48 (s, 9H)	28.57	3.23-3.16 (m, 4H)	51.93
2	7.02 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 1H)	110.59	-	80.20	2.92-2.82 (m, 5H)	45.53
3	7.58 (dd, $J=8.5$, 7.2Hz, 1H)	136.24	-	154.89	-	150.33
4	7.16 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H)	117.20	3.65 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 4H)	51.42	7.35-7.31 (m, 2H)	123.62
5	-	109.26	3.28 (dd, $J=4.4\text{Hz}$, 4H)	43.40	7.69 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	135.83
6	-	132.23	-	150.45	7.35-7.31 (m, 2H)	114.58
7	-	167.35	7.16 (d, $J=8.4$, 0.6Hz, 1H)	123.54	-	133.71
8	-	168.74	7.61 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	135.91	-	116.36
9	5.04 (dd, $J=12.8$, 5.4Hz, 1H)	48.56	7.43 (d, $J=7.2$, 0.7Hz, 1H)	116.34	-	167.08
10	2.63-2.52 (m, 2H) / 2.06-1.98 (m, 3H)	22.22	-	134.31	-	166.28
11	2.88 (ddd, $J=16.9$, 13.9, 4.4Hz, 1H) / 2.63-2.52 (m, 2H)	31.01	-	118.05	5.09 (dd, $J=12.9$, 5.4Hz, 1H)	48.77
12	-	172.86	-	166.72	-	170.02
13	-	171.87	-	167.37	-	172.80
14	-	41.52	4.96 (dd, $J=12.4$, 5.3Hz, 1H)	49.33	2.92-2.82 (m, 5H) / 2.63-2.53 (m, 2H)	30.95
15	-	-	-	168.20	2.63-2.53 (m, 2H) / 2.06-1.98 (m, 1H)	22.05
16	-	174.67	-	170.91	-	-
17	2.15 (t, $J=7.4$, 2H)	33.86	2.94-2.67 (m, 3H)	31.56	-	-

18	1.54-1.38 (m, 4H)	24.57	2.94-2.67 (, 3H) /2.13 (tdd, $J=11.93, 4.5, 1.7\text{Hz}$, 1H)	22.81	-	-
19	1.21 (s, 6H)	28.53	-	-	-	-
20	1.21 (s, 6H)	28.48	-	-	-	-
21	1.21 (s, 6H)	28.53	-	-	-	-
22	1.54-1.38 (m, 4H)	25.18	-	-	-	-
23	2.06-1.98 (m, 3H)	35.40	-	-	-	-
24	-	170.11	-	-	-	-
1-NH	6.70 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H)	-	-	-	-	-
13-NH	-	-	-	-	11.09 (s, 1H)	-
15-NH	8.00 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H)	-	8.03 (s, 1H)	-	-	-

Tabela 22. Deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-31**, **ARP-36** e **ARP-05**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	136.24	-	170.86	7.40-7.30 (m, 5H)	128.34
2	7.39-7.29 (m, 5H)	128.68	2.34 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H)	32.26	7.40-7.30 (m, 5H)	128.69
3	7.39-7.29 (m, 5H)	128.30	1.55-1.44 (m, 4H)	24.77	7.40-7.30 (m, 5H)	128.34
4	7.39-7.29 (m, 5H)	128.68	1.31-1.23 (m, 6H)	28.67	7.40-7.30 (m, 5H)	128.69
5	7.39-7.29 (m, 5H)	128.30	1.31-1.23 (m, 6H)	28.54	7.40-7.30 (m, 5H)	128.34
6	7.39-7.29 (m, 5H)	128.68	1.31-1.23 (m, 6H)	28.61	-	136.25
7	5.11 (s, 2H)	66.22	1.55-1.44 (m, 4H)	24.62	5.12 (s, 2H)	66.25
8	-	173.75	2.16 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H)	34.02	-	173.77
9	2.37-3.32 (m, 4H)	34.39	-	174.70	2.34 (td, $J=7.5, 5.7\text{Hz}$, 4H)	34.03
10	1.69-1.59 (m, 4H)	25.35	3.30-3.24 (m, 4H)	50.95 / 50.30	1.63 (m, 4H)	24.99
11	1.39-1.28 (m, 6H)	29.38	3.65-3.63 (m, 4H)	44.95 / 40.90	1.32 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 6H)	28.99
12	1.39-1.28 (m, 6H)	29.08	-	149.46	1.32 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 6H)	28.99
13	1.39-1.28 (m, 6H)	29.16	7.35 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H)	123.88	1.32 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 6H)	28.99
14	1.69-1.59 (m, 4H)	24.99	7.72 (dd, $J=8.3, 7.2\text{Hz}$, 1H)	135.94	1.63 (m, 4H)	24.70
15	2.37-3.32 (m, 4H)	33.42	7.39 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H)	115.22	2.34 (td, $J=7.5, 5.7\text{Hz}$, 4H)	34.40
16	-	171.94	-	133.61	-	179.58
17	3.41-3.24 (m, 4H)	50.45 / 52.16	-	116.91	-	-
18	3.91-3.67 (m, 4H)	41.49 / 45.87	-	167.02	-	-
19	-	150.08	-	166.35	-	-

20	7.16 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)	123.52	5.11 (dd, $J=12.9$, 5.4Hz , 1H)	48.82	-	-
21	7.62 (dd, $J=8.3$, 7.3Hz , 1H)	135.98	-	169.97	-	-
22	7.45 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 1H)	116.56	-	172.80	-	-
23	-	134.28	2.88 (ddd, $J=17.3$, 14.0 , 5.3Hz , 1H) / 2.64-2.53 (m, 2H)	30.95	-	-
24	-	118.17	2.64-2.53 (m, 2H) / 2.07-1.99 (m, 1H)	22.04	-	-
25	-	167.29	-	-	-	-
26	-	166.77	-	-	-	-
27	4.96 (dd, $J=12.3$, 5.3Hz , 1H)	49.35	-	-	-	-
28	2.94-2.68 (m, 3H) / 2.15-2.09 (m, 1H)	22.80	-	-	-	-
29	2.94-2.68 (m, 3H)	31.06	-	-	-	-
30	-	170.95	-	-	-	-
31	-	168.23	-	-	-	-
21-NH	-	-	11.09 (s, 1H)	-	-	-
31-NH	8.14 (s, 1H)	-	-	-	-	-

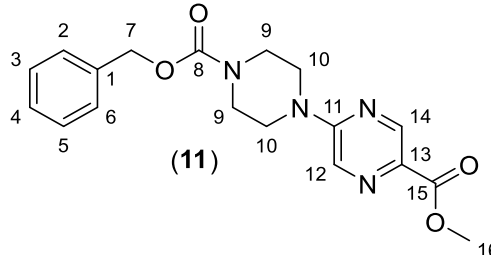
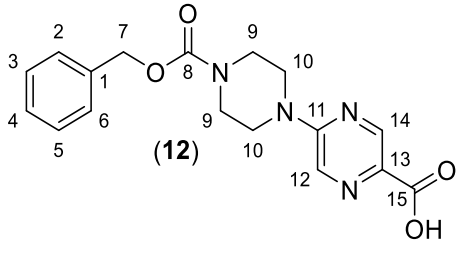
A primeira etapa de reação para obtenção do intermediário **ARP-23** iniciou-se com a S_NAr entre o composto **ARP-01** e o reagente *terc*-butil-N-(2-aminoetilcarbamato) para obtenção da molécula **ARP-02**, o qual pode ser visualizado na Tabela 20 onde seus hidrogênios aromáticos H₂, H₃ e H₄ são vistos como multipletos, duplo duplo e duplo em 7.03-6.99 ppm, 7.57 ppm e 7.14 ppm, respectivamente. Os hidrogênios da subunidade glutarimídica (H₁₀ e H₁₁) são visualizados como multipletos (2.63-2.52 ppm-2H), multipletos (2.06-1.97-1H), duplo duplo duplo (2.89 ppm, $J=17.2, 13.9, 5.4\text{Hz}$, 1H) e multipletos (2.63-2.52 ppm-2H). A região do espaçador é representada pelos hidrogênios H₁₄ e H₁₅ visualizados como quadriplos em 3.36 ppm e 3.12 ppm, respectivamente, ambos integrando para dois hidrogênios, e seus carbonos C₁₄ e C₁₅ são visualizados em 41.57 ppm e 39.61 ppm, respectivamente. O grupamento protetor Boc é visualizado como um simpleto 1.36 ppm integrando para nove hidrogênios, e os carbonos C₁₆, C₁₇ e C₁₈ são visualizados em 155.88 ppm, 77.78 ppm e 28.20 ppm, respectivamente. A etapa seguinte da rota sintética consistiu na clivagem do grupamento Boc, o que pode ser comprovado através da análise dos deslocamentos químicos do composto **ARP-03** onde não se visualiza mais os sinais característicos desse grupo, e há um deslocamento significativo dos hidrogênios H₁₄ e H₁₅ para 3.63 ppm (correlação com 1NH no COSY) e 2.97 ppm (correlação com 15NH – NH₃⁺ - no COSY) devido à presença do grupamento amino. A rota segue com a reação entre o **ARP-03** e o intermediário **ARP-05** resultando no composto **ARP-06**, onde visualiza-se os hidrogênios H₁₇ a H₂₃ do espaçador entre 2.35 ppm a 1.25 ppm, integrando no total para quatorze hidrogênios. O grupo protetor benzila oriundo do **ARP-05** é visualizado como um simpleto em 5.11 ppm integrando para dois hidrogênios (H₂₅) e um multipletos em 7.38-7.29 ppm, integrando para cinco hidrogênios correspondentes aos hidrogênios aromáticos H₂₇ a H₃₁. Na última etapa esse grupo protetor é clivado para obtenção do intermediário chave **ARP-23** (Tabela 21), onde não se visualiza mais os sinais do grupo protetor benzila.

A rota sintética de obtenção do intermediário **ARP-36** foi a mesma utilizada para obtenção do **ARP-23**, e suas estruturas apresentam alta similaridade. Sendo assim, a discussão de RMN será baseada apenas na região do espaçador que as difere. A primeira etapa da rota sintética foi para obtenção do intermediário **ARP-29**, sendo obtido através da S_NAr entre o composto **ARP-01** e o Boc-piperazina. Os hidrogênios H₄ e H₅ do anel piperazínico são visualizados como um tripleto e

um duplo duplete em 3.65 ppm e 3.28 ppm, respectivamente, ambos integrando para quatro hidrogênios, e os carbonos C₄ e C₅ são visualizados em 51.42 ppm e 43.40 ppm, respectivamente. O grupo protetor Boc é visualizado como um simpleto em 1.48 ppm integrando para nove hidrogênios. A etapa seguinte consistiu na clivagem do grupamento Boc, o qual não é mais visualizado no espectro de RMN de ¹H do intermediário **ARP-30**, e os hidrogênios piperazínicos deslocam no espectro, sendo agora visualizados como multipletos em 3.23-3.16 ppm e 2.92-2.82 ppm. Segue-se com o acoplamento desse intermediário com o **ARP-05**, resultando no intermediário **ARP-31**, onde os hidrogênios H₉ a H₁₅ da cadeia carbônica alifática são visualizados entre 3.32 e 1.28 ppm, somando-se quatorze hidrogênios, e os hidrogênios aromáticos do grupo benzila são visualizados como um multiplete em 7.39-7.29 ppm integrando para cinco hidrogênios, os quais não são mais visualizados no espectro de RMN de ¹H do intermediário **ARP-36**, caracterizando a clivagem do grupo protetor e a obtenção do intermediário chave.

As subunidades dos inibidores de HDAC (**ARP-14** e **ARP-45**) foram sintetizados em três e cinco etapas, respectivamente. Iniciou-se as rotas sintéticas através da síntese do intermediário **ARP-12**, o qual seria comum para ambas as subunidades. A Tabela 23 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ¹H e ¹³C dos intermediários **ARP-11** e **ARP-12**.

Tabela 23. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ¹H e ¹³C dos intermediários **ARP-11** e **ARP-12**.

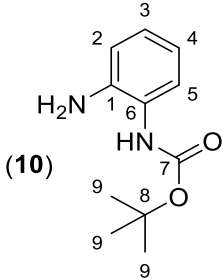
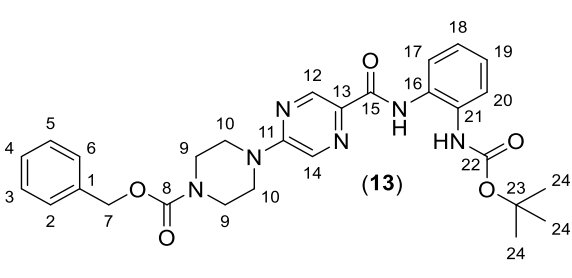
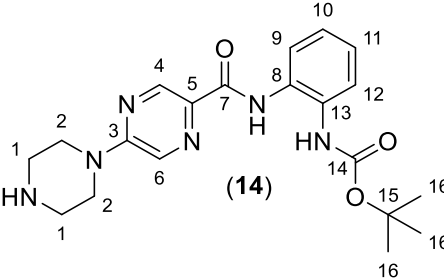
			
δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	-	-	136.45
2	7.38-7.30 (m, 5H)	7.41-7.31 (m, 5H)	128.18
3	7.38-7.30 (m, 5H)	7.41-7.31 (m, 5H)	128.71
4	7.38-7.30 (m, 5H)	7.41-7.31 (m, 5H)	128.38
5	7.38-7.30 (m, 5H)	7.41-7.31 (m, 5H)	128.71
6	7.38-7.30 (m, 5H)	7.41-7.31 (m, 5H)	128.18
7	5.17 (s, 2H)	5.12 (s, 2H)	67.67

8	-	155.28	-	154.53
9	3.79-3.74 (m, 4H)	43.34	3.80-3.73 (m, 4H)	43.38
10	3.66 (dd, $J=6.5, 3.9\text{Hz}$, 4H)	44.04	3.54 (s, 4H)	42.84
11	-	155.06	-	154.48
12	8.13 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	129.46	8.35 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H)	130.93
13	-	131.51	-	130.29
14	8.80 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	145.35	8.66 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H)	144.34
15	-	165.17	-	165.45
16	3.95 (s, 3H)	52.49	12.72 (s, 1H)	-

É possível visualizar na Tabela 23 os hidrogênios H₂ a H₆ do composto **ARP-11** correspondentes ao anel aromático do grupo protetor Cbz como um multiplete em 7.38-7.30 ppm integrando para cinco hidrogênios, e o hidrogênio H₇ visualizado como um simpleto em 5.17 ppm integrando para dois hidrogênios. Os hidrogênios piperazínicos H₉ e H₁₀ são visualizados como um multiplete e um duplo duplete em 3.79-3.74 ppm e 3.66 ppm, respectivamente, ambos integrando para quatro hidrogênios. Os hidrogênios aromáticos H₁₂ e H₁₄ do anel pirazínico são visualizados como dupletos em 8.13 ppm e 8.80 ppm, respectivamente, integrando para um hidrogênio. O grupamento CH₃ do éster, identificado como H₁₆, é visualizado como um simpleto em 3.95 ppm integrando para três hidrogênios. Em relação ao composto **ARP-12**, é possível visualizar os sinais dos hidrogênios supracitados em regiões similares, porém, como houve a hidrólise básica do grupamento éster, não se visualiza mais os hidrogênios do grupo metila, e houve deslocamento dos hidrogênios H₁₂ e H₁₄ para esquerda e direita do espectro, respectivamente, devido à presença agora do ácido carboxílico.

Para a síntese do composto **ARP-14**, iniciou-se a rota sintética com a proteção de um dos grupamentos amino da o-fenilenodiamina (**ARP-10**), seguido do acoplamento de amida entre os intermediários **ARP-10** e **ARP-12**, resultando no composto **ARP-13**, o qual teve o grupamento Cbz clivado através da hidrogenação catalítica, obtendo-se assim o intermediário chave **ARP-14**. A Tabela 24 apresenta os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ¹H e ¹³C dos intermediários **ARP-10**, **ARP-13** e **ARP-14**.

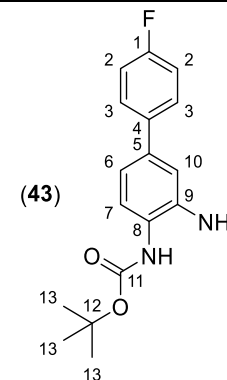
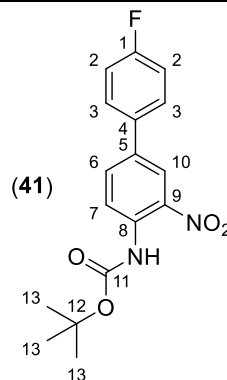
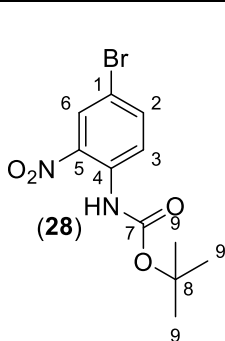
Tabela 24. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos RMNs de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-10**, **ARP-13** e **ARP-14**

						
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	140.06	-	136.78	2.79 (t, 4H)	45.35
2	6.82-6.75 (m, 2H)	117.76	7.41-7.31 (m, 5H)	127.63	3.65 (t, 4H)	45.19
3	7.00 (td, $J=7.6, 1.5\text{Hz}$, 1H)	126.27	7.41-7.31 (m, 5H)	128.45	-	155.33
4	6.82-6.75 (m, 2H)	119.77	7.41-7.31 (m, 5H)	127.91	8.71 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	142.31
5	7.27 (d, 1H)	124.79	7.41-7.31 (m, 5H)	128.45	-	132.15
6	-	124.93	7.41-7.31 (m, 5H)	127.63	8.21 (d, $J=0.9\text{Hz}$, 1H)	128.59
7	-	153.96	5.13 (s, 2H)	66.41	-	161.79
8	-	80.66	-	154.50	-	131.69
9	1.51 (s, 9H)	28.47	3.78 (m, 4H)	43.53	7.27-7.19 (m, 2H)	125.71
10	-	-	3.56 (s, 4H)	42.83	7.13 (td, $J=7.6\text{Hz}$, 1H)	124.53
11	-	-	-	155.08	7.27-7.19 (m, 2H)	125.51
12	-	-	8.75 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	142.15	7.96 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H)	123.57
13	-	-	-	132.32	-	129.54
14	-	-	8.25 (d, $J=0.6\text{Hz}$, 1H)	128.79	-	153.95
15	-	-	-	161.65	-	79.71
16	-	-	-	132.05	1.48 (s, 9H)	28.11
17	-	-	7.26 (dd, $J=7.9\text{Hz}$, 1H)	125.64	-	-
18	-	-	7.13 (td, $J=7.6, 1.5\text{Hz}$, 1H)	124.54	-	-
19	-	-	7.22 (td, $J=7.9, 1.5\text{Hz}$, 1H)	125.45	-	-
20	-	-	7.96 (d, $J=7.4\text{Hz}$, 1H)	123.54	-	-
21	-	-	-	129.56	-	-
22	-	-	-	153.92	-	-

23	-	-	-	79.67	-	-
24	-	-	1.48 (s, 9H)	28.08	-	-
NH_{amida}	-	-	10.00 (s, 1H)	-	9.97 (s, 1H)	-
NH_{Boc}	-	-	9.03 (s, 1H)	-	9.02 (s, 1H)	-

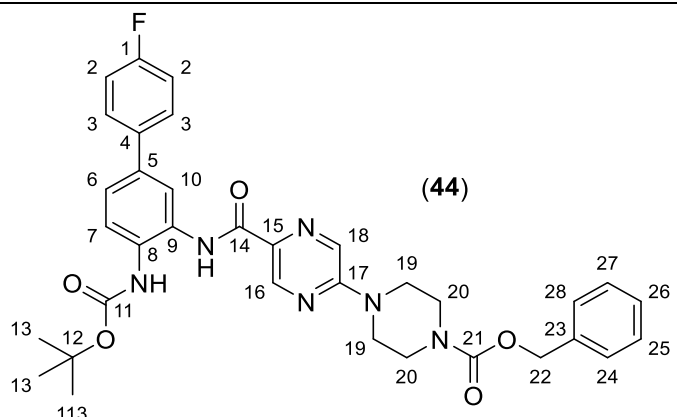
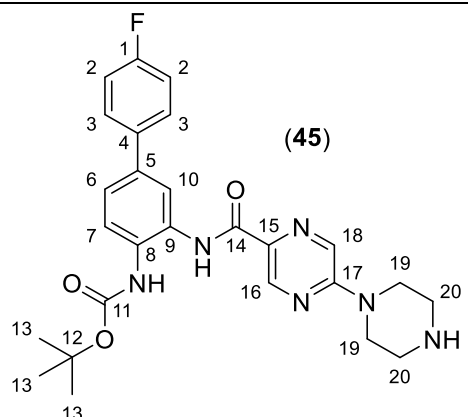
Os hidrogênios aromáticos H₂ a H₅ do composto **ARP-10** são visualizados como multiplete, triplo duplete, multiplete e duplete entre 7.27 e 6.85 ppm, totalizando quatro hidrogênios. O grupo protetor Boc é visualizado como um simpleto em 1.51 ppm integrando para nove hidrogênios, e em seu espectro de RMN de ¹³C visualiza-se o carbono C₉ em 28.47 ppm e o carbono da carbonila (C₇) do carbamato em 153.96 ppm. Em relação ao composto **ARP-13** é possível visualizar o próton da amida como um simpleto em 10.00 ppm integrando para um hidrogênio, enquanto os sinais dos hidrogênios aromáticos H₁₇ a H₂₀ estão deslocados à esquerda do espectro (7.96 a 7.13 ppm), comparando-se com o composto **ARP-10**, devido a presença do grupamento amida que aumenta a desblindagem desses prótons. Os hidrogênios aromáticos H₂ a H₆ do grupo protetor Cbz são visualizados como um multiplete em 7.41-7.31 ppm integrando para cinco hidrogênios e o grupamento CH₂ (H₇ e C₇) é visualizado como um simpleto em 5.13 ppm integrando para dois hidrogênios. Sendo a última etapa a clivagem do grupo Cbz, é possível perceber que o composto **ARP-14** não apresenta os sinais desse grupamento, e os hidrogênios piperazínicos (H₁ e H₂) estão deslocados mais à direita do espectro (3.65 e 2.79 ppm), sugerindo-se o sucesso das reações.

As Tabelas 25 e 26 apresentam os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos intermediários **ARP-28**, **ARP-41**, **ARP-43**, **ARP-44** e **ARP-45**.

