



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

BEATRIZ MEDUQUI RODRIGUES

**Modelagem molecular e síntese de novos agentes reversores de
latência dos reservatórios do vírus HIV**

Araraquara, SP

2022

BEATRIZ MEDUQUI RODRIGUES

**Modelagem molecular e síntese de novos agentes reversores de
latência dos reservatórios do vírus HIV**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Coorientadora: Me. Juliana Romano Lopes

Araraquara, SP

2022

R696m Rodrigue, Beatriz Meduqui.
Modelagem molecular e síntese de novos agentes reversores de
latência dos reservatórios do vírus HIV / Beatriz Meduqui Rodrigues. –
Araraquara: [S.n.], 2022.
130 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Cursos (Graduação – Farmácia Bioquímica) –
Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.
Coorientadora: Juliana Romano Lopes.

1. HIV. 2. "*kick and kill*". 3. Agentes reversores de latência. 4. HDAC.
I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Lopes, Juliana Romano, coorient. III.
Título.

Dedicatória

Aos meus pais, Antonio Rodrigues e Aparecida Meduqui Rodrigues.

Agradecimentos

Aos meus pais, Antonio e Aparecida, por estarem sempre presentes e me ajudarem a alcançar todos os meus sonhos. A minha prima, Priscila Akemi Yamamoto, por todo acolhimento e ajuda. A todos os meus amigos e colegas de sala de aula; dos corredores; de moradia e dos momentos de diversão. Todos foram minha base e suporte ao longo de toda a graduação. Agradeço imensamente pela companhia, apoio e por terem feito parte de momentos tão especiais em minha vida, que jamais serão esquecidos.

A todos do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (LAPDESF), por todos os momentos e pelos ensinamentos. Em especial, ao meu orientador Jean Leandro dos Santos e minha co-orientadora, Juliana Romano Lopes, pela amizade, conhecimentos e por toda paciência ao longo do desenvolvimento deste projeto. Obrigada por terem me recebido de braços abertos e confiado no meu trabalho. Agradeço também a Andressa e ao Diogo, alunos do laboratório, por todo auxílio no trabalho e pelas conversas. A todos do Laboratório de Histologia e Embriologia, em especial a Estela Sasso Cerri e a Fabiane de Santi por todos os ensinamentos em meu primeiro projeto de iniciação científica. Ambos os projetos foram essenciais para que eu me envolvesse e gostasse tanto do setor de pesquisa e desenvolvimento como gosto hoje. Independente da área que seguirei atuando no futuro, sem dúvidas irei ter um carinho muito grande pelo trabalho que desenvolvi nos dois laboratórios e levarei lembranças muito boas das amizades que construí.

A cada um que dividiu espaço comigo nos anos que pude participar do Centro Acadêmico de Ciências Farmacêuticas (CACIF), Curso Unificado do Campus de Araraquara (CUCA) e Catálise Júnior. A vivência nessas e em outras entidades foram essenciais em minha formação como pessoa, além de terem sido suporte nos meus anos de graduação.

A equipe do ID Medley Campinas, principalmente ao time de Desenvolvimento Analítico por todos os conhecimentos compartilhados comigo ao longo do meu Estágio Supervisionado II; por todas as amizades e momentos de diversão e, principalmente pelo apoio ao longo da elaboração deste trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento deste projeto.

A conclusão deste trabalho não seria possível sem a participação de cada um de vocês. Faltam palavras para expressar a gratidão por toda ajuda ao longo desses anos.

A todos, MUITO OBRIGADA.

Resumo

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Apesar de terem ocorridos muitos avanços com o desenvolvimento da terapia antirretroviral (TARV), dados de 2021 mostraram que 38,4 milhões de pessoas no mundo viviam com o HIV, ocorrendo 1,5 milhão de novos casos no referente ano e 650.000 mortes por doenças relacionadas a SIDA. A TARV não é capaz de eliminar totalmente o vírus do organismo do indivíduo contaminado, permanecendo um reservatório latente em locais como o sistema linfático, que possui acesso restrito aos fármacos. Com a interrupção do tratamento, o vírus volta a se replicar novamente. O uso de agentes reversores de latência (ARLs) do vírus HIV têm sido empregados na estratégia “*kick and kill*”, com o objetivo de reativação do vírus latente (“*kick*”) e sua posterior eliminação (“*kill*”). Dentre os ARLs, temos os Inibidores de Histona Deacetilase (HDACi). Além disso, estratégias de direcionamento de fármacos ao sistema linfático através do aumento da massa molecular e da lipofilicidade dos compostos, vem sendo descritas na literatura. Neste trabalho, realizamos a modelagem molecular, síntese e caracterização de inibidores de HDAC-3 acoplados com ácidos graxos visando promover o aumento da lipofilicidade e direcionamento ao sistema linfático. Os compostos foram inicialmente avaliados por meio de estudos *in silico* e tiveram seus valores de Log P teóricos determinados. A caracterização foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C e infravermelho (IV). Os valores de Log P experimentais foram determinados por HPLC-UV (C18, fase móvel MeOH:H₂O, fluxo 1mL/min, $\lambda = 210$ nm). A caracterização por meio do RMN e IV sugerem a obtenção dos compostos de interesse, com rendimentos globais de 45-53%. Os testes *in silico* demonstram potencial capacidade de inibição da enzima HDAC, com *docking score* variando de -8,369 à -6,078. Os valores de Log P experimental (de 4,89 a >6,5) justificam que esses compostos podem ser direcionados ao sistema linfático

Palavras-chave: HIV, “*kick and kill*”, agentes reversores de latência, HDAC

Abstract

The human immunodeficiency virus (HIV) is the cause of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Although there have been many advances with the discovery of antiretroviral therapy (ART), data from 2021 showed that 38.4 million people in the world were living with HIV, with 1.5 million new cases that year and 650,000 deaths from AIDS-related illnesses. ART is not able to completely eliminate the virus from the infected individual's body, leaving a latent reservoir in places like the lymphatic system, which has restricted access to the drugs. With the interruption of treatment, the virus starts replicating again. The use of HIV latency reversal agents (LRAs) has been employed in the "kick and kill" strategy, with the objective of reactivating the latent virus ("kick") and its subsequent elimination ("kill"). Among the ARLs, we have the Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi). In addition, strategies to target drugs to the lymphatic system by increasing the molecular mass and lipophilicity of the compounds have been described in the literature. In this work, we performed the molecular modeling, synthesis and characterization of HDAC-3 inhibitors coupled with fatty acids aiming to promote increased lipophilicity and targeting to the lymphatic system. The compounds were initially evaluated by *in silico* studies and had their theoretical Log P values determined. Characterization was performed by ^1H and ^{13}C NMR and infrared (IR). The experimental Log P values were determined by HPLC-UV (C18, mobile phase MeOH:H₂O, flow rate 1mL/min, λ = 210 nm). Characterization by NMR and IR suggest obtaining the compounds of interest, with global yields of 45-53%. The *in silico* tests demonstrate potential capacity to inhibit the HDAC enzyme, with *docking scores* ranging from -8.369 to -6.078. The experimental Log P values (from 4.89 to >6.5) justify that these compounds can be directed to the lymphatic system.

Keywords: HIV, "kick and kill", latency reversal agentes, HDAC

Lista de Figuras

Figura 1. Epidemiologia da infecção pelo vírus HIV.....	15
Figura 2. Replicação do vírus HIV.....	17
Figura 3. Atuação das diferentes classes de antirretrovirais na replicação do vírus HIV.	21
Figura 4. Transcrição do vírus HIV e fatores importantes para o estabelecimento da latência.	28
Figura 5. Estratégia “ <i>kick and kill</i> ” ou “ <i>shock and kill</i> ”.	29
Figura 6. Processo de deacetilação da lisina das histonas mediado pela HDAC.	30
Figura 7. Direcionamento de fármacos de administração oral para o sistema linfático.....	35
Figura 8. Comparação da ação dos compostos CI-994 e BRD3308 sob as HDACs 1, 2 e 3..	39
Figura 9. Inibidores de HDAC direcionados ao sistema linfático.....	40
Figura 10. Etapas sintéticas para obtenção dos derivados da Série 1.....	42
Figura 11. Etapas sintéticas para obtenção dos derivados da Série 2.....	43
Figura 12. Etapa sintética para obtenção do composto (2).....	43
Figura 13. Etapa sintética para obtenção dos compostos (3) e (6).	45
Figura 14. Etapa sintética para obtenção dos compostos (5), (8) e (11).	47
Figura 15. Etapa sintética para obtenção dos compostos (9) e (12).	50
Figura 16. Etapa sintética para obtenção dos compostos (14) e (16).	52
Figura 17. Etapa sintética para obtenção do composto (15).....	54
Figura 18. Etapa sintética para obtenção do composto (17).....	56
Figura 19. Curva de linearidade dos padrões.	60
Figura 20. Figura 3D e 2D. <i>Docking</i> molecular da estrutura BRD3308 frente a enzima HDAC3.	62
Figura 21. Figura 3D e 2D. <i>Docking</i> molecular da estrutura (16) frente a enzima HDAC-3.	63
Figura 22. Figura 3D e 2D. <i>Docking</i> molecular da estrutura (15) frente a enzima HDAC-3.	63

Figura 23. Figura 3D e 2D. <i>Docking</i> molecular da estrutura (6') frente a enzima HDAC-3. .	63
Figura 24. Resumo das estruturas intermediárias e finais sintetizadas no trabalho.	82
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (2).....	97
Figura 26. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (2)	97
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (3).....	99
Figura 28. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (3).	99
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (5).....	101
Figura 30. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (5).	101
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (6).....	103
Figura 32. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (6).	103
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (8).....	105
Figura 34. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (8).	105
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (11).....	107
Figura 36. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (11).	107
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (14).....	109
Figura 38. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (14).	109
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (15).....	111
Figura 40. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (15).	111
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (9).....	113
Figura 42. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (9).	113
Figura 43. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (9).	114
Figura 44. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (9).....	114
Figura 45. Espectro de IV (KBr) do composto (9).....	115
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (12).....	117
Figura 47. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (12).	117

Figura 48. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (12)	118
Figura 49. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (12)	118
Figura 50. Espectro de IV (KBr) do composto (12)	119
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (16)	121
Figura 52. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (16)	121
Figura 53. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (16)	122
Figura 54. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (16)	122
Figura 55. Espectro de IV (KBr) do composto (16)	123
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (17)	125
Figura 57. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d6, 150 MHz) do composto (17)	125
Figura 58. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (17)	126
Figura 59. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (17)	126
Figura 60. Espectro de IV (KBr) do composto (17)	127

Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições cromatográficas para análise de Log P	58
Tabela 2. Substâncias referências utilizadas para determinação da equação da reta para obtenção do Log P experimental	59
Tabela 3. Docking score dos compostos finais e dos padrões BRD3308 e CI994 frente HDAC-3	64
Tabela 4. Resumo dos dados de rendimento e aspecto físico dos compostos intermediários envolvidos na síntese dos derivados da Série 1.	68
Tabela 5. Resumo dos dados de rendimento, aspecto físico e faixa de fusão dos compostos finais da Série 1.	69
Tabela 6. Resumo dos dados de rendimento e aspecto físico dos compostos intermediários envolvidos na síntese dos derivados da Série 2.	71
Tabela 7. Resumo dos dados de rendimento, aspecto físico e faixa de fusão dos compostos finais da Série 2.	71
Tabela 8. Caracterização estrutural do composto (9) por RMN de ^1H e APT em DMSO- d_6	72
Tabela 9. Caracterização estrutural do composto (12) por RMN de ^1H e APT em DMSO- d_6	73
Tabela 10. Caracterização estrutural do composto (16) por RMN de ^1H e APT em DMSO- d_6	74
Tabela 11. Caracterização estrutural do composto (17) por RMN de ^1H e APT em DMSO- d_6	75
Tabela 12. Caracterização por espectrofotometria na região do infravermelho dos grupos químicos presentes na estrutura química dos compostos (9) , (12) , (16) e (17)	77
Tabela 13. Propriedades físico-químicas das moléculas sintetizadas.	79

Lista de Abreviaturas e Siglas

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
TARV	Terapia antirretroviral
RNA	Ácido ribonucleico
gp120	Glicoproteína-120
CCR ₅	Correceptor 5 de quimiocina CC
CXCR ₄	Correceptor 4 de quimiocina CXC
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PIC	Complexo de pré-integração
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de patógenos
IFN	Interferon
Nuc	Nucleossomo
ATP	Adenosinatrifosfato
LTR	Repetição terminal longa do HIV
HATs	Histonas acetiltransferases
BAF	Complexo de remodelação da cromatina
TAR	Elemento de resposta de transcrição
RNA _m	RNA mensageiro
P-TEFb	Fator de alongamento de transcrição positivo B
ARLs	Agentes reversores de latência
HDAC	Histona deacetilase
HDACi	Inibidores de histona deacetilase

GALT	Tecido linfático associado ao intestino
AG	Ácidos graxos
MG	Monoglicerídeo
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Log P	Coeficiente de partição
IC ₅₀	Concentração inibitória média
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
BOC	Dicarbonato de di-terc-butila
Eq.mol ⁻¹	Equivalentes por mol
THF	Tetraidrofurano
DMAP	4-dimetilaminopiridina
CCD	Cromatografia em camada delgada
R _f	Fator de retenção
HATU	1-[bis(dimetilamino)metileno]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol [4,5- <i>b</i>]piridino 3-óxido hexafluorofosfato
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
TFA	Ácido trifluoracético
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
IV	Infravermelho
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PABA	Ácido 4-aminobenzóico

Sumário

Dedicatória	3
Agradecimentos.....	4
Resumo	6
Abstract.....	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas.....	11
Lista de Abreviaturas e Siglas	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. O Vírus HIV: Epidemiologia	13
1.2. Infecção pelo vírus HIV	16
1.3. Tratamento atual: Terapia Antirretroviral e suas limitações	19
1.4. Reservatório latente do vírus HIV	23
1.5. Agentes Reversores de Latência (ARLs) e estratégia “kick-and-kill” ou “shock-and-kill” ..	28
1.6. Inibidores de histona deacetilase (HDACi)	29
1.7. Direcionamento de fármacos ao sistema linfático	33
2. OBJETIVOS	37
2.1. Objetivos Específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. Planejamento Estrutural	38
3.2. Modelagem Molecular	40
3.3. Metodologia Sintética	41
3.3.1. Síntese dos derivados da Série 1	43
3.3.1.1. Síntese do composto (2)	43
3.3.1.2. Síntese dos compostos (3) e (6).....	44
3.3.1.3. Síntese dos compostos (5), (8) e (11) (adaptado WAGNER, <i>et al.</i> 2016).....	47
3.3.1.4. Síntese dos compostos (9) e (12).....	50
3.3.2. Síntese dos derivados da Série 2	52
3.3.2.1. Síntese do composto (14) e (16).....	52
3.3.2.2. Síntese do composto (15)	54
3.4. Métodos de Purificação.....	57
3.4.1. Cromatografia em Coluna de bancada	57
3.5. Identificação e Caracterização Estrutural.....	57
3.5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	57
3.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	57

3.5.3.	Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	57
3.5.4.	Determinação da Faixa de Fusão.....	58
3.6.	Determinação das Propriedades Físico-Químicas das moléculas	58
3.6.1.	Software SwissADME	58
3.6.2.	Determinação do Log P por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	58
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1.	Modelagem Molecular	61
4.2.	Metodologia Sintética e Caracterização dos Compostos	65
4.2.1.	Síntese dos derivados do BRD3308 (Série 1)	65
4.2.2.	Síntese dos derivados do CI-994 (Série 2)	69
4.2.3.	Caracterização estrutural dos compostos finais.....	72
4.3.	Determinação das Propriedades Físico-Químicas das Moléculas	77
5.	CONCLUSÃO	81
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
	Apêndice A – Caracterização dos Intermediários Sintéticos	96
	Apêndice B – Caracterização dos Compostos Finais	112

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Vírus HIV: Epidemiologia

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), identificado em 1981, é o causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS), na qual ocorre o enfraquecimento do sistema imunológico do indivíduo infectado, facilitando o contágio por patógenos oportunistas (BARRE-SINOUSSE, *et al.* 1983; POPOVIC, *et al.* 1984). Desde o registro dos primeiros casos de infecção por HIV, aproximadamente 84,2 milhões de pessoas já se infectaram e 40,1 milhões de pessoas morreram por doenças relacionadas a AIDS. Embora muitos investimentos tenham sido feitos nos últimos anos e com eles obtido um grande avanço com o desenvolvimento da terapia antirretroviral (TARV), estatísticas referentes ao ano de 2021 mostraram que 38,4 milhões de pessoas no mundo viviam com o HIV, ocorrendo 1,5 milhão de novos casos no referente ano e 650.000 mortes por doenças relacionadas a AIDS (UNAIDS, 2022).

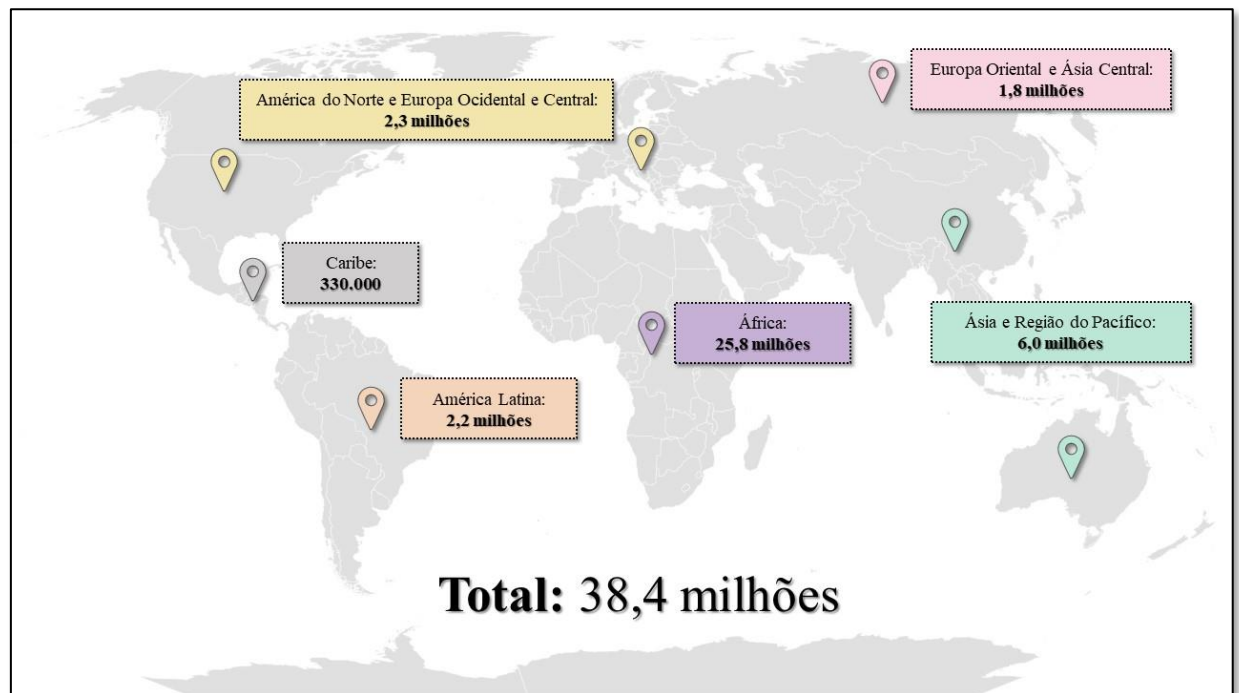
Do total de 38,4 milhões de pessoas que viviam com o HIV em 2021, a faixa etária mais acometida foram os adultos (15 anos ou mais), sendo estes 36,7 milhões. Já as crianças entre 0 a 14 anos representavam 1,7 milhões de casos, indicando que a transmissão perinatal ainda é uma preocupação. Com relação ao sexo biológico, 54% das pessoas que viviam com HIV eram do sexo feminino. As consideradas “populações-chave” (trabalhadores do sexo e seus clientes, gays, trans e pessoas usuárias de drogas injetáveis) abrangem 70% das novas infecções. Além disso, 85% de 38,4 milhões sabiam que estavam vivendo com o vírus, enquanto 5,9 milhões não sabiam da infecção no ano de 2021, demonstrando uma falha no processo de diagnóstico da infecção (UNAIDS, 2022). Muitos portadores do HIV podem não ser diagnosticados e iniciar o tratamento em etapa muito tardia da doença.

É notável que com o desenvolvimento da TARV o número de pessoas que morreram em consequência a complicações da AIDS diminuiu significativamente. Com relação aos dados de 2021, as mortes relacionadas a doença foram reduzidas em 68% desde o último pico que ocorreu em 2004, com 2 milhões de mortes (UNAIDS, 2022). Entretanto, mesmo nos países com fácil acesso ao tratamento, a expectativa de vida das pessoas ainda é menor quando comparado a pessoas não infectadas (The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 2008). Um outro ponto a ser destacado, é o acesso aos medicamentos da TARV. Das 38,4 milhões de pessoas que viviam com o HIV em 2021, apenas 28,7 milhões estavam tendo acesso a terapia antirretroviral (UNAIDS, 2022).

Na África Subsaariana é onde temos o maior número de pessoas vivendo com o HIV (UNAIDS, 2022). Entretanto, estudos de incidência mostraram um ressurgimento do aumento de casos na América do Norte, América do Sul e Oceania. O crescimento é muito alto na Rússia, Portugal, Ucrânia e Brasil. Já em alguns países africanos, como África do Sul e Quênia, foi possível notar uma diminuição constante dos números, embora ainda estejam altos. Também ocorreu uma queda na China e no Subcontinente Indiano. Com relação a prevalência, ocorreu um pico de casos em 2005, diminuindo por 5 anos e retomando uma tendência crescente desde 2010. O aumento é global, envolvendo países como África do Sul, Portugal, Brasil, México, Peru, Espanha, Alemanha e Estados Unidos. Além disso, mulheres tem maior taxa de prevalência, enquanto homens tem maior taxa de mortalidade (GOVENDER, *et al.* 2021).

Na **Figura 1** é possível observar uma estimativa da distribuição de pessoas vivendo com o vírus do HIV no ano de 2021, distribuído por regiões do globo terrestre (UNAIDS, 2022).

Figura 1. Epidemiologia da infecção pelo vírus HIV.



Fonte: adaptado de Unaid - Core Epidemiology Slides.

Com essas estimativas, é possível concluir que mesmo com os avanços nos últimos anos, a infecção por HIV ainda é um problema de saúde pública. Os vírus de RNA (ácido ribonucleico), como o HIV, geram grande preocupação, pois a sua replicação é sujeita a erros gerando um alto índice de mutações. Um estudo publicado em março de 2022 mostrou fortes evidências de uma variante virulenta do subtipo B do HIV que circula na Holanda provavelmente desde o final da década de 1990, mostrando que a epidemia de HIV ainda não terminou (WYMANT, *et al.* 2022). Até o desenvolvimento deste estudo, ainda não existe um tratamento que elimine totalmente a carga viral das pessoas contaminadas. Muito ainda precisa ser entendido sobre o processo de infecção e estudos buscando a cura da doença devem ser feitos visando melhorar a qualidade de vida de todas as pessoas que vivem com o vírus.

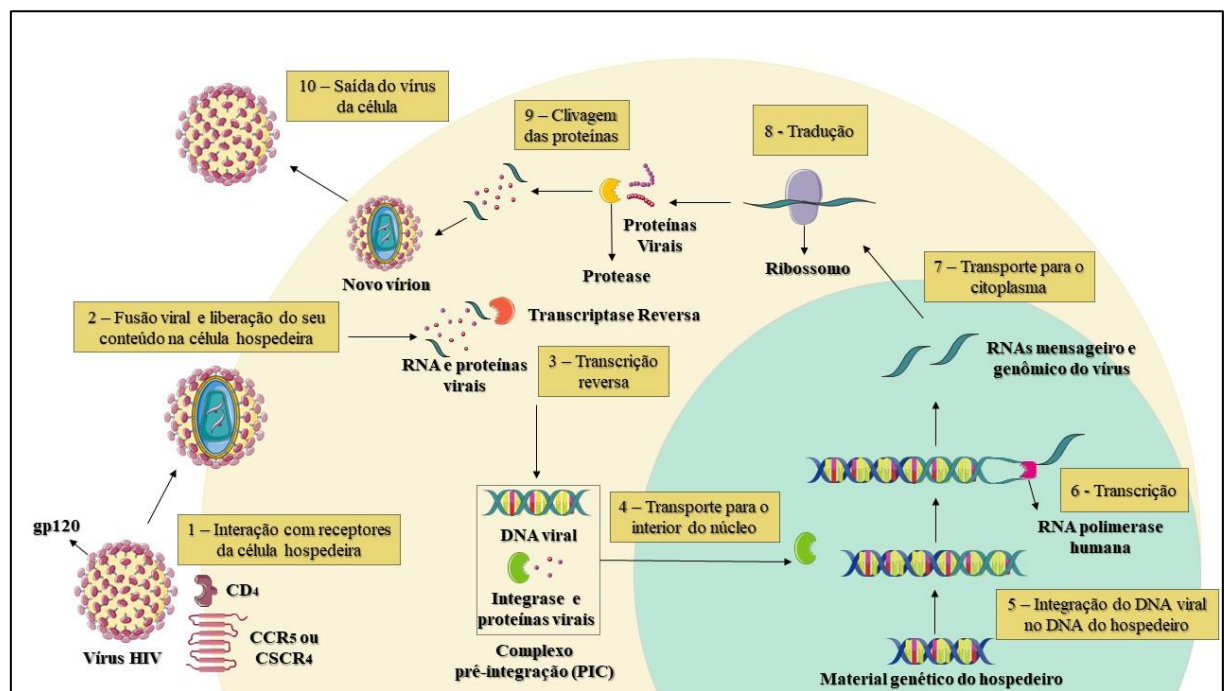
1.2. Infecção pelo vírus HIV

A infecção pelo vírus HIV se inicia através do contato com fluídos corporais (tecido mucoso, sangue, pele rompida) de uma pessoa infectada. As células T CD4⁺ são os principais alvos do vírus HIV e, após certo tempo de contágio, o vírus se instala nos tecidos da mucosa e alcança os órgãos linfoides (HAASE, 2005).

Já no organismo do indivíduo contaminado, o HIV tem como porta de entrada nas células o receptor CD4, que interage com a glicoproteína-120 (gp120) do envelope viral. O vírus forma então ligações subsequentes com o correceptor 5 de quimiocina CC (CCR₅) e o correceptor 4 de quimiocina CXC (CXCR₄), o que gera alterações conformacionais irreversíveis permitindo a ligação do vírus à célula. Em seguida, ocorre a fusão do revestimento viral com a membrana celular da célula humana, liberando o capsídeo viral em seu interior, contendo cópias do RNA viral. Dentro da célula, o RNA viral sofre o processo de transcrição reversa, pela ação da enzima transcriptase reversa, enzima associada ao capsídeo viral, gerando o DNA (ácido desoxirribonucleico) viral. Nesse momento, ocorre a desmontagem do capsídeo viral e o DNA viral forma um complexo de pré-integração (PIC) que compreende o DNA viral, integrase viral e algumas proteínas do capsídeo, bem como algumas proteínas celulares. O transporte deste complexo para o núcleo ocorre de maneira ativa por meio da passagem pelo complexo de poros do núcleo, em células que possuem envelope nuclear. Após entrar no núcleo da célula hospedeira, o DNA viral se liga ao material genético do hospedeiro, preferencialmente em locais com alta densidade de genes e elevada atividade de transcrição, por meio da ação da enzima integrase e, a partir deste momento, o vírus passa a usufruir das enzimas da própria célula infectada para concluir a sua replicação. O DNA viral é transcrito pela ação da RNA polimerase humana, gerando RNA mensageiro e RNA genômico. Este processo de transcrição é influenciado por diversos fatores, como a posição de integração no genoma humano e pela disponibilidade de fatores de transcrição positivos e negativos do hospedeiro, além de cofatores

que se ligam e regulam o promotor do HIV. Após ser sintetizado, o RNA mensageiro chega ao citoplasma da célula e é traduzido em proteínas, como as proteínas estruturais e enzimas virais. As proteínas são clivadas pela protease viral e, juntamente com o RNA genômico, formam novos vírions aptos para infectar novas células. Os novos vírions do HIV são liberados da célula por meio de brotamento da membrana plasmática e seguem para infectar novos alvos (DEEKS, *et al.*, 2015; RAY; DOMS, 2006; SUZUKI; CRAIGIE, 2007). A **Figura 2** contém um esquema do processo de replicação do vírus HIV.

Figura 2. Replicação do vírus HIV.



Fonte: adaptado de DEEKS, *et al.* 2015. A figura foi elaborada utilizando imagens retiradas do banco de imagens de Servier Medical Art, Servier.

Logo após o processo de infecção, inicia-se a resposta imunológica a partir das células que foram infectadas. Nelas, ocorre a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), localizados em produtos do vírus, por receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) da célula hospedeira (RUSTAGI; GALE, 2014). O primeiro estágio da infecção pelo HIV é denominado de infecção primária e nela é possível observar uma alta viremia plasmática,

poucas células T CD4⁺ e ausência de anticorpos contra o HIV (SIMON, *et al.* 2006). Com a interação entre PAMPs e PRRs, ocorre a produção de fatores solúveis como interferon (IFN), citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que são substâncias importantes para o recrutamento de células da imunidade inata, como macrófagos, células natural-killer (NK) e células dendríticas que irão controlar inicialmente a propagação viral e ativar e modular a resposta imune adaptativa (LOO; GALE, 2007). Nesse momento, o paciente apresenta alguns sintomas, mas por eles a infecção é raramente reconhecida, pois muitos são inespecíficos, como febre, mal-estar, diarreia, entre outros, podendo ser relacionados a outras doenças. Como a quantidade de vírus é elevada, tem-se um alto risco de transmissão da infecção (PALMISANO; VELLA, 2011). Apesar de existirem métodos para diagnóstico da doença, como ensaios sorológicos para detecção de anticorpos do HIV e para detecção direta do vírus, o diagnóstico na fase inicial é muito difícil devido aos sintomas inespecíficos.

Sem o tratamento, o HIV se replica e gera um aumento exponencial da viremia. O sistema imunológico começa a ter reações contra o vírus presente e ocorre um aumento muito grande de citocinas pró-inflamatórias produzidas pela imunidade inata (ALTER, *et al.* 2009). Além disso, o processo de infecção causa uma grande perda nos linfócitos T CD4⁺ fazendo com que o paciente desenvolva a imunodeficiência (MOIR; CHUN; FAUCI, 2011; MCCUNE, 2001). Muitos mecanismos estão envolvidos nesta perda de células T CD4⁺, como a própria infecção e os efeitos do vírus na célula, apoptose de células não infectadas, ativação imunológica e senescência (MOIR; CHUN; FAUCI, 2011; DOITSH; GREENE, 2016). Desta forma, após a infecção primária, o HIV permanece em um estado crônico, com perda de muitas células do sistema imunológico, podendo gerar eventos associados ou não a AIDS (PALMISANO; VELLA, 2011), como as infecções por patógenos oportunistas. No momento em que começam a surgir alguns problemas relacionados a AIDS, o diagnóstico passa a ser mais provável. Entretanto, o vírus já se encontra em um estado bem avançado.

Houve um grande avanço com o desenvolvimento da terapia antirretroviral e devido à alta variabilidade do vírus, houve justificativa para a implementação também de tratamentos antirretrovirais altamente ativos, combinando vários agentes potentes para suprimir a replicação do vírus. Com a inibição viral, o número de células T CD4⁺ aumenta, diminuindo as consequências da AIDS e diminuindo o número de mortalidade em decorrência da doença (MOCROFT, *et al.* 1998; HOGG, *et al.* 1998).

1.3. Tratamento atual: Terapia Antirretroviral e suas limitações

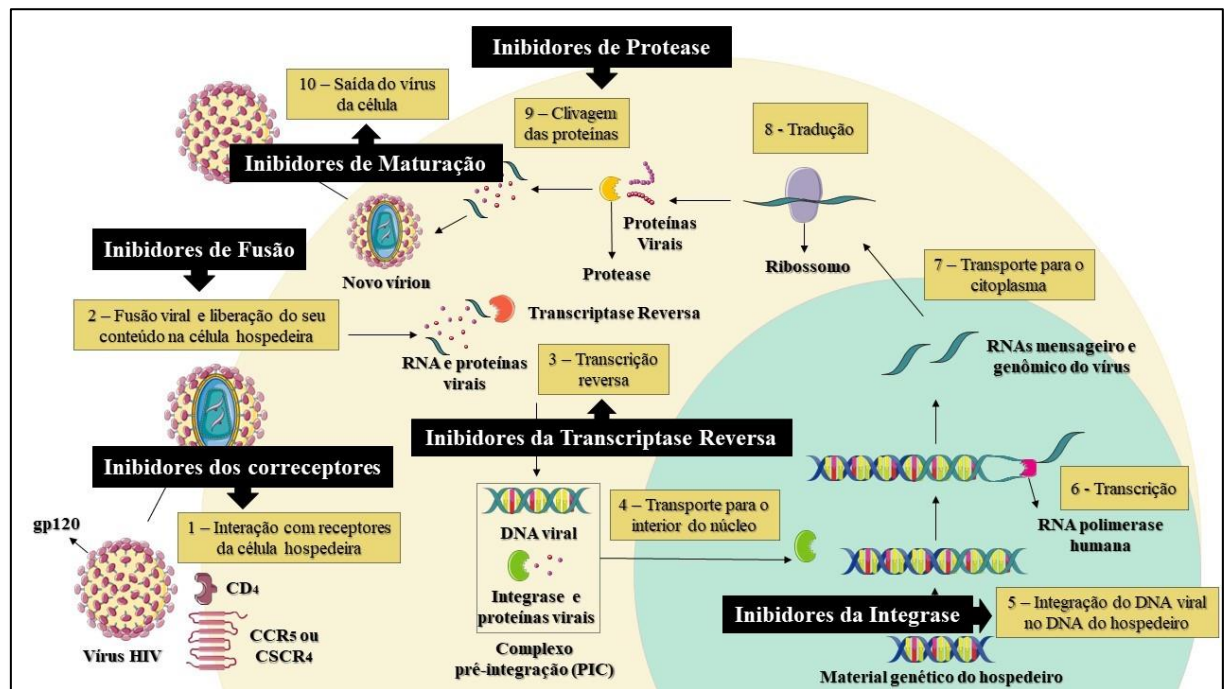
Além da grande disseminação de medidas de prevenção, um dos grandes avanços relacionados a infecção por HIV se deu no desenvolvimento da terapia antirretroviral, responsável pela diminuição da mortalidade de indivíduos com o vírus (MARCUS *et al.*, 2016). Com o uso correto dos medicamentos, que geralmente são bem tolerados, a replicação viral é inibida e a viremia reduzida consideravelmente, para níveis sanguíneos indetectáveis mesmo após algumas semanas de tratamento, além de induzir o ganho de células T CD4⁺ (MOCROFT, *et al.* 2007; KAUFMANN, *et al.* 2003) evitando o surgimento de mutações resistentes aos medicamentos e proporcionando, em muitos casos, uma boa recuperação do sistema imunológico, prevenindo as complicações ocasionadas pela AIDS. Além disso, outro papel importante da terapia antirretroviral é reduzir a transmissão do vírus. Com a diminuição da carga viral no sangue, estudos mostraram que ocorre a prevenção da transmissão de mãe para filho (Centers for Disease Control and Prevention, 2006) e uma redução da infecção por via sexual (MONTANER, *et al.* 2010).

Atualmente, existem cerca de trinta fármacos antirretrovirais aprovados (ZHAN, *et al.* 2016; DEEKS, *et al.* 2015). Os medicamentos estão divididos em diferentes classes e cada uma atua em diferentes etapas do ciclo de vida do HIV: os inibidores nucleosídeos/nucleotídeos da transcriptase reversa (exemplos: abacavir, didanosina, lamivudina) bloqueiam a enzima responsável pela formação do DNA viral atuando como análogos de nucleosídeos/nucleotídeos

naturais, ligando-se no sítio ativo da enzima e culminando no término da síntese do material genético; inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (exemplos: delaviridina, efavirenz, nevirapina) que atuam na mesma enzima, mas se ligando em um bolsão próximo ao seu sítio ativo (sítio alostérico), gerando uma mudança conformacional que impede a sua ação; inibidores da integrase (exemplos: dolutegravir, raltegravir) que inibem a enzima que insere o DNA viral no material genético do hospedeiro; inibidores de protease (exemplos: atazanavir, ritonavir, tripanavir), atuando no sítio ativo da protease viral e impedindo que as proteínas do vírus sejam clivadas para formação dos novos vírions e os inibidores de entrada (exemplo: enfuvirtida) que impedem a liberação do conteúdo do vírus na célula hospedeira (DEEKS, *et al.* 2015). Os inibidores de entrada podem ser inibidores de fusão, que interagem com uma glicoproteína do vírus e bloqueia a fusão do mesmo com a membrana celular ou ainda inibidores de correceptores que interagem com o receptor CCR5 da célula hospedeira, impedindo a interação dele com a gp120, glicoproteína viral importante no processo de entrada do vírus (DRAGIC, *et al.* 2000).

A **Figura 3** mostra um resumo de todas as classes de medicamentos antirretrovirais e suas etapas de inibição da replicação viral. Atualmente, são combinados medicamentos de diferentes classes para compor a terapia antirretroviral e muitos estudos se atentam com relação ao uso de tantos medicamentos que, apesar de possuírem efeitos adversos sutis, possuem uma certa toxicidade a curto e longo prazo. O desenvolvimento de comprimidos únicos com mais de um ativo foi um grande avanço na melhoria de adesão ao tratamento.

Figura 3. Atuação das diferentes classes de antirretrovirais na replicação do vírus HIV.



Fonte: adaptado de DEEKS, *et al.* 2015. A figura foi elaborada utilizando imagens retiradas do banco de imagens de Servier Medical Art, Servier.

Embora tenha sido um desenvolvimento muito promissor, o uso da TARV a longo prazo, pode gerar algumas toxicidades (exemplo: renal), alterações metabólicas (exemplo: diabetes *mellitus*) e doença de reconstituição imune (NOLAN; MALLAL, 2005; FRENCH, *et al.* 2004; WYATT; KLOTMAN, 2006). Além disso, o vírus sofre muitas mutações (OVERBAUGHT; BANGHAN, 2001) o que dificulta o desenvolvimento de uma vacina. Mais obstáculos no tratamento de pacientes com HIV consiste na falta de adesão; efeitos colaterais; o surgimento de resistência aos medicamentos existentes; a baixa biodisponibilidade e interações medicamentosas (DEEKS, 2003).

