

JULIANA ROMANO LOPES

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
AGENTES REVERSORES DE LATÊNCIA PARA ELIMINAÇÃO DE
RESERVATÓRIOS CELULARES DO HIV**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos
Santos

**ARARAQUARA
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

L864p Lopes, Juliana Romano
Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de
agentes reversores de latência para eliminação de
reservatórios celulares do HIV / Juliana Romano Lopes. –
Araraquara : [s.n.], 2020
188 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. HIV. 2. Fármacos. 3. Epigenética. 4. AIDS (Doença).
5. Inibidores enzimáticos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de agentes reversores de latência para eliminação de reservatórios celulares do HIV"

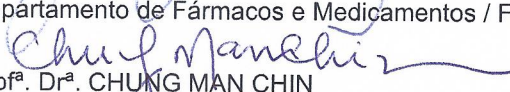
AUTORA: JULIANA ROMANO LOPES

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

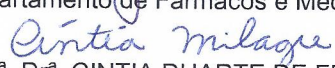
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. CHUNG MAN CHIN

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 10 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Juliana Romano Lopes

Nome em citações bibliográficas: LOPES, J. R.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação em licenciatura em química, pelo Instituto de Química da UNESP de Araraquara – 2018.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos:

LOPES, J. R.; CHIBA, D. E.; CHIN, C.M.; dos SANTOS, J.L. Kick and kill approach: how far are we from HIV cure? **Biochem Pharmacol**, v. 8, ed. 188, 2019.

Apresentação de trabalhos:

Síntese e caracterização estrutural de CI-994 como agente reversor de latência para reservatórios celulares de HIV-1 - XI Congresso Farmacêutico da UNESP e a V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 2ª Escola de Modelagem Molecular (2ª EMMUnesp): 7 a 11 de janeiro de 2019.
- XI Congresso Farmacêutico da UNESP e a V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019.
- Comissão avaliadora do XI Congresso Farmacêutico da UNESP e a V Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019.

ORIENTAÇÕES

Orientação de trabalho de conclusão de curso (TCC) dos alunos: Ana Gabriele de Campos Godoy (bolsista PIBIC-CNPq) e Max Gerlack no ano de 2019-2020.

OUTROS

- Estágio docência na disciplina de “Desenvolvimento de Fármacos” ministrada pelo prof. Dr. Jean Leandro dos Santos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP: 1ª semestre de 2019.
- Estágio docência na disciplina de “Planejamento de Fármacos” ministrada pelo prof. Dr. Jean Leandro dos Santos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP: 2ª semestre de 2019.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo: 132203/2018-9

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

A minha família pelo apoio incondicional.

Ao meu noivo Guilherme, pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, por todo o ensinamento, amizade e apoio.

Aos meus amigos do laboratório, Aline, Bárbara, Beatriz, Diego, Guilherme, Igor, João, Maria, pelo companheirismo, apoio e ensinamentos.

Aos meus alunos de TCC que tive o prazer de orientar, Max e Ana, pela amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos de graduação Lucas, Ricardo, Ailton e Rafaela, pelos ensinamentos, amizade e apoio durante todo o processo do mestrado.

Resumo

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Estimativas para o ano de 2018 apontavam que cerca 37,9 milhões de pessoas viviam com HIV no mundo naquele ano. Até o presente momento, a infecção pelo vírus HIV-1 se mantém incurável. A terapia antirretroviral altamente ativa (TARV), embora altamente efetiva na redução da carga viral, não implica na eliminação do vírus, uma vez que o HIV permanece em um estado latente em células T CD4⁺ e pode ser reativado com a interrupção do tratamento. A estratégia “*kick-and-kill*” ou “*shock-and-kill*” visa induzir a replicação do vírus nos reservatórios latentes por meio de agentes reversores de latência (LARs). Assim, as células infectadas poderiam ser eliminadas através de efeitos citopáticos decorrentes da infecção e da resposta imunológica, ou por meio da associação de compostos que induzam a eliminação do vírus reativado (“*kill agents*”). A combinação dessa nova estratégia com a TARV impede que o vírus reativado consiga infectar células saudáveis, podendo ser um novo caminho a ser explorado para a eliminação dos reservatórios latentes de HIV. Inibidores de histona deacetilase (HDAC) e bromodomínios (BRD) têm sido relatados como promissores agentes reversores de latência. Neste trabalho, utilizando ferramentas de modificação molecular, oito compostos promissores foram planejados. Dos oito, seis compostos finais foram sintetizados e avaliados frente HDAC classe I e BRD4, destacando-se dois mais promissores por sua atividade dual HDAC/BRD4 que serão posteriormente avaliados dentro da estratégia *kick-and-kill*. Os resultados deste trabalho podem levar ao desenvolvimento de novos agentes reversores de latência e contribuir com a continuidade dos estudos da estratégia.

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

Abstract

The human immunodeficiency virus (HIV) is the cause of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Estimates for the 2018 year suggested that about 37,9 millions of people lived with HIV worldwide. Until the present moment, the HIV infection remains incurable. The continuous treatment with Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), although highly effective in reduction of viral load, does not imply in the elimination of virus, once the virus HIV remains in a latent state in CD4⁺ T cells and can be reactivated after interruption of the treatment. The “kick-and-kill” or “shock-and-kill” strategy aims to induce the replication of virus in the latent reservoirs by Latency Reversal Agents (LRAs), for posterior elimination of these infected cells through cytopathic effects due to infection and host immunological response, or through association with compounds that induce the elimination of reactivated virus (kill agents). The combination of this new strategy with HAART prevents the reactivated virus to infected healthy cells and could be a new approach to exhaust and eliminate latent reservoirs of HIV. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) and bromodomain inhibitors (BRDi) have been related as promising LRAs. In this work, using molecular modification tools, eight promising compounds were planned. Of the eight, six final compounds were synthesized and evaluated against HDAC class I and BRD4, with two more promising for their dual HDAC/BRD4 activity, which will later be evaluated within the kick-and-kill strategy. The results of this work can lead to the development of new latency reversal agents and contribute to the continuity of the strategy studies.

Keywords: HIV, “kick-and-kill”, latency reversal agents.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo viral e tratamento com terapia antirretroviral (TARV).....	18
Figura 2. Representação da estratégia "kick-and-kill"	21
Figura 3. Vorinostat e panobinostat.....	23
Figura 4. JQ1.....	25
Figura 5. Modo de ligação do composto isoxazólico em BRD4 obtido por cristalografia de raios-X	27
Figura 6. Otimização do composto CI-994 para obtenção de um inibidor seletivo HDAC-1 e HDAC-2	28
Figura 7. Estrutura do composto BRD3308.....	29
Figura 8. Sobreposição das estruturas cristalinas de HDAC-2 (roxo) e HDAC-3 (marrom) usando o software Maestro.....	29
Figura 9. Planejamento da estrutura geral para inibição dual de BRD-4/HDAC	31
Figura 10. Etapas sintéticas para a obtenção dos compostos finais derivados da série acetamida: (4), (9), (12) e (15).....	35
Figura 11. Etapas sintéticas para a obtenção dos compostos finais derivados da série isoxazol: (20), (23), (25) e (27).....	36
Figura 12. Etapa sintética para a obtenção de (2).....	37
Figura 13. Etapa sintética para obtenção de (6).....	38
Figura 14. Etapa sintética para obtenção de (8), (11), (15) e (27).	39
Figura 15. Etapa sintética para obtenção de (17).....	40
Figura 16. Etapa sintética para obtenção de (19).....	41
Figura 17. Etapa sintética para obtenção de (7), (10), (18), (23) e (25).....	42
Figura 18. Etapa sintética para obtenção de (4), (9), (12), (20), (22) e (24).....	43
Figura 19. Etapa sintética para obtenção de (14) e (26).....	44
Figura 20. Etapa sintética para obtenção de (9), (12), (23) e (25).	45
Figura 21. Substituições bioisostéricas realizadas para estudo por ancoragem molecular	48
Figura 22. Série de compostos e diferentes substituições realizadas no anel aromático na posição p-amino.	49

Figura 23. Interações dos substituintes tiofeno (a) e 3,5-dimetil-isoxazol (b) na posição p-amino do anel aromático ocupando a cavidade adicional de 14 Å de HDAC-2.....	51
Figura 24. Ancoragem molecular do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida contra HDAC-2.....	52
Figura 25. Interações com o BRD4 entre duas moléculas derivadas da série isoxazol (a) e série acetamida (b).....	53
Figura 26. Esquema das etapas sintéticas para os compostos (4), (9), (12) e (14). ...	56
Figura 27. Reação de formação de amida com uso de agente acoplante (EDC)	58
Figura 28. Reação de formação de amida com uso de acoplante (HATU)	59
Figura 29. Esquema das etapas sintéticas para os compostos finais (20) e (26).	67
Figura 30. Esquema das etapas sintéticas para os compostos finais (23) e (25).	68
Figura 31. Mecanismo do acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.....	72
Figura 32. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato	89
Figura 33. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato.	90
Figura 34. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	92
Figura 35. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto terc-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	93
Figura 36. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.	95
Figura 37. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.	96
Figura 38. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.....	97
Figura 39. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.....	98
Figura 40. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto ácido 4-acetamidobenzóico.	100
Figura 41. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto ácido 4-acetamidobenzóico.	101
Figura 42. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto metil-4-iodobenzoato. ...	103
Figura 43. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto metil-4-iodobenzoato.	104

Figura 44. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila.	106
Figura 45. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila.....	107
Figura 46. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico	109
Figura 47. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico.	110
Figura 48. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato.....	112
Figura 49. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato.	113
Figura 50. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	115
Figura 51. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto tert-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.....	116
Figura 52. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato	118
Figura 53. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato	119
Figura 54. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato.....	120
Figura 55. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato	121
Figura 56. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	123
Figura 57. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	124
Figura 58. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	125
Figura 59. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	126
Figura 60. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	128
Figura 61. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.	129

Figura 62. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.	130
Figura 63. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.	131
Figura 64. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 300 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	133
Figura 65. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	134
Figura 66. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	135
Figura 67. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	136
Figura 68. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	138
Figura 69. RMN de ¹³ C (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	139
Figura 70. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	140
Figura 71. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	141
Figura 72. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.	143
Figura 73. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.	144
Figura 74. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	146
Figura 75. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.	147
Figura 76. RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato.	149
Figura 77. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato.	150
Figura 78. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato. ..	151
Figura 79. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato. ..	152

Figura 80. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	154
Figura 81. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	155
Figura 82. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	156
Figura 83. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	157
Figura 84. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)	158
Figura 85. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	160
Figura 86. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	161
Figura 87. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	162
Figura 88. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	163
Figura 89. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9)	164
Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	166
Figura 91. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	167
Figura 92. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	168
Figura 93. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	169
Figura 94. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)	170
Figura 95. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20)	172
Figura 96. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20)	173
Figura 97. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20)	174

Figura 98. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).....	175
Figura 99. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).	176
Figura 100. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	178
Figura 101. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	179
Figura 102. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	180
Figura 103. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	181
Figura 104. Espectro de IV (KBr) do composto composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).	182
Figura 105. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)	184
Figura 106. RMN de ¹³ C (APT) (DMSO-d ₆ , 150 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25).....	185
Figura 107. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)	186
Figura 108. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d ₆ , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)	187
Figura 109. Espectro de IV (KBr) do composto N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).....	188

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 HIV e AIDS: epidemiologia	16
1.2 A Infecção por HIV e o tratamento atual	17
1.3 Reservatório latente de HIV e a estratégia de “kick-and-kill”	19
1.4 Inibidores de histona deacetilase (HDACi) como ARLs	21
1.5 Inibidores de bromodomínios como ARL	24
1.6 Efeitos sinérgicos entre ARLs	25
1.7 Planejamento estrutural dos compostos	26
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Planejamento estrutural	31
3.2 Modelagem molecular	32
3.3 Métodos de purificação	33
Biotage® Isolera™	33
Coluna de bancada	33
3.4 Identificação e Caracterização estrutural	33
3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	33
3.4.2 Determinação da faixa de fusão	33
3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	33
3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	34
3.5 Metodologia sintética	34
3.4.1 Síntese do ácido-4-acetamidobenzóico - (2)	37
3.4.2 Síntese do terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato - (6)	37
3.4.3 Síntese dos compostos (8), (11), (15) e (27)	38
3.4.4 Síntese do 4-metil-iodo benzoato (17)	40
3.4.5 Síntese do ácido-4(-3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico - (19)	40
3.4.6 Síntese dos compostos (7), (10), (18), (23) e (25) (adaptado de GAO <i>et al.</i> , 2017)	41
3.4.7 Síntese dos compostos (4), (9), (12), (20), (22) e (24) (adaptado de (THOMAS <i>et al.</i> , 2008; HOLSON <i>et al.</i> , 2013)	43
3.4.8 Síntese dos compostos (14) e (26) (adaptado de WAGNER <i>et al.</i> , 2016)	44
3.4.9	45
Síntese dos compostos (9), (12), (23) e (25)	45

3.6 Ensaios de inibição enzimática	46
3.5.1 Condições experimentais e análise dos dados para o ensaio de inibição de HDAC	46
3.5.2 Condições experimentais e análise dos dados para o ensaio de inibição de bromodomínio-4 (BRD-4)	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Ancoragem molecular	48
4.2.1 Estudo de ancoragem molecular frente HDAC	50
4.2.2 Estudo de ancoragem molecular frente BRD-4	52
4.2 Síntese e caracterização dos compostos finais	55
4.3.1 Síntese e caracterização dos compostos finais série acetamida (4), (9), (12)	56
4.3.2 Síntese e caracterização dos compostos finais da série isoxazol (20), (23), (25). ...	67
4.4 Avaliação enzimática dos compostos finais.....	78
5. CONCLUSÃO	83
6. REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS SINTÉTICOS.....	88
i) terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato	88
ii) Terc-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	91
iii) Terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato	94
iv) Ácido-4-acetamidobenzóico	99
v) 4-metil-iodo benzoato.....	102
vi) 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila.....	105
vii) ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico	108
viii) tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato	111
ix) tert-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	114
x) Tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	117
xi) Tert-butil (2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	122
xii) 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida	127
xiii) 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.....	132
xix) tert-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	137
xx) tert-butil(2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-(3,5 dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato	142
xxi) tert-butil(2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato	145
xxii) tert-butil(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato	148
APÊNDICE B - CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FINAIS	153
i) 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida - (4)	153
ii) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida - (9)	159
iii) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida - (12).....	165
iv) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida - (20).....	171
N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida - (23).....	177
v)	177
vi) N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida - (25)	183

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIV e AIDS: epidemiologia

A infecção pelo vírus HIV-1, agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS), é ainda uma epidemia mundial de grande preocupação para a Saúde Pública. De acordo com os dados da UNAIDS (2019), estimou-se que em 2018, cerca de 37,9 milhões de pessoas viviam com o vírus e 1,7 milhões de novos casos de infecção tenham ocorrido. Desde o início da epidemia até o ano de 2018, aproximadamente 32 milhões de pessoas morreram em decorrência de causas relacionadas à AIDS. Com o advento da terapia antirretroviral altamente ativa (TARV) as mortes diminuíram em 55% desde 2004, mas somente no ano de 2018, 770 mil pessoas morreram por causas associadas à AIDS (UNAIDS, 2019).

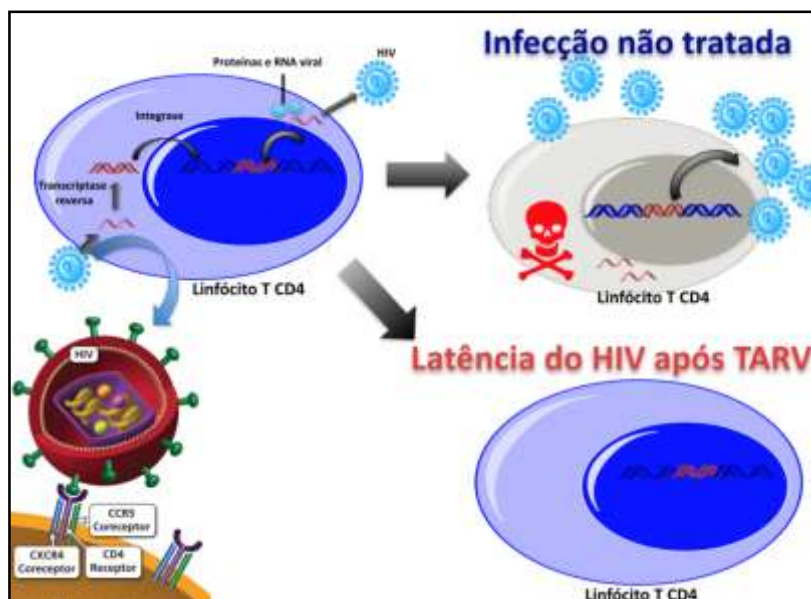
De 2007 até junho de 2019, foram notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 300.496 casos de infecção por HIV no Brasil e apenas em 2018, foram notificados 43.941 novos casos de infecção e 37.161 casos de AIDS. Ainda em 2018, foram registrados no SIM (Sistema de Informação sobre Mortalidade) 10.990 mortes por causas decorrentes à AIDS no Brasil. A maioria dos casos de infecção (52,7 %) encontram-se na faixa etária de 20 a 34 anos. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

Os dados epidemiológicos mostram que a infecção por HIV ainda é numerosa em todo o mundo. Em países subdesenvolvidos como os do leste e sul da África existem aproximadamente 20,6 milhões de pessoas vivendo com HIV, representando mais da metade dos casos mundiais de infecção pelo vírus (UNAIDS, 2019). Ao redor do globo, estima-se que exista 8,1 milhões de pessoas que desconhecem que são infectadas pelo vírus HIV. Apesar da eficácia do tratamento no controle da infecção, no ano de 2018 apenas 23,3 milhões de pessoas tiveram acesso a TARV, um número ainda muito baixo perto do atual cenário de casos mundiais (UNAIDS, 2019).

1.2 A Infecção por HIV e o tratamento atual

O vírus HIV é um retrovírus capaz de infectar preferencialmente linfócitos T CD4+, uma vez que essas células apresentam um receptor primário CD4 capaz de ser reconhecido através de interações moleculares pelas glicoproteínas do envelope viral, como a gp120 e gp41 (DEEKS *et al.*, 2015). Através de co-receptores, denominados de CXCR4, expresso em células T e/ou CCR5 expresso em células como macrófagos e dendríticas, o vírus consegue entrar na célula hospedeira por um processo de fusão. Após esse processo, todo o conteúdo do envelope viral é inserido na célula hospedeira, incluindo o material genético do vírus e as proteínas necessárias para sua replicação. Após adentrar a célula hospedeira, o processo de transcrição reversa é iniciado pela enzima viral transcriptase reversa, que transforma a fita simples de RNA viral em uma fita simples de DNA, posteriormente convertida em uma fita dupla. A fita dupla de DNA pró-viral é transportada até o núcleo celular e inserida ao DNA da célula hospedeira através da enzima viral integrase (Figura 1). O DNA pró-viral é convertido em RNA mensageiro e RNA genômico pela ação da enzima humana RNA polimerase. O RNA mensageiro é traduzido gerando uma cadeia polipeptídica de alta massa molecular, que sofre um processo de clivagem pela enzima viral denominada protease levando a formação de proteínas menores e funcionais (DEEKS *et al.*, 2015). Com a formação das proteínas essenciais e do RNA genômico viral, a formação da membrana lipídica do vírus (envelope) ocorre na superfície da membrana da célula hospedeira. Com isso, novos vírions são formados e liberados da célula através de brotamento (DEEKS *et al.*, 2015) e a infecção pelo vírus se sustenta até uma possível intervenção terapêutica futura.

Figura 1. Ciclo viral e tratamento com terapia antirretroviral (TARV).



Fonte: autoria própria.

Até o presente momento não há cura para os indivíduos infectados pelo vírus. A TARV é capaz de inibir diferentes etapas do ciclo de vida do vírus impedindo a propagação da infecção, mas não apresenta capacidade de eliminar o vírus. O tratamento medicamentoso é altamente eficaz uma vez que seja realizado de maneira interrupta, ao longo de toda a vida do paciente (DEEKS *et al.*, 2015; DAVEY *et al.*, 1999).

Com a comprovação da eficácia no tratamento do HIV-1 pela zidovudina (AZT) (FISCHL *et al.*, 1987), um potente inibidor de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo, outros antirretrovirais foram desenvolvidos. Até o presente momento é estimado cerca de trinta tipos de fármacos aprovados que atuam em diferentes etapas do ciclo de vida do vírus (ZHAN, 2016; DEEKS *et al.*, 2015). Os inibidores de transcriptase reversa atuam bloqueando a etapa de transcriptase reversa do vírus e impedindo a síntese de DNA viral, sendo constituídos por duas classes: os análogos de nucleosídeo, como tenofovir e lamivudina e não-nucleosídicos como nevirapina e rilpivirina (DEEKS *et al.*, 2015). Os não-nucleosídicos inibem a enzima transcriptase reversa, enquanto os nucleosídicos são incorporados ao genoma do vírus e bloqueiam a síntese de DNA viral (DEEKS *et al.*, 2015). Apesar da grande importância do AZT para o desenvolvimento de novos inibidores de transcriptase reversa, seu uso foi

associado a diferentes e severas complicações como anemia, esteatose hepática e lipoatrofia, não sendo mais utilizado para o tratamento de HIV (DEEKS *et al.*, 2015).

Os inibidores de fusão impedem a entrada do vírus na célula hospedeira, tendo como exemplo o fármaco maraviroc que atua interagindo com o receptor CCR5 evitando o processo de fusão por vírus que reconhecem esse co-receptor (DEEKS *et al.*, 2015). Os inibidores de integrase impedem que o genoma do vírus integre o DNA da célula hospedeira, como os fármacos dolutegravir, raltegravir e eltegravir (DEEKS *et al.*, 2015). Os inibidores de protease bloqueiam a etapa final do ciclo de vida do vírus impedindo a formação de proteínas essenciais para os novos vírions, como os fármacos darunavir e atazanavir (DEEKS *et al.*, 2015).

A TARV utiliza um esquema terapêutico combinado (em inglês highly active antiretroviral combination therapy – HAART), geralmente consistindo na associação de dois inibidores de transcriptase reversa e um inibidor de protease ou dois inibidores de transcriptase reversa e um inibidor de integrase (DEEKS *et al.*, 2015; CIHLAR; FORDYCE, 2016; YENI, 2006). A associação de fármacos é potente frente a infecção por HIV e permite uma melhor recuperação do sistema imune (DEEKS *et al.*, 2015; YENI, 2006). A TARV leva à supressão do vírus e reduz sua quantidade no plasma abaixo do limite de detecção, mas a interrupção do tratamento leva ao ressurgimento da replicação viral detectável, uma vez que esses fármacos não afetam o reservatório latente de HIV que persiste em algumas células (DEEKS *et al.*, 2012; SILICIANO *et al.*, 2003). Além disso, as implicações resultantes do uso prolongado desses medicamentos, como o surgimento de cepas de HIV resistentes aos fármacos disponíveis e os efeitos adversos provocados nos pacientes (ZHAN *et al.*, 2016), reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias mais efetivas e duradouras contra o vírus.

1.3 Reservatório latente de HIV e a estratégia de “kick-and-kill”

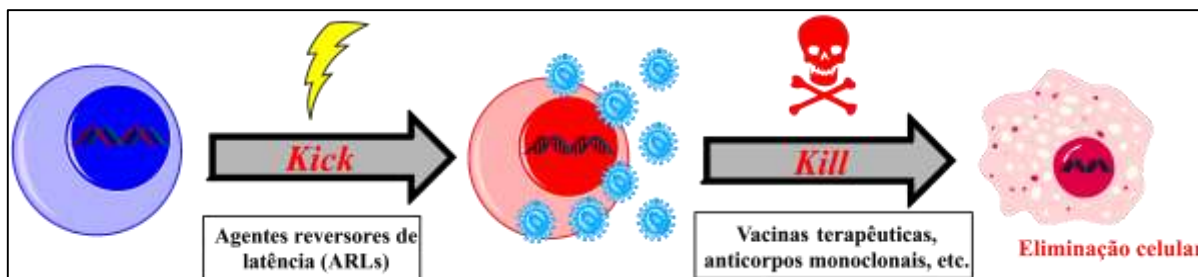
Células T CD4+ ativadas infectadas pelo vírus HIV sofrem processos apoptóticos associados aos efeitos citopáticos do HIV. Dessa forma, a maioria dessas células acabam sendo eliminadas no decorrer da infecção. Mas, uma pequena quantidade de células T CD4+ infectadas que não foram eliminadas se reverterem a um estado desativado persistindo como células de memória, um mecanismo natural pelo

qual os linfócitos T ativados passam (DEEKS, 2012; SILICIANO, 2011). As células T CD4+ de memória carregam o genoma do vírus integrado e contribuem com o estado de latência do HIV, uma vez que o vírus latente não consegue expressar suas proteínas virais e permanece transcricionalmente silenciado (DEEKS, 2012; SILICIANO, 2011). Desta forma, o HIV latente se encontra invisível frente ao sistema imune e nenhuma abordagem terapêutica disponível comercialmente é capaz de reconhecer e eliminar seletivamente células que abrigam o vírus latente (SILICIANO, 2011). Uma vez que o reservatório latente foi estabelecido, essas células podem tornar-se uma nova fonte de infecção viral caso o paciente pare de fazer o tratamento com os medicamentos antirretrovirais. Além disso, células T CD4+ de memória podem perdurar como células de longa duração ou expandirem-se através de mecanismos homeostáticos (DEEKS *et al.*, 2012; FINZI *et al.*, 1999), levando a uma taxa de decaimento muito lenta, estimando-se que sejam necessários mais de 60 anos de tratamento com antirretrovirais para que as células do reservatório sejam erradicadas naturalmente (FINZI *et al.*, 1999; SILICIANO, 2003). Dessa forma, o reservatório latente é estabelecido mesmo em pacientes que fazem tratamento contínuo com a TARV (FINZI *et al.*, 1997) sendo, portanto, a principal barreira para promover a total eliminação do vírus e erradicar a infecção (SILICIANO, 2011).

A latência do vírus HIV é mantida através da contribuição individual de complexos mecanismos, sendo o mais bem compreendidos: a) interferência e/ou repressão transcricional, b) silenciamento epigenético e c) níveis insuficientes de fatores de transcrição (CARY *et al.*, 2016; SILICIANO, 2011). Compostos capazes de interferir nos mecanismos de manutenção da latência de HIV podem levar a reativação do vírus nessas células, fazendo com que o estado de latência seja rompido. Novas estratégias que visam a erradicação do vírus HIV têm como objetivo o esgotamento do reservatório latente nas células, como a estratégia denominada “*kick-and-kill*” ou “*shock-and-kill*”. Nessa abordagem, compostos chamados de Agentes Reversores de Latência (ARLs), são capazes de reativar o vírus do estado latente e promover a replicação viral. Uma vez reativado, o vírus se torna um alvo potencial de reconhecimento e eliminação. Com a reativação total do reservatório, a segunda etapa da estratégia, “*kill*”, objetiva a eliminação das células ou por efeitos citopáticos causados pelo HIV, ou através da ativação do sistema imunológico do indivíduo ou pelo uso de abordagens como anticorpos monoclonais e/ou vacinas terapêuticas

(DEEKS, 2012; CILLO; MELLORS, 2016; KIM *et al.*, 2018). O uso contínuo da TARV em combinação com a abordagem de “kick-and-kill” impede que as células saudáveis do paciente sejam infectadas com o HIV reativado.

Figura 2. Representação da estratégia “kick-and-kill”. Na ilustração, o vírus HIV-1 latente é reativado por agentes reversores de latência. As células reativadas são destruídas: a) pelo próprio sistema imune do paciente; b) pela TARV para eliminação da forma livre, ou; c) por ação citotóxica da infecção; d) por ação de abordagens como vacinas terapêuticas, anticorpos neutralizantes, entre outros.



Fonte: autoria própria.

A combinação de agentes citotóxicos, atuando especificamente como “kill agents”, na presença de agentes reversores de latência potentes pode ser uma melhor estratégia para a eliminação do reservatório latente, uma vez que para a abordagem ser eficiente, não apenas a reativação dos reservatórios deve ser levada em consideração, mas também, a depleção total dessas células que agora possuem o vírus reativado (THORLUND, 2017).

Diferentes compostos com capacidade de reativar o HIV latente já foram relatados na literatura, sendo as classes de compostos mais bem estabelecidas os: inibidores de histona deacetilase (HDACi), inibidores de bromodomínio (BRDi) e agonistas de proteína quinase C (PKC) (XING; SILICIANO, 2013).

1.4 Inibidores de histona deacetilase (HDACi) como ARLs

Um dos mecanismos responsáveis pela manutenção da latência do HIV está envolvido com modificações epigenéticas na cromatina. A unidade básica da cromatina, as histonas, podem sofrer processos de remodelamento através de diferentes proteínas como: a) “escritoras”, capazes de realizar modificações covalentes nas histonas; b) “apagadoras”, responsáveis por removerem as modificações covalentes realizadas pelos “escritores”; e c) “leitoras”, proteínas

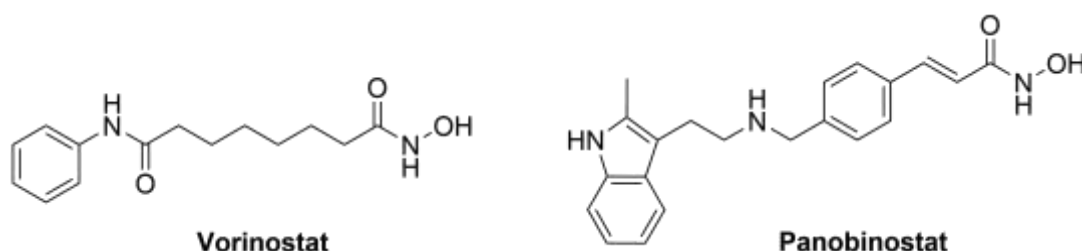
capazes de reconhecer as histonas, sem causar nenhuma modificação em sua estrutura (CARLINO; RASTELLI, 2016). As histonas deacetilases (HDAC), caracterizadas como “apagadoras”, são enzimas que atuam através da remoção do grupo acetil dos resíduos de lisina acetilados na cauda das histonas. As HDAC estão divididas em grupos baseados em sua homologia, e são classificados em: classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8), classe II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10), classe III (SIRT1-7) e classe IV (HDAC 11). Estas classes se diferem essencialmente por apresentarem zinco-dependência (HDAC de classe 1, 2 e 4) ou NAD-dependência (HDAC de classe III) (ANNEMIEKE *et al.*, 2003). A hiperacetilação das histonas é relatada como sendo um fator fundamental para a reativação do HIV latente, uma vez que a presença das HDACs contribui para a repressão transcricional. Com a inibição das HDAC, as histonas acetiltransferases (HATs) responsáveis por acetilar resíduos de lisinas específicos nas histonas promovem um estado relaxado da cromatina e levam a ativação da transcrição do HIV latente, permitindo sua reativação (VAN LINT *et al.*, 1996; XING, SILICIANO, 2013).

Diferentes estudos foram realizados com o objetivo de investigar a capacidade de inibidores de HDAC em reativar o vírus HIV latente em modelos celulares de latência e células T CD4+ isoladas de pacientes infectados por HIV e em tratamento contínuo com a TARV (XING, SILICIANO, 2013). Vorinostat e panobinostat, dois HDACi comercialmente disponíveis para o tratamento de tipos linhagens de câncer, foram estudados *in vivo* para avaliação da capacidade de reativação do HIV latente em pacientes infectados. Archin e colaboradores (2017), demonstraram a capacidade do vorinostat (Figura 3), um inibidor de HDAC classe I, II e IV, em induzir a expressão de RNA viral quando testado em células T CD4+ latentes de pacientes com HIV. Durante o estudo, 16 participantes foram selecionados para a etapa de estudo *ex vivo* e posteriormente 12 participantes do grupo original foram selecionados para o estudo clínico, inicialmente recebendo uma dose única de vorinostat (400mg). Nos estudos posteriores, os participantes selecionados foram submetidos a duas doses de vorinostat em intervalos de tempo de 48 ou 72 horas e ao final do estudo foram submetidos a 10 doses de vorinostat em intervalos de 72 horas. Apesar dos resultados positivos quanto a reversão da latência do vírus HIV-1 na maioria dos pacientes, os autores não relataram a eliminação de células do reservatório latente sugerindo que

estratégias adicionais de “kill” podem ser necessárias para a depleção de HIV latente. (ARCHIN *et al.*, 2017).

Panobinostat (Figura 3), um inibidor não seletivo de HDAC, foi testado em 15 pacientes sem a interrupção da terapia antirretroviral (RASMUSSEN *et al.*, 2014). Após 8 semanas de tratamento, os pesquisadores demonstraram um aumento na transcrição do HIV e detecção de RNA-HIV no plasma, confirmando a eficácia do composto em ativar o vírus latente. A eliminação de células do reservatório latente também não foi relatada nesse estudo, sugerindo que apenas a reativação do vírus não foi suficiente para provocar sua morte por reconhecimento imune de células CD8. Os pesquisadores ainda sugerem que uma reativação mais potente do vírus latente poderia, possivelmente, auxiliar em uma melhor resposta imunológica para eliminação do reservatório latente (RASMUSSEN *et al.*, 2014).

Figura 3. Vorinostat e panobinostat inibidores não seletivos de HDAC testados *in vivo* frente a estratégia de “kick-and-kill”



Archin e colaboradores (2009) investigaram a capacidade de inibidores seletivos de HDAC em reativar o HIV latente em modelos celulares de latência e em células T CD4⁺ isoladas de pacientes infectados por HIV. Os inibidores de HDAC classe I, especificamente, HDACs 1, 2, e 3 são capazes de induzir a reativação da latência de maneira eficiente quando comparados aos inibidores de HDAC classe II (ARCHIN *et al.*, 2009). A contribuição isolada de HDAC 1, 2 e 3 na regulação da transcrição de HIV foi estudada em modelos celulares de latência (BARTON *et al.*, 2014; KEEDY *et al.*, 2009). Inibidores seletivos de HDAC 1 e 2 demonstraram uma fraca capacidade em induzir a expressão de HIV latente, enquanto a combinação de inibidores de HDAC 2 e 3 favorecem uma potente reativação dos reservatórios (BARTON *et al.*, 2014; KEEDY *et al.*, 2009). A importância da definição de um alvo terapêutico na estratégia de “kick-and-kill” é de grande relevância, uma vez que uma inibição não seletiva das enzimas HDACs pode acarretar em citotoxicidade para a

célula hospedeira e efeitos adversos para o paciente (KEEDY *et al.*, 2009), o que justifica a importância do estudo de potentes inibidores de HDAC classe I com maior seletividade para HDAC 2 e 3, para aplicação como novos ARL.

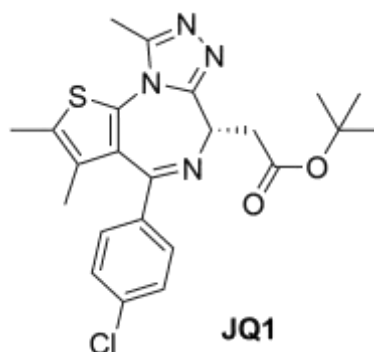
1.5 Inibidores de bromodomínios como ARL

Bromodomínios são uma família de domínios proteicos identificados no gene *brahma* de *Drosophila melanogaster*, sendo agrupados dentro de oito famílias contendo 61 bromodomínios de 46 proteínas diferentes. Proteínas que contêm bromodomínios são capazes de reconhecer resíduos *N*-acetilados de lisina, como os presentes nas caudas das histonas, atuando no remodelamento e no controle transcricional da cromatina; e possuem relação com o desenvolvimento de diferentes doenças como câncer, inflamações e infecções virais (FILLIPAKOPOULOS; KNAPP, 2014). O bromodomínio 4 (BRD4) pertence à família de bromodomínios extra-terminais (BET), composta por BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT, e atua recrutando um fator de alongamento positivo, do inglês “*positive transcriptional elongation factor complex*” (PTEF-b), responsável por promover a regulação do processo de transcrição pela RNA Polimerase II (RNA Pol II) (LIU *et al.*, 2017). A presença de BRD4 está diretamente relacionada com a manutenção da latência do vírus HIV, uma vez que BRD4 compete com a proteína viral Tat pela ligação com o P-TEFb. A interação BRD4-P-TEFb resulta na repressão da transativação mediada por Tat. A proteína Tat é responsável por recrutar um complexo de super alongamento (SEC) para estimular a RNA polimerase II e gerar a produção de transcritos completos de HIV. P-TEFb e ELL2 são os dois fatores de alongamento presentes no SEC, que atuam por mecanismos diferentes. A interação de BRD4 com P-TEFb é necessária para a expressão de vários genes celulares e bloqueia de forma competitiva a interação Tat-SEC, impedindo a reativação da latência do vírus (YANG *et al.*, 2005); LI *et al.*, 2013). Inibidores de BRD4 podem atuar como agentes reversores de latência uma vez que favorecem a interação Tat-P-TEFb, contribuindo com a reativação do vírus latente.

Pesquisas iniciais (BANERJEE *et al.*, 2012; BOEHM *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013) demonstram o potencial de inibidores de BRD4 em induzir a expressão de HIV latente, como em estudos envolvendo o uso do composto JQ1 (Figura 4), um inibidor de BET, que apresentou resultados positivos quanto a capacidade em induzir o vírus latente

em modelos de células T primárias latentes. (BANERJEE *et al.*, 2012; BOEHM *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013).

Figura 4. JQ1, um inibidor de bromdomínios extra-terminais avaliado em modelos celulares frente a estratégia de “kick-and-kill”.



Fonte: autoria própria.

1.6 Efeitos sinérgicos entre ARLs

A combinação de classes diferentes de ARL é uma estratégia explorada em alguns estudos com o objetivo de alcançar efeitos sinérgicos entre compostos que atuam por mecanismo distintos na reativação da latência, contribuindo para potencializar sua ação e apresentando uma maior capacidade de reativação do vírus HIV. Combinações entre agonistas de PKC e JQ1 ou inibidores de HDAC são relatadas na literatura e sua atuação conjunta apresenta sinergia, exibindo um maior aumento na capacidade de reativação do vírus latente do que quando os compostos foram testados separadamente *ex vivo* (LAIRD *et al.*, 2015). Sabendo da importância do planejamento de novos ARL potentes, utilizou-se da proposta de sinergia entre classes de reversores de latência para desenvolver moléculas híbridas, inibidoras duais de HDAC e BRD4.

A hibridação é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais definidas entre dois compostos bioativos distintos em uma única molécula. Essa estratégia tem sido empregada para obtenção de diversos fármacos disponíveis no mercado e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos (MORPHY; RANKOVIC, 2005; MORPHY; RANKOVIC, 2009). O desenho estrutural, baseado no mecanismo de ação, deve

assegurar à mesma molécula planejada o reconhecimento molecular por dois ou mais alvos terapêuticos, simultaneamente, aumentando a eficiência terapêutica. Uma das vantagens da hibridação molecular, comparada a administração concomitante dos fármacos, é que os compostos híbridos gerados não apresentam as diferenças farmacocinéticas da administração individual, tampouco desencadeiam interações medicamentosas provenientes da associação. Outra vantagem, é que o uso de um único composto minimiza o número de fármacos já utilizados pelo paciente, aspecto extremamente relevante ao paciente vivendo com HIV, já que este se encontra polimedicado e está mais sujeito a interações medicamentosas, reações adversas a medicamentos e a falta de adesão à terapia (BRASIL, 2019).

Considerando a possibilidade de atuação em duas vias distintas de reativação do vírus latente, estruturas duais frente a inibição de HDAC classe I e BRD-4 foram planejadas para posterior síntese e avaliação da capacidade de inibição e reversão de latência em ensaios de avaliação farmacológica.

1.7 Planejamento estrutural dos compostos

Inibidores de Bromodomínio

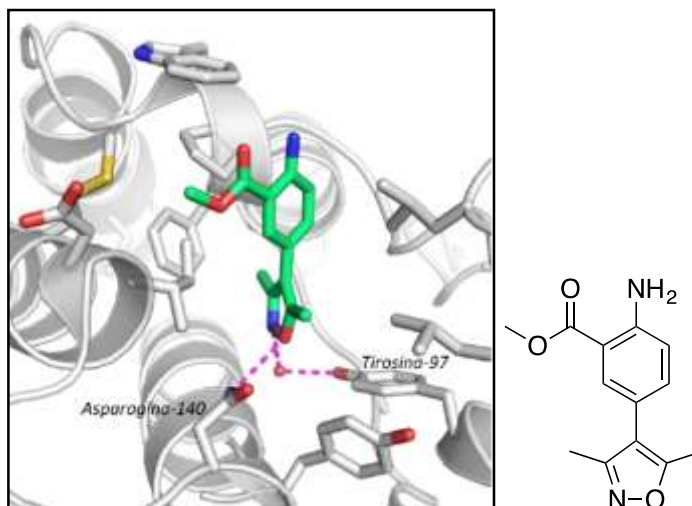
Para o planejamento da série de compostos a serem sintetizados, foi avaliado as possibilidades estruturais que levariam a melhor interação com os alvos desejados: HDAC classe I (HDAC-2 e HDAC-3) e BRD4.

Nos inibidores de BRD4 descritos na literatura, é comum observar subunidades capazes de reconhecer resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima a exemplo da asparagina-140 (ASP-140) e tirosina-97 (TYR-97). Ainda no sítio ativo, também é possível observar moléculas de água conservadas que contribuem com a formação de ligação hidrogênio em seu interior (LIU *et al.*, 2017; HEWINGS *et al.*, 2011).

Derivados contendo a subunidade 3,5-dimetil-isoxazol foram explorados como inibidores de BET em estudos prévios na literatura (HEWINGS *et al.*, 2011). Estudos de triagem virtual realizados em nosso grupo de pesquisa com a colaboração do grupo de Química Medicinal da Universidade de Minnesota levaram a identificação do derivado isoxazólico como padrão estrutural promissor na inibição de BRD4 (resultados não publicados). O derivado foi sintetizado e posteriormente cristalizado

com o BRD-4. Assim, o complexo deste derivado com BRD-4 obtido por cristalografia de raios-X mostrou que a subunidade isoxazol é capaz de realizar ligação de hidrogênio com a asparagina-140 e tirosina-97 (). Posteriormente, a interação com BRD-4 foi avaliada por Fluorimetria de Varredura Diferencial (do inglês: *Differential Scanning Fluorimetry* - DSF) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC). No ensaio de DSF, o derivado isoxazólico foi testado na concentração de 20 μM contra os domínios 1 e 2 presentes nos bromodomínios 3 e 4. Os valores de ΔT_m encontrados foram: 0.8; 0.4; 0.9 e 1.4 para BRD-3(D1), BRD-4(D1), BRD-3(D2) e BRD-4(D2), respectivamente. A constante de dissociação em BRD-4(D1) foi determinada por ITC e mostrou valores de 2.1 μM . A pose obtida apresentou excelente correlação com os dados computacionais apresentando valores de RMSD inferiores a 0,6, validando o modelo computacional. Esses resultados preliminares mostraram que o derivado isoxazólico é um protótipo promissor para o desenvolvimento de novos inibidores de BRD4.