Tabela 25. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-28**, **ARP-41**, e **ARP-43**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	113.88	-	162.22 (d, $J=245.4\text{Hz}$)	-	161.50 (d, $J=243.4\text{Hz}$)
2	7.68 (dd, $J=9.2, 1.4\text{Hz}$, 1H)	138.68	7.32 (t, $J=8.9\text{Hz}$, 2H)	115.96 (d, $J=21.5\text{Hz}$)	7.24 (t, $J=8.9, 2\text{H}$)	115.52 (d, $J=21.2\text{Hz}$)
3	8.51 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H)	122.35	7.78 (dd, $J=8.9, 5.4\text{Hz}$, 2H)	128.76 (d, $J=8.3\text{Hz}$)	7.56 (dd, $J=8.9, 5.5\text{Hz}$, 2H)	128.05 (d, $J=8.0\text{Hz}$)
4	-	136.32	-	133.99 (d, $J=3.0\text{Hz}$)	-	135.63
5	-	135.28	-	134.74	-	136.97
6	8.33 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	128.41	7.97 (dd, $J=8.6, 2.3\text{Hz}$, 1H)	131.94	6.80 (dd, $J=8.2, 2.2\text{Hz}$, 1H)	114.71
7	-	152.10	7.73 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H)	124.44	7.30 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	123.42
8	-	82.46	-	131.64	-	124.57
9	1.54 (s, 9H)	28.32	-	141.47	-	141.22
10	-	-	8.17 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H)	122.77	6.95 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	113.65
11	-	-	-	152.40	-	153.56
12	-	-	-	80.60	-	78.80
13	-	-	1.46 (s, 9H)	27.90	1.47 (s, 9H)	28.17
NH₂	-	-	-	-	4.96 (s, 2H)	-
NH_{Boc}	9.60 (s, 1H)	-	9.65 (s, 1H)	-	8.35 (s, 1H)	-

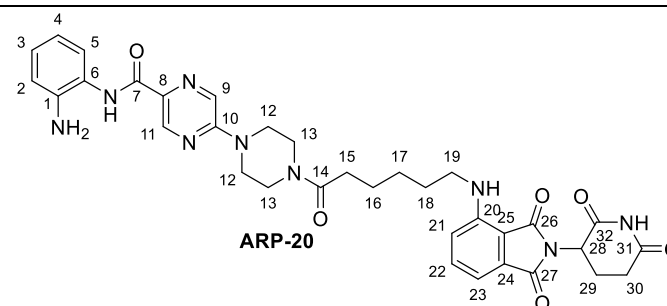
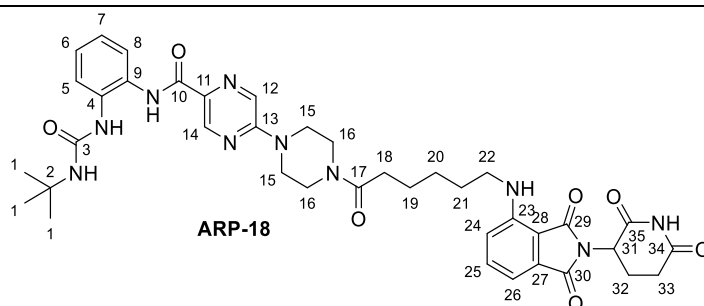
Tabela 26. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos intermediários **ARP-44** e **ARP-45**

 (44)			 (45)		
δ_{H} (ppm)		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)		δ_{C} (ppm)
1	-	161.85 (d, $J=244.8\text{Hz}$)	-	-	161.85 (d, $J=244.5\text{Hz}$)
2	7.44-7.27 (m, 9H)	115.79 (d, $J=21.4\text{Hz}$)	7.30 (t, $J=8.9\text{Hz}$, 2H)	-	115.79 (d, $J=21.4\text{Hz}$)
3	7.68 (dd, $J=8.9$, 5.4Hz , 2H)	128.95 (d, $J=22.8\text{Hz}$)	7.68 (dd, $J=8.8$, 5.4Hz , 2H)	-	128.48 (d, $J=8.2\text{Hz}$)
4	-	136.04 (d, $J=2.9\text{Hz}$)	-	-	136.06 (d, $J=3.0\text{Hz}$)
5	-	136.18	-	-	136.20
6	7.44-7.27 (m, 9H)	125.85	7.42 (dd, $J=8.3$, 2.1Hz , 1H)	-	122.75
7	7.44-7.27 (m, 9H)	122.80	7.35 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H)	-	125.88
8	-	129.67	-	-	128.64
9	-	132.11	-	-	131.76
10	8.23 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H)	121.91	8.24 (s, 2H)	-	121.86
11	-	153.88	-	-	153.88
12	-	79.83	-	-	79.83
13	1.50 (s, 9H)	28.09	1.50 (s, 9H)	-	28.08
14	-	161.87	-	-	161.96
15	-	132.25	-	-	132.20
16	8.76 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	142.24	8.74 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H)	-	142.33
17	-	155.10	-	-	155.27
18	8.27 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	128.83	8.24 (s, 2H)	-	129.02

19	3.57 (m, 4H)	42.90	3.71-3.67 (m, 4H)	44.76
20	3.79 (m, 4H)	43.54	2.88-2.80 (m, 4H)	45.01
21	-	154.50	-	-
22	5.13 (s, 2H)	66.42	-	-
23	-	136.78	-	-
24	7.44-7.27 (m, 9H)	127.64	-	-
25	7.44-7.27 (m, 9H)	128.45	-	-
26	7.44-7.27 (m, 9H)	127.92	-	-
27	7.44-7.27 (m, 9H)	128.45	-	-
28	7.44-7.27 (m, 9H)	127.64	-	-
NH_{amida}	10.08 (s, 1H)	-	10.06 (s, 1H)	-
NH_{Boc}	9.12 (s, 1H)	-	9.11 (s, 1H)	-

Os dados do RMN de ^1H do intermediário **ARP-28** (Tabela 25), visualizam-se os hidrogênios aromáticos H_2 , H_3 e H_6 como duplo duplete, duplete e duplete em 7.68 ppm, 8.51 ppm e 8.33 ppm (1H). A atribuição desses prótons se fez baseando-se nas constantes de acoplamento, onde para o hidrogênio H_2 vê-se a constante em 9.2 e 1.4Hz (*orto* e *meta*), H_3 em 9.2Hz (*orto*) e H_6 em 1.4Hz (*meta*). O simpleto em 1.54 ppm (nove hidrogênios) e os carbonos C_7 , C_8 e C_9 em 152.10 ppm, 82.46 ppm e 28.32 ppm, respectivamente, comprovam o sucesso da reação de proteção. Seguindo-se com a etapa do acoplamento de Suzuki, é possível visualizar no composto **ARP-41** adicionalmente os hidrogênios aromáticos H_2 e H_3 como triplete e duplo duplete, com constantes nos valores de 8.9Hz (*orto*) para o primeiro e 8.9 e 5.4Hz (*orto* e *meta*) para o segundo devido ao acoplamento com o átomo de flúor na posição 1. Os deslocamentos químicos no espectro de ^{13}C caracterizam-se também pelo acoplamento com o átomo de flúor, o que se visualiza através das constantes de acoplamento descritas para os carbonos C_1 a C_4 em que todos os deslocamentos são vistos como dupletos. Em relação ao composto **ARP-43** é possível visualizar um deslocamento significativo dos hidrogênios aromáticos H_6 , H_7 e H_{10} à direita do espectro, região de maior blindagem, devido à redução do grupamento nitro à grupamento amino. A Tabela 26 apresenta os deslocamentos químicos do composto **ARP-44**, onde se é possível visualizar os hidrogênios e carbonos característicos do grupo pirazina e piperazina (H_{16} a H_{20}), sendo estes: duplete (8.6 ppm – 1H), duplete (8.27 ppm – 1H), simpleto (3.57 ppm – 4H) e triplete (3.79 ppm – 4H). Visualiza-se também o próton do grupamento amida como um simpleto em 10.08 ppm integrando para um hidrogênio, e o carbono da carbonila em 161.87 ppm. O grupamento Cbz é visualizado como um multiplete em 7.44-7.27 ppm (5H) e os grupamento CH_2 (H_{22}) como um simpleto em 5.13 ppm (2H). Este grupo não é mais visualizado no espectro do composto **ARP-45**, o qual também apresentou deslocamento dos sinais do anel piperazínico para a região de 3.69 ppm e 2.84 ppm, caracterizando então o sucesso da desproteção.

A seguir serão apresentadas as Tabelas 27 a 39 com os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das PROTACs.

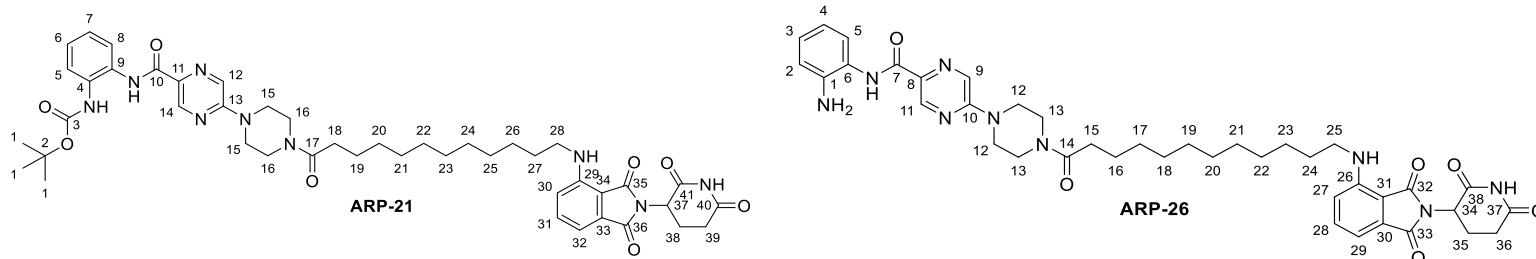
Tabela 27. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-18** e **ARP-20**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.50 (s, 9H)	28.45	-	141.92
2	-	80.81	6.81 (dd, $J=8.0, 1.4\text{Hz}$, 1H)	116.79
3	-	154.03	6.93 (dd, 1H)	125.61
4	-	130.18	6.64 (td, $J=7.7, 1.4\text{Hz}$, 1H)	117.06
5	7.56 (d, $J=7.53\text{Hz}$, 1H)	124.45	7.47 (dd, $J=7.9, 1.3\text{Hz}$, 1H)	124.42
6	7.24-7.14 (m, 3H)	125.58	-	124.30
7	7.24-7.14 (m, 3H)	125.13	-	161.85
8	7.24-7.14 (m, 3H)	126.11	-	132.93
9	-	130.94	8.35 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	128.83
10	-	162.70	-	154.93
11	-	133.44	8.73 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	141.60
12	8.00 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.74	3.79-3.70 (m, 4H)	43.91/43.72
13	-	155.38	3.63-3.58 (m, 4H)	44.21/40.41
14	8.95 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.29	-	168.95
15	3.73-3.59 (m, 4H)	45.00/44.50	2.39 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H)	32.15
16	3.83-3.77 (m, 4H)	44.09/40.94	1.43-1.34 (m, 2H)	26.06
17	-	168.56	1.59-1.54 (m, 4H)	24.44
18	2.40 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H)	33.10	1.59-1.54 (m, 4H)	28.56
19	1.78-1.66 (m, 6H)	24.84	3.31-3.22 (m, 2H)	41.75
20	1.78-1.66 (m, 6H)	26.77	-	146.43
21	1.78-1.66 (m, 6H)	29.15	7.10 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H)	117.20

22	3.29 (dd, $J=12.7, 6.7\text{Hz}$, 2H)	42.46	7.58 (dd, $J=8.4, 7.2\text{Hz}$, 1H)	136.29
23	-	147.07	7.01 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 1H)	110.37
24	7.07 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 1H)	111.62	-	132.19
25	7.48 (dd, $J=8.4, 7.3\text{Hz}$, 1H)	136.31	-	108.99
26	6.88 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	116.77	-	170.10
27	-	132.60	-	167.29
28	-	110.02	5.05 (dd, $J=12.8, 5.4\text{Hz}$, 1H)	48.54
29	-	169.67	2.93-2.83 (m, 1H) / 2.64-2.52 (m, 2H)	22.16
30	-	167.69	2.93-2.83 (m, 1H) / 2.64-2.52 (m, 2H)	30.98
31	4.91 (ddd, $J=12.1, 5.4\text{Hz}$, 1H)	49.00	-	172.81
32	2.90-2.71 (m, 3H)	22.96	-	170.88
33	2.90-2.71 (m, 3H) / 2.16-2.09 (m, 1H)	31.53	-	-
34	-	171.67	-	-
35	-	171.18	-	-
20-NH	-	-	6.54 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 1H)	-
23-NH	6.23 (t, $J = 5.5\text{ Hz}$, 1H)	-	-	-
NH₂	-	-	4.85 (s, 2H)	-
NH_{glutarimida}	8.31 (s, 1H)	-	11.09 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.62 (s, 1H)	-	9.63 (s, 1H)	-
NH_{Boc}	7.67 (s, 1H)	-	-	-

Para obtenção da PROTAC **ARP-20** realiza-se o acoplamento de amida entre os compostos **ARP-14** e **ARP-04** e, então, realiza-se a clivagem do grupamento Boc através do tratamento do composto **ARP-18** com TFA. Devido à similaridade do intermediário **ARP-18** e do composto final **ARP-20**, serão discutidos apenas os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do último. Através dos dados apresentados na Tabela 27, é possível visualizar que os hidrogênios aromáticos da subunidade do inibidor de HDAC (H_2 a H_5) apresentam-se como duplo duplete, duplo duplete, triplo duplete e duplo duplete, em 6.81 ppm, 6.93 ppm, 6.64 ppm e 7.47 ppm, todos integrando para um hidrogênio. Ligada à posição 1 dessa subunidade encontra-se o grupamento amino, oriundo da desproteção realizada com TFA, visto como um simpleto em 4.85 ppm integrando para dois hidrogênios. Os anéis pirazínico e piperazínico são vistos como duplete (H_9 -8.35 ppm-1H), duplete (H_{11} - 8.73 ppm-1H), multiplete (H_{12} -3.79-3.70 ppm-4H) e multiplete (H_{13} -3.63-3.58 ppm-4H). Os hidrogênios alifáticos do espaçador (H_{15} a H_{19}) são vistos como tripeto (2.39 ppm-2H), multiplete (1.43-1.34 ppm-2H), multiplete (1.59-1.54 ppm-4H) e multiplete (3.32-3.22 ppm-2H), e seus carbonos são visualizados na região característica de carbonos alifáticos, sendo eles 32.15, 26.06, 24.44, 28.56 e 41.75 ppm, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos da subunidade do ligante de E3-ligase (H_{21} a H_{23}) são visualizados como duplete (7.10 ppm-1H), duplo duplete (7.58 ppm-1H) e duplete (7.01 ppm-1H), enquanto os hidrogênios alifáticos da subunidade glutarimida são vistos como dois multipletos entre 2.52 e 2.93 ppm, totalizando quatro hidrogênios. Comparando-se os sinais vistos no espectro do composto **ARP-18** e **ARP-20**, vê-se que os hidrogênios aromáticos H_2 a H_5 sofrem um deslocamento à direita do espectro, região mais blindada, devido à clivagem do grupamento carbamato do Boc à amina. Além disso, o carbono C_1 passa de 130.18 ppm (**ARP-18**) à 141.92 ppm (**ARP-20**) pelo mesmo motivo citado anteriormente. Para confirmação de que a purificação pós tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ^{19}F , o qual não apresentou sinal, demonstrando a ausência de TFA residual.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido para o composto **ARP-20**, onde para o pico $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_9\text{O}_6$ foi calculado m/z de 668.2945, sendo então obtido 668.2954 e comprovando-se a obtenção do composto proposto.

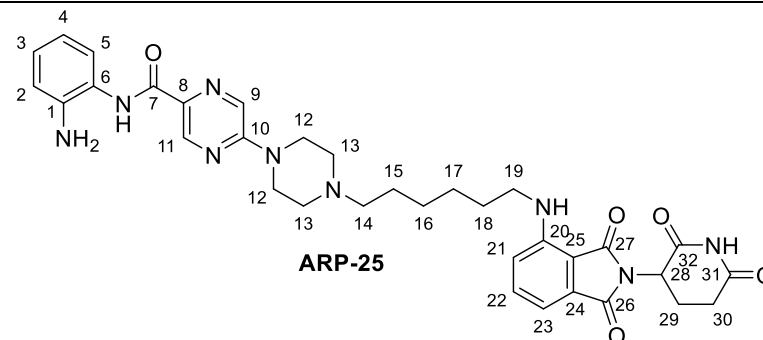
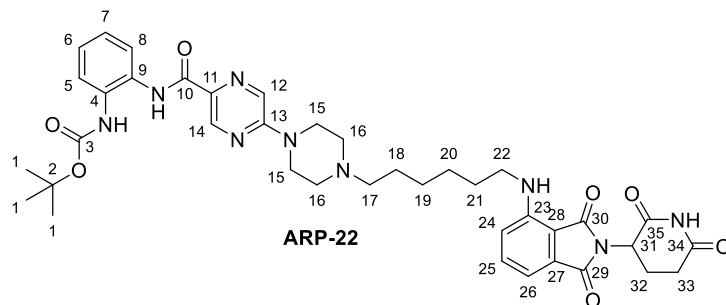
Tabela 28. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-21** e **ARP-26**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.50 (s, 9H)	28.45	-	140.53
2	-	80.81	6.90-6.82 (m, 3H)	118.27
3	-	154.03	7.10-7.04 (m, 2H)	126.93
4	-	-	6.90-6.82 (m, 3H)	119.77
5	7.71-7.63 (m, 1H)	124.47	7.43 (dd, $J=8.2, 1.2\text{Hz}$, 1H)	124.84
6	7.24 – 7.16 (m, 2H)	125.61	-	124.53
7	7.57 (d, 1H)	125.09	-	162.20
8	7.24 – 7.16 (m, 2H)	126.15	-	133.54
9	-	-	8.04 (d, $J=1.1\text{Hz}$, 1H)	127.75
10	-	162.75	-	155.38
11	-	133.41	8.95 (d, $J=1.1\text{Hz}$, 1H)	143.11
12	8.00 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.72	3.74-3.58 (m, 4H)	45.09/44.55
13	-	155.42	3.86-3.77 (m, 4H)	44.13/40.93
14	8.96 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.33	-	168.50
15	3.73-3.60 (m, 4H) 3.85-3.77 (m, 4H)	45.07/44.56	2.41-2.35 (m, 2H)	33.46
16	3.85-3.77 (m, 4H)	44.13/40.91	1.73-1.59 (m, 4H)	25.38
17	-	168.50	1.41-1.24 (m, 14H)	29.84-29.39 (m, 7C)
18	2.40-2.35 (m, 2H)	33.46	1.41-1.24 (m, 14H)	29.84-29.39 (m, 7C)
19	1.72-1.61 (m, 4H)	25.37	1.41-1.24 (m, 14H)	29.84-29.39 (m, 7C)
20	1.40-1.27 (m, 14H)	29.57-29.38 (m, 7C)	1.41-1.24 (m, 14H)	29.84-29.39 (m, 7C)
21	1.40-1.27 (m, 14H)	29.57-29.38 (m, 7C)	1.41-1.24 (m, 14H)	29.84-29.39 (m, 7C)
22	1.40-1.27 (m, 14H)	29.57-29.38 (m, 7C)	1.41-1.24 (m, 14H)	29.84-29.39 (m, 7C)
23	1.40-1.27 (m, 14H)	29.57-29.38 (m, 7C)	1.41-1.24 (m, 14H)	29.84-29.39 (m, 7C)

24	1.40-1.27 (m, 14H)	29.57-29.38 (m, 7C)	1.73-1.59 (m, 4H)	29.34
25	1.40-1.27 (m, 14H)	29.57-29.38 (m, 7C)	3.25 (dd, $J=12.7$, 6.8Hz, 2H)	42.78
26	1.40-1.27 (m, 14H)	29.57-29.38 (m, 7C)	-	147.18
27	1.72-1.61 (m, 4H)	29.34	6.90-6.82 (m, 3H)	111.48
28	3.25 (dd, $J=12.7$, 6.9Hz, 2H)	42.78	7.48 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	136.25
29	-	147.17	7.10-7.04 (m, 2H)	116.79
30	7.07 (d, $J=6.8$ Hz, 1H)	111.47	-	132.63
31	7.48 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	136.24	-	109.95
32	6.87 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	116.78	-	169.65
33	-	132.63	-	167.78
34	-	109.95	4.91 (dd, $J=12.1$, 5.3Hz, 1H)	49.01
35	-	169.65	2.93-2.69 (m, 3H) / 2.18-2.08 (m, 1H)	22.95
36	-	167.78	2.93-2.69 (m, 3H)	31.56
37	4.91 (dd, $J=12.1$, 5.4Hz, 1H)	49.00	-	172.24
38	2.92-2.67 (m, 3H)	22.95	-	171.16
39	3.25 (ddd, $J=9.5$, 5.6, 2.7Hz, 1H) / 2.92-2.67 (m, 3H)	31.56	-	-
40	-	172.23	-	-
41	-	171.18	-	-
26-NH	-	-	6.22 (t, $J=5.4$ Hz, 1H)	-
29-NH	6.22 (t, $J=5.4$ Hz, 1H)	-	-	-
NH_{glutarimida}	8.28 (s, 1H)	-	8.26 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.62 (s, 1H)	-	9.27 (s, 1H)	-

Para obtenção da PROTAC **ARP-26** realiza-se o acoplamento de amida entre os compostos **ARP-14** e **ARP-07** e, então, realiza-se a clivagem do grupamento Boc através do tratamento do composto **ARP-21** com TFA. É possível visualizar na Tabela 28 que os hidrogênios aromáticos da subunidade do inibidor de HDAC (H₂ a H₅) apresentam-se como multipletos, multipletos, multipletos e duplo dupletos, entre 6.83 ppm e 7.42 ppm, totalizando 4 hidrogênios. Os anéis pirazínico e piperazínico são vistos como dupletos (H₉-8.03 ppm-1H), dupletos (H₁₁- 8.95 ppm-1H), multipletos (H₁₂-3.74-3.58 ppm-4H) e multipletos (H₁₃-3.86-3.77 ppm-4H). Os hidrogênios alifáticos do espaçador (H₁₅ a H₂₅) são vistos como multipletos (2.41-2.35 ppm-2H), multipletos (1.73-1.59 ppm-4H), multipletos (1.41-1.24 ppm-14H) e duplo dupletos (3.25 ppm-2H), e seus carbonos são visualizados na região característica de carbonos alifáticos, porém devido à alta similaridade dos ambientes químicos, os sete carbonos centrais acabam se sobrepondo no espectro na região entre 29.84 e 29.39 ppm. Os carbonos mais próximos aos grupamentos amida e amina (C₁₅, C₁₆, C₂₄ e C₂₅), por sofrer influência desses grupos, são vistos separadamente no espectro. Os hidrogênios aromáticos da subunidade do ligante de E3-ligase (H₂₇ a H₂₉) são visualizados como multipletos (6.90-6.82 ppm), duplo dupletos (7.48 ppm) e multipletos (7.10-7.04 ppm), enquanto os hidrogênios alifáticos da subunidade glutarimida são vistos como dois multipletos entre 2.08 e 2.93 ppm, totalizando quatro hidrogênios. Comparando-se os sinais vistos no espectro do composto **ARP-21** e **ARP-26**, vê-se que os hidrogênios aromáticos H₂ a H₅ sofrem um deslocamento à direita do espectro, região mais blindada, devido à clivagem do grupamento carbamato do Boc à amina, e os sinais desse grupo protetor não são mais vistos no espectro da PROTAC. Para confirmação de que a purificação pós tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ¹⁹F, o qual não apresentou sinal, demonstrando a ausência de TFA residual.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido para o composto **ARP-26**, onde para o pico [M+H]⁺ C₄₀H₅₀N₉O₆ foi calculado m/z de 752.3884, sendo então obtido 752.3878 e comprovando-se a obtenção do composto proposto.