Um outro ponto a se ressaltar é que, embora a TARV impeça que novas células sejam infectadas, ela não é capaz de eliminar o vírus do organismo. Muitas das células T CD4⁺ infectadas acabam sendo eliminadas, mas algumas podem sobreviver e passar a um estado desativado, contendo o material genético viral integrado ao seu, mantendo-o em um estado

latente, sem que ocorra a replicação viral, mas em uma falha na adesão ao tratamento, o vírus pode vir a se recuperar em pouco tempo (DAVEY, *et al.*, 1999). Mesmo que o diagnóstico seja feito muito rápido e a terapia iniciada logo no início da infecção, estudos mostraram que os reservatórios ainda podem ser detectados (HENRICH, *et al.* 2017). Um dos seus principais reservatórios é nos linfonodos, local que possui uma penetração muito limitada dos medicamentos antirretrovirais (FLETCHER, *et al.*, 2014).

Além do desenvolvimento da terapia antirretroviral, existem alguns relatos de busca pela cura por meio de outras abordagens e estratégias. Como o caso do bebê do Missisipi, uma criança que nasceu de uma mãe infectada e passou a receber a terapia horas depois do seu nascimento, ficando por cerca de 3 anos sem vírus detectável, mas, infelizmente, aos 4 anos de idade, ocorreu o rebote viral e a necessidade de iniciar a TARV novamente (PERSAUD, *et al.* 2013). Um outro relato foi do paciente de Berlim que eliminou totalmente o vírus do seu corpo por meio de rodadas de quimioterapia e de transplante de células-tronco. As células transplantadas não possuíam CCR₅, tornando as células T CD4⁺ resistentes ao HIV (HUTTER, *et al.* 2009). Houve um caso semelhante, o paciente de Londres, em que foi submetido a uma doação de um doador homozigoto para o alelo CCR₅ após receber quimioterapia para linfoma de Hodgkin. Foi um tratamento mais brando, não recebendo irradiação no corpo inteiro. O paciente permaneceu em remissão do HIV por 18 meses apenas (GUPTA, *et al.* 2019). Apesar de se ter obtido um resultado positivo, esses procedimentos são de altos riscos e necessitam de doadores com condições específicas e um gigantesco acompanhamento clínico. O mesmo desfecho do paciente de Berlim, por exemplo, ainda não se repetiu, mas ocorreram muitas mortes durante as novas tentativas, devido a condições médicas não relacionadas ao HIV (HUTTER, 2014).

Portanto, atualmente, o melhor e mais acessível tratamento para o HIV continua sendo a terapia antirretroviral, embora esta não leve a cura da infecção pelo vírus e possua algumas

desvantagens. Um dos grandes obstáculos na busca pela cura do HIV é a manutenção de reservatórios latentes do vírus em locais com pouco acesso a fármacos, como o sistema linfático.

1.4. Reservatório latente do vírus HIV

Os reservatórios latentes são formados por células infectadas que abrigam o pró-vírus do HIV em um estado inativo, sem produzir suas proteínas. Sem a transcrição viral, os antígenos virais não são expressos e não são detectados pelo sistema imune, não permitindo a identificação e eliminação da célula infectada (EISELE; SILICIANO, 2012). Existem dois tipos de latência do vírus HIV: a latência pré-integração, na qual o DNA viral é parcialmente ou completamente sintetizado, mas não é integrado ao material genético do hospedeiro, permanecendo no citoplasma no complexo de pré-integração (PIC). A integração ocorre apenas quando a célula é ativada novamente. Esse tipo de infecção pode ser comum em células T CD4⁺ em repouso (ZACK, *et al.* 1990; BUKRINSKY, *et al.* 1991; CHUN, *et al.* 1997); e a principal forma de latência, que é a pós-integração, em que o vírus além de ter seu DNA sintetizado, este também é integrado ao material genético da célula hospedeira, apenas não tem seus genes expressos (CHUN, *et al.* 1997; FINZI, *et al.* 1997).

Ainda não está completamente elucidado como os reservatórios do vírus HIV são formados. Existem estudos que sustentam a hipótese de que o reservatório é gerado pela proliferação de alguns tipos celulares infectados antes do início da TARV (ROSENBLOOM, *et al.* 2017), enquanto outra hipótese diz sobre a infecções contínuas e de baixo nível nos santuários com a diminuição da concentração da terapia antirretroviral, além de se ter uma penetração inadequada dos medicamentos antirretrovirais em alguns tecidos que o vírus se encontra e se replica (FLETCHER, *et al.* 2014). Entretanto, está evidente a presença deste reservatório nos pacientes e a importância de sua eliminação para completa cura do HIV.

As células T CD4⁺ em estado de repouso são as principais constituintes do reservatório latente, não possuindo o maquinário necessário para a ativação da célula e do vírus, tendo uma cromatina heterocromática, dificultando o acesso por parte das moléculas efetoras do vírus (CHUN, *et al.* 1997; COIRAS, *et al.* 2009; WOOD; BICKMORE, 2011). Estudos sugerem que a latência nesse tipo celular ocorra por dois mecanismos: a infecção direta de células que estão em repouso (SWIGGARD, *et al.* 2005) ou pela infecção de células T CD4⁺ ativadas que passam para um estado quiescente (CHAVEZ; CALVANESE; VERDIN, 2015). Entretanto, o reservatório latente não é formado apenas por esse tipo celular, envolvendo também outros tipos de células T e integrantes da linhagem mieloide, como monócitos/macrófagos, que podem fagocitar células infectadas, aumentando a probabilidade de infecção, e células dendríticas, que são células apresentadores de antígenos, além de células tronco hematopoiéticas (ZHU, *et al.* 2002; ZAIKOS, *et al.* 2018). Muitas destas células, como as células T CD4⁺ e os macrófagos, estão constantemente transitando nos tecidos linfoides e não linfoides. Desta forma, o sistema linfático, local de acesso restrito aos fármacos, torna-se um dos principais reservatórios do vírus HIV (BELMONTE, *et al.* 2007; LORENZO-REDONDO, *et al.* 2016). Os reservatórios do vírus HIV também foram detectados em outros locais, como cérebro, pulmões, fígado, medula óssea, tecidos reprodutivos e tecido adiposo (AVALOS, *et al.* 2017; AVALOS, *et al.* 2016; DAHL, *et al.* 2014; FISCUS, *et al.* 2013; COUTURIER; LEWIS, *et al.* 2018). Apesar do HIV, em experimentos *in vitro*, se integrar preferencialmente em genes com transcrição ativa (SCHALLER, *et al.* 2011), estudos mostraram que em pacientes que vivem com a doença e estão com uso de TARV, foram detectados vírus em regiões genômicas silenciosas, limitando ou impedindo sua reativação (JIANG, *et al.* 2020).

Embora o uso da TARV mantenha o vírus nesse estado latente e melhore a qualidade de vida dos indivíduos, gerando benefícios também no controle da transmissão, é importante ressaltar que mesmo em um estado “dormente” o vírus ainda pode induzir efeitos negativos no

paciente infectado, desencadeando alterações na sinalização celular e disfunções metabólicas, ocasionando uma inflamação persistente e envelhecimento prematuro do sistema imunológico (ZHAO, *et al.* 2019; KHANAL, *et al.* 2020). Portanto, é urgente a necessidade de se encontrar maneiras de eliminar tais reservatórios para que a pessoa infectada possa ter condições de vidas iguais a de pessoas que nunca passaram pela infecção do HIV.

Para entender como o vírus permanece em um estado latente e como as abordagens estudadas atualmente agem para reverter a latência, é importante compreender os mecanismos celulares envolvidos na transcrição do DNA viral em RNA mensageiro. Temos alguns fatores celulares que suprimem a latência e outros que promovem a latência, atuando em diferentes níveis moleculares do processo de transcrição do HIV. Dentre os que promovem a latência, ou seja, fazem com que o vírus fique em um estado dormente na célula, tem-se: modificadores de histonas (ROMANI; ALLAHBAKHSI, 2017), inibidores da transcrição viral (MOUSSEAU, *et al.* 2015), citocinas que induzem a diferenciação de células T em células de memória (CAMERON, *et al.* 2010) e repressores transcricionais (SAAYMAN, *et al.* 2014). Agora, os que suprimem a latência e são capazes de reverter o estado dormente do vírus, podem ser estudados na terapêutica visando a eliminação destes reservatórios latentes. São eles: citocinas ativadoras da célula T (FOLKS, *et al.* 1987), agonistas de receptores toll-like e rig-i-like (ALVAREZ-CARBONELL, *et al.* 2017; LI, *et al.* 2016), efetores da via $\text{Nf-}\kappa\beta$, inibidores de histonas deacetilases (ARCHIN, *et al.* 2017) e efector pleiotrópico mTOR (BESNARD, *et al.* 2016). Portanto, uma estratégia atual para eliminar os reservatórios do vírus HIV é empregar agentes reversores de latência.

Após o processo de integração viral, tanto a transcrição das proteínas do vírus quanto das proteínas do hospedeiro é em grande parte reguladas pelo estado de condensação da cromatina. Os genes que estão em regiões compactadas do DNA, denominada de heterocromatina, são inativos, pois o estado condensado dificulta o acesso dos fatores de

transcrição. Agora, os genes que estão nas regiões menos condensadas, denominadas de eucromatina, são aptos para transcrição (ALLSHIRE; MADHANI, 2018). Como mencionado anteriormente, a integração do vírus acontece primordialmente na eucromatina para que suas proteínas possam ser geradas.

A cromatina é envolvida em um núcleo proteico octamérico com duas cópias de cada uma das proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) (KORNBERG, 1974). O conjunto das histonas com o material genético é chamado de nucleossoma. Os domínios N-terminais de cada histona está projetado para fora do nucleossoma, estando sujeito a modificações. Na heterocromatina, as interações entre a proteína histona e o material genético são mais compactadas, enquanto na eucromatina são mais descompactadas. O material genético viral também possui nucleossomos, nuc-0 e nuc-1, que estão presentes mesmo quando é integrado na eucromatina (DEMARCHI, *et al.* 1993; EASLEY, *et al.* 2010), sendo seu grau de condensação também importante para a transcrição viral.

Muitos fatores estão relacionados com o processo de condensação/descondensação da cromatina. Modificações pós-traducionais determinam o estado de condensação da cromatina, pois alteram a capacidade da histona de recrutar complexos que são importantes nesse processo. Existem dois mecanismos importantes pelos quais a estrutura do nucleossoma pode ser alterada: a primeira é por meio da ação de complexos de remodelação da cromatina dependentes de ATP (adenosina trifosfato) e a segunda envolve a atividade de proteínas modificadoras de histonas que podem realizar processos como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação alterando a estrutura da interação Histona-DNA, tornando-o mais ou menos estável (DE CRIGNIS; MAHMOUDI, 2017).

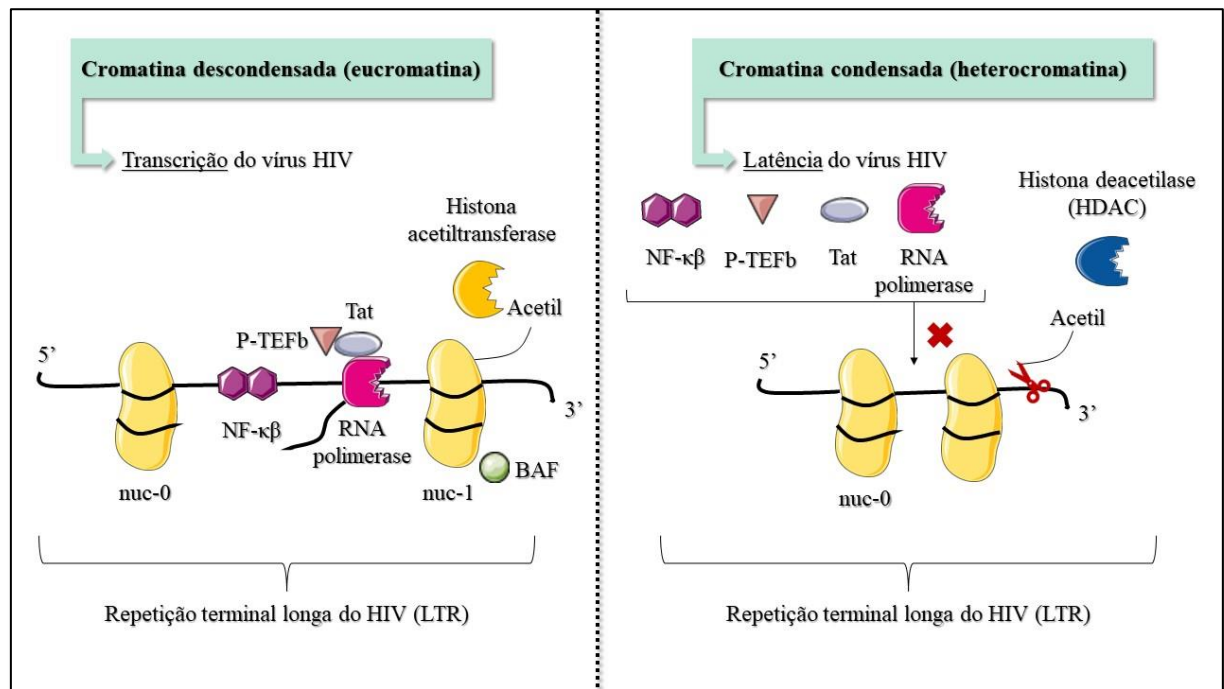
Após a integração viral, os nucleossomas do vírus (nuc-0 e nuc-1) são ordenados dentro da repetição terminal longa do HIV (LTR) que funciona como promotor do HIV (VAN LINT,

et al. 1996). Particularmente o nuc-1, quando posicionado em torno do local de início da transcrição do HIV, contribui para a latência, bloqueando a transcrição pela RNA polimerase viral. A indução de NF- κ B permite que ela se ligue ao promotor do HIV e promova a transcrição do vírus, recrutando histonas acetiltransferases (HATs) para o promotor (LUSIC, *et al.* 2003; BENKIRANE, *et al.* 1998). As HATs, acetilam as histonas e promovem a descompactação do DNA, possibilitando a transcrição (ALLSHIRE; MADHANI, 2018). A acetilação do promotor resulta no recrutamento de um complexo de remodelação da cromatina (BAF) que ativa a transcrição pelo deslocamento de nuc-1, posicionando-o a jusante do local de início da transcrição (VAN LINT, *et al.*, 1996; EASLEY, *et al.* 2010). Esse aumento do NF- κ B gera também um aumento nos níveis de Tat viral, um potente ativador do vírus que modula fortemente a transcrição viral (KARN, 2011). A Tat se liga ao elemento de resposta de transcrição (TAR) que está no RNAm nascente e recruta o fator de alongamento de transcrição positivo B (P-TEFb), que gera o alongamento da fita de RNA (WEST; LOWE; KARN, 2001).

Estudos mostraram que em HIV latente, ocorreu a predominância de histonas desacetiladas e trimetiladas (TYAGI., *et al.* 2010).

A **Figura 4** contém uma representação dos fatores necessários para a transcrição do vírus e compara com o estado de latência do HIV. Portanto, pode-se concluir que os fatores NF- κ B e P-TEFb são importantes para a transcrição do vírus. Explorar estes fatores, bem como as enzimas responsáveis pela desacetilação, acetilação, metilação e outros processos de modificações das histonas podem ser caminhos interessante para buscar a cura do HIV.

Figura 4. Transcrição do vírus HIV e fatores importantes para o estabelecimento da latência.

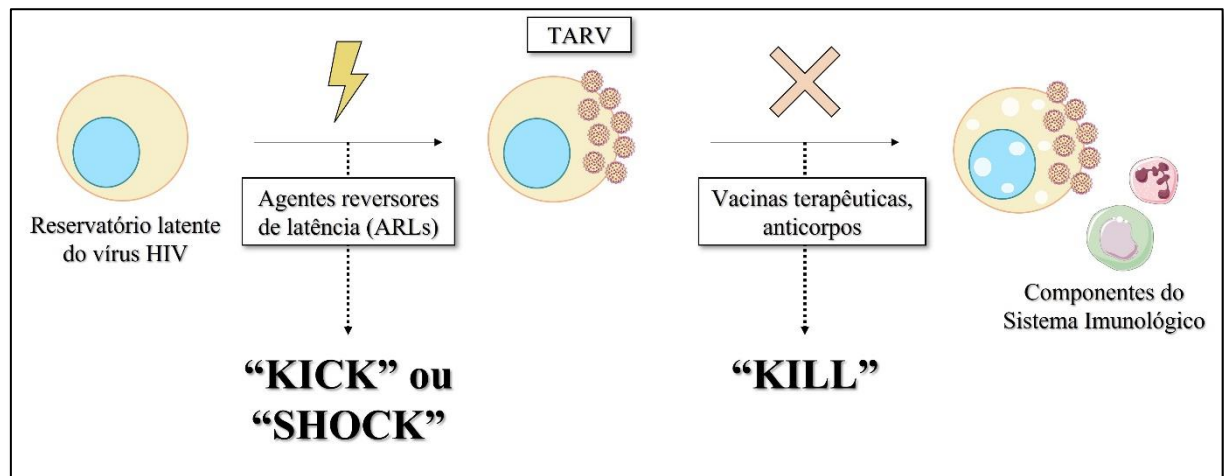


Fonte: adaptado de AHLENSTIEL, *et al.* 2020. A figura foi elaborada utilizando imagens retiradas do banco de imagens de Servier Medical Art, Servier.

1.5. Agentes Reversores de Latência (ARLs) e estratégia “kick-and-kill” ou “shock-and-kill”

Uma estratégia para eliminação do HIV latente é o “kick and kill” ou “shock and kill” por meio do uso de agentes reversores de latência (ARLs). Como o motivo da reinfecção ao interromper a TARV ocorre em decorrência do material genético viral que permanece latente no interior da célula hospedeira, essa estratégia visa reverter a latência do vírus, para que ele volte a produzir suas proteínas virais (“kick”, “shock”), sendo então reconhecido pelo sistema imunológico do indivíduo ou anticorpos oriundos de vacinas, por exemplo, para ser completamente eliminado (“kill”) (DEEKS, *et al.* 2015). Além disso, os vírus que seriam reativados seriam impedidos de infectar outras células com o uso de algumas classes de antirretrovirais (Figura 5).

Figura 5. Estratégia “kick and kill” ou “shock and kill”.



Fonte: próprio autor. A figura foi elaborada utilizando imagens retiradas do banco de imagens de Servier Medical Art, Servier.

Existem diversas classes de ARLs, como por exemplo: agonistas de proteína quinase C, responsáveis por ativar isoformas da enzima que inicia a sinalização por NF- κ B induzindo a transcrição do HIV (JIANG; DANDEKAR, 2015); inibidores de bromodomínios, que aumentam o recrutamento de P-TEFb; inibidores de histona metiltransferases, que impedem a metilação das histonas; antagonista de CCR₅, que pode interagir com o receptor CCR₅ e induzir a ativação de NF- κ B, amentando a transcrição do HIV (MADRID-ELENA, *et al.* 2018; DE CRIGNIS; MAHMOUDI, 2017; HENDERSON, *et al.* 2020), entre outros. No nosso estudo, trabalhamos com a classe dos inibidores de histona deacetilase (HDACi) que inibem esta enzima, gerando acetilação da histona e possibilitando a transcrição do HIV (VAN LINT, *et al.* 1996).

1.6. Inibidores de histona deacetilase (HDACi)

Os inibidores da enzima Histona Deacetilase são ARLs que se destacam por demonstrarem uma boa eficácia clínica. As Histonas Deacetilases (HDAC) são enzimas localizadas no interior das células que realizam a desacetilação de lisinas acetiladas na cauda

Existem quatro diferentes classes de HDAC: a classe I engloba as HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8 que são expressas no núcleo e possuem domínio desacetilase (FU, *et al.* 2007); a classe II pode ser dividida em IIA (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9) e IIB (HDAC6 e HDAC10), estando presentes no núcleo e no citoplasma (VERDIN, *et al.* 2003); a classe III envolvem as sirtuínas que não possuem funções associadas as HDACs de classe I e II; a classe IV engloba a HDAC11 que é encontrada no núcleo e no citoplasma (GAO, *et al.* 2002). As HDACs de classe I e II são dependentes de interação com o íon Zn^{2+} de seu sítio ativo enquanto as HDAC de classe III são NAD-dependentes (GREGORETTI, *et al.* 2004; LAHM, *et al.*, 2007). Além de atuar na modulação do material genético, as HDACs atuam em várias outras vias de sinalização, sendo importantes para o controle de condições fisiopatológicas normais e doentes (CHAKRABARTI, *et al.* 2015; AMIN, *et al.* 2017). Como existem muitos tipos de HDACs com estruturas bastante semelhantes, é de extrema importância que ao se pensar em um inibidor da enzima, trabalhe com um que seja mais seletivo para a forma de interesse.

As enzimas HDACs de classe I possuem uma grande semelhança estrutural com uma proteína de levedura, a RPD3 (TAUNTON, *et al.* 1996). A HDAC3 é codificada de forma semelhante à proteína RPD3, mas possui sua estrutura bastante diferente quando comparada com as outras HDACs de mesma classe (THOMAS, 2014). Da mesma forma que as HDACs 1 e 2, a HDAC3 requer o recrutamento de grandes complexos co-repressores de múltiplas subunidades para que tenha sua atividade máxima. Entretanto, a HDAC3 é recrutada para um complexo diferente das demais, onde interage com componentes importantes para sua ativação. Com relação a sua estrutura, a HDAC3 possui folha β paralela de oito filamentos englobados por α -hélices. Contém também um único resíduo de tirosina próximo ao seu sítio ativo que deve interagir com o substrato para regular a especificidade da enzima, além do átomo de Zn^{2+}

(WATSON; *et al.* 2012). Considerando a sua seletividade e especificidade, a HDAC3 foi considerada um alvo promissor para combater múltiplas doenças (SARKAR, *et al.* 2020).

Um dos primeiros estudos sobre o uso de inibidores de HDAC na reativação do HIV, testou o ácido valpróico, inibidor de HDAC utilizado para tratamento de epilepsia e transtornos bipolares, mas não foi eficiente em diminuir o número de células T CD4⁺ infectadas em estado latente (ROUTY, *et al.* 2012). Outros ARLs testados em humanos foram capazes de induzir a expressão do RNA viral, bem como a produção de vírions. Estudos com o vorinostat e panobinostat mostraram que ocorreu um aumento no nível de RNA do HIV com a administração do medicamento, mas o reservatório latente ainda permaneceu presente (ELLIOTT, *et al.* 2014; RASMUSSEN, *et al.* 2014). Um piloto recente avaliou também o resultado de infusões múltiplas de romidepsin e mostrou aumento do RNA do HIV na maioria dos pacientes (SOGAARD, *et al.* 2015). Dentro das HDACs de classe I, a diminuição da atividade de HDAC1 e HDAC2 sozinho ou em combinação não ativou a transcrição do vírus HIV, enquanto a inibição de HDAC3 levou a ativação do HIV latente. Portanto, a inibição da HDAC3 foi considerada crucial para a reativação do HIV (HUBER, *et al.*, 2011). O composto BRD3308 possuiu destaque na inibição de HDAC3 e foi capaz de induzir a replicação do vírus (BARTON, *et al.* 2014).

Existem algumas hipóteses para a persistência do reservatório latente nos estudos com os ARLs. A resposta imune é prejudicada durante a infecção crônica, podendo ser incapaz de eliminar as células infectadas (SHAN, *et al.* 2012). Além disso, os inibidores de HDAC podem suprimir a resposta de células T citotóxicas (JONES, *et al.* 2014). Por conta disso, o uso de agentes imunomoduladores é muito importante. Entretanto, estudos também mostraram que alguns inibidores de HDAC não foram capazes de reduzir o tamanho dos reservatórios mesmo quando combinados com estratégias imunoterapêuticas (DEEKS, *et al.* 2021). Tal observação pode ser em decorrência da indução insuficiente dos reservatórios pelos ARLs ou ainda uma

falha na ação da imunoterapia. Um ponto que chama muita atenção é o acesso limitado dos ARLs aos locais de reservatório do vírus HIV, como o sistema linfático. Tal fato pode estar ocasionando uma ineficaz reativação viral, uma vez que os reservatórios destes santuários permanecerão intactos se os fármacos não forem capazes de acessá-los. Além disso, alguns ARLs são pouco eficientes contra alguns tipos celulares que abrigam o HIV, como macrófagos e células microgliais, além de modularem a expressão gênica de maneira geral, podendo ocasionar efeitos adversos (ELLIS, *et al.* 2007). Portanto, os potenciais agentes reversores de latência devem ser melhorados para reduzir a toxicidade, melhorar a ação dos fármacos em todos os tipos celulares capazes de armazenar o reservatório latente e aumentar a sua potência, buscando estratégias de entrega mais efetiva destes fármacos aos focos de reservatórios do vírus HIV.

1.7. Direcionamento de fármacos ao sistema linfático

Os reservatórios latentes do vírus HIV podem ter muitas localizações anatômicas, como os linfonodos, tecido linfático associado ao intestino (GALT) (YUKL, *et al.* 2013) e o cérebro (WALLET, *et al.* 2019), sendo considerados santuários do vírus, pois os fármacos antirretrovirais atualmente existentes possuem acesso limitado a estes locais, sendo mais um desafio a ser enfrentado para a eliminação dos reservatórios latentes (FLETCHER, *et al.* 2014).

Apesar do uso de ARLs ser uma estratégia muito interessante, devido ao acesso limitado de fármacos ao sistema linfático, os inibidores de HDAC, bem como outros fármacos, são direcionados a corrente sanguínea, permanecendo intacto o reservatório latente de HIV nos linfonodos. Portanto, uma outra abordagem interessante é o direcionamento dos fármacos reversores de latência para o sistema linfático.

Considerando um fármaco administrado pela via oral, uma molécula com tamanho elevado pode restringir em partes o acesso ao sangue, podendo culminar no direcionamento de

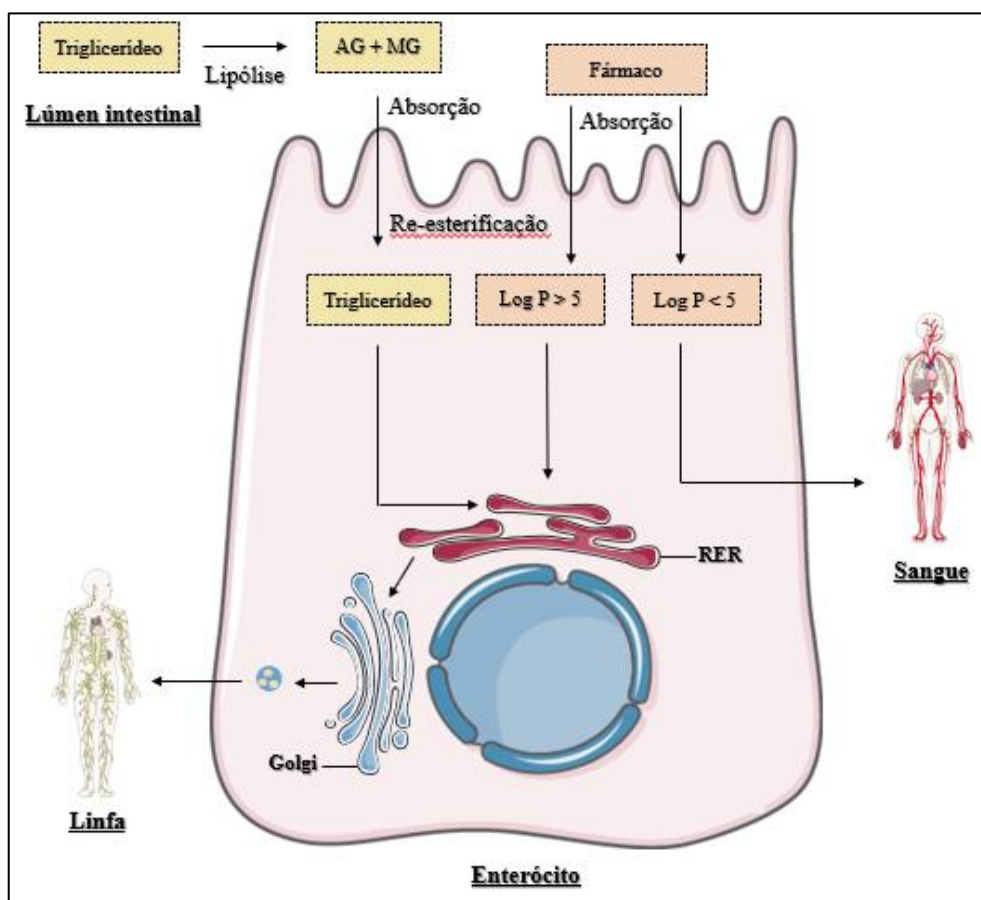
parte do fármaco a linfa mesentérica. Quando temos moléculas pequenas, elas se difundem facilmente pelos capilares sanguíneos e linfáticos e tendem a serem levadas pelos capilares sanguíneos que possuem taxas de fluxo muito superiores ao fluxo linfático. Entretanto, moléculas grandes são capazes de serem direcionadas aos vasos linfáticos, embora não exclusivamente, pois seu tamanho impede o acesso imediato ao sangue. Para tanto, as moléculas de baixo peso molecular podem ser associadas com transportadores macromoleculares lipofílicos sintéticos/endógenos ou a células que possuem propriedades linfotrópicas (TREVASKIS, 2015).

Além disso, a lipofilicidade é outro parâmetro importante para o direcionamento a linfa. Estudos exploraram candidatos a fármacos altamente lipofílicos combinados com sistemas de distribuição a base de lipídios e mostraram que ambas as estratégias são úteis para direcionar os fármacos ao sistema linfático (TREVASKIS, *et al.*, 2010). Uma abordagem muito interessante é a síntese de um fármaco que tenha a sua lipofilicidade temporariamente aumentada por meio da síntese de um pró-fármaco lipofílico através da conjugação do fármaco original com componente lipofílico (LAMBERT; 2000).

A entrada de fármacos lipofílicos no sistema linfático segue um caminho semelhante ao dos lipídios da dieta. Os triglicerídeos adquiridos por meio da alimentação são clivados no lúmen intestinal em ácidos graxos (AG) e monoglicerídeos (MG) que são absorvidos pelos enterócitos e, no interior dessa célula, são convertidos novamente em triglicerídeos que se combinam com fosfolipídios e apolipoproteínas no retículo endoplasmático rugoso (RER), formando uma lipoproteína nascente que passa ao complexo de Golgi, sendo exocitada do intestino por meio dos vasos linfáticos mesentéricos. Os fármacos que são pouco lipossolúveis, após serem absorvidos pelos enterócitos, caem direto para os capilares sanguíneos intestinais. Entretanto, aqueles com LogP (coeficiente de partição) > 5 seguem o caminho descrito para os triglicerídeos, sendo empacotados em lipoproteínas e atingindo o sistema linfático

(TREVASKIS, *et al.*, 2008; TREVASKIS, *et al.*, 2015; YÁÑEZ, *et al.*, 2011) (**Figura 7**). A estratégia de direcionar os fármacos ao sistema linfático, além de permitir o acesso ao reservatório de HIV dos linfonodos, evita o metabolismo de primeira passagem dos fármacos no fígado.

Figura 7. Direcionamento de fármacos de administração oral para o sistema linfático.



Fonte: adaptado de TREVASKIS; PORTER, 2015. A figura foi elaborada utilizando imagens retiradas do banco de imagens de Servier Medical Art, Servier.

Para aumento da lipofilicidade dos fármacos, uma alternativa é o acoplamento com compostos muito lipossolúveis, como os ácidos graxos que são lipídios essenciais para todas as células do nosso organismo. Apesar dos mamíferos possuírem a capacidade de produzir alguns ácidos graxos, os poli-insaturados de cadeias longas só podem ser obtidos a partir de precursores da dieta (BRENNER; 1987). O acoplamento do fármaco com ácido graxo, além de

aumentar a lipofilicidade do mesmo, caso ocorra a clivagem do pró-fármaco *in vivo*, liberaria uma substância também importante para o organismo do indivíduo.

Considerando o número de pessoas que vivem atualmente com o HIV, os problemas relacionados ao reservatório latente e adesão a TARV, bem como a toxicidade do uso de medicamentos administrados por toda a vida, nota-se a importância de estudos que visem a obtenção de fármacos para eliminação completa do reservatório latente do vírus, proporcionando uma melhora ainda maior na qualidade de vida destes pacientes e a diminuição drástica no número de novas infecções. Pensando nisso, o presente estudo visou o planejamento, síntese e caracterização de moléculas que atuassem como reversores de latência por meio da inibição da enzima histona deacetilase 3 (HDAC3), e que fossem direcionados ao sistema linfático por meio do acoplamento com ácidos graxos, com o objetivo de atingir um dos principais focos do reservatório viral que não é facilmente alcançado por outros fármacos.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo realizar a modelagem molecular, planejamento, síntese e caracterização de novos inibidores de HDAC-3 acoplados com ácidos graxos, para atuarem como agentes reversores de latência direcionados ao sistema linfático.

2.1. Objetivos Específicos

- Planejamento estrutural assistido por modelagem molecular de inibidores de HDAC3 acoplados com ácidos graxos;
- Síntese, isolamento e caracterização dos compostos da Série 1;
- Síntese, isolamento e caracterização dos compostos da Série 2;
- Avaliação do Log P teórico e experimental das quatro moléculas finais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Planejamento Estrutural

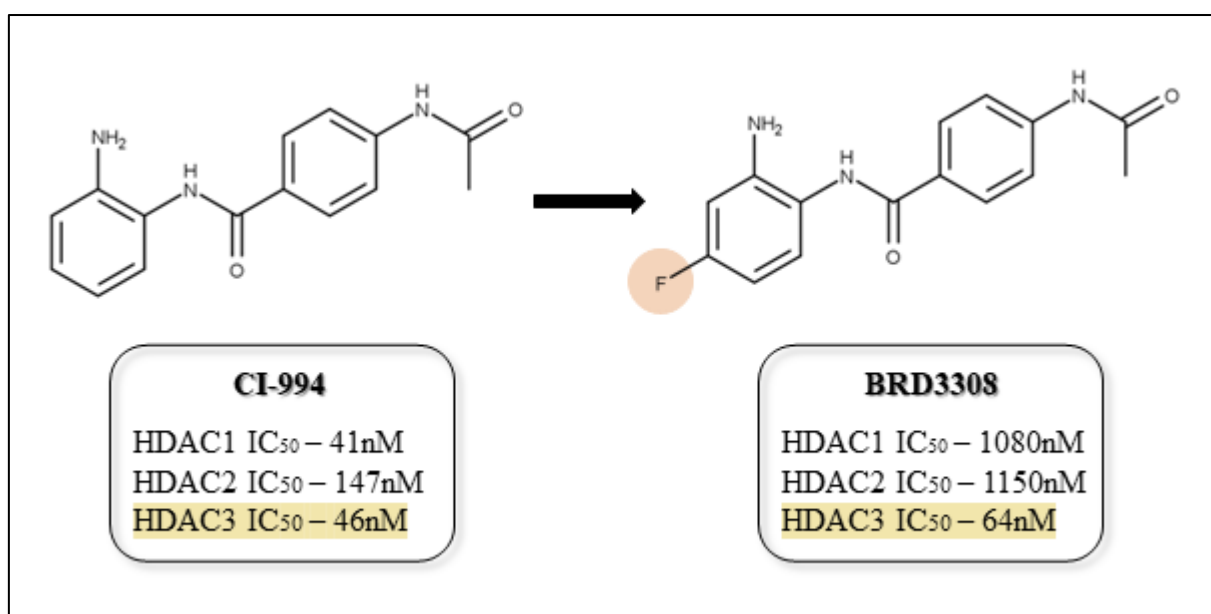
Os inibidores de HDAC não seletivos e seletivos de classe I demonstraram ser indutores potentes da expressão do HIV em modelos de latência (YLISASIGUI, *et al.* 2004; ARCHIN, *et al.* 2009). Dentre as HDACs de classe I, a HDAC3 merece destaque, pois sua inibição isolada foi capaz de ativar o HIV latente (HUBER, *et al.* 2011; BARTON, *et al.* 2014). Considerando a ampla gama de atividades das HDACs no organismo, a obtenção de um composto seletivo é necessária para reduzir os efeitos tóxicos desses medicamentos.

Compostos a base de benzamida foram demonstrados como inibidores seletivos para HDAC de classe I, sendo capazes de interagir com o átomo de Zn^{2+} presente em seu sítio ativo (CHEN, *et al.* 2009; WAGNER, *et al.* 2013). Buscando a seletividade para a HDAC3, estudos mostraram que a substituição por grupos volumosos na posição *p*-amino dificulta a interação com a enzima. A principal diferença do sítio ativo da HDAC3 é que ela possui um resíduo de Tirosina-107 enquanto as HDACs 1 e 2 possuem um resíduo de Serina-119. Essa modificação gera um impedimento estérico entre os resíduos de aminoácido do sítio ativo da HDAC3, permitindo uma melhor interação com átomos menores, como hidrogênio e flúor (WAGNER, *et al.* 2015; CAO, F.; ZWINDERMAN, M.R.H; DEKKER F.J.; 2018).

O CI-994 (tacedinalina) é um composto já bastante conhecido e estudado que possui mecanismo de ação por meio da inibição das HDACs (KRAKER, *et al.* 2003), sendo seletivo para a classe I e possui bom comportamento em estudos em humanos (PRAKASH, *et al.* 2001). A partir deste composto, pesquisadores realizaram uma modificação entre um hidrogênio e um átomo de flúor na posição *para* do grupo benzamida, resultando no composto BRD3308. A **Figura 8** contém a estrutura dos compostos CI-994 e BRD3308 com os respectivos IC_{50} para os tipos 1, 2 e 3 da HDAC (WAGNER, *et al.* 2016). É possível notar que o CI-994 apresentou

valores de IC_{50} mais baixos para as três enzimas quando comparado com BRD3308, sendo o valor menor referente a HDAC1. Com esses resultados, é possível interpretar que este composto seria bastante eficiente na inibição de mais um tipo de HDAC. Já o composto BRD3308 apresentou um valor bem menor de IC_{50} para a HDAC3, quando comparado com as outras enzimas, mostrando uma certa seletividade para este tipo de HDAC.