Figura 5. Modo de ligação do composto isoxazólico em BRD4 obtido por cristalografia de raios-X, (resolução de 1,4 Å; Resultados não publicados).



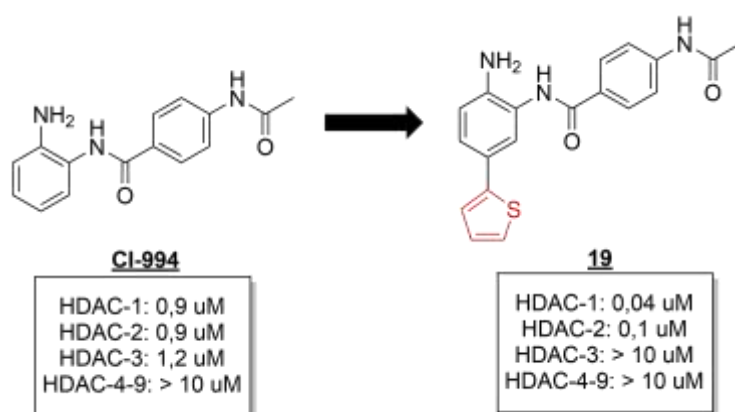
Fonte: autoria própria.

Inibidores de HDAC

Quanto à inibição seletiva de HDAC classe I, do ponto de vista estrutural a classe das o-amino-benzamidas são relatadas como estruturas privilegiadas capazes de interagir com o átomo de zinco (Zn^{2+}) presente no sítio ativo das HDAC-1, 2 e 3 (WAGNER *et al.*, 2013). No estudo de Moradei e colaboradores (2007), os autores

otimizaram a estrutura de um inibidor de HDAC classe I (HDAC-1, 2 e 3), CI-994 (HOLSON; WAGNER; STAHL; 2013) produzindo o composto **19** que contém um substituinte tiofeno na posição *para* em relação ao grupo amino da subunidade 2-amino-benzamida (Figura 6), conferindo assim, maior seletividade para HDAC-1 e 2. A presença do tiofeno permite a ocupação de uma cavidade adicional de 14 Å presente nestas duas isoformas, o que confere seletividade à HDAC -1 e -2 (MORADEI *et al.*, 2007).

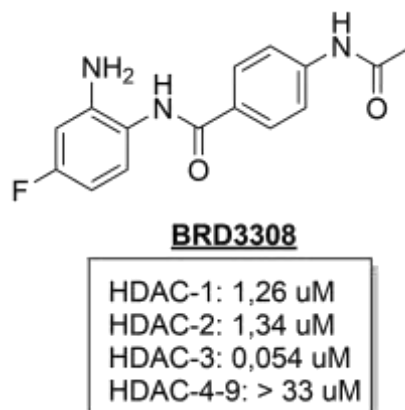
Figura 6. Otimização do composto CI-994 para obtenção de um inibidor seletivo HDAC-1 e HDAC-2. Os valores de IC_{50} obtidos frente a inibição de HDAC são apresentados no quadro em destaque.



Fonte: Autoria própria (Adaptado de MORADEI *et al.*, 2007).

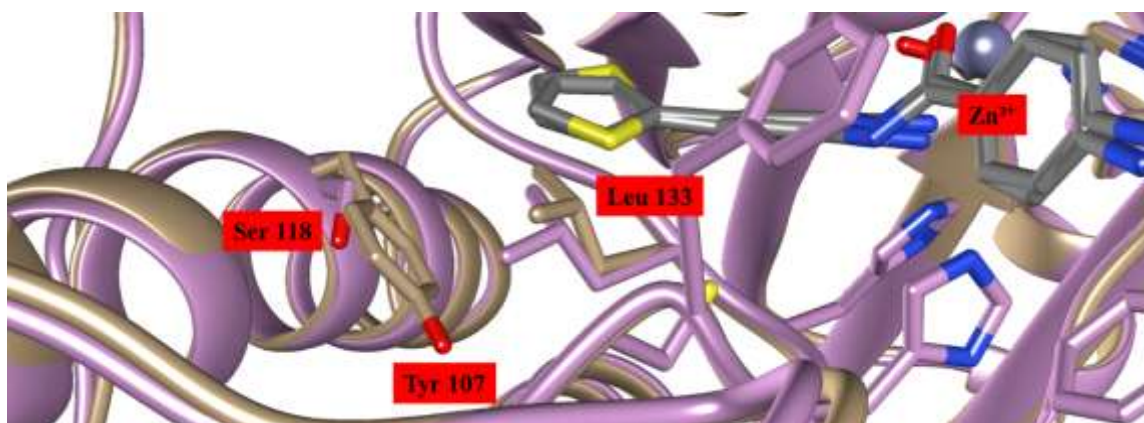
Para a inibição seletiva de HDAC-3, estudos demonstram que substituições por grupos volumosos na posição *p*-amino dificultam uma interação favorável com o sítio da enzima. As HDACs 1, 2 e 3 apresentam 95% de similaridade no sítio ativo, sendo a principal diferença a presença de uma tirosina-107 na HDAC-3 enquanto as HDACs 1 e 2 apresentam uma serina-118 (WAGNER *et al.*, 2015; CAO, ZWINDERMAN, DEKKER, 2018). Essa mudança modifica a cavidade interna de HDAC-3 por impedimento estérico entre os resíduos de aminoácidos, o que faz com que inibidores seletivos de HDAC-3 se limitem a conter em sua estrutura átomos pequenos, como hidrogênio ou flúor nas posições *p*-amino ou *o*-amino (Figura 8) (WAGNER *et al.*, 2015) (CAO, ZWINDERMAN, DEKKER, 2018). Um estudo realizado por Barton e colaboradores (2014) demonstrou a capacidade do composto BRD3308 (Figura 7), um inibidor de HDAC classe I com maior seletividade para HDAC-3, em induzir a expressão de vírus HIV latente em modelos celulares (BARTON *et al.*, 2014).

Figura 7. Estrutura do composto BRD3308 da classe das o-aminoanilidas, um inibidor seletivo de HDAC classe I, com atividade de inibição de HDAC-3.



Fonte: autoria própria.

Figura 8. Sobreposição das estruturas cristalinas de HDAC-2 (roxo) e HDAC-3 (marrom) usando o software Maestro. A mudança de aminoácidos faz com que o sítio ativo de HDAC-3 perca a cavidade de 14 Å presente na HDAC-2 por um efeito de repulsão ocasionado pela Tyr107 e Leu133, tornando o sítio ativo de HDAC-3 mais fechado. Inibidores da classe das o-aminoanilida com grupamentos volumosos na posição p-amino não conseguem ocupar a cavidade de HDAC-3 por uma questão estérica.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, tendo em vista a obtenção de compostos duais a estratégia de hibridação molecular foi empregada combinando fragmentos estruturais capazes de interagir com BRD4 e HDAC classe I, tendo como base inibidores relatados na literatura como a classe das o-amino-benzamidas objetivando explorar uma inibição seletiva para HDAC classe I e a estrutura do 3,5-dimetil-isoxazol para reconhecimento de BRD4.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de inibidores híbridos de bromodominio-4 (BRD4) e de HDAC classe I desenhados como possíveis agentes reversores de latência de HIV para a estratégia de “*kick-and-kill*”.

2.2 Objetivos específicos

- Modelagem molecular utilizando a ancoragem molecular a fim de selecionar os compostos mais promissores planejados como inibidores duais de BRD4 e HDAC classe I.
- Síntese, purificação e caracterização estrutural das moléculas selecionadas.
- Estudo *in vitro* da inibição enzimática de BRD4 afim de determinar os valores de IC₅₀ dos novos análogos selecionados.
- Estudo *in vitro* da inibição enzimática de HDAC afim de determinar os valores de IC₅₀ dos novos análogos selecionados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

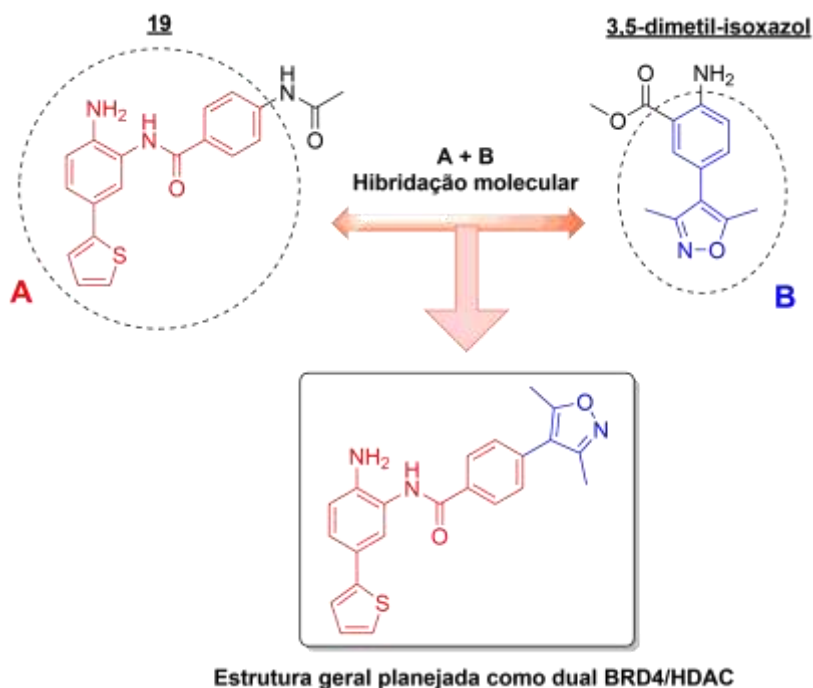
3.1 Planejamento estrutural

Neste trabalho propusemos a hibridação molecular entre inibidores de BRD-4 e inibidores de HDAC classe I, especialmente -2 e -3, visando a obtenção de ARL mais potentes, considerando a possibilidade de sinergia através dos diferentes mecanismos de reativação de latência.

Nesta proposta as séries de compostos planejadas possuem duas regiões específicas (Figura 9), uma para a interação com os bromodomínios (BRD-4) e outra para interação com as HDAC de classe 1, especificamente HDAC-2 ou HDAC-3.

A Figura 9 exemplifica a estratégia adotada visando uma atividade dual pelos compostos envolvendo a conexão entre uma região de derivados de *N*-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (subunidade A; em vermelho) para reconhecimento de HDAC e outra região contendo um grupo 3,5 dimetil-isoxazol (subunidade B; em azul) capaz de interagir com BRD-4.

Figura 9. Planejamento da estrutura geral para inibição dual de BRD-4/HDAC



Fonte: autoria própria.

3.2 Modelagem molecular

Os experimentos de ancoragem molecular foram realizados utilizando o software Maestro® 2018-4 (SCHRÖDINGER, 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.

Para este estudo, as estruturas cristalográficas de BRD-4, HDAC-2 e HDAC-3 foram obtidas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), sob o código 4WIV (MCKEOWN *et al.*, 2014) com resolução de 1,56 Å para BRD-4; 4LY1 com resolução de 1,57 Å para HDAC-2 (LAUFFER *et al.*, 2013) e 4A69 com resolução de 2,06 Å para HDAC-3 (WATSON *et al.*, 2012). As referidas estruturas se apresentam cristalizadas com seus respectivos inibidores, sendo 3P2 para o BRD-4, 20Y para HDAC-2 e IOP para HDAC-3.

As estruturas foram importadas para o software isoladamente e preparadas para o estudo de ancoragem molecular utilizando a função *Protein Preparation Wizard*. O seguinte protocolo foi executado: (i) remoção das moléculas de água (exceto aquelas conservadas presentes no sítio ativo para BRD-4); (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* (SCHRÖDINGER, 2017b), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å. Com a conclusão 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 (SCHRÖDINGER, 2017c).

Para determinar a eficiência de todos os parâmetros utilizados neste estudo, o modelo foi validado por *redocking*, em que os ligantes originais das proteínas foram removidos e seguidamente, ancorados no mesmo sítio enzimático. A qualidade deste 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 (YUSUF *et al.*, 2008).

3.3 Métodos de purificação

Biotage® Isolera™

A purificação dos compostos obtidos foi realizada através de cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™, utilizando a coluna Biotage® SNAP ULTRA 10g (HP-Sphere 25 μm), por um método isocrático com acetato de etila e hexano como eluentes, fluxo de 36 mL/min e detecção no comprimento de onda fixo em 254 nm.

Coluna de bancada

Outro método de purificação empregado foi o uso de cromatografia em coluna de bancada utilizando eluentes como acetato de etila, hexano e éter de petróleo (fase móvel) e sílica flash como fase estacionária. A altura e diâmetro da coluna usados para cada composto foram especificados na seção de Apêndices.

3.4 Identificação e Caracterização estrutural

3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio (AL TLC- Merck®) de sílica-gel 60 F254 para o acompanhamento das reações. A visualização das substâncias foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).

3.4.2 Determinação da faixa de fusão

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

3.4.3 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.

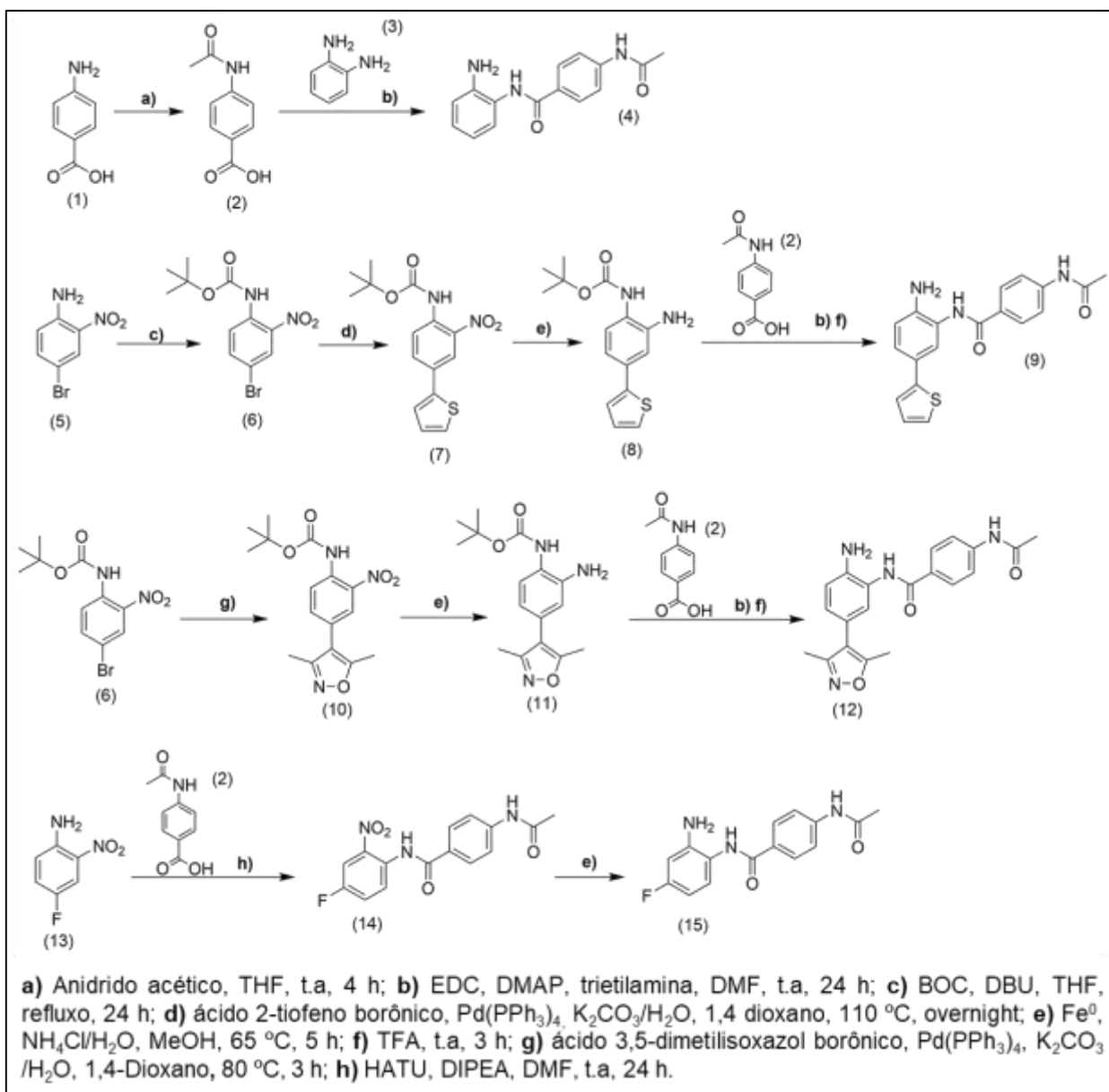
3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (Bruker 600 e Bruker 300, operando a 600 MHz e 300 MHz, respectivamente, para o núcleo de ^1H e TMS como referência interna e a 150 MHz e 75 MHz para ^{13}C) foram realizadas utilizando solvente deuterado (DMSO- d_6 ou acetona- d_6). O equipamento está lotado no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.5 Metodologia sintética

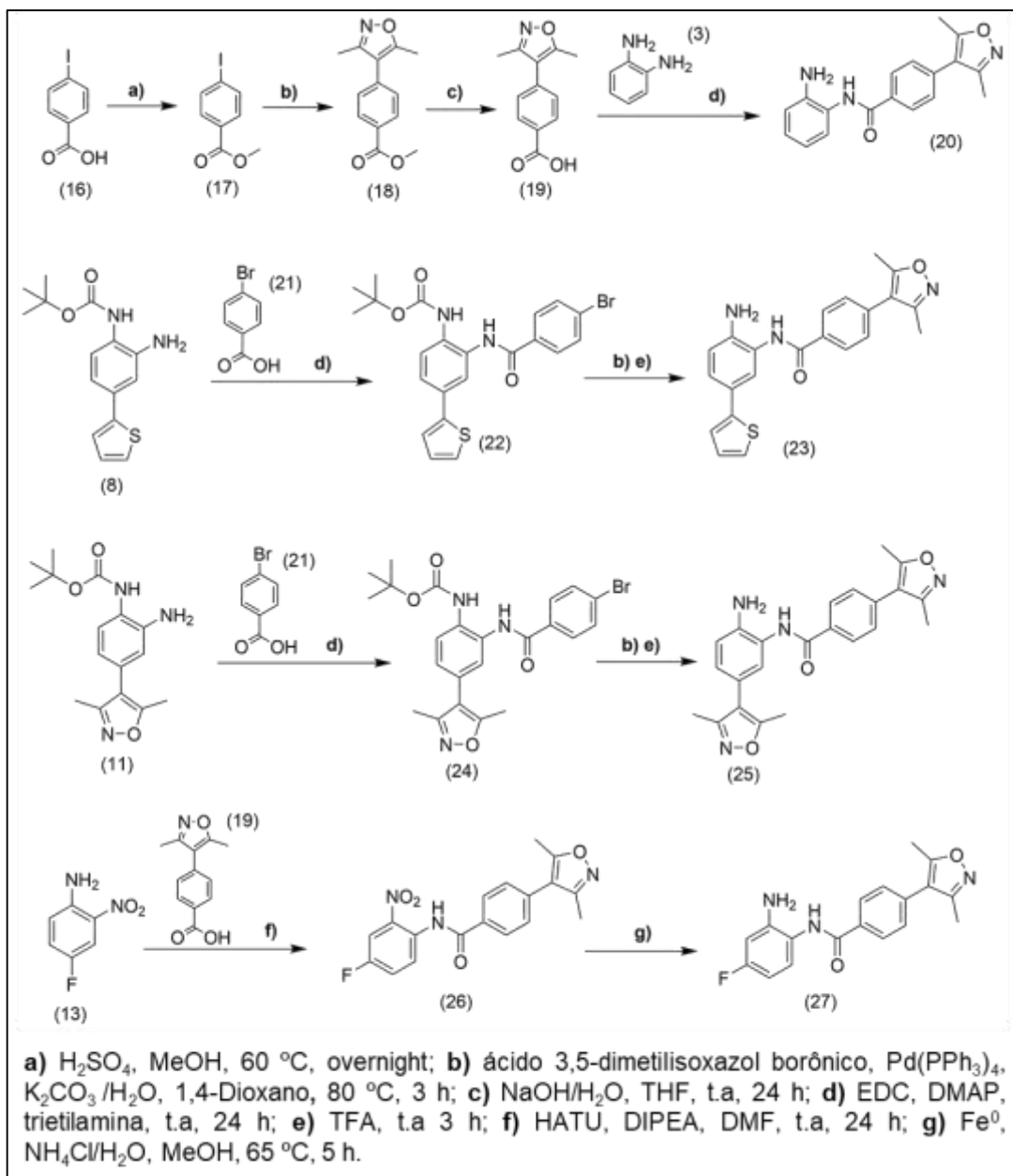
Os principais tipos de reações envolvidas na síntese dos compostos foram: a) reações de proteção e desproteção, com o objetivo de proteger grupamentos livres reativos, a exemplo das aminas primárias; b) Reações de Suzuki para formação de ligações carbono-carbono; c) Reações de redução do grupo nitro em amina primária; d) Formação de amidas através de reações de acetilação ou acoplamento usando agentes acoplantes. As Figuras 10 e 11 representam todas as etapas sintéticas empregadas para formação dos compostos finais, sendo estes ordenados em duas séries de acordo com sua estrutura química: a) derivados de acetamida compostos por **(4)**, **(9)**, **(12)** e **(15)** (Figura 10) e b) derivados de isoxazol compostos por **(20)**, **(23)**, **(25)** e **(27)** (Figura 11).

Figura 10. Etapas sintéticas para a obtenção dos compostos finais derivados da série acetamida: (4), (9), (12) e (15).



Fonte: autoria própria.

Figura 11. Etapas sintéticas para a obtenção dos compostos finais derivados da série isoxazol: (20), (23), (25) e (27)

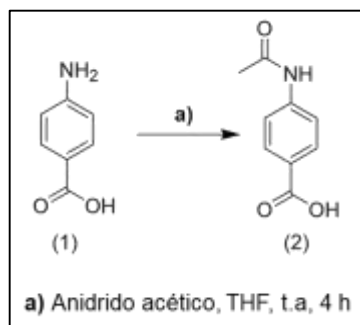


Fonte: autoria própria.

3.4.1 Síntese do ácido-4-acetamidobenzóico - (2)

A metodologia sintética para realizar a interconversão do grupo amina em amida levou a formação do composto ácido-4-acetamidobenzóico (2), de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 12).

Figura 12. Etapa sintética para a obtenção de (2).



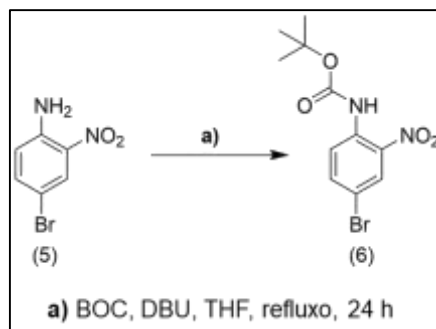
Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foi adicionado 1,0 g (7,3 mmol) de ácido-4-aminobenzóico (**1**), 4,2 mL (43,7 mmol) de anidrido acético e 4 mL de THF anidro. A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação por 5 h. O acompanhamento reacional foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (7:3) acetato de etila:hexano como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo o produto foi precipitado com adição de H₂O gelada e mantido em geladeira por 24 h. O precipitado foi filtrado em funil de Büchner e lavado com água gelada para fornecer o produto desejado, um sólido de cor branca com 89% de rendimento.

3.4.2 Síntese do terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato - (6)

A metodologia sintética para proteção de amina primária com dicarbonato de di-terc-butila (BOC) levou a obtenção do intermediário sintético (**6**), de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 13).

Figura 13. Etapa sintética para obtenção de (6).



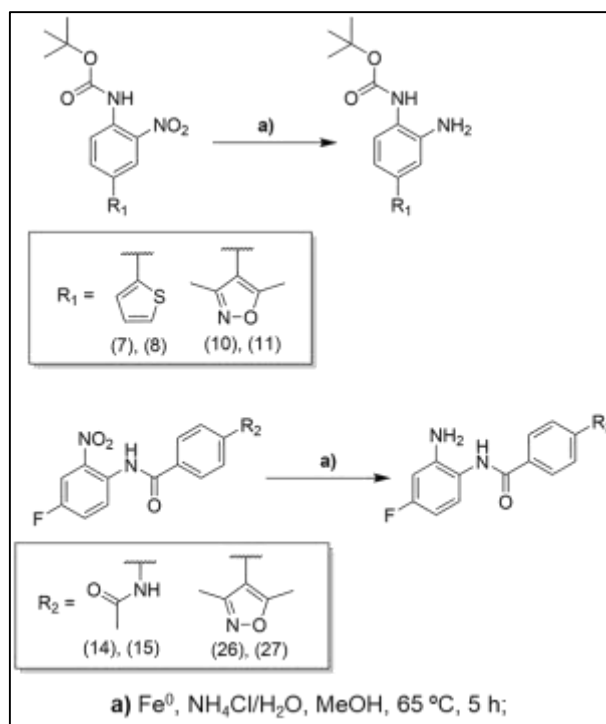
Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10 mL adicionou-se 300 mg (1,8 mmol) de 4-bromo-2-nitro-anilina (**5**) e 350 μ L (1,65 mmol) de dicarbonato de di-terc-butila, 400 μ L (2,7 mmol) de DBU e 6 mL de THF anidro. O mistura reacional foi mantida a temperatura de 55 °C sob agitação durante 24 h em atmosfera inerte de N₂. O acompanhamento reacional foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (C.C.D) utilizando a eluição (9:1) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após esse tempo o meio reacional foi rotaevaporado para eliminação do solvente THF e diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido de cor verde que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™ levando a formação do produto puro com 29 % de rendimento.

3.4.3 Síntese dos compostos (8), (11), (15) e (27)

A metodologia sintética para a redução do grupo nitro-aromático em arilamina levou a obtenção dos compostos (**8**), (**11**), (**15**) e (**27**) de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 14).

Figura 14. Etapa sintética para obtenção de (8), (11), (15) e (27).



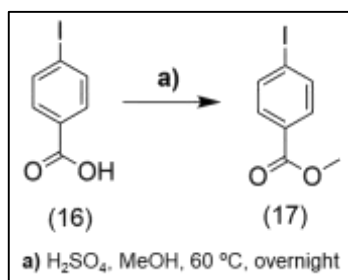
Procedimento experimental geral

Em um balão de fundo redondo de 10 mL adicionou-se o composto contendo o respectivo grupo nitro **(7)** ou **(10)** ou **(14)** ou **(26)**, 4 eq.mol⁻¹ de Fe (0), 5 eq.mol⁻¹ de NH_4Cl em 2 mL de H_2O e 7 mL de MeOH . A reação foi mantida a temperatura de 60°C e agitação por 5 h. O acompanhamento reacional foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando (5:5) hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo, o meio reacional foi filtrado em celite para remoção de ferro (0), lavado com MeOH e rotaevaporado para eliminação do solvente levando a um sólido de cor marrom. O sólido foi diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido bege que foi, em uma última etapa, purificado por cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™ para obtenção dos compostos **(8)**, **(11)**, **(15)** e **(27)** com rendimentos que variaram de 40 a 47%.

3.4.4 Síntese do 4-metil-iodo benzoato (17)

A metodologia sintética para a reação de esterificação de Fischer levou a obtenção do intermediário sintético **(17)**, de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 15).

Figura 15. Etapa sintética para obtenção de (17).



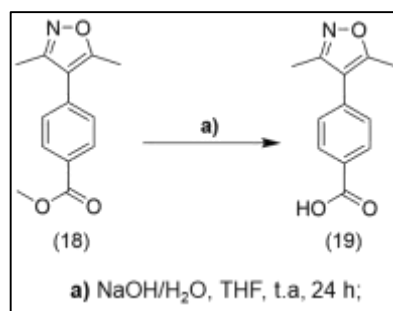
Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 400 mg (1,5 mmol) de ácido-4-iodobenzóico **(16)**, 4 mL de MeOH e 200 uL de H₂SO₄ (3,5 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura de 60 °C durante 18 h. O acompanhamento reacional foi realizado por cromatografia de camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel os eluentes (9:1) hexano:acetato de etila. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo o meio reacional foi rotaevaporado para eliminação do solvente e diluído com 150 mL de éter etílico para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada com adição de bicarbonato de sódio para neutralizar o excesso de ácido no meio. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a formação do produto desejado, um sólido branco com 90 % de rendimento

3.4.5 Síntese do ácido-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico - (19)

A metodologia sintética para a hidrólise do grupo éster levou a obtenção do intermediário sintético **(19)**, de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 16).

Figura 16. Etapa sintética para obtenção de (19).



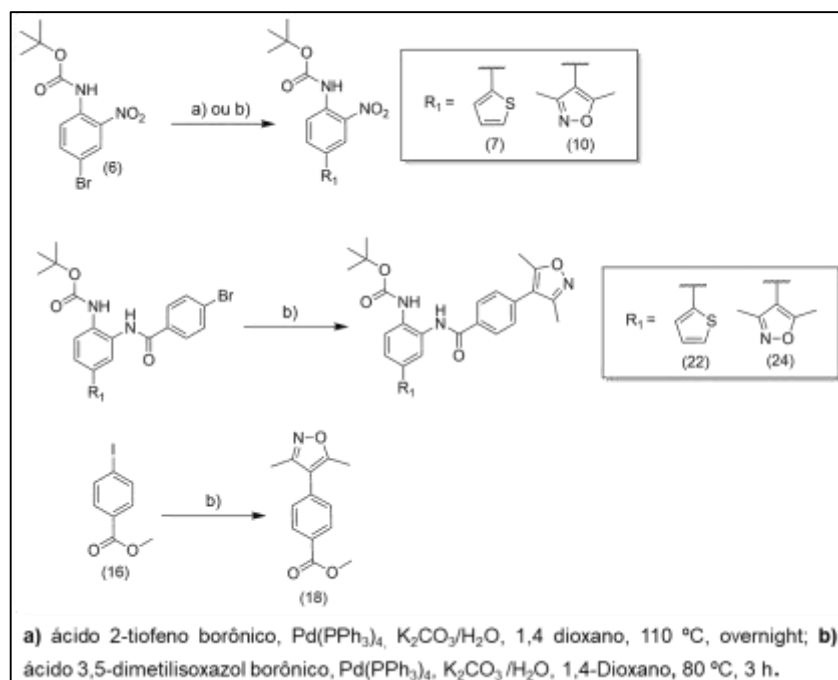
Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10 mL adicionou-se 150 mg (0,64 mmol) de 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila **(18)**, 65 mg (1,6 mmol) de NaOH em 1 mL de H₂O e 4 mL de THF. A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante 24 h. O acompanhamento reacional foi realizado por meio de cromatografia de camada delgada (C.C.D), utilizando como fase móvel a mistura de hexano:acetato de etila na proporção 8:2. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo o meio reacional foi rotaevaporado para eliminação do solvente e diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada com adição de ácido cítrico para neutralizar o excesso de base no meio. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a formação do produto desejado, um sólido marrom com 29% de rendimento.

3.4.6 Síntese dos compostos (7), (10), (18), (23) e (25) (adaptado de GAO et al., 2017)

A metodologia sintética de acoplamento cruzado de Suzuki (MIYARUA; SUZUKI, 1995) levou a obtenção dos compostos **(7)**, **(10)**, **(18)**, **(23)** e **(25)**, de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 17).

Figura 17. Etapa sintética para obtenção de (7), (10), (18), (23) e (25).



Procedimento experimental geral

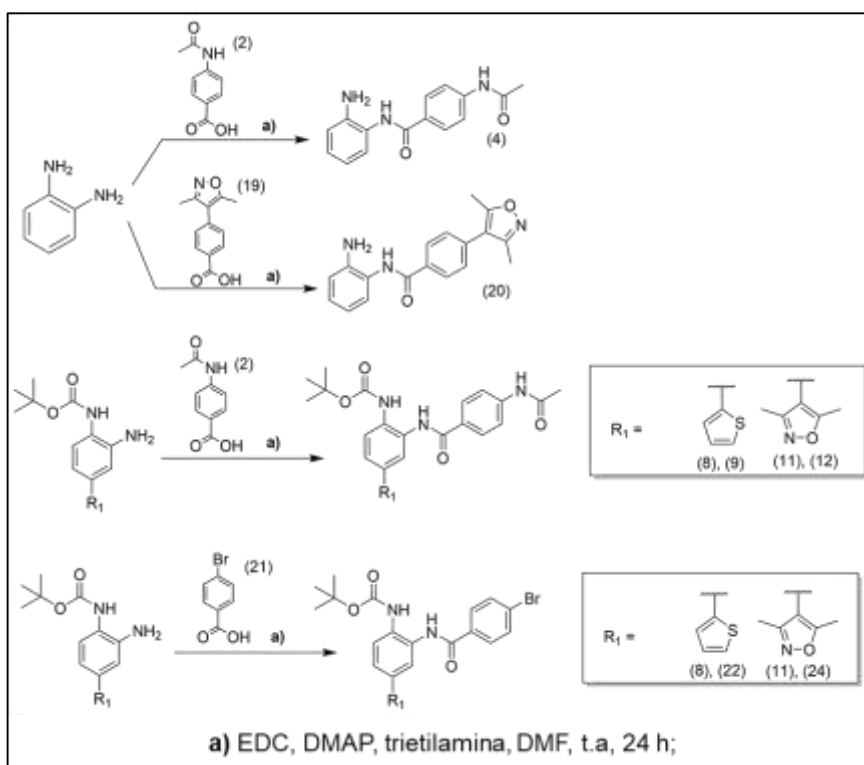
Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados $1,3 \text{ eq. mol}^{-1}$ do reagente halogenado (6) ou (17) ou (22) ou (24), ácido-2-tiofeno-borônico ou ácido (3,5-dimetil-isoxazol) borônico, $0,05 \text{ eq. mol}^{-1}$ de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (paládio tetrakis), 2 eq. mol^{-1} de K_2CO_3 em 2 mL de água e 5 mL de 1,4-dioxano. As reações de acoplamento de Suzuki foram mantidas em temperaturas entre 80 até 100 °C, de acordo com a estabilidade do produto formado e o tempo reacional necessário para o término da reação variou de 3 até 18 horas. Durante esse tempo, as reações foram mantidas sob agitação e atmosfera inerte de N_2 . O acompanhamento reacional foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo, o meio reacional foi filtrado em celite para remoção do catalisador de paládio, lavado com MeOH e rotaevaporado para eliminação do solvente levando a um sólido de cor marrom. O sólido foi diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida e em uma ultima etapa, os compostos purificados por cromatografia cromatografia para obtenção dos

produtos desejados **(7)**, **(10)**, **(18)**, **(23)** e **(25)**, com rendimentos de 59%, 62%, 64%, 35% e 36% , respectivamente.

3.4.7 Síntese dos compostos **(4)**, **(9)**, **(12)**, **(20)**, **(22)** e **(24)** (adaptado de (THOMAS et al., 2008; HOLSON et al., 2013)

A metodologia sintética para a formação de ligações peptídicas usando EDC como agente acoplante levou à obtenção dos compostos **(4)**, **(9)**, **(12)**, **(20)**, **(22)** e **(24)**, de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 18).

Figura 18. Etapa sintética para obtenção de **(4)**, **(9)**, **(12)**, **(20)**, **(22)** e **(24)**.



Procedimento experimental geral

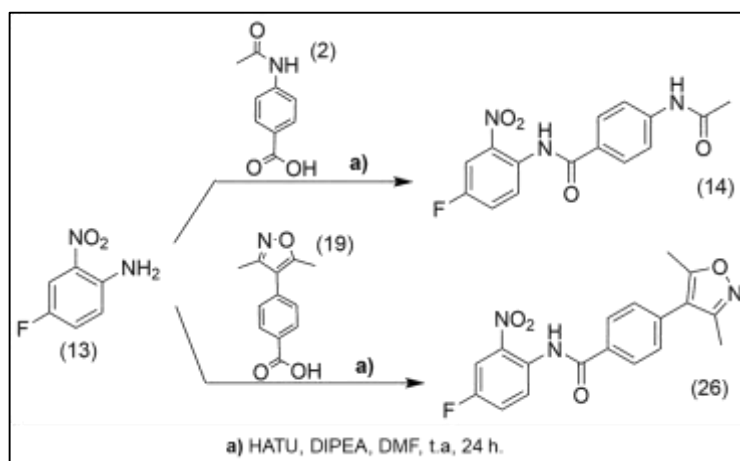
Em um balão de fundo redondo de 10 mL adicionou-se o intermediário carboxilado **(2)** ou **(19)** ou **(21)**, 1 eq.mol⁻¹ de EDC, 0,2 eq.mol⁻¹ de DMAP, e 5 mL de DMF anidro. A reação ficou sob agitação constante e atmosfera de N₂ durante 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 1 eq.mol⁻¹ do intermediário contendo o grupo amina **(3)** ou **(8)** ou **(11)** e 1 eq.mol⁻¹ de trietilamina gota-a-gota, em banho de gelo. A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante 24 h. O acompanhamento reacional foi realizado por meio de cromatografia de camada

delgada (C.C.D), utilizando a eluição acetato de etila:hexano como fase móvel, revelação sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo o meio reacional foi diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e, em uma última etapa, os compostos purificados por cromatografia ou cristalização para obtenção dos produtos desejados **(4)**, **(9)**, **(12)**, **(20)**, **(22)** e **(24)** com rendimentos de 12%, 14%, 13%, 20%, 25%, 29% e respectivamente.

3.4.8 Síntese dos compostos **(14)** e **(26)** (adaptado de WAGNER et al., 2016).

A metodologia empregada para formação de ligações peptídicas utilizando (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazol [4,5-b]piridino 3-óxido hexafluorofosfato (HATU) como agente acoplante levou a formação dos compostos **(14)** e **(26)**, de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 19).

Figura 19. Etapa sintética para obtenção de **(14)** e **(26)**.



Procedimento experimental geral

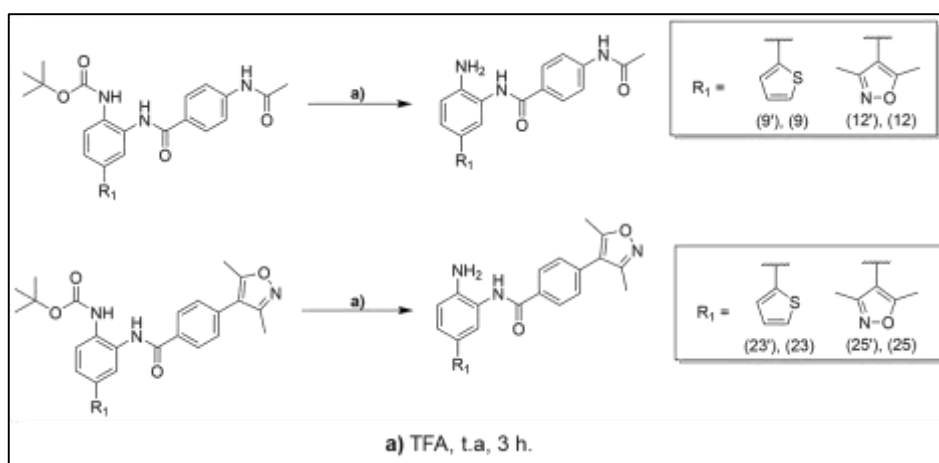
Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 1,0 eq.mol⁻¹ de HATU, 1,0 eq.mol⁻¹ de DIPEA, o intermediário carboxilado **(2)** ou **(19)** e 4 mL de DMF. A reação ficou sob agitação constante e atmosfera de N₂ durante 15 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 1 eq.mol⁻¹ do derivado contendo amina **(13)** e a reação foi mantida sob agitação e atmosfera de N₂ por 24 h. O acompanhamento reacional foi feito por meio

de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição acetato de etila:hexano como fase móvel, revelação sob luz ultravioleta (254 nm). Após esse tempo o meio reacional foi diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e os compostos purificados por cromatografia através do Biotage® Isolera™ para obtenção dos produtos desejados **(14)** e **(26)**, com 55 e 26% de rendimentos respectivamente.

3.4.9 Síntese dos compostos (9), (12), (23) e (25)

A remoção do grupo protetor BOC levou a obtenção dos compostos **(9)**, **(12)**, **(23)** e **(25)**, de acordo com o esquema apresentado a seguir (Figura 20).

Figura 20. Etapa sintética para obtenção de (9), (12), (23) e (25).



Procedimento experimental geral

Em um balão de fundo redondo de 5 mL adicionou-se o respectivo intermediário com grupo protetor e excesso de ácido trifluoracético (5 eq.mol⁻¹). A reação foi mantida a temperatura ambiente e agitação por 3 h. O acompanhamento reacional foi feito por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição acetato de etila:hexano como fase móvel, revelação sob luz ultravioleta (254 nm) e agente revelador 2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona (ninidrina) para detecção de aminas primárias. Após esse tempo o meio reacional foi rotaevaporado para remoção do excesso de TFA e diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido.

A fase orgânica foi lavada três vezes com 50 mL de água destilada. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sodio anidro e a solução filtrada com adição de bicarbonato de sódio para neutralizar o excesso de ácido. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida para obtenção dos produtos desejados **(9)**, **(12)**, **(23)** e **(25)** com rendimentos de 88%, 83%, 85% e 83%, respectivamente.

3.6 Ensaios de inibição enzimática

Os compostos finais sintetizados foram avaliados através de ensaios enzimáticos a fim de identificar sua capacidade de inibição das enzimas HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3 e BRD-4. Os ensaios foram realizados em colaboração com a empresa BPS Bioscience localizada em San Diego, Califórnia. Os compostos foram solubilizados em DMSO e testados em uma concentração de 10 µM tendo como referência o pan-inibidor de HDAC (SAHA) nas concentrações de 0,005, 0,05 e 0,5 µM. Para os bromodomínos extraterminais foi utilizado como controle o composto JQ1 nas concentrações de 0,025; 0,25 e 2.5 µM.