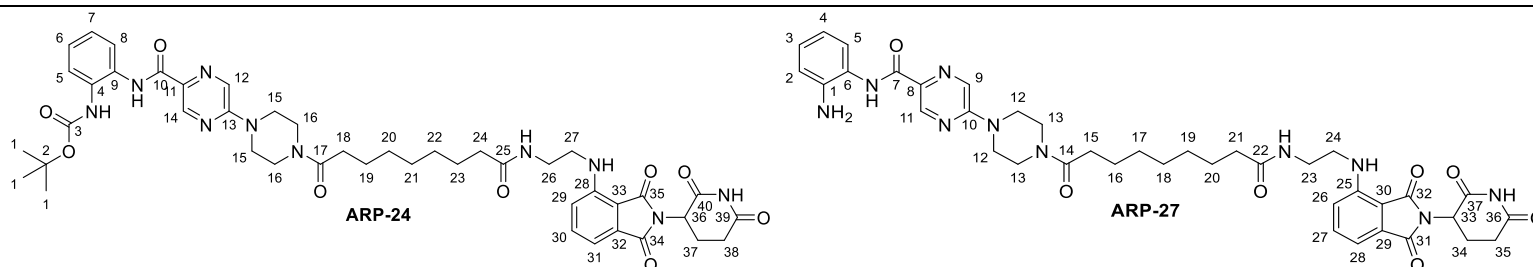
Tabela 29. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-22** e **ARP-25**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.50 (s, 9H)	28.45	-	140.58
2	-	80.71	6.86-6.81 (m, 2H)	118.16
3	-	154.00	7.10-7.04 (m, 2H)	126.81
4	-	-	6.86-6.81 (m, 2H)	119.67
5	7.67-7.56 (m, 2H)	124.51	7.42 (dd, $J=8.2, 1.4\text{Hz}$, 1H)	124.84
6	7.24-7.13 (m, 2H)	125.46	-	124.60
7	7.67-7.56 (m, 2H)	125.01	-	162.40
8	7.24-7.13 (m, 2H)	126.10	-	132.78
9	-	-	8.0 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.76
10	-	162.98	-	155.52
11	-	132.56	8.91 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.14
12	7.98 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.72	3.78-3.72 (m, 4H)	44.35
13	-	155.59	2.61-2.54 (m, 4H)	52.77
14	8.93 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.39	2.45-2.39 (m, 2H)	58.50
15	3.78-3.71 (m, 4H)	44.44	1.56 (dt, $J=14.8, 7.5\text{Hz}$, 2H)	26.62
16	2.58-2.53 (m, 4H)	52.83	1.50-1.37 (m, 4H)	26.94
17	2.43-2.36 (m, 2H)	58.53	1.50-1.37 (m, 4H)	27.22
18	1.60-1.52 (m, 2H)	26.73	1.68 (dt, $J=14.5, 7.1\text{Hz}$, 2H)	29.29
19	1.47-1.36 (m, 4H)	26.97	3.27 (dd, $J=12.7, 6.8\text{Hz}$, 2H)	42.68
20	1.47-1.36 (m, 4H)	27.30	-	147.11

21	1.73-1.64 (m, 2H)	29.32	7.10-7.04 (m, 2H)	111.56
22	3.27 (dd, $J=12.7$, 6.8Hz, 2H)	42.70	7.48 (d, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	136.27
23	-	147.12	6.88 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	116.75
24	7.08 (d, $J=7.0$ Hz, 1H)	111.57	-	132.63
25	7.48 (dd, $J=8.4$, 7.3Hz, 1H)	136.27	-	110.01
26	6.88 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	116.75	-	167.73
27	-	132.64	-	169.67
28	-	110.02	4.90 (dd, $J=12.1$, 5.4Hz, 1H)	49.01
29	-	167.72	2.91-2.70 (m, 3H) / 2.18-2.09 (m, 1H)	22.95
30	-	169.67	2.91-2.70 (m, 3H)	31.55
31	4.91 (dd, $J=12.1$, 5.4Hz, 1H)	49.01	-	168.60
32	2.16-2.07 (m, 1H) / 2.92-2.70 (m, 3H)	22.96	-	171.24
33	2.92-2.70 (m, 3H)	31.06	-	-
34	-	168.53	-	-
35	-	171.15	-	-
20-NH	-	-	6.23 (t, $J=5.4$ Hz, 1H)	-
23-NH	6.23 (t, $J=5.5$ Hz, 1H)	-	-	-
NH_{amida}	9.57 (s, 1H)	-	9.25 (s, 1H)	-
NH_{glutarimida}	8.33 (s, 1H)	-	8.45 (s, 1H)	-

Para obtenção da PROTAC **ARP-25** realizou-se uma reação de S_N2 entre os compostos **ARP-14** e **ARP-17** e, então, realizou-se a clivagem do grupamento Boc através do tratamento do composto **ARP-22** com TFA. É possível visualizar na Tabela 29 que os hidrogênios aromáticos da subunidade do inibidor de HDAC (H_2 a H_5) do composto **ARP-25** apresentam-se como multipletos, multipletos, multipletos e duplo dupletos, entre 6.81 ppm e 7.42 ppm, totalizando 4 hidrogênios. Os anéis pirazínico e piperazínico são vistos como dupletos (H_9 -8.00 ppm-1H), dupletos (H_{11} - 8.92 ppm-1H), multipletos (H_{12} -3.78-3.72 ppm-4H) e multipletos (H_{13} -2.61-2.54 ppm-4H). Devido ao fato desse composto apresentar uma amina na posição 14, a influência sobre os hidrogênios da piperazina é de proteção, quando comparado ao composto **ARP-20** ou **ARP-26** (amidas), sendo assim não há um deslocamento significativo dos hidrogênios H_{13} quando comparados ao reagente **ARP-14**. Os hidrogênios alifáticos do espaçador (H_{14} a H_{19}) são vistos como multipletos (2.45-2.39 ppm-2H), duplo triplo (1.56 ppm-2H), multipletos (1.50-1.37 ppm-4H), duplo triplo (1.68 ppm-2H) e duplo duplo (3.27 ppm-2H), e seus carbonos são visualizados na região característica de carbonos alifáticos entre 58.50 e 27.22 ppm. Os hidrogênios aromáticos da subunidade do ligante de E3-ligase (H_{21} a H_{23}) são visualizados como multipletos (7.10-7.04 ppm), dupletos (7.48 ppm) e dupletos (6.88 ppm), enquanto os hidrogênios alifáticos da subunidade glutarimida são vistos como dois multipletos entre 2.09 e 2.71 ppm, totalizando quatro hidrogênios. Comparando-se os sinais vistos no espectro do composto **ARP-22** e **ARP-25**, vê-se que os hidrogênios aromáticos H_2 a H_5 sofrem um deslocamento à direita do espectro, região mais blindada, devido à clivagem do grupamento carbamato do Boc à amina, e os sinais desse grupo protetor não são mais vistos no espectro da PROTAC. Para confirmação de que a purificação pós tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ^{19}F , o qual não apresentou sinal, demonstrando a ausência de TFA residual.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido para o composto **ARP-25**, onde para o pico $[M+H]^+$ $C_{34}H_{40}N_9O_5$ foi calculado m/z de 654.3152, sendo então obtido 654.3152 e comprovando-se a obtenção do composto proposto.

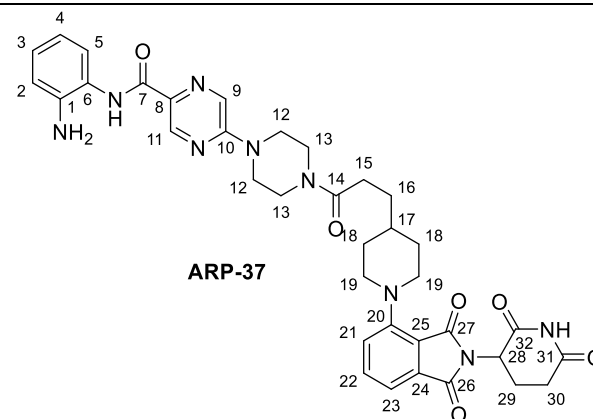
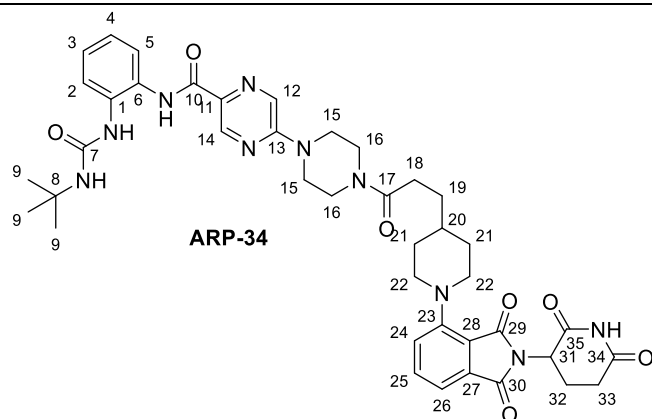
Tabela 30. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-24** e **ARP-27**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.50 (s, 9H)	28.46	-	140.56
2	-	80.83	6.87-6.82 (m, 2H)	118.24
3	-	154.04	7.08-7.05 (m, 1H)	126.94
4	-	-	6.87-6.82 (m, 2H)	119.75
5	7.67 (s, 1H)	124.53	7.43 (dd, $J=8.2, 1.3\text{Hz}$, 1H)	124.85
6	7.23-7.15 (m, 2H)	125.07	-	124.51
7	7.56 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)	124.81	-	162.21
8	7.23-7.15 (m, 2H)	125.62	-	133.35
9	-	-	8.03 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.78
10	-	162.76	-	155.38
11	-	133.40	8.94 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.10
12	8.0 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.75	3.74-3.60 (m, 4H)	45.06/44.50
13	-	155.41	3.85-3.77 (m, 4H)	44.11/40.93
14	8.95 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.31	-	172.21
15	3.74-3.60 (m, 4H)	45.05/44.50	2.39-2.34 (m, 2H)	33.27
16	3.84-3.76 (m, 4H)	44.11/40.92	1.68-1.57 (m, 4H)	25.13
17	-	172.22	1.37-1.29 (m, 6H)	29.02
18	2.39-2.33 (m, 2H)	33.26	1.37-1.29 (m, 6H)	28.97
19	1.68-1.65 (m, 4H)	25.12	1.37-1.29 (m, 6H)	29.14
20	1.38-1.22 (m, 6H)	29.02	1.68-1.57 (m, 4H)	25.58
21	1.38-1.22 (m, 6H)	28.97	2.19-2.09 (m, 3H)	36.62
22	1.38-1.22 (m, 6H)	29.13	-	174.04
23	1.68-1.65 (m, 4H)	25.57	3.46 (s, 4H)	39.17

24	2.19-2.14 (m, 2H)	36.60	3.46 (s, 4H)	42.23
25	-	174.06	-	146.92
26	3.50-3.43 (m, 4H)	39.15	7.10 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H)	112.10
27	3.50-3.43 (m, 4H)	42.22	7.50 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz , 1H)	136.44
28	-	146.92	6.99 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	116.92
29	7.10 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H)	112.07	-	132.63
30	7.50 (dd, $J=8.4$, 7.3Hz , 1H)	136.42	-	110.52
31	6.99 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	116.92	-	167.65
32	-	132.61	-	168.75
33	-	110.48	4.92 (dd, $J=12.0$, 5.3Hz , 1H)	49.08
34	-	167.65	2.90-2.71 (m, 3H) / 2.19-2.09 (m, 3H)	22.91
35	-	168.72	2.90-2.71 (m, 3H)	31.60
36	4.92 (dd, $J=12.1$, 5.5Hz , 1H)	49.08	-	171.29
37	2.91-2.68 (m, 3H) / 2.14-2.08 (m, 1H)	22.90	-	169.56
38	2.91-2.68 (m, 3H)	31.59	-	-
39	-	171.38	-	-
40	-	169.56	-	-
7-CONH	-	-	9.27 (s, 1H)	-
10-CONH	9.63 (s, 1H)	-	-	-
22-CONH	-	-	6.09 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 1H)	-
25-NH	-	-	6.40 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 1H)	-
25-CONH	6.08 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 1H)	-	-	-
28-NH	6.39 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H)	-	-	-
NH₂	-	-	4.00 (s, 2H)	-
NH_{glutarimida}	8.62 (s, 1H)	-	-	-

Para obtenção da PROTAC **ARP-27** procedeu-se com o acoplamento de amida entre os compostos **ARP-14** e **ARP-23** e, então, realizou-se a clivagem do grupamento Boc através do tratamento do composto **ARP-24** com TFA. É possível visualizar na Tabela 30 que os hidrogênios aromáticos da subunidade do inibidor de HDAC (H₂ a H₅) do composto **ARP-27** apresentam-se como multipletos, multipletos, multipletos e duplo dupletos, entre 6.82 ppm e 7.43 ppm, totalizando 4 hidrogênios. Os anéis pirazínico e piperazínico são vistos como dupletos (H₉-8.03 ppm-1H), dupletos (H₁₁- 8.94 ppm-1H), multipletos (H₁₂-3.74-3.60 ppm-4H) e multipletos (H₁₃-3.85-3.77 ppm-4H). Os hidrogênios alifáticos do espaçador (H₁₅ a H₂₁) são vistos como multipletos (2.39-2.34 ppm-2H), multipletos (1.68-1.57 ppm-4H), multipletos (1.37-1.29 ppm-6H) e multipletos (2.19-2.09 ppm-2H) e seus carbonos são visualizados na região característica de carbonos alifáticos entre 36.62 e 28.97 ppm. Os hidrogênios H₂₃ e H₂₄ são vistos como um simpleto em 3.46 ppm integrando para quatro hidrogênios, e seus carbonos são visualizados em 42.23 e 39.17 ppm, devido à influência dos grupos amida e amina próximos a esses prótons. Os hidrogênios aromáticos da subunidade do ligante de E3-ligase (H₂₆ a H₂₈) são visualizados como dupletos (7.10 ppm), duplo dupletos (7.50 ppm) e dupletos (6.99 ppm), enquanto os hidrogênios alifáticos da subunidade glutarimida são vistos como dois multipletos entre 2.09 e 2.90 ppm, totalizando quatro hidrogênios. Comparando-se os sinais vistos no espectro do composto **ARP-24** e **ARP-27**, vê-se que os hidrogênios aromáticos H₂ a H₅ sofrem um deslocamento à direita do espectro, região mais blindada, devido à clivagem do grupamento carbamato do Boc à amina, e os sinais desse grupo protetor não são mais vistos no espectro da PROTAC. Além disso, também é visualizado um simpleto em 4.00 ppm, integrando para dois hidrogênios, oriundos do grupamento amino na posição 1. Para confirmação de que a purificação pós tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ¹⁹F, o qual não apresentou sinal, demonstrando a ausência de TFA residual.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido para o composto **ARP-27**, onde para o pico $[M+H]^+$ C₃₉H₄₇N₁₀O₇ foi calculado m/z de 767.3629, sendo então obtido 767.3632 e comprovando-se a obtenção do composto proposto.

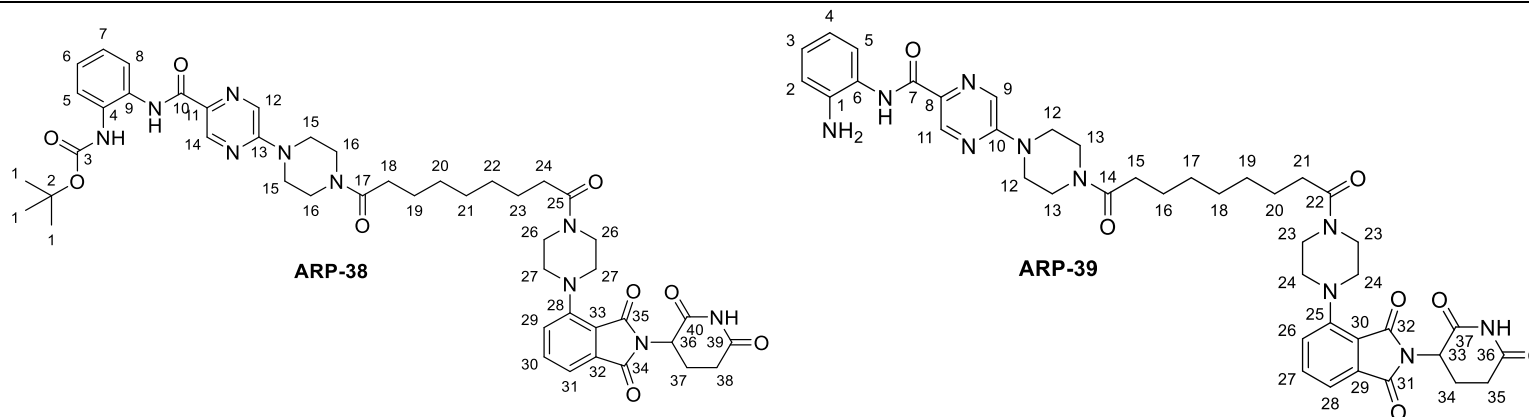
Tabela 31. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-34** e **ARP-37**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	-	-	140.53
2	7.67 (d, 1H)	124.43	6.87-6.82 (m, 2H)	118.24
3	7.24-7.11 (m, 3H)	125.62	7.10-7.05 (m, 1H)	126.98
4	7.59-7.54 (m, 2H)	125.12	6.87-6.82 (m, 2H)	119.74
5	7.24-7.11 (m, 3H)	126.17	7.43 (dd, $J=8.2, 1.3\text{Hz}$, 1H)	124.80
6	-	-	-	124.51
7	-	154.01	-	162.16
8	-	80.82	-	133.59
9	1.51 (s, 9H)	28.45	8.04 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H)	127.74
10	-	162.71	-	155.35
11	-	133.49	8.95 (d, $J=1.1\text{Hz}$, 1H)	143.09
12	8.01 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.70	3.86-3.62 (m, 10H)	45.05/44.50
13	-	155.40	3.86-3.62 (m, 10H)	44.09/40.97
14	8.96 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.32	-	171.89
15	3.89-3.62 (m, 10H)	45.04/44.53	2.48-2.43 (m, 2H)	30.41
16	3.89-3.62 (m, 10H)	44.09/40.97	1.74-1.64 (m, 2H)	31.66
17	-	171.89	1.59-1.49 (m, 3H)	35.15
18	2.47-2.43 (m, 2H)	30.42	1.86 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 2H) / 1.59-1.49 (m, 3H)	32.25

19	1.74-1.68 (m, 2H)	31.66	3.86-3.62 (m, 10H)/2.94-2.66 (m, 5H) /	52.13/51.80
20	1.57-1.53 (m, 3H)	35.16	-	150.98
21	1.87 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H) / 1.57-1.53 (m, 3H)	32.27	7.36 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H)	115.48
22	3.89-3.62 (m, 10H) / 2.92-2.68 (m, 5H)	52.14/51.80	7.56 (dd, $J=8.3$, 7.2Hz, 1H)	135.64
23	-	150.99	7.16 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H)	123.78
24	7.36 (dd, $J=8.8$, 2.1Hz, 1H)	115.49	-	134.24
25	7.59-7.54 (m, 2H)	135.65	-	117.32
26	7.24-7.11 (m, 3H)	123.78	-	166.86
27	-	134.25	-	167.53
28	-	117.33	4.95 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.23
29	-	166.87	2.94-2.66 (m, 5H)	22.82
30	-	167.53	2.94-2.66 (m, 5H)	31.54
31	4.96 (dd, $J=12.3$, 5.3Hz, 1H)	49.24	-	171.11
32	2.92-2.68 (m, 5H) / 2.14-2.07 (m, 1H)	22.83	-	168.38
33	2.92-2.68 (m, 5H)	31.55	-	-
34	-	171.05	-	-
35	-	168.34	-	-
NH₂	-	-	3.99 (s, 2H)	-
NH_{glutarimida}	8.13	-	8.22 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.63 (s, 1H)	-	9.27 (s, 1H)	-

Para obtenção da PROTAC **ARP-37** procedeu-se com o acoplamento de amida entre os compostos **ARP-14** e **ARP-32** e, então, realizou-se a clivagem do grupamento Boc através do tratamento do composto **ARP-34** com TFA. É possível visualizar na Tabela 31 que os hidrogênios aromáticos da subunidade do inibidor de HDAC (H_2 a H_5) do composto **ARP-37** apresentam-se como multipletos, multipletos, multipletos e duplo dupletos, entre 6.82 ppm e 7.43 ppm, totalizando 4 hidrogênios. Os hidrogênios do anel pirazina são vistos como dois dupletos (H_9 -8.04 ppm-1H e H_{11} - 8.95 ppm-1H). Já em relação aos hidrogênios do anel piperazínico, devido à similaridade com o ambiente químico dos hidrogênios H_{19} , apresentam-se como um multipletos em 3.86-3.62 ppm, integrando para dez hidrogênios. Os carbonos C_{12} e C_{13} são visualizados em 45.05, 44.50, 44.09 e 40.97 ppm, respectivamente, enquanto os carbonos C_{19} são visualizados em 52.13 e 51.80 ppm. Os hidrogênios alifáticos do espaçador (H_{15} a H_{19}) são vistos como multipletos (2.48-2.43 ppm-2H), multipletos (1.74-1.64 ppm-2H), multipletos (1.59-1.49 ppm-3H), dupletos (1.86 ppm), multipletos (2.94-2.66 ppm-5H). É interessante perceber que os hidrogênios do anel alifático do espaçador não são simétricos, como já esperado, devido à flexibilidade do mesmo. Os hidrogênios aromáticos da subunidade do ligante de E3-ligase (H_{26} a H_{28}) são visualizados como dupletos (7.36 ppm), duplo dupletos (7.56 ppm) e dupletos (7.16 ppm), enquanto os hidrogênios alifáticos da subunidade glutarimida são vistos como um multipletos em 2.94-2.66 ppm, integrando para cinco hidrogênios. Comparando-se os sinais vistos no espectro do composto **ARP-34** e **ARP-37**, vê-se que os hidrogênios aromáticos H_2 a H_5 sofrem um deslocamento à direita do espectro, região mais blindada, devido à clivagem do grupamento carbamato do Boc à amina, a qual é visualizada como um simpleto em 3.99 ppm, integrando para dois hidrogênios. Para confirmação de que a purificação pós tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ^{19}F , o qual não apresentou sinal, demonstrando a ausência de TFA residual.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido para o composto **ARP-37**, onde para o pico $[M+H]^+$ $C_{36}H_{40}N_9O_6$ foi calculado m/z de 694.3102, sendo então obtido 694.3102 e comprovando-se a obtenção do composto proposto.