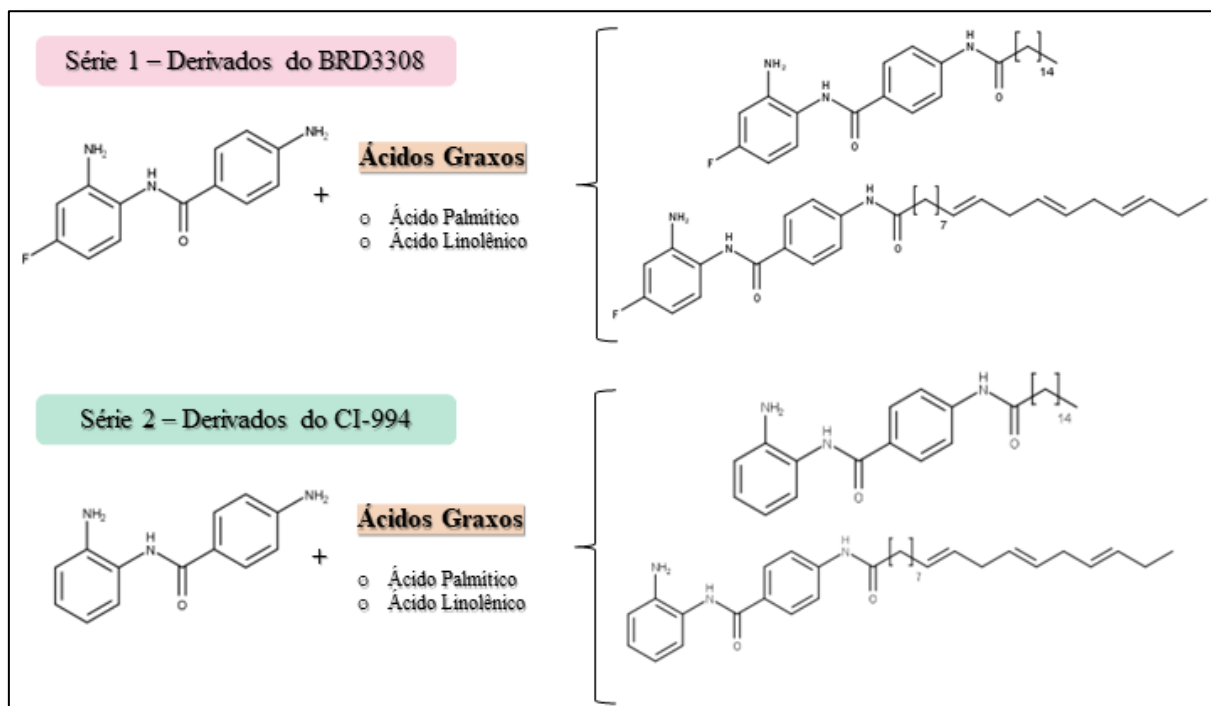
Figura 8. Comparação da ação dos compostos CI-994 e BRD3308 sob as HDACs 1, 2 e 3.



Fonte: adaptado de WAGNER, *et al.* 2016.

Considerando isso, a proposta do projeto foi realizar o acoplamento de inibidores de HDAC3 com dois ácidos graxos, o ácido palmítico e o ácido linolênico, visando obter uma molécula final com $\text{Log } P > 5$ para que, quando administrada via oral, siga um caminho semelhante ao dos triglicerídeos da dieta e seja direcionado ao sistema linfático, conforme descrito por Trevaskis *et al.*, 2008, Trevaskis *et al.*, 2015 e Yáñez *et al.*, 2011. Na **Figura 9**, temos uma ilustração de dois inibidores de HDAC3 e as duas estruturas finais de cada um quando acoplados aos ácidos graxos.

Figura 9. Inibidores de HDAC direcionados ao sistema linfático.



Fonte: próprio autor.

3.2. Modelagem Molecular

Para realização da modelagem molecular, utilizou-se o software Maestro® 2018-4 (SCHRODINGER, 2017a) em um computador com sistema operacional Windows 7 Home Premium, processador Intel Core I7-4790 com memória de 16 Gb e placa de processamento gráfico Nvidia Gforce GTX 980. A estrutura cristalográfica de HDAC-3 foi obtida no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), sob o código 4A69 com resolução de 2,06 Å (WATSON, *et al.* 2012). A estrutura se apresenta cristalizada com seu inibidor I0P.

Após a importação da estrutura para o software, ocorreu a preparação da mesma para o estudo de ancoragem molecular utilizando a função *Protein Preparation Wizard*. O seguinte protocolo foi executado: (i) remoção das moléculas de água; (ii) adição de átomos de hidrogênio; (iii) preenchimento de cadeias laterais incompletas; (iv) minimização de energia utilizando o campo de força OPLS3. A caixa de interação (“*grid*”) foi definida pelo *Receptor*

Grid Generation (SCHRODINGER, 2017b), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å. Seguido do preparo das proteínas, os ligantes foram desenhados e importados no formato SDF para o software Maestro® e sua preparação se deu através da função *Ligand Preparation (LigPrep)* a fim de realizar a minimização de energia utilizando campo de força OPLS3, e obter a simulação dos possíveis estados de ionização em pH 7 ± 2 (SCHRODINGER, 2017c).

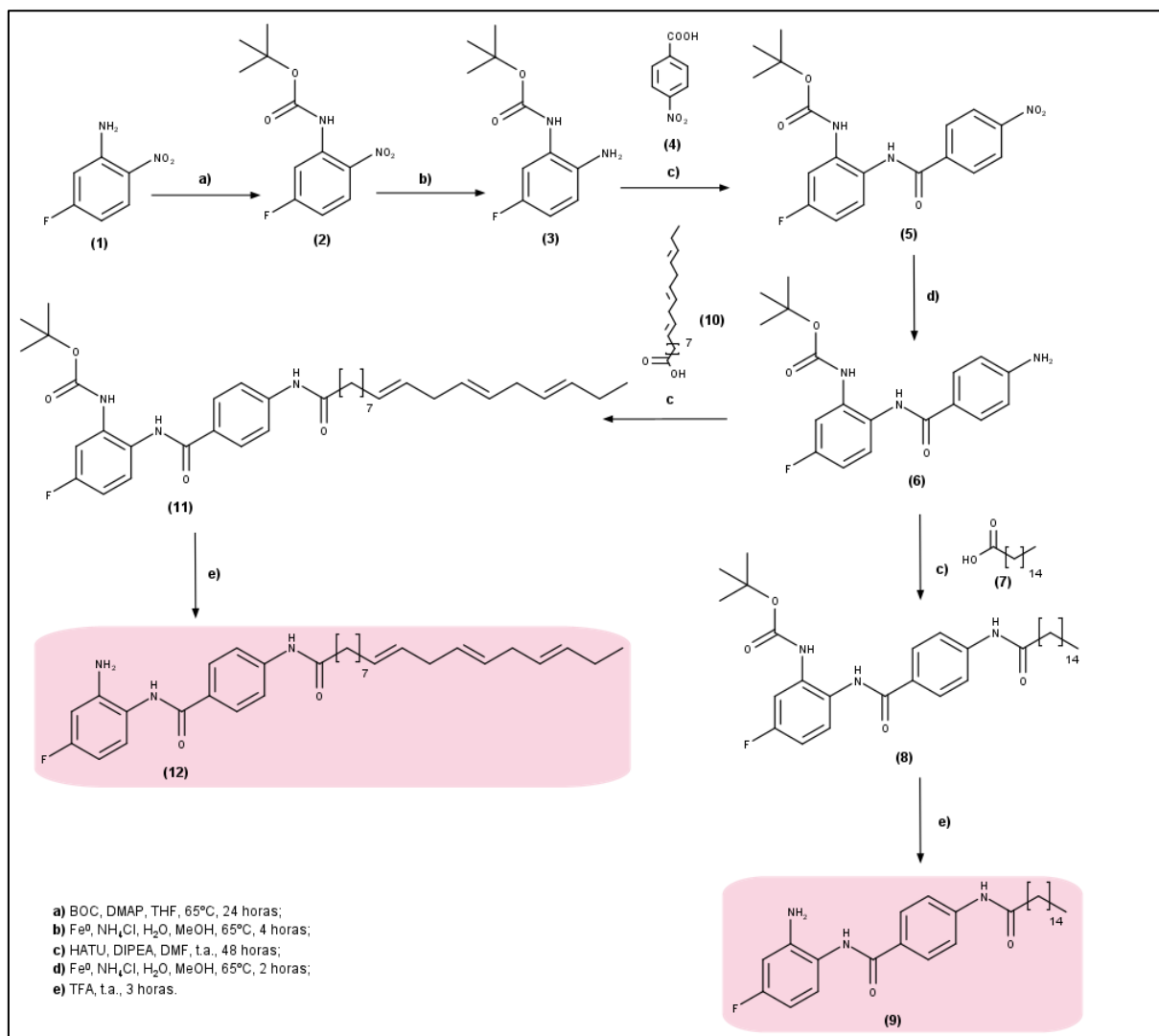
A fim de determinar a eficiência de todos os parâmetros utilizados neste estudo, o modelo foi validado por *redocking*, em que os ligantes originais das proteínas são removidos e posteriormente ancorados no mesmo sítio enzimático. A qualidade do resultado foi analisada pelo cálculo *Root Mean Square Deviation* (RMSD) entre o ligante co-cristalizado e o “redocado”. O valor obtido é considerado de confiança quando o RMSD for inferior a 2 Å (YUSF, *et al.* 2008).

3.3. Metodologia Sintética

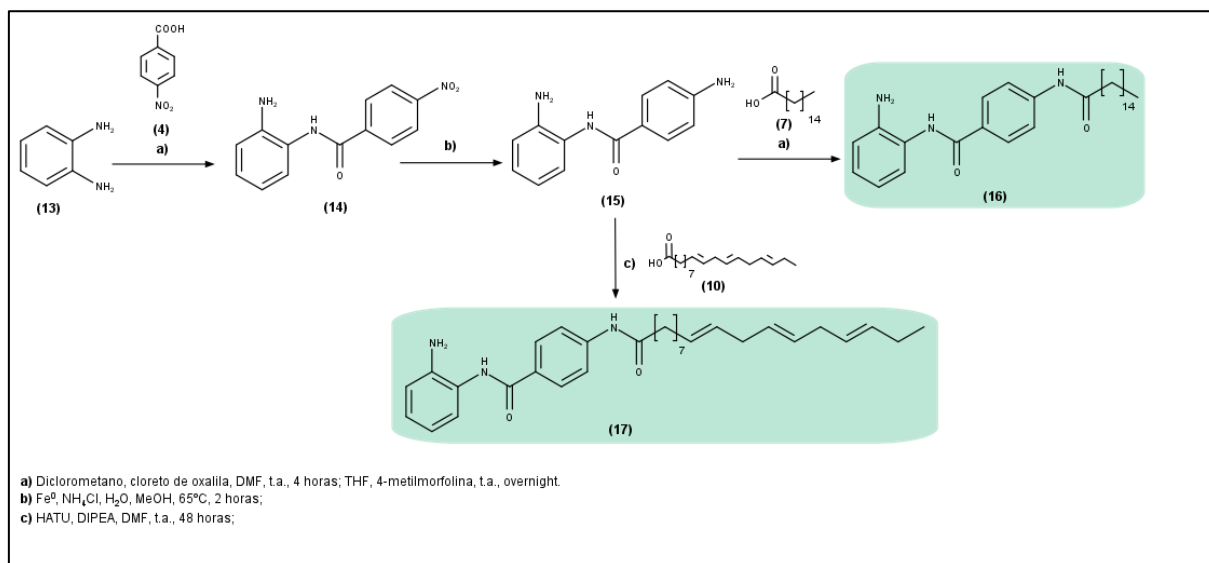
As **Figuras 10 e 11** representam as etapas sintéticas para síntese de dois derivados da Série 1, contendo um átomo de flúor, sendo um acoplado ao ácido palmítico e outro ao linolênico, e dois derivados da Série 2, também sendo um acoplado ao ácido palmítico e outro ao linolênico, gerando as estruturas finais, **(9) (12)** e **(16) (17)**.

As principais reações envolvidas no processo, foram: reações de proteção e desproteção de grupamento amina; reações de redução do grupamento nitro para uma amina primária; reações de acoplamento com agentes acoplantes para formação de amidas.

Figura 10. Etapas sintéticas para obtenção dos derivados da Série 1.



Fonte: próprio autor.

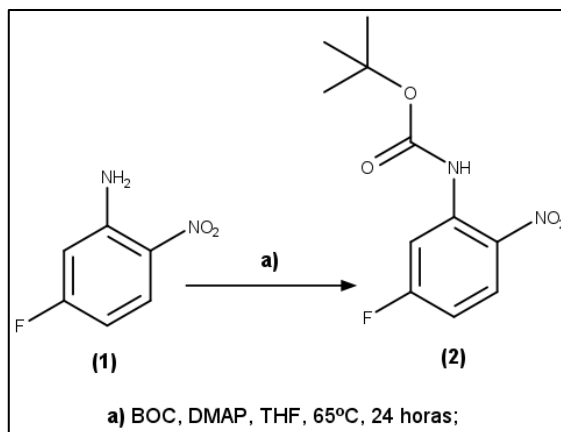
Figura 11. Etapas sintéticas para obtenção dos derivados da Série 2.

Fonte: próprio autor.

3.3.1. Síntese dos derivados da Série 1

3.3.1.1. Síntese do composto (2)

A primeira reação sintética para a síntese de terc-butil N-(5-fluoro-2-nitrofenil) carbamato (2) envolveu a proteção do grupamento amina primária do reagente 5-flúor-2-nitroanilina (1) com o agente protetor dicarbonato de di-terc-butila (BOC) conforme apresentado na figura abaixo (Figura 12).

Figura 12. Etapa sintética para obtenção do composto (2).

Fonte: próprio autor.

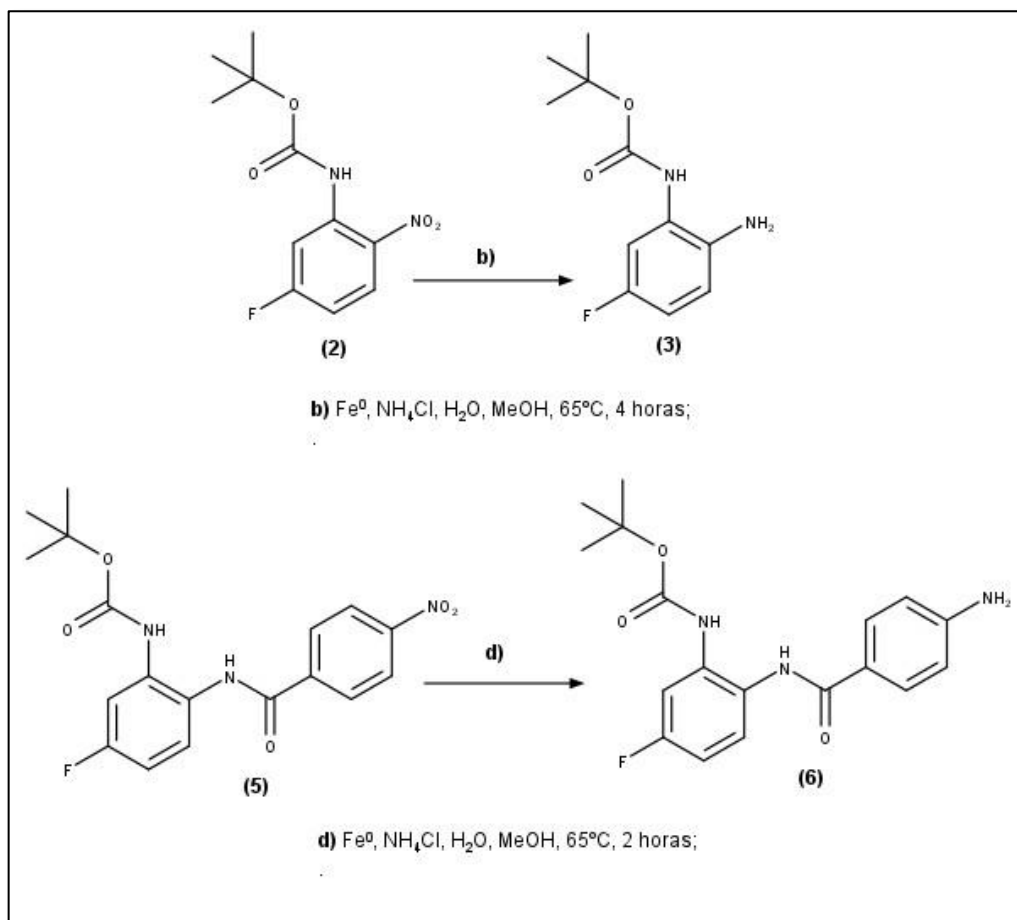
Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 800,0 mg (1 eq.mol^{-1}) do reagente 5-flúor-2-nitroanilina (reagente limitante), solubilizando-o em 6 mL de tetraidrofurano (THF), seguido pela adição de 2,354 mL (2 eq.mol^{-1}) do agente protetor BOC e 313,9 mg ($0,5 \text{ eq.mol}^{-1}$) do catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP). A reação foi mantida em refluxo, à 65 °C, sob agitação, por 24 horas, sendo acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando hexano/acetato de etila (9:1, v/v) como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm. Após 24 horas, o THF foi evaporado com auxílio de rotaevaporador e o conteúdo do balão submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a fase aquosa descartada após a completa remoção do conteúdo orgânico. A fase orgânica foi seca pela adição de sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. O acetato de etila foi evaporado. Realizou-se a purificação por cromatografia em coluna de bancada com altura aproximada de 15 cm da fase estacionária Sílica *Flash* e com fase móvel constituída de hexano/acetato de etila (9:1, v/v). O produto terc-butil *N*-(5-fluoro-2-nitrofenil) carbamato (**2**) foi obtido como um sólido amarelo e com rendimento em torno de 33,53% e fator de retenção (R_f) aproximado de 0,950.

3.3.1.2. Síntese dos compostos (3) e (6)

Para a síntese dos intermediários terc-butil *N*-(2-amino-5-fluorofenil) carbamato (**3**) e terc-butil *N*-[2-(4-aminobenzamida)-5-fluorofenil] carbamato (**6**), foi feita a redução do grupamento nitro-aromático dos precursores (**2**) e (**5**) em amina, conforme demonstrado nas reações a seguir (**Figura 13**).

Figura 13. Etapa sintética para obtenção dos compostos **(3)** e **(6)**.



Fonte: próprio autor.

Procedimento experimental para síntese de (3)

Adicionou-se em um balão de fundo redondo de 50 mL 300,0 mg (1 eq.mol⁻¹) do composto precursor **(2)** contendo o grupamento nitro, solubilizando-o em 7 mL de metanol e adicionando 313,3 mg (5 eq.mol⁻¹) de cloreto de amônio (NH_4Cl) diluído previamente em 2 mL de água destilada. O conteúdo do balão foi mantido sob agitação por 2 minutos e adicionou-se 261,7 mg (4 eq.mol⁻¹) de ferro metálico. A reação foi mantida sob refluxo, a 65°C e agitação por 4h. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando hexano/acetato de etila (7:3, v/v) como fase móvel, com revelação sob luz ultravioleta (254 nm) e com o uso da solução de ninidrina 2%, sendo que a amina formada apresentou coloração rosa após a placa de CCD borrifada com

ninidrina 2% permanecer alguns minutos na estufa. Após o tempo de reação, o conteúdo foi filtrado em celite para a remoção do ferro, lavado com metanol que foi rotaevaporado. Realizou-se a extração líquido/líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a aquosa descartada após completa remoção do composto orgânico. O excesso de água foi removido com a adição de sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. O acetato de etila foi evaporado e o sólido submetido a cromatografia em coluna de bancada utilizando 20 cm de fase estacionária Sílica *Flash* e fase móvel composta de hexano/acetato de etila (7:3, v/v). Após a purificação, obteve-se um sólido de coloração roxa bem escura, rendimento aproximado de 83,05% e R_f aproximado de 0,447.

Procedimento experimental para síntese de (6)

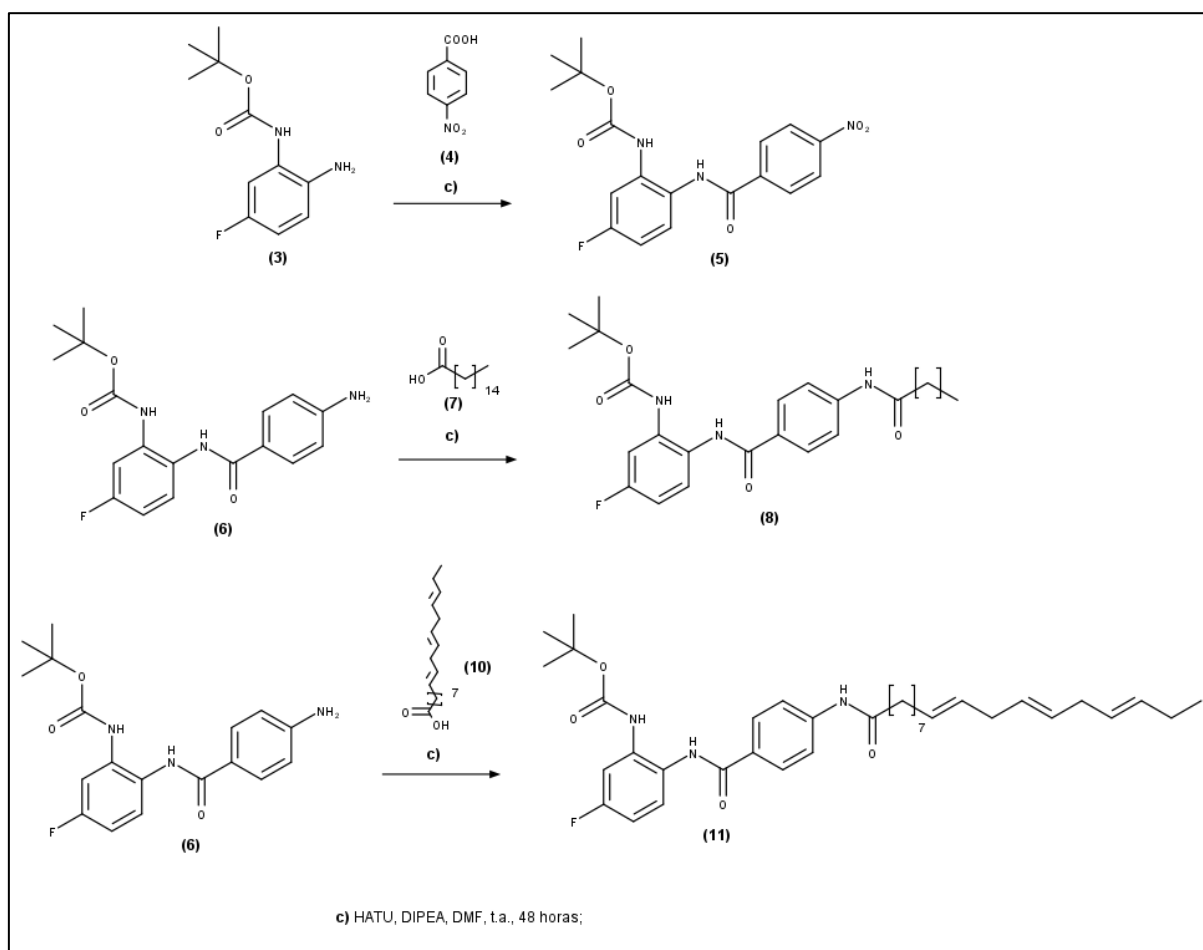
Adicionou-se em um balão de fundo redondo de 50 mL 120,0 mg (1 eq.mol⁻¹) do composto precursor (5), solubilizando-o em 7 mL de metanol e adicionando 85,6 mg (5 eq.mol⁻¹) de cloreto de amônio (NH₄Cl) diluído previamente em 2 mL de água destilada. O conteúdo do balão foi mantido sob agitação por 2 minutos e adicionou-se 71,5 mg (4 eq.mol⁻¹) de ferro metálico. A reação foi mantida sob refluxo, a 65 °C e agitação por 2h. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando hexano/acetato de etila (5:5, v/v) como fase móvel, com revelação sob luz ultravioleta (254 nm) e com o uso da solução de ninidrina 2%, sendo que a amina formada apresentou coloração rosa após a placa de CCD borrifada com ninidrina 2% permanecer alguns minutos na estufa. Após o tempo de reação, o conteúdo foi filtrado em celite para a remoção do ferro, lavado com metanol que foi rotaevaporado. Realizou-se a extração líquido/líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a aquosa descartada após completa remoção do composto orgânico. O excesso de água foi removido com a adição de sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. O acetato de etila foi evaporado e o sólido submetido a cromatografia em coluna de bancada com 10 cm de fase estacionária Sílica *Flash* e fase móvel

composta de hexano/acetato de etila (5:5, v/v). Após a purificação, obteve-se um sólido de coloração bege bem clara, rendimento em torno de 54,30% e R_f aproximado de 0,350.

3.3.1.3. Síntese dos compostos (5), (8) e (11) (adaptado WAGNER, *et al.* 2016).

A metodologia para formação das amidas terc-butil *N*-[5-fluoro-2-(4-nitrobenzamida) fenil] carbamato (5), terc-butil *N*-[5-fluoro-2-(4-hexadecanamidobenzamida) fenil] carbamato (8) e terc-butil *N*-(5-fluoro-2-{4-[(9*E*,12*E*,15*E*)-octadeca-9,12,15-trienamida]benzamida} fenil) carbamato (11) a partir dos precursores (3) e (6) utilizou o agente acoplante (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazol [4,5-*b*]piridino 3 óxido hexafluorofosfato (HATU), como representado na **Figura 14**.

Figura 14. Etapa sintética para obtenção dos compostos (5), (8) e (11).



Procedimento experimental para síntese de (5)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 655,8 mg ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) do agente acoplante HATU, 300,4 μL ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) da base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), 5 mL de dimetilformamida (DMF) e 288,3 mg ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) do intermediário carboxilado ácido 4-nitrobenzóico (**4**). A reação foi mantida sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 1 hora. Após este período, adicionou-se 300 mg (1 eq.mol^{-1}) do composto contendo o grupamento amino (**3**). Manteve-se o meio reacional sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 48 horas. O acompanhamento da reação foi feito por meio de CCD utilizando a fase móvel hexano/acetato de etila (5:5, v/v), sendo revelados sob luz ultravioleta (254 nm). Passadas as 48 horas, o meio reacional foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a aquosa descartada. A fase orgânica foi seca pela adição de sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. Evaporou-se o acetato de etila e o sólido formado foi submetido a cromatografia em coluna de bancada utilizando 15 cm da fase estacionária Sílica *Flash* e hexano/acetato de etila (5:5, v/v) como fase móvel. Após a purificação, obteve-se um sólido de coloração bege, rendimento de aproximadamente 40,18% e R_f aproximado de 0,833.

Procedimento experimental para síntese de (8)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 78,7 mg ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) do agente acoplante HATU, 36, $1\mu\text{L}$ ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) da base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), 5 mL de dimetilformamida (DMF) e 53,1 mg ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) do intermediário carboxilado ácido palmítico (**7**). A reação foi mantida sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 1 hora. Após este período, adicionou-se 55 mg (1 eq.mol^{-1}) do composto contendo o grupamento amino (**6**). Manteve-se o meio reacional sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 48 horas. O acompanhamento da reação foi feito por

meio de CCD utilizando a fase móvel hexano/acetato de etila (5:5, v/v), sendo revelados sob luz ultravioleta (254 nm). Passadas as 48 horas, o meio reacional foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a aquosa descartada. A fase orgânica foi seca pela adição de sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. Evaporou-se o acetato de etila e o sólido formado foi submetido a cromatografia em coluna de bancada utilizando 15 cm da fase estacionária Sílica *Flash* e hexano/acetato de etila (5:5, v/v) como fase móvel. Após a purificação, obteve-se um sólido de coloração branca, rendimento de 32,29% e R_f aproximado de 0,700.

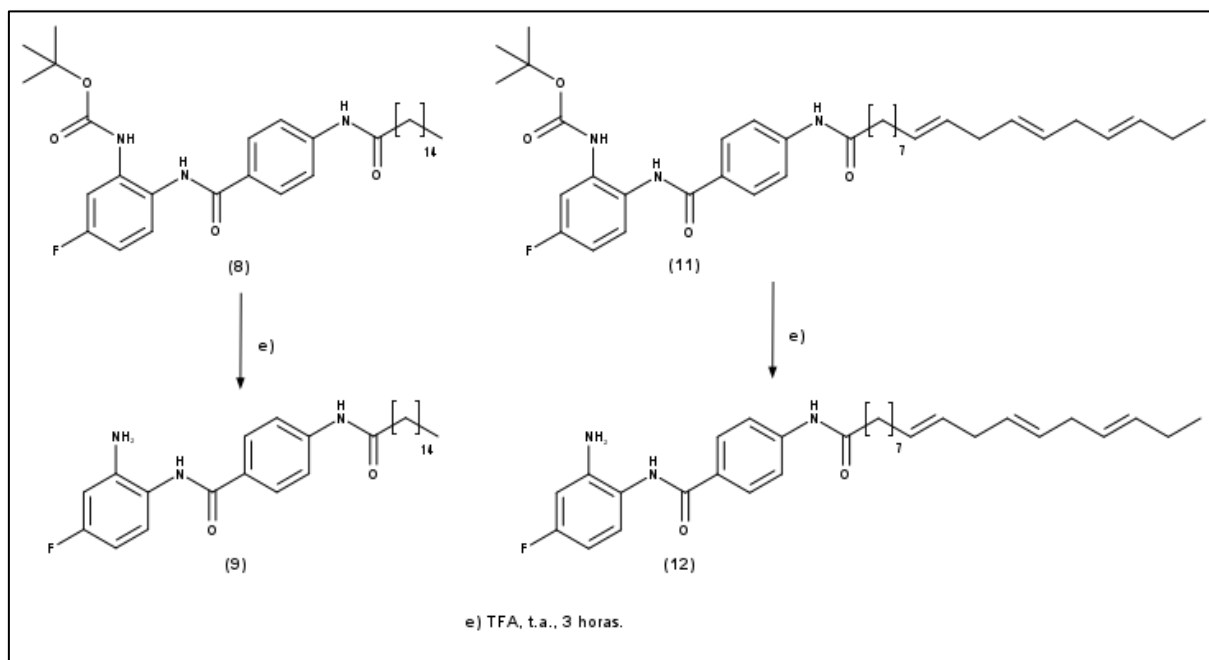
Procedimento experimental para síntese de (11)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 229,2 mg ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) do agente acoplante HATU, 104,9 μL ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) da base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), 5 mL de dimetilformamida (DMF) e 183,7 μL ($1,3 \text{ eq.mol}^{-1}$) do intermediário carboxilado ácido linolênico **(10)**. A reação foi mantida sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 1 hora. Após este período, adicionou-se 160,0 mg (1 eq.mol^{-1}) do composto contendo o grupamento amino **(6)**. Manteve-se o meio reacional sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 48 horas. O acompanhamento da reação foi feito por meio de CCD utilizando a fase móvel hexano/acetato de etila (5:5, v/v), sendo revelados sob luz ultravioleta (254 nm). Passadas as 48 horas, o meio reacional foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a aquosa descartada. A fase orgânica foi seca pela adição de sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. Evaporou-se o acetato de etila e o sólido formado foi submetido a cromatografia em coluna de bancada, utilizando 15 cm da fase estacionária Sílica *Flash* e hexano/acetato de etila (5:5, v/v) como fase móvel. Após a purificação, obteve-se um composto amarelo oleoso, com rendimento de 38,02% e R_f aproximado de 0,875.

3.3.1.4. Síntese dos compostos (9) e (12).

A remoção do grupo protetor BOC dos intermediários (8) e (11) levou a formação dos compostos finais *N*-(2-amino-4-fluorofenil)-4-hexadecanamidobenzamida (9) e *N*-(2-amino-4-fluorofenil)-4-[(9*E*, 12*E*, 15*E*)-octadeca-9,12,15-trienamida] benzamida (12) (Figura 15).

Figura 15. Etapa sintética para obtenção dos compostos (9) e (12).



Fonte: próprio autor

Procedimento experimental para síntese de (9)

Em um balão de fundo redondo de 10 mL, foi adicionado 30,0 mg (1 eq.mol⁻¹) do intermediário contendo o grupo protetor BOC (8) e aproximadamente 19,8 µL (5 eq.mol⁻¹) de ácido trifluoracético (TFA). Manteve-se a reação em temperatura ambiente e agitação por 3 horas, sendo acompanhado por CCD, utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (5:5, v/v) e revelado sob luz ultravioleta (254 nm). Após o tempo de 3 horas, o TFA foi neutralizado pela adição de bicarbonato de sódio e a solução submetida a extração líquido-líquido com acetato de etila e água. A fase orgânica foi coletada e seca com sulfato de sódio anidro, sendo

posteriormente filtrada. O acetato de etila foi evaporado, obtendo-se o produto **(9)**, sólido de coloração branco, rendimento em torno de 40,16% e R_f aproximado de 0,688.

Procedimento experimental para síntese de (12)

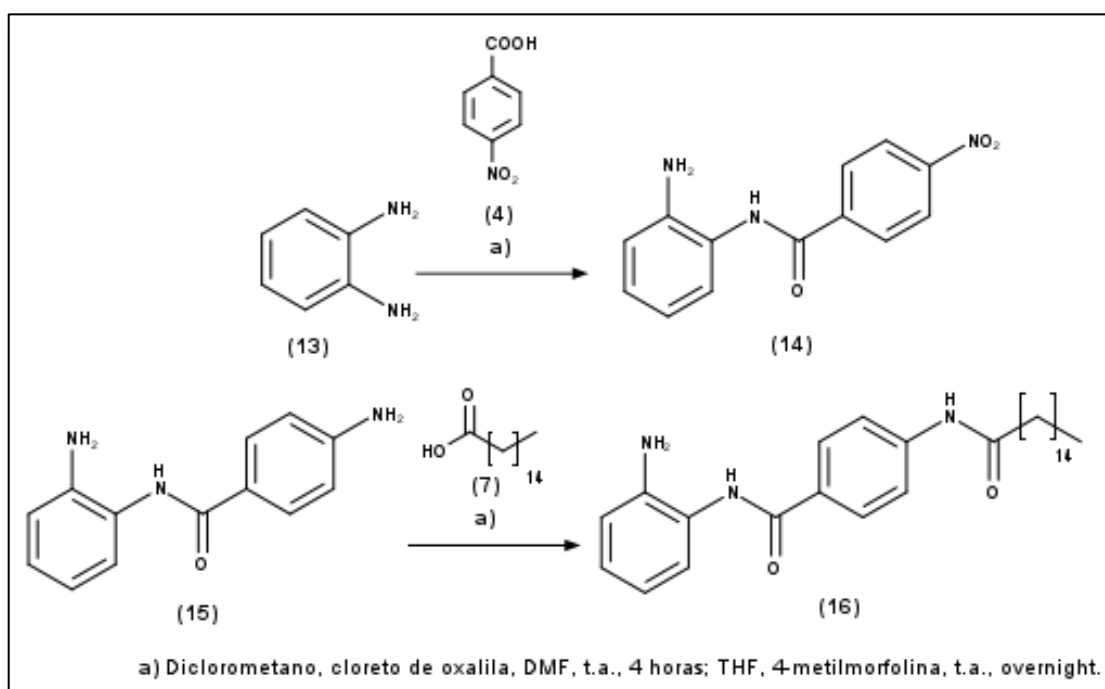
Em um balão de fundo redondo de 10 mL, foi adicionado o intermediário contendo o grupo protetor BOC **(11)** e aproximadamente 63,4 μL (5 eq.mol^{-1}) de ácido trifluoracético (TFA). Manteve-se a reação em temperatura ambiente e agitação por 3 horas, sendo acompanhado por CCD, utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (5:5, v/v) e revelado sob luz ultravioleta (254 nm). Após o tempo de 3 horas, o TFA foi neutralizado pela adição de bicarbonato de sódio e a solução submetida a extração líquido-líquido com acetato de etila e água. A fase orgânica foi coletada e seca com sulfato de sódio anidro, sendo posteriormente filtrada. O acetato de etila foi evaporado, obtendo-se o produto desejado com um aspecto físico amarelo oleoso, rendimento em torno de 71,86% e R_f aproximado de 0,725.

3.3.2. Síntese dos derivados da Série 2

3.3.2.1. Síntese do composto (14) e (16)

Para formação das amidas *N*-(2-aminofenil)-4-nitrobenzamida (**14**) e *N*-(2-aminofenil)-4-hexadecanamidobenzamida (**16**), utilizou-se uma metodologia sintética de acoplamento com o cloreto de oxalila, conforme demonstrado abaixo (**Figura 16**).

Figura 16. Etapa sintética para obtenção dos compostos (**14**) e (**16**).



Fonte: próprio autor.

Procedimento experimental para síntese de (14)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 500,0 mg (1 eq.mol⁻¹) do composto carboxílico ácido 4-nitrobenzóico (**4**), solubilizando-os em 5 mL de diclorometano, seguido da adição de 640,0 µL (2,5 eq.mol⁻¹) de cloreto de oxalila e 3 gotas de DMF. A reação foi mantida em agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 4 horas. Passado esse tempo, o conteúdo do balão foi transferido para um béquer e mantido na capela por 5 minutos para evaporação do diclorometano. Enquanto ocorria a evaporação do solvente, em

outro balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 970,0 mg (3 eq.mol⁻¹) do composto contendo o grupamento amina (**13**), 5 mL de THF e 657,0 µL (2 eq.mol⁻¹) de 4-metilmorfolina. O balão foi colocado para agitação em banho de gelo. Após completa evaporação do diclorometano do béquer referente a primeira etapa, o conteúdo foi solubilizado em THF e transferido, gota a gota, para o balão mantido em agitação e banho de gelo. A reação foi mantida sob agitação e temperatura ambiente, *overnight*. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando acetato de etila/hexano (8:2, v/v) como fase móvel. No dia seguinte, o THF foi rotaevaporado e o conteúdo sólido submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila e água, sendo coletada a fase orgânica, na qual se adicionou sulfato de sódio anidro para remoção das moléculas de água, passando por uma filtração posterior. Após evaporação do acetato de etila, foi conduzida a purificação por cromatografia em coluna de bancada com 20 cm de fase estacionária Sílica *Flash* e de fase móvel acetato de etila/hexano (8:2, v/v). Após a purificação, foi obtido um sólido de coloração marrom claro, rendimento de 76,97% e R_f aproximado de 0,914.