3.5.1 Condições experimentais e análise dos dados para o ensaio de inibição de HDAC

Os ensaios enzimáticos com as enzimas HDAC foram conduzidas em triplicatas. Uma mistura contendo de 50 µL do tampão, 5 µg de BSA (substrato de HDAC), a respectiva enzima HDAC (10 µM) e 5 µL de cada composto (10 µM) a ser avaliado foram mantidos a 37 °C por 30 minutos. Após as reações enzimáticas, 2x de 50 µL de revelador de HDAC foram adicionadas em cada poço para as enzimas HDAC e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A intensidade da fluorescência foi medida com uma excitação de 360 nM e emissão de 460 nM usando um leitor de microplacas Tecan Infinite M1000.

Os ensaios de atividade para HDAC foram realizados em duplicatas em cada concentração. Os dados de intensidade de fluorescência foram analisados através do software Graphpad Prism. Na ausência do composto a ser testado, a intensidade fluorescente (Ft) em cada conjunto de dados foi definida como 100% de atividade. Na ausência de HDAC, a intensidade fluorescente (Fb) em cada conjunto de dados foi definida como 0% de atividade. A porcentagem de atividade na presença de cada composto foi calculada de acordo com a seguinte equação: % de atividade = (F-Fb) /

(Ft-Fb), em que F = a intensidade da fluorescência na presença do composto. Os valores de % de atividade versus uma série de concentrações de compostos foram plotados usando análise de regressão não linear da curva dose-resposta sigmoidal gerada com a equação $Y = B + (TB) / 1 + 10^{((\text{LogEC}_{50}-X) \times \text{Hill Slope})}$, onde Y = porcentagem de atividade, B = porcentagem mínima de atividade, T = porcentagem máxima de atividade, X = logaritmo do composto e Hill Slope = fator de inclinação ou coeficiente de Hill.

3.5.2 Condições experimentais e análise dos dados para o ensaio de inibição de bromodomínio-4 (BRD-4)

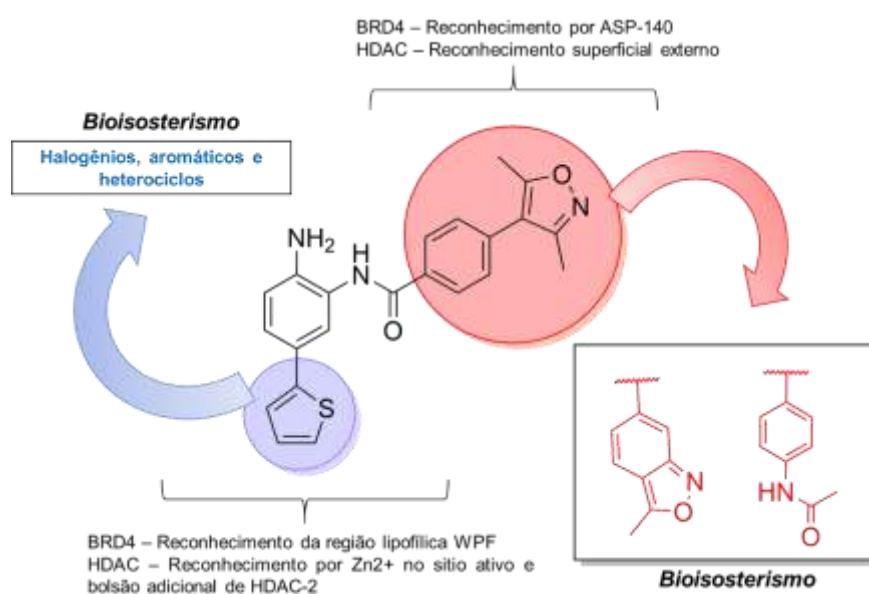
O ensaio foi realizado através da técnica TR-FRET (Time-resolved fluorescence energy transfer) utilizando proteínas recombinantes de bromodomínios (2,5 nM) e o ligante BET (32 nM). O sinal TR-FRET obtido no ensaio foi correlacionado com a quantidade de ligante conjugado ao bromodomínio. Os compostos foram solubilizados em DMSO e diluídos (1:20) em tampão reacional. Desta solução foram pipetados 2 µL e transferidos para 20 µL da mistura reacional (BRD4 (BD1+BD2), inibidor, ligante BET e marcadores fluorescentes) para que a concentração final de DMSO fosse 0.5%, para todas as reações. A mistura reacional foi incubada por 120 minutos em temperatura ambiente, antes da leitura do sinal TR-FRET. A fluorescência dos marcadores aceptores e doadores foram medidos utilizando leitor de microplaca Tecan Infinite M1000. O sinal TR-FRET foi obtido através da relação de fluorescência entre marcadores aceptores e doadores. O ensaio de inibição foi realizado em duplicata para três experimentos distintos. Os dados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism. Nos poços em que continham apenas o ligante BET, o sinal TR-FRET (Ft) foi considerado como 100% de atividade. Nos poços em que o controle (inibidor) era maior que 100 vezes o IC50 foi utilizado para determinar o sinal TR-FRET (Fb) como 0% de atividade. A porcentagem de atividade na presença de cada composto foi calculada utilizando a seguinte equação: $\% \text{ atividade} = [(F - Fb)/(Ft - Fb)] \times 100$, onde F = sinal TR-FRET na presença do composto. A porcentagem de inibição foi calculada a partir da seguinte equação: $\% \text{ inibição} = 100 - \% \text{ atividade}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ancoragem molecular

A partir da estrutura geral do protótipo planejado foram realizadas substituições bioisostéricas visando a otimização da estrutura, conforme representado na Figura 21. Para isso, experimentos de ancoragem molecular foram realizados buscando a identificação dos compostos mais promissores que apresentassem melhor complementariedade com o alvo em questão, bem como os melhores valores de *docking score*, para escolha das moléculas a serem sintetizadas.

Figura 21. Substituições bioisostéricas realizadas para estudo por ancoragem molecular



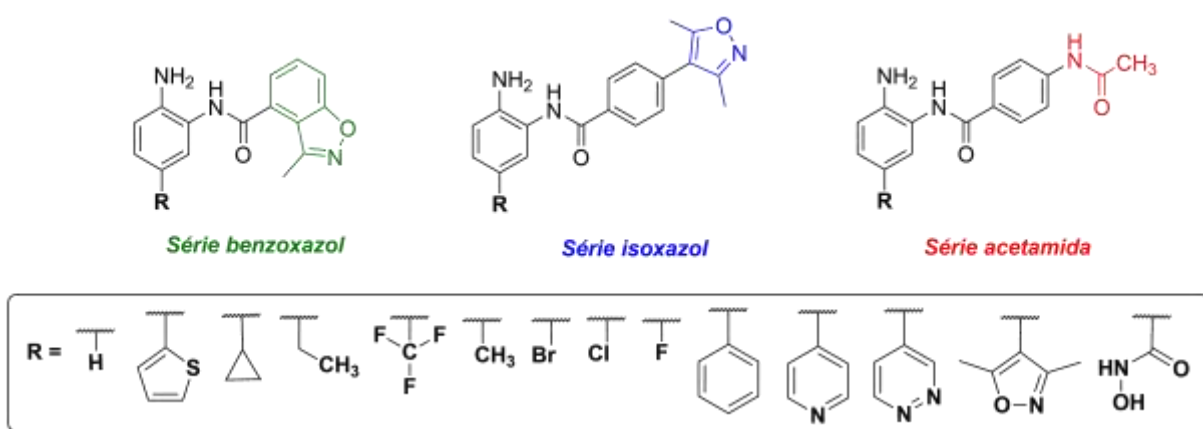
Fonte: autoria própria.

A modelagem molecular é constituída por um conjunto de ferramentas amplamente utilizadas no planejamento de fármacos com a finalidade de, baseado em um modelo computacional, auxiliar e otimizar o processo de desenvolvimento de compostos bioativos através da compreensão das possíveis interações moleculares com o alvo de interesse (SAN'TANNA, 2009; BARREIRO *et al.*, 1997). Neste trabalho, foi empregada a ancoragem molecular como ferramenta para seleção dos compostos como maior potencial para serem inibidores das enzimas HDAC-2 e 3 e BRD-4.

Inicialmente, foi gerada a biblioteca de ligantes usando modificações estruturais especificadas na Figura 22. As modificações buscaram abranger grupos capazes de

proporcionar incremento nas interações através da exploração de regiões do sítio ativo das enzimas em estudo. De forma complementar a análise visual, os valores de *docking score* foram usados para auxiliar na seleção dos compostos para a etapa de síntese orgânica. O *docking score* (DS) é função de pontuação empírica gerada pelo programa Glide que se relaciona com a energia livre de interação do ligante. Diferentes contribuições são levadas em consideração para gerar esse valor, como campo de força (interações eletrostáticas e de van der Waals) e penalidades ou contribuições que influenciam na interação entre o ligante e a enzima (FRIESNER *et al.*, 2006). Quanto menor seu valor, entende-se que as interações entre determinada pose do ligante e a enzima estão sendo mais favorecidas (FRIESNER *et al.*, 2006). Com a estrutura geral do composto dual HDAC/BRD4 planejada, duas séries derivadas de substituições bioisostéricas do grupo 3,5-dimetil-isoxazol (série isoxazol) foram definidas: série benzoxazol e série acetamida (Figura 22).

Figura 22. Série de compostos e diferentes substituições realizadas no anel aromático na posição p-amino.



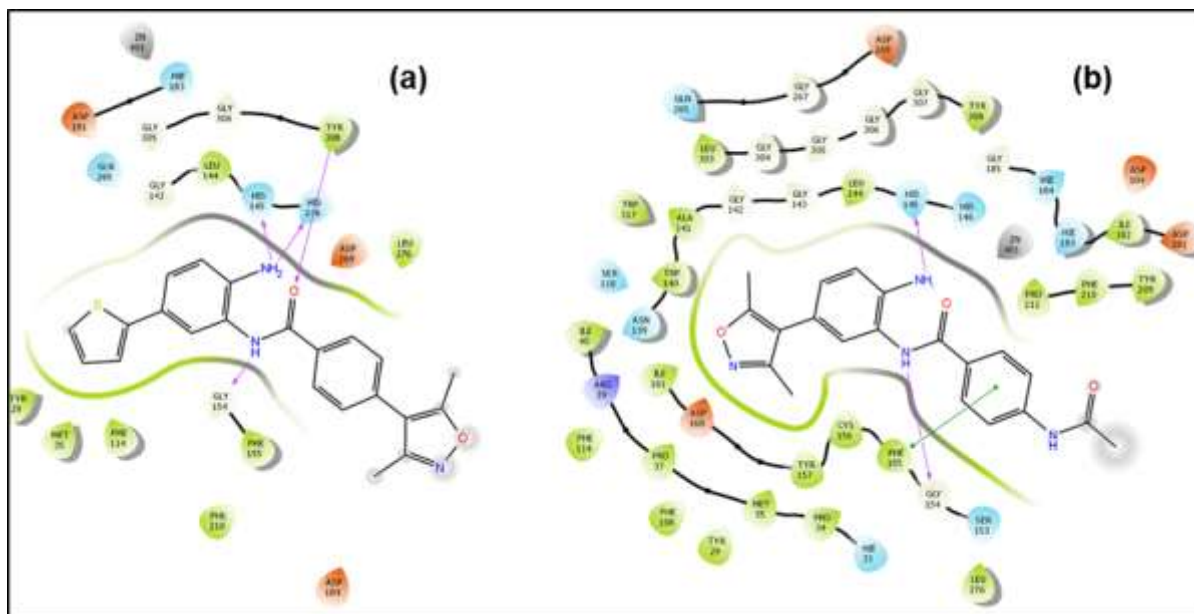
Fonte: autoria própria.

Partindo-se das três séries de compostos com substituições por 14 grupos funcionais diferentes, obteve-se 42 compostos que foram inicialmente estudados na ancoragem molecular contra HDAC-2. Para a formação do complexo entre os ligantes e as HDAC-2 e 3 foi definida como restrição, durante a ancoragem, a interação com o átomo de Zn^{2+} presente no sítio ativo das enzimas.

4.2.1 Estudo de ancoragem molecular frente HDAC

Os resultados de ancoragem molecular para HDAC-2 demonstraram que a substituição bioisostérica do tiofeno por fenila, piridina, piridazina, e 3,5-dimetil-isoxazol levaram a poses adequadas, sendo estes grupos capazes de ocupar a cavidade adicional de 14 Å presente na HDAC-2 (Figura 23). Além disso, este padrão de substituição bioisostérica permitiu a obtenção de compostos com valores de DS comparáveis ao protótipo contendo o tiofeno. As substituições com tiofeno e 3,5-dimetil-isoxazol na posição *p*-amino do anel aromático possuem menores valores de DS do que quando comparado as outras estruturas com substituintes pequenos, como hidrogênio ou flúor (Quadro 1). Dentre as substituições bioisostéricas que mais se destacaram no estudo computacional, selecionou-se os grupos a) tiofeno, por já ser um grupo relatado na literatura como capaz de proporcionar uma inibição seletiva frente a HDAC-2, corroborando com os resultados obtidos no *docking*; e b) 3,5-dimetil-isoxazol que apresentou o maior valor de DS no estudo computacional para HDAC-2, demonstrando um encaixe favorável no sítio ativo da enzima no modelo. Como observado no modelo computacional, os compostos derivados de *o*-amino-benzamidas são capazes de interagir com o átomo de Zn^{2+} na cavidade interna de HDAC-2 através do átomo de nitrogênio da amina aromática e do átomo de oxigênio da carboníla da amida, que possuem pares de elétrons disponíveis e distância adequada (Figura 24).

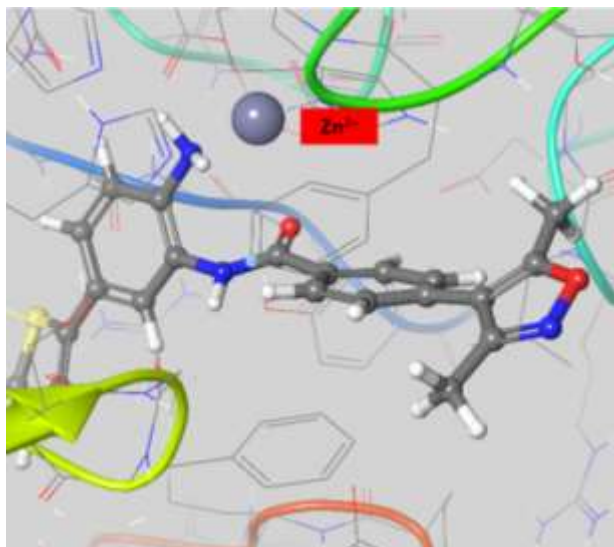
Figura 23. Interações dos substituintes tiofeno (a) e 3,5-dimetil-isoxazol (b) na posição *p*-amino do anel aromático ocupando a cavidade adicional de 14 Å de HDAC-2. As setas em roxo representam as interações de hidrogênio e em verde interações π - π stacking.



Fonte: autoria própria.

Quanto as series acetamida, isoxazol e benzoxazol, o estudo computacional demonstrou que as estruturas derivadas de acetamida e isoxazol mantinham valores de DS entre -10 até -14 aproximadamente e permitiam o encaixe da região *p*-amino da molécula com o sítio ativo de HDAC-2. Quanto a série benzoxazol, apenas três moléculas obedeceram a restrição e foram capazes de interagir com o Zn^{2+} no sítio ativo de HDAC-2. Além disso, o menor valor de DS obtido para os derivados dessa série foi de -9, demonstrando que, em comparação as séries acetamida e isoxazol, a série benzoxazol apresentou resultados inferiores no estudo computacional.

Figura 24. Ancoragem molecular do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida contra HDAC-2. O substituinte tiofeno ocupa o bolsão adicional da enzima. O átomo de nitrogênio da amina aromática e o átomo de oxigênio da carbonila da amida são capazes de interagir com o Zn^{2+} na cavidade interna da enzima. O grupo isoxazol fica fora do sítio de HDAC-2.



Fonte: Autoria própria (imagens das interações obtida através do software Maestro).

O estudo de modelagem molecular para HDAC-3 não foi incluído na seleção dos compostos para síntese uma vez que o modelo computacional não apresentou resultados robustos, sendo pouco conclusivos com relação a formação do complexo ligante-enzima.

4.2.2 Estudo de ancoragem molecular frente BRD-4

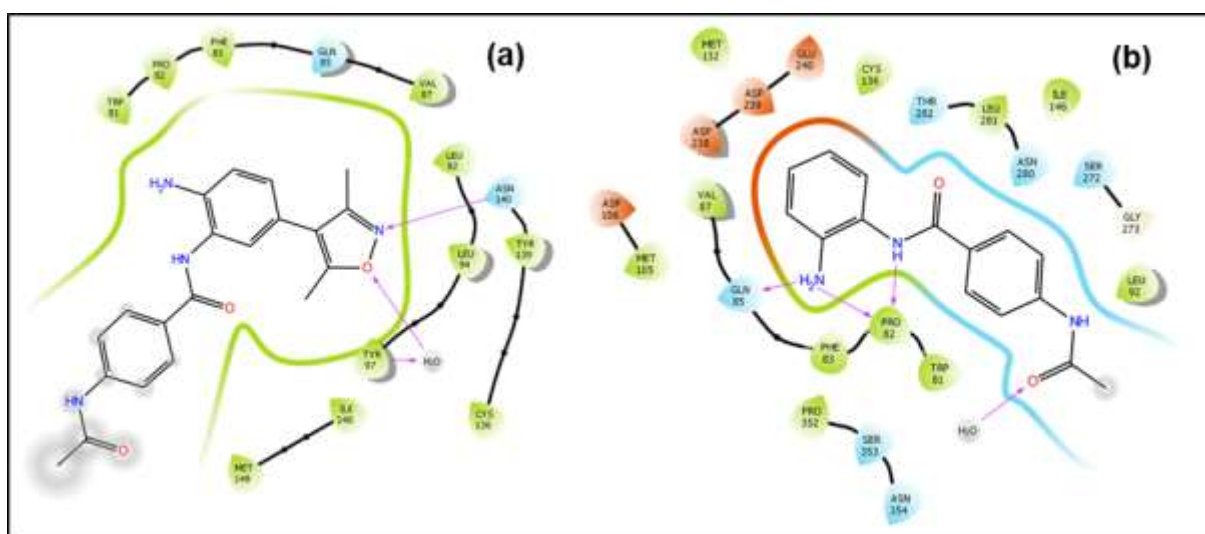
Os resultados de ancoragem molecular demonstraram que a série isoxazol é capaz de reconhecer o resíduo de ASP-140 no sítio ativo de BRD4 no modelo computacional. A cadeia lateral do resíduo de ASP-140, composta por uma amida primária, é capaz de realizar uma interação de hidrogênio com o nitrogênio do anel isoxazólico (Figura 25). O átomo de oxigênio do anel isoxazólico é responsável por realizar uma interação de hidrogênio com o resíduo de água presente no sítio ativo (Figura 25). Os resultados do estudo de ancoragem molecular corroboram com os dados da literatura em que derivados de 3,5-dimetil-isoxazol possuem inibição frente a BRD-4, como previamente discutido.

A série acetamida quando avaliada frente a BRD4 apresenta em alguns casos possibilidade de interação com a cadeia lateral do resíduo de ASP-140 ou com a água interna por uma ligação de hidrogênio pelo átomo de oxigênio da carbonila, mas esse

comportamento é observado apenas em algumas poses do ligante o que pode indicar que essa interação não necessariamente ocorra de maneira tão efetiva quanto a observada para os substituintes derivados de 3,5-dimetil-isoxazol. Os valores de DS para ambas as séries são similares, o que leva a necessidade do estudo das duas substituições para avaliar se o grupamento 3,5-dimetil-isoxazol é de fato significativo para favorecer uma inibição mais potente de BRD4 frente os derivados de acetamida.

A série benzoxazol não foi estudada frente a BRD4 uma vez que em comparação com as séries acetamida e isoxazol apresentou resultados inferiores no estudo computacional para HDAC-2, que sugerem que o substituinte benzoxazol pode não ser uma escolha adequada para planejar compostos duais HDAC/BRD4.

Figura 25. Interações com o BRD4 entre duas moléculas derivadas da série isoxazol (a) e série acetamida (b). A estrutura derivada da série isoxazol é capaz de reconhecer o resíduo de ASP-140 presente no sítio de BRD4 por uma interação de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio do anel isoxazólico e o aminoácido (seta roxa). O átomo de oxigênio também é capaz de realizar outra interação importante para BRD4, uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água interna do sítio. (b) a estrutura derivada da série acetamida, nesse caso, apresenta uma interação favorável através da ligação de hidrogênio do átomo de oxigênio da carbonila da amida com a água interna do sítio

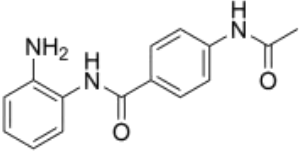
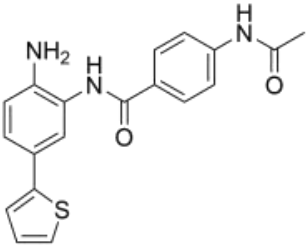
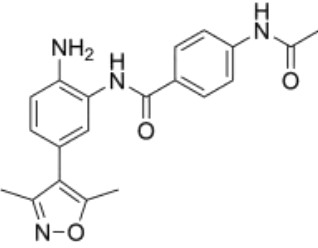
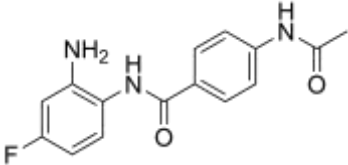


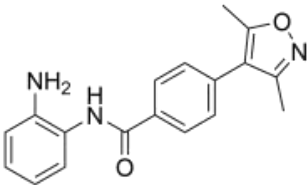
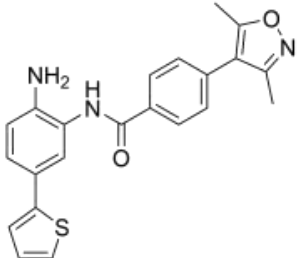
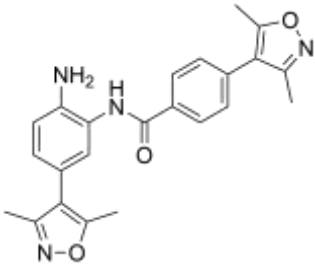
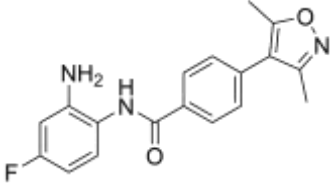
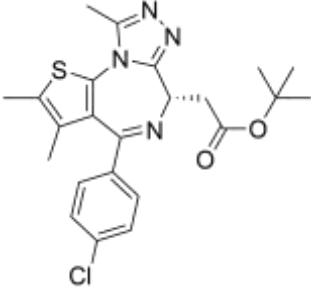
Fonte: autoria própria.

Assim, foram selecionadas oito moléculas, consideradas as mais promissoras, para síntese (Quadro 1) com base nos seus valores de DS e em um estudo visual de seu comportamento no sítio ativo das enzimas. Das oito moléculas selecionadas, três estruturas são relatadas na literatura como inibidoras de HDAC classe I: **(4)**, **(9)** e **(15)** (Quadro 1). Utilizando essas estruturas como modelo comparativo observa-se que os compostos inéditos **(12)**, **(20)**, **(23)** e **(25)** apresentam valores de DS similares para

HDAC-2, com destaque para a estrutura (12) (Quadro 1). Como modelo comparativo o composto inibidor JQ1, foi estudado no modelo computacional para BRD-4 e apresentou um DS de -4,603 em sua melhor pose (Quadro 1), valor similar aos que os compostos selecionados apresentaram. Tanto a série acetamida quanto a série isoxazol apresentaram valores semelhantes de DS para BRD-4 em suas melhores poses e desta forma foram escolhidas para posterior síntese.

Tabela 1. Compostos selecionados para síntese com base no estudo de ancoragem molecular para HDAC-2 e BRD-4.

Estrutura	HDAC-2	BRD-4
	Docking Score	Docking Score
 CI-994 (4)	-10,330	-7,118
 (9)	-12,899	-5,114
 (12)	-13,981	-5,416
 BRD3308 (15)	-10,586	-3,547

 (20)	-11,336	-5,785
 (23)	-12,557	-4,941
 (25)	-12,309	-4,659
 (27)	-10,731	-4,356
 JQ1	-	-4,603

4.2 Síntese e caracterização dos compostos finais

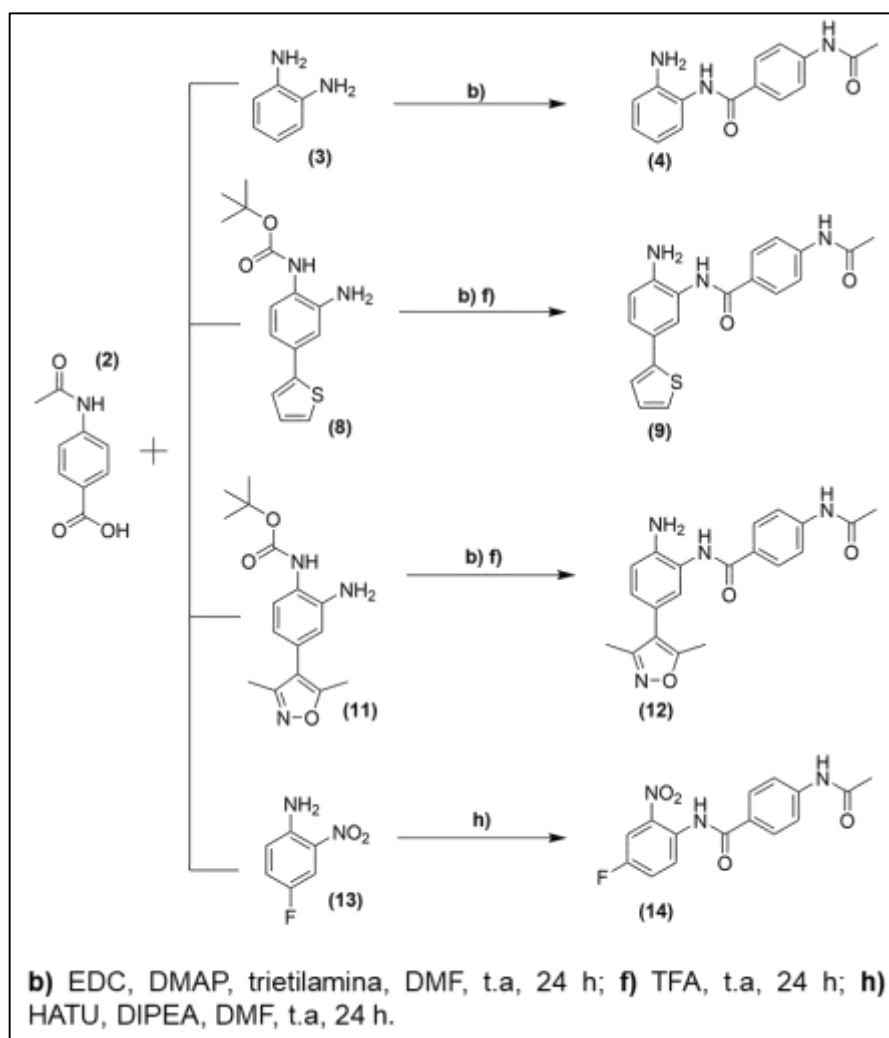
Todos os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais (HSQC e HMBC) e de infravermelho (IV) dos compostos sintetizados foram inseridos na seção Apêndice deste trabalho.

4.3.1 Síntese e caracterização dos compostos finais série acetamida (4), (9), (12)

Os compostos (4), (9), (12) e (15) apresentaram etapas sintéticas semelhantes para formação da função amida em suas estruturas com uso de agentes acoplantes. Como a síntese do composto (15) não foi efetuada, apenas o intermediário (14) será discutido.

O intermediário carboxilado ácido-4-acetamida benzóico (2) reagiu com os intermediários (3) ou (8) ou (11) ou (13) contendo uma amina primária em suas estruturas para formação da ligação peptídica (Figura 26).

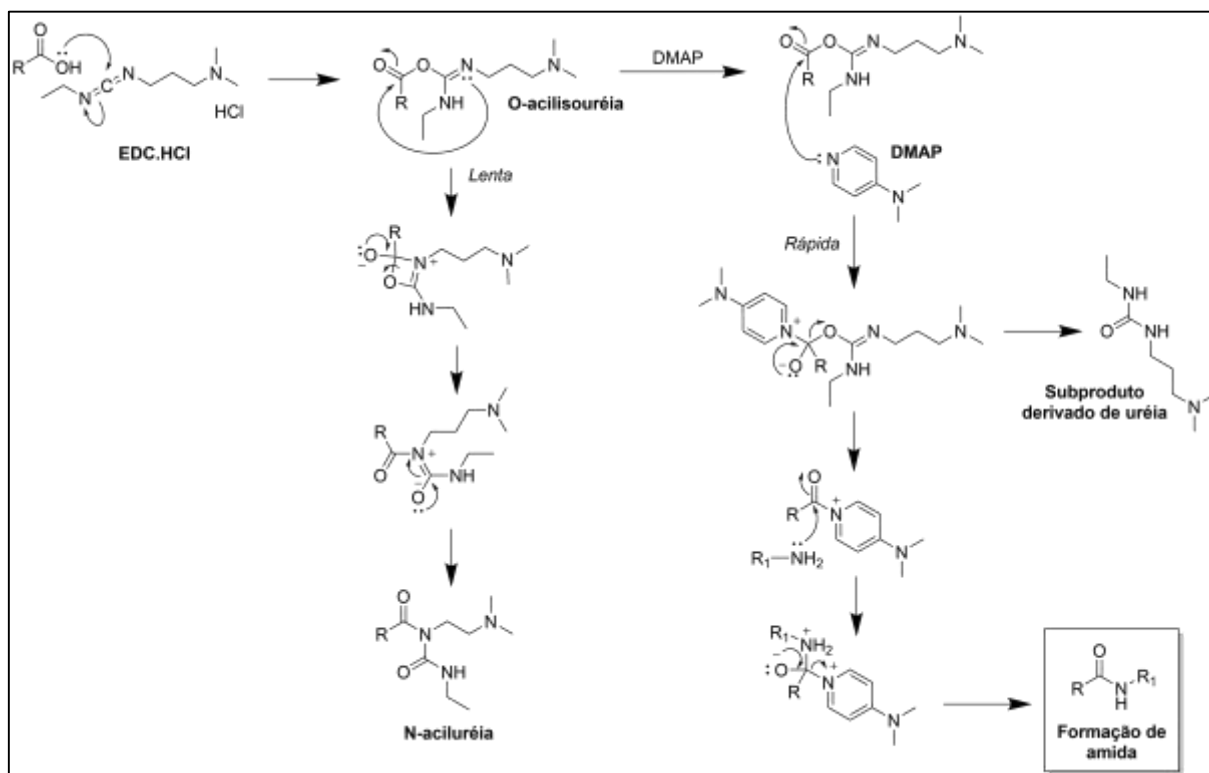
Figura 26. Esquema das etapas sintéticas para os compostos (4), (9), (12) e (14).



Fonte: autoria própria.

Os compostos **(4)**, **(9)** e **(12)** foram sintetizados com o uso de etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente acoplante, catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP), trietilamina como base e em meio de DMF anidro (Figura 26). A escolha do agente acoplante se deu com base na literatura, em que os compostos **(4)** – CI994 e **(9)** já descritos, foram obtidos por meio do uso de EDC (THOMAS *et al.*, 2008; HOLSON *et al.*, 2013). Outras tentativas de formação de amida foram realizadas empregando 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) como agente acoplante, mas não obtivaram êxito na formação dos produtos. Desta forma, optou-se por manter o uso de EDC nas etapas de formação de amidas. Além da efetividade em formar a ligação peptídica, esse agente acoplante forma um subproduto derivado de uréia solúvel em água, que é facilmente eliminado na etapa de extração líquido/líquido (MONTALBETTI, FALQUE; 2005). A adição de DMAP atua como um facilitador da reação através de seu comportamento como nucleófilo frente ao intermediário *o*-acilisouréia (etapa rápida), contribuindo por prevenir reações paralelas como o rearranjo intramolecular (etapa lenta) que leva a formação de um intermediário não reativo (*N*-aciluréia) (Figura 27) (MONTALBETTI, FALQUE; 2005).

Figura 27. Reação de formação de amida com uso de agente acoplante (EDC). A primeira etapa constitui o ataque nucleofílico do ácido carboxílico ao EDC, levando a formação do intermediário O-acilisouréia. Esse intermediário pode sofrer um rearranjo intramolecular (etapa lenta) levando a formação de N-aciluréia, um intermediário não reativo. Para contornar esse problema, pode-se empregar agentes nucleofílicos como DMAP, que reagem rapidamente com o O-acilisouréia para formação de um novo intermediário reativo. A última etapa consiste na adição da amina que ataca o carbono carbonílico do intermediário e o DMAP é restituído no meio reacional, levando a formação do derivado amídico de interesse



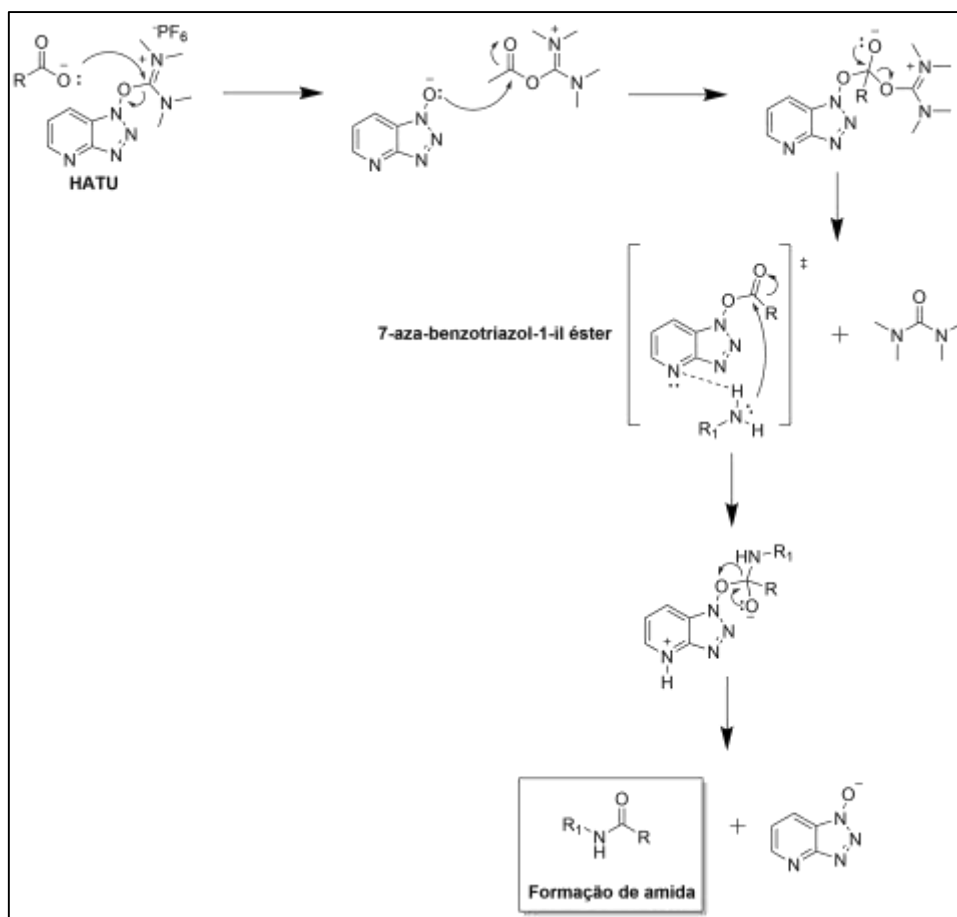
Fonte: Adaptado de MONTALBETTI; FALQUE, 2005.

O composto **(14)** diferente dos demais da série acetamida, foi sintetizado com o uso de agente acoplante hexafluorofosfato de 1-óxido de 1-[bis (dimetilamino) metileno] – 1H-1,2,3-triazolo [4,5-b] piridíneo (HATU), base N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) e DMF como solvente na presença de ácido-4-acetamida benzoico **(2)** (Figura 26).

A escolha do agente acoplante se deu com base na literatura, uma vez que o composto **(15)** – BRD3308 foi obtido por meio do uso de HATU (WAGNER *et al.*, 2016). Avaliou-se também a possibilidade de sintetizar o composto **(14)** através do uso de EDC como agente acoplante, não sendo possível observar a formação do composto esperado. Desta forma, a melhor escolha para a formação da ligação peptídica nesse caso se deu pelo uso de HATU. HATU é um agente acoplante da classe dos sais de urônio, muito empregado em metodologias de formação de ligações

peptídicas. A formação de um intermediário 7-aza-benzotriazol-1-il éster durante a reação favorece o ataque nucleofílico das aminas, sendo sua reatividade associada pela capacidade de gerar uma catálise básica intramolecular pela presença do anel piridínico em sua estrutura (Figura 28) (MONTALBETTI, FALQUE; 2005) (VALEUR, BRADLEY; 2008).

Figura 28. Reação de formação de amida com uso de acoplante (HATU). O ataque do ânion carboxilato, proveniente da reação do ácido carboxílico com uso de uma base não nucleofílica DIPEA (não representado), ao agente acoplante HATU dá seguimento ao mecanismo. A formação da espécie reativa 7-aza-benzotriazol-1-il éster é capaz de realizar uma etapa de catálise básica pela presença do anel piridínico enquanto ocorre o ataque nucleofílico da amina a carbonila, levando a formação do derivado amídico de interesse.



Fonte: Adaptado de VALEUR; BRADLEY, 2008.

Após sintetizados, os compostos **(4)**, **(9)**, **(12)** e **(14)** foram purificados e caracterizados. O composto **(4)** foi purificado por cristalização em CH_2Cl_2 seguindo a metodologia descrita por (THOMAS *et al.*, 2008; HOLSON *et al.*, 2013); o composto **(9)** e **(12)** foram purificados por meio de extração líquido/líquido e o composto **(14)** foi purificado por cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™, utilizando a coluna

Biotage® SNAP ULTRA 10g (HP-Sphere 25 μ m), por um método isocrático com acetato de etila e hexano como eluentes nas proporções 7:3. O rendimento global, faixa de fusão e aspecto dos compostos foram resumidos na Tabela 2.

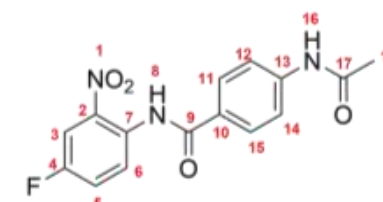
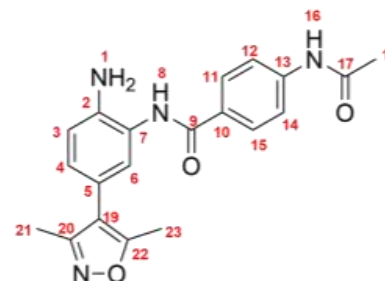
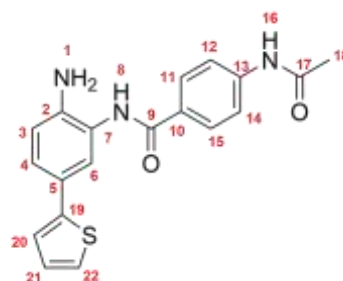
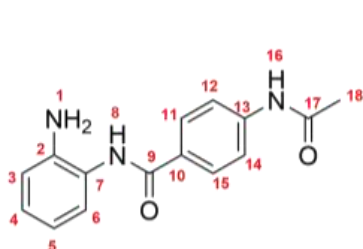
Tabela 2. Resumo dos dados de rendimento global, faixa de fusão e aspecto dos compostos (4), (9), (12) e (14).

	(4)	(9)	(12)	(14)
Rendimento global (%)	49%	47%	46%	72%
Faixa de fusão (°C)	236-240 °C	120-130 °C	182-185 °C	199-204 °C
Aspecto	Sólido de cor branca	Sólido de cor marrom	Sólido de cor bege	Sólido de cor branca

Os compostos apresentaram rendimentos globais semelhantes, com exceção do composto (14) que obteve 72%. A etapa de menor rendimento para todos os compostos foram as reações de acoplamento. Os rendimentos obtidos para as etapas de acoplamento com o uso de EDC foram de 10-14%. Esses valores baixos são esperados nesta etapa devido ao impedimento estérico ocasionado pela presença do grupo BOC na posição *orto* em relação as amins primárias no caso de (8) e (11) para formação de (9) e (12); além da baixa reatividade do grupo aril-amina, uma vez que os pares de elétrons das amins podem estar em ressonância com o sistema aromático diminuindo sua nucleofilicidade. Ao utilizar HATU como agente acoplante para a formação da molécula (14), obteve-se o maior rendimento das etapas de formação de ligações peptídicas com 55% de rendimento; o que pode indicar que esse agente acoplante seja uma melhor escolha para a construção das moléculas dessa série.

Quanto a elucidação estrutural os compostos da série acetamida foram caracterizados por RMN de ^1H , APT (^{13}C) e bidimensionais (HSQC e HMBC) (Tabela 3)

Tabela 3. Caracterização estrutural de (4), (9), (12) e (14) por RMN de ^1H e APT (^{13}C) em $\text{DMSO}-d_6$.



Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	4,86 (s, 2H)	-	-	-	5,09 (s, 2H)	-	-	-
2	-	123,92	-	125,8	-	123,52	-	135,06
3	6,77 (dd, $J = 8.0, 1.1$ Hz, 1H)	116,51	6,93 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H)	119,0	6,86 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	116,33	8,75 (dd, $J = 4.4, 1.4$ Hz, 1H)	151,65
4	6,59 (m, 1H)	116,68	7,39 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H)	124,24	6,97 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H)	126,88	-	143,64
5	6,96 (m, 1H)	126,72	-	125,8	-	117,25	7,51 (dd, $J = 8.4, 4.4$ Hz, 1H)	121,33

6	7,14 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H)	127,18	7,52 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	124,19	7,17 (<i>s</i> , 1H)	127,03	8,50 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.4, 1.4 Hz, 1H)	129,28
7	-	143,58	-	138,7	-	142,47	-	124,90
8	9,57 (<i>s</i> , 1H)	-	9,79 (<i>s</i> , 1H)	-	9,60 (<i>s</i> , 1H)	-	-	-
9	-	165,24	-	165,50	-	164,85	-	167,51
10	-	142,53	-	142,08	-	142,20	-	139,64
11 e 15	7,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7 Hz; 2H)	129,06	7,97 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)	129,30	7,94 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)	128,76	7,66 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7, 2H)	118,78
12 e 14	7,69 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)	118,42	7,72 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)	118,52	7,70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)	118,02	7,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7, 2H)	130,84
13	-	129,21	-	128,8	-	128,69	-	125,36
16	10,21 (<i>s</i> , 1H)	-	10,22 (<i>s</i> , 1H)	131,71	10,21 (<i>s</i> , 1H)	-	10,30 (<i>s</i> , 1H)	-
17	-	169,29	-	169,36	-	168,28	-	169,72
18	2,08 (<i>s</i> , 3H)	24,68	2,09 (<i>s</i> , 3H)	24,59	2,08 (<i>s</i> , 3H)	24,17	2,07 (<i>s</i> , 1H)	24,48
19			-	144,0	-	115,90		
20			7,42 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5.1, 1.1 Hz, 1H)	124,56	-	158,21		

21		7,07 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5.1, 3.6 Hz, 1H)	128,73	2,20 (s, 3H)	10,57	
22		7,32 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3.6, 1.0 Hz, 1H)	122,42	-	164,00	
23				2,38 (s, 3H)	11,30	

Destacam-se os sinais que caracterizam o núcleo em comum da série acetamida, presente nas quatro estruturas: os hidrogênios das amidas na posição 8 e 16, dois simpletos com integração de 1H, com deslocamentos químicos em 9 ppm para o hidrogênio na posição 8 e 10 ppm para o hidrogênio na posição 16. As posições dos hidrogênios das amidas foram confirmadas com o auxílio do experimento de HMBC. As carbonilas das amidas nas posições 9 e 17 apresentaram deslocamentos químicos entre 165,24 – 167,51 ppm e 169 ppm respectivamente. Os hidrogênios da metila na posição 18, proveniente da função amida, foram caracterizados como um simpleto em 2,08 ppm, com integração de 3H. Os hidrogênios nas posições 11, 15, 12 e 14 no anel aromático apresentaram equivalência nos seus deslocamentos químicos em virtude do padrão de substituição do anel. Os hidrogênios nas posições 11 e 15 foram caracterizados como um duplete, com integração de 2H, entre 7,66 – 7,97 ppm e constante de acoplamento (J) = 8,7 Hz. Os hidrogênios nas posições 12 e 14 foram caracterizados como um duplete, com integração de 2H, entre 7,69 – 7,87 ppm e constante de acoplamento (J) = 8,7 Hz. As constantes de acoplamento justificam que esses sinais são provenientes do mesmo sistema aromático. Os hidrogênios nas posições 3, 4, e 6 para os compostos **(9)** e **(12)** apresentaram a seguinte caracterização: o hidrogênio na posição 3 teve um deslocamento químico de 6,93 ppm na molécula **(9)** e 6,86 ppm na molécula **(12)**, com a mesma multiplicidade (duplete) e mesmas constantes de acoplamento em ambas as moléculas (J = 8,2 Hz) indicando uma interação *orto*. O hidrogênio na posição 4 teve um deslocamento químico de 7,39 ppm na molécula **(9)** e 6,97 ppm na molécula **(12)**, com a mesma multiplicidade (duplo duplete) e mesmas constantes de acoplamento em ambas as moléculas (J = 8,2; 2,1 Hz) indicando interações *orto* e *meta*. O hidrogênio na posição 6 teve um deslocamento químico de 7,52 ppm na molécula **(9)** sendo um duplete com J = 2,0 Hz e 7,17 ppm na molécula **(12)** como um simpleto.

O composto **(9)** apresentou sinais em 7,42; 7,07 e 7,32 ppm, que caracterizaram os hidrogênios do anel tiofeno nas posições 20, 21 e 22. O hidrogênio na posição 20 é um duplo duplete com J = 5,1 e 1,1 Hz, indicando interações em *orto* e *meta*; o hidrogênio na posição 21 é um duplo duplete com J = 5,1 e 3,6 Hz indicando interações em *orto* e o hidrogênio 22 é um duplo duplete com J = 3,6 e 1,0 Hz indicando interações em *orto* e *meta*. Os hidrogênios da amina primária na posição 1 não foram

observados, o que pode ser justificado pela troca entre deutério e hidrogênios da amina.

O composto **(12)** apresentou dois simpletos em 2,20 e 2,38 ppm, ambos com integração para 3H caracterizando os hidrogênios da metila do grupo 3,5-dimetil-isoxazol. Os carbonos quartenários na posição 20 e 22 apresentaram deslocamentos em 158,21 e 164,00 ppm respectivamente no experimento de APT, sendo esses carbonos mais desblindados por serem vizinhos aos átomos de nitrogênio e oxigênio do sistema isoxazólico. Os hidrogênios da amina primária na posição 1 foram caracterizados como um simpleto em 5,09 ppm, com integração para 2H.

O composto **(4)** apresentou para os hidrogênios nas posições 3, 4, e 6 os seguintes deslocamentos químicos: 6,77; 6,59; 6,96 e 7,14 ppm respectivamente, sendo o hidrogênio na posição 3 um duplo duplete com $J = 8,0$ e $1,1$ Hz; indicando acoplamentos em *orto* e *meta*, os hidrogênios na posição 4 e 5 são multipletos e o hidrogênio na posição 6 é um duplete, com $J = 7,6$ Hz indicando um acoplamento em *orto*. O composto **(14)** apresentou para os hidrogênios nas posições 3, 4, e 6 os seguintes deslocamentos químicos: 8,75; 7,51 e 8,50 ppm. Os hidrogênios nessas posições apresentam os maiores deslocamentos químicos da série, o que pode ser justificado pela presença do átomo de flúor e do grupo nitro na estrutura química que torna esses hidrogênios mais desblindados. O hidrogênio na posição 3 foi caracterizado como um duplo duplete com $J = 4,4$ e $1,4$ Hz, indicando interações em *meta* e *para*; o hidrogênio na posição 5 foi caracterizado como um duplo duplete com $J = 8,4$ e $4,4$ Hz, inidicando interações em *orto* e *meta*; o hidrogênio na posição 6 foi caracterizado como duplo duplete com $J = 8,4$ e $1,4$ Hz indicando interações *orto* e *para*. Os carbonos quartenários das quatro estruturas foram atribuídos com auxílio do experimento de APT (^{13}C) e HMBC; e com auxílio do HSQC os hidrogênios foram correlacionados com seus respectivos carbonos em J_1 .

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV) demonstrou a presença de bandas de absorção indicando grupos químicos característicos dos compostos **(4)**, **(9)** e **(12)** representados na Tabela 4:

Tabela 4. Caracterização por espectrofotometria na região do infravermelho dos grupos químicos presentes na estrutura química dos compostos (4), (9) e (12).

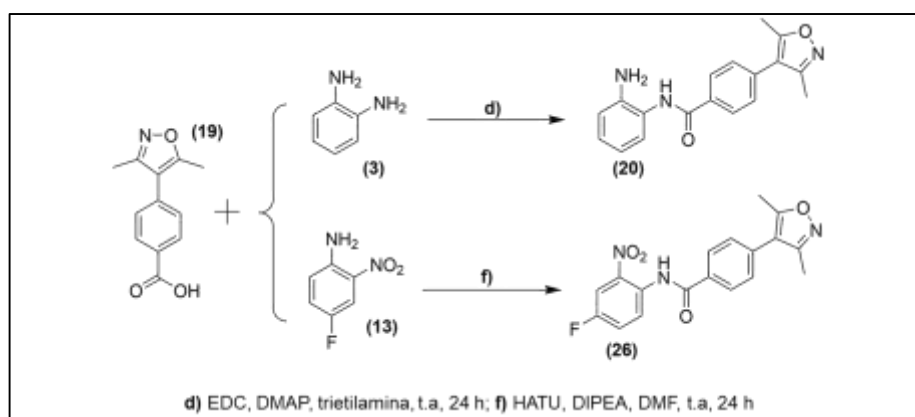
Tipo de vibração	(4)	(9)	(12)
	cm ⁻¹		
ν NH ₂	3471,87	3471,87	3446,79
ν C=O (amida)	1670,35	1683,86	1683,86
ν C=O (amida)	1647,21	1635,64	1635,64
ν C=C (aromáticos)	1602,85	-	1608,62
δ C-N-H (amida)	1541,12	1541,12	1541,12
ν C=C (aromáticos)	1456,26	-	1506,41
δ_s CH ₃ (amida)	1404,18	1400,32	1404,18
ν C-N (aminas aromáticas)	1309,67	1313,52	1363,67

4.3.2 Síntese e caracterização dos compostos finais da série isoxazol (20), (23), (25).

Os compostos (20), (23), (25) e (27) apresentaram etapas sintéticas semelhantes para formação da função amida em suas estruturas com o uso de agentes acoplantes. Como a síntese do composto (27) não foi efetuada, apenas o intermediário (26) será discutido.

Para os compostos (20) e (26), foram feitas reações entre o intermediário ácido-4-(3,5-dimetilisoxazol) benzoico (19) com os reagentes (3) ou (13) contendo uma amina primária em suas estruturas para formação da ligação peptídica (Figura 29). Para o composto (20) a metodologia de acoplamento foi realizada utilizando EDC, e para o composto (26) o acoplamento foi realizado com o uso de HATU (Figura 29).

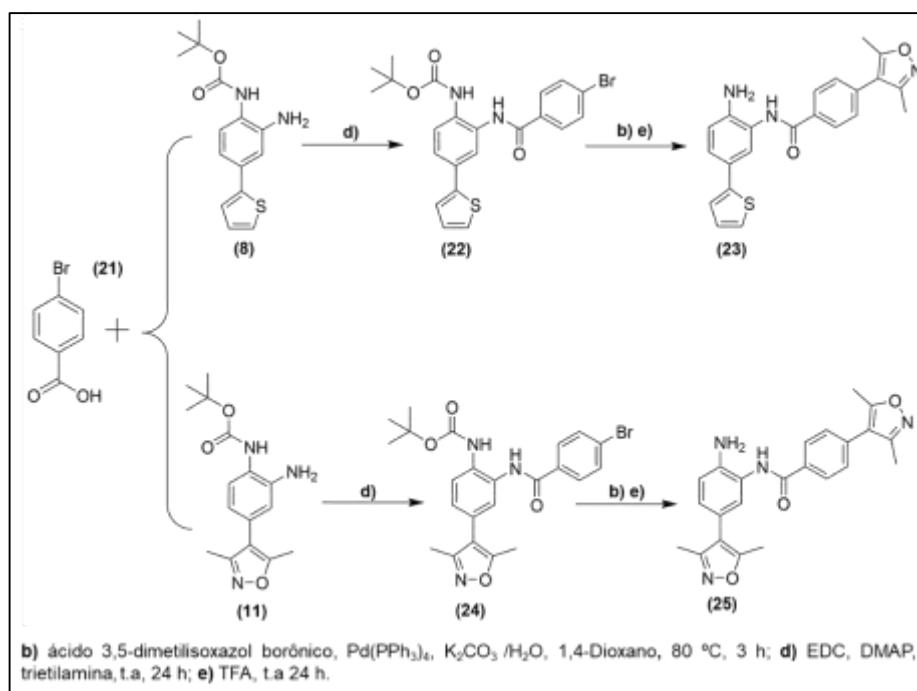
Figura 29. Esquema das etapas sintéticas para os compostos finais (20) e (26).



Fonte: autoria própria.

Para a formação dos compostos **(23)** e **(25)**, foram feitas reações entre o intermediário ácido-4-bromo-benzoico **(21)** com os reagentes **(8)** ou **(11)** contendo uma amina primária em suas estruturas para formação da ligação peptídica (Figura 30). Essa etapa de acoplamento levou a formação dos intermediários **(22)** e **(24)** (Figura 30). Posteriormente os intermediários **(22)** e **(24)** passaram por um acoplamento cruzado de Suzuki na presença de ácido 3,5-dimetilisoxazol borônico para a formação dos compostos **(23')** e **(25')** não representados na Figura 30. Os intermediários **(23')** e **(25')** reagiram com ácido trifluoracético (TFA) para a remoção do grupo protetor BOC, levando a obtenção dos compostos finais **(23)** e **(25)**.

Figura 30. Esquema das etapas sintéticas para os compostos finais **(23)** e **(25)**.

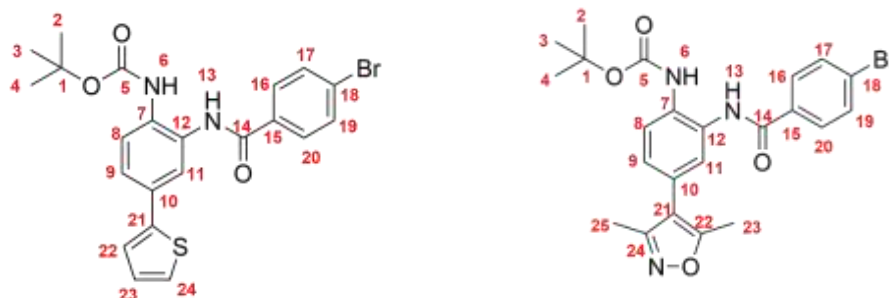


Fonte: autoria própria.

Diferente das etapas sintéticas seguidas para a formação de **(20)** e **(27)**, foi necessário o uso do reagente ácido-4-bromo-benzoico **(21)** para a obtenção dos produtos de acoplamento **(22)** e **(24)** e posteriormente realizar a substituição do átomo de bromo no anel aromático pelo grupo 3,5-dimetil-isoxazol em um acoplamento cruzado de Suzuki; ao invés da reação direta com o ácido-4-(3,5-dimetilisoxazol) benzoico **(19)**. Essa mudança nas etapas sintéticas foi necessária uma vez que a reação entre o ácido-4-(3,5-dimetilisoxazol) benzoico **(19)** com os reagentes **(8)** e **(11)** seguindo a metodologia de acoplamento com o uso de EDC não apresentou a

formação dos produtos esperados. Uma hipótese para que essas reações não tenham se efetuado é o fato do impedimento estérico gerado pelas metilas do substituinte 3,5-dimetil-isoxazol dificultar a formação da ligação peptídica esperada, uma vez que os compostos já apresentavam em sua estrutura outros dois grupamentos volumosos: um anel tiofeno no intermediário **(8)** e um anel 3,5-dimetil-isoxazol no intermediário **(11)**. Os compostos finais foram obtidos sem dificuldades nas reações com ácido-4-bromo-benzóico **(21)** na presença de EDC, uma vez que o bromo contribuí com um volume estérico menor. O intermediário **(22)** foi cristalizado em meio de CH₂Cl₂, fornecendo o produto puro com 25% de rendimento e o intermediário **(24)** foi cristalizado em meio de acetato de etila, fornecendo o produto puro com 29% de rendimento. Os intermediários foram caracterizados por RMN de ¹H, APT (¹³C) e bidimensionais (HSQC e HMBC) (Tabela 5):

Tabela 5. Caracterização estrutural de (22) e (24) por RMN de ¹H e APT (¹³C) em DMSO-d₆.



Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	-	79,73	-	79,87
2, 3 e 4	1,45 (s, 9H)	28,04	1,45 (s, 9H)	28,08
5	-	153,22	-	153,42
6	8,74 (s, 1H)	-	8,83 (s, 1H)	-
7	-	129,46	-	131,36
8	7,64 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H)	123,97	7,66 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)	123,91
9	7,52 (m, 2H) *sinais coalescendo	122,87	7,23 (m, $J = 7.5$ Hz, 1H)	126,21
10	-	131,60	-	125,32

11	7,78 (m, 3H) *sinais coalescendo	123,15	7,51 (s, 1H)	126,73
12	-	129,59	-	129,63
13	9,99 (s, 1H)	-	9,94 (s, 1H)	-
14	-	164,73	-	164,69
15	-	133,39	-	133,47
16 e 20	7,94 (d, J = 8.5 Hz, 2H)	129,87	7,91 (d, J = 8.0 Hz, 2H)	129,87
17 e 19	7,78 (m, 3H)	131,46	7,77 (d, J = 8.0 Hz, 2H)	131,56
18	-	125,61	-	125,68
21	-	142,62	-	115,27
22	7,52 (m, 2H)	125,43	-	165,15
23	7,13 (dd, J = 5.1, 3.6 Hz, 1H)	128,51	2,42 (s, 3H)	11,35
24	7,45 (dd, J = 3.6, 1.0 Hz, 1H)	123,42	-	158,16
25			2,24 (s, 3H)	10,54

Destacam-se os sinais que caracterizam o núcleo em comum de ambos os compostos: os hidrogênios das posições 2, 3 e 4, que caracterizam as metilas do grupo protetor BOC foram caracterizadas como um simpleto com deslocamento químico em 1,45 ppm e integração para 9H. O carbono carbonílico da posição 5 apresenta deslocamento químico em 79 ppm. O hidrogênio da função amida na posição 13 foi caracterizado em 9,9 ppm como um simpleto com integração de 1H. A carboníla da amida na posição 14 apresentou um deslocamento químico de 164 ppm. Os carbonos quaternários na posição 15 e 18 apresentaram deslocamentos químicos em 133 e 125 ppm respectivamente em ambos intermediários. Os hidrogênios equivalentes do anel aromático nas posições 16 e 20 foram caracterizados como um duplete com $J = 8,5$ Hz para o composto **(22)** e $J = 8,0$ Hz para o composto **(24)**, deslocamento químico de 7,9 ppm e integração de 2H. Os hidrogênios nas posições 17 e 19 foram caracterizados como um multiplete para o composto **(22)**, pois os sinais

coalesceram com o sinal do hidrogênio 11 e como um duplete para o composto **(24)** com $J = 8,0$ Hz e integração de 2H. O hidrogênio aromático na posição 8 apresentou a seguinte caracterização: 7,6 ppm, duplete com $J = 8,5$ Hz e integração de 1H.

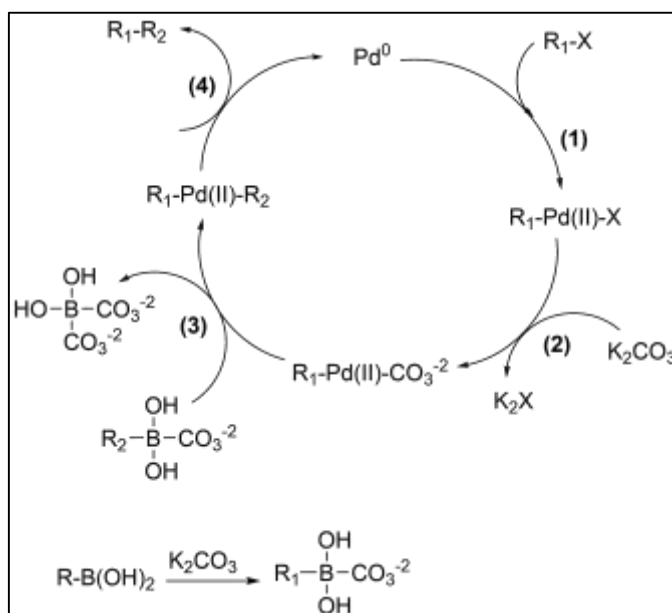
Para o composto **(22)** o hidrogênio aromático na posição 9 apresentou deslocamento em 7,52 ppm, um multiplete com integração para 2H, pois esse sinal coalesceu com o sinal do hidrogênio da posição 22 e o hidrogênio aromático na posição 11 apresentou deslocamento em 7,78 ppm, um multiplete com integração de 3H, pois esse sinal coalesceu com os sinais dos hidrogênios aromáticos das posições 17 e 19. Os sinais característicos do anel tiofeno apresentaram os seguintes deslocamentos químicos: 142,62 ppm para o carbono 21; o hidrogênio 22 como um multiplete em 7,52 ppm e integração de 2H; o hidrogênio 23 como um duplo duplete em 7,13 ppm e $J = 5,1$ e 3,6 Hz e integração de 1H e o hidrogênio 24 como um duplo duplete em 7,45 ppm e $J = 3,6$ e 1,0 Hz e integração de 1H.

Para o composto **(24)** o hidrogênio aromático na posição 9 apresentou 7,23 ppm, um multiplete com integração de 1H; e o hidrogênio na posição 11 apresentou deslocamento em 7,51 ppm como um simpleto com integração de 1H. Os sinais característicos do anel 3,5-dimetil-isoxazol apresentaram os seguintes deslocamentos químicos: 115,27 ppm para o carbono 21, 165,15 ppm para o carbono 22 e 158,16 ppm para o carbono 24. Os hidrogênios das metilas foram caracterizados em 2,24 ppm para os hidrogênios da posição 23 e 2,42 ppm para os hidrogênios da posição 26, sendo dois simpletos com integração de 3H cada. Os carbonos quaternários das quatro estruturas foram atribuídos com auxílio do experimento de APT (^{13}C) e HMBC; e com auxílio do HSQC os hidrogênios foram correlacionados com seus respectivos carbonos em J_1

A reação de acoplamento cruzado de Suzuki foi empregada para a formação de **(23')** e **(25')**, partindo dos intermediários **(22)** e **(24)** (Figura 30). Quanto a reatividade desses compostos, os intermediários **(22)** e **(24)** possuem um bromo estrutura que em comparação a outros halogênios como o iodo e o cloro, apresenta menor e maior reatividade respectivamente na etapa de adição oxidativa (Figura 31) (MIYARUA; SUZUKI, 1995). Os intermediários **(22)** e **(24)** possuem uma amida substituída ao anel aromático na posição *para* em relação ao átomo de bromo. A presença de um grupo desativante no anel favorece a etapa adição oxidativa (Figura

31) e tornam esses compostos mais reativos (MIYARUA; SUZUKI, 1995). O catalisador de paládio (0) empregado, o $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, é um reagente clássico, comumente utilizado nas reações de Suzuki e relativamente estável quando em contato com o ar (MIYARUA; SUZUKI, 1995). No geral, as reações de Suzuki apresentam diferentes possibilidades em termos de condições experimentais, não sendo afetadas pela presença de água e não gerando subprodutos tóxicos (MIYARUA; SUZUKI, 1995).

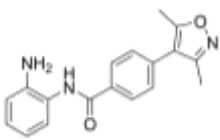
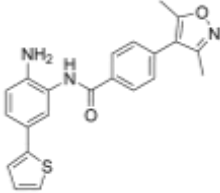
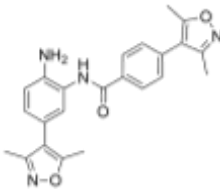
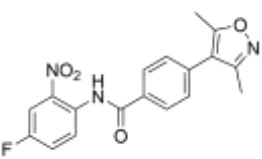
Figura 31. Mecanismo do acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura. A etapa (1) chamada de adição oxidativa, consiste na formação do intermediário de Pd(II) ligado ao grupo R_1 e um halogênio (X). A segunda etapa (2) consiste na substituição do halogênio (X) por um ânion proveniente da base utilizada (K_2CO_3), formando um segundo intermediário de Pd(II). Em seguida, na etapa de transmetalção (3), o intermediário borônico formado proveniente de uma reação paralela com o ânion CO_3^{2-} leva a inserção de R_2 no intermediário de Pd(II). A última etapa (4), a eliminação redutiva, leva a formação do produto de Suzuki (R_1-R_2) e restituição do catalisador de Pd.



Fonte: Adaptado de MIYARUA; SUZUKI, 1995.

Após sintetizados, os compostos **(20)**, **(23)**, **(25)** e **(26)** foram purificados e caracterizados. O composto **(20)** foi purificado por cristalização em CH_2Cl_2 ; o composto **(23)** e **(25)** foram purificados por meio de extração líquido/líquido e o composto **(26)** foi purificado por cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™, utilizando a coluna Biotage® SNAP ULTRA 10g (HP-Sphere 25 μm), por um método isocrático com hexano e acetato de etila como eluentes nas proporções 6:4. O rendimento global, faixa de fusão e aspecto dos compostos foram resumidos na Tabela 6.

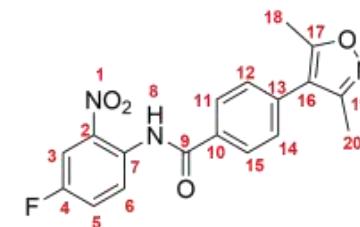
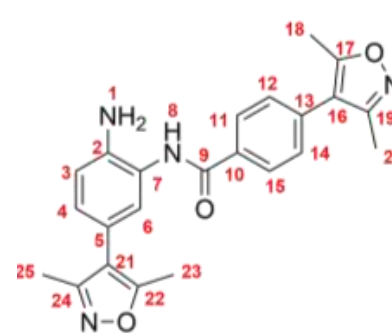
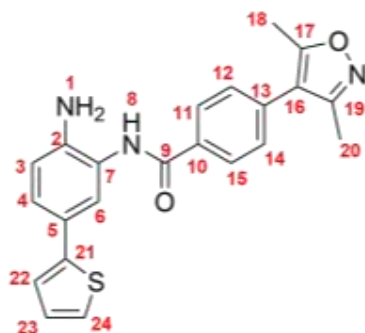
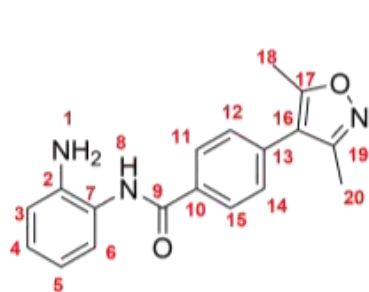
Tabela 6. Resumo dos dados de rendimento global, faixa de fusão e aspecto dos compostos (20), (23), (25) e (26).

	(20)	(23)	(25)	(26)
				
Rendimento global (%)	58%	46%	46%	61%
Faixa de fusão (°C)	240-247 °C	92-96 °C	85-88 °C	134-140 °C
Aspecto	Sólido de cor lilás	Sólido de cor bege	Sólido de cor marrom	Sólido de cor marrom

Os compostos apresentaram rendimentos globais semelhantes. Os compostos (20) e (26) foram sintetizados em 4 etapas enquanto que os compostos (23) e (25) foram sintetizados em 6 etapas. O composto (20) teve um rendimento de 15% na etapa de acoplamento com o uso de EDC, o composto (26), com o uso de HATU, obteve um rendimento de 26%. Os compostos (23) e (25) apresentaram 25 e 29% de rendimento com o uso de EDC. Esses rendimentos foram os maiores obtidos para a metodologia sintética empregando esse agente acoplante, o que pode sugerir que o acoplamento com um ácido carboxílico menos impedido estericamente, como o ácido-4-bromo-benzóico (21), tenha favorecido a formação do produto.

Quanto a elucidação estrutural os compostos da série acetamida foram caracterizados por RMN de ^1H , APT (^{13}C) e bidimensionais (HSQC e HMBC) (Tabela 7).

Tabela 7. Caracterização estrutural de (20), (23), (25) e (26) por RMN de ^1H e APT (^{13}C) em DMSO-d_6 .



Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	4,91 (s, 2H)	-	5,19 (s, 2H)	-	5,15 (s, 1H)	-	-	-
2	-	123,28	-	122,22	-	123,22	-	134,68
3	6,79 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H)	116,22	6,82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H)	116,33	7,19 (m, 1H)	127,00	8,77 (dd, $J = 4.4, 1.4$ Hz, 1H)	151,48
4	6,61 (m, 1H)	116,39	7,31 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H)	124,02	7,00 (dd, $J = 8.2; 2.0$ Hz, 1H)	127,05	-	143,37
5	6,98 (m, 1H)	126,73	-	123,07	-	117,17	7,52 (m, 3H) *sinais coalescendo	121,31

6	7,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H)	126,89	7,47 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H)	124,04	6,87 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz, 1H)	116,03	8,54 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.4, 1.4 Hz, 1H)	129,13
7	-	143,32	-	143,12	-	142,60	-	124,90
8	9,74 (<i>s</i> , 1H)	-	9,80 (<i>s</i> , 1H)	-	9,77 (<i>s</i> , 1H)	-	-	-
9	-	165,07	-	165,07	-	165,69	-	167,04
10	-	133,61	-	133,06	-	133,07	-	134,49
11 e 15	8,07 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H)	128,41	8,10 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H)	128,71	8,08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H)	128,19	7,52 (<i>m</i> , 3H)	129,29
12 e 14	7,53 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H)	128,82	7,55 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H)	128,37	7,55 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H)	128,56	8,02 (<i>m</i> , 2H)	130,10
13	-	133,07	-	128,8	-	133,48	-	129,67
16	-	115,52	-	115,42	-	115,43	-	115,31
17	-	165,79	-	165,67	-	165,04	-	165,89
18	2,44 (<i>s</i> , 3H)	11,52	2,45 (<i>s</i> , 3H)	11,44	2,44 (<i>s</i> , 3H)	11,08	2,44 (<i>s</i> , 3H)	11,49
19	-	158,23	-	158,10	-	158,11	-	158,07
20	2,26 (<i>s</i> , 3H)	10,61	2,28 (<i>s</i> , 3H)	10,52	2,27 (<i>s</i> , 3H)	10,24	2,25 (<i>s</i> , 3H)	10,55
21			-	144,23	-	115,88		
22			7,35 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5.1, 0.9 Hz, 1H)	123,24	-	164,02		

23		7,05 (<i>dd</i> , $J = 5.0$, 3.6 Hz, 1H)	128,23	2,38 (s, 3H)	10,97	
24		7,24 (<i>dd</i> , $J = 3.5$, 0.8 Hz, 1H)	121,03	-	158,22	
25				2,21 (s, 3H)	10,25	

Destacam-se os sinais que caracterizam o núcleo em comum da série isoxazol, presente nas quatro estruturas: os hidrogênios das metilas do anel 3,5-dimetil-isoxazol nas posições 18 e 20 com deslocamentos químicos em 2,44 e 2,25 ppm aproximadamente, dois simpletos com integração para 3H; o carbono quaternário ligado diretamente ao átomo de oxigênio no anel isoxazólico na posição 7 com deslocamento em 165 ppm; e o carbono quaternário ligado diretamente ao átomo de nitrogênio no anel isoxazólico com deslocamento em 158 ppm. Os carbonos quaternários na posição 10 e 16 apresentam deslocamentos em 133 e 115 ppm respectivamente. Os hidrogênios aromáticos nas posições 11 e 15 são equivalentes, caracterizados como um duplete com deslocamento químico em 8 ppm, $J = 8,2$ Hz para os compostos **(20)** e **(25)** e $J = 7,6$ Hz para o composto **(23)**; com integração de 2H. O sinal dos hidrogênios 11 e 15 coalesceram com o sinal do hidrogênio na posição 5 da molécula no composto **(26)**, sendo, portanto, um multiplete com integração de 3H. Os hidrogênios aromáticos 12 e 14 foram caracterizados como um duplete, com deslocamento em 7,5 ppm e $J = 8,2$ Hz para **(20)** e **(25)** e $J = 7,9$ Hz para **(23)**. A carboníla da amida na posição 9 apresentou um deslocamento químico de 165 ppm aproximadamente e o hidrogênio da amida na posição 8 foi caracterizado como um simpleto com deslocamento em 9 ppm e integração de 1H. Os hidrogênios da amina primária na posição 1 foram caracterizados como um simpleto em deslocamentos entre 4,91 – 5,15 e integração de 2H.

Para o composto **(20)** os hidrogênios aromáticos nas posições 3, 4, 5 e 6 foram caracterizados respectivamente: um duplo duplete, com deslocamento em 6,79 ppm e $J = 8,0$ e 1,3 Hz, com integração para 1H; dois multipletos em 6,61 ppm e 6,98 ppm com integração de 1H cada e um duplete em 7,17 ppm com $J = 7,3$ Hz e integração para 1H.

Para o composto **(22)**, os hidrogênios aromáticos nas posições 3, 4, e 6 foram caracterizados respectivamente: um duplete em 6,82 ppm com $J = 8,4$ Hz e integração para 1H; um duplo duplete em 7,31 com $J = 8,4$ e 2,1 Hz com integração para 1H e um duplete em 7,47 ppm com $J = 1,8$ Hz e integração para 1H. Os sinais característicos do anel tiofeno nas posições 21, 22, 23 e 24 foram caracterizados respectivamente: um carbono quaternário com deslocamento químico em 144,23 ppm; um duplo duplete em 7,35 ppm com $J = 5,1$ e 0,9 Hz e integração de 1H; um duplo duplete em 7,05 ppm com $J = 5,0$ e 3,6 Hz e integração de 1H e um duplo

duplete em 7,24 ppm com $J = 3,5$ e $0,8$ Hz e integração de 1H.

Para o composto **(25)** os hidrogênios aromáticos nas posições 3, 4, e 6 foram caracterizados respectivamente: um multiplete em 7,19 ppm com integração de 1H; um duplo duplete em 7,00 ppm com $J = 8,2$ e $2,0$ Hz e integração de 1H e um duplete em 6,87 ppm com $J = 8,2$ Hz e integração de 1H. Os hidrogênios 25 e 23 foram caracterizados respectivamente: dois simpletos em 2,38 e 2,21 ppm com integração de 3H. Os carbonos das posições 24 e 22 apresentaram deslocamentos em 158,22 e 164,02 ppm respectivamente.

Para o composto **(26)** os hidrogênios aromáticos nas posições 3, 5 e 6 foram caracterizados respectivamente: um duplo duplete em 8,77 ppm com $J = 4,4$ e $1,4$ Hz com integração de 1H; um multiplete em 7,52 com integração de 3H pois esse sinal coalesceu com o sinal dos hidrogênios 11 e 15; um duplo duplete em 8,54 ppm com $J = 8,4$ e $1,4$ Hz com integração de 1H.

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV) demonstrou a presença de bandas de absorção indicando grupos químicos característicos dos compostos JRL-5, 6 e 7, representados na Tabela 8:

Tabela 8. Caracterização por espectrofotometria na região do infravermelho dos grupos químicos presentes na estrutura química dos compostos (20), (23) e (25).

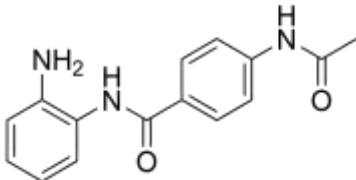
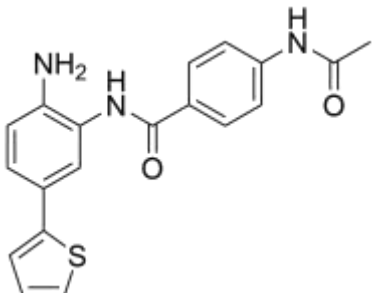
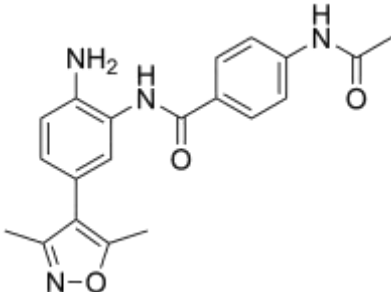
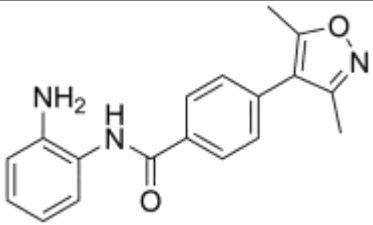
Tipo de vibração	(20)	(23)	(25)
	cm ⁻¹		
ν NH ₂	3448,72	3462,22	3446,79
ν C=O (amida)	1635,64	1653,00	1647,21
ν C=C (aromáticos)	1602,85	1558,48	1618,28
δ C-N-H (amida)	1541,12	1541,12	1558,48
ν C=C (aromáticos)	1458,18	1506,41	1506,41
δ_s CH ₃ (anel isoxazol)	1398,39	1404,18	1398,39
ν C-N (aminas aromáticas)	1305,81	1313,52	1313,52

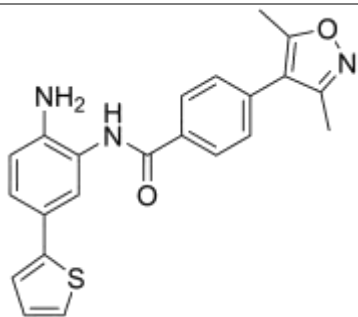
4.4 Avaliação enzimática dos compostos finais

As avaliações enzimáticas dos seis compostos finais **(4)**, **(9)**, **(12)**, **(20)**, **(23)**, **(25)**; e dos intermediários **(14)** e **(26)** foram realizadas frente a capacidade de inibição para as HDACs de classe I (HDAC-1, 2 e 3) e para BRD4. Todos os compostos foram avaliados na mesma concentração (10 μ M) e comparados com um padrão para HDAC

(SAHA) e BRD4 (JQ1). Os resultados dos ensaios de inibição enzimática são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da avaliação enzimática dos compostos frente as enzimas HDAC-1, 2 e 3 e BRD4.

Composto	% de Inibição			
	HDAC-1	HDAC-2	HDAC-3	BRD-4
 (4) – CI994	89	82	77	0
 (9)	95	91	18	14
 (12)	8	10	3	25
 (20)	75	72	57	21



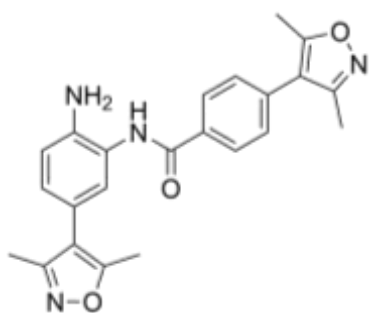
(23)

95

88

16

17



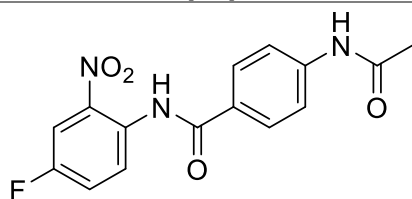
(25)

8

10

3

25



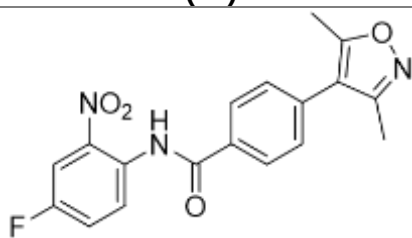
(14)

15

8

5

5



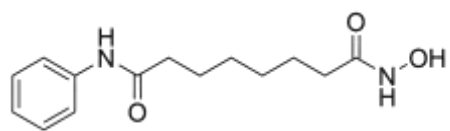
(26)

9

5

1

9



Vorinostat

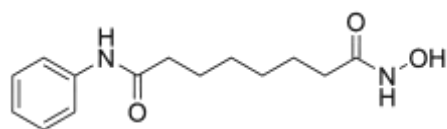
90

-

90

-

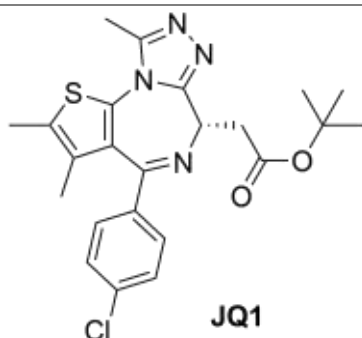
SAHA **



Vorinostat

-	89	-	-
---	----	---	---

SAHA ***



JQ1

-	-	-	88
---	---	---	----

JQ1 ****

*O composto (25) está em etapa de avaliação enzimática. **SAHA (vorinostat) na concentração de 0,5 uM foi usado como padrão frente as enzimas HDAC-1 e HDAC-3. ***SAHA (vorinostat) na concentração de 0,1 uM foi usado como padrão frente as enzimas HDAC-2. ****JQ1 na concentração de 2,5 uM foi usado como padrão frente BRD4.

Ao comparar os compostos **(4)** e **(9)** evidencia-se a diferença na ocupação entre as cavidades de HDAC-1 e 2 e HDAC-3, em que o grupo tiofeno no composto **(9)** conseguiu gerar seletividade para a molécula frente HDAC-1 e 2, uma vez que esse grupo é capaz de ocupar a cavidade adicional de 14 Å presente nessas isoformas. O composto **(4)** apresentou capacidade de inibir as três enzimas potencialmente.

Os compostos **(12)** e **(25)** apresentaram valores de inibição fracos frente as HDACs 1, 2 e 3, indicando que o substituinte 3,5-dimetil-isoxazol não é capaz de ocupar devidamente as cavidades dessas enzimas provavelmente por conta do volume estérico gerado pela presença das duas metilas substituídas no anel. Apesar de não ser um protótipo potencial para inibição de HDAC, ambos os compostos apresentaram a melhor porcentagem de inibição frente a BRD4, o que pode indicar que essa posição em que o anel aromático foi substituído com o grupo 3,5-dimetil-isoxazol é mais favorecida, podendo ser um ponto chave a ser explorado em futuras otimizações.

Os compostos **(20)** e **(23)**, derivados da série isoxazol, mantiveram os valores de inibição para HDAC-1, 2 e 3 próximos aos seus pares da série acetamida, **(4)** e **(9)** respectivamente. Ao comparar os compostos **(20)** e **(4)**, evidencia-se um ganho de 0% de para 21% de inibição para BRD4 quando o grupo 3,5-dimetil-isoxazol foi inserido na estrutura. Ao comparar **(23)** com **(9)** um pequeno aumento na inibição para BRD4 também foi notado, de 14 para 17%. Esses ganhos justificam que a inserção do grupo 3,5-dimetil-isoxazol foi responsável por fornecer as moléculas da série isoxazol a característica de inibir BRD4. Os compostos da série acetamida apresentaram menor ou nenhuma inibição frente a BRD4, justificando que a série isoxazol é a melhor candidata para o planejamento de compostos duais.

Os compostos intermediários **(14)** e **(26)** apresentaram baixos valores de inibição para as HDACs 1, 2 e 3 e BRD4, indicando que a presença do grupo nitro na estrutura não favorece as interações necessárias no sítio dos alvos seja pela carga do grupo e/ou volume estérico desfavorável. Dessa forma, é necessário a redução do nitro em amina para posteriores avaliações.

Visando a aplicação desses compostos como agentes reversores de latência, justifica-se a necessidade de um estudo individual de cada estrutura, com destaque para **(20)** e **(23)**, com o objetivo de avaliar efetivamente a relevância de uma inibição mais seletiva (HDAC-1 e 2) ou se de fato, a inibição frente a HDAC-3 deve ser priorizada. Além disso, avaliar o quanto a inibição de BRD4 em conjunto com a inibição de HDAC pode atuar em sinergia favorecendo a reativação do HIV latente.

5. CONCLUSÃO

O planejamento estrutural com o uso da estratégia de modelagem molecular levou a oito compostos, que de acordo com o modelo, foram capazes de interagir com os sítios de HDAC-2 e BRD4.

Dos oito compostos planejados, seis foram sintetizados com rendimentos globais entre 58 a 46%; e dois intermediários sintéticos com rendimentos entre 61 a 72%. A caracterização estrutural realizada por meio de RMN uni e bidimensional e espectroscopia de infravermelho, sugere a obtenção das moléculas.