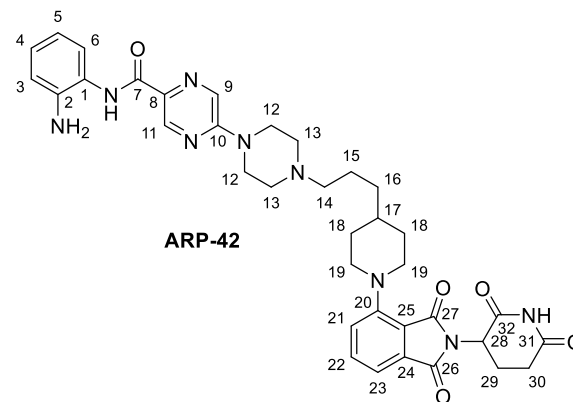
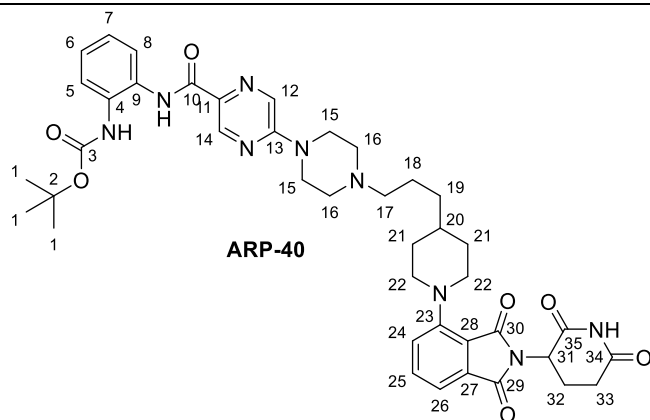
Tabela 32. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-38** e **ARP-39**

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.50 (s, 9H)	28.45	-	140.54
2	-	80.81	6.86-6.81 (m, 2H)	118.22
3	-	154.02	7.09-7.05 (m, 1H)	126.90
4	-	-	6.86-6.81 (m, 2H)	119.72
5	7.67 (s, 1H)	124.47	7.46-7.41 (m, 2H)	124.80
6	7.21-7.13 (m, 3H)	125.59	-	124.52
7	7.56 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H)	125.06	-	162.18
8	7.21-7.13 (m, 3H)	126.13	-	133.53
9	-	130.84	8.04 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.75
10	-	162.73	-	155.38
11	-	133.41	8.94 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	143.09
12	8.00 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.71	3.87-3.61 (m, 12H)	45.06/44.53
13	-	155.42	3.87-3.61 (m, 12H)	44.15/40.91
14	8.96 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	143.32	-	171.92
15	3.91-3.61 (m, 12H)	45.05/44.53	2.42-2.32 (m, 4H)	33.36
16	3.91-3.61 (m, 12H)	44.14/40.91	1.67 (s, 4H)	25.22
17	-	171.93	1.37 (s, 6H)	29.35
18	2.37 (td, $J=7.7$, 3.0Hz, 4H)	33.36	1.37 (s, 6H)	29.28

19	1.66 (s, 4H)	25.22	1.37 (s, 6H)	29.32
20	1.37 (s, 6H)	29.36	1.67 (s, 4H)	25.31
21	1.37 (s, 6H)	29.29	2.42-2.32 (m, 4H)	33.39
22	1.37 (s, 6H)	29.33	-	172.09
23	1.66 (s, 4H)	25.32	3.41-3.23 (m, 4H)	45.87/41.49
24	2.37 (td, $J=7.7$, 3.0Hz, 4H)	33.39	3.87-3.61 (m, 12H)	52.14/50.44
25	-	172.09	-	150.04
26	3.41-3.25 (m, 4H)	45.88/41.50	7.46-7.41 (m, 2H)	116.56
27	3.91-3.61 (m, 12H)	52.15/50.43	7.62 (dd, $J=8.3$, 7.2Hz, 1H)	135.98
28	-	150.04	7.16 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	123.50
29	7.44 (d, $J=7.1$ Hz, 1H)	116.57	-	134.27
30	7.62 (dd, $J=8.3$, 7.2Hz, 1H)	135.99	-	118.16
31	7.21-7.13 (m, 3H)	123.51	-	166.78
32	-	134.27	-	167.28
33	-	118.16	4.96 (dd, $J=12.3$, 5.3Hz, 1H)	49.35
34	-	166.79	2.93-2.70 (m, 3H) / 2.15-2.08 (m, 1H)	22.80
35	-	167.28	2.93-2.70 (m, 3H)	31.53
36	4.96 (dd, $J=12.3$, 5.3Hz, 1H)	49.35	-	171.00
37	2.91-2.71 (m, 3H) / 2.16-2.09 (m, 1H)	22.80	-	168.29
38	2.91-2.71 (m, 3H)	31.54	-	-
39	-	171.00	-	-
40	-	168.28	-	-
NH₂	-	-	3.98 (s, 2H)	-
NH_{glutarimida}	8.23 (s, 1H)	-	8.26 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.62 (s, 1H)	-	9.26 (s, 1H)	-

Para obtenção da PROTAC **ARP-39** procedeu-se com o acoplamento de amida entre os compostos **ARP-14** e **ARP-36** e, então, realizou-se a clivagem do grupamento Boc através do tratamento do composto **ARP-38** com TFA. É possível visualizar na Tabela 32 que os hidrogênios aromáticos da subunidade do inibidor de HDAC (H_2 a H_5) do composto **ARP-39** apresentam-se como quatro multipletos, entre 6.81 ppm e 7.46 ppm, totalizando 4 hidrogênios. Os hidrogênios do anel pirazina são vistos como duplete (H_9 -8.04 ppm-1H) e duplete (H_{11} - 8.94 ppm-1H). Já em relação aos hidrogênios do anel piperazínico, devido à similaridade com o ambiente químico dos hidrogênios H_{23} , presente no segundo anel piperazínico, apresentam-se como um multipletos em 3.87-3.61 ppm, integrando para doze hidrogênios. Os carbonos C_{12} e C_{13} são visualizados em 45.06, 44.53, 44.15 e 40.91 ppm, respectivamente, enquanto os carbonos C_{23} são visualizados em 45.87 e 41.49 ppm. Os hidrogênios alifáticos do espaçador (H_{15} a H_{24}) são vistos como multipletos (2.42-2.32 ppm-4H), simpleto (1.67 ppm-4H) e simpleto (1.37 ppm-6H). Devido à alta similaridade no ambiente químico dos hidrogênios e carbonos contidos entre os anéis piperazínicos, os sinais do RMN de ^1H se sobrepõem e os de carbono se comportam como se esse espaçador alifático fosse simétrico (C_{15} a C_{21} – 33.36, 25.22, 29.35, 29.28, 29.32, 25.31 e 33.39 ppm). Os hidrogênios aromáticos da subunidade do ligante de E3-ligase (H_{26} a H_{28}) são visualizados como multipletos (7.46-7.41 ppm), duplo duplete (7.62 ppm) e duplete (7.16 ppm), enquanto os hidrogênios alifáticos da subunidade glutarimida são vistos como um multipletos em 2.93-2.08 ppm, integrando para cinco hidrogênios. Comparando-se os sinais vistos no espectro do composto **ARP-38** e **ARP-39**, vê-se que os hidrogênios aromáticos H_2 a H_5 sofrem um deslocamento à direita do espectro, região mais blindada, devido à clivagem do grupamento carbamato do Boc à amina, a qual é visualizada como um simpleto em 3.98 ppm, integrando para dois hidrogênios. Para confirmação de que a purificação pós tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ^{19}F , o qual não apresentou sinal, demonstrando a ausência de TFA residual.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido para o composto **ARP-39**, onde para o pico $[M+H]^+ C_{41}H_{49}N_{10}O_7$ foi calculado m/z de 793.3786, sendo então obtido 793.3782 e comprovando-se a obtenção do composto proposto.

Tabela 33. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-40** e **ARP-42**

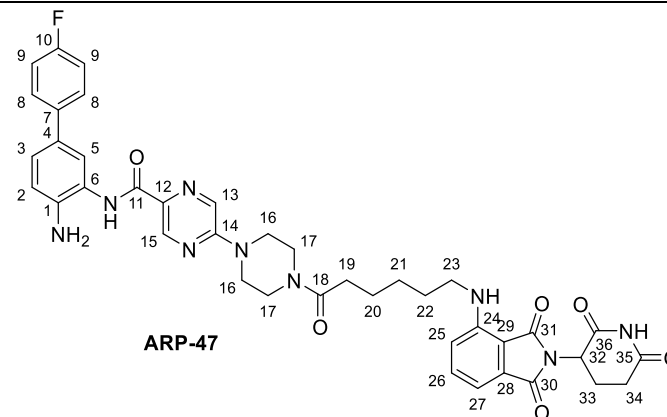
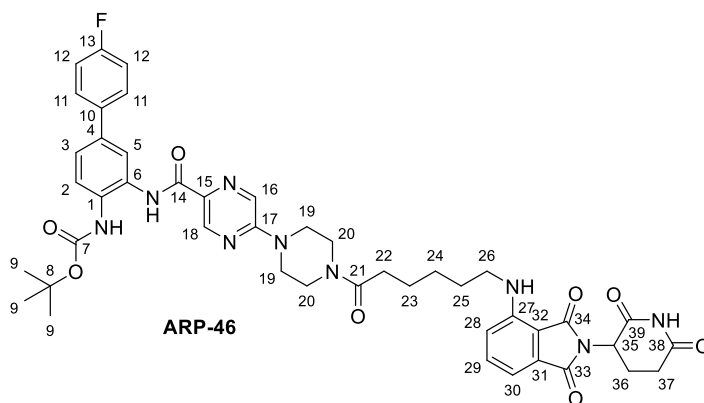
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.50 (s, 9H)	28.46	-	124.62
2	-	80.72	-	140.57
3	-	154.00	6.86-6.81 (m, 2H)	118.18
4	-	-	7.09-7.04 (m, 1H)	126.80
5	7.66-7.60 (m, 2H)	124.47	6.86-6.81 (m, 2H)	119.68
6	7.23-7.15 (m, 3H)	125.48	7.42 (dd, $J=8.3, 1.4\text{Hz}$, 1H)	124.82
7	7.66-7.60 (m, 2H)	125.01	-	162.40
8	7.23-7.15 (m, 3H)	126.12	-	132.76
9	-	-	8.01 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.73
10	-	162.96	-	155.56
11	-	132.64	8.92 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	143.16
12	7.99 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.71	3.77-3.71 (m, 6H)	44.45
13	-	155.56	2.60-2.55 (m, 4H)	52.86
14	8.93 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.40	2.44-2.38 (m, 2H)	58.92
15	3.81-3.70 (m, 6H)	44.35	1.65-1.55 (m, 2H)	24.08
16	2.59 (s, 4H)	52.79	1.39-1.32 (m, 2H)	34.39
17	2.43 (t, 2H)	58.87	1.52-1.43 (m, 3H)	35.58
18	1.64-1.56 (m, 2H)	23.95	1.84 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 2H)/1.52-1.43 (m, 3H)	32.52/32.49

19	1.39-1.32 (m, 2H)	34.35	3.77-3.71 (m, 6H)/2.93-2.67 (m, 5H)	52.28/51.96
20	1.48 (s, 3H)	35.56	-	151.07
21	1.84 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 2H)/1.48 (s, 3H)	32.51/32.48	7.35 (dd, $J=7.1$, 0.6Hz, 1H)	115.39
22	3.81-3.70 (m, 6H)/2.93-2.70 (m, 5H)	52.27/51.94	7.56 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	135.59
23	-	151.06	7.17 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)	123.78
24	7.35 (d, $J=6.7\text{Hz}$, 1H)	115.37	-	134.27
25	7.56 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	135.60	-	117.24
26	7.23-7.15 (m, 3H)	123.78	-	166.85
27	-	134.26	-	167.56
28	-	117.25	4.96 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.24
29	-	166.82	2.93-2.67 (m, 5H) / 2.15-2.06 (m, 1H)	22.83
30	-	167.56	2.93-2.67 (m, 5H)	31.56
31	4.96 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.24	-	171.12
32	2.93-2.70 (m, 5H) / 2.14-2.07 (m, 1H)	22.83	-	168.39
33	2.93-2.70 (m, 5H)	31.56	-	-
34	-	171.11	-	-
35	-	168.39	-	-
NH₂	-	-	3.98 (s, 2H)	-
NH_{glutarimida}	8.24 (s, 1H)	-	8.27 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.58 (s, 1H)	-	9.26 (s, 1H)	-

Para obtenção da PROTAC **ARP-42** procedeu-se com a reação de S_N2 entre os compostos **ARP-14** e **ARP-35** e, então, realizou-se a clivagem do grupamento Boc através do tratamento do composto **ARP-40** com TFA. É possível visualizar na Tabela 33 que os hidrogênios aromáticos da subunidade do inibidor de HDAC (H_2 a H_5) do composto **ARP-42** apresentam-se como multipletos, multipletos, multipletos e duplo dupletos, entre 6.81 ppm e 7.42 ppm, totalizando 4 hidrogênios. Os hidrogênios do anel pirazina são vistos como dois dupletos (H_9 -8.01 ppm-1H e H_{11} - 8.92 ppm-1H). Em relação aos hidrogênios H_{12} do anel piperazínico, devido à similaridade com o ambiente químico dos hidrogênios H_{19} , apresentam-se como um multipletos (3.77-3.67 ppm-6H), enquanto os hidrogênios H_{13} apresentam-se como um multipletos em 2.60-2.55 ppm. Devido ao fato desse composto apresentar uma amina na posição 14, a influência sobre os hidrogênios da piperazina é de proteção, quando comparado ao composto **ARP-37** (amida), sendo assim não há um deslocamento significativo dos hidrogênios H_{13} quando comparados ao reagente **ARP-14**. Os hidrogênios alifáticos do espaçador (H_{14} a H_{19}) são vistos como multipletos (2.44-2.38 ppm-2H), multipletos (1.65-1.55 ppm-2H), multipletos (1.39-1.32 ppm-3H), multipletos (1.52-1.43 ppm-3H), dupletos (1.84 ppm-2H), multipletos (3.77-3.71 ppm-6H) e multipletos (2.93-2.67 ppm-5H). Os hidrogênios aromáticos da subunidade do ligante de E3-ligase (H_{21} a H_{23}) são visualizados como duplo dupletos (7.35 ppm), duplo dupletos (7.56 ppm) e dupletos (7.17 ppm), enquanto os hidrogênios alifáticos da subunidade glutarimida são vistos como um multipletos em 2.93-2.06 ppm, integrando para cinco hidrogênios. Comparando-se os sinais vistos no espectro do composto **ARP-40** e **ARP-42**, vê-se que os hidrogênios aromáticos H_2 a H_5 sofrem um deslocamento à direita do espectro, região mais blindada, devido à clivagem do grupamento carbamato do Boc à amina, a qual é visualizada como um simpleto em 3.98 ppm, integrando para dois hidrogênios. Para confirmação de que a purificação pós tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ^{19}F , o qual não apresentou sinal, demonstrando a ausência de TFA residual.

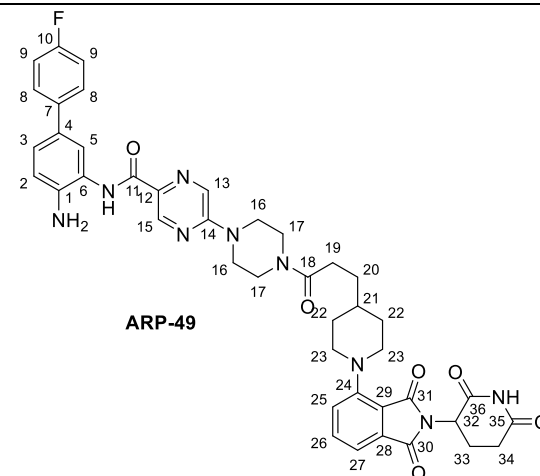
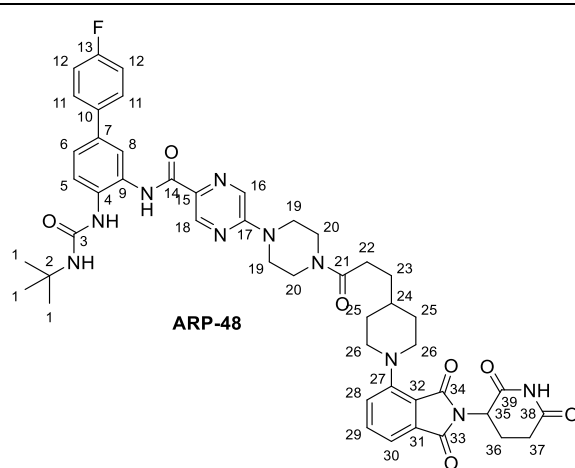
O espectro de massas de alta resolução foi obtido para o composto **ARP-42**, onde para o pico $[M+H]^+$ $C_{36}H_{42}N_9O_5$ foi calculado m/z de 680.3309, sendo então obtido 680.3314 e comprovando-se a obtenção do composto proposto.

As Tabelas de 34 a 39 apresentam os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-47**, **ARP-49**, **ARP-53**, **ARP-54**, **ARP-55** e **ARP-56**. Esses compostos apresentam alta similaridade com o que já foi discutido anteriormente, sendo assim, uma única discussão será apresentada ao final das tabelas pontuando as modificações realizadas nessas estruturas, seus sinais nos RMNs e os resultados obtidos na espectrometria de massas de alta resolução.

Tabela 34. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-46** e **ARP-47**

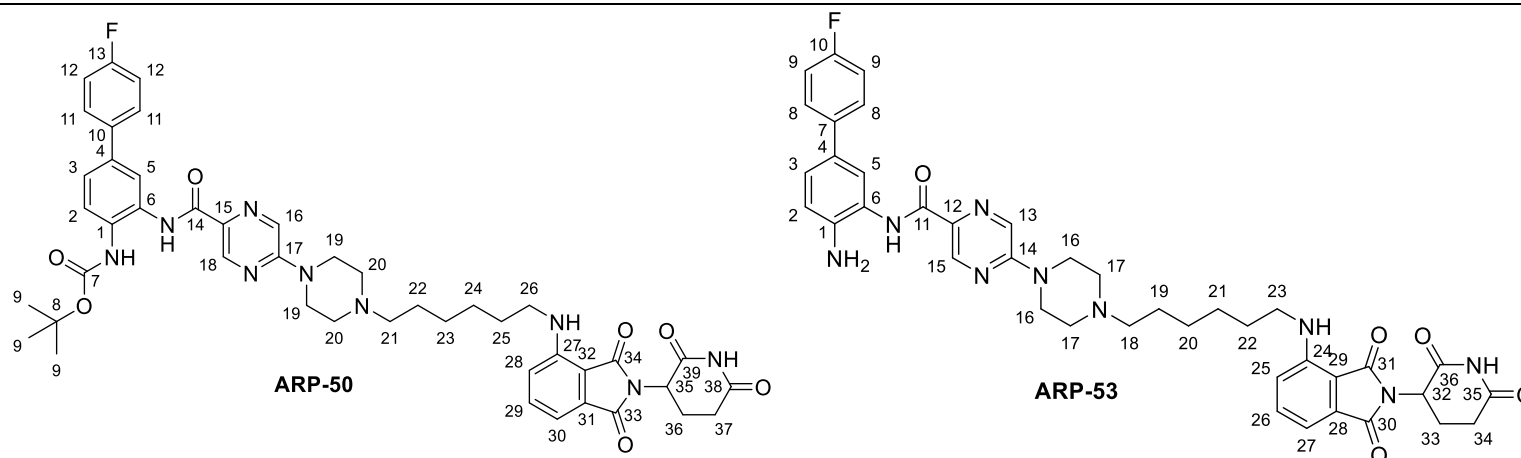
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	-	-	139.78
2	7.63 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	125.41	6.91-6.86 (m, 2H)	118.55
3	7.38 (dd, $J=8.4$, 2.1Hz, 1H)	124.57	7.28 (d, 1H)	124.85
4	-	-	-	136.32
5	7.90 (s, 1H)	122.85	7.68 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H)	123.26
6	-	-	-	131.98
7	-	154.02	-	136.89 (d, $J=3.1\text{Hz}$)
8	-	81.00	7.53-7.46 (m, 3H)	128.20 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
9	1.57-1.47 (m, 12H)	28.46	7.10-7.04 (m, 3H)	115.60 (d, $J=21.4\text{Hz}$)
10	-	136.44	-	162.17 (d, $J=245.4\text{Hz}$)
11	7.49 (dd, $J=8.3$, 7.3Hz, 1H)	128.74 (d, $J=8.1\text{Hz}$)	-	162.30
12	7.13-7.06 (m, 3H)	115.75 (d, $J=12.5\text{Hz}$)	-	133.47
13	-	162.62 (d, $J=246.7\text{Hz}$)	8.04 (d, $J=1.0\text{Hz}$, 1H)	127.79
14	-	162.83	-	155.38
15	-	133.36	8.96 (d, $J=1.0\text{Hz}$, 1H)	143.14
16	8.01 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.76	3.74-3.69 (m, 4H)	45.02 / 44.51
17	-	155.41	3.84-3.78 (m, 4H)	44.09 / 40.96
18	8.97 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.36	-	168.53

19	3.74-3.60 (m, 4H)	45.02 / 44.51	2.41 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H)	33.11
20	3.85-3.77 (m, 4H)	44.10 / 40.98	1.73 (dq, $J=15.1$, 7.4Hz, 4H)	24.85
21	-	168.54	1.49 (dt, $J=15.8$, 7.9Hz, 2H)	26.77
22	2.40 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H)	33.11	1.73 (dq, $J=15.1$, 7.4Hz, 4H)	29.15
23	1.73-1.68 (m, 4H)	24.85	3.29 (dd, $J=12.7$, 6.6Hz, 2H)	42.46
24	1.57-1.47 (m, 11H)	26.78	-	147.07
25	1.73-1.68 (m, 4H)	29.15	7.10-7.04 (m, 3H)	111.63
26	3.30 (dd, $J=12.6$, 6.7Hz, 2H)	42.47	7.53-7.46 (m, 3H)	136.32
27	-	147.08	6.91-6.86 (m, 2H)	116.78
28	7.13-7.06 (m, 3H)	111.65	-	132.61
29	7.49 (dd, $J=8.3$, 7.3Hz, 1H)	136.32	-	110.03
30	6.88 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	116.78	-	167.69
31	-	132.61	-	169.67
32	-	110.03	4.90 (dd, $J=12.1$, 5.4Hz, 1H)	49.01
33	-	167.69	2.92-2.67 (m, 3H) / 2.16-2.09 (m, 1H)	22.96
34	-	169.68	2.92-2.67 (m, 3H)	31.54
35	4.91 (dd, $J=12.1$, 5.4Hz, 1H)	49.01	-	171.66
36	2.91-2.71 (m, 3H) / 2.16-2.10 (m, 1H)	22.97	-	171.12
37	2.91-2.71 (m, 3H)	31.54	-	-
38	-	171.67	-	-
39	-	161.14	-	-
NH₂	-	-	4.04 (s, 2H)	-
24-NH	-	-	6.23 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H)	-
27-NH	6.23 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H)	-	-	-
NH_{glutarimida}	8.25 (s, 1H)	-	8.27 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.69 (s, 1H)	-	9.33 (s, 1H)	-

Tabela 35. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-48** e **ARP-49**.