Procedimento experimental para síntese de (16)

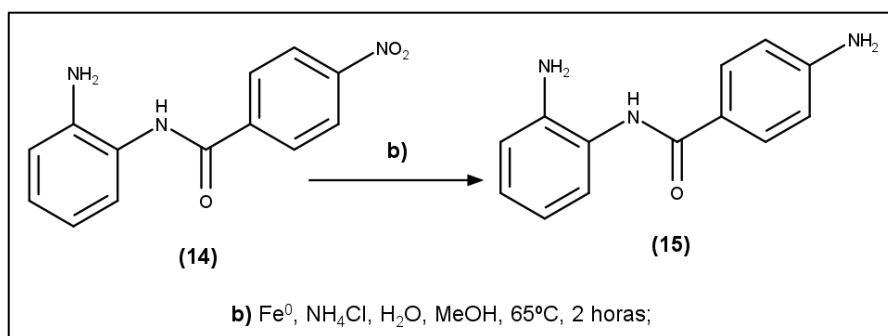
Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 80,0 mg (1 eq.mol⁻¹) do composto carboxílico ácido palmítico (**7**), solubilizando-os em 5 mL de diclorometano, seguido da adição de 66,9 µL (2,5 eq.mol⁻¹) de cloreto de oxalila e 3 gotas de DMF. A reação foi mantida em agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 4 horas. Passado esse tempo, o conteúdo do balão foi transferido para um béquer e mantido na capela por 5 minutos para evaporação do diclorometano. Enquanto ocorria a evaporação do solvente, em outro balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 210,0 mg (3 eq.mol⁻¹) do composto contendo o grupamento amina (**15**), 5 mL de THF e 68,6 µL (2 eq.mol⁻¹) de 4-metilmorfolina. O balão foi colocado para agitação em banho de gelo. Após completa evaporação do diclorometano do béquer referente a primeira etapa, o conteúdo foi solubilizado em THF e transferido, gota a

gota, para o balão mantido em agitação e banho de gelo. A reação foi mantida sob agitação e temperatura ambiente, *overnight*. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando hexano/acetato de etila (5:5, v/v) como fase móvel. No dia seguinte, o THF foi rotaevaporado e o conteúdo sólido submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila e água, sendo coletada a fase orgânica, na qual se adicionou sulfato de sódio anidro para remoção das moléculas de água, passando por uma filtração posterior. Após evaporação do acetato de etila, foi conduzida a purificação por cromatografia em coluna de bancada com 15 cm de fase estacionária Sílica *Flash* e de fase móvel hexano/acetato de etila (5:5, v/v). Após a purificação, foi obtido um sólido branco, rendimento de 20,66% e R_f de 0,650.

3.3.2.2. Síntese do composto (15)

Para a síntese do composto 4-amino-*N*-(2-aminofenil)benzamida (**15**) foi feita a redução do grupamento nitro-aromático do precursor (**14**) em amina, conforme demonstrado na **Figura 17**.

Figura 17. Etapa sintética para obtenção do composto (**15**).



Fonte: próprio autor.

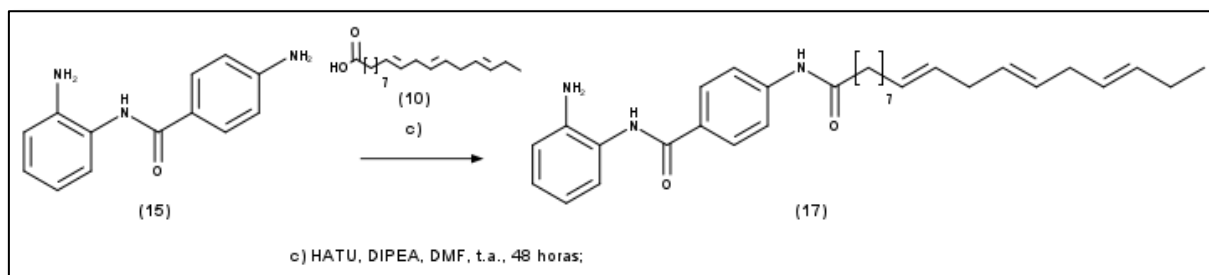
Procedimento experimental para síntese de (15)

Transferiu-se para um balão de fundo redondo de 50 mL 500,0 mg (1 eq.mol^{-1}) do composto precursor contendo o grupamento nitro (**14**), solubilizando-o em 7 mL de metanol e adicionando 519,2 mg (5 eq.mol^{-1}) de cloreto de amônio (NH_4Cl) diluído previamente em 2 mL

de água destilada. O conteúdo do balão foi mantido sob agitação por 2 minutos e adicionou-se 434,4 mg (4 eq.mol⁻¹) de ferro metálico. A reação foi mantida sob refluxo, a 65 °C e agitação por 2 horas. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando acetato de etila/hexano (8:2, v/v) como fase móvel, para acompanhar a formação do composto **(15)**, com revelação sob luz ultravioleta (254 nm) e com o uso da solução de ninidrina 2%, sendo que a amina formada apresentou coloração rosa após a placa de CCD borrifada com ninidrina 2% ser mantida na estufa por alguns minutos. Após o tempo de reação, o conteúdo foi filtrado em celite para a remoção do ferro, lavado com metanol que foi rotaevaporado. Realizou-se a extração líquido/líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a aquosa descartada. A fase orgânica foi seca com a adição de sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. O acetato de etila foi evaporado e o sólido submetido a cromatografia em coluna de bancada, com 15 cm de fase estacionária Sílica *Flash* e fase móvel composta de acetato de etila/hexano (8:2, v/v). Após a purificação, foi obtido o composto **(15)** de coloração branca, com rendimento de 38,82% e R_f aproximado de 0,763.

3.3.2.3. Síntese do composto **(17)** (adaptado WAGNER, *et al.* 2016).

A metodologia para formação da amida *N*-(2-aminofenil)-4-[(9*E*, 12*E*, 15*E*)-octadeca-9,12,15-trienamida] benzamida **(17)** a partir do precursor **(15)** utilizou o agente acoplante (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazol [4,5-*b*]piridino 3 óxido hexafluorofosfato (HATU), como representado na **Figura 18**.

Figura 18. Etapa sintética para obtenção do composto **(17)**.

Fonte: próprio autor.

Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionado 159,8 mg ($1,3 \text{ eq. mol}^{-1}$) do agente acoplante HATU, 73,2 μL ($1,3 \text{ eq. mol}^{-1}$) da base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), 5 mL de dimetilformamida (DMF) e 99,0 μL (1 eq. mol^{-1}) do intermediário carboxilado, o ácido linolênico **(10)**. A reação foi mantida sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 1 hora. Após este período, adicionou-se 95,0 mg ($1,3 \text{ eq. mol}^{-1}$) do composto **(15)** contendo o grupamento amino. Manteve-se o meio reacional sob agitação, temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 48 horas. O acompanhamento da reação foi feito por meio de CCD utilizando a fase móvel hexano/acetato de etila (5:5, v/v), sendo revelados sob luz ultravioleta (254 nm). Passadas as 48 horas, o meio reacional foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila e água, sendo a fase orgânica coletada e a aquosa descartada após completa remoção dos compostos orgânicos. A fase orgânica foi seca pela adição de sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. Evaporou-se o acetato de etila e o sólido formado foi submetido a cromatografia em coluna de bancada, sob as seguintes condições: 15 cm da fase estacionária Sílica *Flash* e hexano/acetato de etila (5:5, v/v) como fase móvel. Após a purificação, obteve-se o produto **(17)**, com aspecto amarelo levemente oleoso, rendimento de 33,09% e R_f aproximado de 0,857.

3.4. Métodos de Purificação

3.4.1. Cromatografia em Coluna de bancada

A purificação dos compostos obtidos foi realizada por meio da cromatografia em coluna de bancada, utilizando Sílica *Flash* como fase estacionária e diferentes proporções dos solventes acetato de etila e hexano na composição das fases móveis. O diâmetro da coluna foi escolhido de acordo com a massa inicial de reagente adicionada na reação e a altura da coluna foi selecionada de acordo com o número de compostos gerados ao final da reação, sendo avaliado previamente por cromatografia em camada delgada (CCD).

3.5. Identificação e Caracterização Estrutural

3.5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada realizadas em placas de alumínio de sílica gel e fase móvel composta por diferentes proporções de acetato de etila e hexano. A visualização das substâncias foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm) e, para visualização das aminas, utilizou-se solução de ninidrina 2% previamente preparada com 200 mg de ninidrina e 100 mL de álcool etílico.

3.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Foram realizadas análises de RMN ^1H e ^{13}C , utilizando DMSO deuterado. Os equipamentos utilizados para análise estão localizados no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.5.3. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

As análises de espectrofotometria foram realizadas na faixa de absorção de 4.000 a 400 cm^{-1} , região do infravermelho (IV), através de um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu®, utilizando pastilhas KBr.

3.5.4. Determinação da Faixa de Fusão

As faixas de fusão dos compostos finais foram determinadas em um equipamento de ponto de fusão capilar Mettler Toledo®.

3.6. Determinação das Propriedades Físico-Químicas das moléculas

3.6.1. Software SwissADME

A avaliação teórica das propriedades físico-químicas das moléculas sintetizadas foi feita utilizando o servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). A linguagem Smiles das moléculas foi gerada utilizando o programa MarvinSketch®.

3.6.2. Determinação do Log P por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A determinação do Log P para as moléculas finais sintetizadas foi feita utilizando o método adaptado descrito no OECD Guideline for the Testing of Chemicals n°117 – Partition coefficient (n-octanol/water), high performance liquid chromatography (HPLC) method (2004) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa, com uso de coluna cromatográfica contendo sílica ligada a longas cadeias de hidrocarbonetos (C8, C18, por exemplo), seguindo as seguintes condições cromatográficas:

Tabela 1. Condições cromatográficas para análise de Log P

Condições Cromatográficas	
Equipamento	HPLC
Detector	UV
Comprimento de onda	210 nm
Fase Móvel	Metanol:Água (3:1, v/v)
Modo	Isocrático
Fluxo	1 mL/min
Tempo de corrida	1h

A partir do tempo de retenção do produto (t_r), determinou-se o valor de k por meio de uma equação envolvendo o tempo morto (t_0), para ser utilizado na equação de Log P. O tempo morto foi determinado utilizando substâncias orgânicas não retidas.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

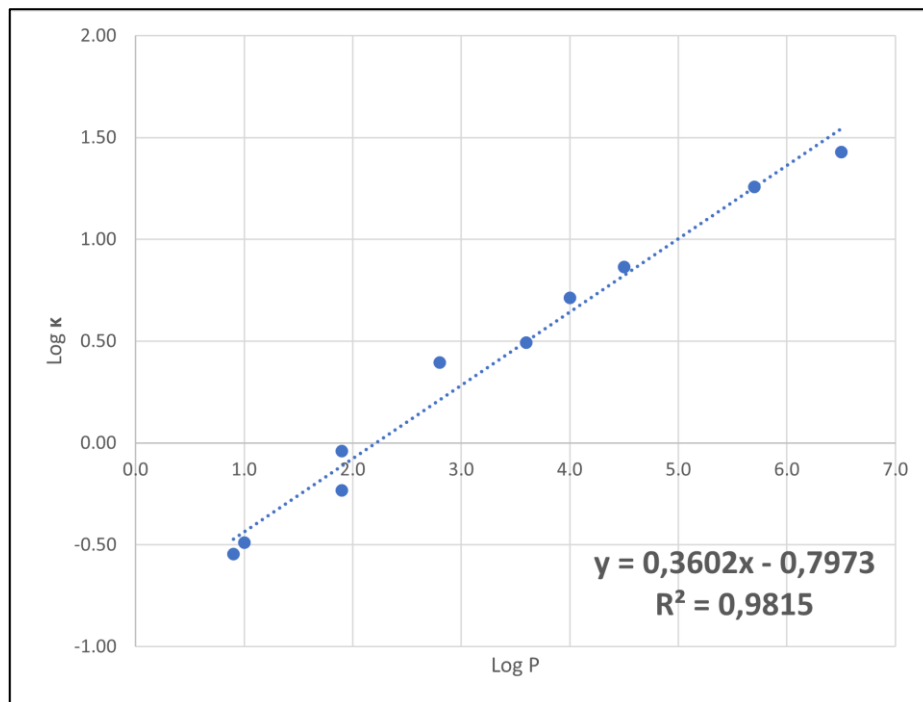
$$\text{Log } P = a + b \times \log k$$

A equação da reta descrita na fórmula do Log P foi determinada a partir dos coeficientes de partição octanol/água de substâncias referências, que foram avaliadas em triplicata, obtendo-se a média do tempo de retenção descritos na **Tabela 2**. O t_0 (tempo morto) foi calculado utilizando a tiouréia, substância que não apresenta retenção em cromatografia em fase reversa.

Tabela 2. Substâncias referências utilizadas para determinação da equação da reta para obtenção do Log P experimental

Substância	t_r médio	t_r médio tiouréia	k	Log k	Log P prático
Anilina	2,18	1,70	0,29	-0,54	0,70
Acetanilida	2,40	1,81	0,32	-0,49	0,85
p-Cresol	2,87	1,81	0,58	-0,23	1,56
Nitrobenzeno	3,23	1,69	0,91	-0,04	2,10
Clorobenzeno	5,61	1,61	2,49	0,40	3,31
Naftaleno	7,30	1,78	3,11	0,49	3,58
Bifenil	10,75	1,75	5,15	0,71	4,19
Fenantreno	14,79	1,78	7,31	0,86	4,61
Trifenilamina	33,60	1,76	18,10	1,26	5,70
DDT	49,24	1,77	26,90	1,43	6,18

Figura 19. Curva de linearidade dos padrões.



Fonte: Próprio autor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

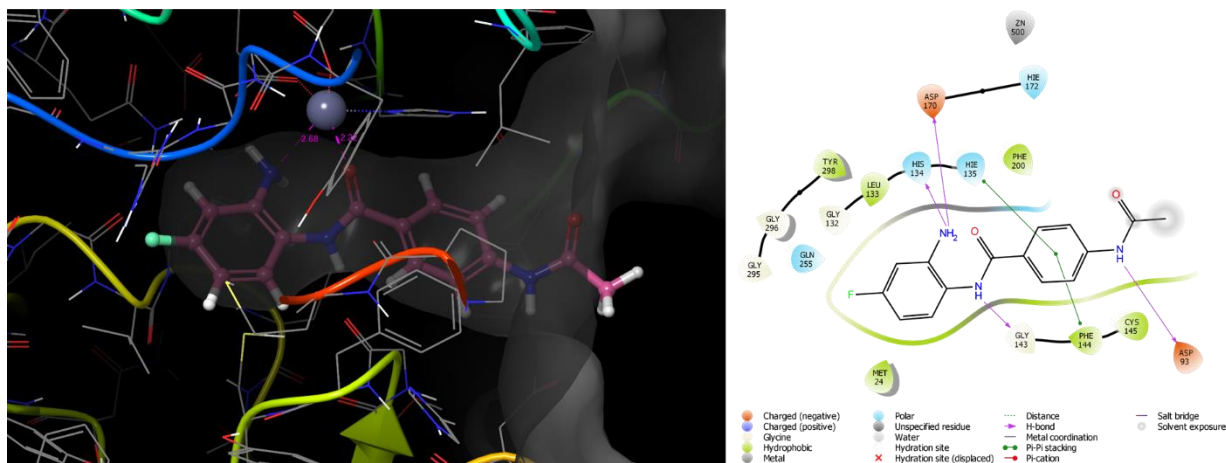
4.1. Modelagem Molecular

O estudo de modelagem molecular é muito utilizado na área de planejamento de fármacos. Os modelos computacionais auxiliam no processo de planejamento e desenvolvimento de novos compostos, contribuindo com a compreensão das interações envolvidas com um determinado alvo de interesse (SAN'TANN, 2009; BARREIRO, *et al.* 1997). As novas estruturas planejadas e os compostos CI-994 e BRD3308 foram submetidas ao estudo de modelagem molecular visando avaliar sua capacidade em interagir com o sítio ativo da HDAC3.

Para interpretação dos resultados de modelagem molecular, além de ser feita uma análise visual, os valores de *docking score* foram utilizados para avaliar se os compostos planejados possuem ação semelhante ao CI-994 e BRD3308. O *docking score* é uma função de pontuação empírica gerada pelo programa Glide que está relacionado com a energia livre de interação do ligante. Para gerar o valor de *docking score*, são consideradas contribuições como o campo de força (interações eletrostáticas e de Van der Waals) e penalidades ou contribuições que influenciam na interação entre o ligante e a enzima, sendo que, quanto menor o seu valor, mais as interações entre o ligante e a enzima estão sendo favorecidas (FRIESNER, *et al.* 2006). No estudo das interações entre os ligantes e a HDAC3, foi definida como restrição a interação com o átomo de Zn^{2+} presente no sítio ativo da enzima.

As interações entre os compostos BRD3308 e CI-994 mostram que o grupo responsável por interagir com o Zn^{+2} no sítio ativo (*zinc binding group*) apresenta boa proximidade e orientação (**Figura 20**).

Figura 20. Figura 3D e 2D. *Docking* molecular da estrutura BRD3308 frente a enzima HDAC-3.



Os resultados obtidos mostraram que as estruturas finais acopladas aos ácidos graxos, **(9)** **(12)** **(16)** e **(17)**, foram capazes de interagir com o átomo de Zn²⁺ do sítio ativo da enzima HDAC, apresentando valor de *docking score* similar aos padrões CI-994 e BRD3308 (**Tabela 3**). Os compostos contendo ácido graxo em sua estrutura demonstram por meio do modelo computacional capacidade de interagir com a enzima (**Figura 21**). A longa cadeia de hidrocarbonetos na estrutura dos compostos não impediu as interações com o sítio da HDAC-3, a exemplo do composto **(16)** (**Figura 21**). As estruturas **(6'** – **composto (6) sem o grupamento BOC**) e **(15)**, derivadas da hidrólise do grupamento amida, apresentaram boa proximidade com o átomo de Zn²⁺ e orientação semelhantes aos compostos padrões. A amina livre na posição *para* do anel aromático de ambos os compostos **(6')** e **(15)** foi capaz de realizar uma ligação de hidrogênio com o resíduo de asparagina (ASP93), o que potencializa sua interação com o sítio ativo (**Figuras 22 e 23**).

Figura 21. Figura 3D e 2D. *Docking* molecular da estrutura (16) frente a enzima HDAC-3.

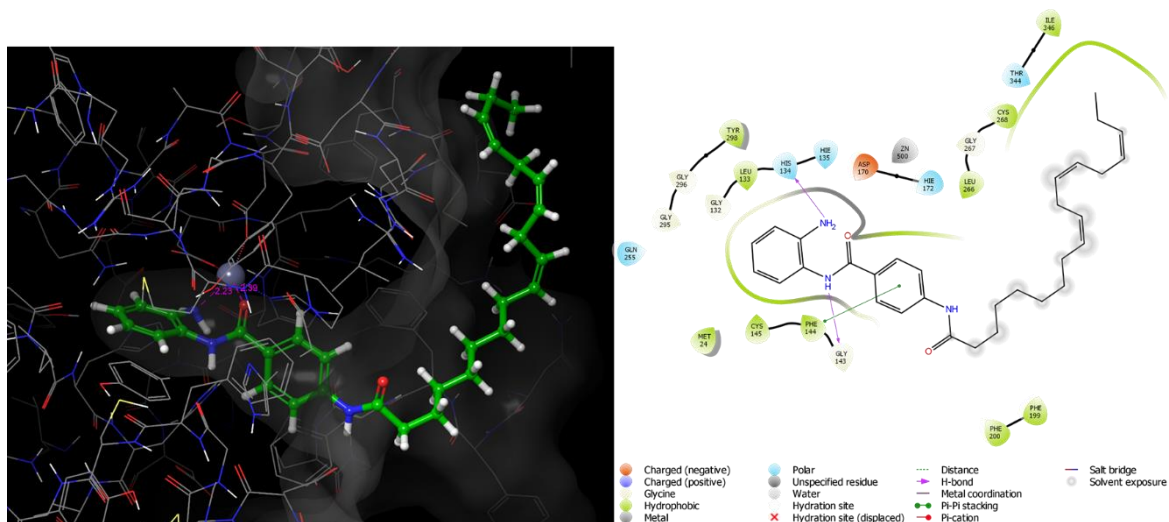


Figura 22. Figura 3D e 2D. *Docking* molecular da estrutura (15) frente a enzima HDAC-3.

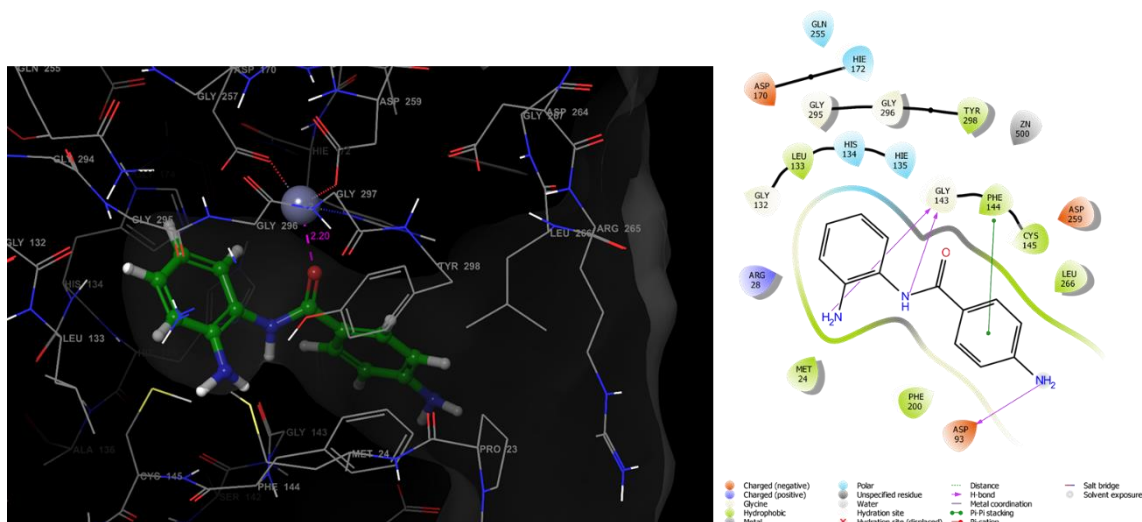


Figura 23. Figura 3D e 2D. *Docking* molecular da estrutura (6') frente a enzima HDAC-3.

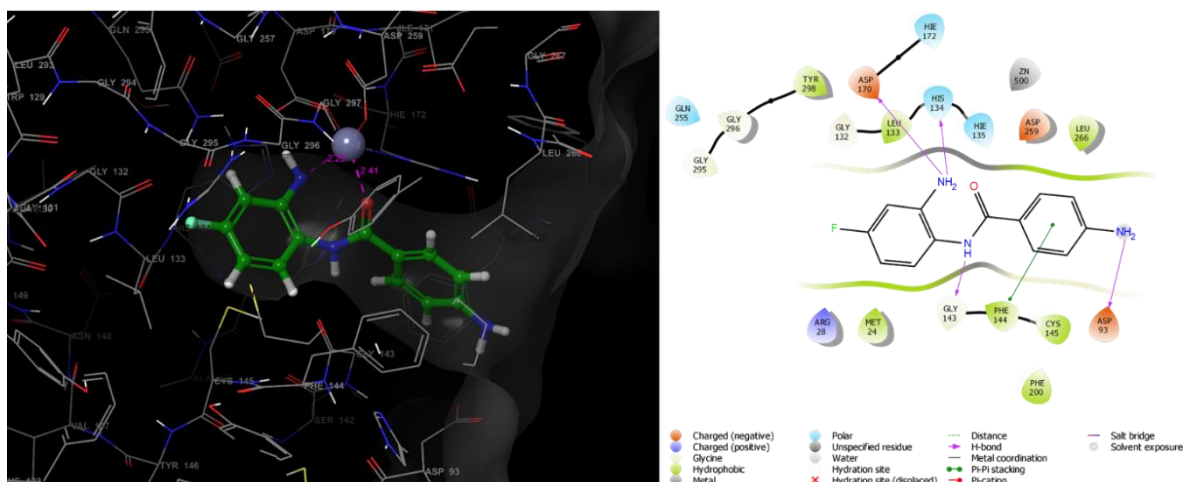
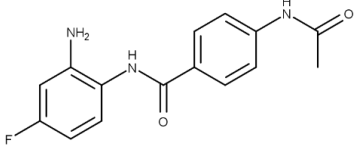
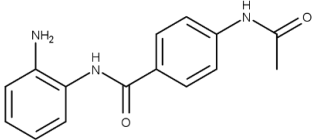
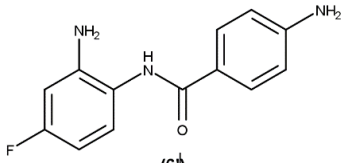
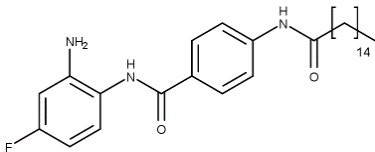
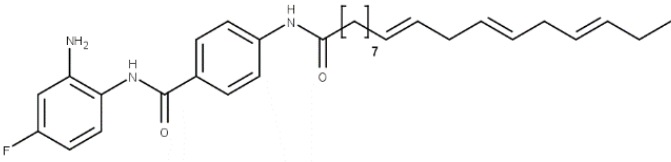
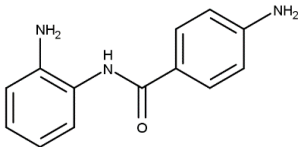
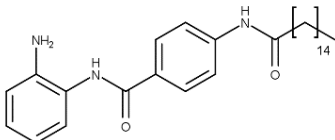
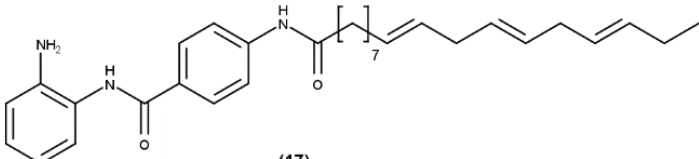


Tabela 3. Docking score dos compostos finais e dos padrões BRD3308 e CI994 frente HDAC-3

Molécula	Docking Score
 BRD3308	-9,218
 CI-994	-9,357
 (6)	-8,369
 (9)	-7,473
 (12)	-6,078
 (15)	-8,116
 (16)	-6,322
 (17)	-7,504

4.2. Metodologia Sintética e Caracterização dos Compostos

Nessa seção, será discutido a metodologia sintética utilizada na síntese das moléculas inibidoras de HDAC3 direcionadas ao sistema linfático, bem como outras tentativas que foram realizadas ao longo do desenvolvimento do projeto. Inicialmente, em cada metodologia, sintetizou-se compostos inibidores de HDAC3 derivados do BRD3308 e CI-994, **(6')** e **(15)**. Posteriormente, estes compostos foram acoplados com dois ácidos graxos cada, os ácidos palmítico e linolênico, gerando 4 moléculas finais: **(9)**, **(12)**, **(16)** e **(17)**.

4.2.1. Síntese dos derivados do BRD3308 (Série 1)

Realizou-se a síntese do composto intermediário **(6)** que foi posteriormente acoplado com dois diferentes ácidos graxos, gerando os compostos finais **(9)** e **(12)**. As Tabelas 4 e 5 contém o resumo das estruturas envolvidas na síntese, rendimentos, aspecto físico e ponto de fusão dos compostos finais.

A primeira etapa dessa rota sintética envolveu uma reação de proteção do grupamento amina do reagente 5-flúor-2-nitroanilina **(1)** com o grupo protetor dicarbonato de di-terc-butila (BOC), gerando o composto final **(2)**. As aminas são bases nucleofílicas, possuindo um par de elétrons livre. Visando direcionar a próxima etapa da reação para a posição em que está o grupamento nitro, foi necessário a proteção deste grupamento amina.

Para desenvolvimento da síntese, a primeira tentativa realizada envolveu a adição do BOC, DMAP, THF e a base forte 1,8-diazobiciclo (5.4.0) undec-7-eno (DBU). Entretanto, a presença destes reagentes somados a uma provável boa reatividade do reagente 5-flúor-2-nitroanilina, resultou na adição de dois grupamentos BOC a amina livre em cerca de poucos minutos, o que não era esperado para a reação, não formando o produto desejado com a presença de um único BOC protegendo a amina. Repetiu-se a reação com os mesmos reagentes, mas retirando o DBU, obtendo um rendimento de 33,53%, embora o reagente não tenha sido mais

observado por CCD. Uma justificativa para tal rendimento, é também a formação da estrutura com duas moléculas BOC, o que ressalta a importância do tempo de reação. O tempo de 48 horas também foi testado para as mesmas condições, mas não proporcionou uma melhoria no rendimento da reação. Um tempo excessivo pode gerar uma maior conversão das moléculas com apenas um BOC para aquelas com dois BOC.

Como segunda etapa sintética, temos a redução de **(2)** em **(3)**. Os grupamentos nitros são facilmente reduzidos em aminas primárias com diferentes métodos. Em todas as etapas de redução da metodologia sintética dos compostos foi utilizada a redução por ferro. Devido a formação de subprodutos, diversos tempos foram testados na redução de **(2)** em **(3)**, para escolha do que gerasse um maior consumo do reagente com a menor formação de subprodutos possível. Testou-se a reação nos tempos de 1h30, 2h, 2h30, 3h, 4h e 6h. O tempo de 4h foi o que apresentou melhor rendimento (83,05%), entretanto, não ocorreu o consumo de todo o reagente. Além disso, é aconselhável o armazenamento do produto **(3)** no freezer até o momento do seu uso pois, quando em temperatura ambiente, pode ocorrer a sua degradação.

Diversas metodologias foram testadas para realização da etapa de acoplamento do intermediário **(3)** para formação de **(5)**. Inicialmente, realizou-se o acoplamento do composto **(3)** com o ácido 4-aminobenzóico (PABA), com o objetivo de diminuir uma etapa na rota sintética. Para isso, utilizou-se o agente acoplante EDC em meio contendo o ácido 4-aminobenzóico, DMF e 3 gotas de trietilamina. Após 1h de agitação em temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio, o composto contendo o grupo amina **(3)** foi adicionado e a reação mantida por 48 horas. Entretanto, ao acompanhar por CCD, notou-se que os reagentes utilizados não foram consumidos e o produto de interesse não havia sido formado. As seguintes metodologias utilizaram o ácido 4-nitrobenzóico no lugar do PABA. Para realizar o acoplamento de **(3)** com o ácido 4-nitrobenzóico, testou-se primeiro o método utilizando cloreto de oxalila (cloração). Entretanto, novamente não ocorreu o consumo dos reagentes e formação

do produto. Por fim, realizou-se a síntese com o agente acoplante HATU, levando a formação do composto esperado **(5)**.

A etapa de redução do grupamento nitro da molécula **(5)** para formação de **(6)** seguiu a mesma metodologia descrita para outra etapa de redução, com alteração apenas do tempo de reação. As outras reações de acoplamento, de **(6)** com **(7)** e de **(6)** com **(10)**, para gerar **(8)** e **(11)**, respectivamente, seguiu a mesma metodologia de acoplamento com agente acoplante HATU. A última etapa da rota sintética teve como objetivo a remoção do grupo protetor BOC utilizando o ácido TFA, levando aos respectivos compostos finais **(9)** e **(12)**.

Tabela 4. Resumo dos dados de rendimento e aspecto físico dos compostos intermediários envolvidos na síntese dos derivados da Série 1.

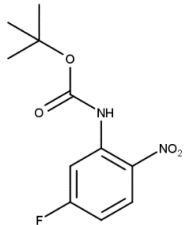
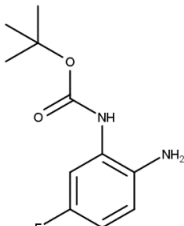
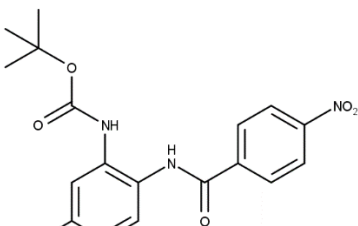
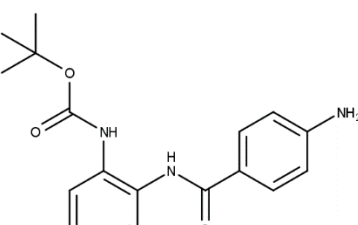
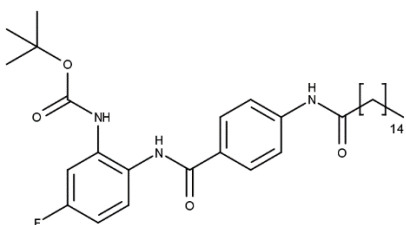
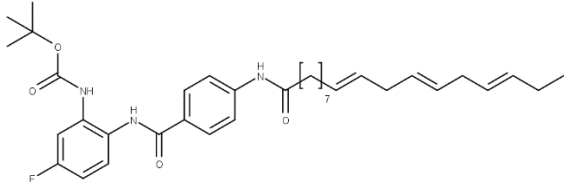
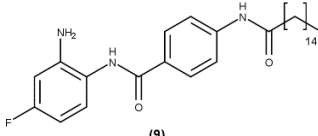
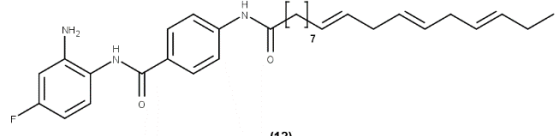
Molécula	Rendimento (%)	Aspecto Físico
 (2)	33,53%	Sólido Amarelo Claro
 (3)	83,05%	Sólido Roxo Escuro
 (5)	40,18%	Sólido Bege
 (6)	54,30%	Sólido Bege Claro
 (8)	32,29%	Sólido Branco
 (11)	38,02%	Óleo Amarelo

Tabela 5. Resumo dos dados de rendimento, aspecto físico e faixa de fusão dos compostos finais da Série 1.

		
	(9)	(12)
Rendimento	40,16%	71,86%
Aspecto Físico	Sólido Branco	Óleo Amarelo
Faixa de Fusão	187,4 à 189,3°C	-

4.2.2. Síntese dos derivados do CI-994 (Série 2)

Realizou-se a síntese do composto (15), que foi posteriormente acoplado com dois diferentes ácidos graxos, gerando os compostos finais (16) e (17). Nas Tabelas 6 e 7, temos um resumo das estruturas envolvidas na síntese, rendimentos globais, aspectos físicos e faixa de fusão.

Para a síntese do intermediário (14) inicialmente foi realizado uma tentativa de síntese entre PABA e o-fenilenodiamina (13), com o uso de EDC, DMAP e DMF. A reação permaneceu por 48 horas, mas não ocorreu a formação do produto. Uma segunda tentativa foi realizada com o uso de cloreto de oxalila e novamente o produto não foi observado. Desta forma, optou-se pela reação entre o-fenilenodiamina (13) e ácido 4-nitrobenzóico (4) com o uso de cloreto de oxalila, desta vez levando a formação do composto (14).

A etapa de redução de (14) em (15) seguiu a mesma metodologia empregada para as reduções das outras moléculas. O tempo de reação foi relativamente curto. Ocorreu a formação de um subproduto visível apenas no ultravioleta 365 nm, sendo seu fator de retenção muito próximo ao do produto de interesse.

O acoplamento final com ácido palmítico foi realizado da mesma forma que o primeiro acoplamento, utilizando cloreto de oxalila, formando o composto **(16)**. Entretanto, a mesma metodologia foi testada para a reação com o ácido linolênico, mas não ocorreu a formação do produto de interesse. Portanto, a estratégia utilizada foi o uso do agente acoplante HATU, com a mesma metodologia empregada para os acoplamentos das moléculas da Série 1, possuindo um resultado efetivo, gerando o composto final **(17)**. Da mesma forma que o outro derivados do ácido linolênico, este também possuiu um aspecto final oleoso, podendo ser em decorrência do aspecto físico do próprio ácido.

Para todas as etapas de acoplamento das sínteses destas moléculas, os ácidos carboxilados foram considerados como reagentes limitantes, diferente da síntese das moléculas anteriores, em que as aminas eram limitantes. Isso ocorreu, pois notamos que, tanto em **(13)** quanto em **(15)**, temos duas aminas livres. Ao escolher os ácidos como limitantes, evitamos ter um excesso que possa se ligar as duas aminas. A escolha de não realizar a proteção da amina livre em **(15)** com BOC ocorreu considerando o impedimento estérico da própria estrutura. Como próximo a essa amina temos uma amida, considera-se que esta geraria um impedimento evitando que os ácidos palmíticos e linolênicos se liguem a ela, ficando a amina gerada pela redução de **(14)** em **(15)** menos impedida para que essa reação ocorra.

Tabela 6. Resumo dos dados de rendimento e aspecto físico dos compostos intermediários envolvidos na síntese dos derivados da Série 2.

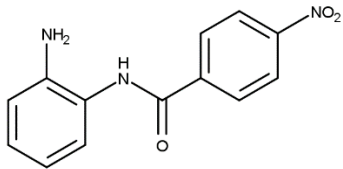
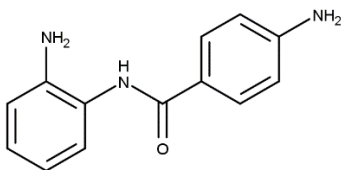
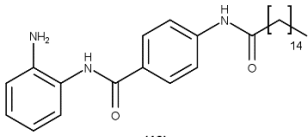
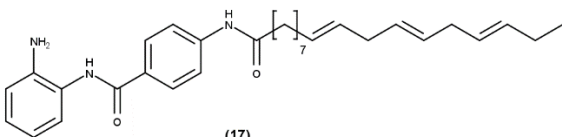
Molécula	Rendimento (%)	Aspecto Físico
 (14)	76,97%	Sólido Marrom Claro
 (15)	38,82%	Sólido Branco

Tabela 7. Resumo dos dados de rendimento, aspecto físico e faixa de fusão dos compostos finais da Série 2.

	 (16)	 (17)
Rendimento	20,66%	33,09%
Aspecto Físico	Sólido Branco	Óleo Amarelo
Faixa de Fusão	102,2 à 109,7°C	107,2 à 118,1°C

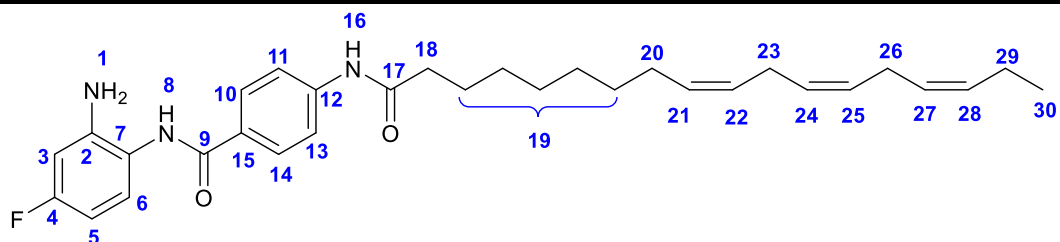
Nessas reações obteve-se rendimentos menores. Uma possível hipótese é a menor reatividade da molécula em questão pela ausência do átomo de flúor quando comparado com a outra série. Entretanto, foram bons rendimentos, com destaque para o do composto **(14)** que foi o com maior rendimento da série, consumindo grande parte do reagente. A molécula reduzida **(15)** apresentou o rendimento mais baixo, possivelmente por perda do produto durante as purificações, uma vez que a formação do subproduto com tempo de retenção próximo ao do produto de interesse atrapalhava a separação.

4.2.3. Caracterização estrutural dos compostos finais

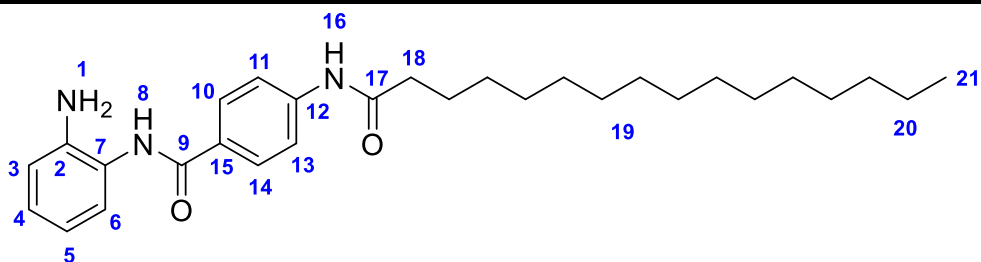
Após a etapa de síntese, os compostos intermediários e finais foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais e infravermelho (IV). Todos os espectros dos compostos foram inseridos na seção Apêndice A e B deste trabalho. A caracterização estrutural dos compostos finais **(9)**, **(12)**, **(16)** e **(17)** foi organizada em forma de tabelas (**Tabelas 8-11**).