As avaliações enzimáticas demonstraram que os compostos da série isoxazol apresentaram as maiores inibições frente a BRD4 quando comparado com a série acetamida. Os compostos **(12)** e **(25)** também demonstraram que o grupo 3,5-dimetil-isoxazol não é capaz de ocupar a cavidade de HDAC-1, 2 e 3 por apresentar porcentagem de inibição de 8, 10, 3%; e 2, 5, 0%, respectivamente para essas enzimas. Esses compostos também apresentaram a maior porcentagem de inibição frente BRD4 (25%), indicando que a posição em que o anel 3,5-dimetil-isoxazol foi substituído na molécula foi a mais favorecida em relação ao reconhecimento do sítio de BRD4.

Os compostos **(20)** e **(23)** obtiveram resultados potenciais quanto sua capacidade de inibir HDAC-1, 2 e 3 e BRD4, sendo o composto **(23)** mais seletivo para HDAC- 1 e 2 com porcentagem de inibição de 92 e 88% respectivamente. O composto **(20)** foi capaz de inibir HDAC-1,2 e 3 com porcentagem de inibição de 75, 72 e 57% respectivamente. Os compostos também apresentaram porcentagem de inibição de 21 e 17% frente BRD4.

Os intermediários **(14)** e **(26)** não apresentaram bons resultados de inibição frente aos alvos HDAC -1,2,3 e BRD4, indicando que o grupo nitro nas estruturas não é adequado para gerar as interações necessárias no sítio dessas enzima e proteína.

Com os resultados da avaliação enzimática, de maneira geral, destaca-se que os compostos **(20)** e **(23)** são protótipos adequados para otimização estrutural visando um aumento na porcentagem de inibição frente aos alvos definidos e futuramente serem avaliadas quanto sua capacidade em atuar como agentes reversores de latência para HIV.

6. REFERÊNCIAS

- ARCHIN, N. M. *et al.*, Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors. **AIDS**, v. 23, n. 14, p. 1799-1806, 2009.
- ARCHIN, N. M. *et al.*, Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 8, p. 3126-3135, 2017.
- BANERJEE, C. *et al.*, BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 1147-1154, 2012.
- BARREIRO, E. J. *et al.*, Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997
- BARTON, K. M. *et al.*, Selective HDAC Inhibition for the Disruption of Latent HIV-1 Infection. **PLOS One**. v. 9, n. 8, 2014.
- BOEHM, D. *et al.*, BET bromodomain-targeting compounds reactivate HIV from latency via a Tat-independent mechanism. **Cell Cycle**, v. 12, n. 3, p. 452-462, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/gestores/painel-de-indicadores-epidemiologicos>. Acesso em: 10 jan. 2019
- CAO, F.; ZWINDERMAN, M. R. H.; DEKKER, F. J. The process and strategy for developing selective histone deacetylase 3 inhibitors. **Molecules**, v. 23, n. 551, 2018.
- CARY, D. C.; FUJINAGA, K.; PETERLIN, M. Molecular mechanisms of HIV latency. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 126, n. 2, p. 448-454, 2016.
- CARLINO, L.; RASTELLI, G.; Dual kinase-bromodomain inhibitors in anticancer drug discovery: a structural and pharmacological perspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 59, p. 9305-9320, 2016.
- CIHLAR, T.; FORDYCE, M. Current status and prospects of HIV treatment. **Current Opinion in Virology**, v.18; p. 50-56, 2016.
- CILLO, A. R.; MELLORS, J. W.; Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1? **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 14-19, 2016.
- DAVEY JR, 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, 1999.

DOUEK, D. C. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature**. v. 417, p. 95-98, 2002.

DEEKS, S. G. *et al.*, Towards an HIV cure: a global scientific strategy. **Nature Reviews Immunology**. v. 12, n.8, p. 607-614, 2012.

DEEKS, S. G. *et al.*, HIV infection. **Nature Reviews**, v. 1, n. 15035, 2015.

FISCHL, M. A. *et al.*, The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. **New England Journal of Medicine**. v. 317, n. 4, 1987.

FINZI, D. *et al.*, Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. **Science**, v. 278, p. 1295-1300, 1997.

FINZI, D. *et al.*, Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. **Nature Medicine**. n. 5, p. 512-517, 1999.

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

GAO, S. *et al.*, Design, synthesis and anti-tumor activity study of novel histone deacetylase inhibitors containing isatin-based caps and o-phenylenediamine-based zinc binding groups. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, cap. 12, v. 25, p. 2981-2994, 2017.

HEWINGS, D. S. 3,5-Dimethylisoxazoles act as acetyl-lysine-mimetic bromodomain ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 6761-6770, 2011.

HOLSON, E.; WAGNER, F. F.; STAHLY, G. P. **Solid forms of tacedinaline**. Broad Institute, Inc. Cambridge, MA (US). no.US8691875B2. Depósito: 15 Set. 2012. Concessão: 25 Abr. 2013.

KEEDY, K. S. *et al.*, A limited group of class I histone deacetylases acts to repress human immunodeficiency virus type 1 expression. **Journal of Virology**. v. 83, n. 10, p. 4749-4756, 2009.

LAUFFER, B. E. *et al.*, Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 26926-26943, 2013.

LI, Z. *et al.*, The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing BRD4 inhibition of Tat-transactivation. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 277-287, 2013.

LIU, Z. *et al.*, **Drug discovery targeting bromodomain-containing protein 4**. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, p. 4533-4558, 2017.

MCKEOWN, M. R. *et al.*, Biased multicomponent reactions to develop novel bromodomain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, p. 9019-9027, 2014.

MORADEI, O. M. *et al.*, Novel aminophenyl benzamide-type histone deacetylase inhibitors with enhanced potency and selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, p. 5543-5546, 2007.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 21, p. 6523-6543, 2005

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands – medicinal chemistry strategies and challenges. *Current Pharmaceutical Design*, v. 15, n. 6, p. 587-600, 2009.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, v. 61, p. 10827-10852, 2005.

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. *Lancet HIV*, v. 1, p.13-21, 2014.

SANT'ANNA, C. M. R.; Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

Secretaria da Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde - Brasil. Boletim epidemiológico. HIV AIDS 2018. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hivaids-2018>. Acesso em: 6 de nov. 2019.

SILICIANO, J. D. *et al.*, Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Medicine*, v. 9, n. 6, p. 727-728, 2003.

SILICIANO, R. F.; GREENE, W. C. HIV Latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. v. 1, n. 1, 2011.

Schrödinger, **LigPrep**, New York, 2017

Schrödinger, **Maestro**, New York; 2017

Schrödinger, **Glide**, New York, 2017

MIYAURA, N.; SUZUKI, Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. **American Chemical Society**, v. 95, p. 2457-2483, 1995.

THORLUND, K. *et al.*, Landscape review of current HIV 'kick-and-kill' cure research – some kicking, not enough killing. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 595, 2017.

THOMAS, M. *et al.*, Synthesis and biological evaluation of glucuronide prodrugs of the histone deacetylase inhibitor CI-994 for application in selective cancer chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 8109-8116, 2008.

UNAIDS. Fact sheet – Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic. Disponível em: http://www.unaids.org/en/resources/documents/2018/UNAIDS_FactSheet>. Acesso em: 6 nov. 2019

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 606-631, 2009.

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, 1996.

YANG, Z. *et al.*, Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. **Molecular Cell**, v. 19, n. 4, p. 535-545, 2005.

YENI, P. Update on HAART in HIV. **Journal of Hepatology**, v. 44, p. 100-103, 2006.

YUSUF, D. *et al.*, An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, p. 1411-422.

XING, S.; SILICIANO, R. F.; Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication, **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 541-551, 2003.

WATSON, P. J.; FAIRALL, L.; SANTOS, G. M.; SCHWABE, J. W. Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. **Nature**, v. 481, p. 335-340, 2012.

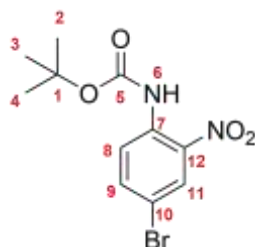
WAGNER, F. F. *et al.*, An isochemogenic set of inhibitors to define the therapeutic potential of histone deacetylases in β -cell protection. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 363-374, 2015.

WAGNER, F. F.; WEIWER, M.; LEWIS, M. C.; HOLSON, E. B. Small molecule inhibitors of zinc-dependent histone deacetylases. **Neurotherapeutics**, v. 10, p. 589-604, 2013.

ZHAN, P. *et al.*, Anti-HIV drug discovery and development: current innovations and future trends. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2849-287

APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS SINTÉTICOS

i) terc-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes hexano:acetato de etila nas proporções 9:1.

Rendimento: 29%

Aspecto: Sólido de cor verde

Faixa de fusão: 99-101 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,69 (s, 1H); 8,13 (d; J = 2.3 Hz, 1H); 7,86 (dd; J = 8.8, 2.4 Hz, 1H); 7,59 (d; J = 8.8 Hz, 1H); 1,43 (s; 9H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 131,62 (C12); 136,35 (C11); 114,49 (C10); 127,15 (C9); 124,45 (C8); 141,33 (C7); 151,93 (C5); 27,5 (C2,3,4); 80,4 (C1) ppm.

Figura 32. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *terc-butil* (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato

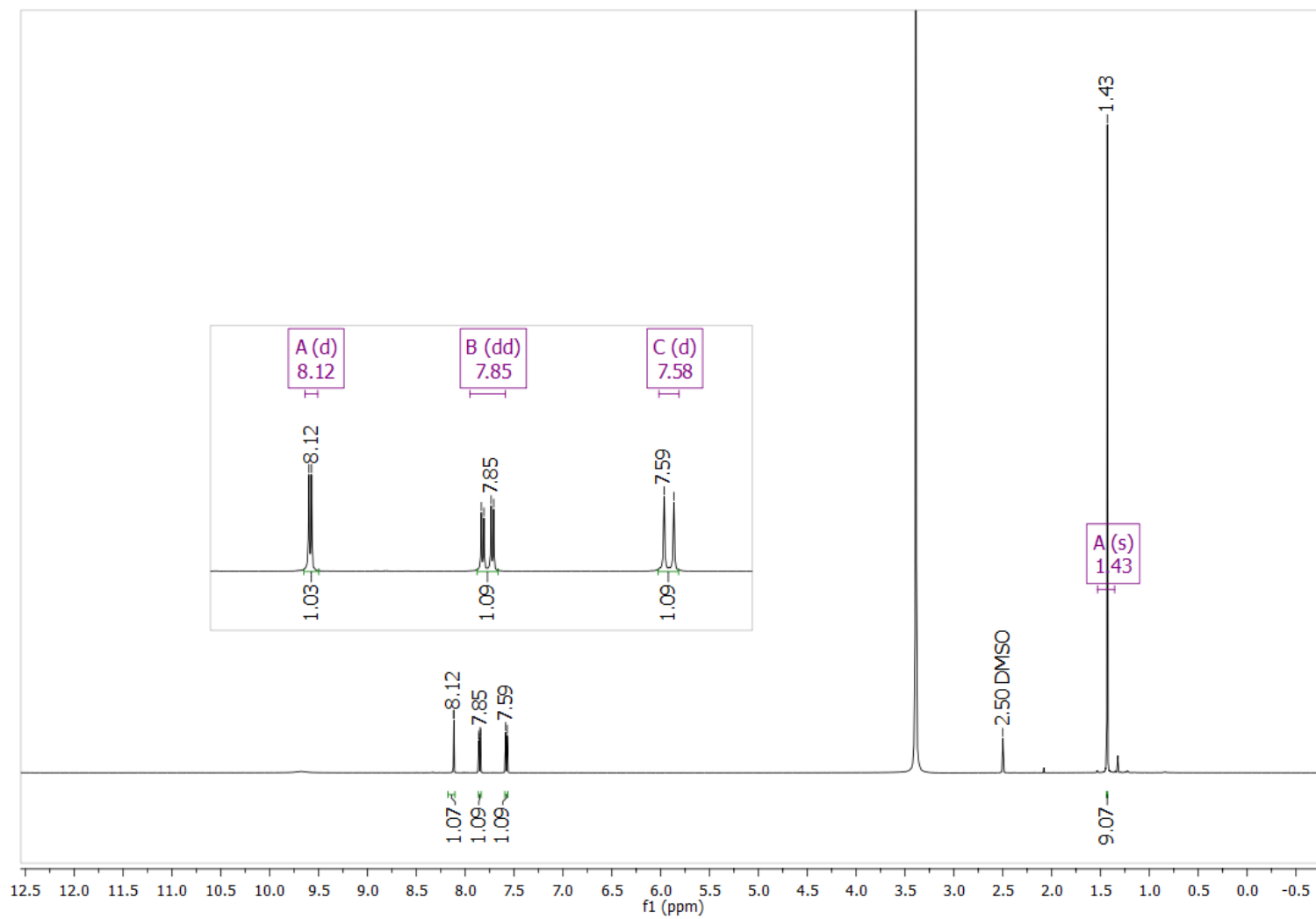
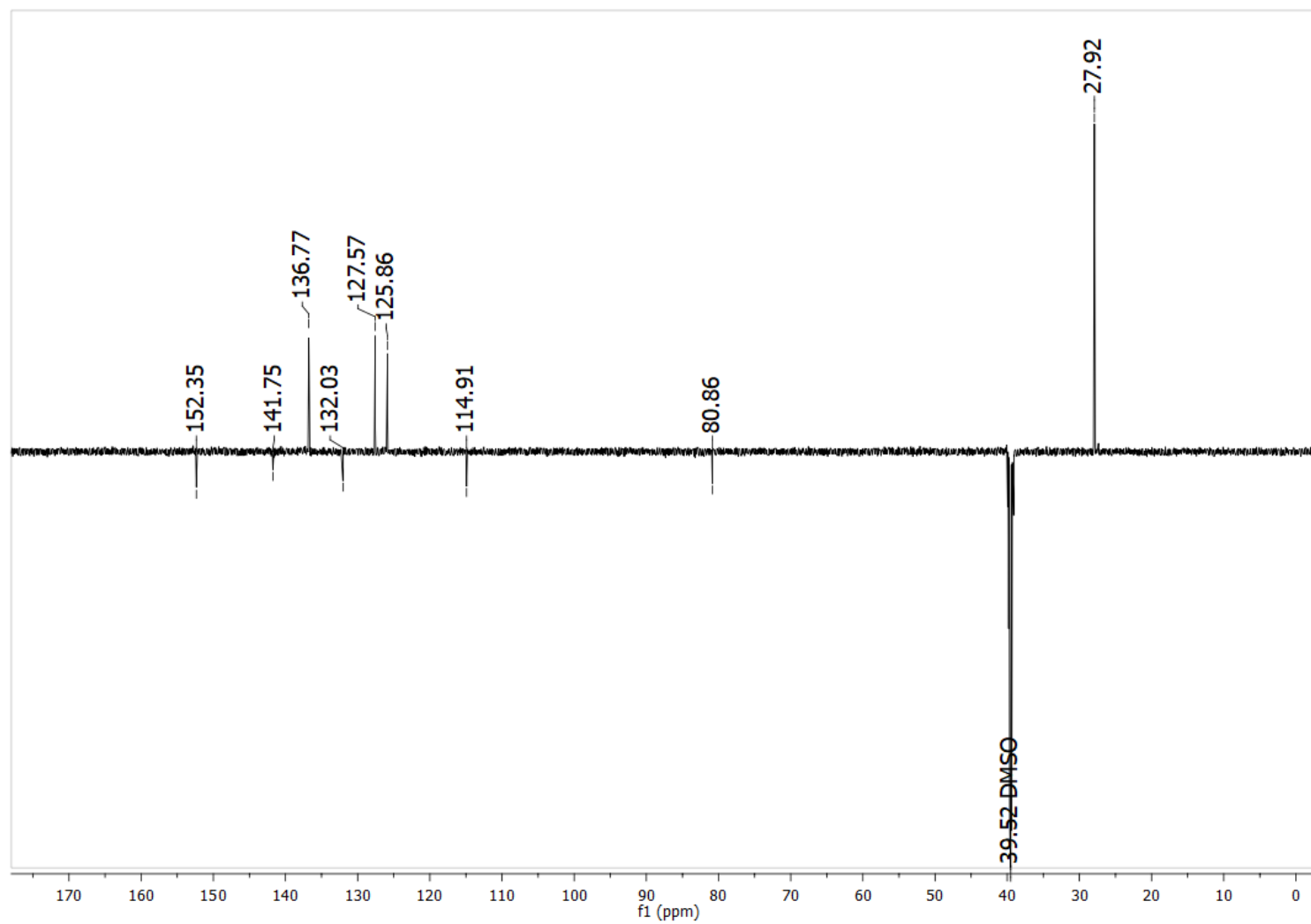
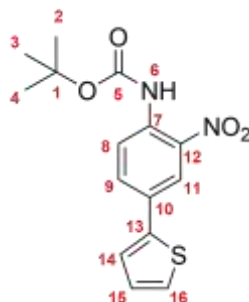


Figura 33. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto *terc*-butil (4-bromo-2-nitrofenil)carbamato.



ii) Terc-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes hexano:acetato de etila nas proporções 8:2.

Rendimento: 59%

Aspecto: Sólido de cor amarela

Faixa de fusão: 126-128 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 9,65 (s; 1H); 8,14 (d; $J = 2.2$ Hz, 1H); 7,94 (dd; $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H); 7,69 (d; $J = 8.6$ Hz, 1H); 7,62 (m); 7,16 (dd; $J = 5.0, 3.6$ Hz, 1H); 1,45 (s; 9H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 121,70 (C16); 129,26 (C15); 125,10 (C14); 140,98 (C13); 131,11 (C12); 131,89 (C11); 130,12 (C10); 127,16 (C9); 125,45 (C8); 141,84 (C7); 152,81 (C5); 28,34 (C2,3,4); 81,11 (C1) ppm.

Figura 34. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *terc*-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato

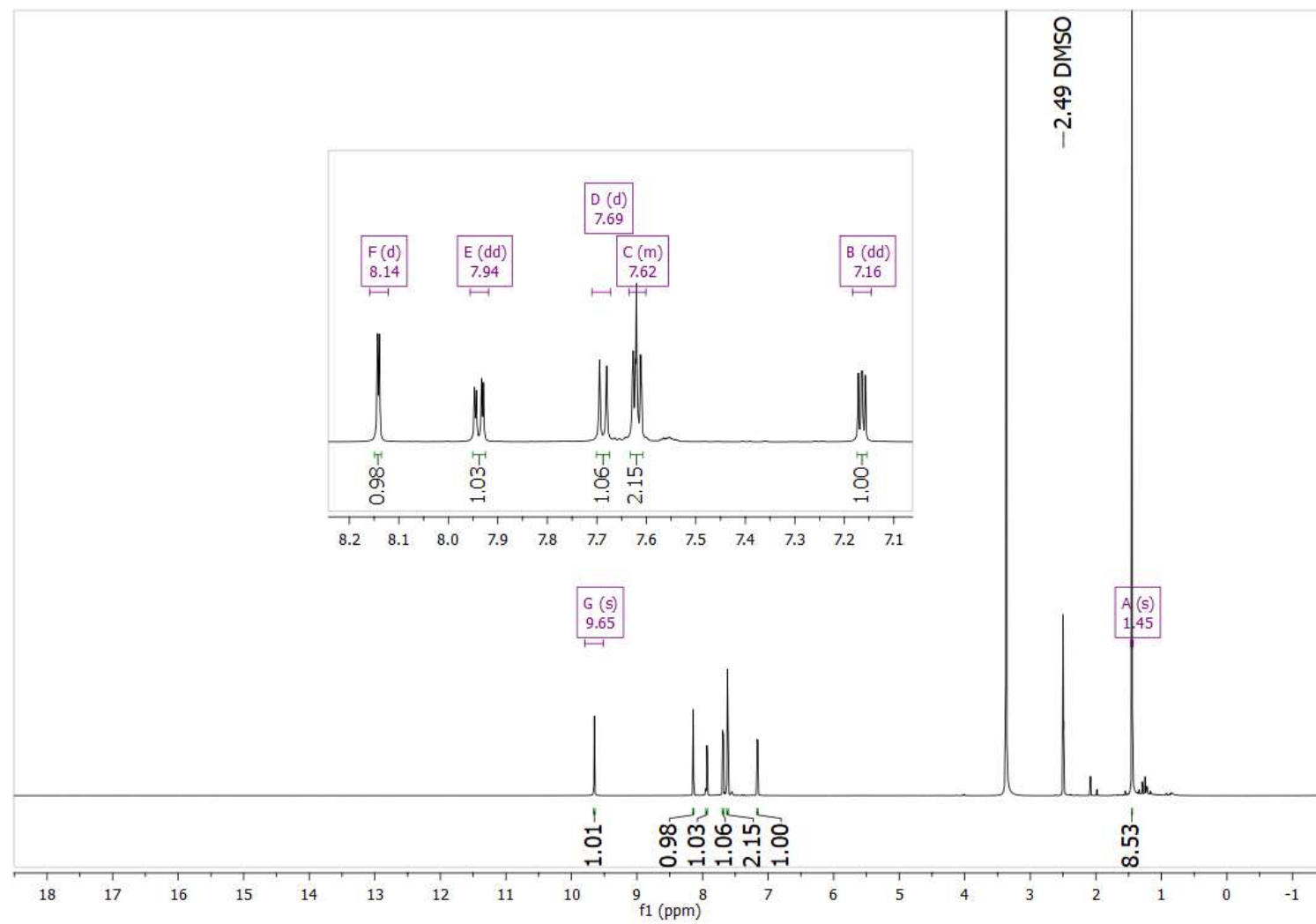
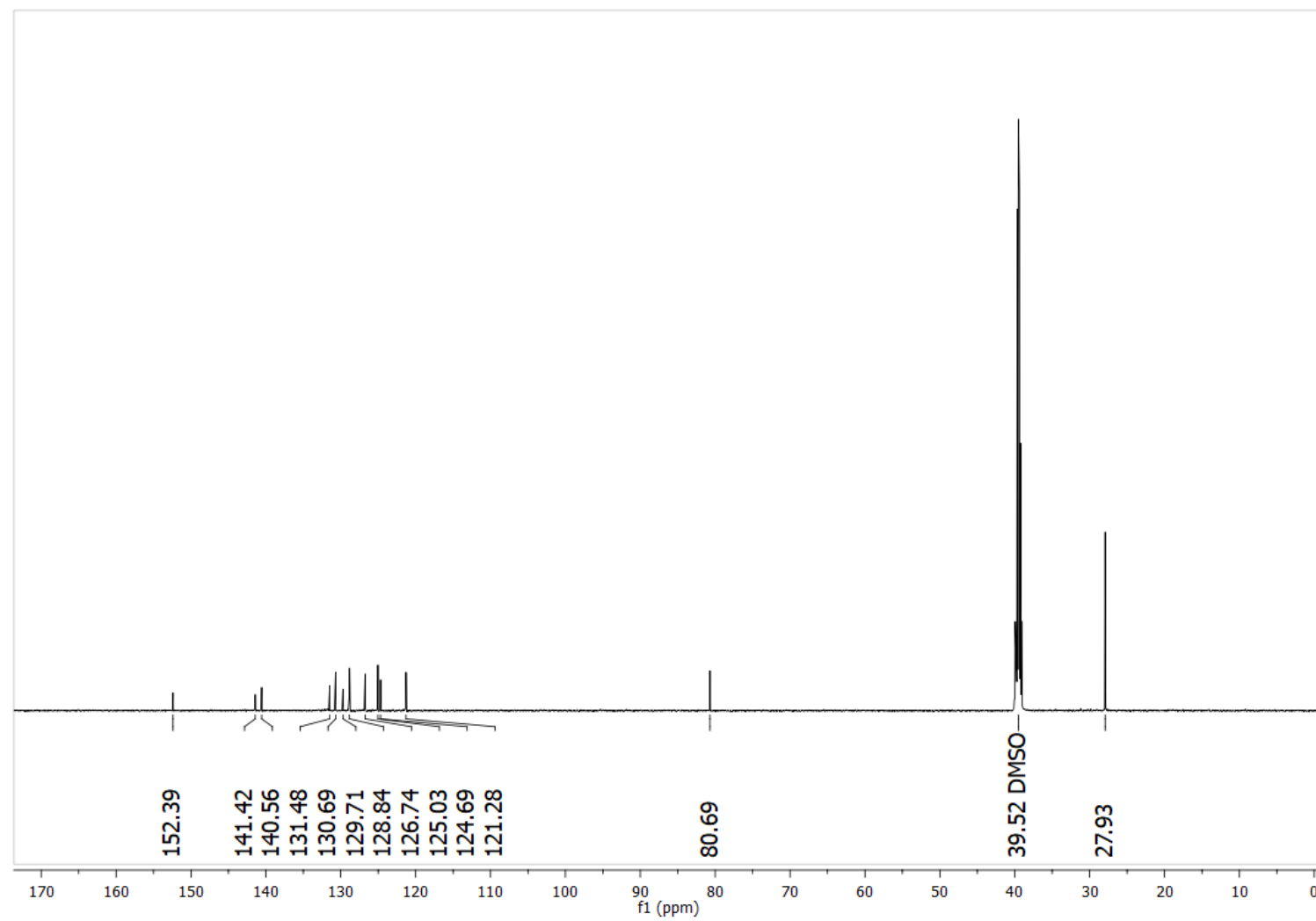
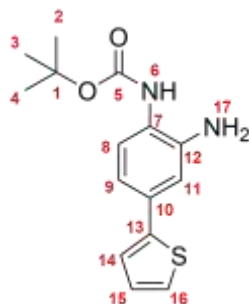


Figura 35. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto *terc*-butil-2-nitro-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato



iii) Terc-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes hexano:acetato de etila nas proporções 7:3.

Rendimento: 47%

Aspecto: Sólido de cor bege

Faixa de fusão: 154-157 °C

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 8,35 (s; 1H); 7,44 (d; *J* = 5.0, 1H); 7,29 (d; *J* = 3.4 Hz, 1H); 7,27 (d; *J* = 7.3 Hz, 1H); 6,98 (d; *J* = 1.9 Hz, 1H); 6,84 (dd; *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H); 7,08 (m); 5,01 (s, 2H); 1,46 (s; 9H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 124,67 (C16); 128,3 (C15); 122,5 (C14); 144,0 (C13); 123,5 (C12); 112,5 (C11); 130,30 (C10); 125,03 (C9); 113,7 (C8); 141,31 (C7); 153,60 (C5); 28,23 (C2,3,4); 79,0 (C1) ppm.

Figura 36. RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) do composto *terc*-butil-2-amino-4(*tiofen-2-il*)fenilcarbamato.

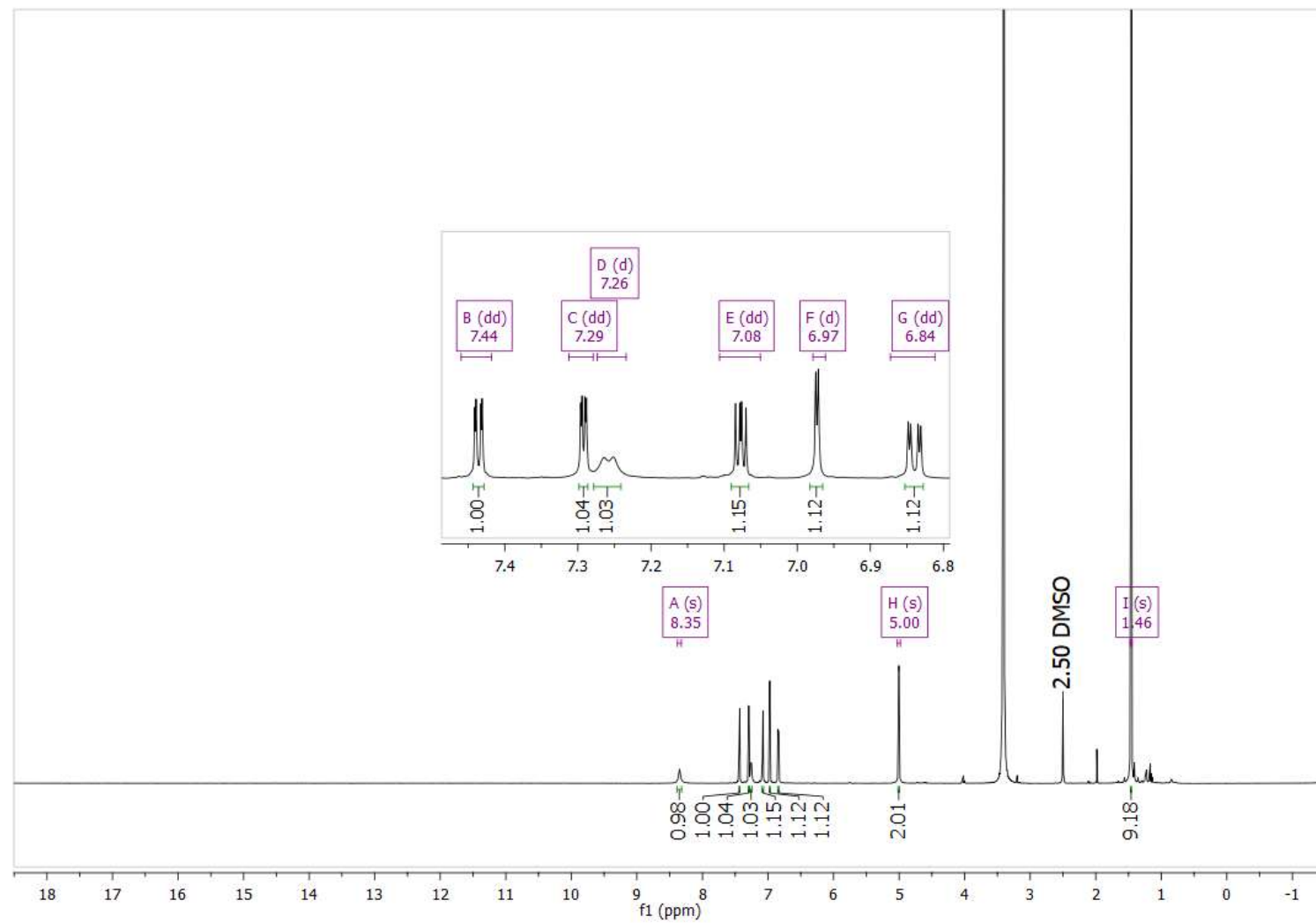


Figura 37. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto *terc*-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.

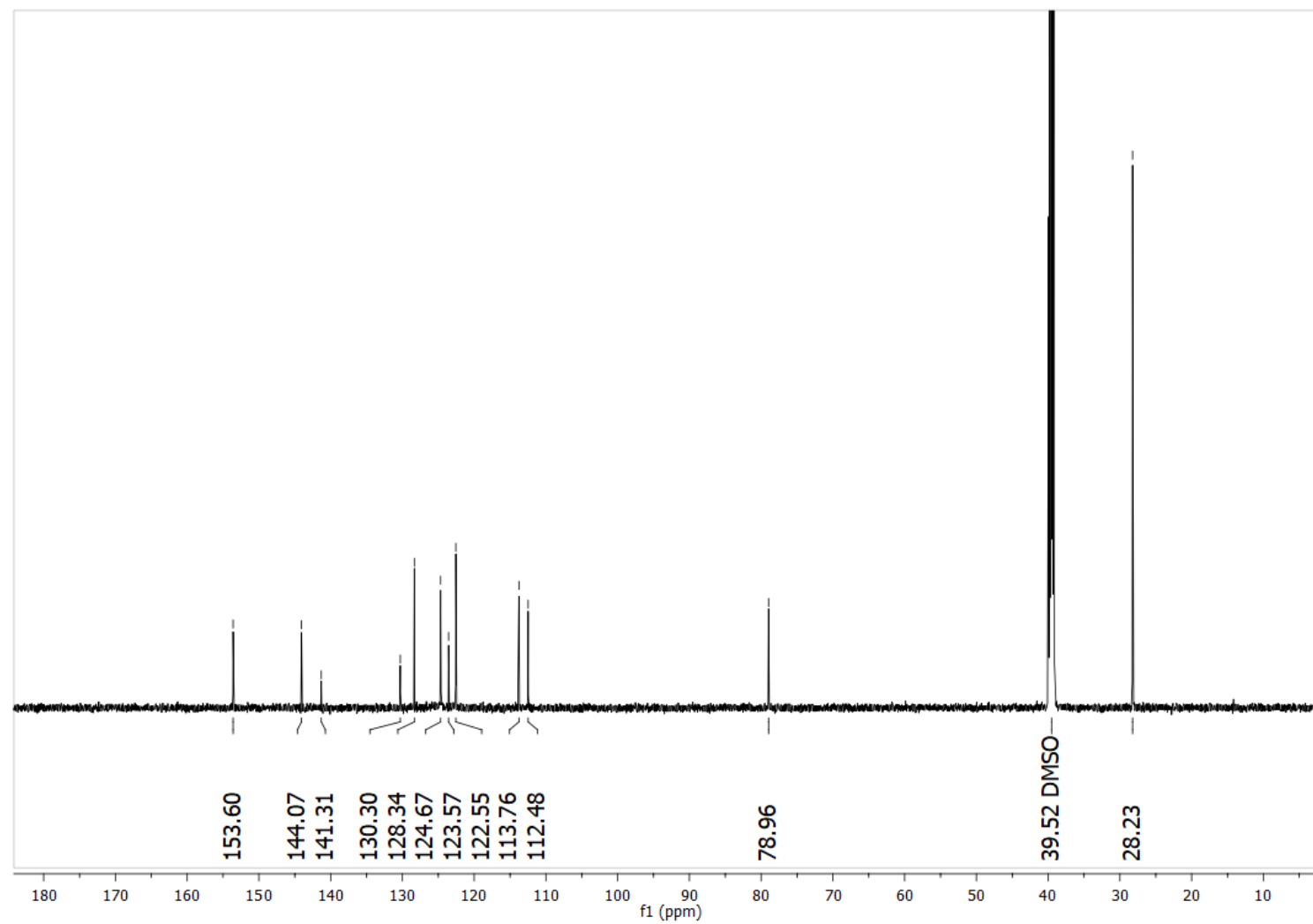


Figura 38. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *terc*-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.

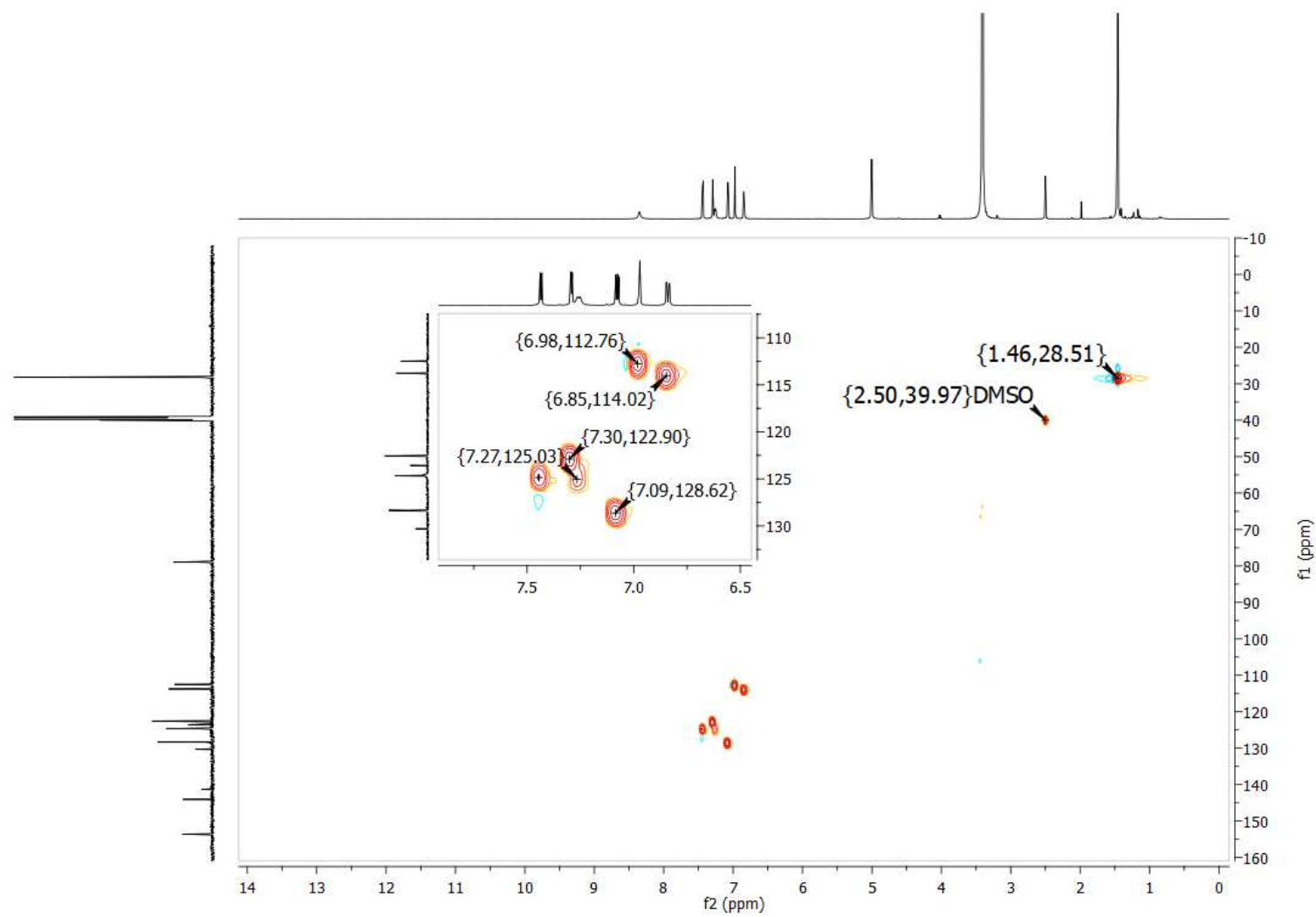
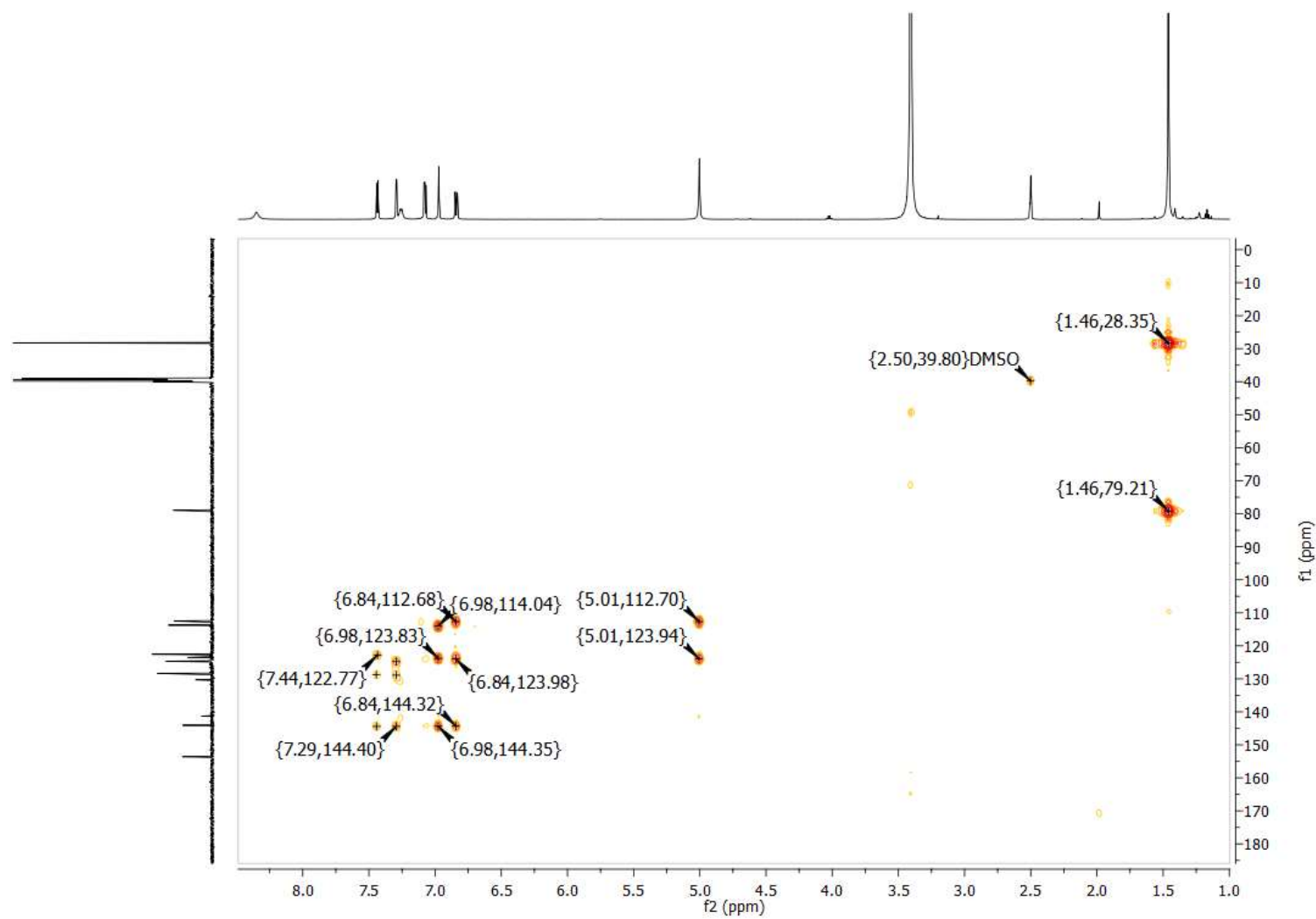
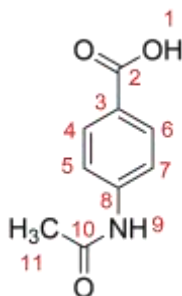


Figura 39. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *terc*-butil-2-amino-4(tiofen-2-il)fenilcarbamato.



iv) Ácido-4-acetamidobenzóico



Método de purificação: Cristalização em água.

Rendimento: 89%

Aspecto: Sólido de cor branca

Faixa de fusão: 260-263 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 10,25 (s, 1H); 7,87 (d, $J = 8.7$, 2H); 7,68 (d, $J = 8.7$, 2H); 2,08 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 24,61 (C11); 167,42 (C10); 125,33 (C8); 118,63 (C5,7); 130,84 (C4,6); 143,78 (C3); 169,38 (C2) ppm.

Figura 40. RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) do composto ácido 4-acetamidobenzóico.