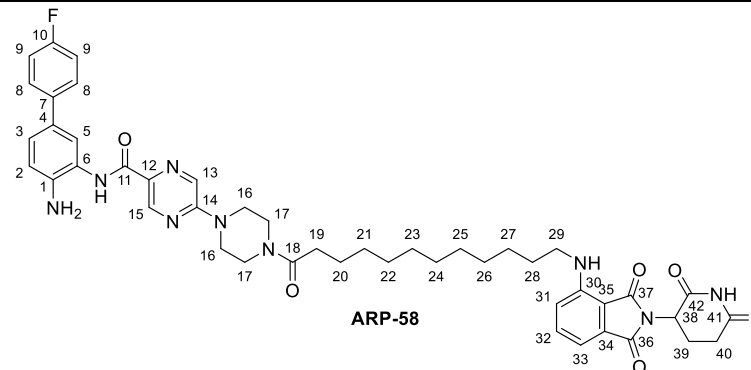
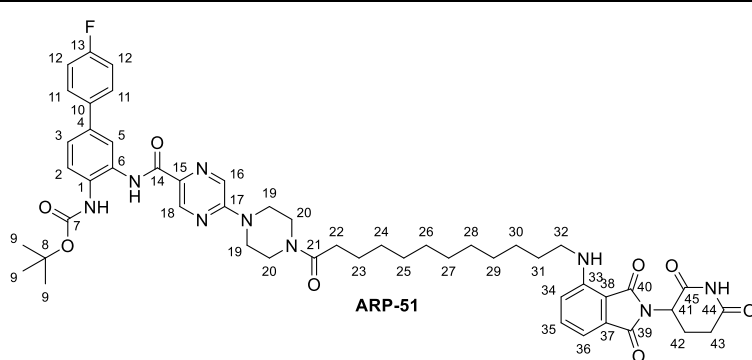
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.53 (s, 12H)	28.47	-	139.77
2	-	81.00	6.90 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	118.58
3	-	154.01	7.27-7.25 (m, 1H)	125.33
4	-	-	-	124.86
5	7.62 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H)	125.38	7.68 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	123.23
6	7.40-7.35 (m, 2H)	124.61	-	132.00
7	-	-	-	136.88 (d, $J=3.1\text{Hz}$)
8	7.90 (s, 1H)	122.93	7.50 (dd, $J=8.8, 5.3\text{Hz}$, 2H)	128.20 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
9	-	-	7.07 (t, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	115.60 (d, $J=21.50\text{Hz}$)
10	-	136.42 (d, $J=3.3\text{Hz}$)	-	162.17 (d, $J=245.5\text{Hz}$)
11	7.58-7.52 (m, 3H)	128.74 (d, $J=8.0\text{Hz}$)	-	162.29
12	7.10 (t, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	115.75 (d, $J=21.4\text{Hz}$)	-	133.49
13	-	162.63 (d, $J=246.3\text{Hz}$)	8.05 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.74
14	-	162.83	-	155.43
15	-	133.39	8.97 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H)	143.15
16	8.02 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.71	3.89-3.63 (m, 10H)	45.04 / 44.52

17	-	155.43	3.89-3.63 (m, 10H)	44.10 / 40.97
18	8.98 (d, $J=1.3$ Hz, 1H)	143.37	-	171.88
19	3.92-3.54 (m, 10H)	45.04 / 44.53	2.49-2.42 (m, 2H)	30.41
20	3.92-3.54 (m, 10H)	44.12 / 40.98	1.71 (dd, $J=13.5$, 7.0Hz, 2H)	31.66
21	-	171.89	1.59-1.47 (m, 3H)	35.16
22	2.48-2.43 (m, 2H)	30.42	1.87 (d, $J=9.2$ Hz, 2H) / 1.59-1.47 (m, 3H)	32.26
23	1.71 (dd, $J=14.2$, 7.4Hz, 2H)	31.66	3.89-3.63 (m, 10H)/2.93-2.67 (m, 5H)	52.15/51.80
24	1.53 (s, 12H)	35.16	-	150.99
25	1.87 (d, $J=9.6$ Hz, 2H)/1.53 (s, 12H)	32.27	7.36 (d, $J=7.1$ Hz, 1H)	115.50
26	3.92-3.54 (m, 10H)/2.96-2.67 (m, 5H)	52.14/51.81	7.56 (dd, $J=8.3$, 7.2Hz, 1H)	135.65
27	-	150.99	7.17 (d, $J=8.4$ Hz, 1H)	123.78
28	7.40-7.35 (m, 2H)	115.50	-	134.25
29	7.58-7.52 (m, 3H)	135.66	-	117.34
30	7.17 (d, $J=8.1$ Hz, 1H)	123.79	-	166.87
31	-	134.25	-	167.52
32	-	117.34	4.96 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.24
33	-	166.88	2.93-2.67 (m, 5H) / 2.14-2.07 (m, 1H)	22.83
34	-	167.52	2.93-2.67 (m, 5H)	31.55
35	4.96 (dd, $J=12.3$, 5.3Hz, 1H)	49.25	-	171.04
36	2.96-2.67 (m, 5H) / 2.14-2.08 (m, 1H)	22.83	-	168.34
37	2.96-2.67 (m, 5H)	31.56	-	-
38	-	171.03	-	-
39	-	168.32	-	-
NH ₂	-	-	4.03 (s, 2H)	-
NH _{glutarimida}	8.11 (s, 1H)	-	8.14 (s, 1H)	-
NH _{amida}	9.69 (s, 1H)	-	9.33 (s, 1H)	-

Tabela 36. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-50** e **ARP-53**.

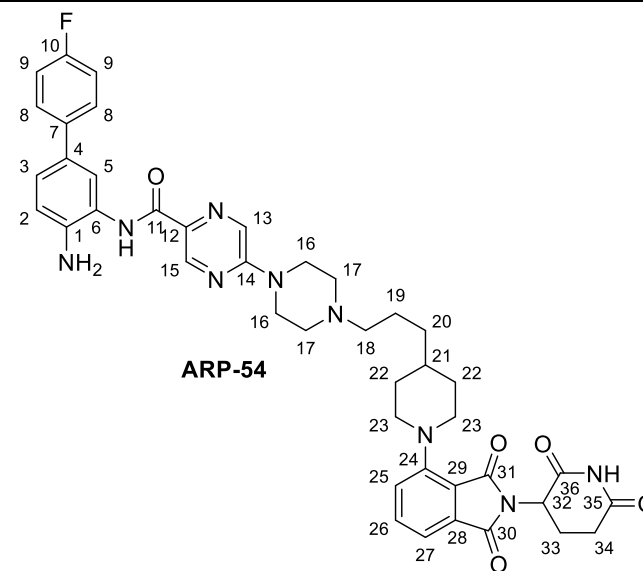
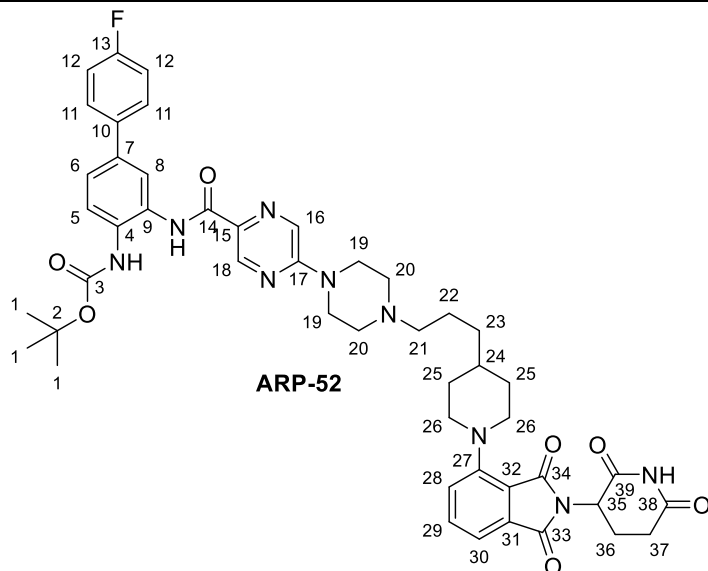
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	-	-	139.81
2	7.65 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	125.31	6.78 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H)	118.52
3	7.37 (dd, $J=8.4$, 2.1Hz , 1H)	124.49	7.27 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	125.25
4	-	129.41	-	-
5	7.85 (s, 1H)	122.78	7.67 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	123.27
6	-	-	-	131.98
7	-	154.00	-	136.95 (d, $J=3.2\text{Hz}$)
8	-	80.91	7.53-7.48 (m, 2H)	128.22 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
9	1.52 (s, 9H)	28.47	7.10-7.04 (m, 3H)	115.26 (d, $J=21.4\text{Hz}$)
10	-	136.47 (d, $J=3.0\text{Hz}$)	-	162.17 (d, $J=245.5\text{Hz}$)
11	7.56-7.52 (m, 3H)	128.74 (d, $J=8.0\text{Hz}$)	-	162.53
12	7.13-7.07 (m, 3H)	115.73 (d, $J=21.5\text{Hz}$)	-	131.98
13	-	162.61 (d, $J=246.4\text{Hz}$)	8.02 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.76
14	-	163.10	-	155.60
15	-	132.48	8.94 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.23
16	7.99 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.74	3.79-3.73 (m, 4H)	44.48
17	-	155.62	2.61-2.52 (m, 4H)	52.86

18	8.95 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	143.46	2.44-2.37 (m, 2H)	58.54
19	3.79-3.73 (m, 4H)	44.46	1.61-1.52 (m, 2H)	26.76
20	2.59-2.54 (m, 4H)	52.84	1.49-1.38 (m, 4H)	26.95
21	2.43-2.38 (m, 2H)	58.52	1.49-1.38 (m, 4H)	27.30
22	1.60-1.55 (m, 2H)	26.73	1.74-1.65 (m, 2H)	29.26
23	1.48-1.39 (m, 4H)	26.94	3.31-3.23 (m, 2H)	42.82
24	1.48-1.39 (m, 4H)	27.28	-	146.53
25	1.70-1.65 (m, 2H)	29.25	7.10-7.04 (m, 3H)	111.65
26	3.31-3.22 (m, 3H)	42.81	7.54 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	140.69
27	-	146.52	6.82 (d, $J=8.2\text{Hz}$)	118.43
28	7.13-7.07 (m, 3H)	111.64	-	129.42
29	7.56-7.52 (m, 3H)	140.68	-	111.65
30	6.78 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H)	118.43	-	165.66
31	-	-	-	162.53
32	-	103.65	4.92 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.18
33	-	163.10	2.93-2.72 (m, 3H) / 2.18-2.10 (m, 1H)	22.86
34	-	165.66	2.93-2.72 (m, 3H)	31.52
35	4.92 (dd, $J=12.3$, 5.4Hz, 1H)	49.17	-	170.89
36	2.93-2.72 (m, 3H) / 2.16-2.10 (m, 1H)	22.85	-	168.21
37	2.93-2.72 (m, 3H)	31.52	-	-
38	-	170.96	-	-
39	-	168.26	-	-
NH₂	-	-	4.03 (s, 2H)	-
24-NH	-	-	6.38 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H)	-
27-NH	6.38 (t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H)	-	-	-
NH_{glutarimida}	8.22 (s, 1H)	-	8.14 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.64 (s, 1H)	-	9.31 (s, 1H)	-

Tabela 37. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-51** e **ARP-58**.

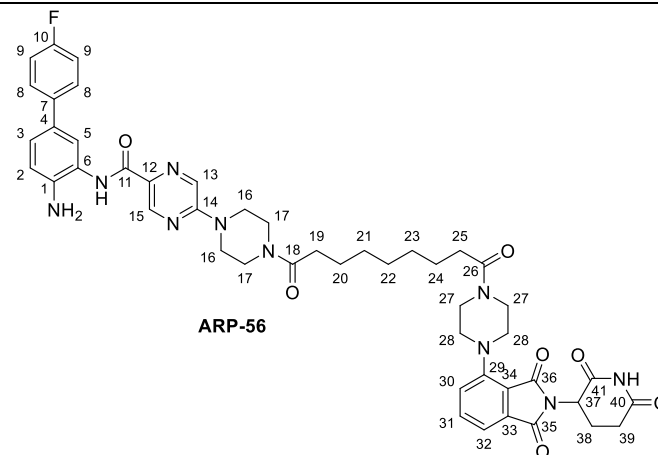
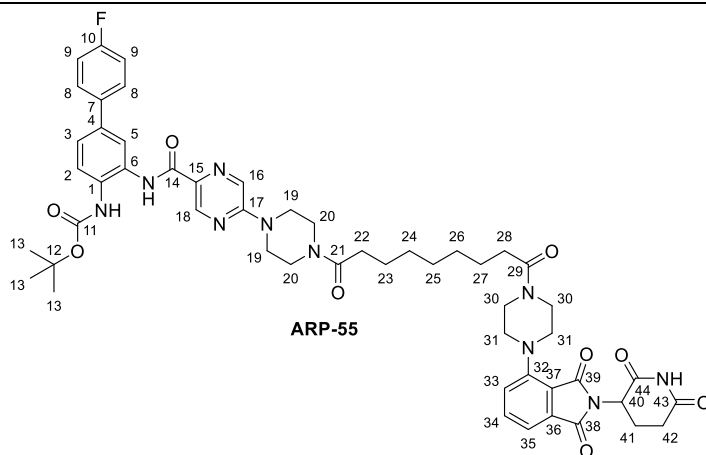
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	-	-	139.79
2	7.63 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	125.87	6.89 (t, 2H)	118.56
3	7.38 (dd, $J=8.4$, 2.1Hz , 1H)	124.22	7.28 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	124.85
4	-	-	-	125.33
5	7.89 (s, 1H)	123.22	7.68 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	123.27
6	-	-	-	131.99
7	-	154.00	-	136.89 (d, $J=3.1\text{Hz}$)
8	-	80.98	7.54-7.45 (m, 4H)	128.20 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
9	1.53 (s, 9H)	28.47	7.10-7.04 (m, 4H)	115.60 (d, $J=21.4\text{Hz}$)
10	-	-	-	162.17 (d, $J=245.3\text{Hz}$)
11	7.55 (dd, $J=8.8$, 5.3Hz , 2H)	128.76 (d, $J=8.1\text{Hz}$)	-	162.31
12	7.14 (m, 4H)	115.75 (d, $J=21.4\text{Hz}$)	-	133.43
13	-	162.64 (d, $J=246.5\text{Hz}$)	8.04 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.75
14	-	162.87	-	155.42
15	-	133.34	8.96 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.17
16	8.02 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.72	3.76-3.61 (m, 4H)	45.08 / 44.55
17	-	155.47	3.86-3.78 (m, 4H)	44.14 / 40.91
18	8.98 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	143.40	-	168.48
19	3.76-3.62 (m, 4H)	45.08 / 44.58	2.41-2.34 (m, 2H)	33.46

20	3.88-3.77 (m, 4H)	44.14 / 40.92	1.73-1.63 (m, 4H)	25.37
21	-	168.45	1.43-1.27 (m, 14H)	29.56
22	2.40-2.35 (m, 2H)	33.46	1.43-1.27 (m, 14H)	29.59
23	1.71-1.61 (m, 4H)	29.34	1.43-1.27 (m, 14H)	29.51
24	1.34-1.28 (m, 14H)	29.67	1.43-1.27 (m, 14H)	29.39
25	1.34-1.28 (m, 14H)	29.64	1.43-1.27 (m, 14H)	27.03
26	1.34-1.28 (m, 14H)	29.62	1.43-1.27 (m, 14H)	27.03
27	1.34-1.28 (m, 14H)	29.60	1.43-1.27 (m, 14H)	27.03
28	1.34-1.28 (m, 14H)	29.57	1.73-1.63 (m, 4H)	29.34
29	1.34-1.28 (m, 14H)	29.55	3.25 (dd, $J=12.7$, 6.9Hz, 2H)	42.78
30	1.34-1.28 (m, 14H)	29.52	-	147.17
31	1.71-1.61 (m, 4H)	29.39	7.10-7.04 (m, 4H)	111.48
32	3.26-3.20 (m, 2H)	42.79	7.54-7.45 (m, 4H)	136.24
33	-	147.19	6.89 (t, 2H)	116.78
34	7.14-7.05 (m, 4H)	111.49	-	132.63
35	7.49 (dd, $J=8.4$, 7.3Hz, 1H)	136.25	-	109.96
36	6.88 (d, $J=8.5$ Hz, 1H)	116.79	-	169.65
37	-	132.64	-	167.77
38	-	109.97	4.90 (dd, $J=12.1$, 5.3Hz, 1H)	49.00
39	-	169.66	2.92-2.69 (m, 3H) / 2.15-2.09 (m, 1H)	22.95
40	-	167.77	2.92-2.69 (m, 3H)	31.56
41	4.91 (dd, $J=12.2$, 5.3Hz, 1H)	49.01	-	171.13
42	2.89-2.70 (m, 3H) / 2.16-2.09 (m, 1H)	22.96	-	172.22
43	2.89-2.70 (m, 3H)	31.57	-	-
44	-	172.23	-	-
45	-	171.10	-	-
NH₂	-	-	4.03 (s, 2H)	-
30-NH	-	-	6.22 (t, $J=5.5$ Hz, 1H)	-
33-NH	6.22 (t, $J=5.4$ Hz, 1H)	-	-	-
NH_{glutarimida}	8.19 (s, 1H)	-	8.25 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.69 (s, 1H)	-	9.33 (s, 1H)	-

Tabela 38. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-52** e **ARP-54**.

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	1.52 (s, 9H)	28.46	-	139.81
2	-	80.89	6.89 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	118.51
3	-	153.99	7.26 (dd, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	124.96
4	-	-	-	125.23
5	7.65 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H)	125.34	7.67 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	123.26
6	7.39-7.34 (m, 2H)	124.51	-	131.95
7	-	-	-	136.94 (d, $J=3.2\text{Hz}$)
8	7.86 (s, 1H)	122.81	7.50 (dd, $J=8.9$, 5.3Hz , 2H)	128.20 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
9	-	-	7.07 (t, $J=8.8\text{Hz}$, 2H)	115.58 (d, $J=21.4\text{Hz}$)
10	-	136.46 (d, $J=3.1\text{Hz}$)	-	162.16 (d, $J=245.3\text{Hz}$)
11	7.58-7.51 (m, 3H)	128.73 (d, $J=8.1\text{Hz}$)	-	162.54
12	7.12-7.06 (m, 2H)	115.72 (d, $J=21.4\text{Hz}$)	-	132.63
13	-	162.60 (d, $J=246.2\text{Hz}$)	8.02 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H)	127.74
14	-	163.10	-	155.59

15	-	132.45	8.94 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.23
16	7.99 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.72	3.80-3.69 (m, 6H)	44.48
17	-	155.62	2.60-2.55 (m, 4H)	52.87
18	8.94 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.46	2.44-2.38 (m, 2H)	58.93
19	3.80-3.71 (m, 6H)	44.47	1.65-1.55 (m, 2H)	24.10
20	2.60-2.53 (m, 4H)	52.86	1.40-1.32 (m, 2H)	34.39
21	2.44-2.38 (m, 2H)	58.92	1.52-1.45 (m, 3H)	35.59
22	1.63-1.56 (m, 2H)	24.09	1.52-1.45 (m, 3H)/1.82 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H)	32.52/32.50
23	1.39-1.32 (m, 2H)	34.38	3.80-3.69 (m, 6H)/ 2.92-2.66 (m, 6H)	52.29/51.96
24	1.49-1.46 (m, 3H)	35.59	-	151.08
25	1.89-1.80 (m, 2H)/1.49-1.46 (m, 3H)	32.52/32.50	7.36 (d, $J=6.7\text{Hz}$, 1H)	115.37
26	3.80-3.71 (m, 6H)/2.92-2.70 (m, 5H)	52.28/51.95	7.56 (dd, $J=8.4$, 7.2Hz, 1H)	135.60
27	-	151.07	7.17 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	123.78
28	7.39-7.34 (m, 2H)	115.37	-	134.27
29	7.58-7.51 (m, 3H)	135.60	-	117.25
30	7.17 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H)	123.78	-	167.56
31	-	134.27	-	166.86
32	-	117.25	4.96 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.24
33	-	166.85	2.92-2.66 (m, 6H) / 2.16-2.07 (m, 1H)	22.84
34	-	167.55	2.92-2.66 (m, 6H)	31.56
35	4.96 (dd, $J=12.2$, 5.4Hz, 1H)	49.24	-	171.06
36	2.92-2.70 (m, 5H) / 2.18-2.08 (m, 1H)	22.84	-	168.35
37	2.92-2.70 (m, 5H)	31.56	-	-
38	-	168.37	-	-
39	-	171.09	-	-
NH₂		-	4.05 (s, 2H)	-
NH_{glutarimida}	8.24 (s, 1H)	-	8.18 (s, 1H)	-
NH_{amida}	9.65 (s, 1H)	-	9.32 (s, 1H)	-

Tabela 39. Deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **ARP-55** e **ARP-56**.