Tabela 8. Caracterização estrutural do composto **(9)** por RMN de ^1H e APT em DMSO- d_6

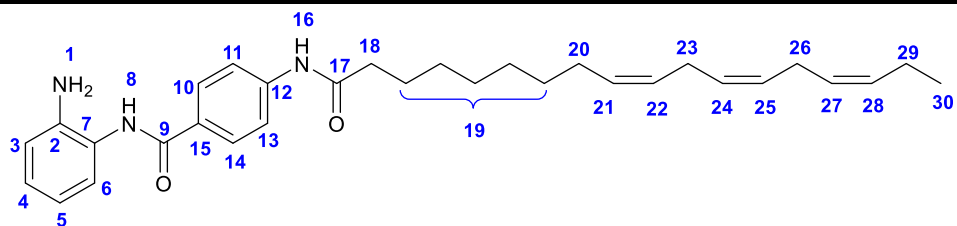
Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	5,19 (s, 2H)	-
2	-	119,90
3	7,10 (m, 1H)	128,24
4	-	162,19
5	6,54 (dd, $J = 11.2, 2.6$ Hz, 1H)	101,23
6	6,35 (m, 1H)	101,85
7	-	145,93
8	9,49 (s, 1H)	-
9	-	165,55
10	7,92 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H)	129,11
11	7,92 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H)	129,11
12	-	142,60
13	7,70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H)	118,60
14	7,70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H)	118,60
15	-	160,61
16	10,14 (s, 1H)	-
17	-	172,23
18	2,33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H)	36,90
19	1,23 (s, 21H)	29,47
20	1,59 (m, 2H)	25,42
21	0,85 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)	13,67

Tabela 9. Caracterização estrutural do composto (12) por RMN de ^1H e APT em DMSO- d_6 

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	-
2	-	120,23
3	7,10 (<i>m</i> , 1H)	127,93
4	-	161,82
5	6,55 (<i>dd</i> , $J = 11.2, 2.9$ Hz, 1H)	101,23
6	6,37 (<i>m</i> , 1H)	101,85
7	-	145,20
8	9,49 (<i>s</i> , 1H)	-
9	-	163,94
10 e 11	7,92 (<i>d</i> , $J = 8.3$ Hz, 2H)	128,64
12	-	118,02
13 e 14	7,70 (<i>d</i> , $J = 8.5$ Hz, 2H)	118,02
15	-	142,17
16	10,11 (<i>s</i> , 1H)	-
17	-	172,39
18	2,18 (<i>m</i> , 2H)	33,63
19	1,29 (<i>s</i> , 10H)	28,50
20	2,75 (<i>m</i> , 2H)	24,46
21, 22,		
24, 25,	5,31 (<i>m</i> , 6H)	127,88
27, 28		
23 e 26	2,03 (<i>m</i> , 4H)	25,19
29	1,57 (<i>m</i> , 2H)	25,00
30	0,91 (<i>m</i> , 3H)	14,10

Tabela 10. Caracterização estrutural do composto **(16)** por RMN de ^1H e APT em DMSO- d_6 

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	5,79 (s, 2H)	-
2	-	131,63
3	7,20 (m, 1H)	125,42
4	7,15 (m, 1H)	-
5	7,36 (d, J = 7.8 Hz, 1H)	124,58
6	7,66 (m, 1H)	125,42
7	-	130,52
8	9,77 (s, 1H)	-
9	-	172,30
10	7,63 (d, J = 8.3 Hz, 2H)	128,97
11	7,63 (d, J = 8.3 Hz, 2H)	128,97
12	-	120,27
13	6,59 (d, J = 8.4 Hz, 2H)	112,63
14	6,59 (d, J = 8.4 Hz, 2H)	112,63
15	-	152,37
16	9,44 (s, 1H)	-
17	-	164,62
18	2,34 (t, J = 7.2 Hz, 2H)	35,98
19	1,23 (s, 21H)	29,52
20	1,57 (q, J = 14.4, 6.7 Hz, 2H)	25,40
21	0,85 (t, J = 6.8 Hz, 3H)	13,95



Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	-	-
2	-	131,50
3	7,39 (<i>d</i> , J = 7.8 Hz, 1H)	128,09
4	7,21 (<i>m</i> , 2H)	128,48
5	7,21 (<i>m</i> , 2H)	128,48
6	7,66 (<i>d</i> , J = 7.9 Hz, 1H)	129,03
7	-	131,20
8	9,73 (<i>s</i> , 1H)	-
9	-	167,39
10 e 11	7,87 (<i>d</i> , J = 8.7 Hz, 2H)	131,24
12	-	134,78
13 e 14	7,74 (<i>d</i> , J = 8.5 Hz, 2H)	121,49
15	-	145,90
16	10,15 (<i>s</i> , 1H)	-
17	-	174,99
18	2,33 (<i>m</i> , 2H)	36,00
19	1,29 (<i>s</i> , 10H)	29,91
20	2,75 (<i>m</i> , 2H)	23,55
21, 22, 24, 25, 27, 28	5,31 (<i>m</i> , 6H)	128,58
23 e 26	2,03 (<i>m</i> , 4H)	25,41
29	1,57 (<i>m</i> , 2H)	25,29
30	0,91 (<i>m</i> , 3H)	17,41

Destacam-se os sinais que caracterizam a formação dos grupos amida: dois simpletos com integração para 1H cada, referente aos hidrogênios das posições 8 e 16, com deslocamentos químicos próximos de 9,0 ppm para o hidrogênio 8 e mais próximo de 10 ppm para o hidrogênio 16. Os hidrogênios referentes a posição 16 encontram-se próximos da cadeia de hidrocarbonetos proveniente do acoplamento com os ácidos graxos, tornando estes hidrogênios mais protegidos (blindados), o que justifica o deslocamento químico maior quando comparado aos hidrogênios da amida na posição 8. Os hidrogênios característicos ao grupo amina, na posição 1, aparecem como um simpleto com integração para 2H na região de 5,0 ppm aproximadamente. As moléculas finais contendo a porção de hidrocarbonetos proveniente do acoplamento com o ácido linolênico não apresentaram sinal do grupo amina, uma vez que os hidrogênios referentes aos carbonos metilênicos nas posições 21, 22, 24, 25, 27 e 28 apresentaram sinais nessa mesma região em 5,31 ppm, sendo um multipletto com integração para 6H. Os hidrogênios referentes aos anéis aromáticos se encontram nas regiões entre 6,0 a 8,0 ppm. O anel aromático substituído com os grupos amida em *para* apresenta hidrogênios caracterizados como dupletos com integração para 2H e constantes de acoplamento próximas de 8,0 Hz, indicando um acoplamento *orto*. Os hidrogênios aromáticos referentes ao anel que contém o átomo de flúor substituído apresentam uma característica diferente, em que é possível observar uma constante de acoplamento de 11,2 Hz para o hidrogênio na posição 5, que está na posição *orto* ao carbono substituído com átomo de flúor. Quanto aos hidrogênios referentes aos carbonos (hibridizados em sp³) de hidrocarbonetos provenientes dos ácidos graxos, os sinais se encontram mais blindados (protegidos) caindo em regiões do espectro entre 2,0 até 0,8 ppm.

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV) demonstrou a presença de bandas de absorção indicando grupos químicos característicos dos compostos finais (9), (12), (16) e (17) que foram representados na **Tabela 12**:

Tabela 12. Caracterização por espectrofotometria na região do infravermelho dos grupos químicos presentes na estrutura química dos compostos **(9)**, **(12)**, **(16)** e **(17)**.

Tipo de vibração	(9)	(12)	(16)	(17)
Frequência (cm ⁻¹)				
N-H (estiramento)	2918,30 – 2848,86	3010,88	3367,71	3282,84
Alcanos (estiramento)	1685,79	2927,94 – 2854,65	2850,79	2926,01 – 2852,72
C = O (amida)	1525,69 e 1436,97	1712,79 – 1618,28	1678,07 – 1600,92	1732,08 – 1643,35
C=C (aromático)	-	-	1504,48 e 1435,04	1595,13 e 1452,40
N-H (estiramento)	2918,30 – 2848,86	3010,88	3367,71	3282,84

4.3. Determinação das Propriedades Físico-Químicas das Moléculas

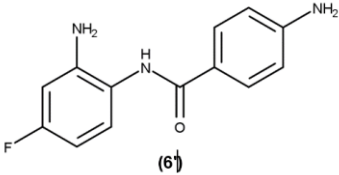
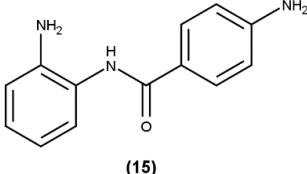
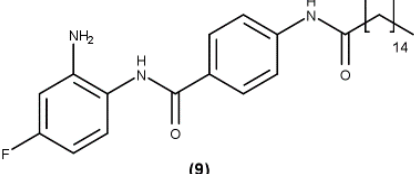
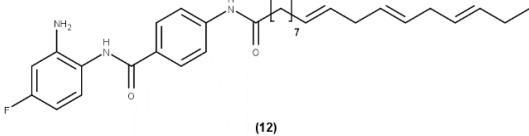
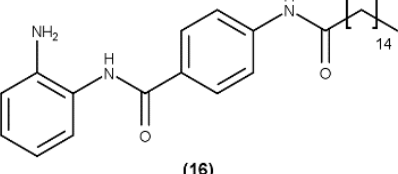
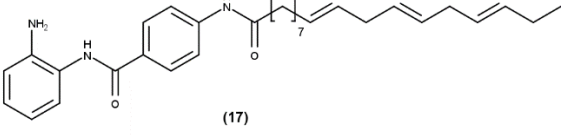
As moléculas inibidoras de HDAC3, bem como as estruturas acopladas aos dois diferentes ácidos graxos foram submetidas a análise das propriedades físico-químicas através do software SwissADME. As quatro moléculas finais também foram submetidas a análise do Log P experimental por CLAE. Os resultados de ambos os testes estão apresentados na **Tabela 13**.

O software SwissADME permite o cálculo de diversas propriedades teóricas com base na estrutura molecular de um composto. Para o presente trabalho, foram selecionadas algumas propriedades que são relevantes para o nosso estudo, sendo elas: fórmula molecular, peso molecular, solubilidade em água, propriedades farmacocinéticas, acessibilidade sintética e o Log P. Com relação as propriedades farmacocinéticas, são geradas informações como a absorção gastrointestinal, permeabilidade a barreira hematoencefálica, se a substância é substrato da glicoproteína P ou se inibe alguma enzima do citocromo P 450 e a permeabilidade pela pele. Avaliamos no estudo a absorção gastrointestinal, por se tratar de possíveis fármacos

de administração oral e se ocorre interações com alguma enzima, uma vez que o tratamento possa exigir a associação com outras substâncias, como fármacos antirretrovirais, sendo essa informação relevante para impedir que efeitos adversos ocorram em decorrência de interações medicamentosas. A acessibilidade sintética também foi estudada, variando em uma escala de 0-10 permitindo uma noção ampla da complexidade de síntese daquela estrutura (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Com base no tempo de retenção médio das moléculas sintetizadas (20,85 minutos para **(9)**; 17,84 minutos para **(12)** e 28,56 minutos para **(16)**) avaliadas por CLAE e considerando a curva descrita na **Figura 19**, foi possível determinar o Log P experimental para compará-lo com o obtido teoricamente. O composto **(17)** apresentou tempo de retenção que não foi abrangido pela curva de linearidade dos padrões que tem valor máximo de Log P em 6,5. Portanto, considerou-se que o Log P deste composto é $\geq 6,5$.

Tabela 13. Propriedades físico-químicas das moléculas sintetizadas

Molécula	Propriedade Físico-Química
 (6)	Fórmula Molecular: C₁₃H₁₂N₂O Peso Molecular: 245,25 g/mol Solubilidade em água: solúvel Farmacocinética: alta absorção gastrointestinal; inibidor da enzima CYP1A2. Acessibilidade Sintética: 1,57 Log P teórico: 1,85
 (15)	Fórmula Molecular: C₁₃H₁₃N₃O Peso Molecular: 227,26 g/mol Solubilidade em água: solúvel Farmacocinética: alta absorção gastrointestinal; inibidor da enzima CYP2C9 Acessibilidade sintética: 1,41 Log P teórico: 1,53
 (9)	Fórmula Molecular: C₂₉H₄₂N₃O₂ Peso Molecular: 483,66 g/mol Solubilidade em água: pouco solúvel. Farmacocinética: baixa absorção gastrointestinal; inibidor da enzima CYP1A2 e CYP2C19. Acessibilidade sintética: 3,42 Log P teórico: 6,95; Log P prático: 5,10
 (12)	Fórmula Molecular: C₃₁H₄₀N₃O₂ Peso Molecular: 505,67 g/mol Solubilidade em água: pouco solúvel. Farmacocinética: baixa absorção gastrointestinal; inibidor da enzima CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4. Acessibilidade sintética: 3,68 Log P teórico: 6,88; Log P prático: 4,89
 (16)	Fórmula Molecular: C₂₉H₄₃N₃O₂ Peso Molecular: 465,67 g/mol Solubilidade em água: pouco solúvel. Farmacocinética: baixa absorção gastrointestinal; inibidor da enzima CYP1A2, CYP2C19 e CYP3A4. Acessibilidade sintética: 3,30 Log P teórico: 6,65; Log P prático: 5,44
 (17)	Fórmula Molecular: C₃₁H₄₁N₃O₂ Peso Molecular: 487,68 g/mol Solubilidade em água: pouco solúvel. Farmacocinética: baixa absorção gastrointestinal; inibidor da enzima CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4. Acessibilidade sintética: 3,61 Log P teórico: 6,55; Log P prático: >6,5

Avaliando os resultados apresentados, os dois potenciais inibidores de HDAC3, **(6')** e **(15)**, apresentaram propriedades interessantes para serem utilizados como fármacos. Com relação os valores de Log P teórico e prático dos compostos acoplados aos ácidos graxos, foram obtidos resultados semelhantes e todos próximos a 5, possuindo grandes chances de serem direcionados ao sistema linfático. Nenhuma molécula demonstrou ser substrato da glicoproteína P ou ser permeável a barreira hematoencefálica. A complexidade sintética foi relativamente baixa para as estruturas.

5. CONCLUSÃO

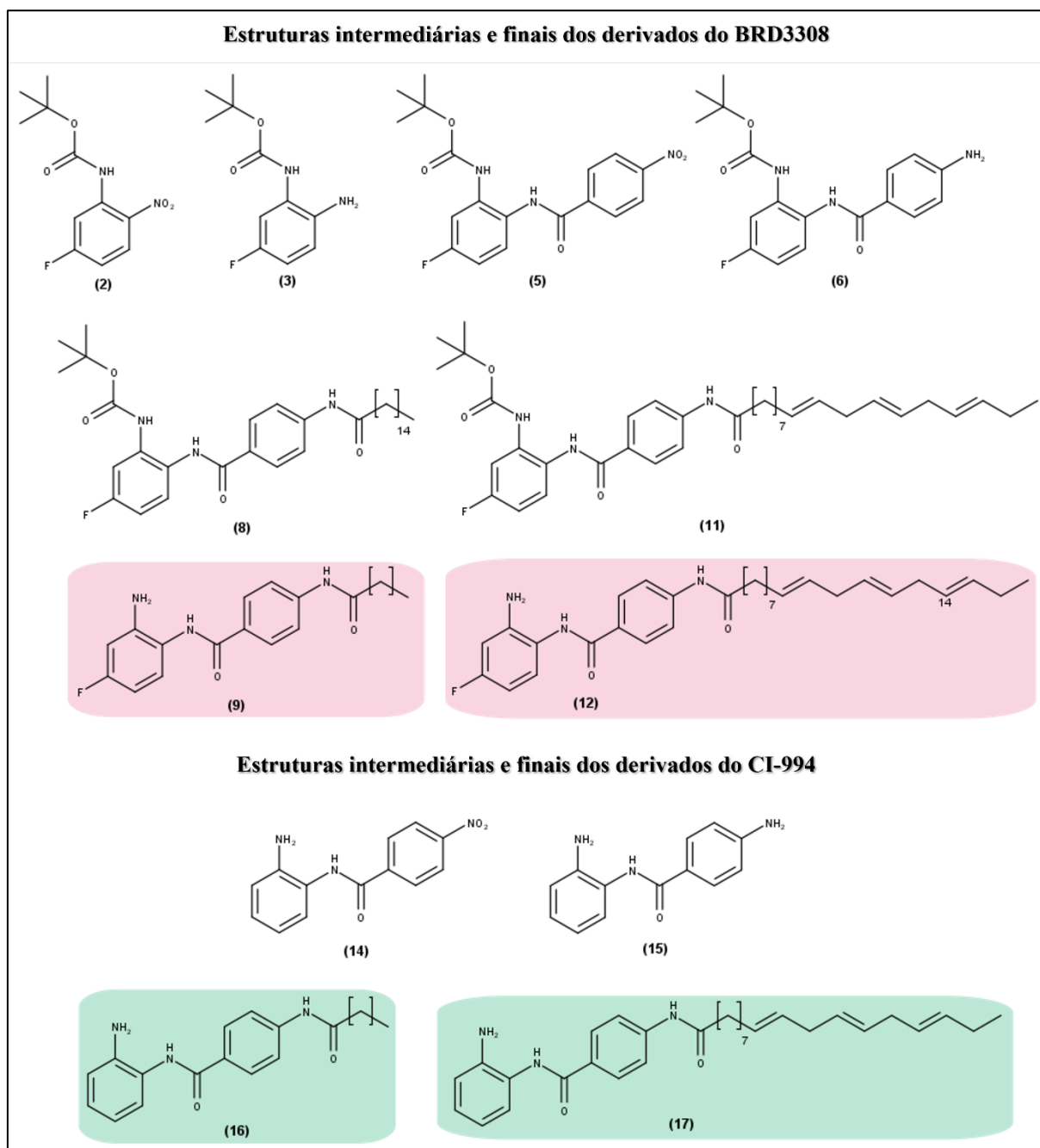
Os estudos de modelagem molecular mostraram que os compostos intermediários **(6')** e **(15)** e os compostos finais **(9)**, **(12)**, **(16)** e **(17)** foram capazes de interagir com os sítios da HDAC3. Os valores de *docking score* de todas as estruturas avaliadas ficaram próximo aos dos HDACi já descritos em literatura, BRD3308 (*docking score*: -9,218) e CI-994 (*docking score*: -9,357), sendo -8,369 para **(6')**, -7,473 para **(9)**, -6,078 para **(12)**, -8,116 para **(15)**, -6,322 para **(16)** e -7,504 para **(17)**.

De maneira geral, os compostos finais **(9)**, **(12)**, **(16)** e **(17)** apresentaram bons rendimentos globais, sendo respectivamente: 47,25%, 53,49%, 45,48% e 49,63%. Os espectros obtidos pelas análises de RMN e IV sugerem a obtenção das estruturas trabalhadas ao longo das sínteses.

As moléculas acopladas com ácidos graxos **(9)**, **(12)**, **(16)** e **(17)**, apresentaram Log P próximos a 5, sendo 5,10; 4,89; 5,44 e >6,5, respectivamente, mostrando um grande potencial de direcionamento destes fármacos ao sistema linfático.

O presente trabalho teve como objetivo a modelagem molecular, planejamento, síntese, caracterização e avaliação de propriedades físico-químicas de moléculas inibidoras de HDAC3 acopladas à ácidos graxos, visando o direcionamento de fármacos ao sistema linfático. Os quatro compostos finais **(9)**, **(12)**, **(16)** e **(17)** são estruturas interessantes para serem avaliadas quanto a reversão da latência do HIV em trabalhos futuros. Nosso estudo mostrou resultados promissores e ressaltou a importância da busca de uma cura para a infecção pelo vírus HIV.

Figura 24. Resumo das estruturas intermediárias e finais sintetizadas no trabalho.



Fonte: próprio autor

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, N.; JHA, T.; GHOSH, B. Dissecting Histone Deacetylase 3 in Multiple Disease Conditions: Selective Inhibition as a Promising Therapeutic Strategy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 64, n. 13, p. 8827–8869, 23 jun. 2021.
- AHLENSTIEL, C. L. et al. Block and Lock HIV Cure Strategies to Control the Latent Reservoir. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 14 ago. 2020.
- ALLSHIRE, R. C.; MADHANI, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 4, p. 229–244, 13 dez. 2018.
- ALTER, G. et al. HLA Class I Subtype-Dependent Expansion of KIR3DS1 + and KIR3DL1 + NK Cells during Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, v. 83, n. 13, p. 6798–6805, jul. 2009.
- ALVAREZ-CARBONELL, D. et al. Toll-like receptor 3 activation selectively reverses HIV latency in microglial cells. *Retrovirology*, v. 14, n. 1, 6 fev. 2017.
- AMIN, S. A.; ADHIKARI, N.; JHA, T. Structure-activity relationships of hydroxamate-based histone deacetylase-8 inhibitors: reality behind anticancer drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 18, p. 2211–2237, 1 dez. 2017.
- ARCHIN, N. M. et al. Expression of Latent HIV Induced by the Potent HDAC Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 25, n. 2, p. 207–212, fev. 2009.
- ARCHIN, N. M. et al. Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 8, p. 3126–3135, 17 jul. 2017.
- AVALOS, C. R. et al. Brain Macrophages in Simian Immunodeficiency Virus-Infected, Antiretroviral-Suppressed Macaques: a Functional Latent Reservoir. *mBio*, v. 8, n. 4, 6 set. 2017.
- AVALOS, C. R. et al. Quantitation of Productively Infected Monocytes and Macrophages of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *Journal of Virology*, v. 90, n. 12, p. 5643–5656, 15 jun. 2016.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. *Química Nova*, v. 20, n. 3, p. 300–310, jun. 1997.

BARRE-SINOUSSE, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p. 868–71, 1983.

BARTON, K. M. *et al.* Selective HDAC Inhibition for the Disruption of Latent HIV-1 Infection. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, p. e102684, 19 ago. 2014.

BELMONTE, L. *et al.* The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART. *AIDS*, v. 21, n. 15, p. 2106–2108, 1 out. 2007.

BENKIRANE, M. *et al.* Activation of Integrated Provirus Requires Histone Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 38, p. 24898–24905, 18 set. 1998.

BESNARD, E. *et al.* The mTOR Complex Controls HIV Latency. *Cell Host & Microbe*, v. 20, n. 6, p. 785–797, dez. 2016.

BRENNER, R. R. Biosynthesis and interconversion of essential fatty acids. In: A. L. Willis. *Handbook of eicosanoids: prostaglandins and related lipids*, v. 1, Chemical and biochemical aspects, part A, p. 99-117, 1987.

BUKRINSKY, M. I. *et al.* Quiescent T Lymphocytes as an Inducible Virus Reservoir in HIV-1 Infection. *Science*, v. 254, n. 5030, p. 423–427, 18 out. 1991.

CAMERON, P. U. *et al.* Establishment of HIV-1 latency in resting CD4⁺ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 39, p. 16934–16939, 13 set. 2010.

CAO, F.; ZWINDERMAN, M.R.H; DEKKER F.J. The Process and Strategy for Developing Selective Histone Deacetylase 3 Inhibitors. *Molecules*, v. 23, n. 3, p. 551, 2 mar. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Achievements in public health. Reduction in perinatal transmission of HIV infection--United States, 1985-2005. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 55, n. 21, p. 592–597, 2 jun. 2006.

CHAKRABARTI, A. *et al.* HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 36, n. 7, p. 481–492, jul. 2015.

CHAVEZ, L.; CALVANESE, V.; VERDIN, E. HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLOS Pathogens*, v. 11, n. 6, p. e1004955, 11 jun. 2015.

CHEN, Y. et al. Studies of Benzamide- and Thiol-Based Histone Deacetylase Inhibitors in Models of Oxidative-Stress-Induced Neuronal Death: Identification of Some HDAC3-Selective Inhibitors. *ChemMedChem*, v. 4, n. 5, p. 842–852, 11 maio 2009.

CHUN, T. W. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, v. 387, n. 6629, p. 183–188, 8 maio 1997.

CHUN, T.-W. et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 24, p. 13193–13197, 25 nov. 1997.

COIRAS, M. et al. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 11, p. 798–812, nov. 2009.

COUTURIER, J.; LEWIS, D. E. HIV Persistence in Adipose Tissue Reservoirs. *Current HIV/AIDS Reports*, v. 15, n. 1, p. 60–71, fev. 2018.

DAHL, V. et al. Low levels of HIV-1 RNA detected in the cerebrospinal fluid after up to 10 years of suppressive therapy are associated with local immune activation. *AIDS*, v. 28, n. 15, p. 2251–2258, 24 set. 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 3 mar. 2017.

DAVEY, R. T. et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 26, p. 15109–15114, 21 dez. 1999.

DE CRIGNIS, E.; MAHMOUDI, T. The Multifaceted Contributions of Chromatin to HIV-1 Integration, Transcription, and Latency. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 328, p. 197–252, 2017.

DEEKS, S. G. et al. HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, n. 1, 1 out. 2015.

DEEKS, S. G. et al. Research priorities for an HIV cure: International AIDS Society Global Scientific Strategy 2021. *Nature Medicine*, v. 27, n. 12, p. 2085–2098, 1 dez. 2021.

DEEKS, S. G. Treatment of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 infection. *The Lancet*, v. 362, n. 9400, p. 2002–2011, dez. 2003.

DEMARCHI, F. et al. In vivo footprinting analysis of constitutive and inducible protein-DNA interactions at the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, v. 67, n. 12, p. 7450–7460, dez. 1993.

DOITSH, G.; GREENE, W. C. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host & Microbe*, v. 19, n. 3, p. 280–291, mar. 2016.

DRAGIC, T. et al. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 10, p. 5639–5644, 25 abr. 2000.

EASLEY, R. et al. Chromatin dynamics associated with HIV-1 Tat-activated transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1799, n. 3-4, p. 275–285, mar. 2010.

EASLEY, R. et al. Transcription through the HIV-1 nucleosomes: Effects of the PBAF complex in Tat activated transcription. *Virology*, v. 405, n. 2, p. 322–333, set. 2010.

EISELE, E.; SILICIANO, ROBERT F. Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity*, v. 37, n. 3, p. 377–388, set. 2012.

ELLIOTT, J. H. et al. Activation of HIV Transcription with Short-Course Vorinostat in HIV-Infected Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 11, p. e1004473, 13 nov. 2014.

ELLIS, R.; LANGFORD, D.; MASLIAH, E. HIV and antiretroviral therapy in the brain: neuronal injury and repair. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 33–44, jan. 2007.

FINZI, D. et al. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science*, v. 278, n. 5341, p. 1295–1300, 14 nov. 1997.

FISCUS, S. A. et al. Changes in HIV-1 Subtypes B and C Genital Tract RNA in Women and Men After Initiation of Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 57, n. 2, p. 290–297, 26 mar. 2013.

FLETCHER, C. V. et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 6, p. 2307–2312, 27 jan. 2014.

FOLKS, T. M. et al. Cytokine-Induced Expression of HIV-1 in a Chronically Infected Promonocyte Cell Line. *Science*, v. 238, n. 4828, p. 800–802, 6 nov. 1987.

FRENCH, M. A.; PRICE, P.; STONE, S. F. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS*, v. 18, n. 12, p. 1615–1627, ago. 2004.

FRIESNER, R. A. et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 21, p. 6177–6196, out. 2006.

FU, W.; WU, K.; DUAN, J. Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 356, n. 4, p. 843–850, maio 2007.

GAO, L. et al. Cloning and Functional Characterization of HDAC11, a Novel Member of the Human Histone Deacetylase Family. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 28, p. 25748–25755, jul. 2002.

GOVENDER, R. D. et al. Global Epidemiology of HIV/AIDS: A Resurgence in North America and Europe. *Journal of Epidemiology and Global Health*, v. 11, n. 3, p. 296, 2021.

GREGORETTI, I.; LEE, Y.-M.; GOODSON, H. V. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology*, v. 338, n. 1, p. 17–31, abr. 2004.

GUPTA, R. K. et al. HIV-1 remission following CCR5 Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, v. 568, 5 mar. 2019.

HAASE, A. T. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 10, p. 783–792, out. 2005.

HENDERSON, L. J. et al. Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs. *Journal of Virology*, v. 94, n. 3, 17 jan. 2020.

HENRICH, T. J. et al. HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study. *PLOS Medicine*, v. 14, n. 11, p. e1002417, 7 nov. 2017.

HOGG, R. S. et al. Improved Survival Among HIV-Infected Individuals Following Initiation of Antiretroviral Therapy. *JAMA*, v. 279, n. 6, p. 450, 11 fev. 1998.

HUBER, K. et al. Inhibitors of Histone Deacetylases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 25, p. 22211–22218, jun. 2011.

HÜTTER, G. et al. Long-Term Control of HIV by CCR5Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 7, p. 692–698, 12 fev. 2009.

HÜTTER, G. More on Shift of HIV Tropism in Stem-Cell Transplantation with CCR5 Delta32/Delta32 Mutation. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 25, p. 2437–2438, 18 dez. 2014.

JIANG, C. et al. Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1. *Nature*, v. 585, n. 7824, p. 261–267, 1 set. 2020.

JIANG, G.; DANDEKAR, S. Targeting NF- κ B Signaling with Protein Kinase C Agonists As an Emerging Strategy for Combating HIV Latency. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 31, n. 1, p. 4–12, jan. 2015.

JONES, R. B. et al. Histone Deacetylase Inhibitors Impair the Elimination of HIV-Infected Cells by Cytotoxic T-Lymphocytes. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 8, p. e1004287, 14 ago. 2014.

KARN, J. The molecular biology of HIV latency: Breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Current opinion in HIV and AIDS*, v. 6, n. 1, p. 4–11, 1 jan. 2011.

KAUFMANN, G. R. CD4 T-Lymphocyte Recovery in Individuals With Advanced HIV-1 Infection Receiving Potent Antiretroviral Therapy for 4 Years The Swiss HIV Cohort Study. *Archives of Internal Medicine*, v. 163, n. 18, p. 2187, 13 out. 2003.

KHANAL, S. et al. Telomere and ATM Dynamics in CD4 T-Cell Depletion in Active and Virus-Suppressed HIV Infections. *Journal of Virology*, v. 94, n. 22, 27 out. 2020.

KORNBERG, R. D. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, v. 184, n. 4139, p. 868–871, 24 maio 1974.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, v. 128, n. 4, p. 693–705, fev. 2007.

KRAKER, A.J. et al. Modulation of histone acetylation by [4-(acetylamino)-N-(2-amino-phenyl) benzamide] in HCT-8 colon carcinoma. *Mol Cancer Ther*, v. 2, n. 4, p. 401–408, 2003.

LAHM, A. et al. Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 44, p. 17335–17340, 30 out. 2007.

LAMBERT, D. M. Rationale and applications of lipids as prodrug carriers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 11, Suppl. 2, p. S15–S27, Outubro 2000.

LI, P. et al. Stimulating the RIG-I pathway to kill cells in the latent HIV reservoir following viral reactivation. *Nature Medicine*, v. 22, n. 7, p. 807–811, 13 jun. 2016.

LOO, Y.-M.; GALE, M. Viral Regulation and Evasion of the Host Response *Curr Top Microbiol Immunol*, p. 295–313, 2007.

LORENZO-REDONDO, R. et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, v. 530, n. 7588, p. 51–56, 27 jan. 2016.

LUSIC, M. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *The EMBO Journal*, v. 22, n. 24, p. 6550–6561, 15 dez. 2003.

MADRID-ELENA, N. et al. Maraviroc Is Associated with Latent HIV-1 Reactivation through NF- κ B Activation in Resting CD4 + T Cells from HIV-Infected Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, v. 92, n. 9, maio 2018.

MARCUS, J. L. et al. Narrowing the Gap in Life Expectancy Between HIV-Infected and HIV-Uninfected Individuals With Access to Care. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, v. 73, n. 1, p. 39–46, 1 set. 2016.

MCCUNE, J. M. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*, v. 410, n. 6831, p. 974–979, abr. 2001.

MOCROFT, A. et al. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet (London, England)*, v. 352, n. 9142, p. 1725–30, 1998.

MOCROFT, A. et al. Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. *The Lancet*, v. 370, n. 9585, p. 407–413, ago. 2007.

MOIR, S.; CHUN, T.-W.; FAUCI, A. S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 6, n. 1, p. 223–248, 28 fev. 2011.

MONTANER, J. S. G. et al. Expanded Highly Active Antiretroviral Therapy Coverage Among HIV-Positive Drug Users to Improve Individual and Public Health Outcomes. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 55, p. S5–S9, dez. 2010.

MOUSSEAU, G. et al. The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio*, v. 6, n. 4, 7 jul. 2015.

NOLAN, D.; MALLAL, S. Antiretroviral-therapy-associated lipoatrophy: current status and future directions. *Sexual Health*, v. 2, n. 3, p. 153, 2005.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals n°117 – Partition coefficient (n-octanol/water), high performance liquid chromatography (HPLC) method, 2004.

OVERBAUGH, J. Selection Forces and Constraints on Retroviral Sequence Variation. *Science*, v. 292, n. 5519, p. 1106–1109, 11 maio 2001.

PALMISANO, L., VELLA, S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Ann Ist Super Sanita*, v. 47, n. 1, p. 44-48, 2011.

PERSAUD, D. et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *The New England journal of medicine*, v. 369, n. 19, p. 1828–35, 2013.

POPOVIC, M. et al. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, v. 224, n. 4648, p. 497–500, 4 maio 1984.

PRAKASH, S. et al. Chronic oral administration of CI-994: a phase 1 study *Investigational New Drugs*, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2001.

RASMUSSEN, T. A. et al. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *The Lancet HIV*, v. 1, n. 1, p. e13–e21, 1 out. 2014.

RAY, N.; DOMS, R. W. HIV-1 coreceptors and their inhibitors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 303, p. 97–120, 2006.

ROMANI, B.; ALLAHBAKHSI, E. Underlying mechanisms of HIV-1 latency. *Virus Genes*, v. 53, n. 3, p. 329–339, 3 mar. 2017.

ROSENBLOOM, D. I. S. et al. Re-evaluating evolution in the HIV reservoir. *Nature*, v. 551, n. 7681, p. E6–E9, 1 nov. 2017.

ROUTY, J. et al. Valproic acid in association with highly active antiretroviral therapy for reducing systemic HIV-1 reservoirs: results from a multicentre randomized clinical study. *HIV Medicine*, v. 13, n. 5, p. 291–296, 26 jan. 2012.

RUSTAGI, A.; GALE, M. Innate Antiviral Immune Signaling, Viral Evasion and Modulation by HIV-1. *Journal of Molecular Biology*, v. 426, n. 6, p. 1161–1177, mar. 2014.

SAAYMAN, S. et al. An HIV-Encoded Antisense Long Noncoding RNA Epigenetically Regulates Viral Transcription. *Molecular Therapy*, v. 22, n. 6, p. 1164–1175, jun. 2014.

SANT'ANNA, C. M. R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: An introduction. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, 2009.

SARKAR, R. et al. Histone deacetylase 3 (HDAC3) inhibitors as anticancer agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 192, p. 112171, abr. 2020.

SCHALLER, T. et al. HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 12, p. e1002439, 8 dez. 2011.

Schrödinger, Glide, New York, 2017b

Schrödinger, LigPrep, New York, 2017c

Schrödinger, Maestro, New York; 2017a

SHAN, L. et al. Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation. *Immunity*, v. 36, n. 3, p. 491–501, mar. 2012.

SIMON, V.; HO, D. D.; ABDOOL KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet*, v. 368, n. 9534, p. 489–504, ago. 2006.

SØGAARD, O. S. et al. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLOS Pathogens*, v. 11, n. 9, p. e1005142, 17 set. 2015.

SUZUKI, Y.; CRAIGIE, R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 5, n. 3, p. 187–196, 1 mar. 2007.

SWIGGARD, W. J. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Can Establish Latent Infection in Resting CD4 + T Cells in the Absence of Activating Stimuli. *Journal of Virology*, v. 79, n. 22, p. 14179–14188, 15 nov. 2005.

TAUNTON, J.; HASSIG, C. A.; SCHREIBER, S. L. A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. *Science*, v. 272, n. 5260, p. 408–411, 19 abr. 1996.

The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *The Lancet*, v. 372, n. 9635, p. 293–299, jul. 2008.

THOMAS, E. Involvement of HDAC1 and HDAC3 in the Pathology of Polyglutamine Disorders: Therapeutic Implications for Selective HDAC1/HDAC3 Inhibitors. *Pharmaceuticals*, v. 7, n. 6, p. 634–661, 26 maio 2014.

TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 6, p. 702–716, mar. 2008.

TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. H. Targeted Drug Delivery to Lymphocytes: A Route to Site-Specific Immunomodulation? *Molecular Pharmaceutics*, v. 7, n. 6, p. 2297–2309, 12 nov. 2010.

TREVASKIS, N. L.; KAMINSKAS, L. M.; PORTER, C. J. H. From sewer to saviour — targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 11, p. 781–803, 16 out. 2015.

TYAGI, M.; PEARSON, R. J.; KARN, J. Establishment of HIV Latency in Primary CD4+ Cells Is due to Epigenetic Transcriptional Silencing and P-TEFb Restriction. *Journal of*

Virology, v. 84, n. 13, p. 6425–6437, 21 abr. 2010. KARN, J. The molecular biology of HIV latency: Breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Current opinion in HIV and AIDS*, v. 6, n. 1, p. 4–11, 1 jan. 2011.

UNAIDS. Core epidemiology slides. Disponível em: <<https://www.unaids.org/en/resources/documents/2022/core-epidemiology-slides>>. Acesso em: 08 de setembro de 2022

UNAIDS. Fact sheet - Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2022/UNAIDS_FactSheet>. Acesso em: 07 de setembro de 2022.

VAN LINT, C. et al. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *The EMBO Journal*, v. 15, n. 5, p. 1112–1120, mar. 1996.

VERDIN, E.; DEQUIEDT, F.; KASLER, H. G. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in Genetics*, v. 19, n. 5, p. 286–293, maio 2003.

WAGNER, F. F. et al. An Isochemogenic Set of Inhibitors To Define the Therapeutic Potential of Histone Deacetylases in β -Cell Protection. *ACS Chemical Biology*, v. 11, n. 2, p. 363–374, 7 dez. 2015.

WAGNER, F. F. et al. An Isochemogenic Set of Inhibitors To Define the Therapeutic Potential of Histone Deacetylases in β -Cell Protection. *ACS Chemical Biology*, v. 11, n. 2, p. 363–374, 7 dez. 2016.