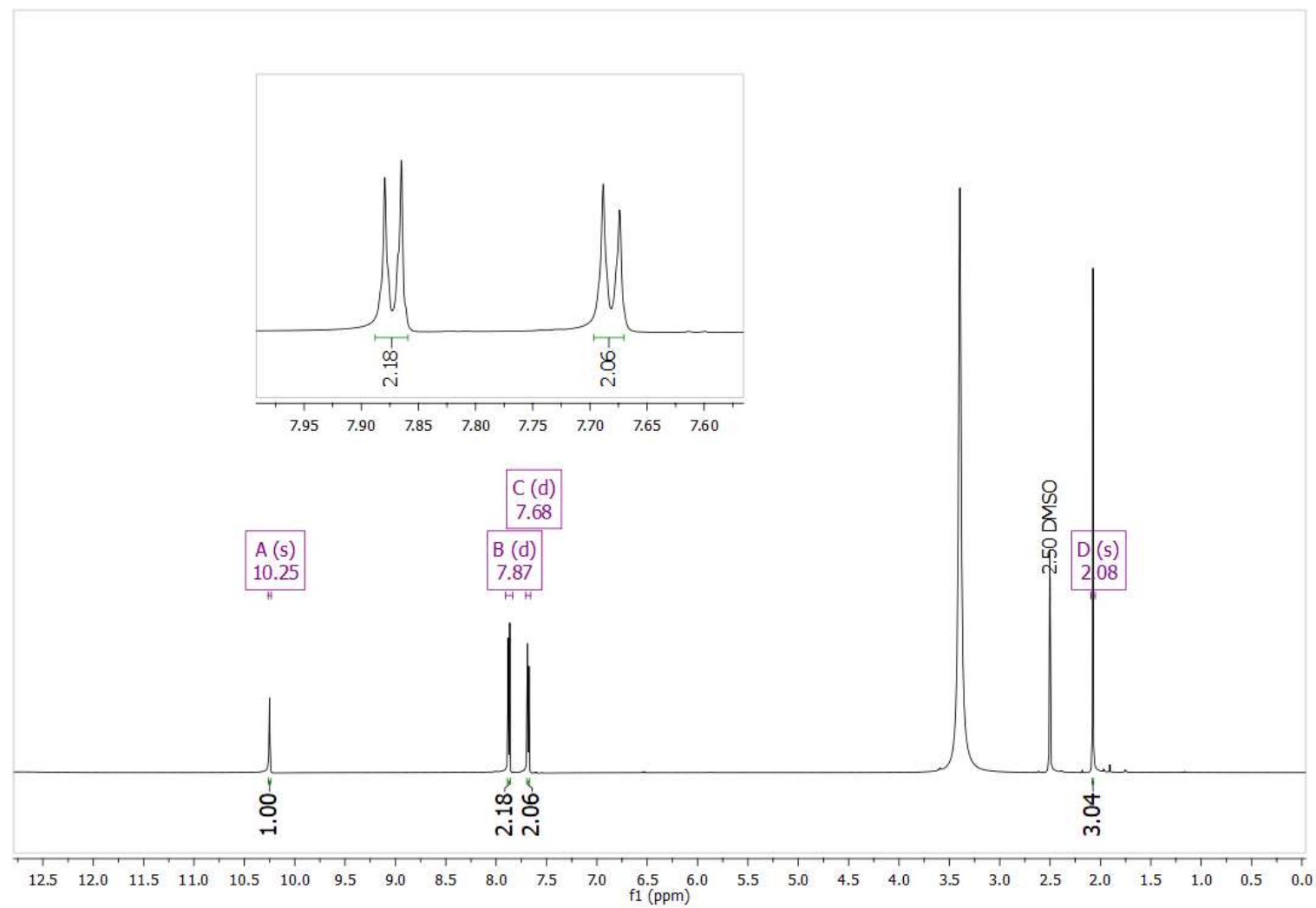
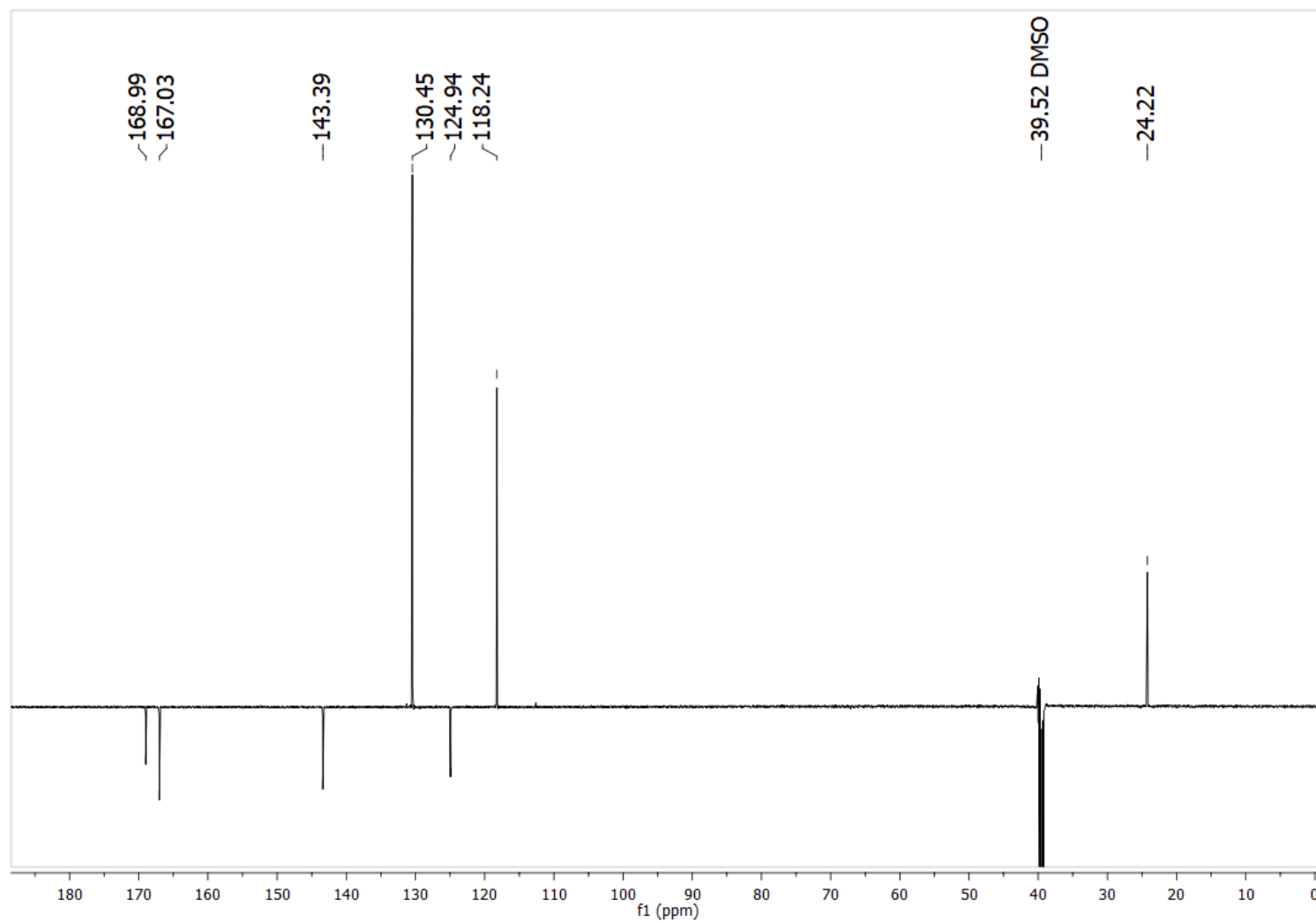
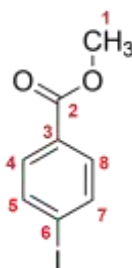


Figura 41. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto ácido 4-acetamidobenzóico.



v) 4-metil-iodo benzoato



Método de purificação: Extração líquido líquido.

Rendimento: 90%

Aspecto: Sólido de cor branca

Faixa de fusão: 109-113 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 7,91 (m, 2H); 7,70 (m, 2H); 3,84 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 131,31 (C5,7); 102,28 (C6); 138,26 (C4,8); 129,54 (C3); 166,36 (C2); 52,80 (C1) ppm.

Figura 42. RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) do composto metil-4-iodobenzoato.

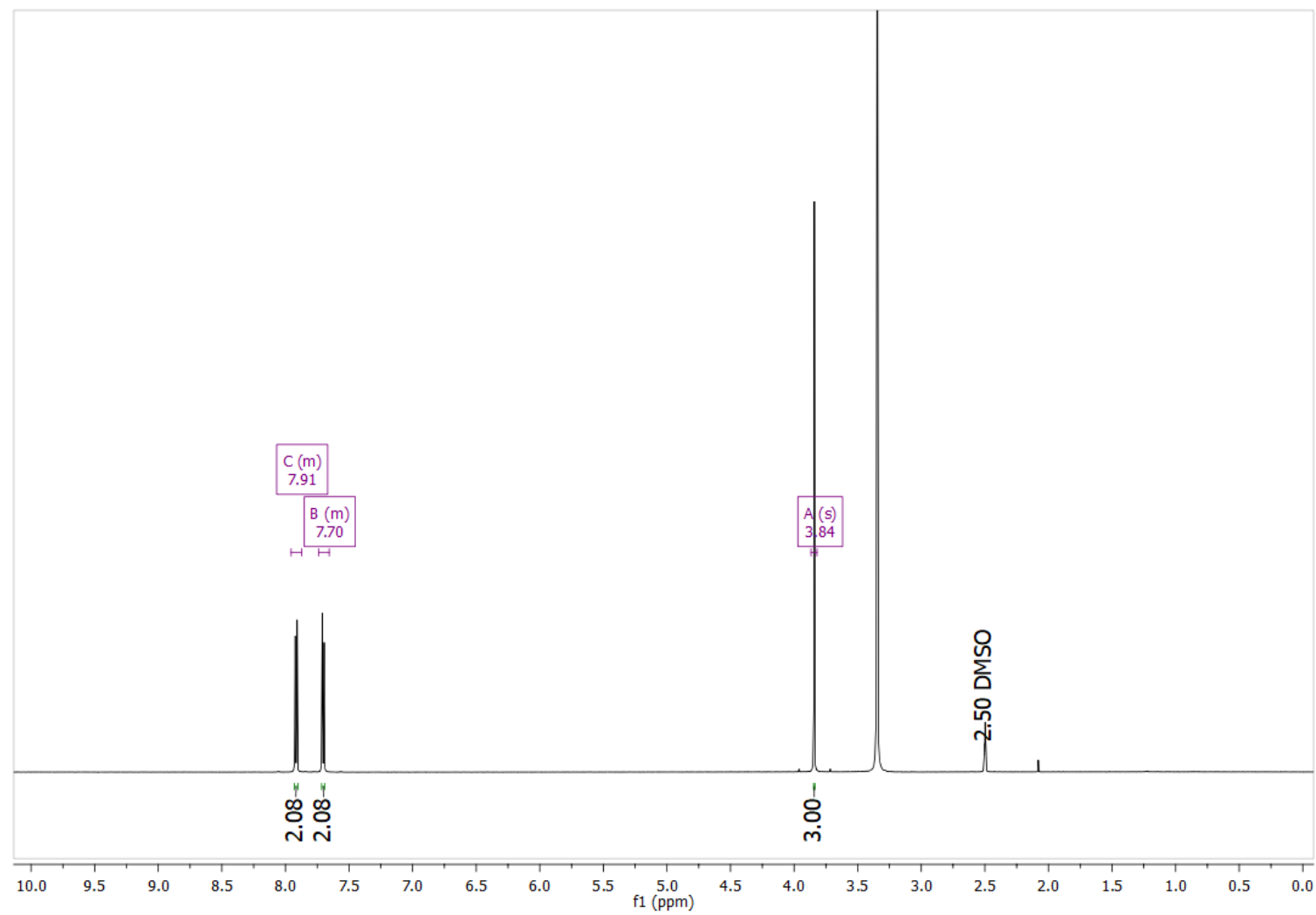
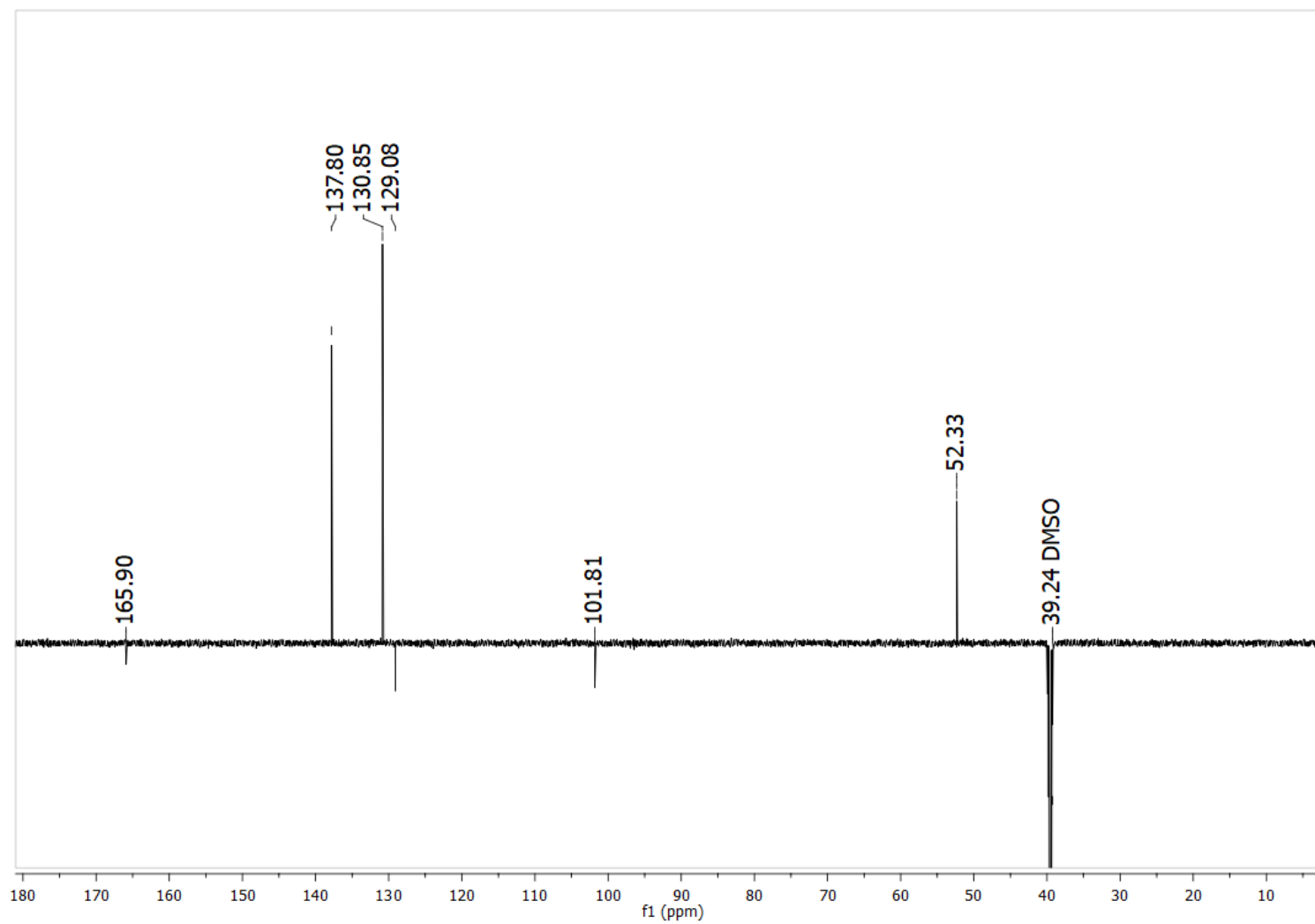
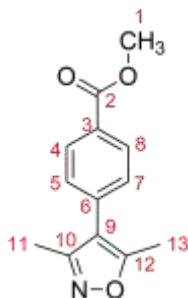


Figura 43. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto metil-4-iodobenzoato.



vi) 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila



Método de purificação: Coluna de bancada (15 cm de altura e 5 mm de diâmetro), com os eluentes éter de petróleo:acetato de etila nas proporções 8:2.

Rendimento: 64%

Aspecto: Sólido de cor amarela

Faixa de fusão: 84-87 °C

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 8,04 (m, 2H); 7,56 (m, 2H); 3,87 (s, 3H); 2,25 (s, 3H); 2,43 (s, 3H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 11,49 (C13); 165,99 (C12); 10,53 (C11); 158,03 (C10); 134,94 (C9); 138,26 (C5,7); 115,19 (C6); 131,31 (C4,8); 128,50 (C3); 165,97 (C2); 52,26 (C1) ppm.

Figura 44. RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila.

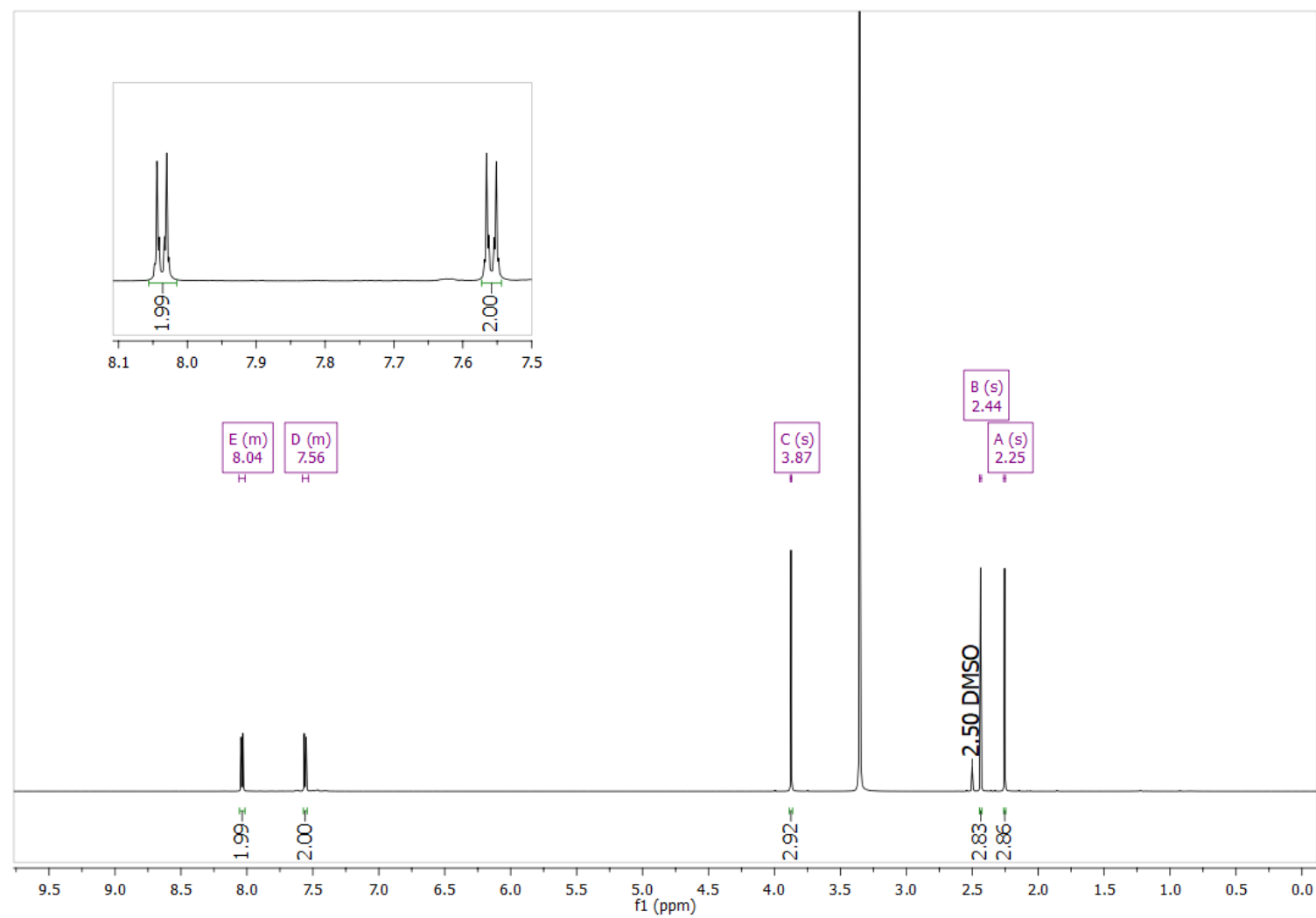
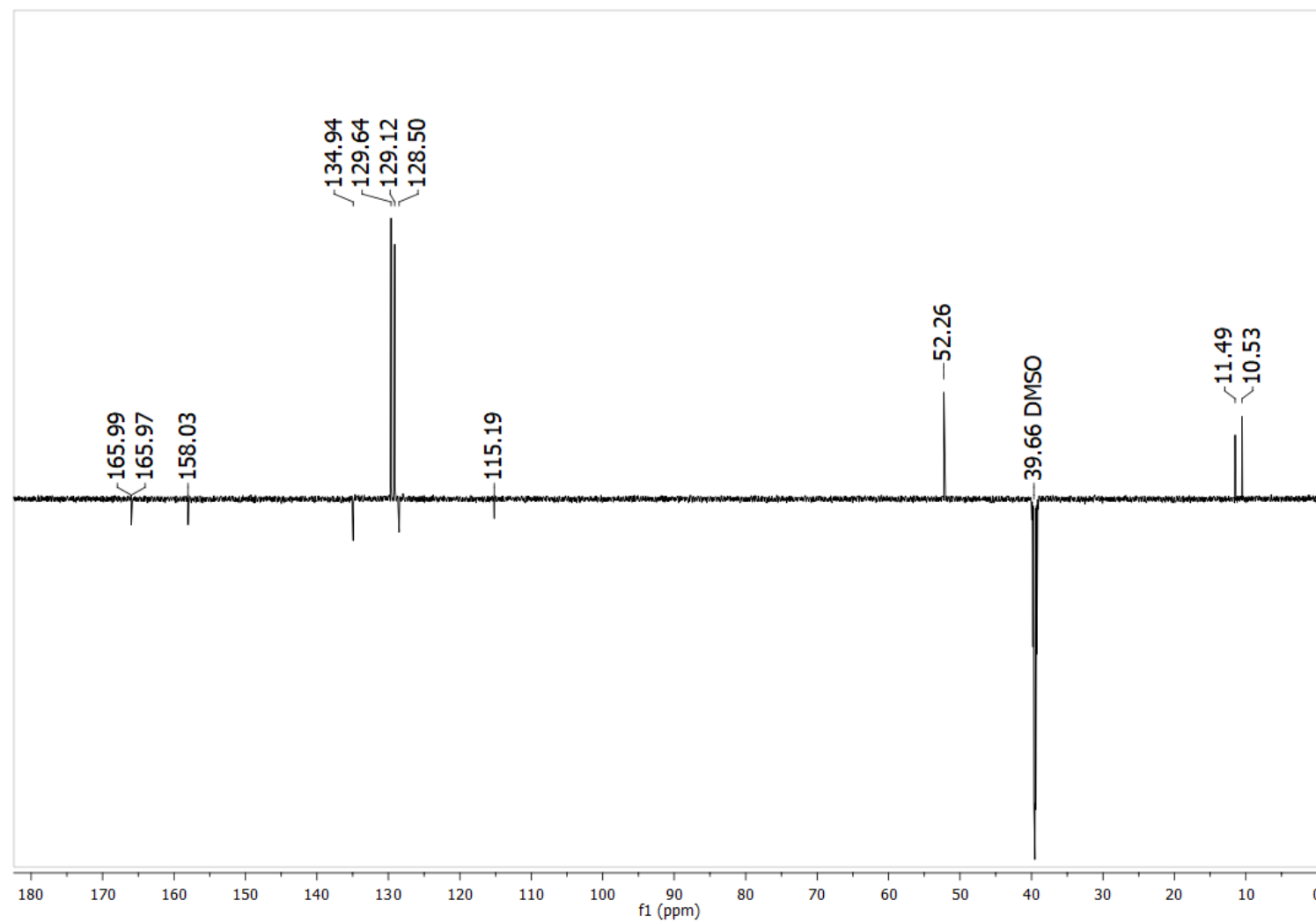
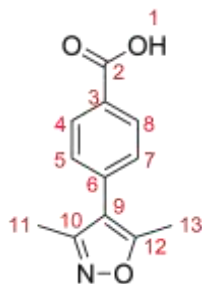


Figura 45. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzoato de metila



vii) ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico



Método de purificação: Extração líquido líquido.

Rendimento: 64%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: 187-190 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 8,02 (m, 2H); 7,53 (m, 2H); 2,43 (s, 3H); 2,25 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 11,52 (C13); 165,93 (C12); 10,58 (C11); 158,11 (C10); 134,52 (C9); 129,00 (C7,5); 115,34 (C6); 129,82 (C4,8); 129,69 (C3); 167,08 (C2) ppm.

Figura 46. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico

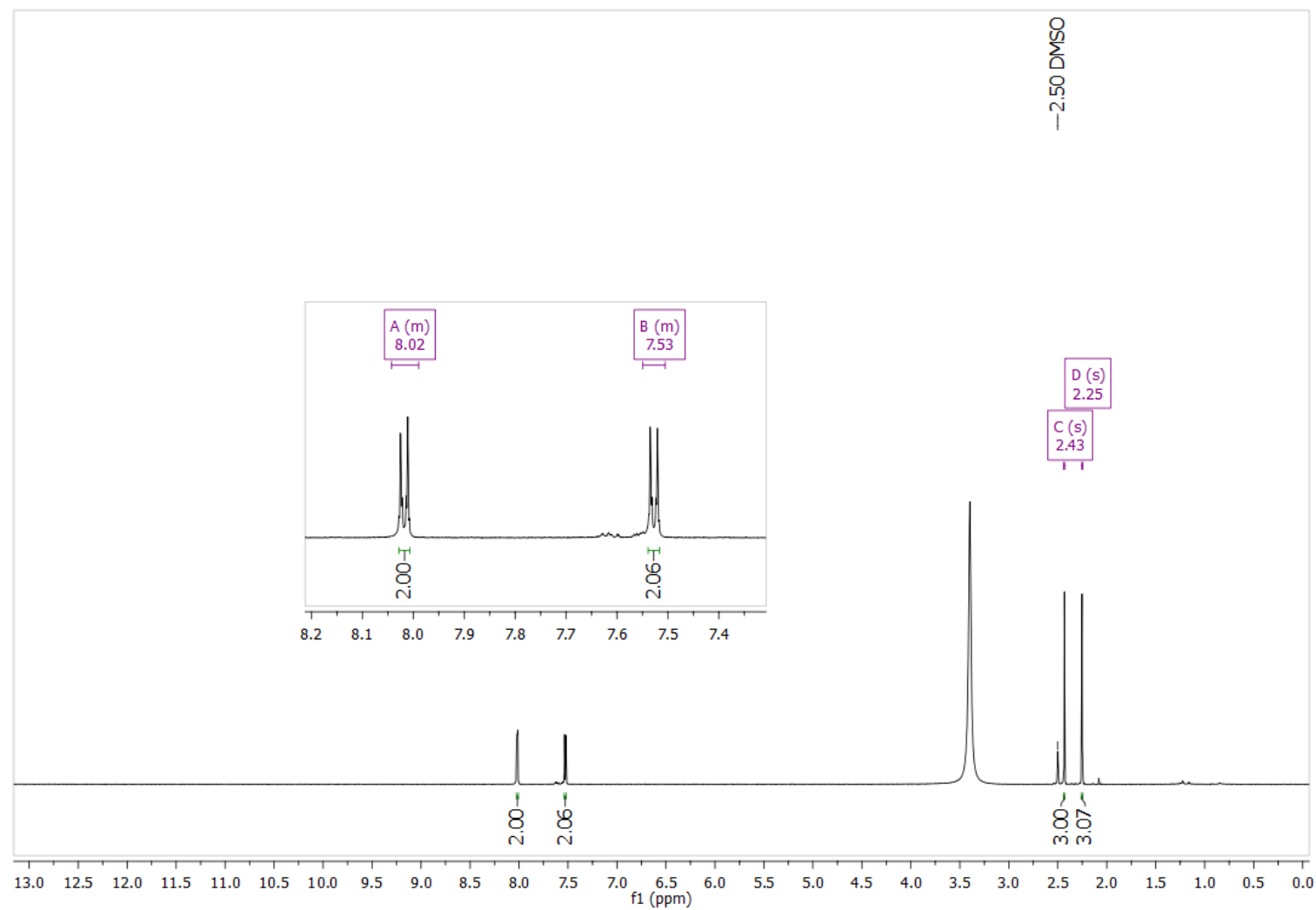
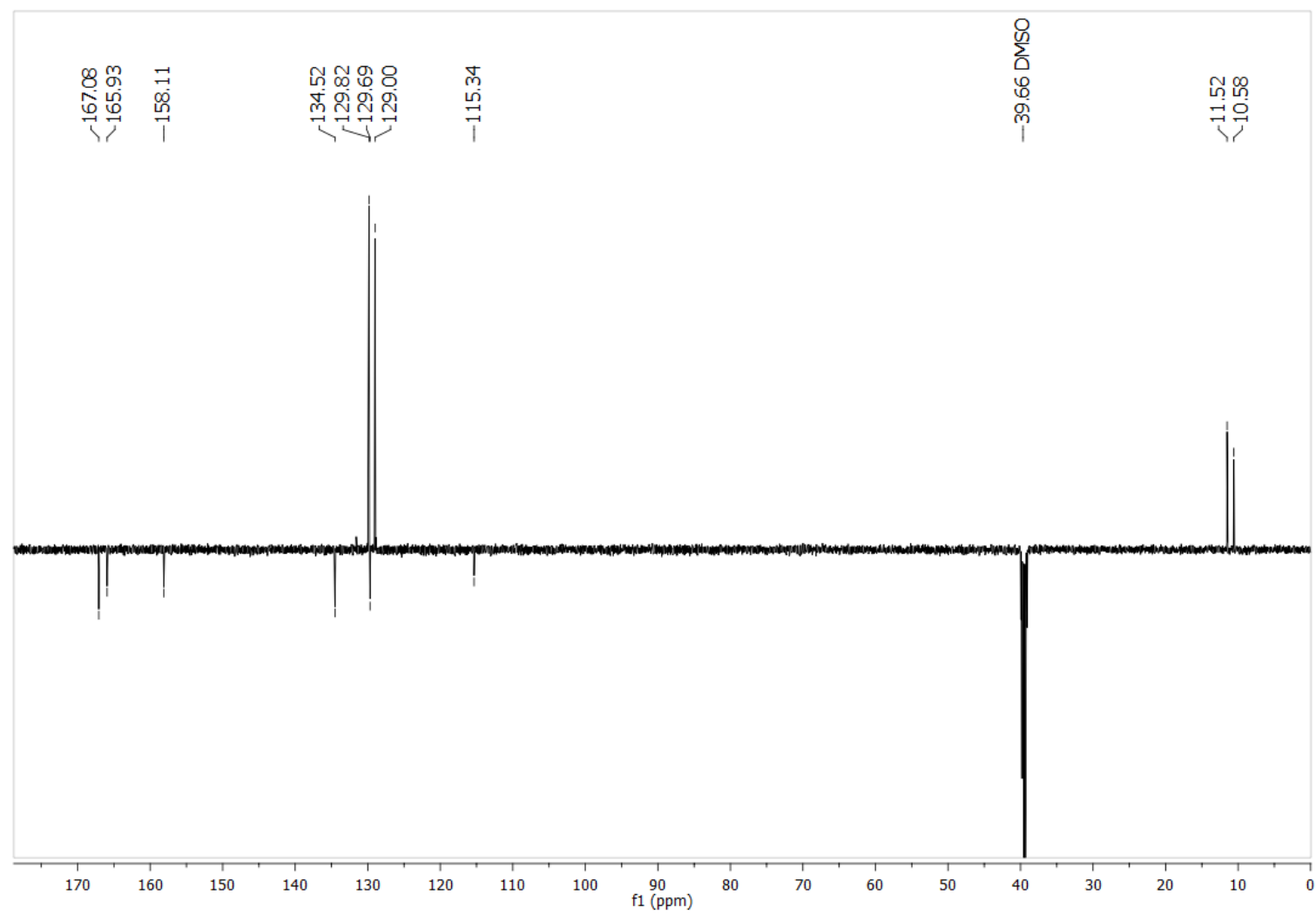
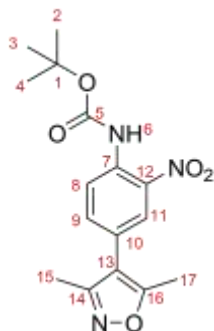


Figura 47. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto ácido-4(3,5-dimetilisoxazol-4-il) benzóico.



viii) tert-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes hexano:acetato de etila nas proporções 7:3.

Rendimento: 62%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: 98-100 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,70 (s, 1H); 7,92 (m, 1H); 7,70 (m, 2H); 2,42 (s, 3H); 2,24 (s, 3H); 1,45 (s, 9H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 11,32 (C17); 158,11 (C16); 10,35 (C15); 152,47 (C14); 125,72 (C13); 131,60 (C12); 134,80 (C11); 114,01 (C10); 125,08 (C8); 124,50 (C9); 141,47 (C7); 165,96 (C5); 80,63 (C2,3,4); 27,90 (C1) ppm.

Figura 48. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato

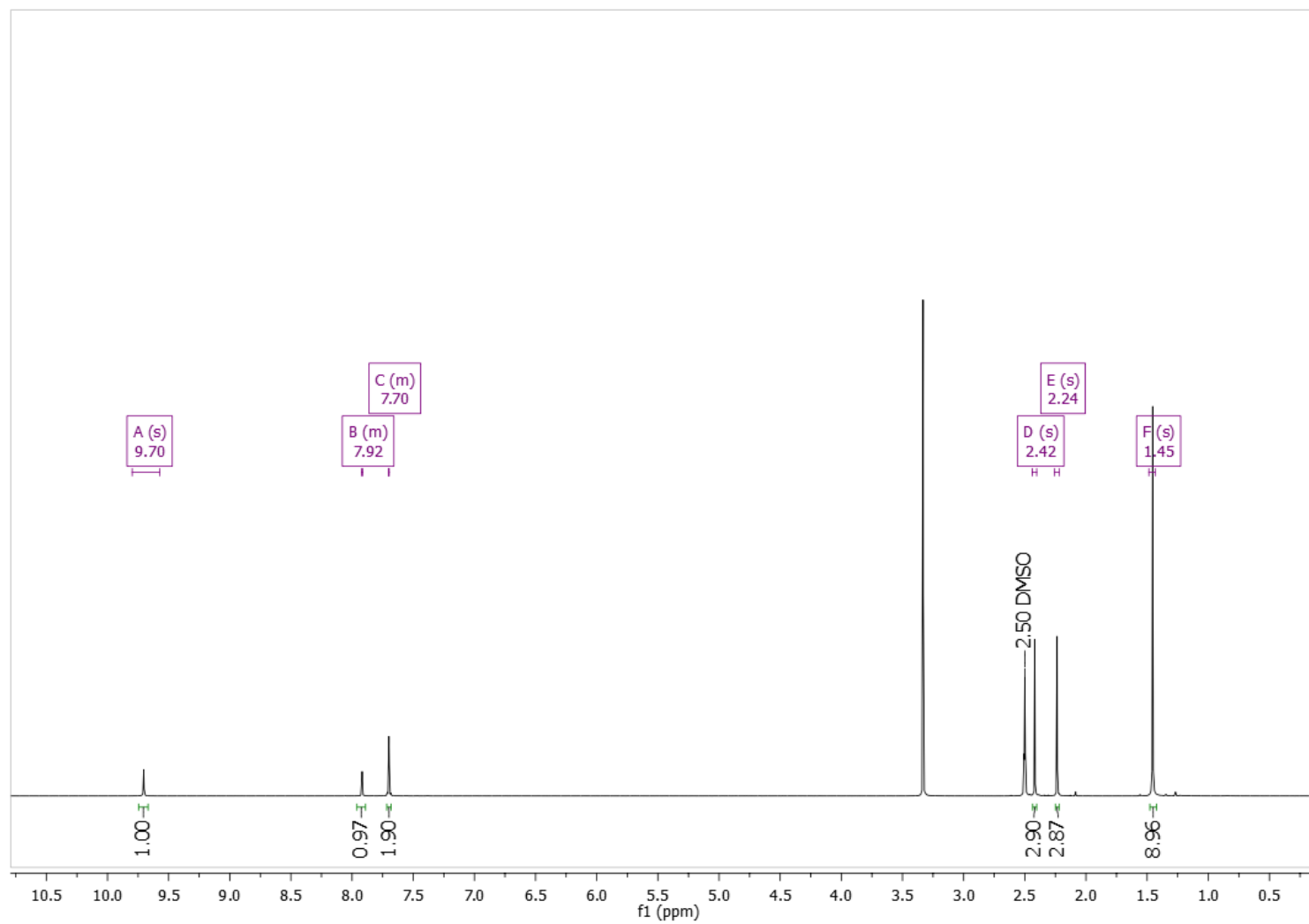
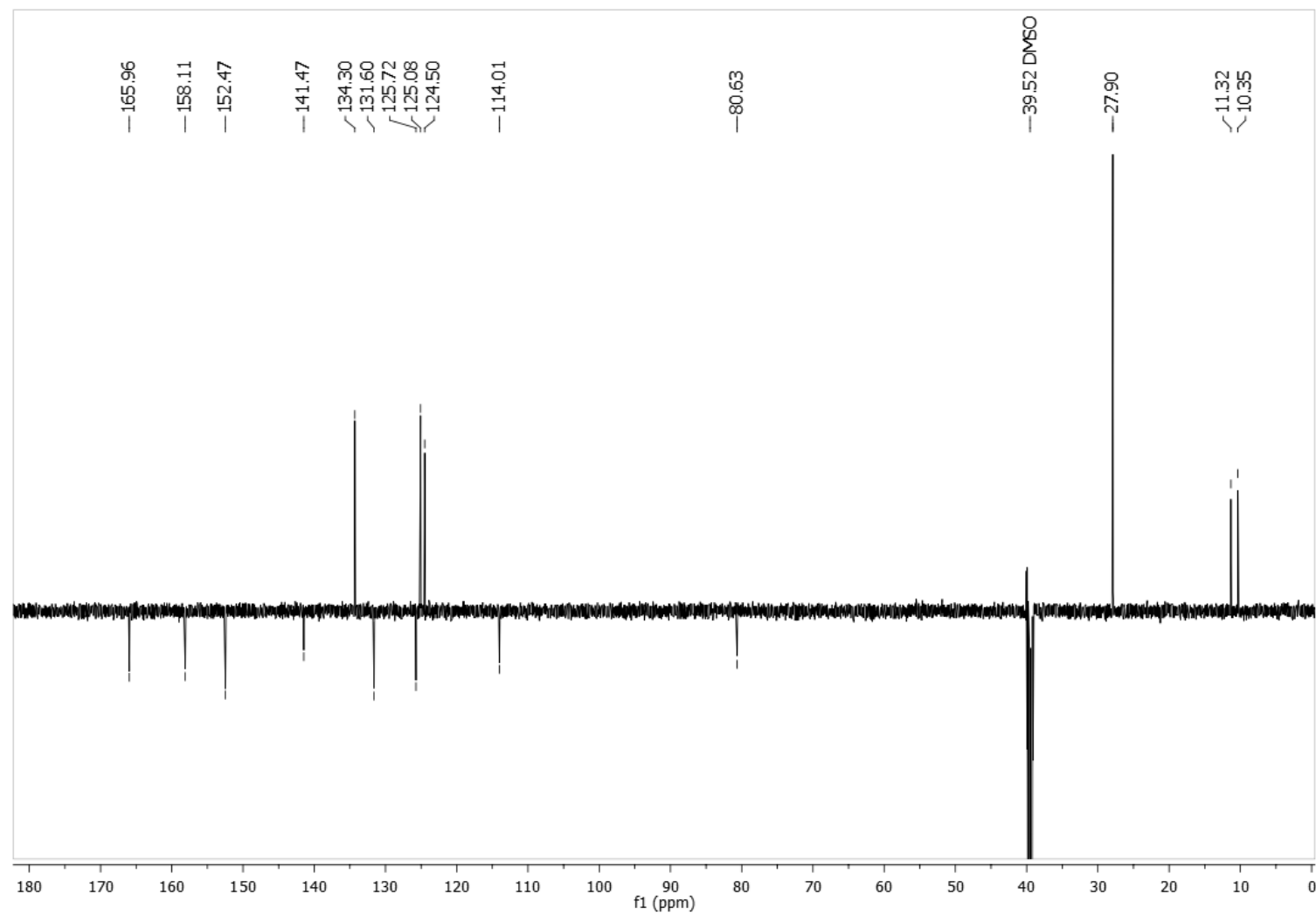
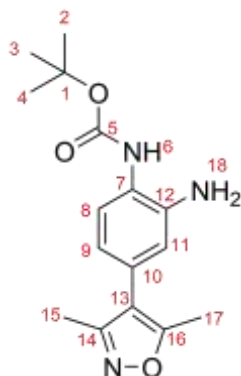


Figura 49. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-nitrofenil)carbamato.



ix) *tert*-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes acetato de etila:hexano nas proporções 7:3.

Rendimento: 45%

Aspecto: Sólido de cor bege

Faixa de fusão: 186-188 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 8,38 (s, 1H); 7,28 (d, 1H); 6,68 (d, 1H); 6,51 (dd, 1H); 4,97 (s, 2H); 2,37 (s, 3H); 2,19 (s, 3H); 1,47 (s, 9H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 11,35 (C17); 158,11 (C16); 10,58 (C15); 152,47 (C14); 126,15 (C13); 123,17 (C12); 115,85 (C11); 116,07 (C10); 116,84 (C9); 124,56 (C8); 141,30 (C7); 164,44 (C5); 28,17 (C2,3,4); 78,85 (C1) ppm.