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	133.31	-	139.79
2	7.65-7.59 (m, 2H)	125.39	6.89 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H)	118.56
3	7.37 (dd, $J=8.4$, 2.1Hz , 1H)	124.60	7.28 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	124.85
4	-	-	-	125.33
5	7.90 (s, 1H)	122.86	7.68 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H)	123.25
6	-	137.70	-	134.28
7	-	136.00 (d, $J=3.2\text{Hz}$)	-	136.88 (d, $J=3.1\text{Hz}$)
8	7.54 (dd, $J=8.8$, 5.3Hz , 2H)	128.74 (d, $J=8.1\text{Hz}$)	7.50 (dd, $J=8.9$, 5.3Hz , 2H)	128.20 (d, $J=7.9\text{Hz}$)
9	7.10 (t, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)	115.74 (d, $J=21.5\text{Hz}$)	7.07 (t, $J=8.8\text{Hz}$, 2H)	115.60 (d, $J=21.4\text{Hz}$)
10	-	162.62 (d, $J=246.7\text{Hz}$)	-	162.17 (d, $J=245.5\text{Hz}$)
11	-	154.02	-	162.32
12	-	80.99	-	133.42
13	1.52 (s, 9H)	28.46	8.05 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.76
14	-	162.86	-	155.42
15	-	133.31	8.96 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.15
16	8.01 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	127.73	3.92-3.62 (m, 12H)	45.07/44.54
17	-	155.45	3.92-3.62 (m, 12H)	44.14/40.92

18	8.97 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H)	143.37	-	171.93
19	3.92-3.61 (m, 12H)	45.05/44.54	2.41-2.34 (m, 4H)	33.36
20	3.92-3.61 (m, 12H)	44.14/ 40.91	1.70-1.61 (m, 4H)	25.22
21	-	171.95	1.38 (s, 6H)	29.36
22	2.42-2.32 (m, 4H)	33.36	1.38 (s, 6H)	29.32
23	1.72-1.62 (m, 4H)	25.22	1.38 (s, 6H)	29.29
24	1.37 (s, 6H)	29.36	1.70-1.61 (m, 4H)	25.32
25	1.37 (s, 6H)	29.29	2.41-2.34 (m, 4H)	33.40
26	1.37 (s, 6H)	29.33	-	172.10
27	1.72-1.62 (m, 4H)	25.32	3.43-3.22 (m, 4H)	52.16/50.43
28	2.42-2.32 (m, 4H)	33.40	3.92-3.62 (m, 12H)	45.89/41.50
29	-	172.11	-	150.05
30	3.42-3.25 (m, 4H)	52.16/50.43	7.44 (dd, $J=7.2\text{Hz}$, 1H)	116.57
31	3.92-3.61 (m, 12H)	45.89/41.51	7.62 (dd, $J=8.3, 7.3\text{Hz}$, 1H)	135.99
32	-	150.04	7.16 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H)	123.51
33	7.44 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 1H)	116.58	-	134.28
34	7.65-7.59 (m, 2H)	136.00	-	118.16
35	7.16 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)	123.51	-	167.28
36	-	134.27	-	166.79
37	-	118.16	4.96 (dd, $J=12.3, 5.3\text{Hz}$, 1H)	49.35
38	-	167.28	2.94-2.69 (m, 3H) / 2.16-2.09 (m, 1H)	22.80
39	-	166.79	2.94-2.69 (m, 3H)	31.54
40	4.96 (dd, $J=12.3, 5.3, 1\text{H}$)	49.35	-	170.96
41	2.93-2.71 (m, 3H) / 2.16-2.09 (m, 1H)	22.80	-	168.27
42	2.93-2.71 (m, 3H)	31.54	-	-
43	-	171.00	-	-
44	-	168.28	-	-
NH ₂		-	4.06 (s, 2H)	-
NH _{glutarimida}	8.22 (s, 1H)	-	8.21 (s, 1H)	-
NH _{amida}	9.69 (s, 1H)	-	9.32 (s, 1H)	-

Como demonstrado nas tabelas acima, as PROTACs **ARP-47**, **ARP-49**, **ARP-53**, **ARP-54**, **ARP-55** e **ARP-56** apresentam a subunidade do inibidor de HDAC contendo o anel 4-fluorofenil, o que tem como objetivo torná-la mais seletiva em relação às HDACs 1 e 2. De forma geral, essa subunidade tem seus hidrogênios H_2 , H_3 e H_5 apresentados como duplete, duplete e duplete, todos integrando para um hidrogênio, nas regiões de 6.89, 7.28 e 7.68 ppm. A identificação desses hidrogênios é realizada através da análise das constantes de acoplamento, onde o hidrogênio H_2 apresenta constante em torno de 8Hz (acoplamento em *orto* com H_3), o hidrogênio H_3 apresenta constantes em torno de 8Hz e 2Hz (acoplamento em *orto* com H_2 e *meta* com H_5) e o hidrogênio H_5 apresenta constante em torno de 2Hz (acoplamento em *meta* com H_3). Os hidrogênios do anel 4-fluorofenil (H_8 e H_9) apresentam-se como duplo duplete e tripleto, em 7.50 e 7.07 ppm e ambos integrando para dois hidrogênios. Em relação às constantes de acoplamento, é interessante perceber que ambos os pares acoplam entre si, porém também com o átomo de flúor, sendo caracterizado pelas constantes de acoplamento dos hidrogênios H_8 (8.9Hz e 5.3Hz). O mesmo comportamento é visualizado no espectro de RMN de ^{13}C , onde todos os carbonos do anel apresentam-se o espectro como dupletos e constantes de acoplamento variando entre 245.5 à 3.1 Hz. Assim como foi visto para as PROTACs discutidas anteriormente, o grupamento amino na posição 1 é visualizado como um simpleto na região de 4.00 ppm, integrando para dois hidrogênios, e todos os sinais do anel aromático ligado diretamente a ele se deslocam para à direita do espectro, quando comparado aos compostos protegidos com o grupo Boc.

Para confirmação de que a purificação pós-tratamento com TFA foi realizada de forma efetiva, realizou-se RMN de ^{19}F de todas as PROTACs, o qual apresentou apenas o sinal do flúor contido na molécula e a ausência de TFA residual.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido para os compostos apresentados, obtendo-se os seguintes resultados:

ARP-47 – $[M+H]^+$ calculado para $C_{40}H_{41}N_9O_6F$: 762.3164, encontrado 761.3162;

ARP-49 - $[M+H]^+$ calculado para $C_{42}H_{43}N_9O_6F$: 788.3320, encontrado 788.3313;

ARP-53 - $[M+H]^+$ calculado para $C_{40}H_{43}N_9O_5F$: 748.3371, encontrado 748.3372;

ARP-56 - $[M+H]^+$ calculado para $C_{47}H_{52}N_{10}O_7F$: 887.4004, encontrado 887.4005;

ARP-58 - $[M+H]^+$ calculado para $C_{46}H_{53}N_9O_6F$: 846.4103, encontrado 846.4122.

Todas as PROTACs foram liofilizadas e, então, enviadas para ensaio biológico.

5.6. Ensaio de degradação de HDACs 1-3

Os compostos **ARP-20**, **ARP-25**, **ARP-26**, **ARP-27**, **ARP-37**, **ARP-39**, **ARP-42**, **ARP-47**, **ARP-49**, **ARP-53**, **ARP-54**, **ARP-56** e **ARP-58** foram avaliados de acordo com o ensaio de degradação de HDACs seguindo o protocolo descrito na seção de metodologias.

Os dados de degradação serão discutidos de acordo com os grupos de PROTACs e suas modificações no espaçador. Os ensaios foram realizados utilizando-se a PROTAC JPS004 (Figura 15) como controle positivo (SMALLEY *et al.*, 2020). Os valores acima das imagens de *western blot* representam a porcentagem da proteína.

As Figuras 44 e 45 apresentam os resultados de degradação de HDAC 1-3 dos compostos **ARP-20**, **ARP-25**, **ARP-37** e **ARP-42**, e a quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac.

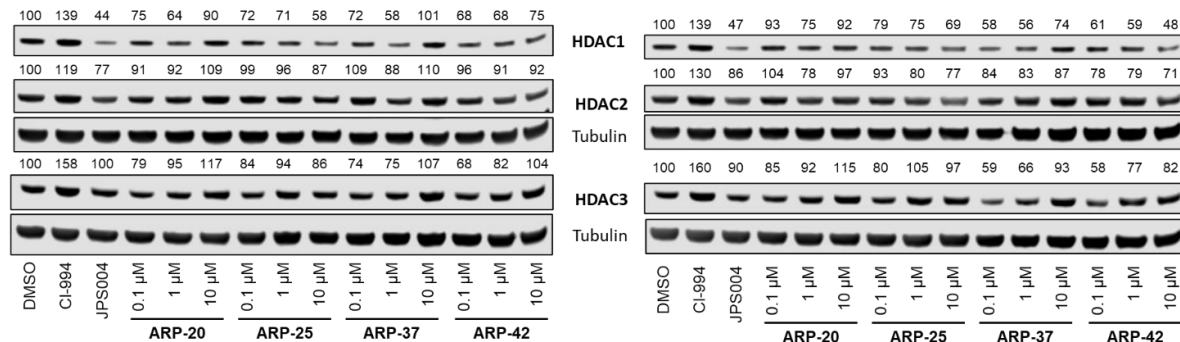


Figura 44. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M.

Fonte: Própria autora

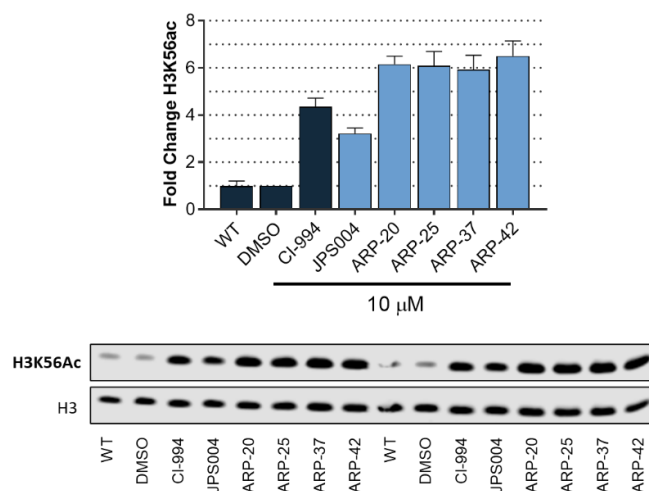


Figura 45. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac

Fonte: Própria autora

Esse grupo de compostos apresenta o espaçador com sete átomos, e modificações quanto ao tipo de ligação e rigidez conformacional. É possível perceber que as moléculas apresentadas são capazes de degradar a HDAC-1 com certa seletividade quando comparada aos valores apresentados para HDAC-2 e HDAC-3. Em relação aos compostos **ARP-20** e **ARP-37**, vê-se que na concentração de 10 μ M a quantidade de HDAC-1 volta a aumentar, o que pode ser explicado pelo efeito denominado “hook effect”. Tal efeito ocorre quando a concentração do composto atinge um patamar onde não mais se forma o complexo ternário e a PROTAC se liga a E3-ligase e a proteína de interesse separadamente. Deste grupo de compostos, destaca-se o composto **ARP-37** como sendo o mais promissor por ser capaz de degradar 43% da HDAC-1 na concentração de 1,0 μ M. O composto **ARP-37** apresenta em seu espaçador um anel alifático que aumenta a rigidez da estrutura e um grupamento amida entre o espaçador e a subunidade do inibidor de HDAC.

Em relação ao aumento da acetilação da lisina H3K56Ac, percebe-se que os quatro compostos foram capazes de aumentar em, aproximadamente, seis vezes os níveis de acetilação, sendo esse valor maior do que o obtido para o controle positivo. Esse efeito é, provavelmente, devido à soma da degradação da HDAC-1 e também à atuação da PROTAC apenas como inibidor.

As Figuras 46 e 47 apresentam os dados de degradação de HDACs 1-3 dos compostos **ARP-26**, **ARP-27** e **ARP-39** e os dados de quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac.

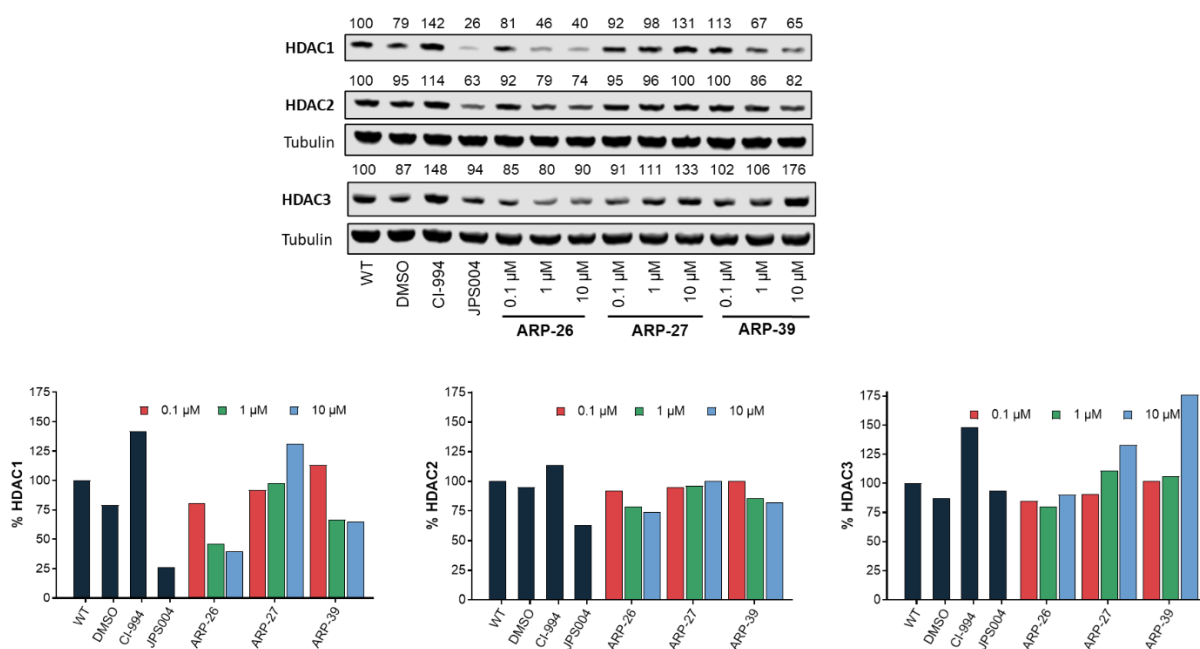


Figura 46. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M.

Fonte: Própria autora

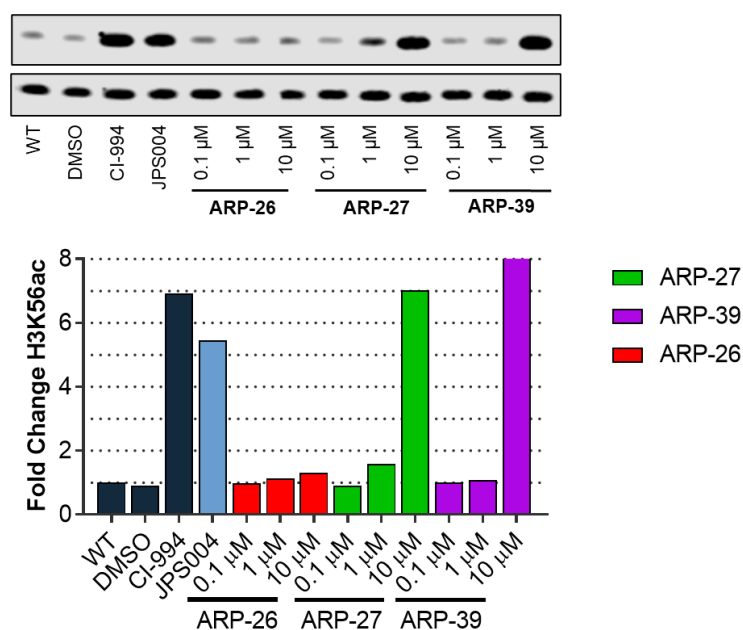


Figura 47. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac

Fonte: Própria autora

Os compostos **ARP-26**, **ARP-27** e **ARP-39** apresentam espaçadores com treze átomos de e modificações quanto a rigidez conformacional. Dentro desse grupo, é possível perceber

novamente que a degradação das enzimas apresenta seletividade contra HDAC-1. Além disso, o composto **ARP-27** não foi capaz de degradar nenhuma das três HDACs avaliadas. Destaca-se desse grupo o composto **ARP-26** o qual apresenta significativa degradação da HDAC-1, chegando a 54 e 60% de degradação à 1,0 μM e 10 μM . É interessante perceber que apenas os compostos **ARP-27** e **ARP-39** a 10 μM foram capazes de aumentar a acetilação da lisina avaliada, mesmo não apresentando capacidade significativa de degradação das HDACs. Já o composto **ARP-26** não foi capaz de aumentar a acetilação da lisina. As HDACs 1 e 2 não atuam de forma isolada dentro da célula. Existem seis complexos nos quais são encontradas as estruturas das HDACs 1 e 2 (CoREST, NuRD, MiDAC, RERE e MIER) (MILLARD *et al.*, 2017). Sendo assim, existe a possibilidade de que a PROTAC **ARP-26** atue degradando a HDAC-1 de um complexo que não esteja envolvido com a acetilação/deacetilação da lisina H3K56Ac. Seriam necessários estudos adicionais para comprovação desse evento.

As Figuras 48 e 49 apresentam os dados de degradação de HDACs 1-3 dos compostos **ARP-47**, **ARP-53** e **ARP-58** e os dados de quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac.

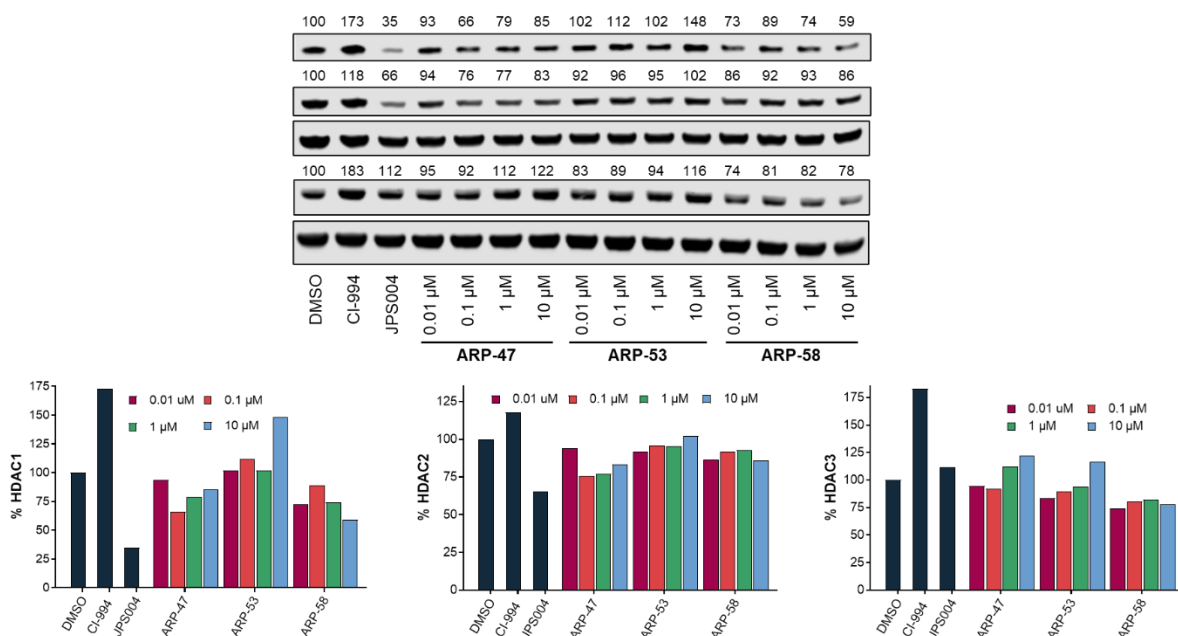


Figura 48. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,1 μM , 1,0 μM e 10 μM .

Fonte: Própria autora

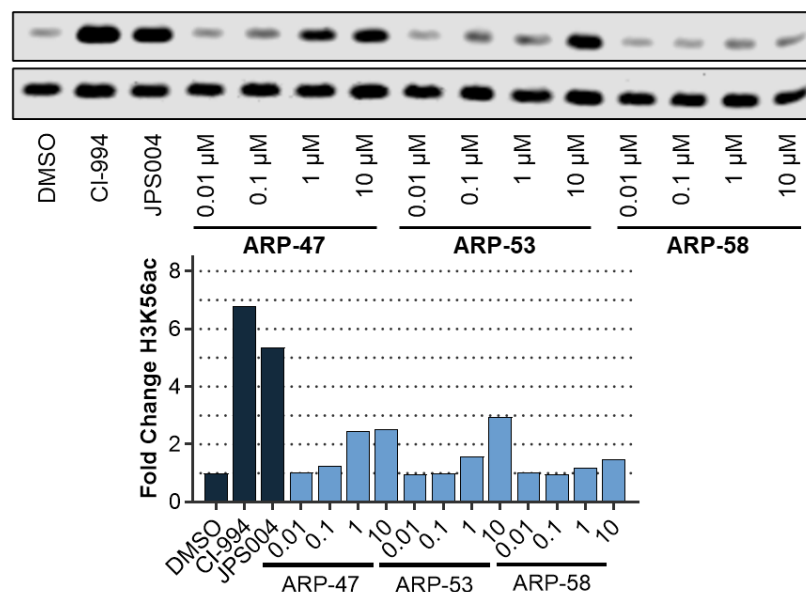


Figura 49. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac

Fonte: Própria autora

Esse grupo de PROTACs possui o inibidor de HDAC seletivo, o qual apresenta o anel 4-fluorofenila na posição para em relação ao grupo amino da 2-aminobenzamida. As PROTACs **ARP-47** e **ARP-53** possuem espaçadores de sete átomos, sendo diferenciadas pela ligação entre o espaçador e o inibidor de HDAC (amida e amina, respectivamente). O composto **ARP-58** apresenta um espaçador com cadeia alifática de doze carbonos e a ligação amida entre o espaçador e o inibidor de HDAC. Neste caso, o composto **ARP-53** não foi capaz de degradar nenhuma das HDACs avaliadas de forma significativa, enquanto seu análogo **ARP-47** apresentou degradação de 34% da HDAC-1 a 1 μM. Com esse resultado pode se sugerir que a ligação amina entre espaçador e inibidor não é promissora, provavelmente devido ao fato da flexibilidade e geometria dessa ligação conferida à molécula. O composto **ARP-58** foi o mais promissor desse grupo, apresentando degradação de 44% da HDAC-1. Nenhum dos compostos foi capaz de aumentar a acetilação da lisina em valores comparados ao controle positivo.

As Figuras 50 e 51 apresentam os dados de degradação de HDACs 1-3 dos compostos **ARP-49**, **ARP-54** e **ARP-56** e os dados de quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac.