WAGNER, F. F. et al. Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. *Neurotherapeutics*, v. 10, n. 4, p. 589–604, out. 2013.

WALLET, C. et al. Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, 24 out. 2019.

WATSON, P. J. et al. Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 335–340, jan. 2012.

WEST, M. J.; LOWE, A. D.; KARN, J. Activation of Human Immunodeficiency Virus Transcription in T Cells Revisited: NF- κ B p65 Stimulates Transcriptional Elongation. *Journal of Virology*, v. 75, n. 18, p. 8524–8537, 15 set. 2001.

WOOD, A. J.; BICKMORE, W. A. A condensed view of chromatin during T cell development. *The EMBO Journal*, v. 30, n. 2, p. 235–236, 19 jan. 2011.

WYATT, C. M.; KLOTMAN, P. E. Antiretroviral therapy and the kidney: balancing benefit and risk in patients with HIV infection. *Expert Opinion on Drug Safety*, v. 5, n. 2, p. 275–287, 27 fev. 2006.

WYMANT, C. et al. A highly virulent variant of HIV-1 circulating in the Netherlands. *Science*, v. 375, n. 6580, p. 540–545, 4 fev. 2022.

XING, S.; SILICIANO, R. F. Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 11-12, p. 541–551, jun. 2013.

YÁÑEZ, J. A. et al. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, n. 10-11, p. 923–942, set. 2011.

YLISASTIGUI, L. et al. Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells. *AIDS*, v. 18, n. 8, p. 1101–1108, maio 2004.

YUKL, S. A. et al. The Distribution of HIV DNA and RNA in Cell Subsets Differs in Gut and Blood of HIV-Positive Patients on ART: Implications for Viral Persistence. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 208, n. 8, p. 1212–1220, 12 jul. 2013.

YUSUF, D. et al. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 1 jul. 2008.

ZACK, J. A. et al. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*, v. 61, n. 2, p. 213–222, abr. 1990.

ZAIKOS, T. D. et al. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Are a Distinct HIV Reservoir that Contributes to Persistent Viremia in Suppressed Patients. *Cell Reports*, v. 25, n. 13, p. 3759-3773.e9, dez. 2018.

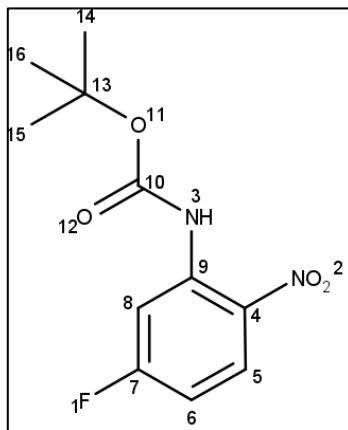
ZHAN, P. et al. Anti-HIV Drug Discovery and Development: Current Innovations and Future Trends. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, n. 7, p. 2849–2878, 5 nov. 2016.

ZHAO, J. et al. ATM Deficiency Accelerates DNA Damage, Telomere Erosion, and Premature T Cell Aging in HIV-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 5 nov. 2019.

ZHU, T. et al. Evidence for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication In Vivo in CD14 + Monocytes and Its Potential Role as a Source of Virus in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, v. 76, n. 2, p. 707–716, 15 jan. 2002.

Apêndice A – Caracterização dos Intermediários Sintéticos

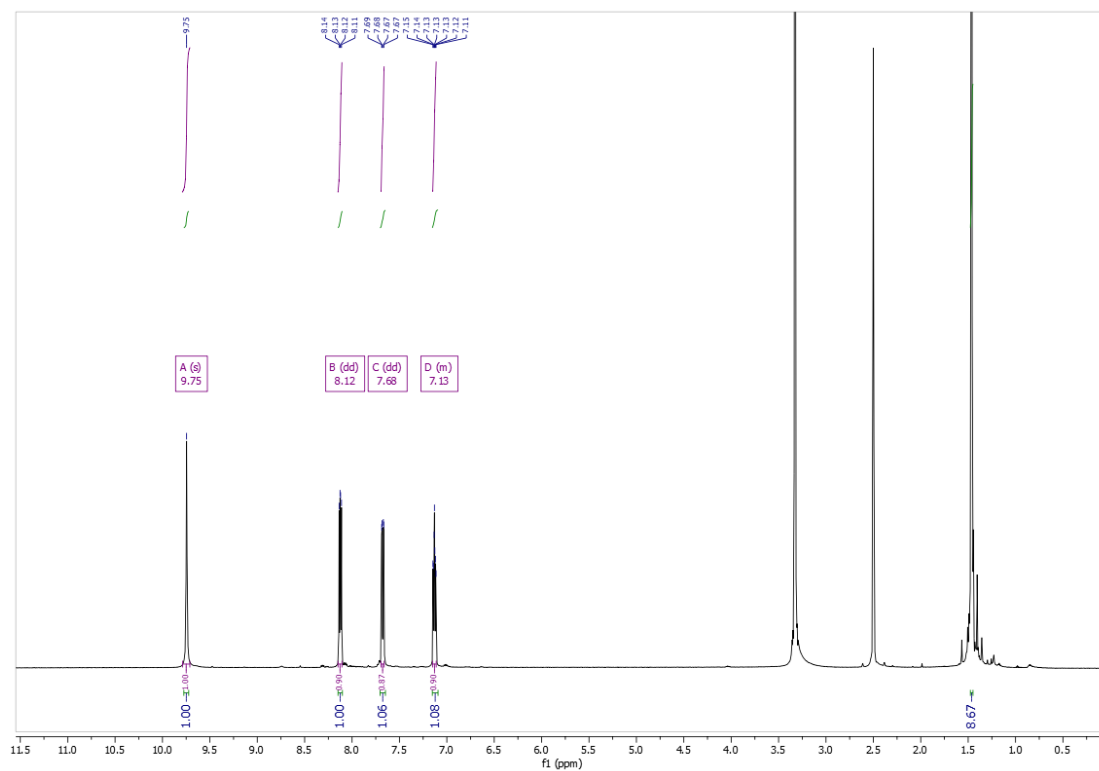
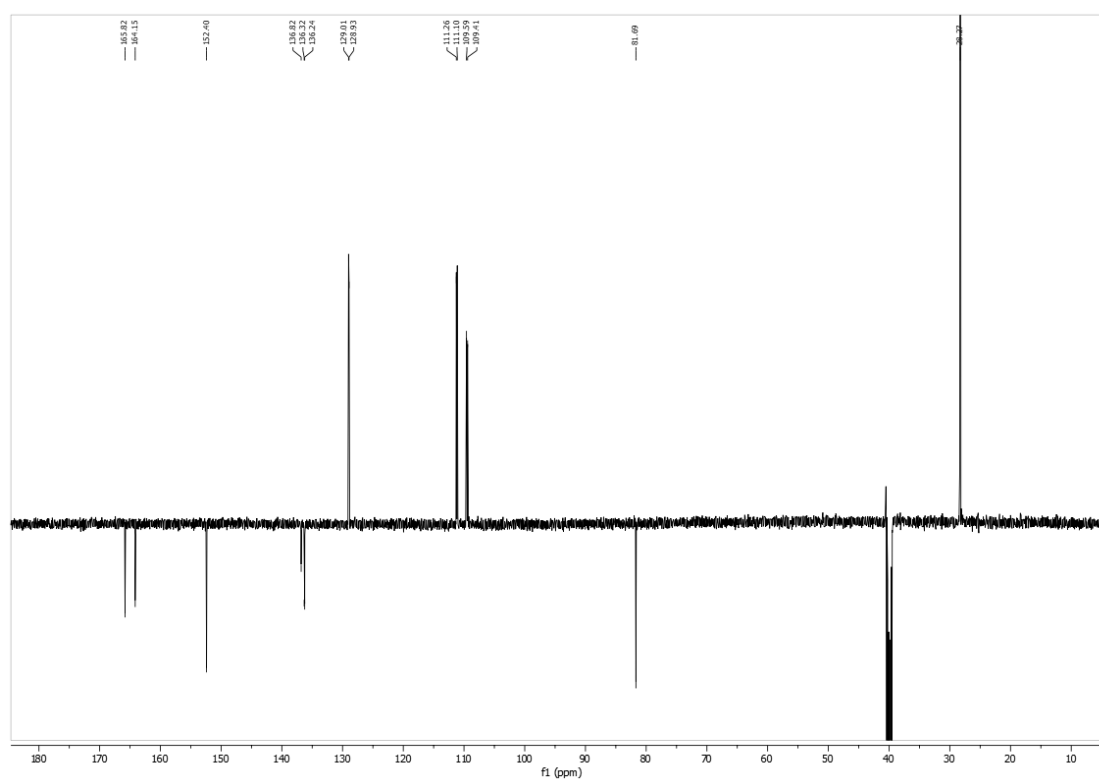
▪ Terc-butil N-(5-fluoro-2-nitrofenil) carbamato (2)



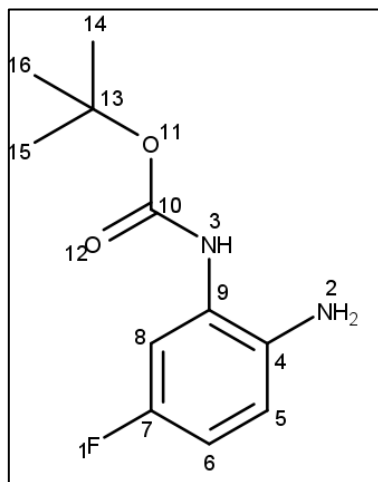
Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 5cm de diâmetro; fase móvel: 9:1 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 33,53%

Aspecto físico: Sólido Amarelo Claro

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto (2)**Figura 26.** RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (2)

▪ Terc-butil N-(2-amino-5-fluorofenil) carbamato **(3)**



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 20cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 7:3 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 83,05%

Aspecto físico: Sólido Roxo Escuro

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto (3).

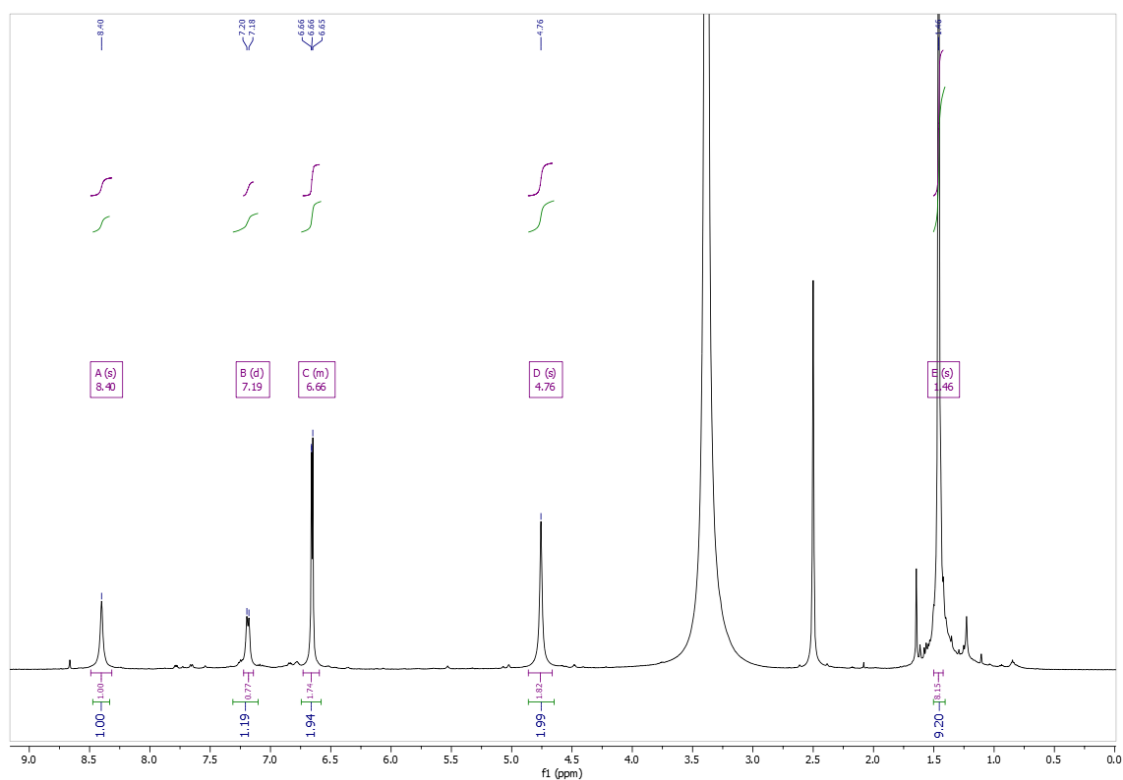
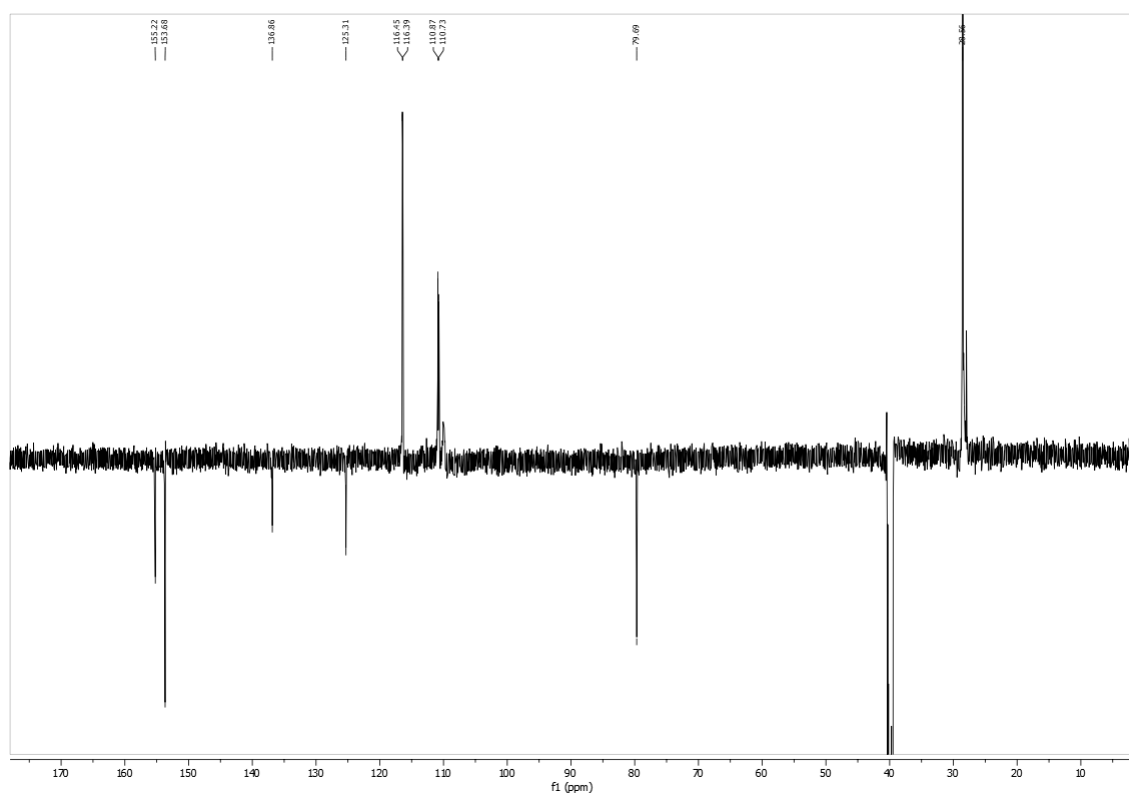
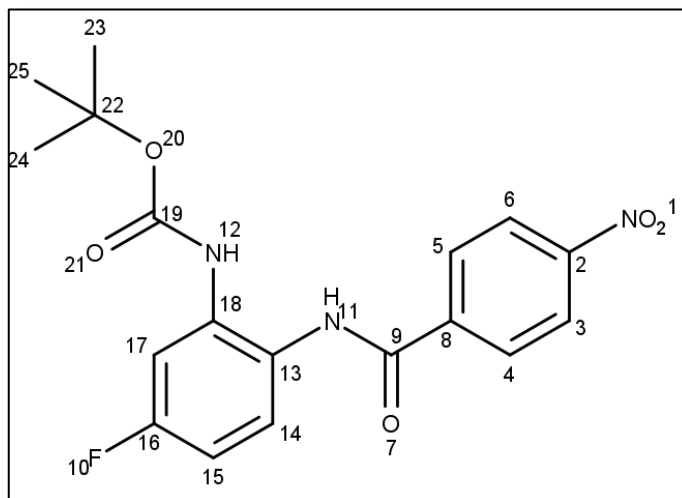


Figura 28. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (3).



▪ Terc-butil N-[5-fluoro-2-(4-nitrobenzamida) fenil] carbamato (5)



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 40,18%

Aspecto físico: Sólido Bege

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto (5).

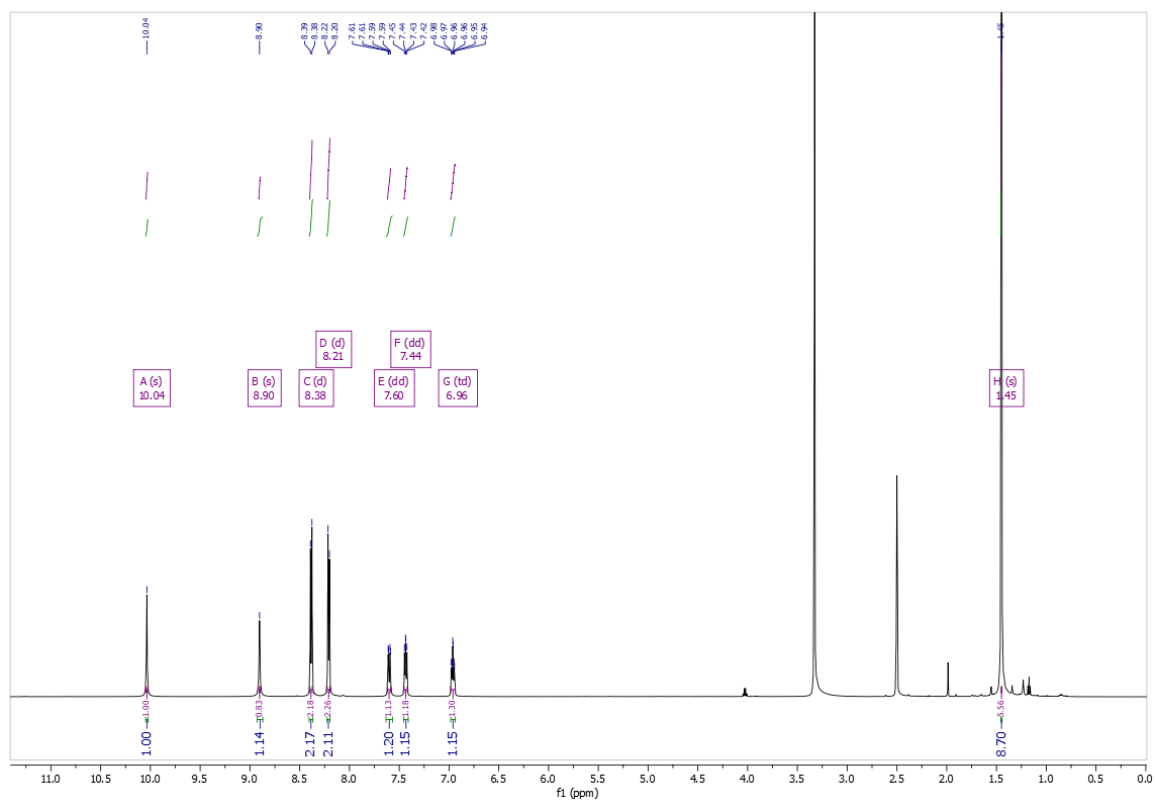
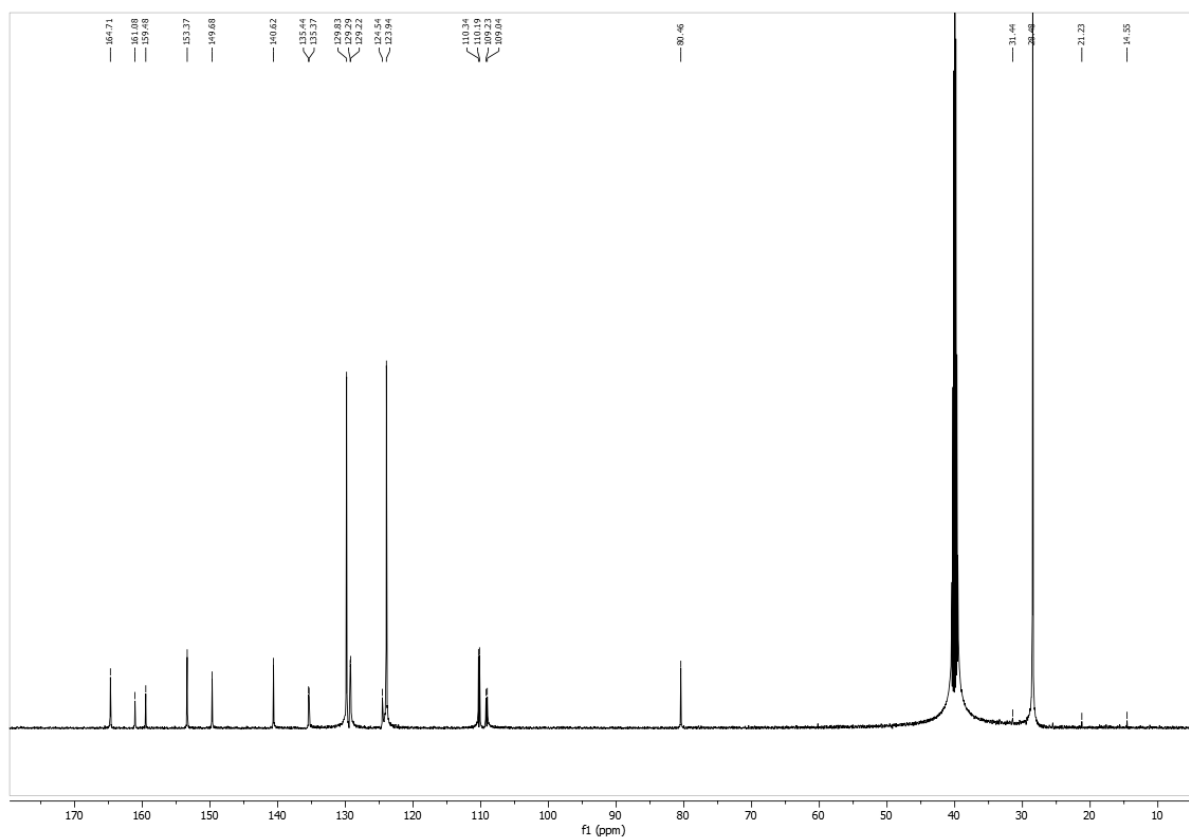
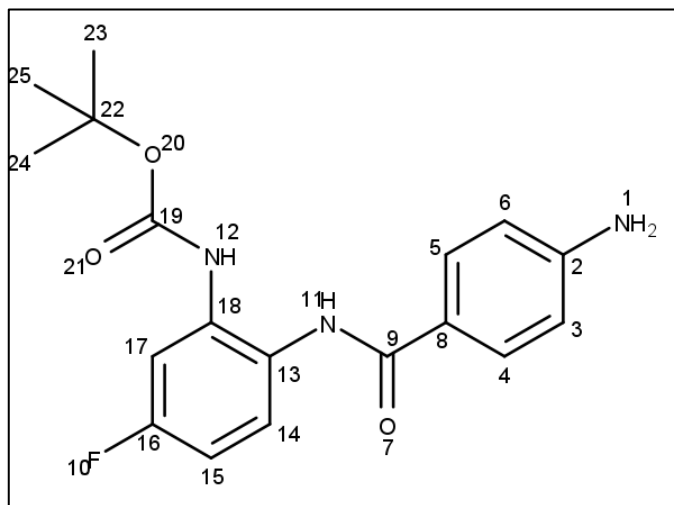


Figura 30. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (5).



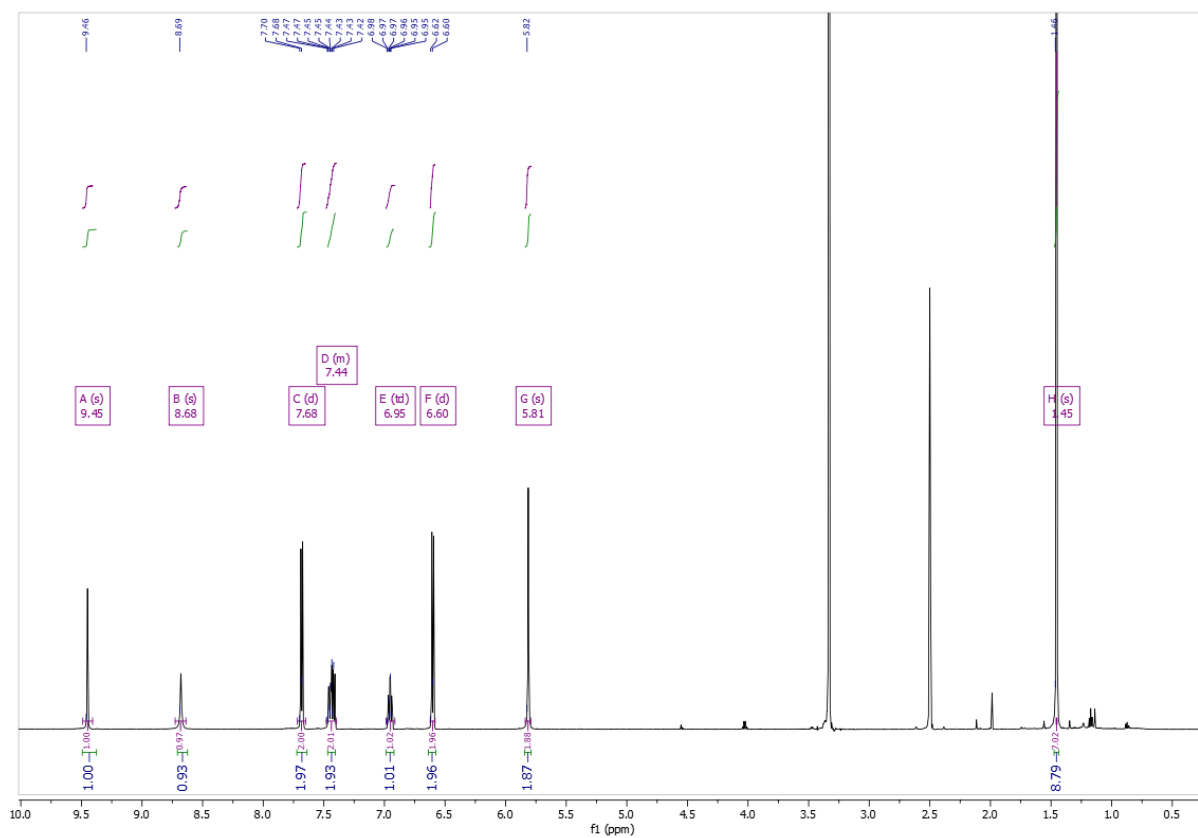
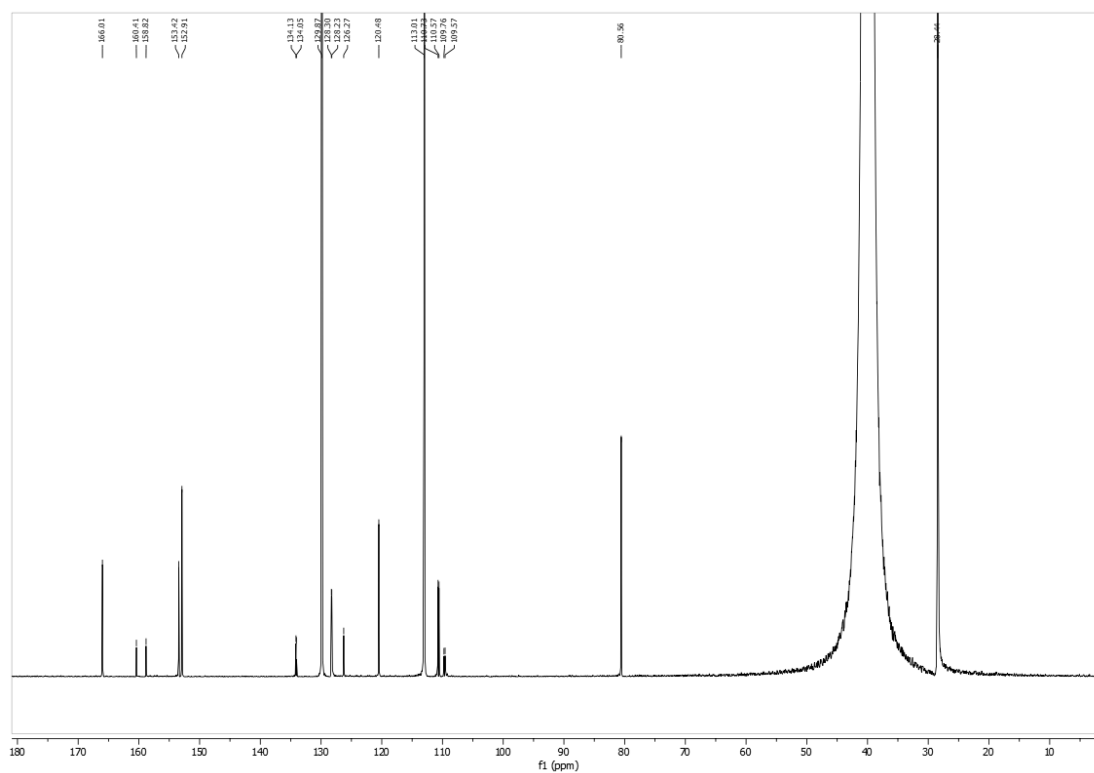
▪ Terc-butil N-[2-(4-aminobenzamida)-5-fluorofenil] carbamato **(6)**



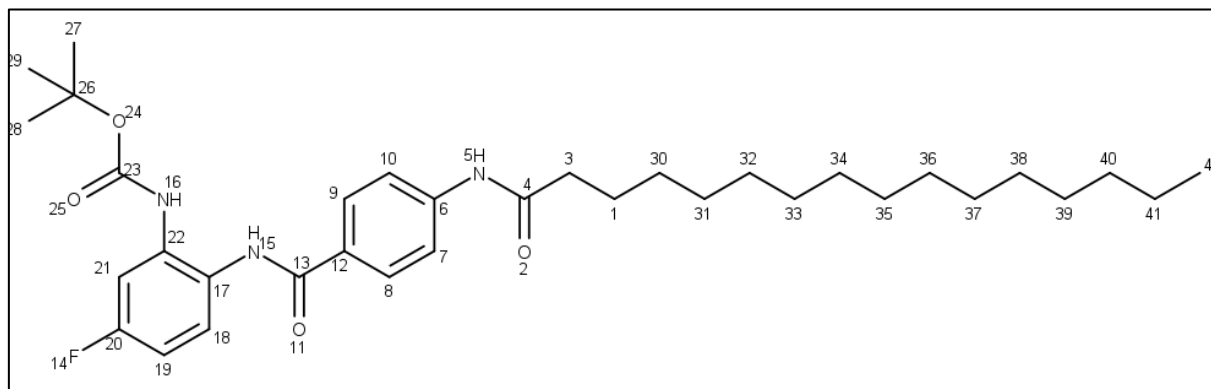
Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 10cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 54,30%

Aspecto físico: Sólido Bege Claro

Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto **(6)**.**Figura 32.** RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto **(6)**.

▪ **Terc-butil N-[5-fluoro-2-(4-hexadecanamidabenzamida)fenil] carbamato (8)**



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 32,29%

Aspecto físico: Sólido Branco

Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto **(8)**.

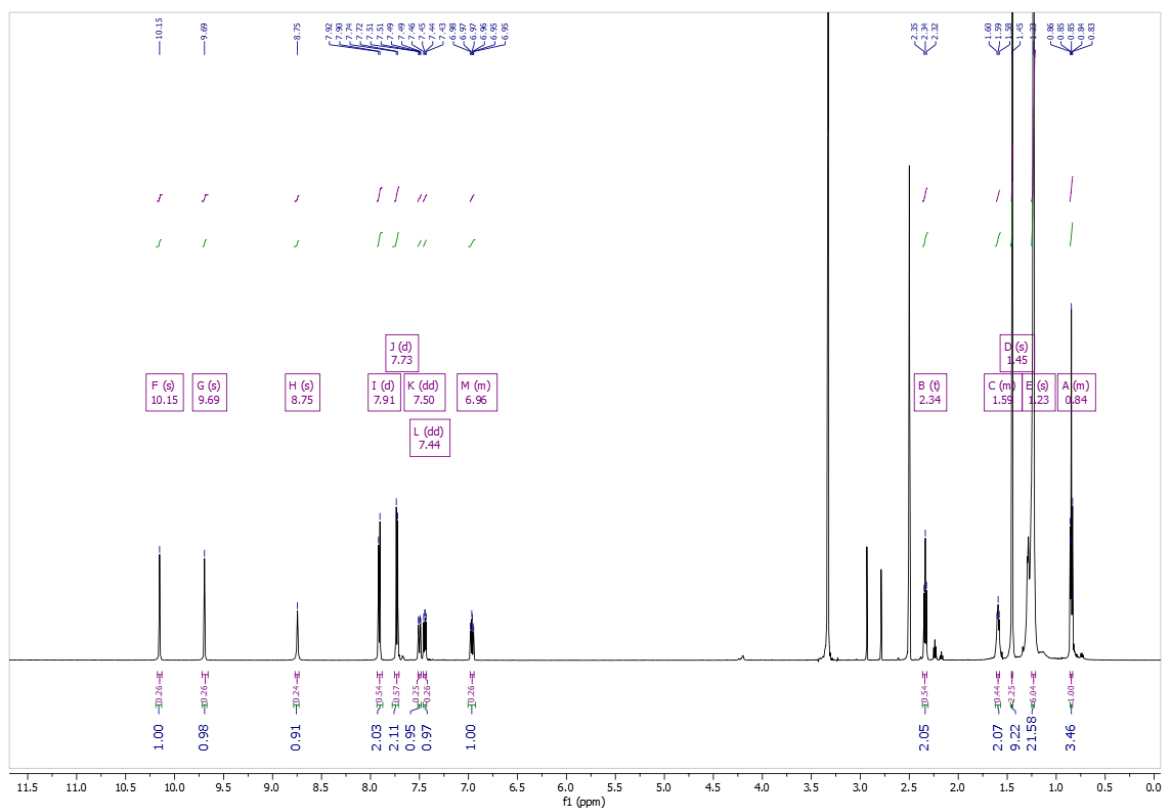
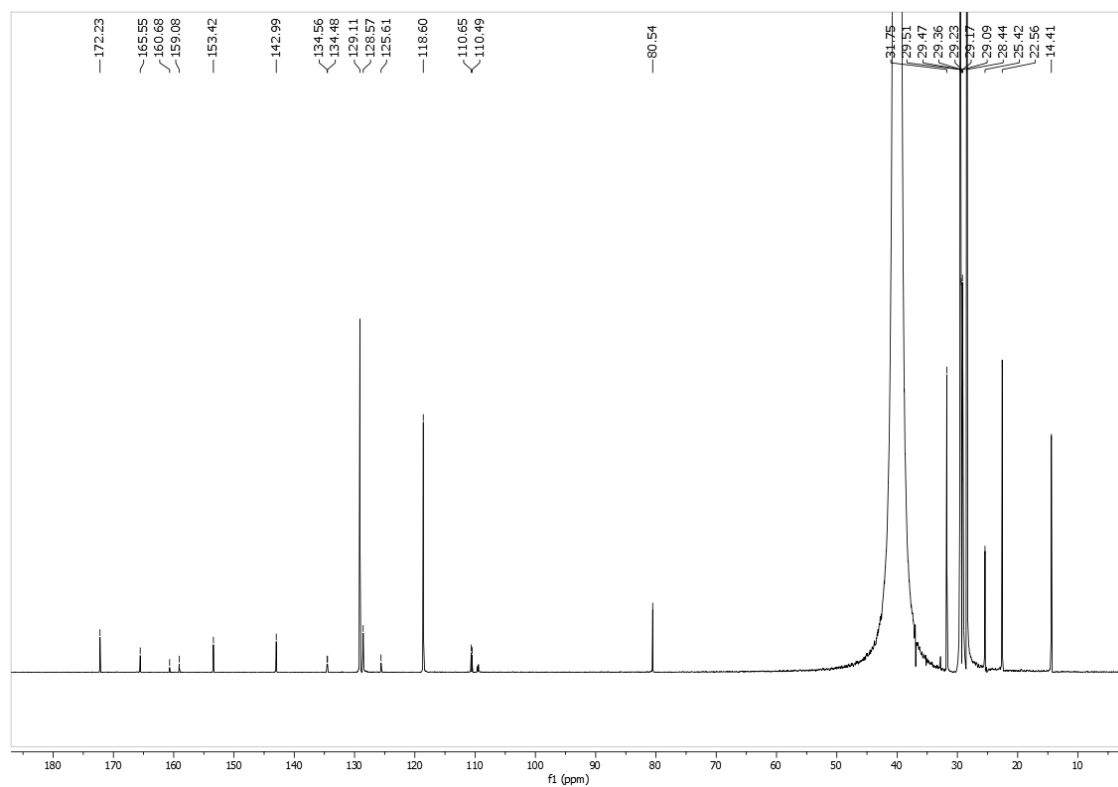
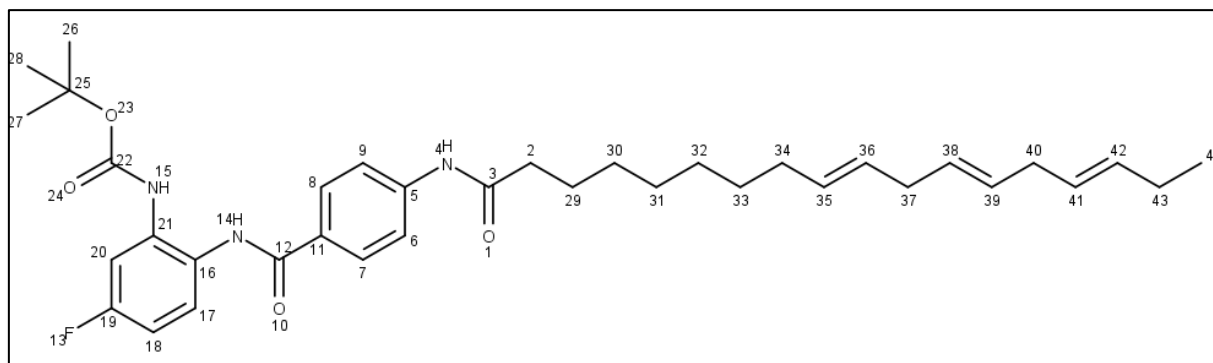


Figura 34. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto **(8)**.