Figura 50. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato

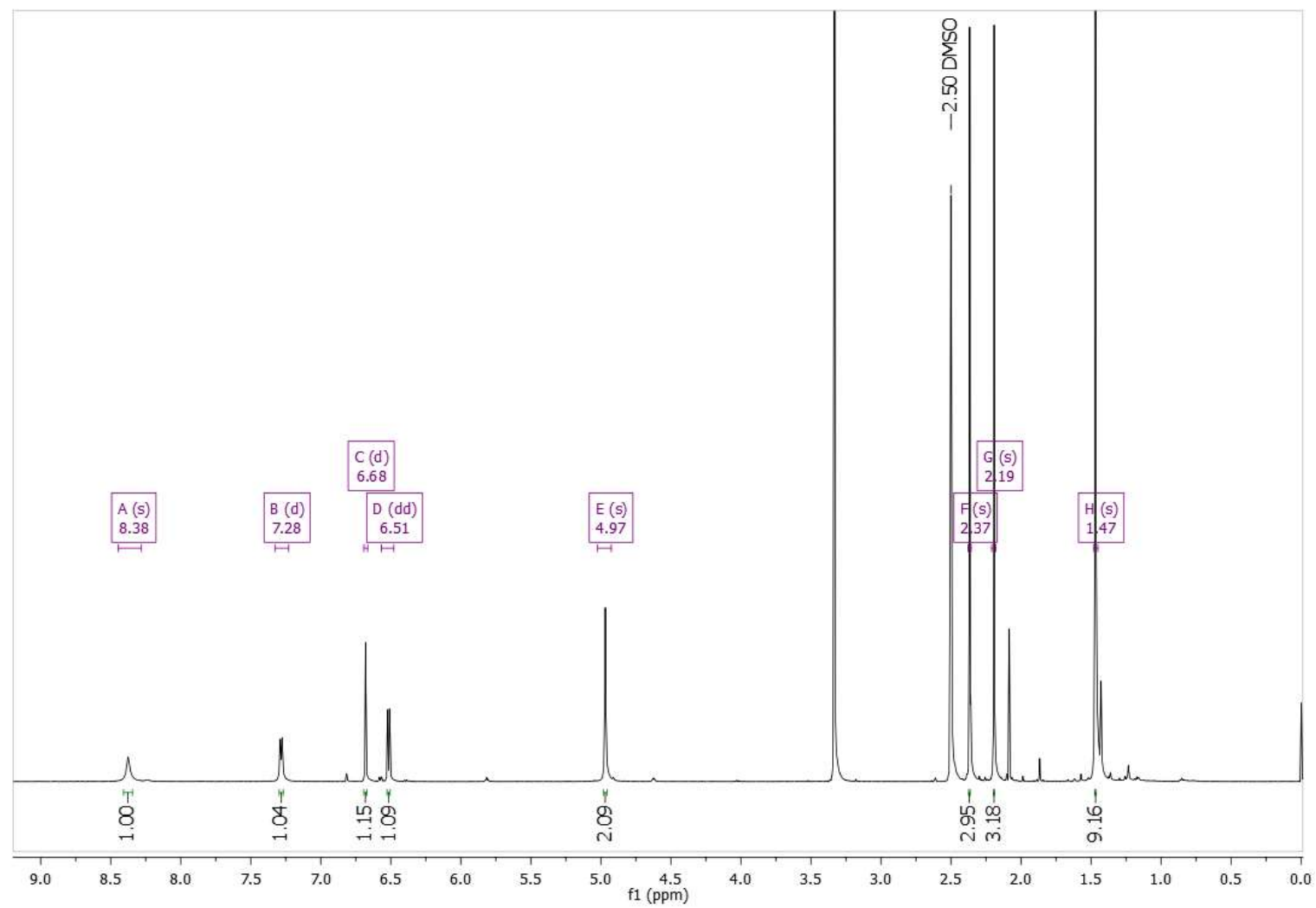
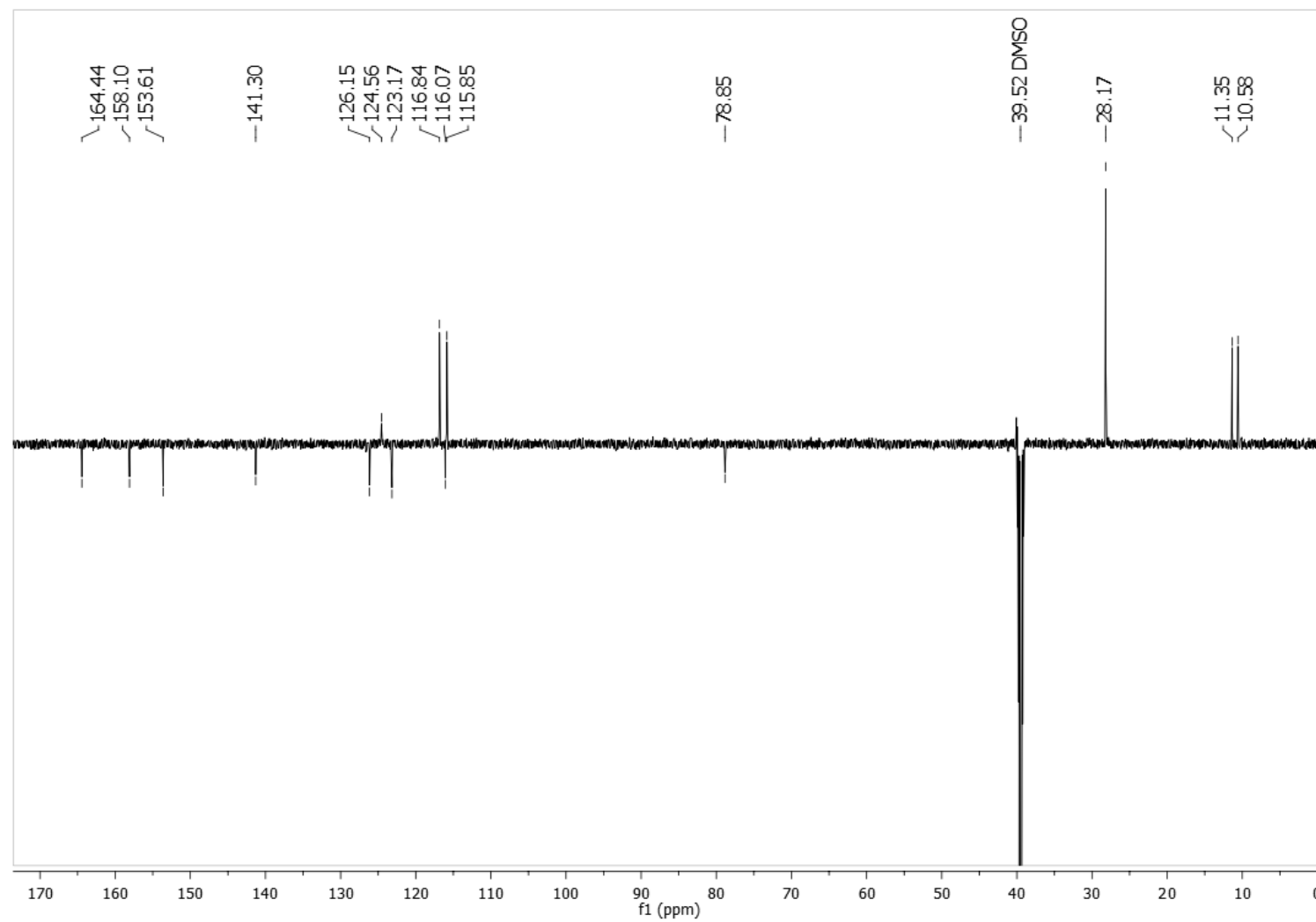
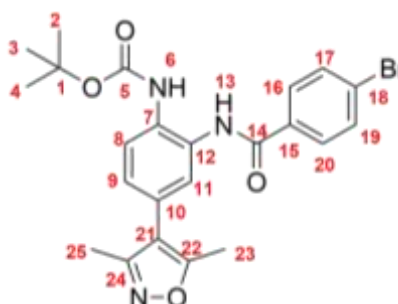


Figura 51. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto *tert*-butil (2-amino-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.



x) *Tert-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato*



Método de purificação: Cristalização em acetato de etila.

Rendimento: 29%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: 200-209 °C

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 9,94 (s, 1H); 8,83 (s, 1H); 7,91 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H); 7,77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H); 7,66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H); 7,51 (s, 1H); 7,23 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H); 2,42 (s, 3H); 2,24 (s, 3H); 1,45 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 79,87 (C1); 28,08 (C2,3,4); 153,42 (C5); 131,36 (C7); 123,91 (C8); 126,21 (C9); 125,32 (C10); 126,73 (C11); 129,63 (C12); 164,69 (C14); 133,47 (C15); 129,87 (C16, C20); 131,56 (C17, C19); 125,68 (C18); 115,27 (C21); 165,15 (C22); 11,35 (C23); 158,16 (C24); 10,54 (C25).

Figura 52. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato

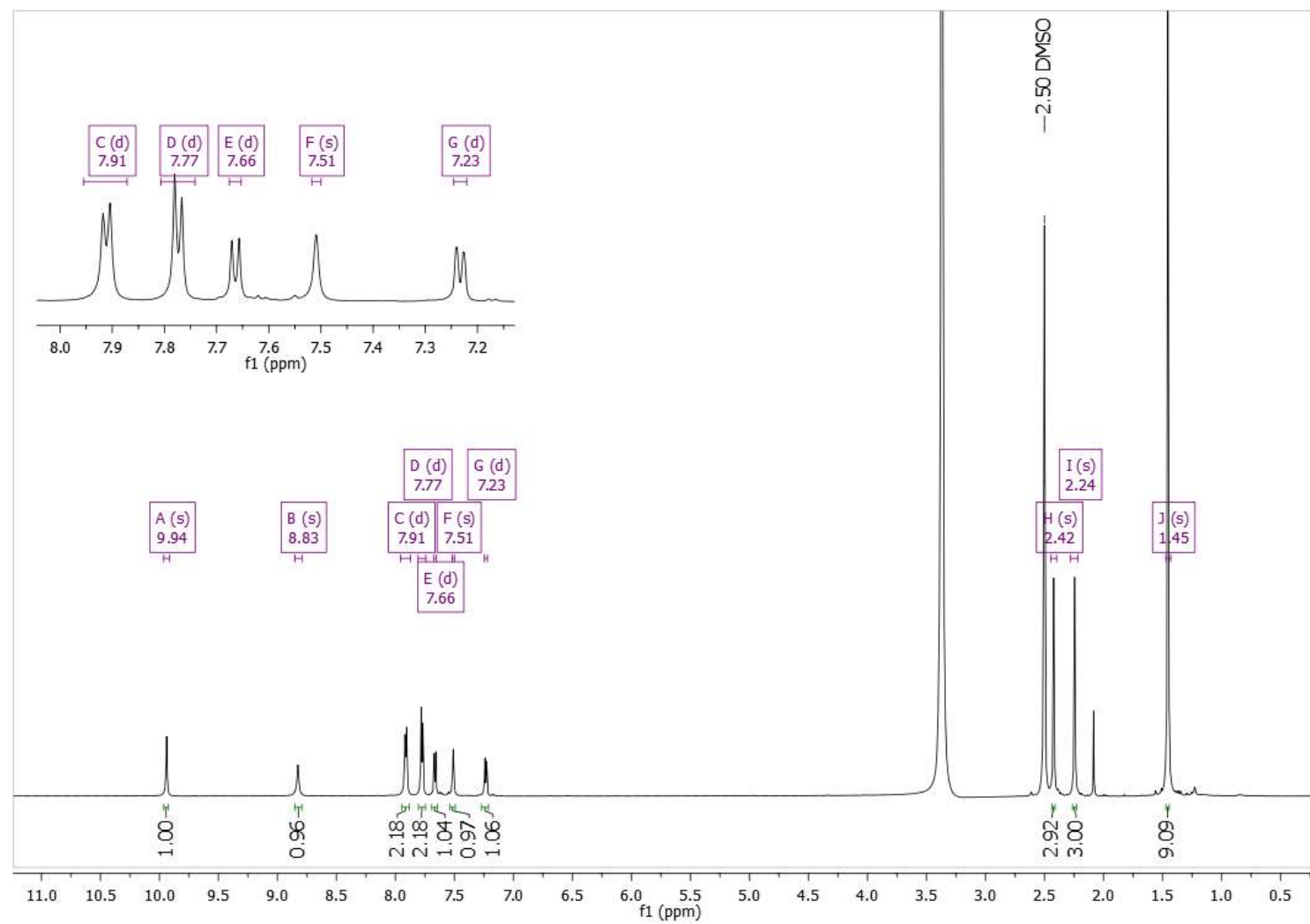


Figura 53. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto *tert*-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato

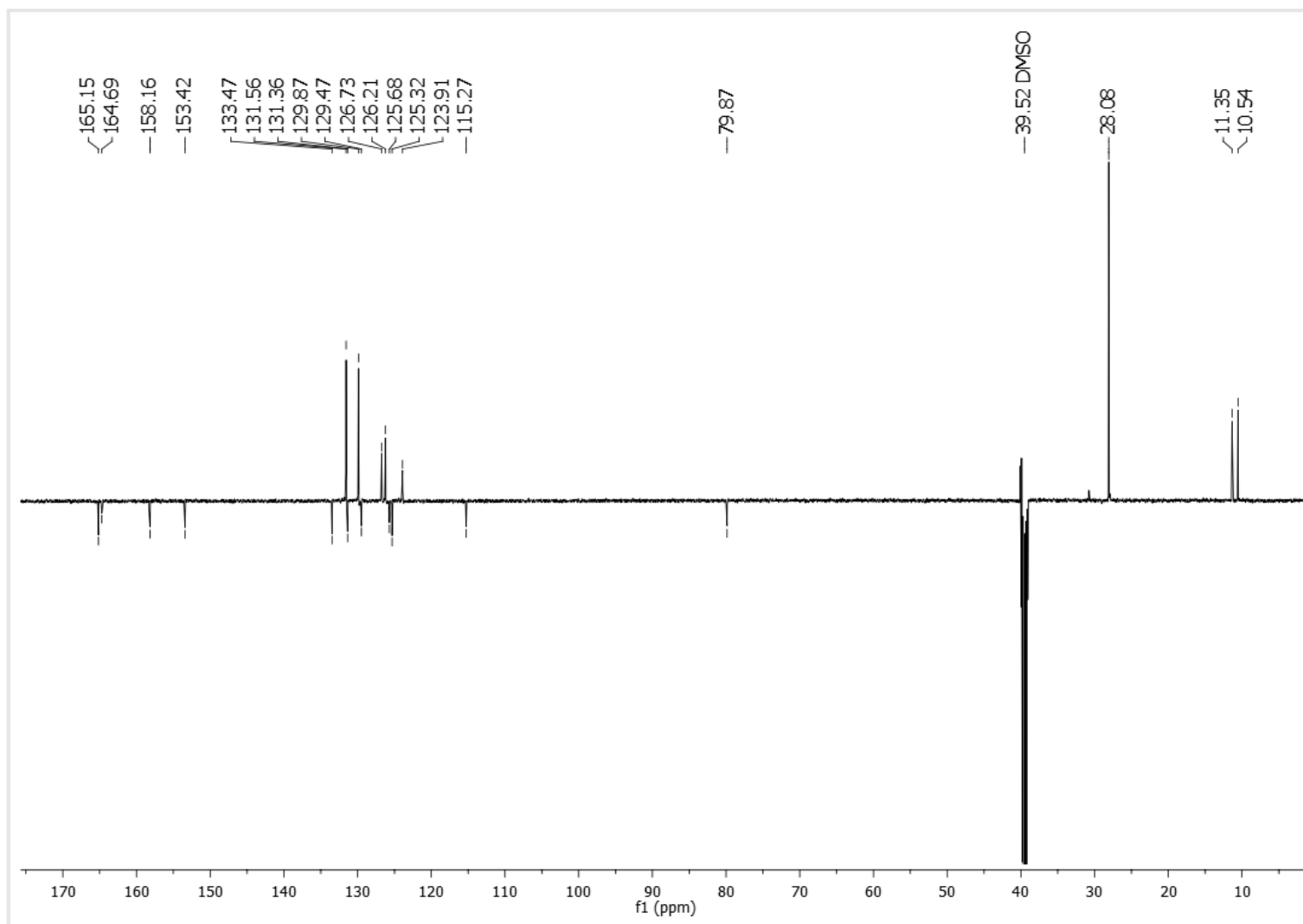


Figura 54. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato

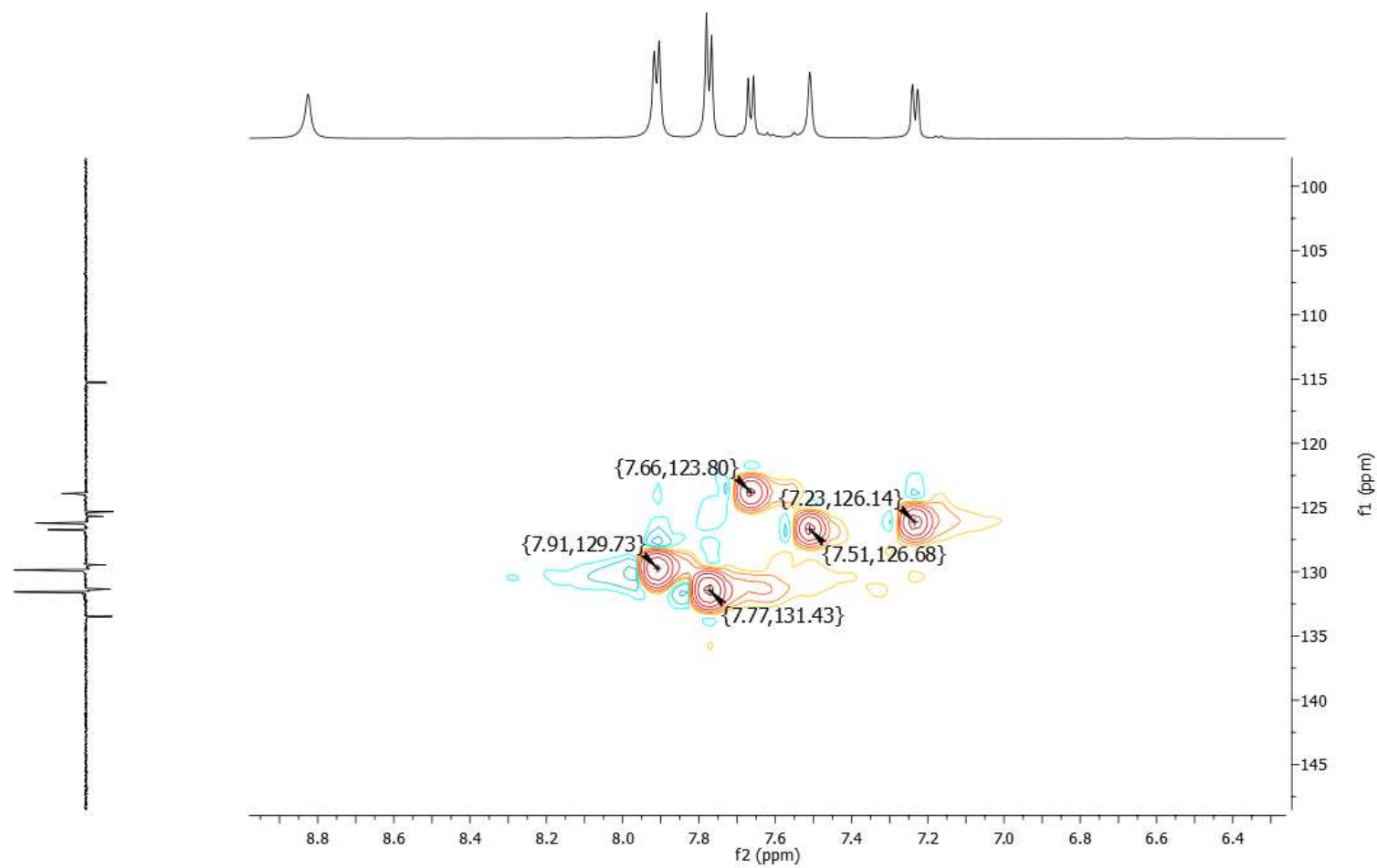
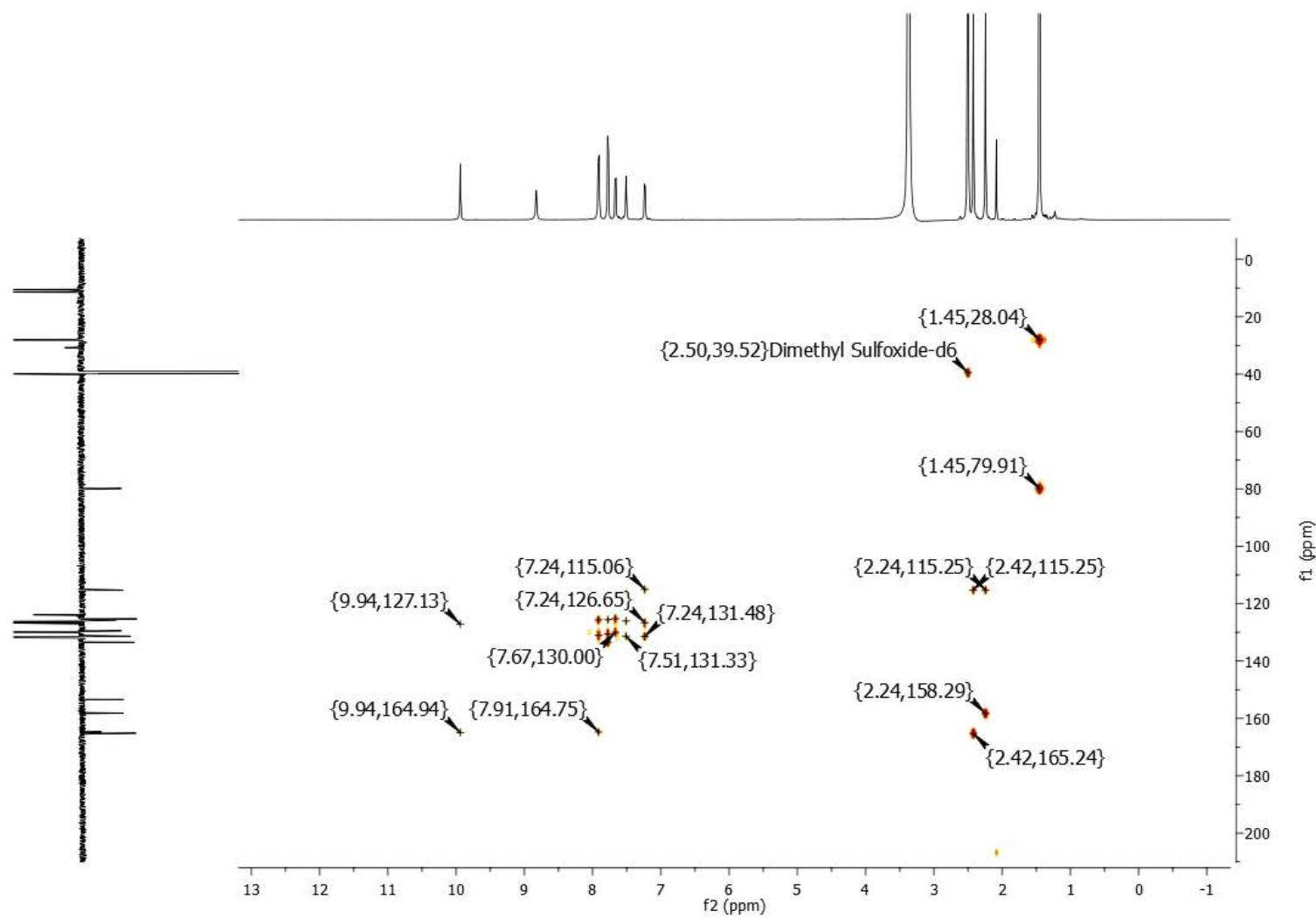
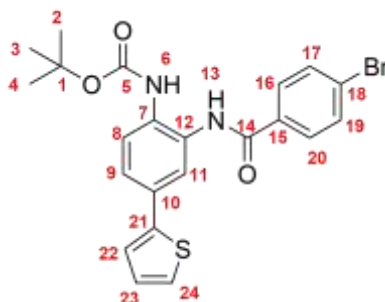


Figura 55. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil(2-(4-bromobenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol)4il)fenil)carbamato



xi) *Tert-butil (2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato*



Método de purificação: Cristalização em CH₂Cl₂.

Rendimento: 25%

Aspecto: Sólido de cor marrom claro

Faixa de fusão: 185-187 °C

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 9,99 (s, 1H); 8,74 (s, 1H); 7,94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); 7,78 (m, 3H); 7,64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H); 7,45 (dd, *J* = 3.6, 1.0 Hz, 1H); 7,13 (dd, *J* = 5.1, 3.6 Hz, 1H); 1,45 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 79,73 (C1); 28,04 (C2,3,4); 153,22 (C5); 129,46 (C7); 123,97 (C8); 122,87 (C9); 131,60 (C10); 123,15 (C11); 129,59 (C12); 164,73 (C14); 133,39 (C15); 129,87 (C16,20); 131,46 (C17,19); 125,61 (C18); 142,62 (C21); 125,43 (C22); 128,51 (C23); 123,42 (C24) ppm.

Figura 56. RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.

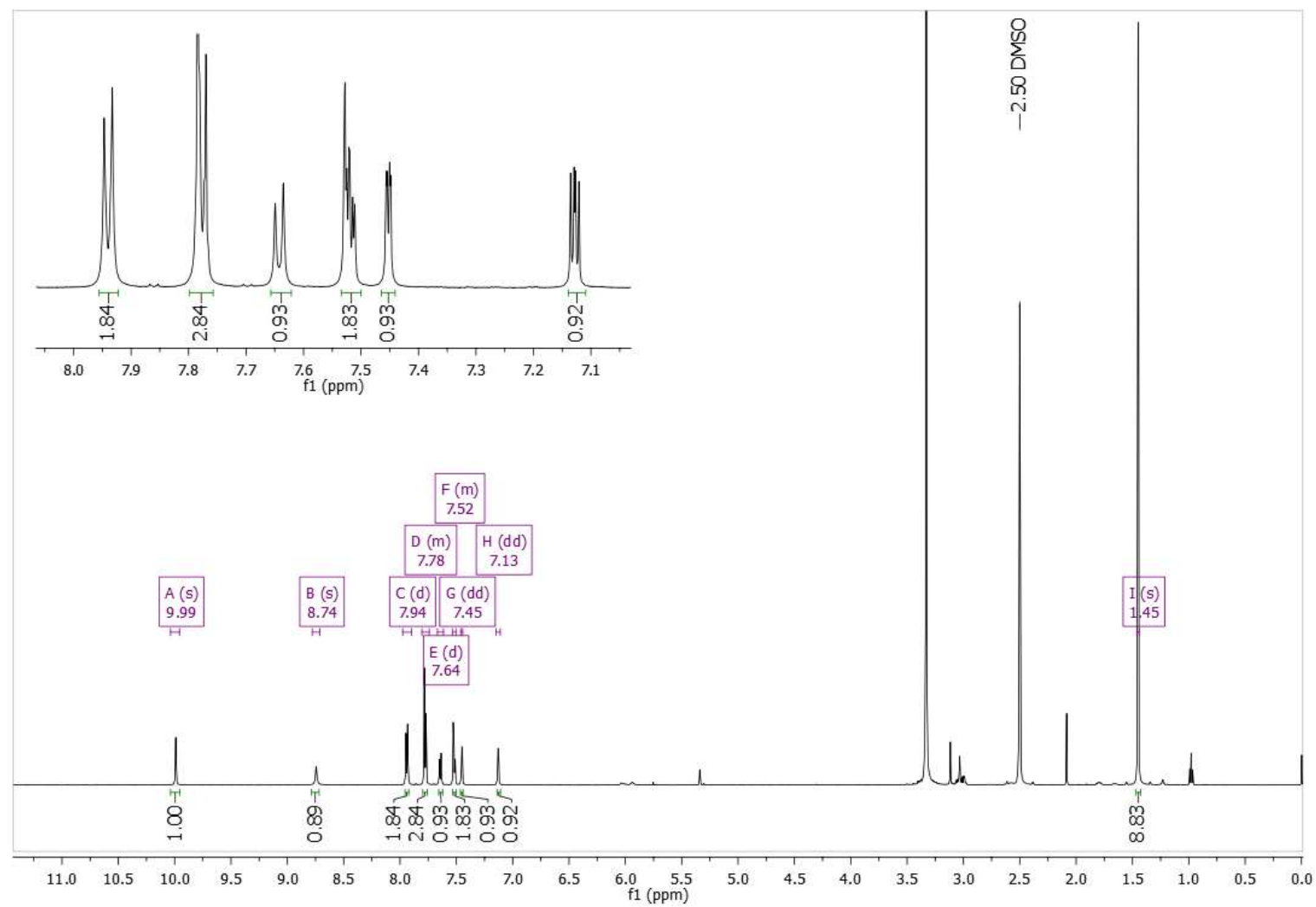


Figura 57. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.

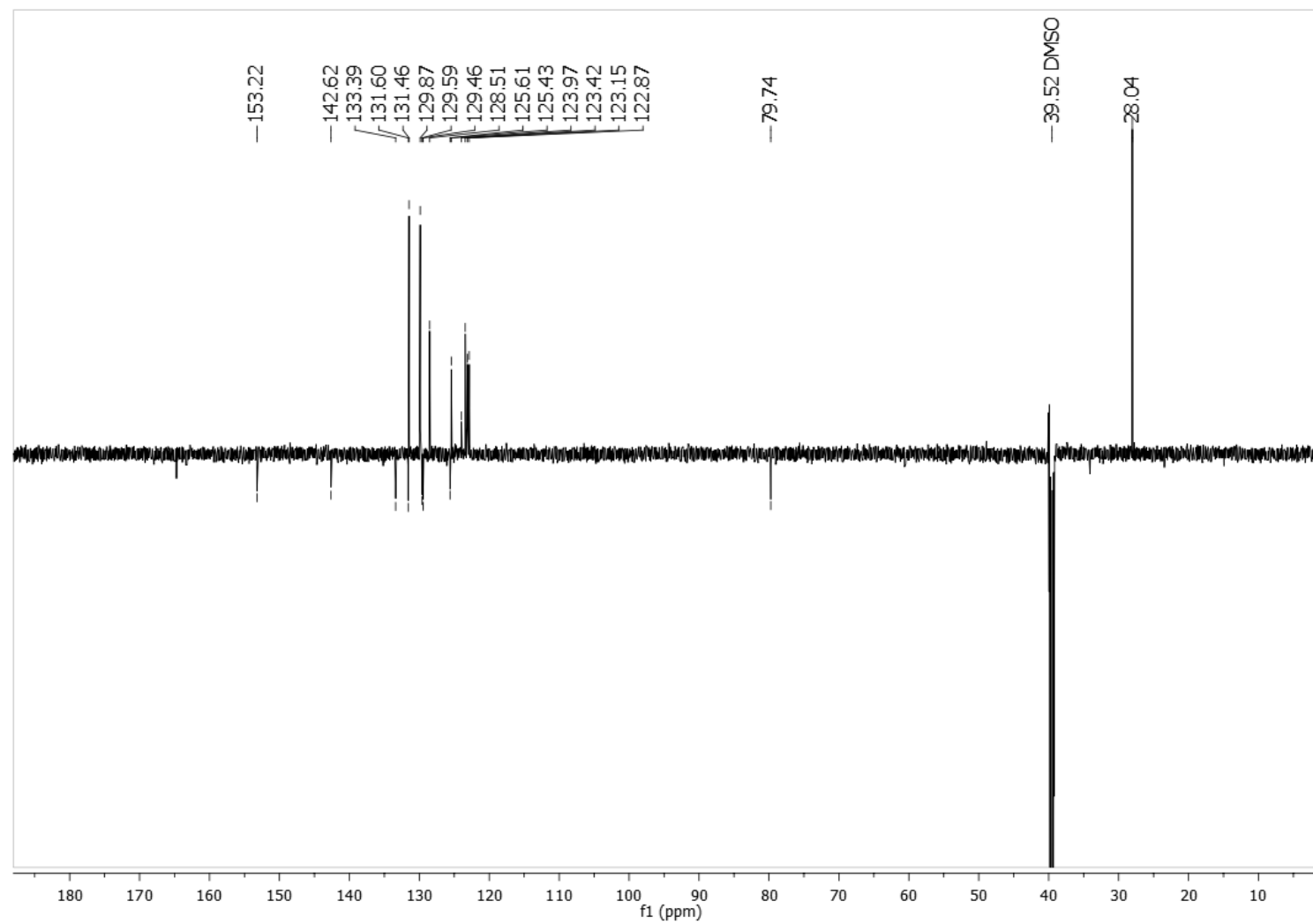


Figura 58. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.

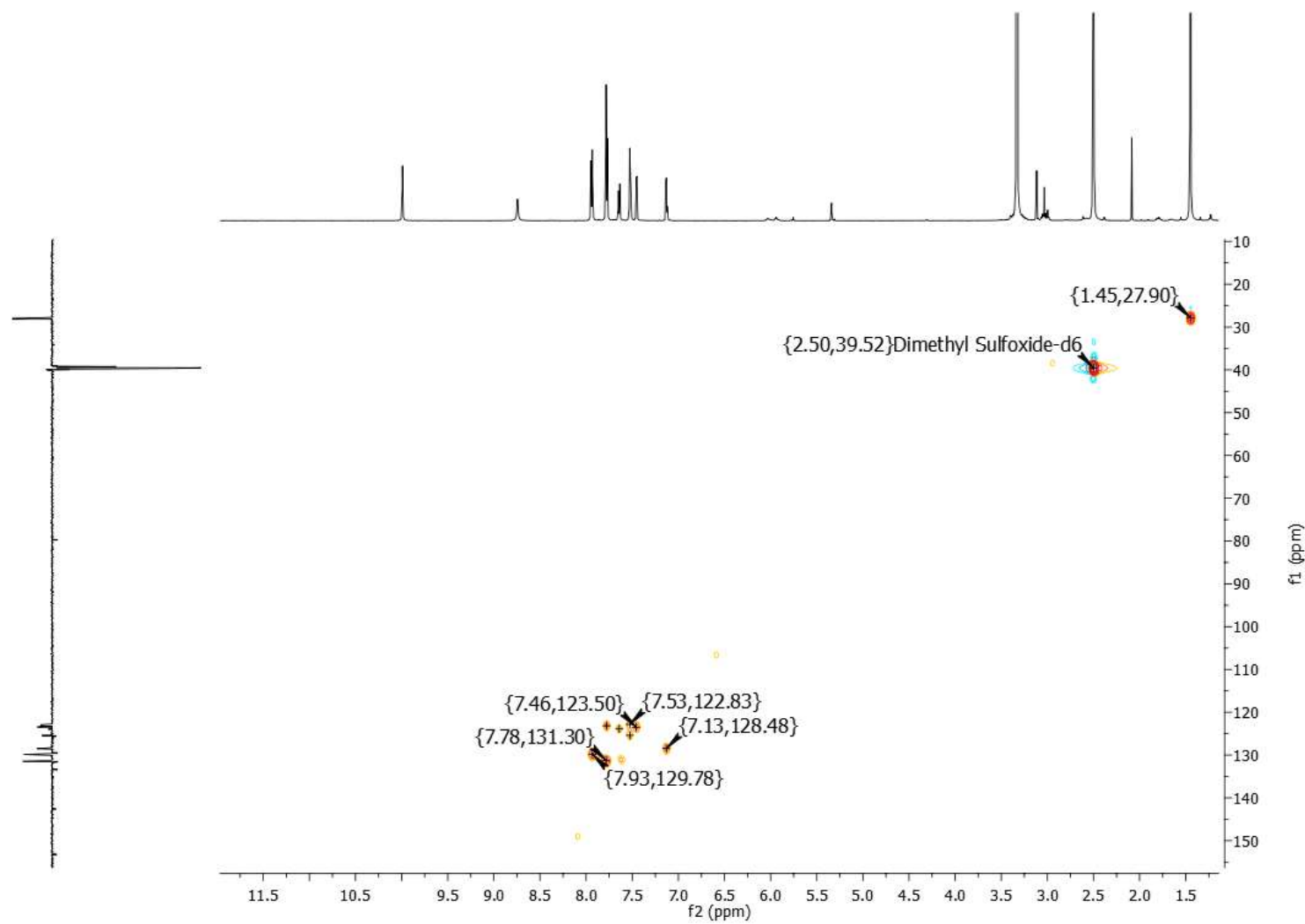
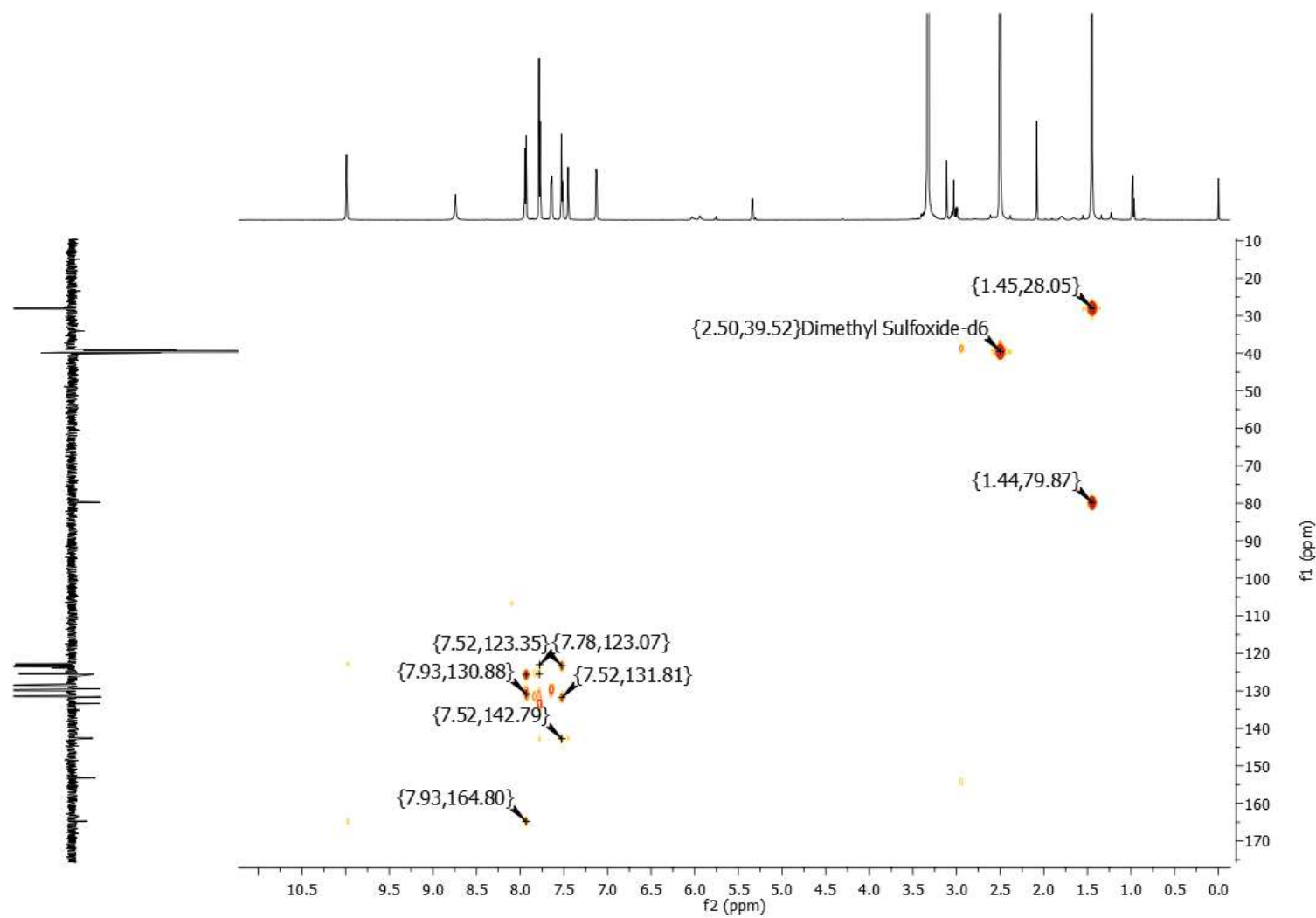
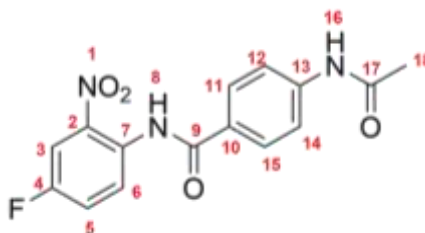


Figura 59. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 2-(4-bromobenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato



xii) 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes acetato de etila/hexano nas proporções 7:3.

Rendimento: 55%

Aspecto: Sólido de cor branca

Faixa de fusão: 199-204 °C

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 10,30 (s, 1H); 8,75 (dd, *J* = 4.4, 1.4 Hz, 1H); 8,50 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H); 7,87 (d, *J* = 8.7, 2H); 7,66 (d, *J* = 8.7, 2H); 7,51 (dd, *J* = 8.4, 4.4 Hz, 1H); 2,07 (s, 1H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 135,06 (C2); 151,65 (C3); 143,64 (C4); 121,33 (C5); 129,28 (C6); 124,90 (C7); 167,51 (C9); 139,64 (C10); 118,78 (C11, C15); 130,84 (C12, C14); 125,36 (C13); 169,72 (C17); 24,48 (C18).