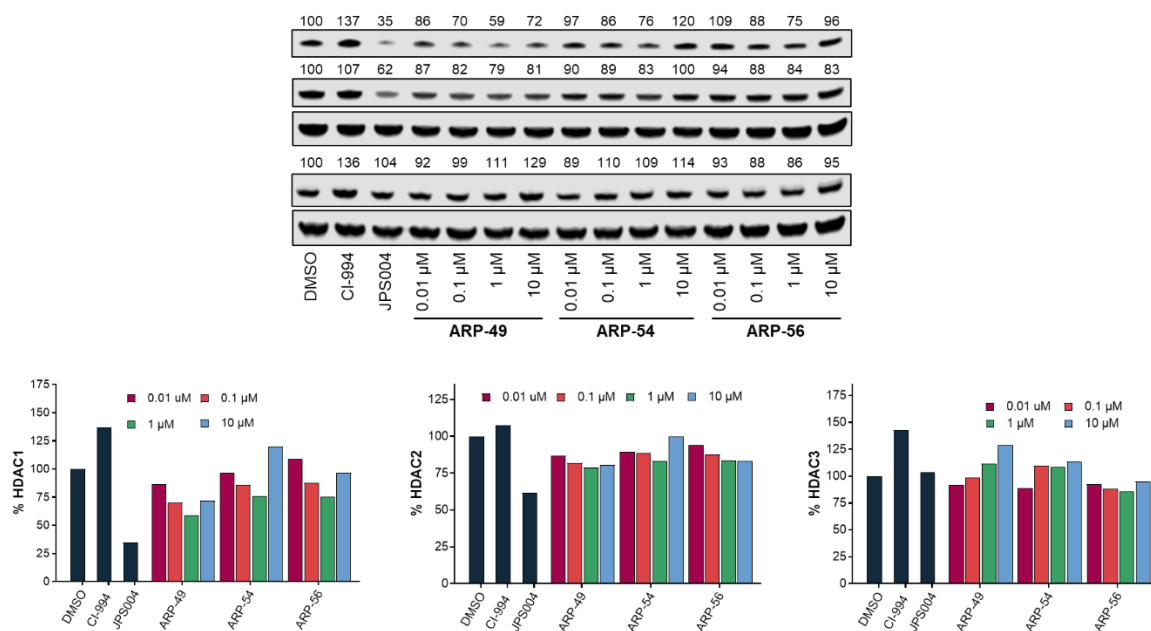


Figura 50. Avaliação da degradação das HDACs 1-3 em concentrações de 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1,0 μ M e 10 μ M.

Fonte: Própria autora

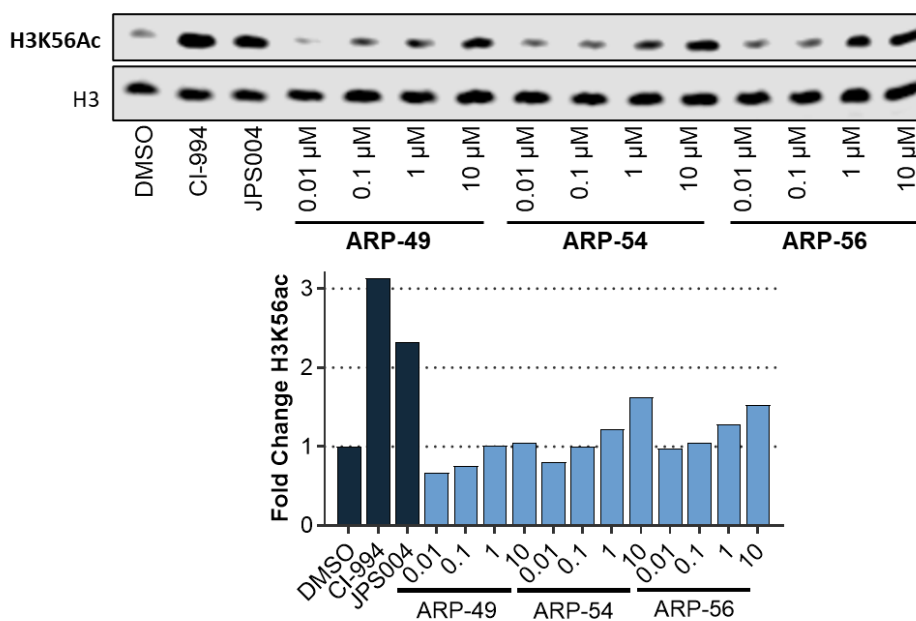


Figura 51. Quantificação da acetilação da lisina H3K56Ac

Fonte: Própria autora

Deste grupo de compostos, pode-se perceber que as PROTACs **ARP-54** e **ARP-56** não são capazes de promover a degradação de forma significativa de nenhuma das três HDACs avaliadas. O composto **ARP-49** promove a degradação de 41% da HDAC-1 a 1,0 μM , e o máximo que promove de degradação das HDACs 2 e 3 é de 21% e 9%, respectivamente, mostrando sua seletividade contra HDAC-1. Nenhuma das três moléculas foi capaz de aumentar a acetilação da lisina em mais do que 1,5 vezes, aproximadamente.

Com os dados apresentados, selecionou-se as moléculas **ARP-26**, **ARP-37** e **ARP-49** para avaliação de DC_{50} onde se avalia os compostos em 10 concentrações diferentes, variando-se entre 0,001 e 10 μM . As Figuras 52 e 53 apresentam os resultados obtidos para os compostos **ARP-26** e **ARP-49**. A avaliação da molécula **ARP-37** está em andamento.

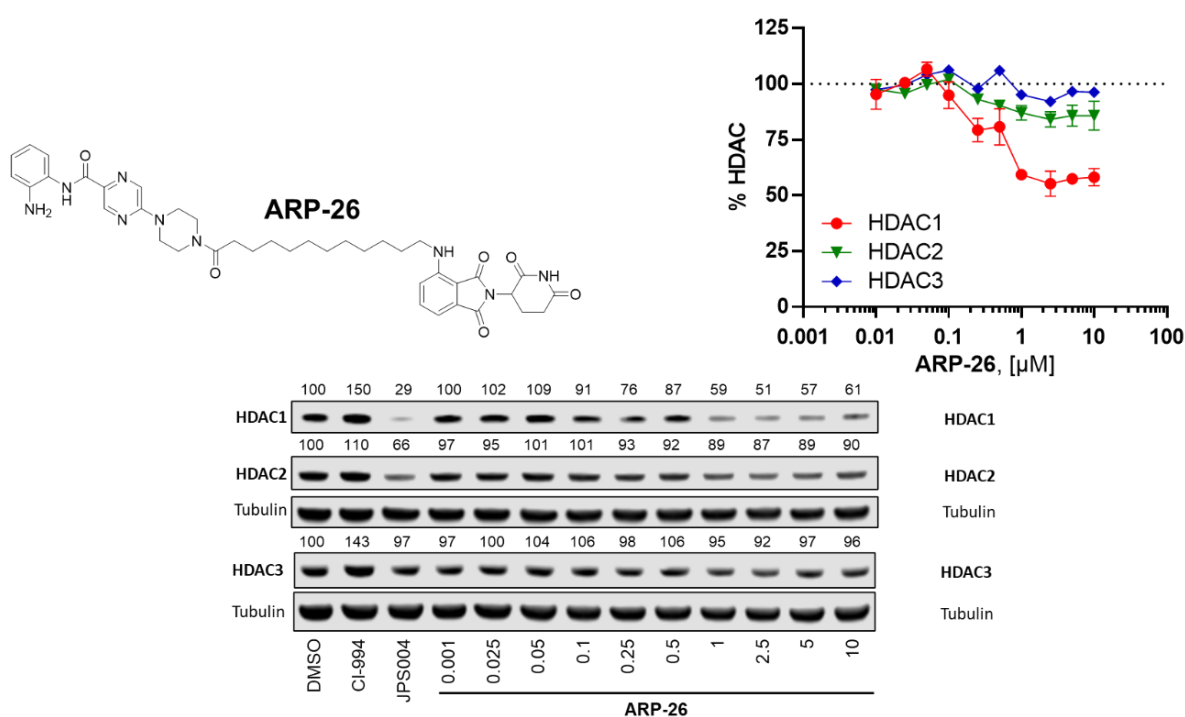


Figura 52. Avaliação de DC_{50} do composto **ARP-26**

Fonte: Própria autora

Através do gráfico apresentado na Figura 52 é possível ver que a degradação promovida pelo composto **ARP-26** é seletiva contra HDAC-1, chegando a 49% de degradação a 2,5 μM . A

quantificação de HDAC-2 mostra que existe degradação desta, porém chega apenas a 13% na concentração de 2,5 μM e 8% contra HDAC-3 na mesma concentração. Em relação à HDAC-1, o “hook effect” começa a ser observado a partir da concentração de 5 μM .

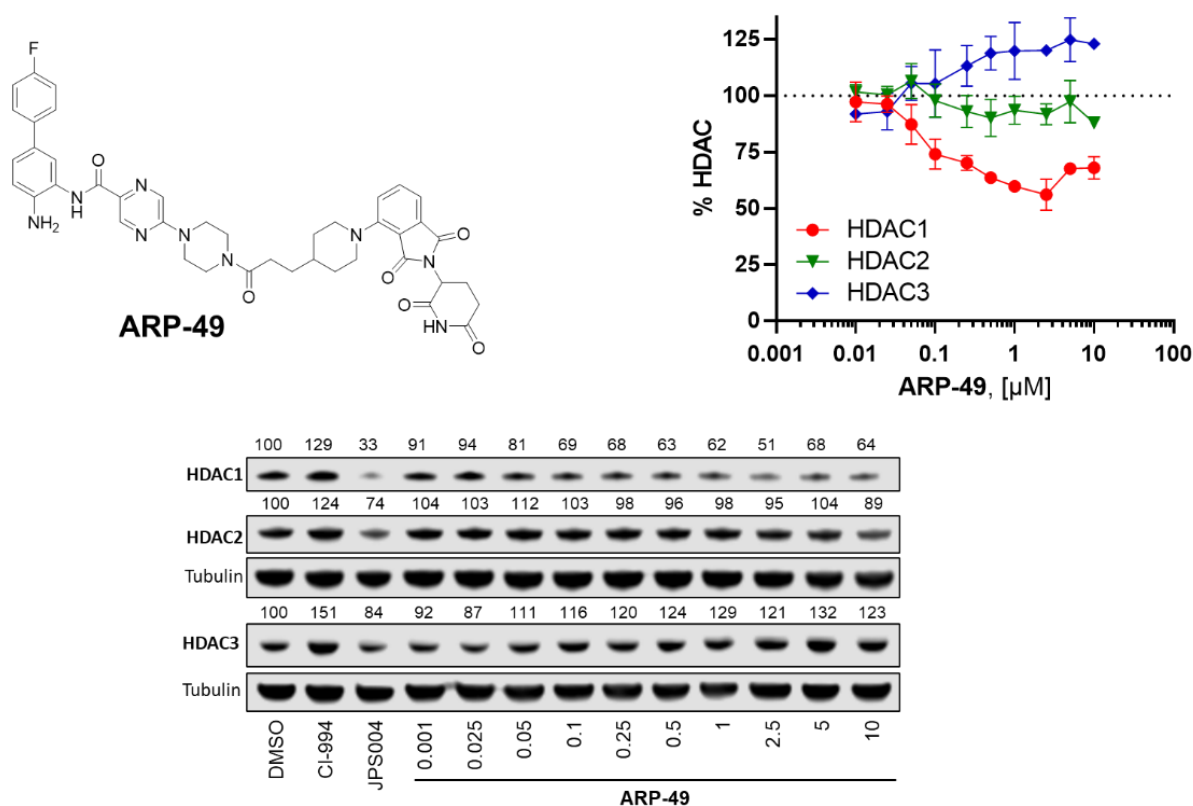


Figura 53. Avaliação de DC_{50} do composto **ARP-49**

Fonte: Própria autora

No caso da molécula **ARP-49** a seletividade contra HDAC-1 é ainda mais evidente, chegando também à 49% de degradação à 2,5 μM . A degradação da HDAC-2 é ainda menor, chegando a 5% na mesma concentração e, de forma concentração dependente, é capaz de aumentar a as quantidades de HDAC-3. O “hook effect” também começa a ser observado a partir de 5 μM . É possível que a seletividade contra a HDAC-1 foi observada devido à presença do anel 4-fluorofenila, porém ainda são necessários mais ensaios para comprovar tal efeito.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram planejados, sintetizados e caracterizados novos inibidores seletivos contra HDAC-1 e 2 além das PROTACs inéditas para degradação das mesmas enzimas, com o objetivo de avaliá-los como novos indutores de expressão de γ -globina e analisar a aplicação dos mesmos como candidatos ao tratamento da anemia falciforme. Para os inibidores de HDAC, foram obtidos vinte e quatro intermediários e sete produtos finais inéditos ((**18**), (**19**), (**20**), (**21**), (**29**), (**30**), e (**31**)) com rendimentos que variaram entre 29 e 85%, enquanto em relação às PROTACs foram obtidos quarenta intermediários e treze produtos finais (**ARP-20**, **ARP-25**, **ARP-26**, **ARP-27**, **ARP-37**, **ARP-39**, **ARP-42**, **ARP-47**, **ARP-49**, **ARP-53**, **ARP-54**, **ARP-56** e **ARP-58**) com rendimentos que variaram entre 30 e 93%.

Em relação aos inibidores de HDAC, foram obtidos dois compostos promissores (**21**) e (**31**) que apresentaram valores de IC_{50} contra HDAC-1 de 17 nM e 95 nM, respectivamente, e contra HDAC-2 de 39 nM e 940 nM, respectivamente. Quando avaliados contra outras HDACs da mesma classe e HDACs de outras classes, ambas as estruturas apresentaram baixos valores de inibição, o que indica a seletividade desses compostos contra as enzimas alvo deste trabalho. Em relação à avaliação da viabilidade celular, todos os compostos apresentaram células viáveis em níveis próximos a 80%, indicando inicialmente baixa toxicidade desses compostos quando utilizados em células K562. Dados preliminares sugerem que o maior índice de expressão de γ -globina alcançado foi entre 6 e 7 vezes de aumento para ambos os compostos e foi atingido na concentração de 1 μ M, modificando-se apenas o tempo de tratamento, sendo 72h para o composto (**21**) e 96h para o composto (**31**).

Todas as PROTACs obtidas foram avaliadas quanto aos níveis de degradação de HDAC-1-3 e acetilação da lisina H3K56Ac. Destacaram-se os compostos **ARP-26**, **ARP-37** e **ARP-49** com níveis de degradação de HDAC-1 que variou entre 40 e 60% e apresentaram os seguintes espaçadores: treze átomos sendo uma cadeia alifática composta por doze carbonos e ligação amida para conexão entre o espaçador e o inibidor de HDAC (**ARP-26**); anel alifático com ligação de amida conectando o espaçador ao inibidor de HDAC (**ARP-37** e **ARP-49**). O composto **ARP-49** apresenta o anel 4-fluorofenila na subunidade do inibidor de HDAC. Com esses resultados foi possível

concluir que, de forma geral, os compostos que apresentaram algum nível de degradação de proteína, o mesmo apresentava tendência de seletividade em relação à HDAC-1, o que ficou mais evidente com os compostos citados. Além disso, foi possível concluir também que ligações amina na conexão entre espaçador e inibidor não foram promissoras.

Por fim, conclui-se que neste trabalho foi possível a obtenção de inibidores seletivos contra HDAC-1 e 2, sendo o composto **(31)** dez vezes mais seletivo contra HDAC-1, quando comparada a HDAC-2, resultado ainda não antes publicado para compostos inibidores de HDAC utilizados para indução de γ -globina. Além disso, os compostos **(21)** e **(31)** alcançaram níveis de indução de γ -globina mais altos do que os apresentados pelo fármaco utilizado na terapia atualmente, evidenciando-os como excelentes candidatos para continuação dos estudos para torná-los candidatos a fármacos para o tratamento da AF. Em relação às PROTACs, os resultados obtidos neste trabalho são inéditos na literatura em relação à degradação à HDAC-1, o que os torna excelentes candidatos à avaliação dos mesmos quanto à indução de γ -globina e o entendimento da aplicação desta tecnologia para o tratamento da AF.

7. REFERÊNCIAS

ABDULMALIK, O.; PAGARE, P. P.; HUANG, B.; XU, G. G.; GHATGE, M. S.; XU, X.; CHEN, Q.; ANABARAONYE, N.; MUSAYEV, F. N.; OMAR, A. M.; VENITZ, J.; ZHANG, Y.; SAFO, M. K. VZHE-039, a novel antisickling agent that prevents erythrocyte sickling under both hypoxic and anoxic conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

ABID, S.; KEBE, K.; HOUSSAÏNI, A.; TOMBERLI, F.; MARCOS, E.; BIZARD, E.; BREAU, M.; PARPALEIX, A.; TISSOT, C. M.; MAITRE, B.; LIPSKAIA, L.; DERUMEAUX, G.; BASTIA, E.; MEKONTSO-DESSAP, A.; ADNOT, S. New Nitric Oxide Donor NCX 1443: Therapeutic Effects on Pulmonary Hypertension in the SAD Mouse Model of Sickle Cell Disease. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 283–292, 2018.

ABU-SALAH, K. M.; GAMBO, A. H. A. An analysis of the mechanism by which cetiedil inhibits sickling. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1003–1011, 2002.

AMM, I.; SOMMER, T.; WOLF, D. H. Protein quality control and elimination of protein waste: The

role of the ubiquitin-proteasome system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 1, p. 182–196, 2014.

ATAGA, K. I.; KUTLAR, A.; KANTER, J.; LILES, D.; CANCADO, R.; FRIEDRISCH, J.; GUTHRIE, T. H.; KNIGHT-MADDEN, J.; ALVAREZ, O. A.; GORDEUK, V. R.; GUALANDRO, S.; COLELLA, M. P.; SMITH, W. R.; ROLLINS, S. A.; STOCKER, J. W.; ROTHER, R. P. Crizanlizumab for the prevention of pain crises in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 5, p. 429–439, 2017.

BÉKÉS, M.; LANGLEY, D. R.; CREWS, C. M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 3, p. 181–200, 2022.

BEMIS, T. A.; LA CLAIR, J. J.; BURKART, M. D. Unraveling the Role of Linker Design in Proteolysis Targeting Chimeras. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 8042–8052, 2021.

BIELIAUSKAS, A. V.; KAY, M.; PFLUM, H. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 1, p. 1402–1413, 2008.

BLAIR, H. A. Crizanlizumab: First Approval. **Drugs**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 79–84, 2020.

BLYDEN, G.; BRIDGES, K. R.; BRONTE, L. Case series of patients with severe sickle cell disease treated with voxelotor (GBT440) by compassionate access. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 8, p. E188–E190, 2018.

BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 769–784, 2006.

BRADNER, J. E.; MAK, R.; TANGUTURI, S. K.; MAZITSCHKE, R.; HAGGARTY, S. J.; ROSS, K.; CHANG, C. Y.; BOSCO, J.; WEST, N.; MORSE, E.; LIN, K.; SHEN, J. P.; KWIATKOWSKI, N. P.; GHELDOLF, N.; DEKKER, J.; DEANGELO, D. J.; CARR, S. A.; SCHREIBER, S. L.; GOLUB, T. R.; EBERT, B. L. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 107, p. 12617–12622, 2010.

BRADNER, James E.; MAK, R.; TANGUTURI, S. K.; MAZITSCHKE, R.; HAGGARTY, S. J.; ROSS, K.; CHANG, C. Y.; BOSCO, J.; WEST, N.; MORSE, E.; LIN, K.; SHEN, J. P.; KWIATKOWSKI, N. P.; GHELDOLF,

N.; DEKKER, J.; DEANGELO, D. J.; CARR, S. A.; SCHREIBER, S. L.; GOLUB, T. R.; EBERT, B. L. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, p. 12617–12622, 2010.

BRIEHL, R. W. Rheology of hemoglobin S gels: possible correlation with impaired microvascular circulation. **American Journal of Pediatric Hematology Oncology**, v. 5, p. 390–398, 1983.

BROWNSEY, D. K.; ROWLEY, B. C.; GOROBETS, E.; GELFAND, B. S.; DERKSEN, D. J. Rapid synthesis of pomalidomide-conjugates for the development of protein degrader libraries. **Chemical Science**, v. 12, n. 12, p. 4519–4525, 2021.

BRUGNARA, C.; GEE, B.; ARMSBY, C. C.; KURTH, S.; SAKAMOTO, M.; RIFAI, N.; ALPER, S. L.; PLATT, O. S. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 5, p. 1227–1234, 1996.

BUCKLEY, D. L.; VAN MOLLE, I.; GAREISS, P. C.; TAE, H. S.; MICHEL, J.; NOBLIN, D. J.; JORGENSEN, W. L.; CIULLI, A.; CREWS, C. M. Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 α interaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 10, p. 4465–4468, 2012.

BURSLEM, G. M.; CREWS, C. M. Proteolysis Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. **Cell**, v. 181, p. 102–114, 2020.

BUTLER, K. V.; KOZIKOWSKI, A. P. Chemical origins of isoform selectivity in histone deacetylase inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 505–528, 2008.

CAI, J.; WEI, H.; HONG, K. H.; WU, X.; CAO, M.; ZONG, X.; LI, L.; SUN, C.; CHEN, J.; JI, M. Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 1–13, 2015.

CANALLI, A. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric

oxide donation. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 605–609, 2008.

CARR, B. I.; RAHBAR, S.; ASMERON, Y.; RIGGS, A.; WINBERG, C. D. Carcinogenicity and haemoglobin synthesis induction by cytidine analogues. **British Journal of Cancer**, v. 57, n. 4, p. 395–402, 1988.

CARR, B. I.; REILLY, J. G.; SMITH, S. S.; WINBERG, C.; RIGGS, A. The tumorigenicity of 5-azacytidine in the male Fischer rat. **Carcinogenesis**, v. 5, p. 1583–1590, 1984.

CHAKRAVORTY, S.; WILLIAMS, T. N. Sick cell disease: A neglected chronic disease of increasing global health importance. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, n. 1, p. 48–53, 2015.

COKIC, V. P.; SMITH, R. D.; BELESLIN-COKIC, B. B.; NJOROGI, J. M.; MILLER, J. L.; GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal Clinical Investigation**, v. 111, p. 231–239, 2003.

CONITEC. **MEDICAMENTOS para o tratamento de Doença Falciforme**. Brasil: 2022.

DASTMALCHI, S. .; HAMZEH-MIVEHROUD, M.; SOKOUTI, B. Applied Case Studies and Solutions in Molecular Docking-Based Drug Design. **Hershey PA: Medical Information Science Reference**, 2016.

DESIMONE, J.; HELLER, P.; HALL, L.; ZWIERS, D. 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 14 I, p. 4428–4431, 1982.

DESIMONE, J.; KOSHY, M.; DORN, L.; LAVELLE, D.; BRESSLER, L.; MOLOKIE, R.; TALISCHY, N. Maintenance of elevated fetal hemoglobin levels by decitabine during dose interval treatment of sickle cell anemia. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 3905–3908, 2002.

DI MICCO, Simone; CHINI, M. G.; TERRACCIANO, S.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; BIFULCO, G. Structural basis for the design and synthesis of selective HDAC inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3795–3807, 2013.