- Terc-butil N-[5-fluoro-2-{4-[(9E, 12E, 15E)-octadeca-9, 12, 15-trienamida] benzamida} fenil) carbamato (11)



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 38,02%

Aspecto físico: Óleo Amarelo

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto **(11)**.

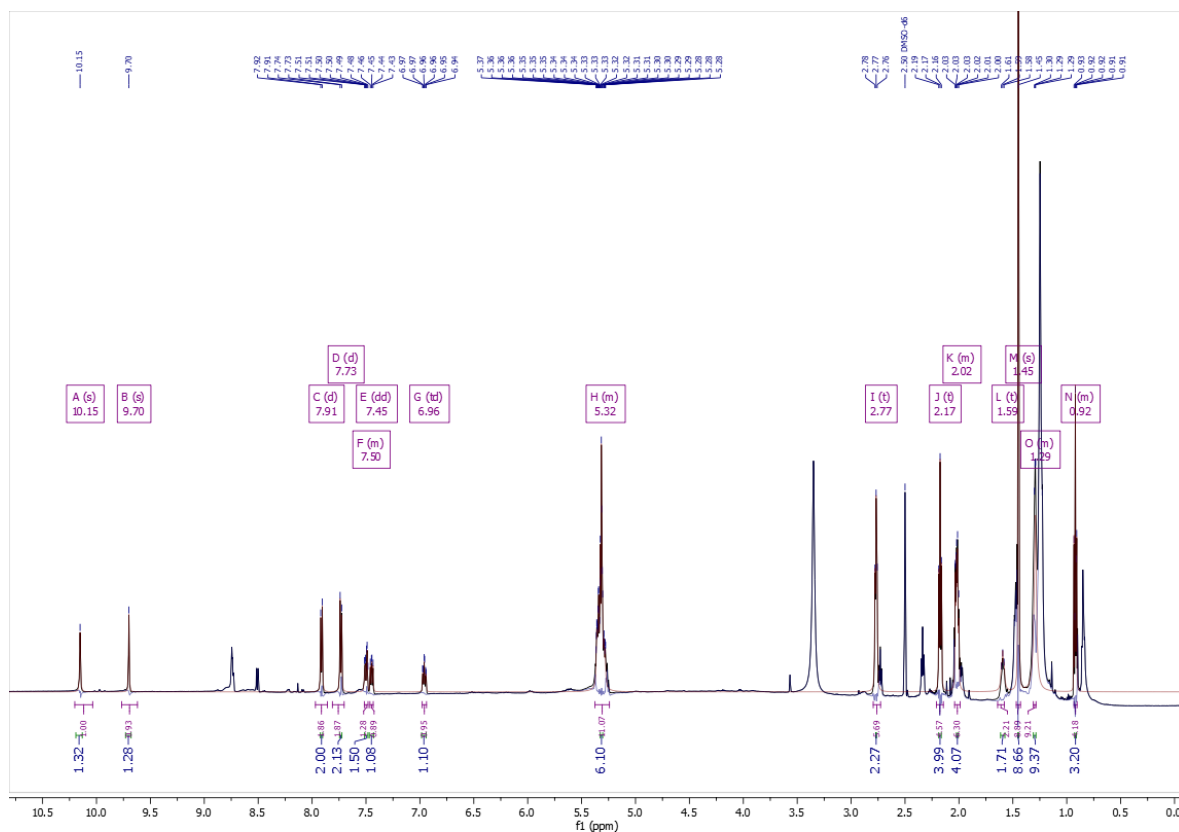
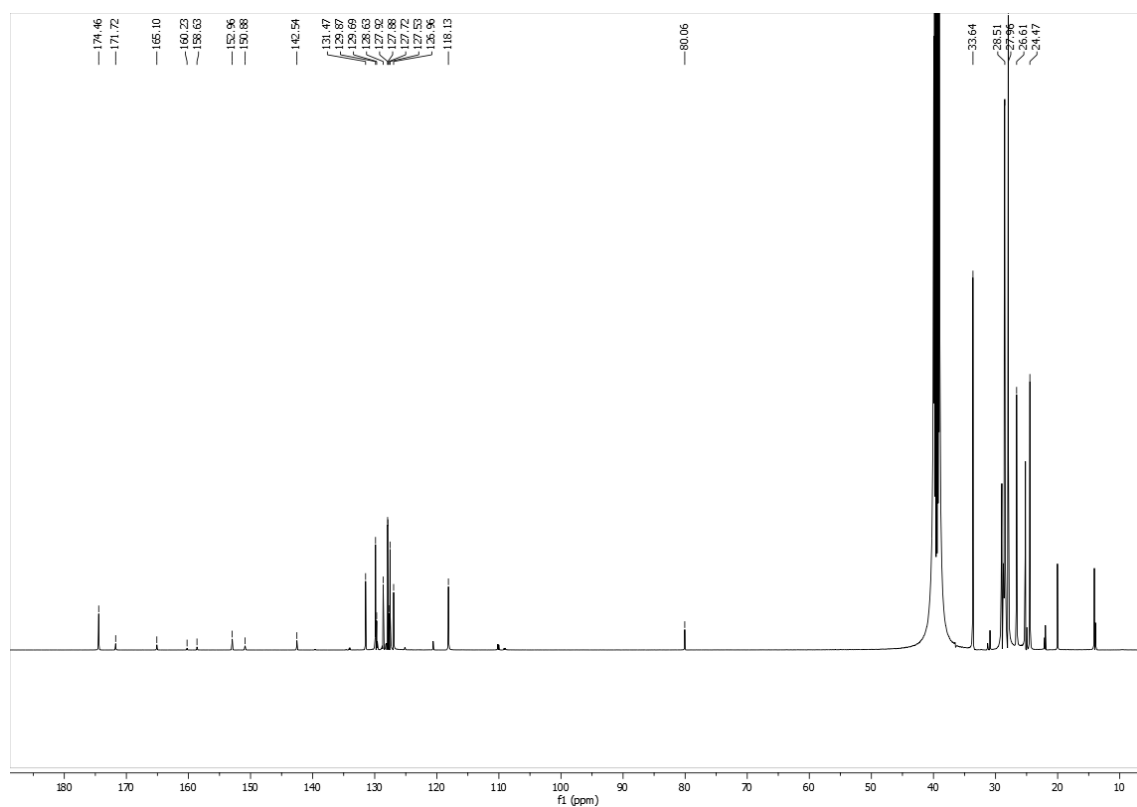
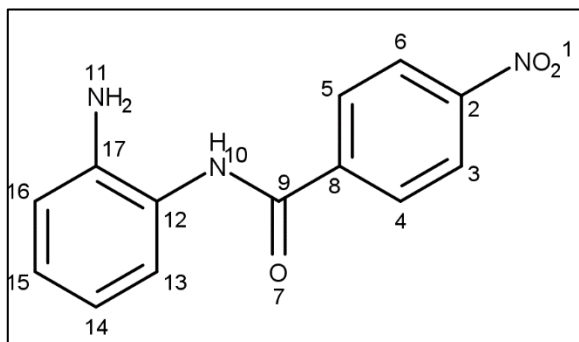


Figura 36. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto **(11)**.



▪ **N-(2-aminofenil)-4-nitrobenzamida (14)**



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 20cm de altura e 5cm de diâmetro; fase móvel: 8:2 acetato de etila/hexano).

Rendimento: 76,97%

Aspecto físico: Sólido Marrom Claro

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto **(14)**.

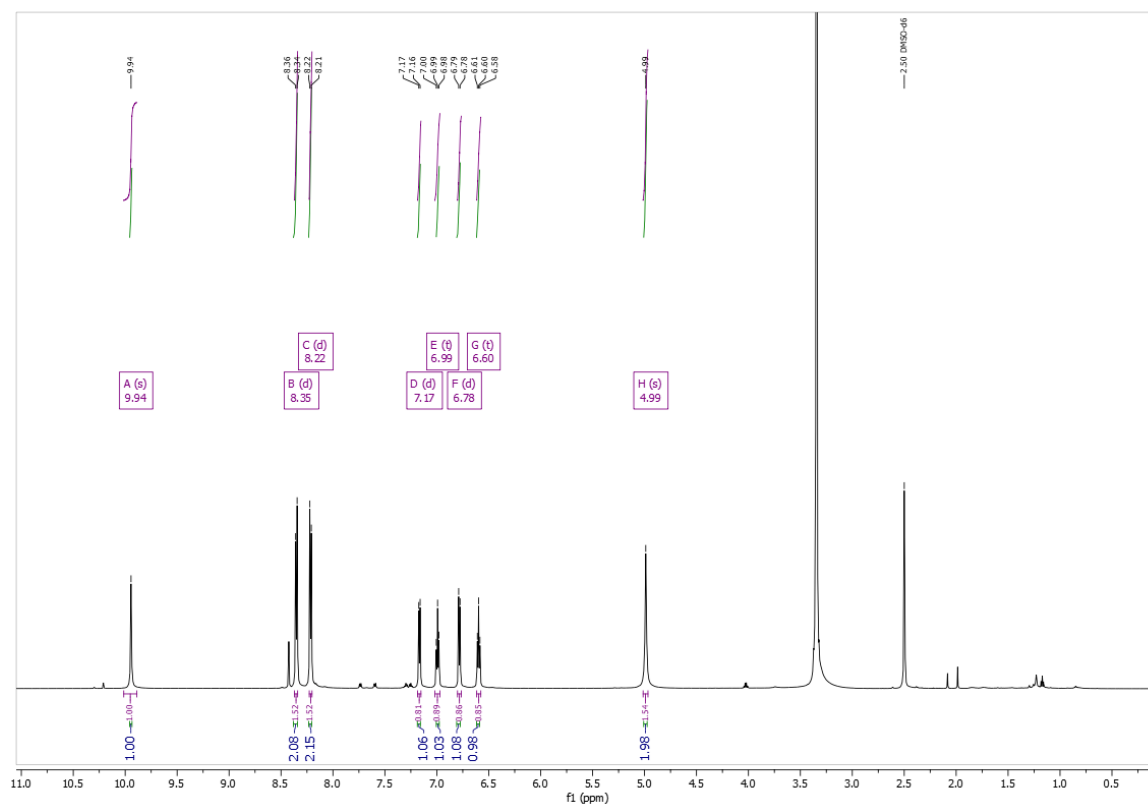
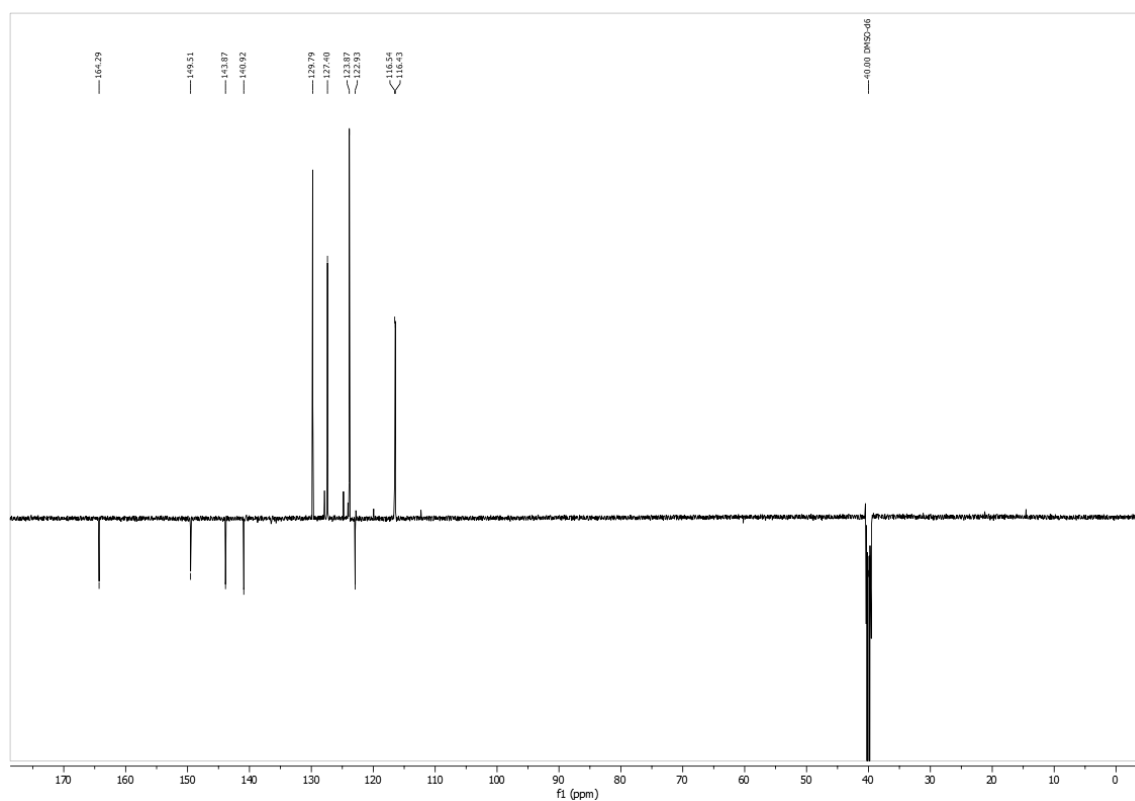
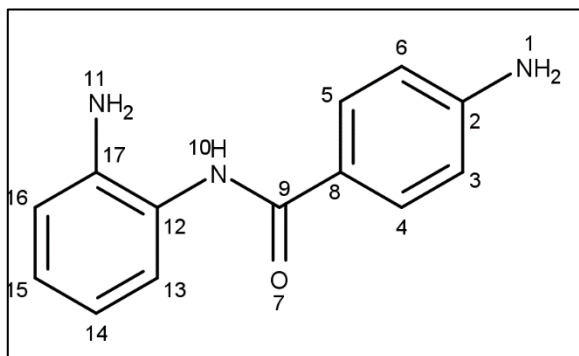


Figura 38. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto **(14)**.



▪ 4-amino-N-(2-aminofenil) benzamida **(15)**



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 8:2 acetato de etila/hexano).

Rendimento: 38,82%

Aspecto físico: Sólido Branco

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto (15).

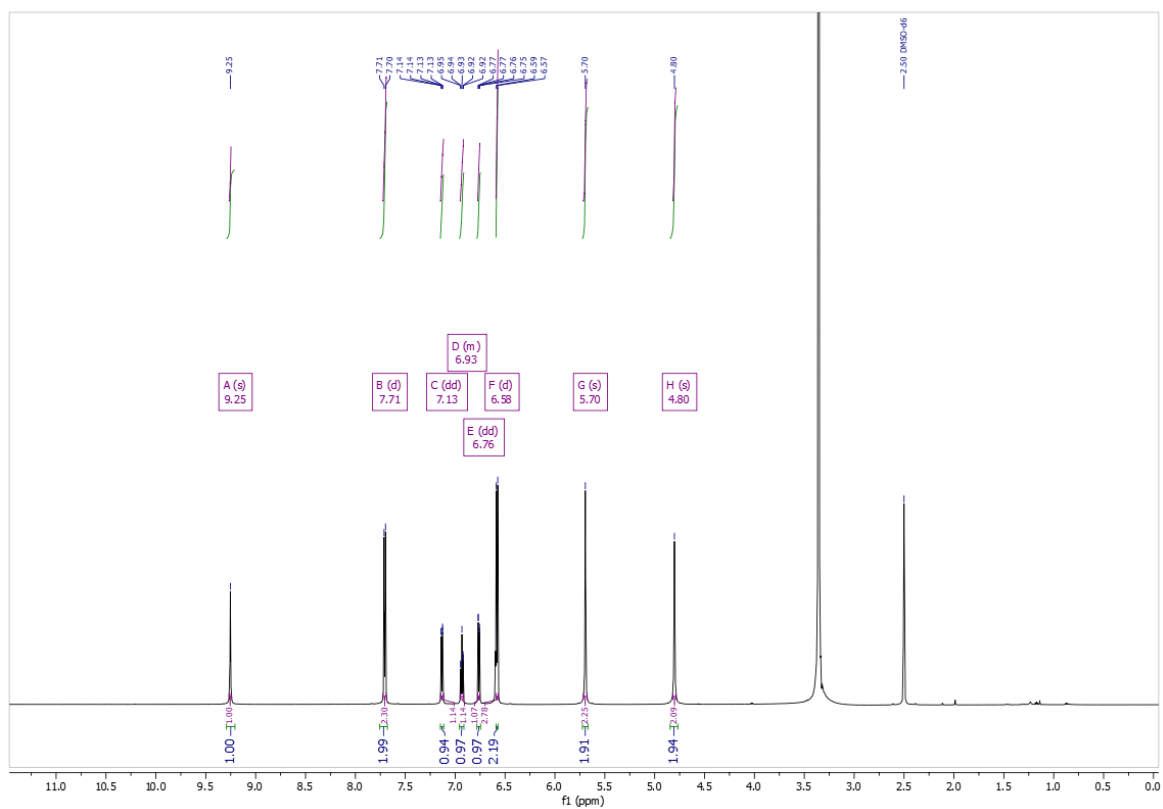
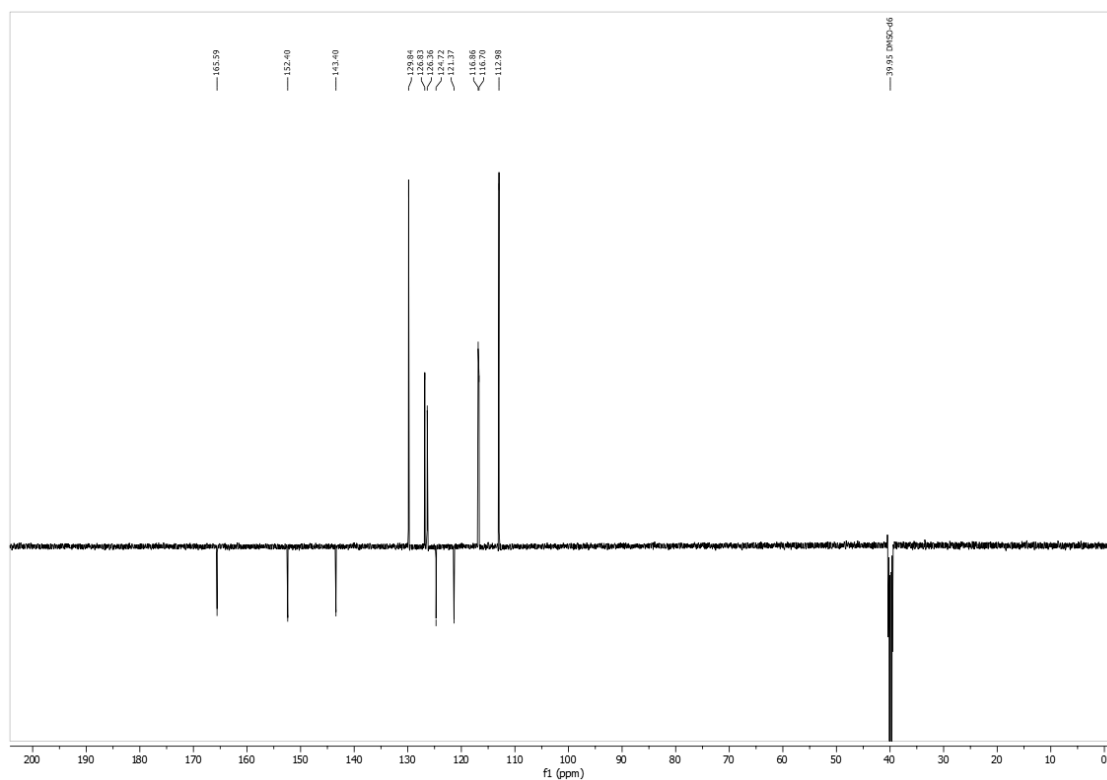
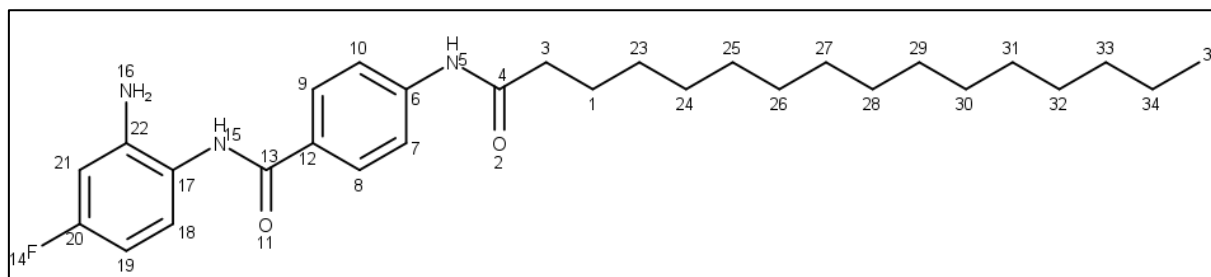


Figura 40. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (15).



Apêndice B – Caracterização dos Compostos Finais

▪ N-(2-amino-4-fluorofenil)-4-hexadecanamidabenzamida (**9**)



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 40,16%

Aspecto físico: Sólido Branco

Faixa de Fusão: 187,4°C à 189,3°C

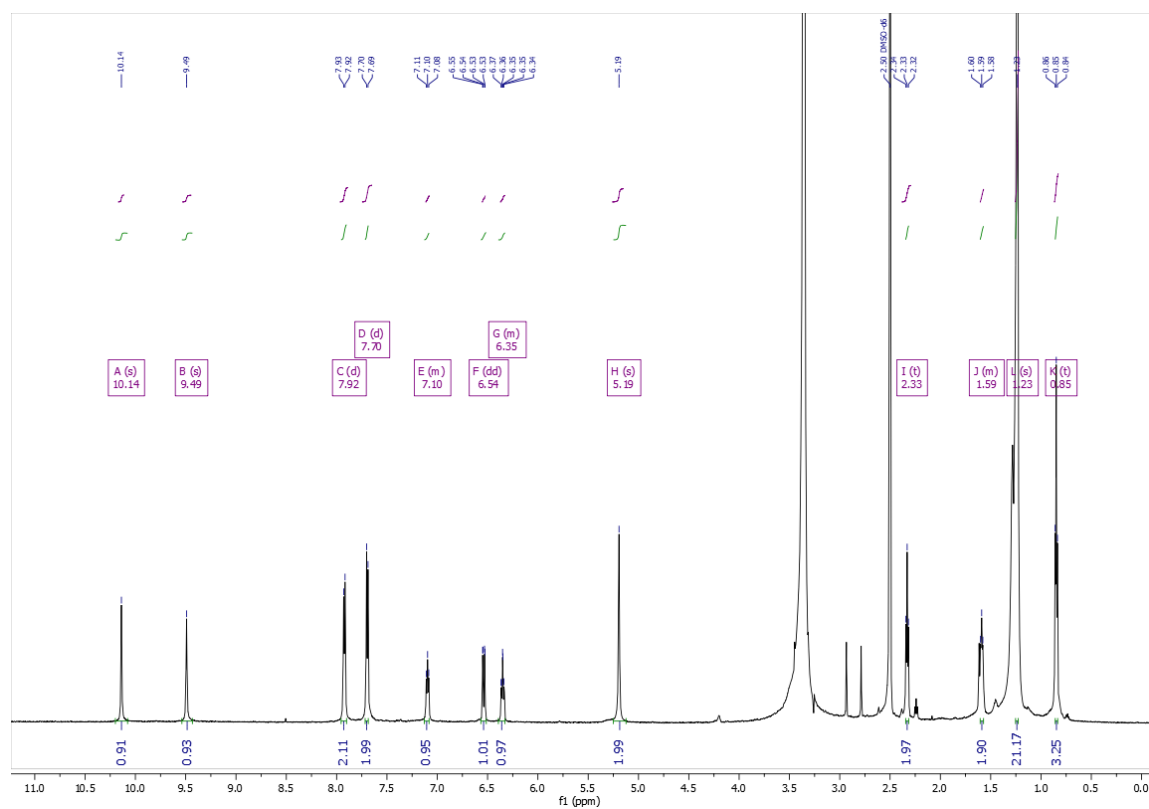
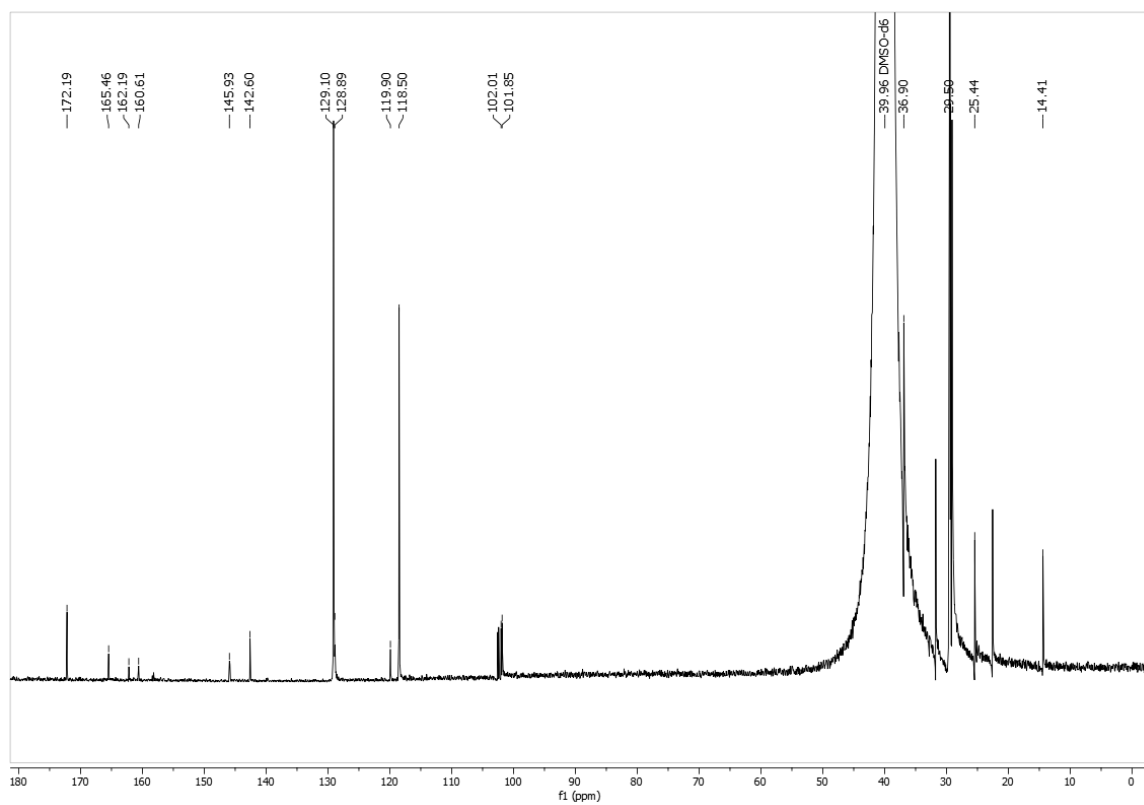
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto **(9)**.**Figura 42.** RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto **(9)**.

Figura 43. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto **(9)**.

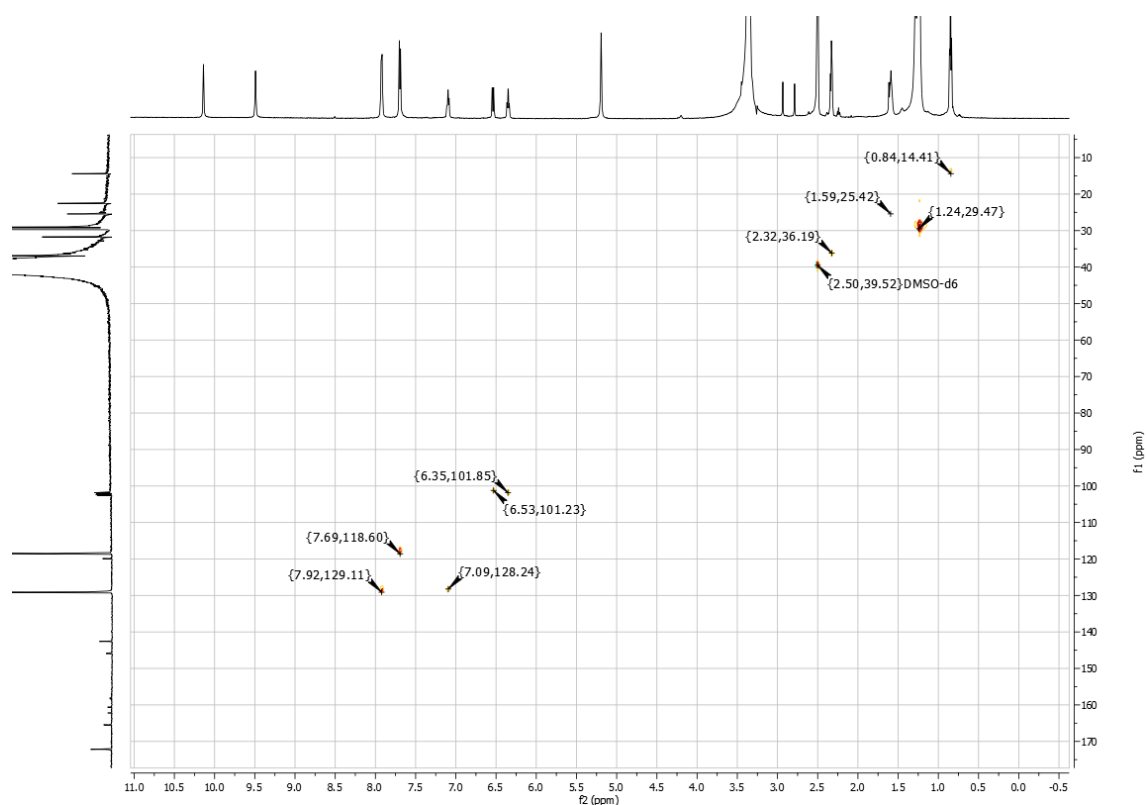


Figura 44. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto **(9)**.

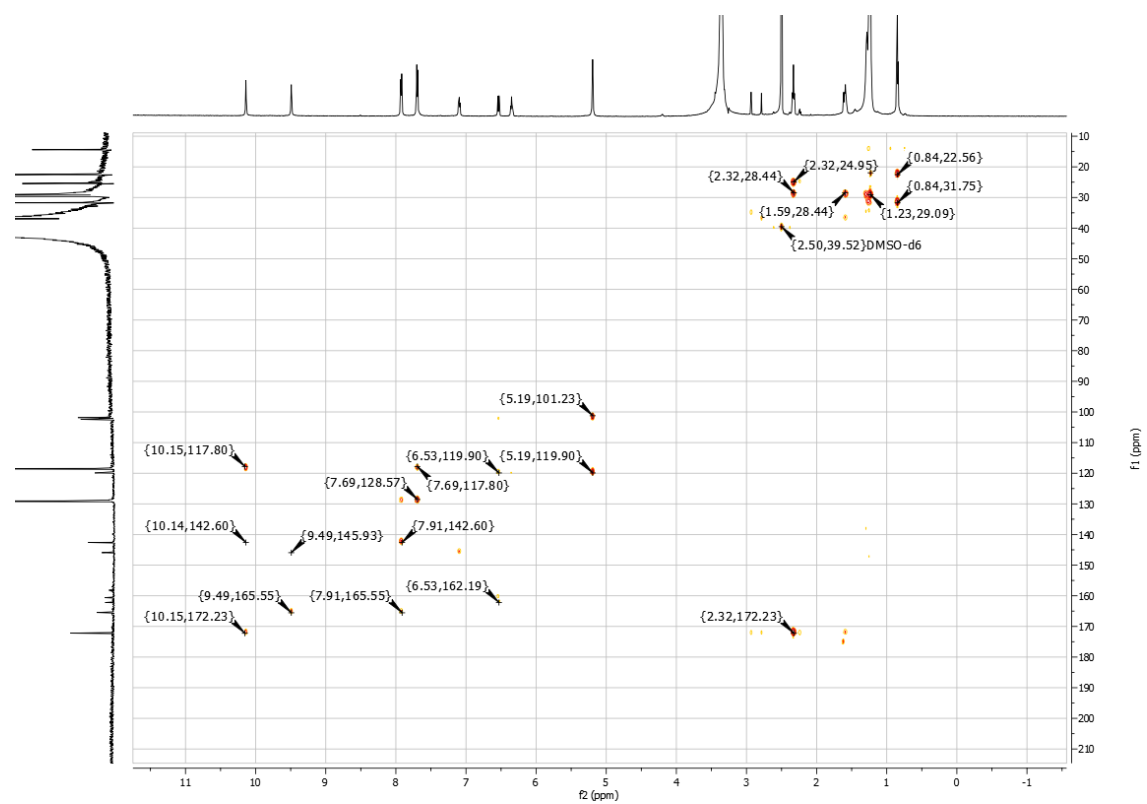
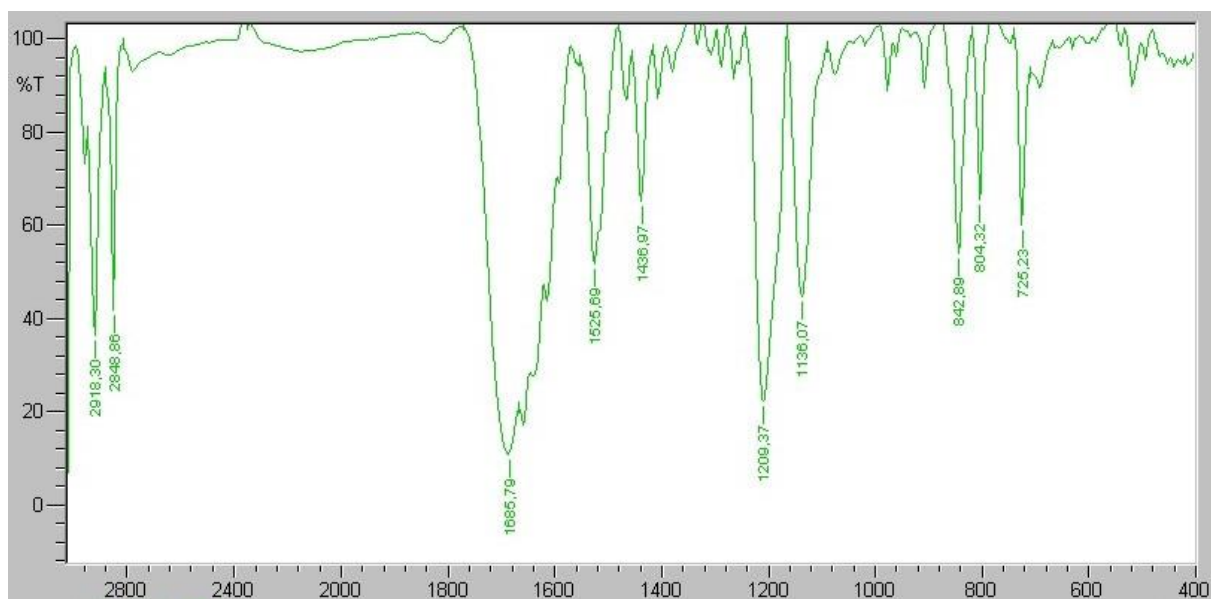
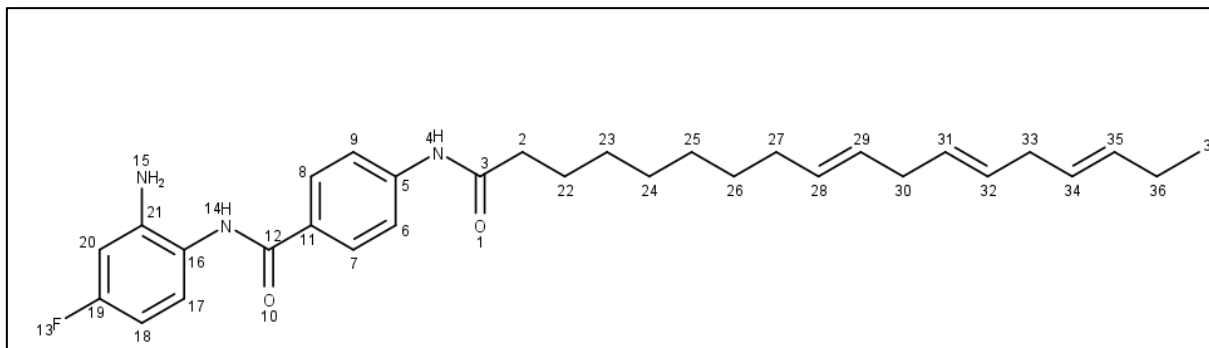


Figura 45. Espectro de IV (KBr) do composto **(9)**.



- **N-(2-amino-4-fluorofenil)-4-[(9E, 12E, 15E)-octadeca-9,12,15-trienamida] benzamida (12)**



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 71,86%

Aspecto físico: Óleo Amarelo

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto (12).

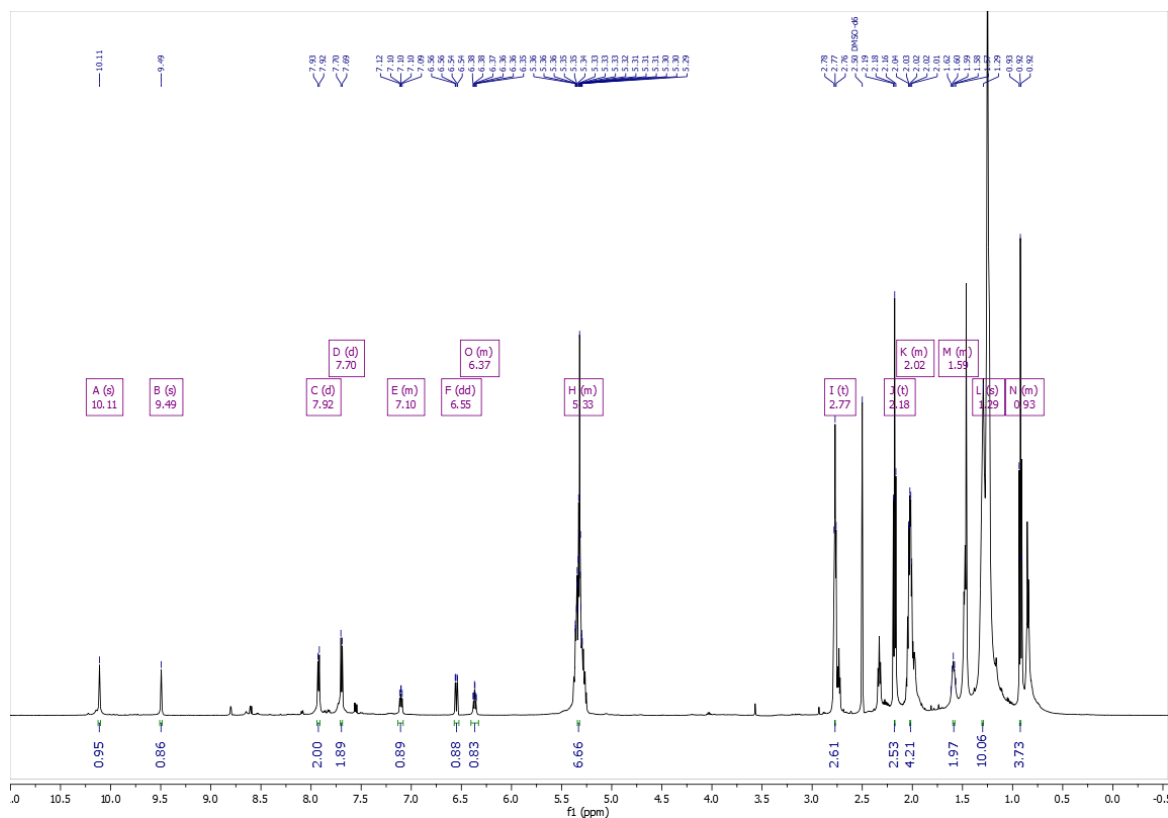


Figura 47. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (12).

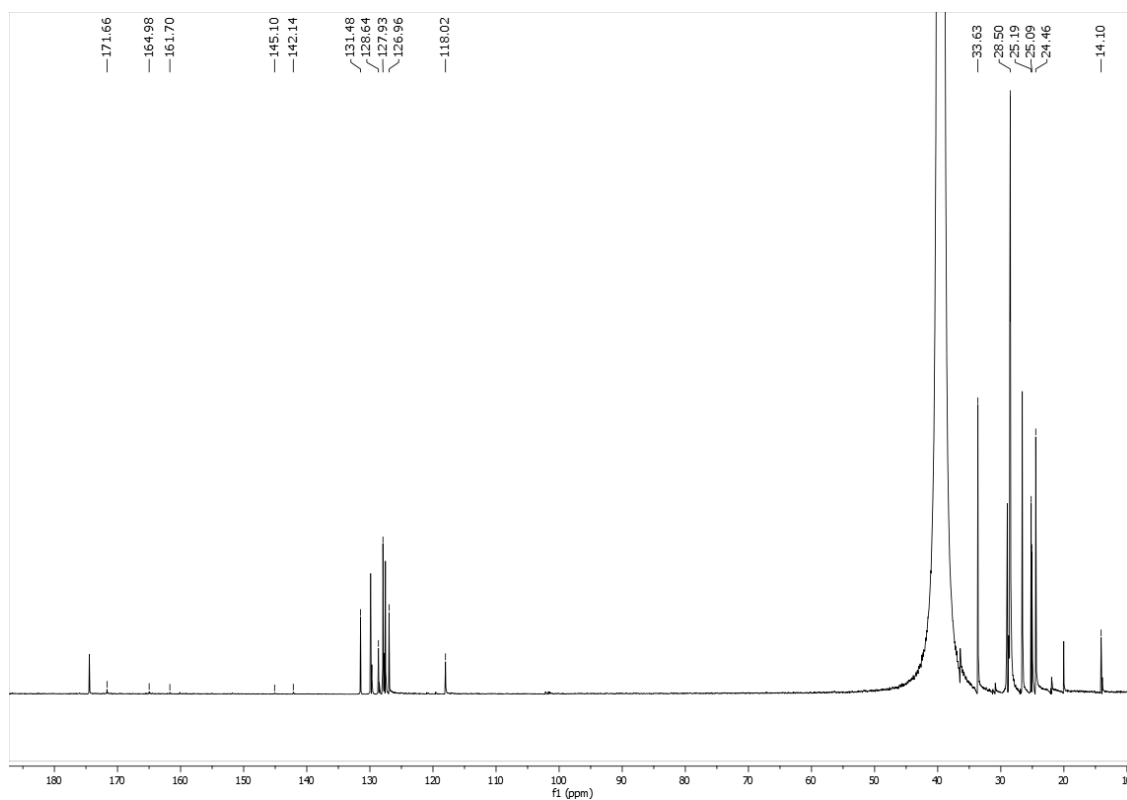


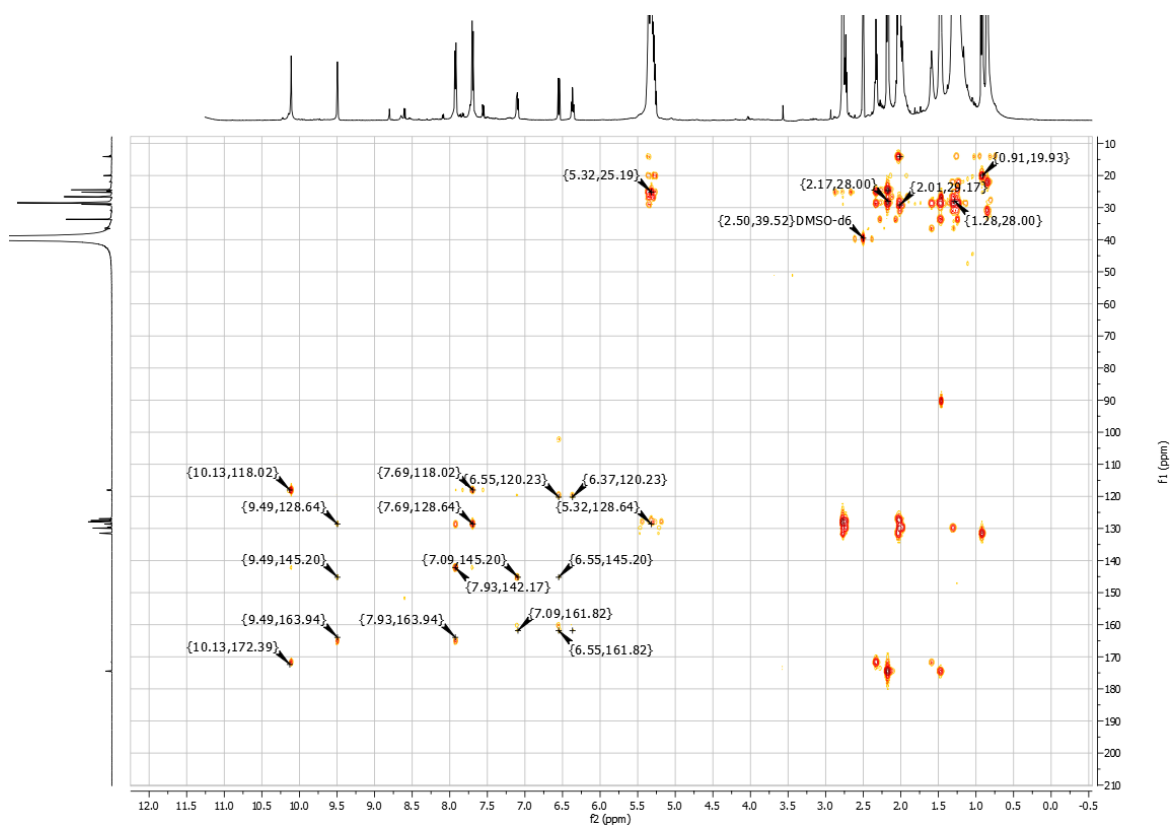
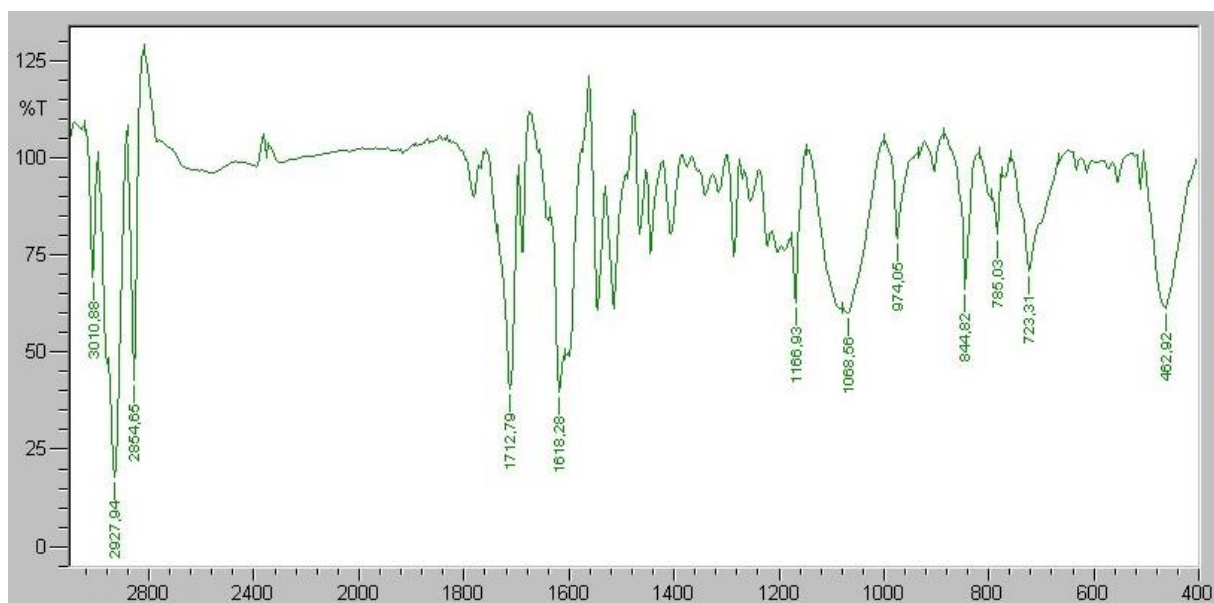
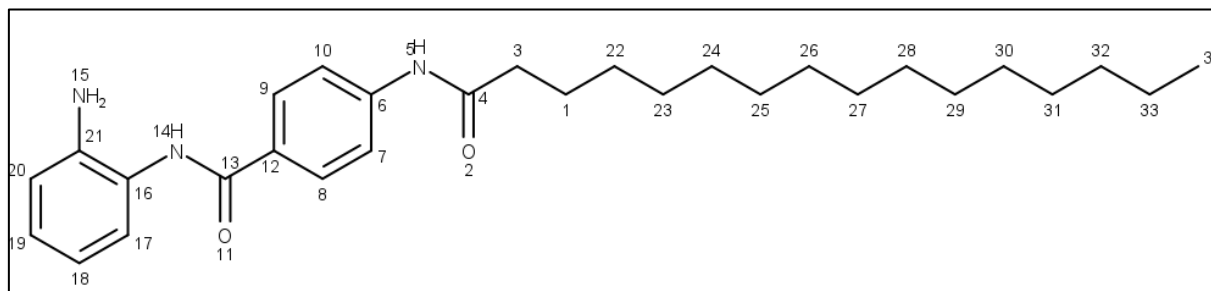
Figura 48. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto **(12)**.**Figura 49.** Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto **(12)**.

Figura 50. Espectro de IV (KBr) do composto **(12)**.



▪ **N-(2-amino-2-fenil)-4-hexadecanamidobenzamida (16)**



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 20,66%

Aspecto físico: Sólido Branco

Faixa de Fusão: 102,2°C à 109,7°C

Figura 51. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto **(16)**.

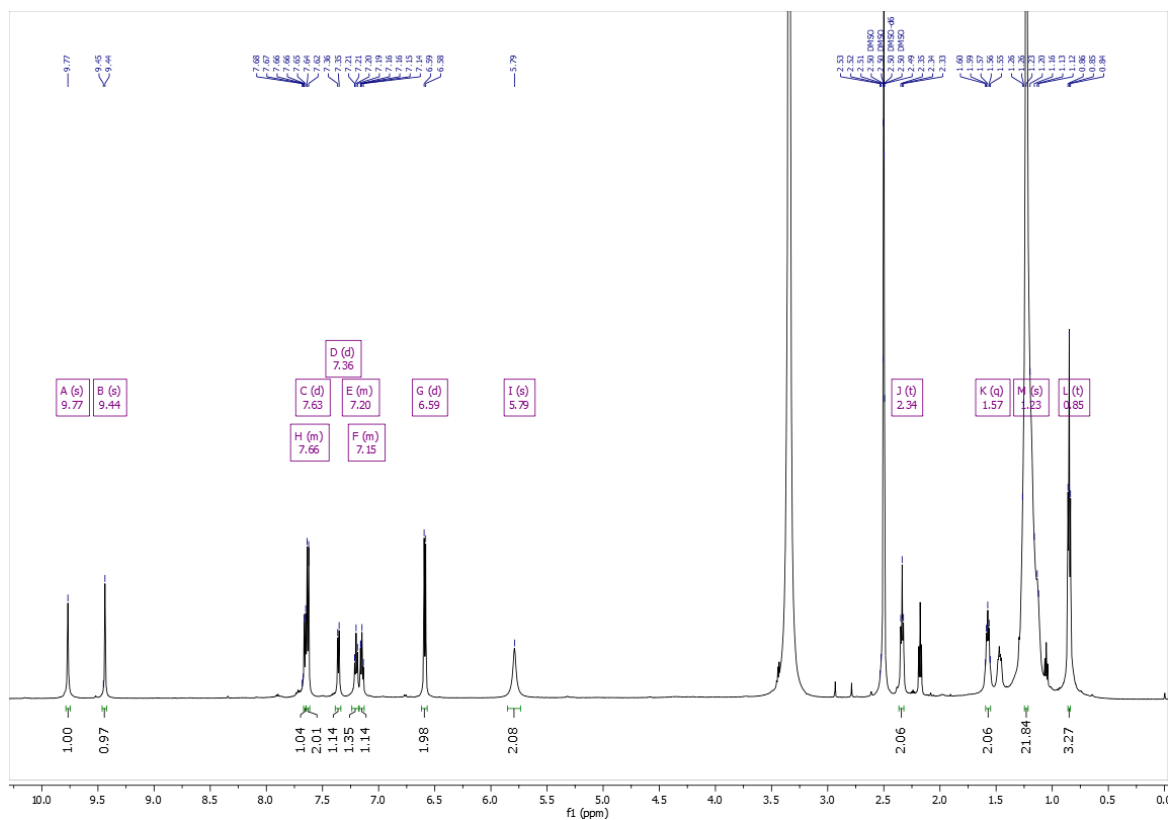


Figura 52. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto **(16)**.

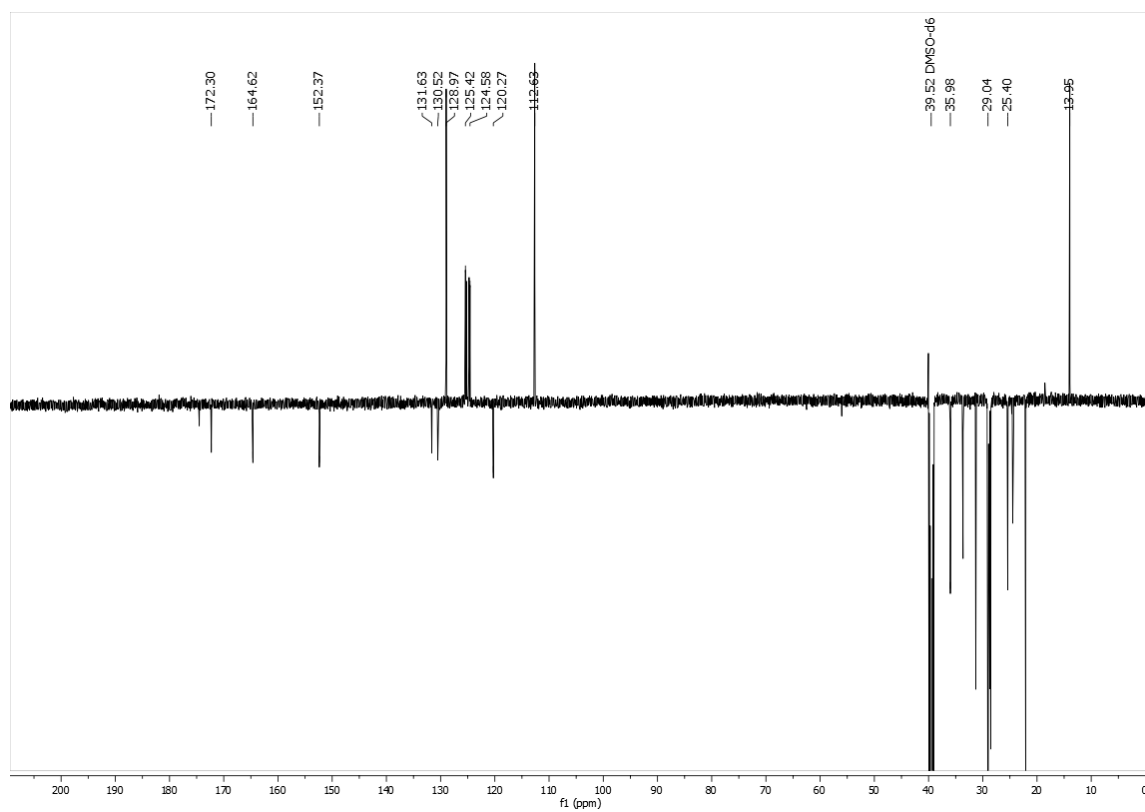


Figura 53. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto **(16)**.

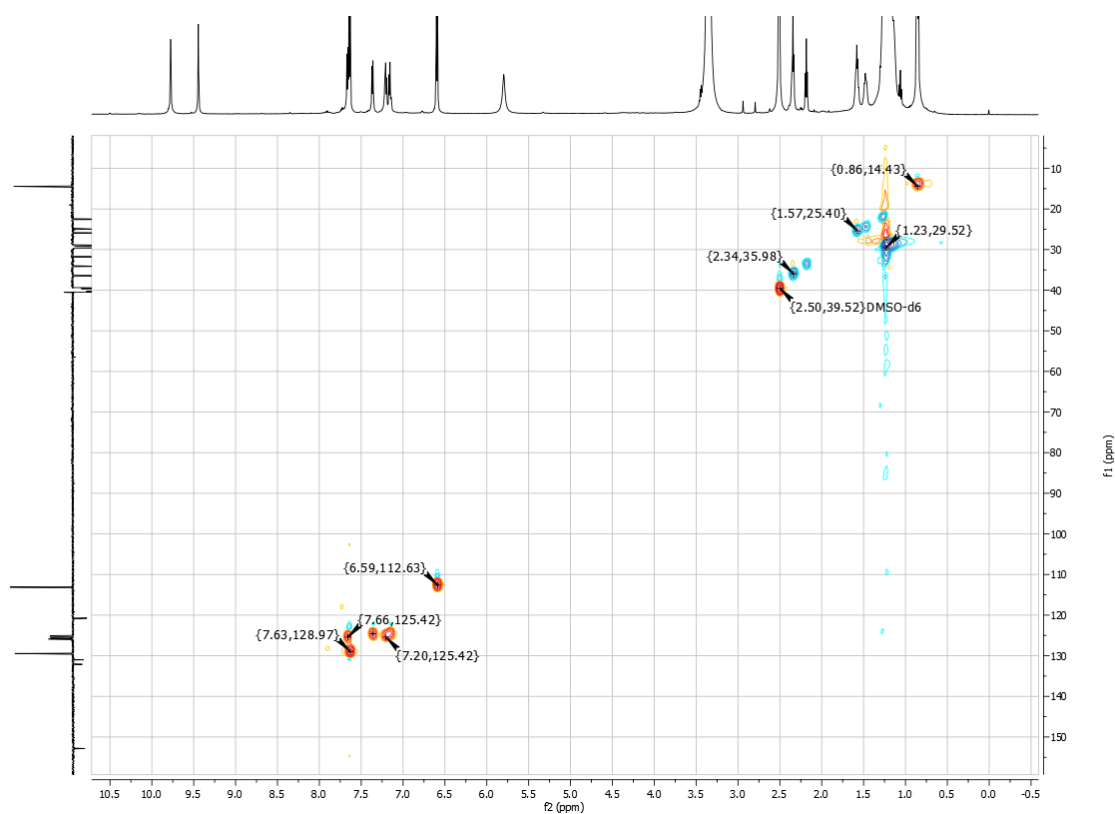


Figura 54. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto **(16)**.

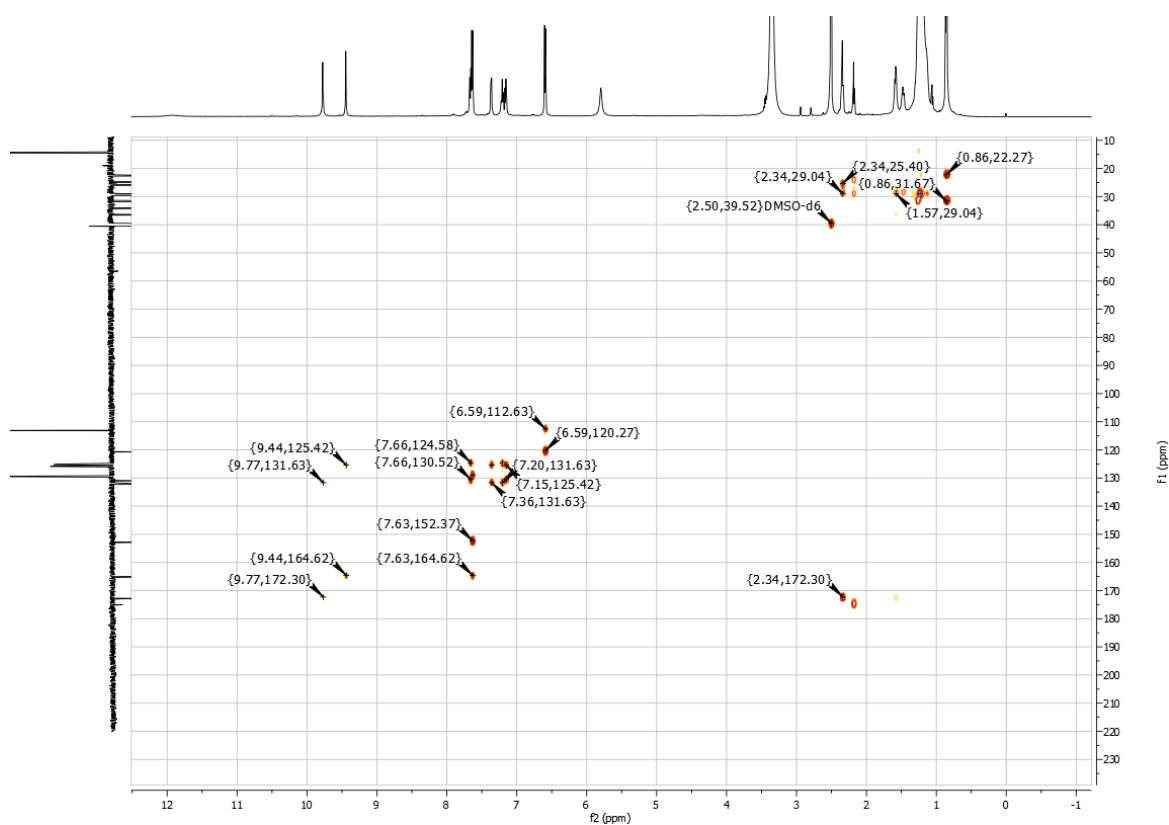
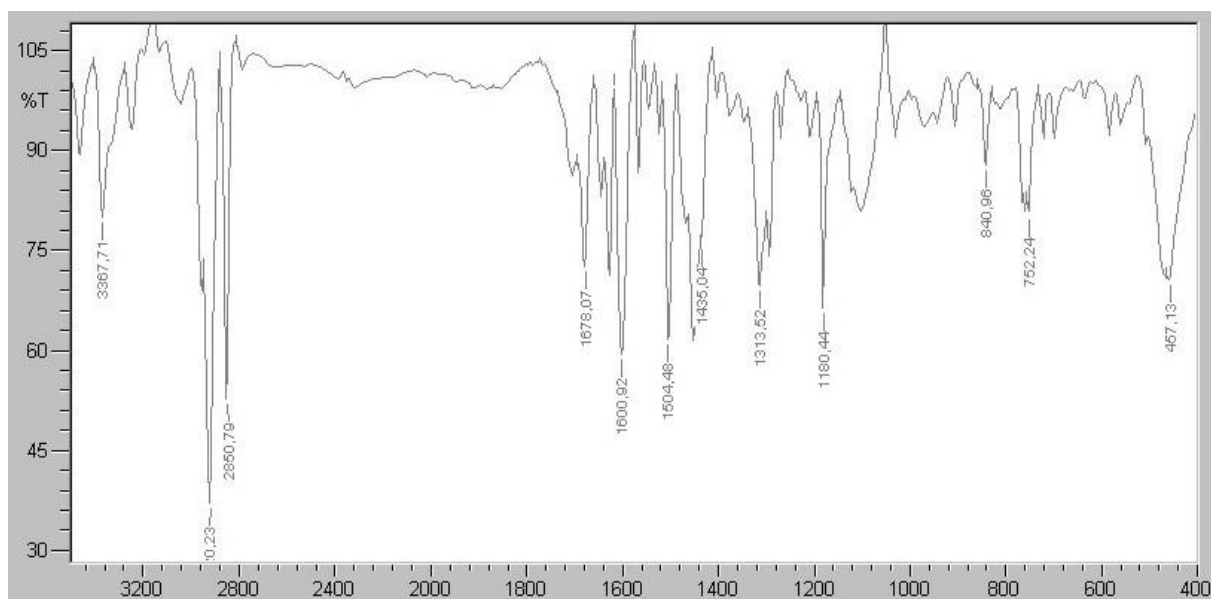
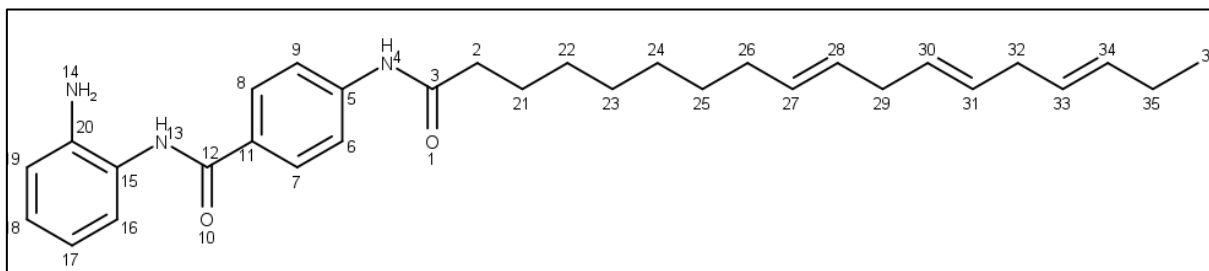


Figura 55. Espectro de IV (KBr) do composto **(16)**.



▪ **N-(2-aminofenil)-4-[(9E, 12E, 15E)-octadeca-9,12,15-trienamida] benzamida (17)**



Método de Purificação: Cromatografia de coluna de bancada (fase estacionária: Sílica *Flash*, 15cm de altura e 3cm de diâmetro; fase móvel: 5:5 hexano/acetato de etila).

Rendimento: 33,09%

Aspecto físico: Óleo Amarelo

Faixa de Fusão: 107,2 à 118,1°C

Figura 56. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto (17).

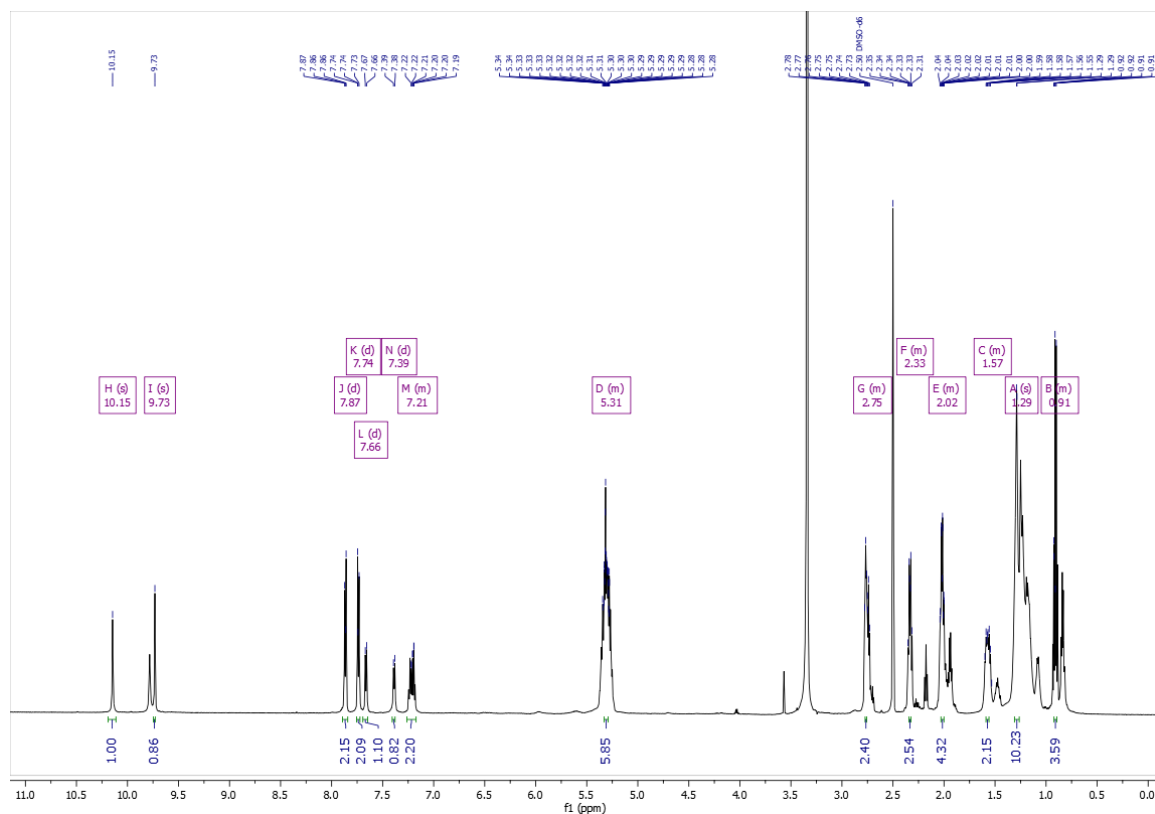


Figura 57. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (17).

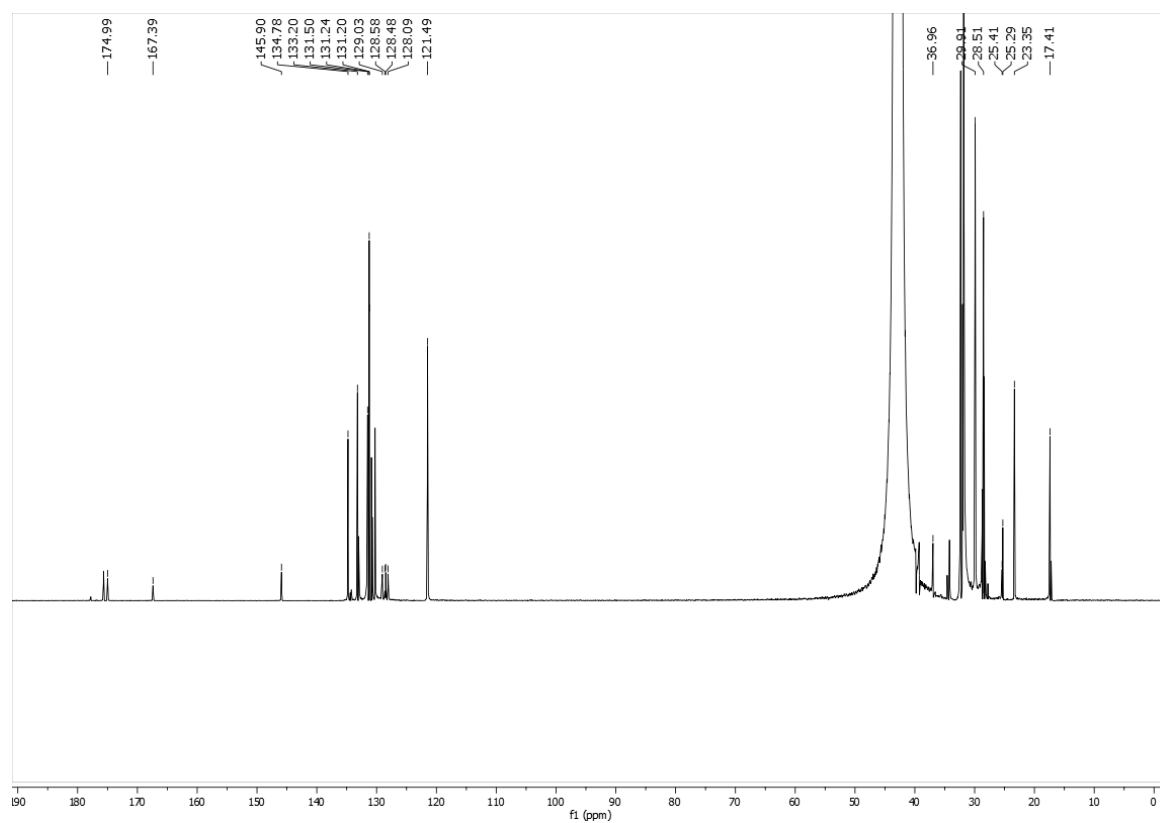


Figura 58. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (17).

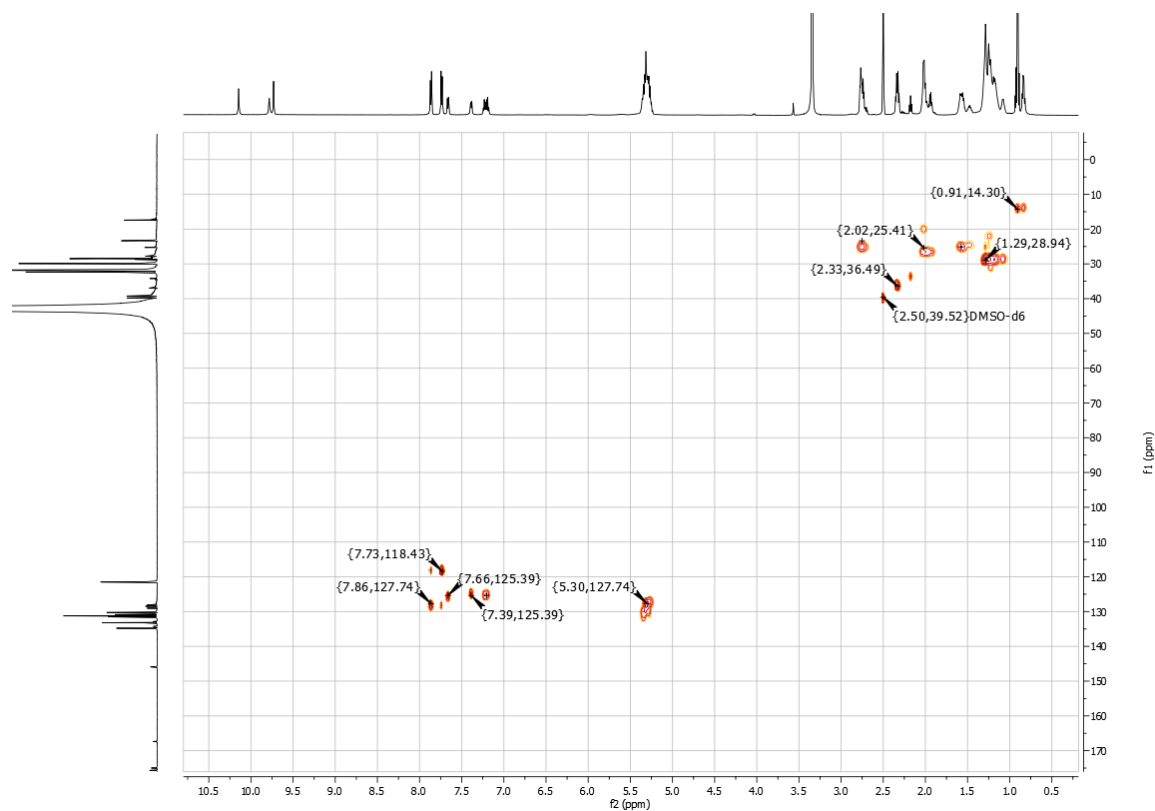


Figura 59. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d6, 600 MHz) do composto (17).

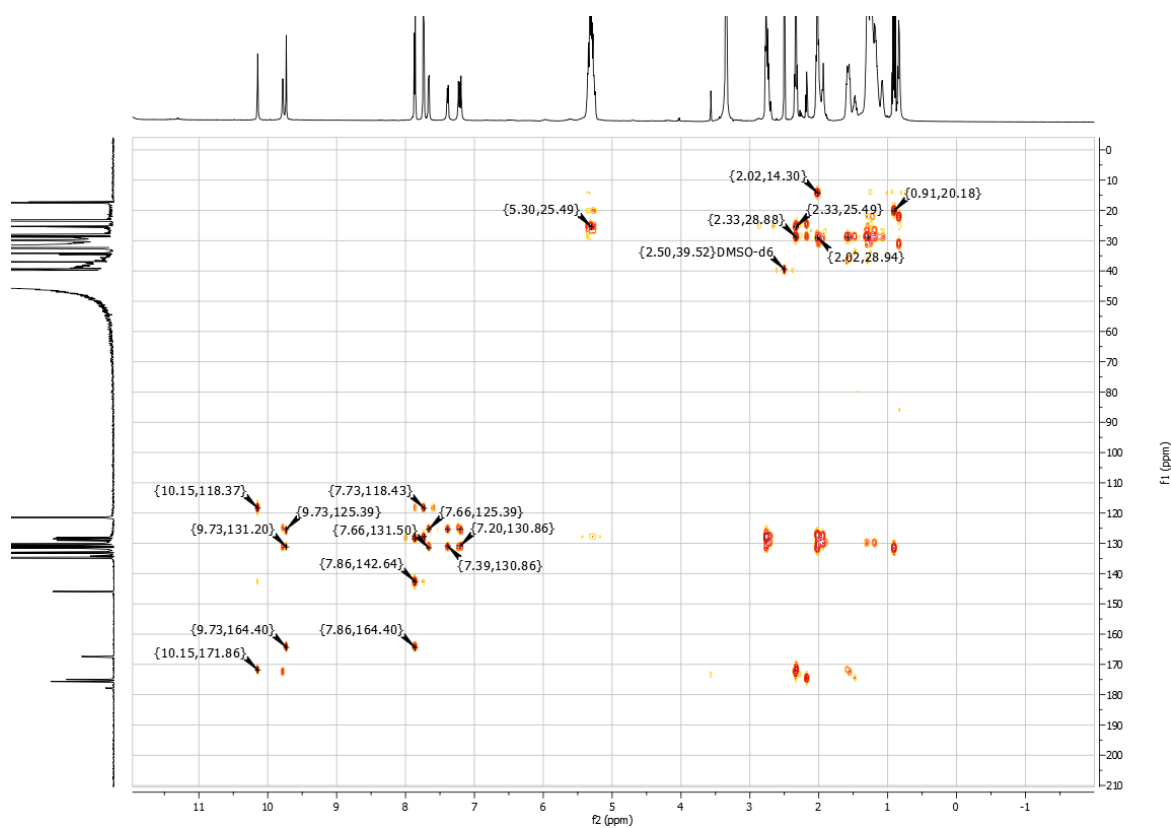


Figura 60. Espectro de IV (KBr) do composto **(17)**.