DI MICCO, S.; CHINI, M. G.; TERRACCIANO, S.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; BIFULCO, G. Structural basis for the design and synthesis of selective HDAC inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 21,

p. 3795–3807, 2013.

DO NASCIMENTO, A. J.; HENNEBERG, R.; OTUKI, M. F.; FURMAN, A. E. F.; HERMANN, P.; LEONART, M. S. S. Protective effect of favonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 52–55, 2013.

DOVER, G. J.; BRUSILOW, S.; CHARACHE, S. Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. **Blood**, v. 84, p. 339–343, 1994.

DUFU, K.; PATEL, M.; OKSENBERG, D.; CABRALES, P. GBT440 improves red blood cell deformability and reduces viscosity of sickle cell blood under deoxygenated conditions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 70, n. 1, p. 95–105, 2018.

DULMOVITS, B. M.; APPIAH-KUBI, A. O.; PAPOIN, J.; HALE, J.; HE, M.; AL-ABED, Y.; DIDIER, S.; GOULD, M.; HUSAIN-KRAUTTER, S.; SINGH, S. A.; CHAN, K. W. H.; VLACHOS, A.; ALLEN, S. L.; TAYLOR, N.; MARAMBAUD, P.; AN, X.; GALLAGHER, P. G.; MOHANDAS, N.; LIPTON, J. M.; LIU, J. M.; BLANC, L. Pomalidomide reverses γ -globin silencing through the transcriptional reprogramming of adult hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 127, p. 1481–1492, 2016.

EATON, W. A. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 2, p. 205–211, 2020.

ESRICK, E. B.; MCCONKEY, M.; LIN, K.; FRISBEE, A.; EBERT, B. L. Inactivation of HDAC1 or HDAC2 induces gamma globin expression without altering cell cycle or proliferation. **American Journal Hematology**, v. 90, p. 624–628, 2015.

ESTIU, G.; GREENBERG, E.; HARRISON, C. B.; KWIATKOWSKI, N. P.; MAZITSCHKE, R.; BRADNER, J. E.; WIEST, O. Structural origin of selectivity in class II-selective histone deacetylase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2898–2906, 2008.

FIBACH, E.; PRUS, E.; BIANCHI, N.; ZUCCATO, C.; BREVEGLIERI, G.; SALVATORI, F.; FINOTTI, A.; DI PAOLA, M. L.; BROGNARA, E.; LAMPRONTI, I.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R. Resveratrol: Antioxidant activity and induction of fetal hemoglobin in erythroid cells from normal donors and

β -thalassemia patients. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 29, n. 6, p. 974–982, 2012.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sick cell disease: Old discoveries, new concepts, and future promise. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 850–58, 2007.

FRIESNER, R. A.; MURPHY, R. B.; REPASKY, M. P.; FRYE, L. L.; GREENWOOD, J. R.; HALGREN, T. A.; SANSCHAGRIN, P. C.; MAINZ, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein - Ligand Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6177–6196, 2006.

GOPALSAMY, A.; AULABAUGH, A. E.; BARAKAT, A.; BEAUMONT, K. C.; CABRAL, S.; CANTERBURY, D. P.; CASIMIRO-GARCIA, A.; CHANG, J. S.; CHEN, M. Z.; CHOI, C.; DOW, R. L.; FADEYI, O. O.; FENG, X.; FRANCE, S. P.; HOWARD, R. M.; JANZ, J. M.; JASTI, J.; JASUJA, R.; JONES, L. H.; KING-AHMAD, A.; KNEE, K. M.; KOHRT, J. T.; LIMBERAKIS, C.; LIRAS, S.; MARTINEZ, C. A.; MCCLURE, K. F.; NARAYANAN, A.; NARULA, J.; NOVAK, J. J.; O'CONNELL, T. N.; PARIKH, M. D.; PIOTROWSKI, D. W.; PLOTNIKOVA, O.; ROBINSON, R. P.; SAHASRABUDHE, P. V.; SHARMA, R.; THUMA, B. A.; VASA, D.; WEI, L.; WENZEL, A. Z.; WITHKA, J. M.; XIAO, J.; YAYLA, H. G. PF-07059013: A Noncovalent Modulator of Hemoglobin for Treatment of Sick Cell Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 326–342, 2021.

HAMBLETT, C. L.; METHOT, J. L.; MAMPREIAN, D. M.; SLOMAN, D. L.; STANTON, M. G.; KRAL, A. M.; FLEMING, J. C.; CRUZ, J. C.; CHENARD, M.; OZEROVA, N.; HITZ, A. M.; WANG, H.; DESHMUKH, S. V.; NAZEF, N.; HARSCH, A.; HUGHES, B.; DAHLBERG, W. K.; SZEWCZAK, A. A.; MIDDLETON, R. E.; MOSLEY, R. T.; SECRIST, J. P.; MILLER, T. A. The discovery of 6-amino nicotinamides as potent and selective histone deacetylase inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 5300–5309, 2007.

HARRINGTON, D. J.; ADACHI, K.; ROYER, W. E. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 3, p. 398–407, 1997.

HEBBEL, R. P. Adhesion of sickle red cells to endothelium: myths and future directions. **Societe francaise de transfusion sanguine**, v. 15, p. 8–14, 2008.

HEBBEL, R. P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 83–86, 1997.

HOWARD, J.; HEMMAWAY, C. J.; TELFER, P.; LAYTON, D. M.; PORTER, J.; AWOGBADE, M.; MANT, T.; GRETHER, D. D.; DUFU, K.; HUTCHALEELAHA, A.; PATEL, M.; SIU, V.; DIXON, S.; LANDSMAN, N.; TONDA, M.; LEHRER-GRAIWER, J. A phase 1/2 ascending dose study and open-label extension study of voxelotor in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 133, n. 17, p. 1865–1875, 2019.

HUANG, J.; HADIMANI, S. B.; RUPON, J. W.; BALLAS, S. K.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Iron nitrosyl hemoglobin formation from the reactions of hemoglobin and hydroxyurea. **Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 2466–2474, 2002.

HUANG, J.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 3495–3501, 2004.

HUANG, J.; SOMMERS, E. M.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 13, p. 3473–3480, 2002.

HUTCHALEELAHA, A.; PATEL, M.; WASHINGTON, C.; SIU, V.; ALLEN, E.; OKSENBERG, D.; GRETHER, D. D.; MANT, T.; LEHRER-GRAIWER, J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of voxelotor (GBT440) in healthy adults and patients with sickle cell disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 1290–1302, 2019.

IBRAHIM, H. S.; ABDELSALAM, M.; ZEYN, Y.; ZEISSIN, M.; MUSTAFA, A. H. M.; FISCHER, M. A.; ZEYEN, P.; SUN, P.; BÜLBÜL, E. F.; VECCHIO, A.; ERDMANN, F.; SCHMIDT, M.; ROBAA, D.; BARINKA, C.; ROMIER, C.; SCHUTKOWSKI, M.; KRÄMER, O. H.; SIPPL, W. Synthesis, Molecular Docking and Biological Characterization of Pyrazine Linked 2-Aminobenzamides as New Class I Selective Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors with Anti-Leukemic Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 1–34, 2022.

INCALZA, M. A.; D'ORIA, R.; NATALICCHIO, A.; PERRINI, S.; LAVIOLA, L.; GIORGINO, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018.

INGRAM, V. M. A Specific Chemical Difference Between the Globins of Normal Human and Sickle-Cell Anemia Hæmoglobin. **Nature**, v. 178, p. 792–794, 1956.

ITOH, Y.; SUZUKI, T.; MIYATA, N. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 529–544, 2008.

JOHNSTONE, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nature Review Drug Discovery**, v. 1, p. 287–299, 2002.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KATO, G. J.; PIEL, F. B.; REID, C. D.; GASTON, M. H.; OHENE-FREMPONG, K.; KRISHNAMURTI, L.; SMITH, W. R.; PANEPINTO, J. A.; WEATHERALL, D. J.; COSTA, F. F.; VICHINSKY, E. P. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18010, 2018.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.

KOSHY, M.; DORN, L.; BRESSLER, L.; MOLOKIE, R.; LAVELLE, D.; TALISCHY, N.; HOFFMAN, R.; VAN OVERVELD, W.; DESIMONE, J. 2-Deoxy 5-azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2379–2384, 2000.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, p. 693–705, 2007.

KUTLAR, A.; KANTER, J.; LILES, D. K.; ALVAREZ, O. A.; CANÇADO, R. D.; FRIEDRISCH, J. R.; KNIGHT-MADDEN, J. M.; BRUEDERLE, A.; SHI, M.; ZHU, Z.; ATAGA, K. I. Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: A SUSTAIN study analysis. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 1, p. 55–61, 2019.

KUTLAR, A.; REID, M. E.; INATI, A.; TAHER, A. T.; ABBOUD, M. R.; EL-BESHLAWY, A.; BUCHANAN, G. R.; SMITH, H.; ATAGA, K. I.; PERRINE, S. P.; GHALIE, R. G. A dose-escalation phase IIa study of 2,2-dimethylbutyrate (HQQ-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 88, p. 255–260, 2013.

LANARO, C.; PENTEADO, C. F. F.; ALBUQUERQUE, D. M.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 235–242, 2009.

LAVELLE, D.; CHIN, J.; VAITKUS, K.; REDKAR, S.; PHIASIVONGSA, P.; TANG, C.; WILL, R.; HANKEWYCH, M.; ROXAS, B.; SINGH, M.; SAUNTHARARAJAH, Y.; DESIMONE, J. Oral decitabine reactivates expression of the methylated γ -globin gene in *Papio anubis*. **American Journal of Hematology**, v. 82, n. 11, p. 981–985, 2007.

LUBECK, D.; AGODOA, I.; BHAKTA, N.; DANESE, M.; PAPPU, K.; HOWARD, R.; GLEESON, M.; HALPERIN, M.; LANZKRON, S. Estimated Life Expectancy and Income of Patients With Sickle Cell Disease Compared With Those Without Sickle Cell Disease. **Journal of the American Medical Association network open**, v. 2, n. 11, p. e1915374, 2019.

LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251–260, 1998.

MALAVÉ, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E. ANCHUSTEGUI, M. MALAVÉ, H.; ARENDS, T. Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematologica**, v. 90, p. 172–176, 1993.

METHOT, J. L.; HAMBLETT, C. L.; MAMPREIAN, D. M.; JUNG, J.; HARSCH, A.; SZEWCZAK, A. A.; DAHLBERG, W. K.; MIDDLETON, R. E.; HUGHES, B.; FLEMING, J. C.; WANG, H.; KRAL, A. M.; OZEROVA, N.; CRUZ, J. C.; HAINES, B.; CHENARD, M.; KENIFIC, C. M.; SECRIST, J. P.; MILLER, T. A. SAR profiles of spirocyclic nicotinamide derived selective HDAC1/HDAC2 inhibitors (SHI-1:2). **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6104–6109, 2008.

MILLARD, C. J.; WATSON, P. J.; FAIRALL, L.; SCHWABE, J. W. R. Targeting Class I histone deacetylases in a “complex” environment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, p. 363–377, 2017.

MORADEI, O. M.; MALLAIS, T. C.; FRECHETTE, S.; PAQUIN, I.; PIERRE, E.; LEIT, S. M.; FOURNEL, M.; BONFILS, C.; LIU, J.; YAN, T. P.; LU, A.; RAHIL, J.; WANG, J.; LEFEBVRE, S. Supporting Information:

Novel Aminophenyl Benzamide Type Histone Deacetylase Inhibitors with Enhanced Potency and Selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 5543–5546, 2007.

MOTA, F. M.; JÚNIOR, M. A. F.; POMPEO, C. M.; FROTA, O. P.; TSUHA, D. H.; SOUZA, A. S. de. Análise da tendência temporal da mortalidade por anemia falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem - REBEn**, v. 75, n. 4, p. 1–8, 2022.

NAHAVANDI, M.; PERLIN, E.; KASSIM, O.; WYCHE, M. O. .; CASTRO, O. .; TAVAKKOLI, F. Upregulation of TNF_ by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 96, p. 14, 2000.

NIIHARA, Y. L-Glutamine Therapy Reduces Hospitalization for Sickle Cell Anemia and Sickle β^0 -Thalassemia Patients at Six Months – A Phase II Randomized Trial. **Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 1000116, 2014.

NIIHARA, Y.; MILLER, S. T.; KANTER, J.; LANZKRON, S.; SMITH, W. R.; HSU, L. L.; GORDEUK, V. R.; VISWANATHAN, K.; SARNAIK, S.; OSUNKWO, I.; GUILLAUME, E.; SADANANDAN, S.; SIEGER, L.; LASKY, J. L.; PANOSYAN, E. H.; BLAKE, O. A.; NEW, T. N.; BELLEVUE, R.; TRAN, L. T.; RAZON, R. L.; STARK, C. W.; NEUMAYR, L. D.; VICHINSKY, E. P. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease . **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 3, p. 226–235, 2018.

NIIHARA, Y.; ZEREZ, C. R.; AKIYAMA, D. S.; TANAKA, K. R. Oral L-glutamine therapy for sickle cell anemia: I. Subjective clinical improvement and favorable change in red cell NAD redox potential. **American Journal of Hematology**, v. 58, n. 2, p. 117–121, 1998.

OWUSU-ANSAH, A.; IHUNNAH, C. A.; WALKER, A. L.; OFORI-ACQUAH, S. F. Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease. **Translational Research**, v. 15, p. 240–246, 2015.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543–548, 1949.

PAVAN, A. R.; DOS SANTOS, J. L. Advances in Sickle Cell Disease Treatments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 1–24, 2021.

PAVAN, A. R.; LOPES, J. R.; DOS SANTOS, J. L. The state of the art of fetal hemoglobin-inducing agents. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, n. 11, p. 1279–1293, 2022.

PIEL, F. B.; PATIL, A. P.; HOWES, R. E.; NYANGIRI, O. A.; GETHING, P. W.; DEWI, M.; TEMPERLEY, W. H.; WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J.; HAY, S. I. Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, p. 142–151, 2013.

PINTO, A. C. S.; COSTA, F. F.; GUALANDRO, S. F. M.; FONSECA, P. B. B.; BUENO, C. T.; CANÇADO, R. D. Burden of Sickle Cell Disease: A Brazilian Societal Perspective Analysis. **Blood**, v. 136, p. 10–11, 2020.

PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M. H.; KLUG, P. P. Mortality in sickle cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 1639–1644, 1994.

POONGAVANAM, V.; KIHLEBERG, J. PROTAC cell permeability and oral bioavailability: a journey into uncharted territory. **Future Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 123–126, 2021.

QUINN, C. T.; SMITH, E. P.; ARBABI, S.; KHERA, P. K.; LINDSELL, C. J.; NISS, O.; JOINER, C. H.; FRANCO, R. S.; COHEN, R. M. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 12, p. 1195–1201, 2016.

REES, D. C.; BROUSSE, V. A. M.; BREWIN, J. N.; DEBR, R. Blood Reviews Determinants of severity in sickle cell disease. **Blood Reviews**, v. 56, n. June, p. 100983, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.100983>.

REID, M. E.; EL BESHAWY, A.; INATI, A.; KUTLAR, A.; ABBOUD, M. R.; HAYNES, J. J.; WARD, R.; SHARON, B.; TAHER, A. T.; SMITH, W.; MANWANI, D.; GHALIE, R. G. A double-blind, placebo-controlled phase II study of the efficacy and safety of 2,2-dimethylbutyrate (HQK-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 89, p. 709–713, 2014.

SADAF, A.; QUINN, C. T. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn?. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 2, p. 146–154, 2020.

SAITO, A.; YAMASHITA, T.; MARIKO, Y.; NOSAKA, Y.; TSUCHIYA, K.; ANDO, T.; SUZUKI, T.; TSURUO,

T.; NAKANISHI, O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 96, p. 4592–4597, 1999.

SAMARASINGHE, K. T. G.; CREWS, C. M. Targeted Protein Degradation: A Promise for Undruggable Proteins. **Cell Chemical Biology**, v. 28, n. 7, p. 934–951, 2021.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, 2013.

SANKARAN, V. G.; WEISS, M. J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nature Medicine**, v. 21, p. 221–230, 2015.

SAUNTHARARAJAH, Y.; HILLERY, C. A.; LAVELLE, D.; MOLOKIE, R.; DORN, L.; BRESSLER, L.; GAVAZOVA, S.; CHEN, Y. H.; HOFFMAN, R.; DESIMONE, J. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 3865–3870, 2003.

SCHRÖDINGER. **Glide**. New York: 2017.

SCHRÖDINGER. **LigPrep**. New York: 2017.

SCHRÖDINGER. **Maestro**. New York: 2017.

SHEARSTONE, J. R.; CHONKAR, A.; BHOL, K.; JONES, S. S.; JARPE, M. The Histone Deacetylase 1 and 2 (HDAC1/2) Inhibitor ACY-957 Increases Epsilon (HbE) and Gamma (HbG) Globin mRNA in the Peripheral Blood of Non-Anemic Rats and Monkeys. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 3378, 2015.

SHEARSTONE, J. R.; GOLONZHKA, O.; CHONKAR, A.; TAMANG, D.; VAN DUZER, J. H.; JONES, S. S.; JARPE, M. B. Chemical Inhibition of Histone Deacetylases 1 and 2 Induces Fetal Hemoglobin through Activation of GATA2. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0153767, 2016.

SHEARSTONE, J. R.; VAN DUZER, J.; BRADNER, J. E.; MAZITSCHKE, R.; JONES, S. S.; JARPE, M. Induction of Human Fetal Hemoglobin Expression by Selective Inhibitors of Histone Deacetylase 1 and 2 (HDAC1/2). **Blood**, v. 120, n. 21, p. 3259, 2012.

SHI, L.; CUI, S.; ENGEL, J. D.; TANABE, O. Lysine-specific demethylase 1 is a therapeutic target for fetal hemoglobin induction. **Nature Medicine**, v. 19, p. 291–294, 2013.

SHI, Yujiang; LAN, F.; MATSON, C.; MULLIGAN, P.; WHETSTINE, J. R.; COLE, P. A.; CASERO, R. A.; SHI, Yang. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 941–53, 2004.

SMALLEY, J. P.; ADAMS, G. E.; MILLARD, C. J.; SONG, Y.; NORRIS, J. K. S.; SCHWABE, J. W. R.; COWLEY, S. M.; HODGKINSON, J. T. PROTAC-mediated degradation of class i histone deacetylase enzymes in corepressor complexes. **Chemical Communications**, v. 56, n. 32, p. 4476–4479, 2020.

SMALLEY, J. P.; BAKER, I. M.; PYTEL, W. A.; LIN, L. Y.; BOWMAN, K. J.; SCHWABE, J. W. R.; COWLEY, S. M.; HODGKINSON, J. T. Optimization of Class I Histone Deacetylase PROTACs Reveals that HDAC1/2 Degradation is Critical to Induce Apoptosis and Cell Arrest in Cancer Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 5642–5659, 2022.

STORCH, A. S.; MATTOS, J. D. de; ALVES, R.; GALDINO, I. dos S.; ROCHA, H. N. M. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262–273, 2017.

SUN, X.; GAO, H.; YANG, Y.; HE, M.; WU, Y.; SONG, Y.; TONG, Y.; RAO, Y. Protacs: Great opportunities for academia and industry. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 4, n. 1, 2019.

THIAGALINGAM, S.; CHENG, K. H.; LEE, H. J.; MINEVA, N.; THIAGALINGAM, A.; PONTE, J. F. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 983, p. 84–100, 2003.

THIJS, T. C.; TRINH, V. T.; VÁZQUEZ, O.; PHILIPSEN, S. Targeted Protein Degradation as a Promising Tool for Epigenetic Upregulation of Fetal Hemoglobin. **ChemMedChem**, v. 15, n. 24, p. 2436–2443, 2020.

URIAS, B. S.; PAVAN, A. R.; ALBUQUERQUE, G. R.; PROKOPCZYK, I. M.; ALVES, T. M. F.; DE MELO, T. R. F.; SARTORI, G. R.; DA SILVA, J. H. M.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Dos. Optimization of Resveratrol Used as a Scaffold to Design Histone Deacetylase (HDAC-1 and HDAC-2) Inhibitors.

Pharmaceuticals, v. 15, n. 10, p. 1–14, 2022.

VAN DER PLOEG, L. H. T.; FLAVELL, R. A. DNA methylation in the human $\gamma\delta\beta$ -globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. **Cell**, v. 19, p. 947–958, 1980.

VEKILOV, P. G. Sick-cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?. **British Journal of Haematology**, v. 139, n. 2, p. 173–184, 2007.

WAGNER, F. F.; WEIWER, M.; STEINBACHER, S.; SCHOMBURG, A.; REINEMER, P.; GALE, J. P.; CAMPBELL, A. J.; FISHER, S. L.; ZHAO, W. N.; REIS, S. A.; HENNIG, K. M.; THOMAS, M.; MÜLLER, P.; JEFSON, M. R.; FASS, D. M.; HAGGARTY, S. J.; ZHANG, Y. L.; HOLSON, E. B. Kinetic and structural insights into the binding of histone deacetylase 1 and 2 (HDAC1, 2) inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4008–4015, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.040>.

WAGNER, F. F.; WEIWER, M.; LEWIS, M. C.; HOLSON, E. B. Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 4, p. 589–604, 2013.

WAGNER, F. F.; ZHANG, Y. L.; FASS, D. M.; JOSEPH, N.; GALE, J. P.; WEIWER, M.; MCCARREN, P.; FISHER, S. L.; KAYA, T.; ZHAO, W. N.; REIS, S. A.; HENNIG, K. M.; THOMAS, M.; LEMERCIER, B. C.; LEWIS, M. C.; GUAN, J. S.; MOYER, M. P.; SCOLNICK, E.; HAGGARTY, S. J.; TSAI, L. H.; HOLSON, E. B. Kinetically selective inhibitors of histone deacetylase 2 (HDAC2) as cognition enhancers. **Chemical Science**, v. 6, n. 1, p. 804–815, 2015.

WANG, D. F.; WIEST, O.; HELQUIST, P.; LAN-HARGEST, H. Y.; WIECH, N. L. On the function of the 14 Å long internal cavity of histone deacetylase-like protein: implications for the design of histone deacetylase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 3409–3417, 2004.

WILLIAMS, R.; OLIVI, S.; LI, C. S.; STORM, M.; CREMER, L.; MACKERT, P.; WANG, W. Oral glutamine supplementation decreases resting energy expenditure in children and adolescents with sickle cell anemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 26, n. 10, p. 619–625, 2004.

ZENNADI, R.; CHIEN, A.; XU, K.; BATCHVAROVA, M.; TELEN, M. J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood**, v. 112, p. 3474–3483, 2008.

ZHANG, Q.; CHEN, C. Direct acylation of aryl amines using dimethylformamide and dimethylacetamide as the acyl resources. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 114–119, 2016.