Figura 60. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida

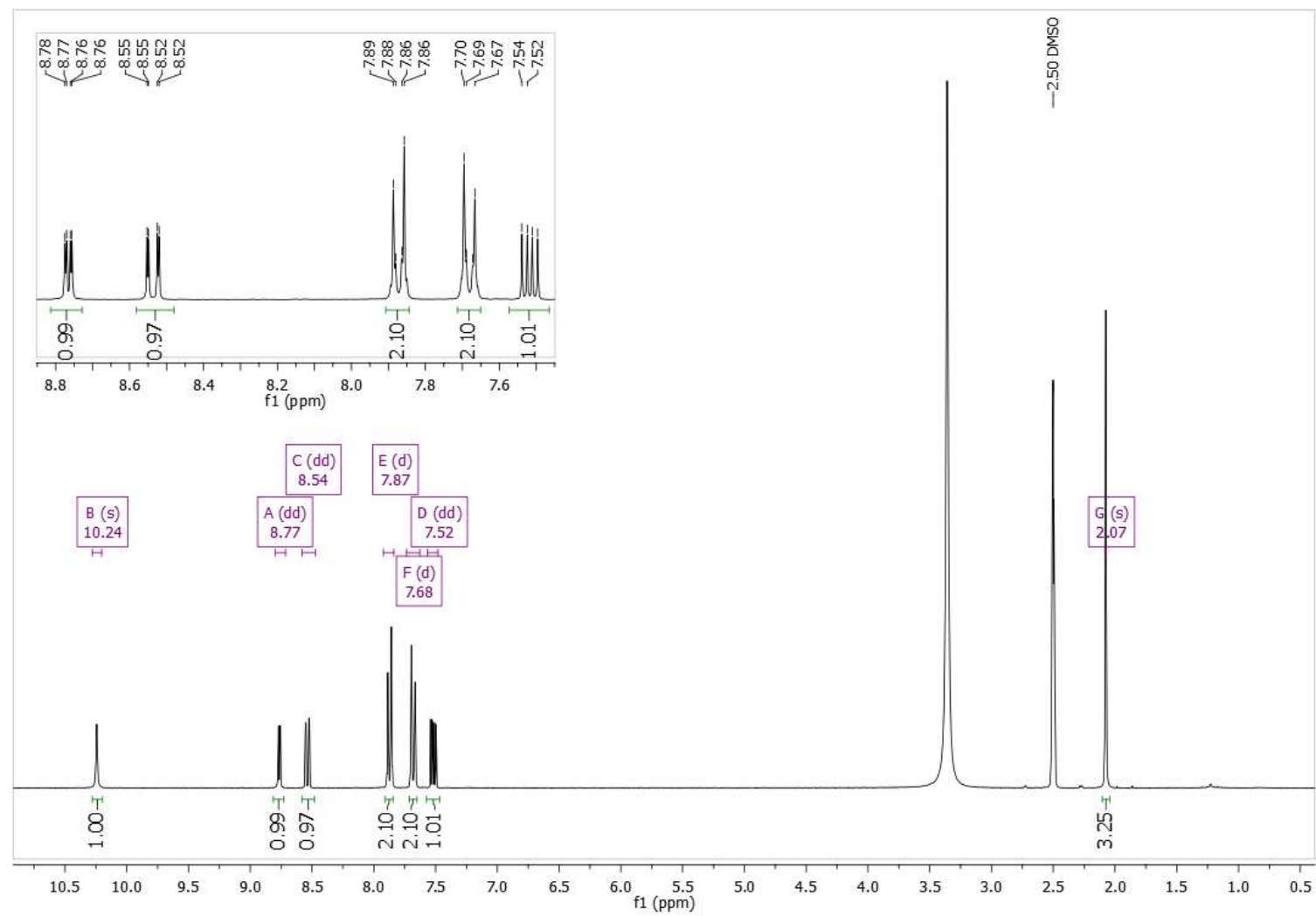


Figura 61. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.

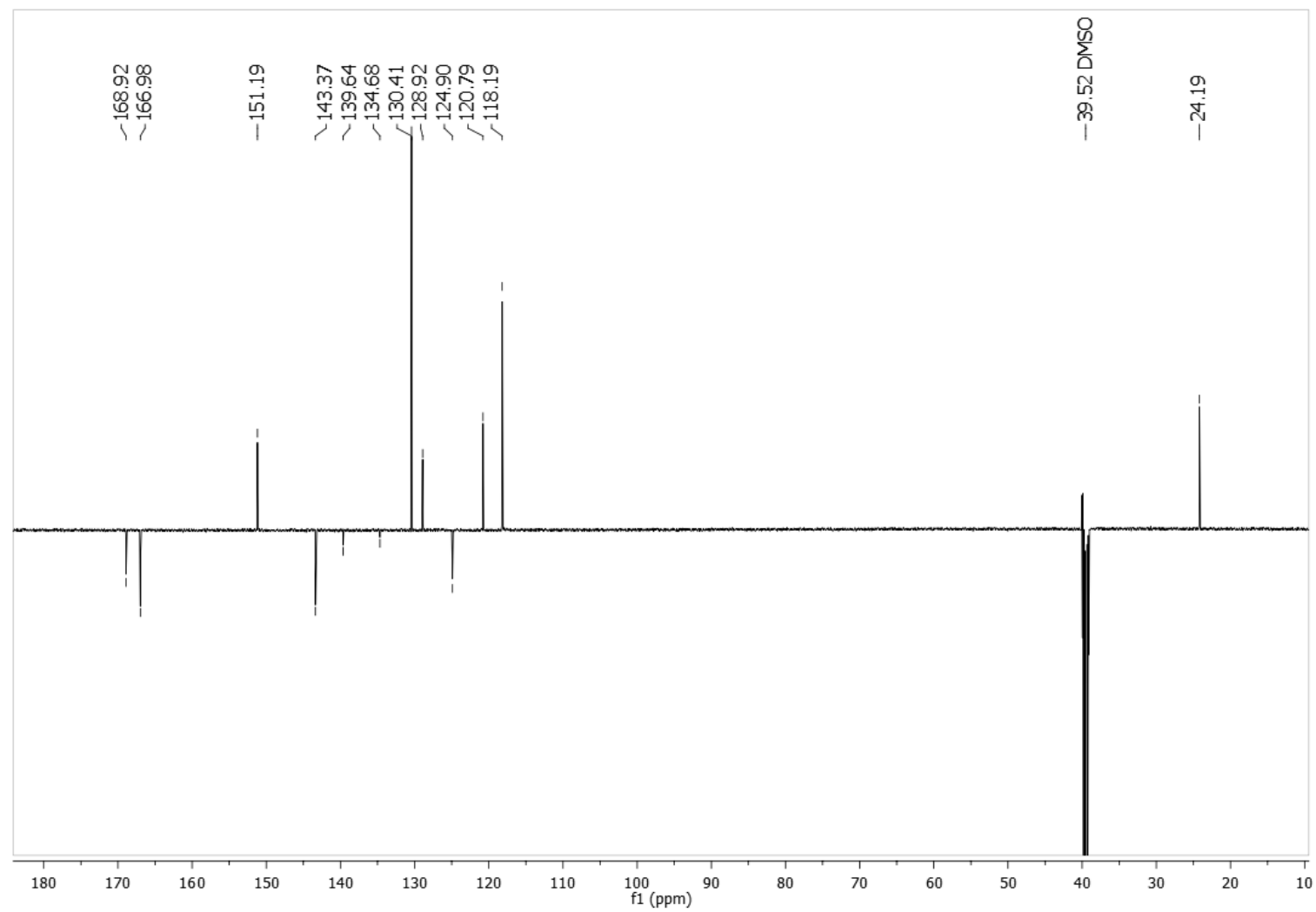


Figura 62. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.

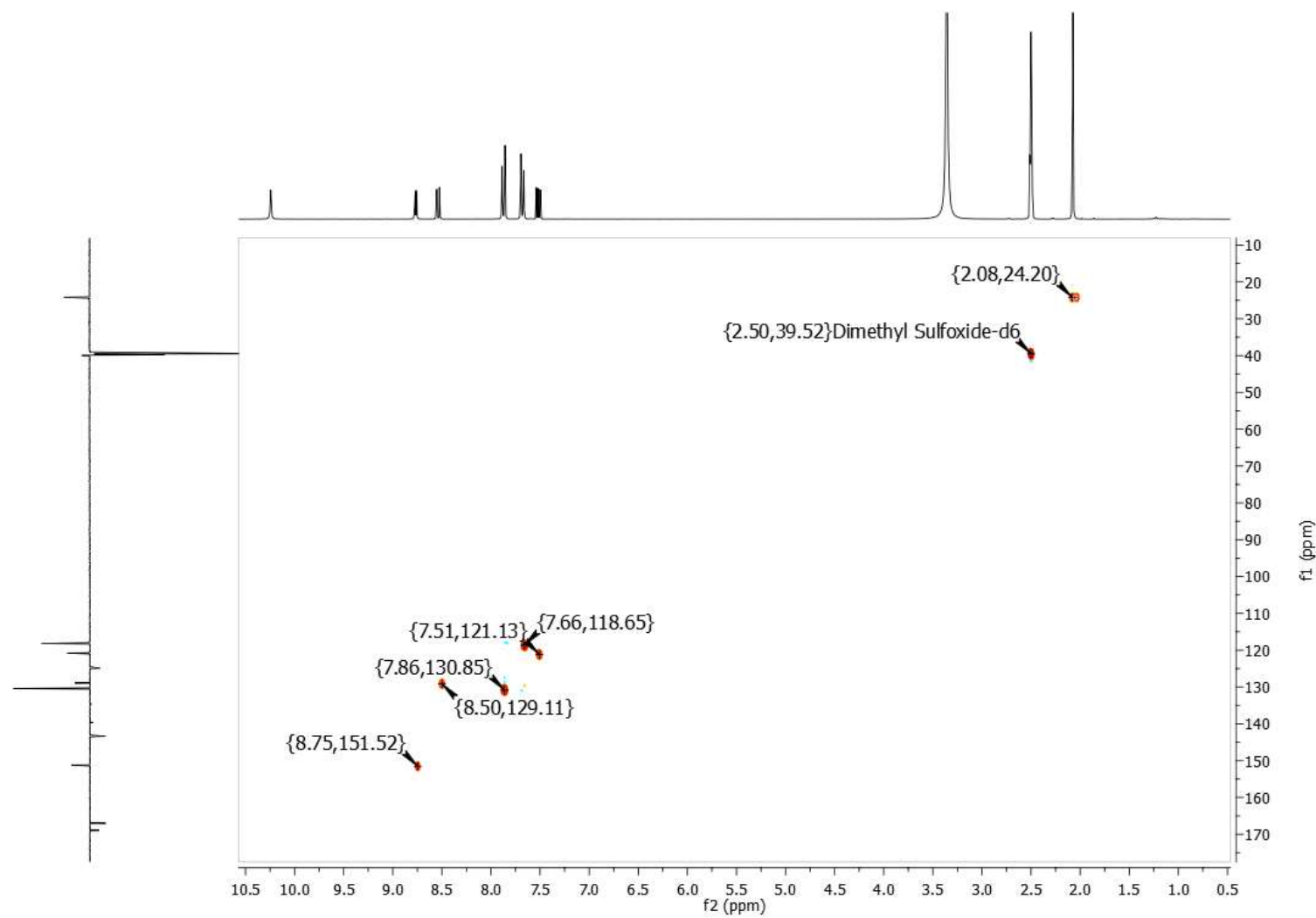
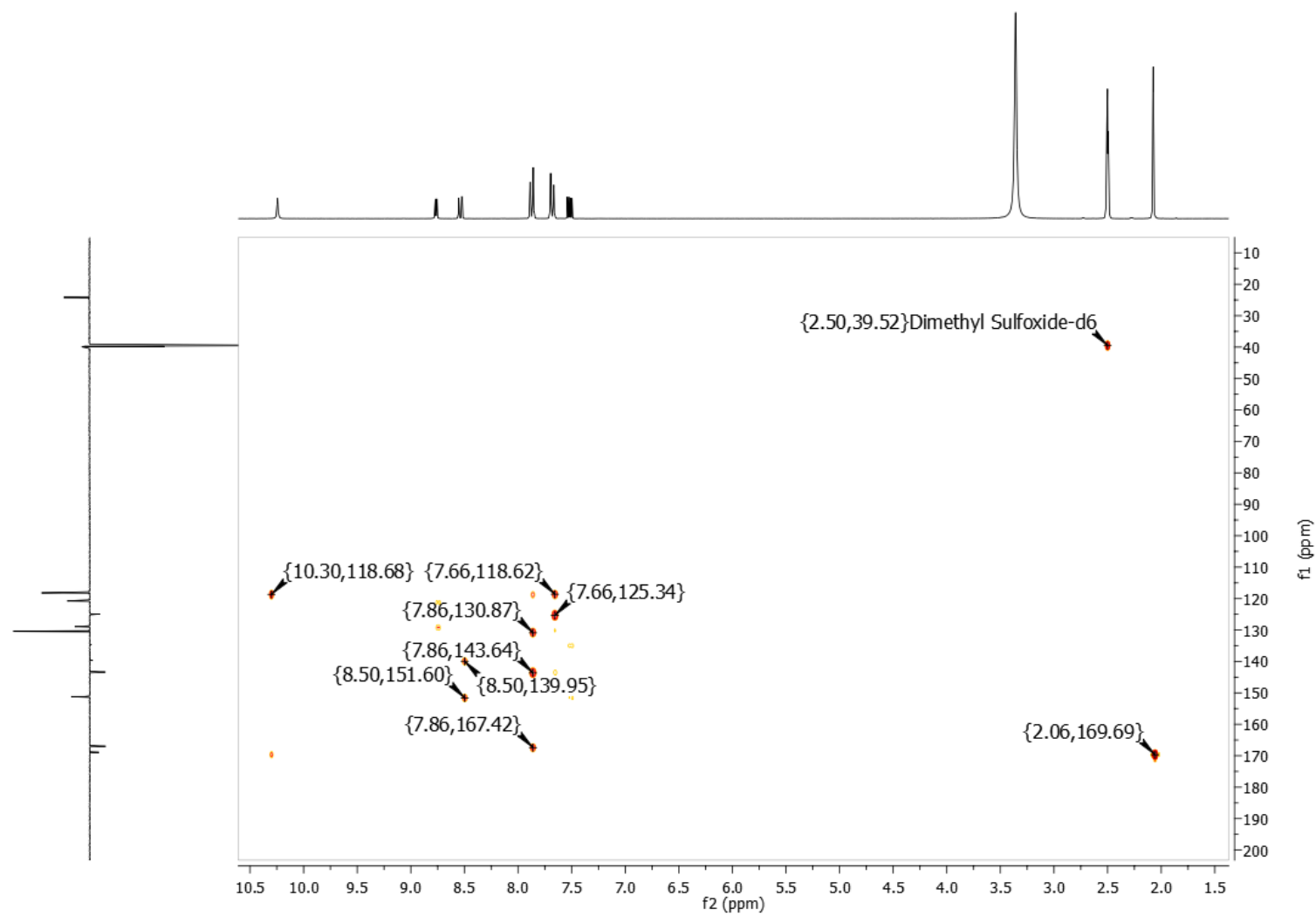
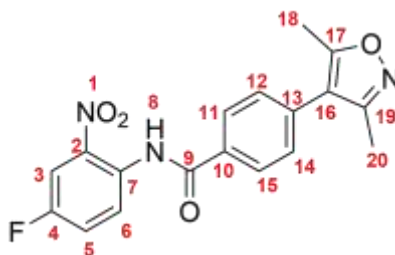


Figura 63. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d₆, 600 MHz) 4-acetamida-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida.



xiii) 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes hexano:acetato de etila nas proporções 6:4.

Rendimento: 26%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: 134-140 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 8,77 (dd, $J = 4.4, 1.4$ Hz, 1H); 8,54 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 1H); 8,02 (m, 2H); 7,52 (m, 3H); 2,44 (s, 3H); 2,25 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 134,68 (C2); 151,48 (C3); 143,37 (C4); 121,31 (C5); 129,13 (C6); 124,90 (C7); 167,04 (C9); 134,49 (C10); 129,29 (C11, C15); 130,10 (C12, C14); 129,67 (C13); 115,31 (C16); 165,89 (C17); 11,49 (C18); 158,07 (C19); 10,55 (C20) ppm.

Figura 64. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida

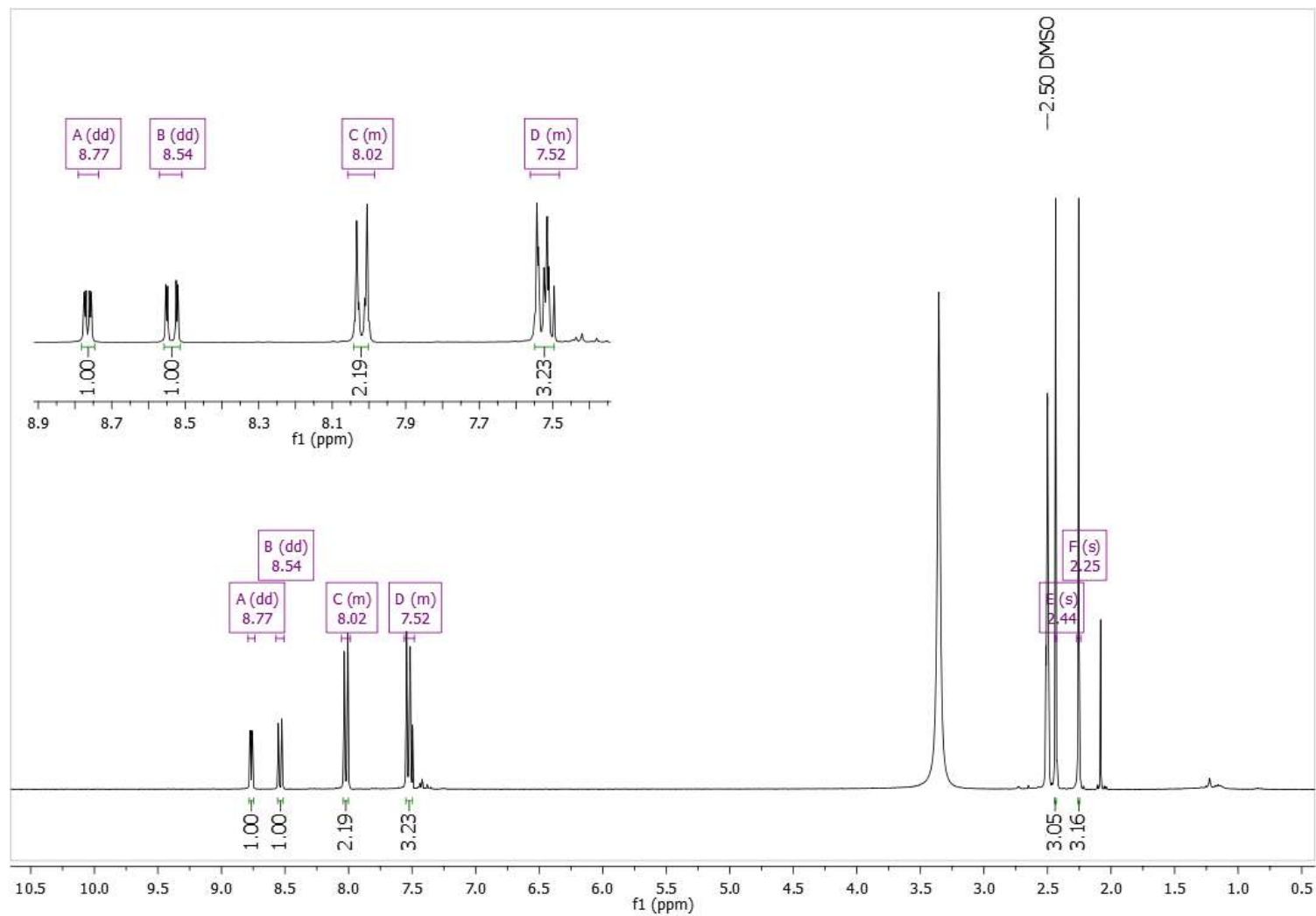


Figura 65. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida

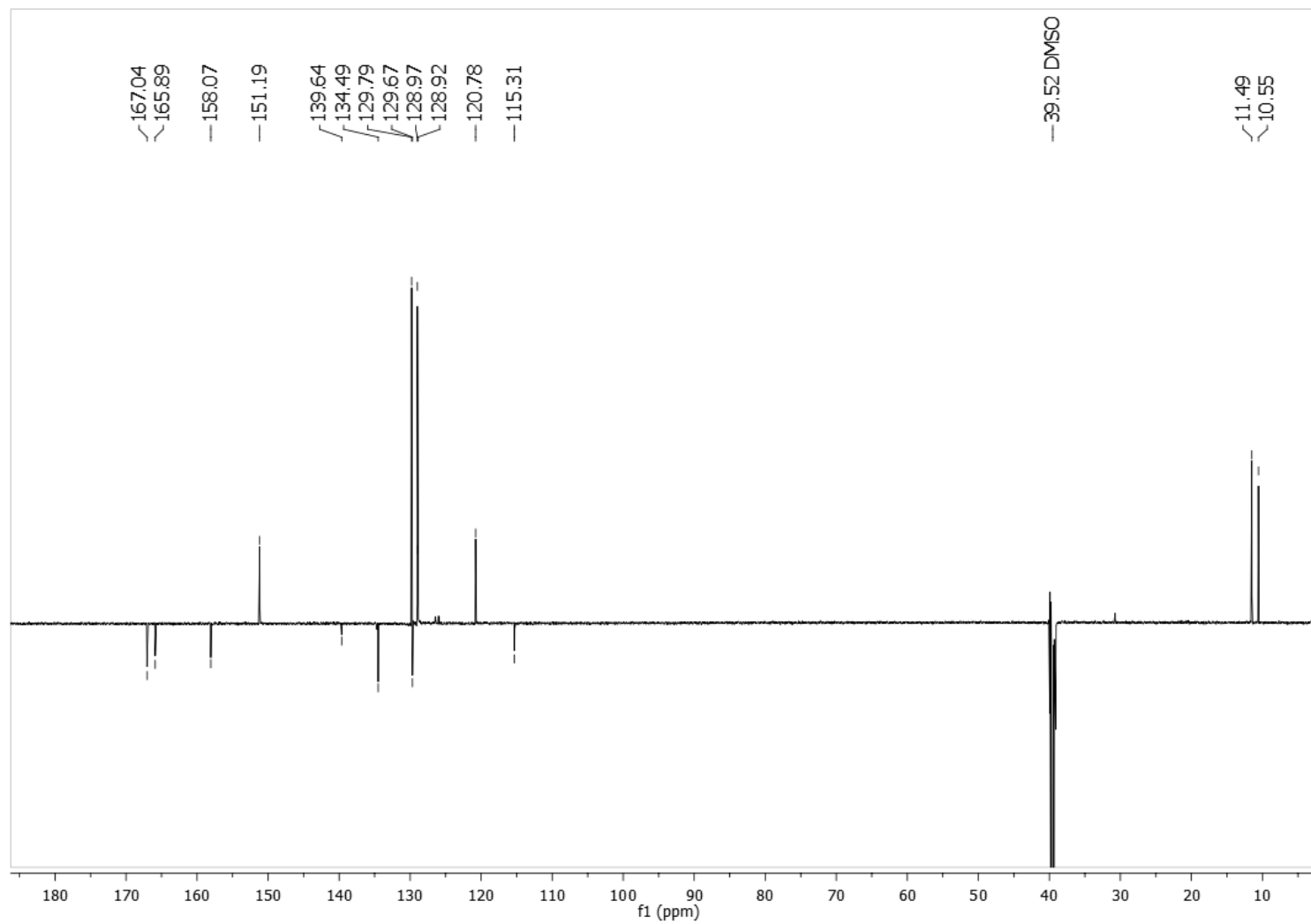


Figura 66. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida

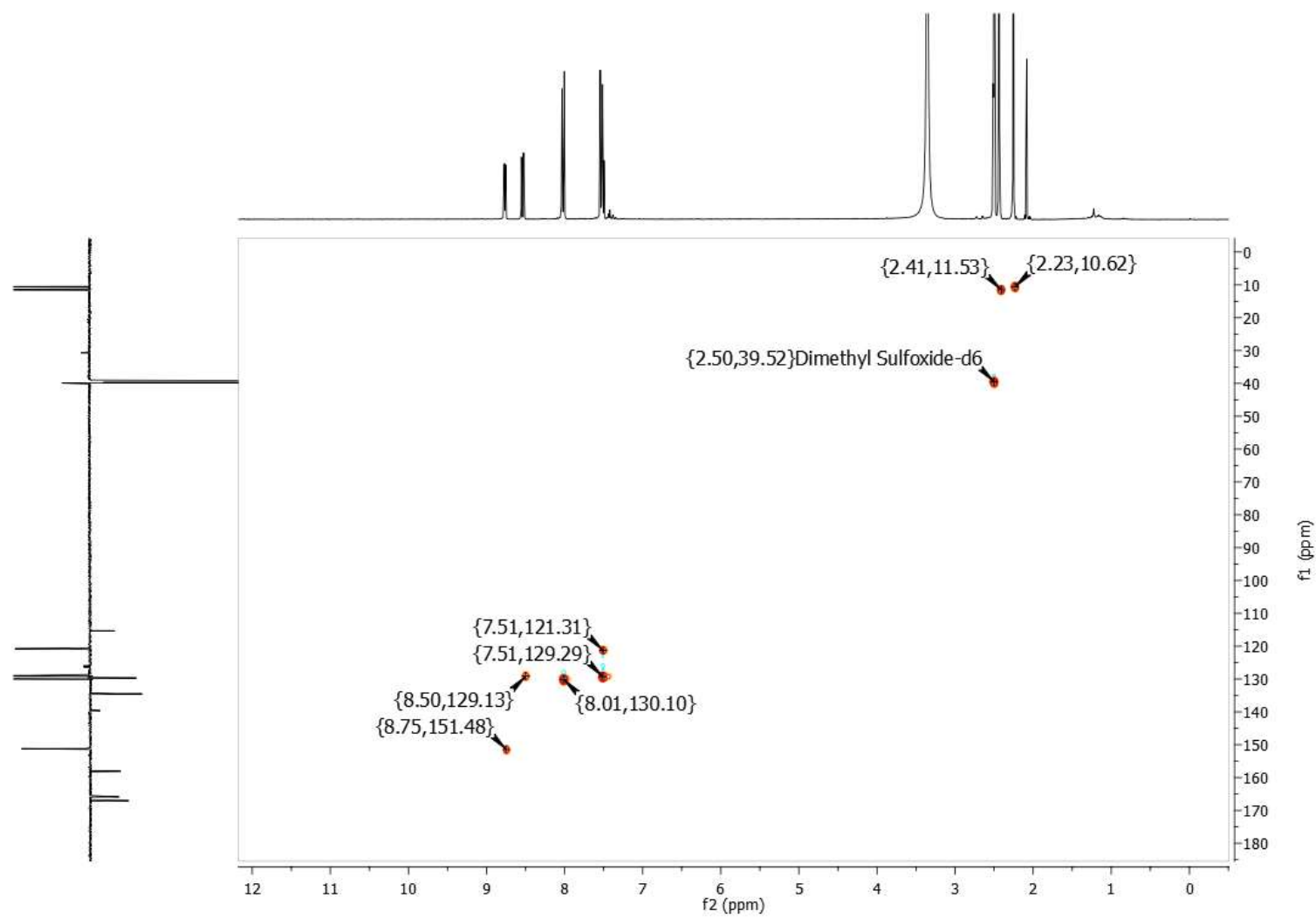
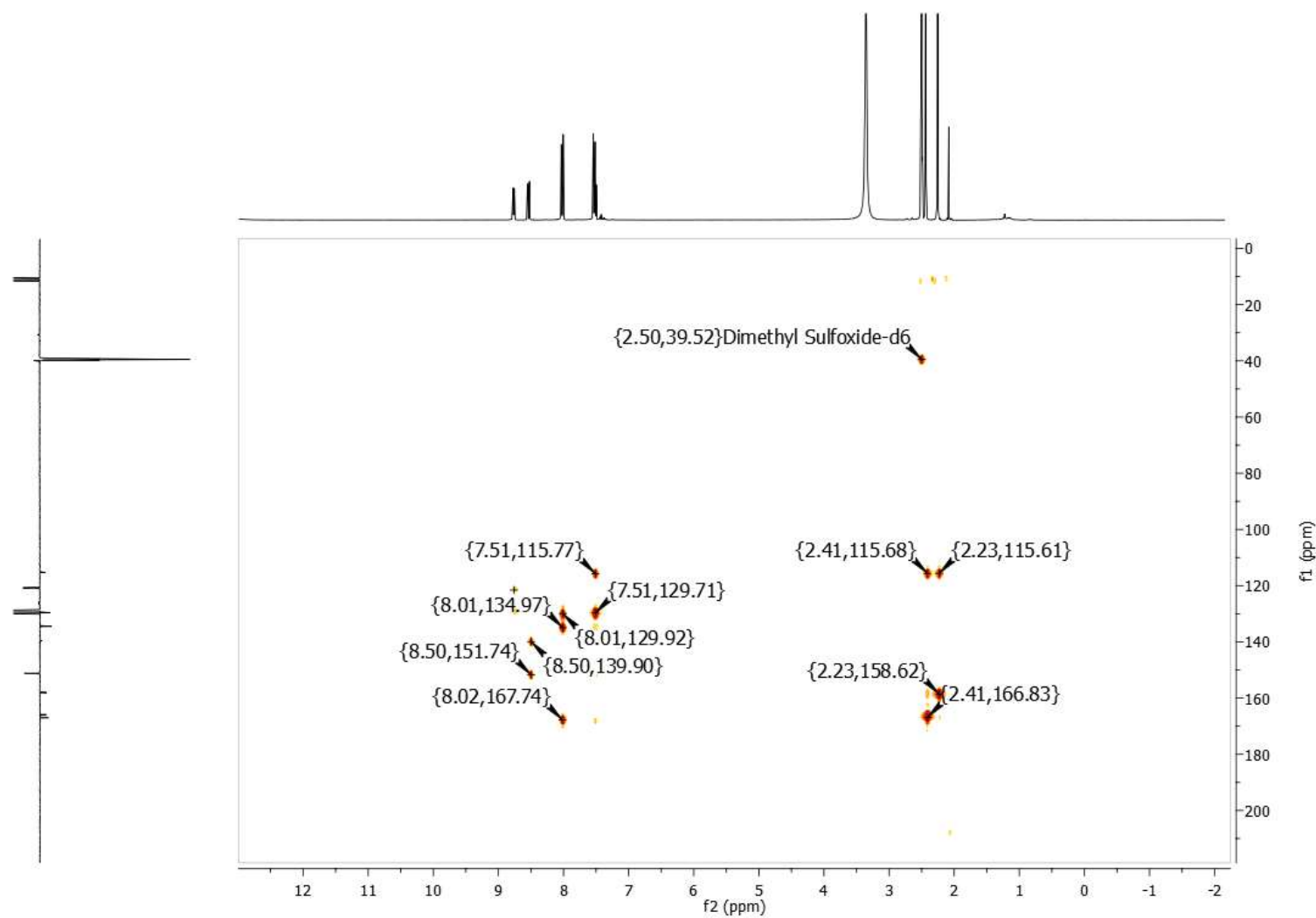
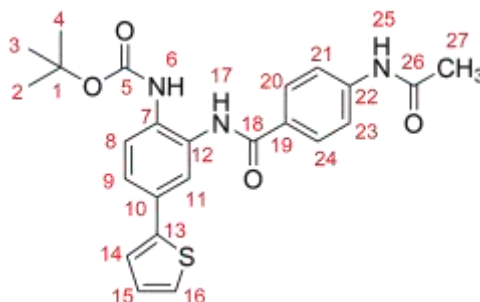


Figura 67. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto 4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-N-(4-fluor-2-nitrofenil)benzamida



xix) *tert*-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes acetato de etila:hexano nas proporções 7:3.

Rendimento: 14%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: -

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 10,28 (s; 1H); 9,84 (s; 1H); 8,73 (s; 1H); 7,93 (d, J = 8.7 Hz, 2H); 7,81 (d; J = 1.8 Hz, 1H); 7,73 (d; J = 8.6 Hz, 2H); 7,59 (d; J = 8.5 Hz, 1H); 7,51 (m, 2H); 7,45 (m; 1H); 2,09 (s; 3H); 1,45 (s; 9H).

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 24,60 (C27); 169,39 (C26); 130,13 (C22); 118,63 (C21,23); 129,12 (C20,24); 143,04 (C19); 165,48 (C18); 128,92 (C15); 125,80 (C16); 123,0 (C14); 143,11 (C13); 130,60 (C12); 123,2 (C11); 131,60 (C10); 123,92 (C9); 124,56 (C8); 128,64 (C7); 153,82 (C5); 28,48 (C2,3,4); 80,33 (C1).

Figura 68. RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.

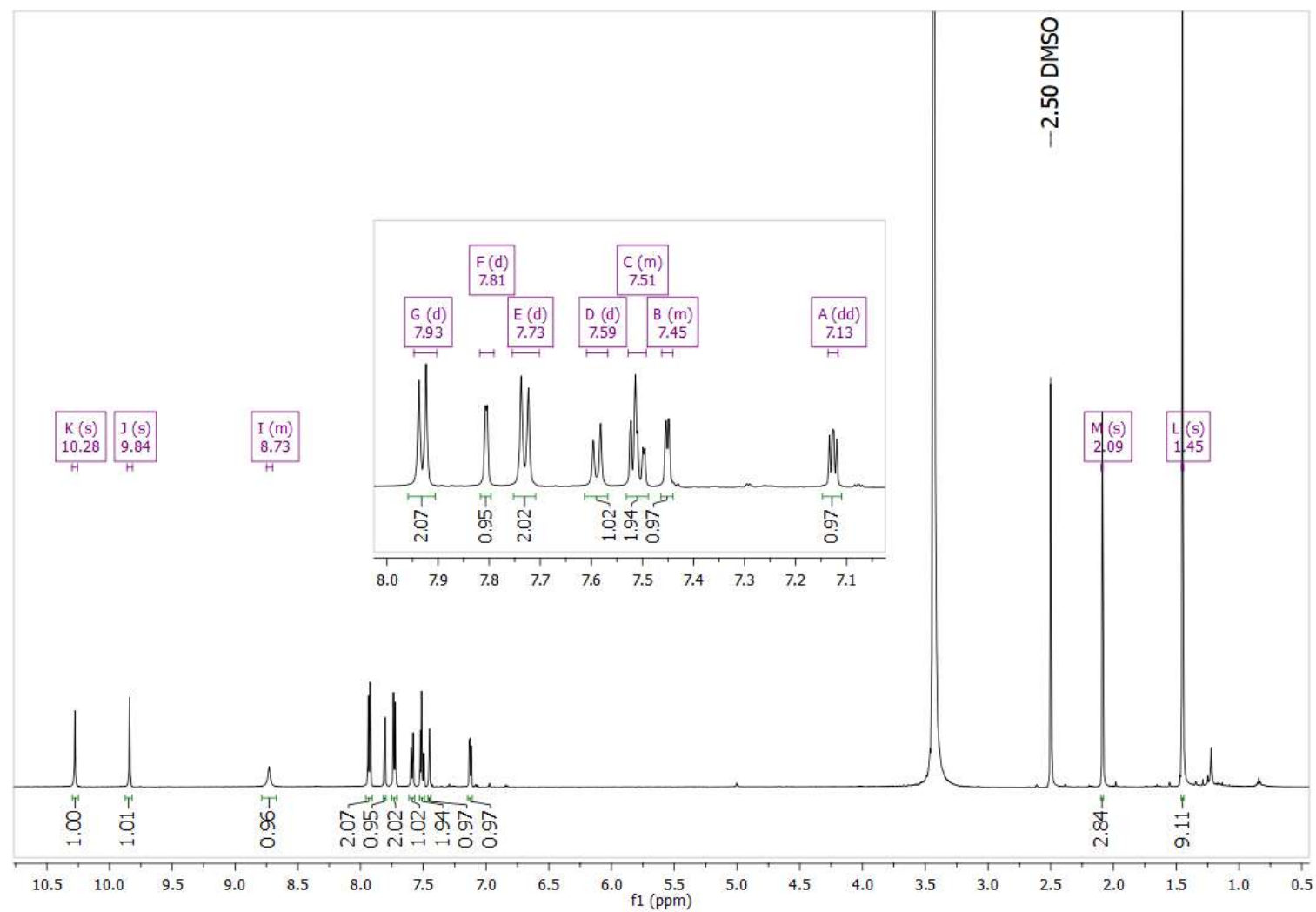


Figura 69. RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.

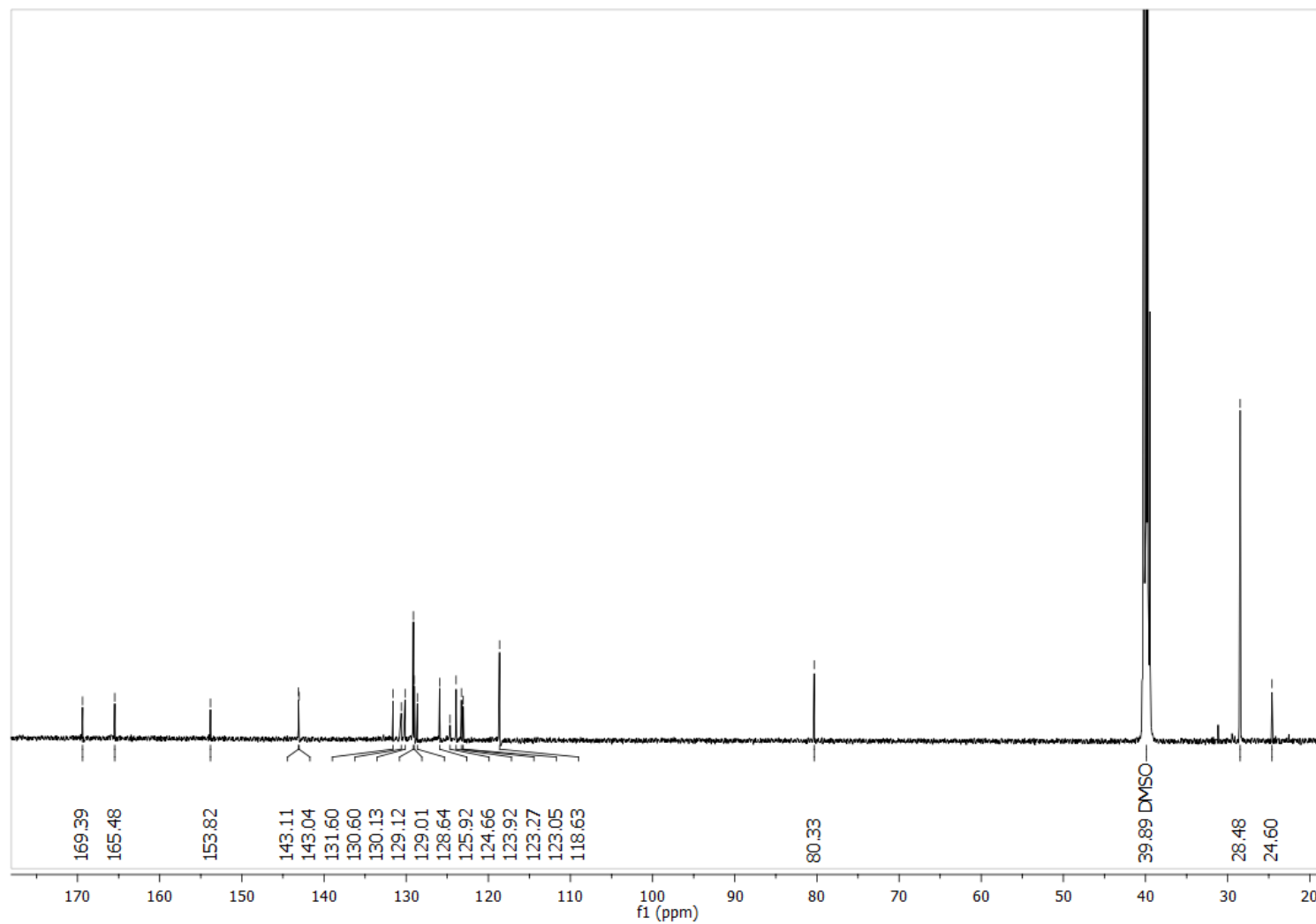


Figura 70. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.

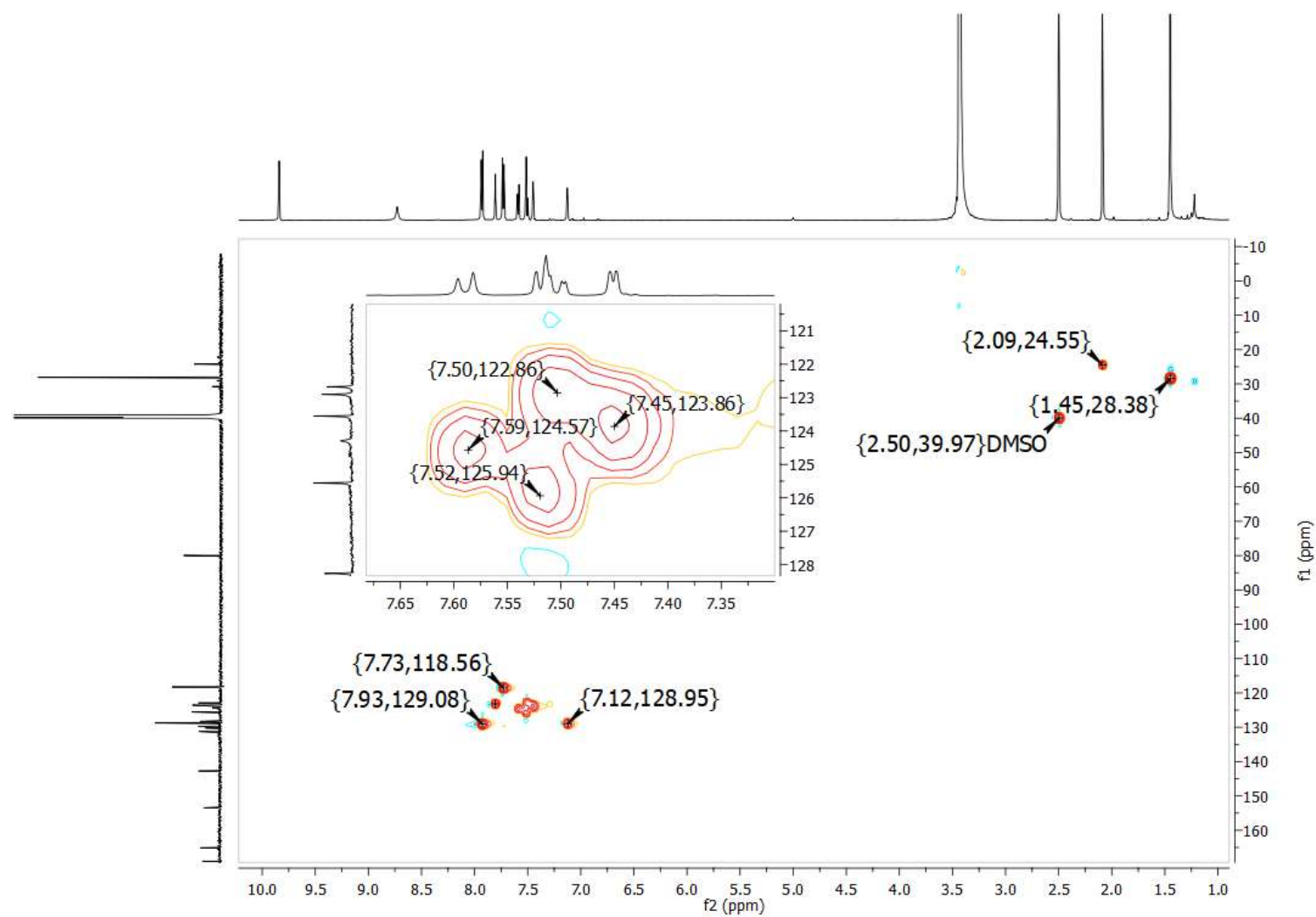
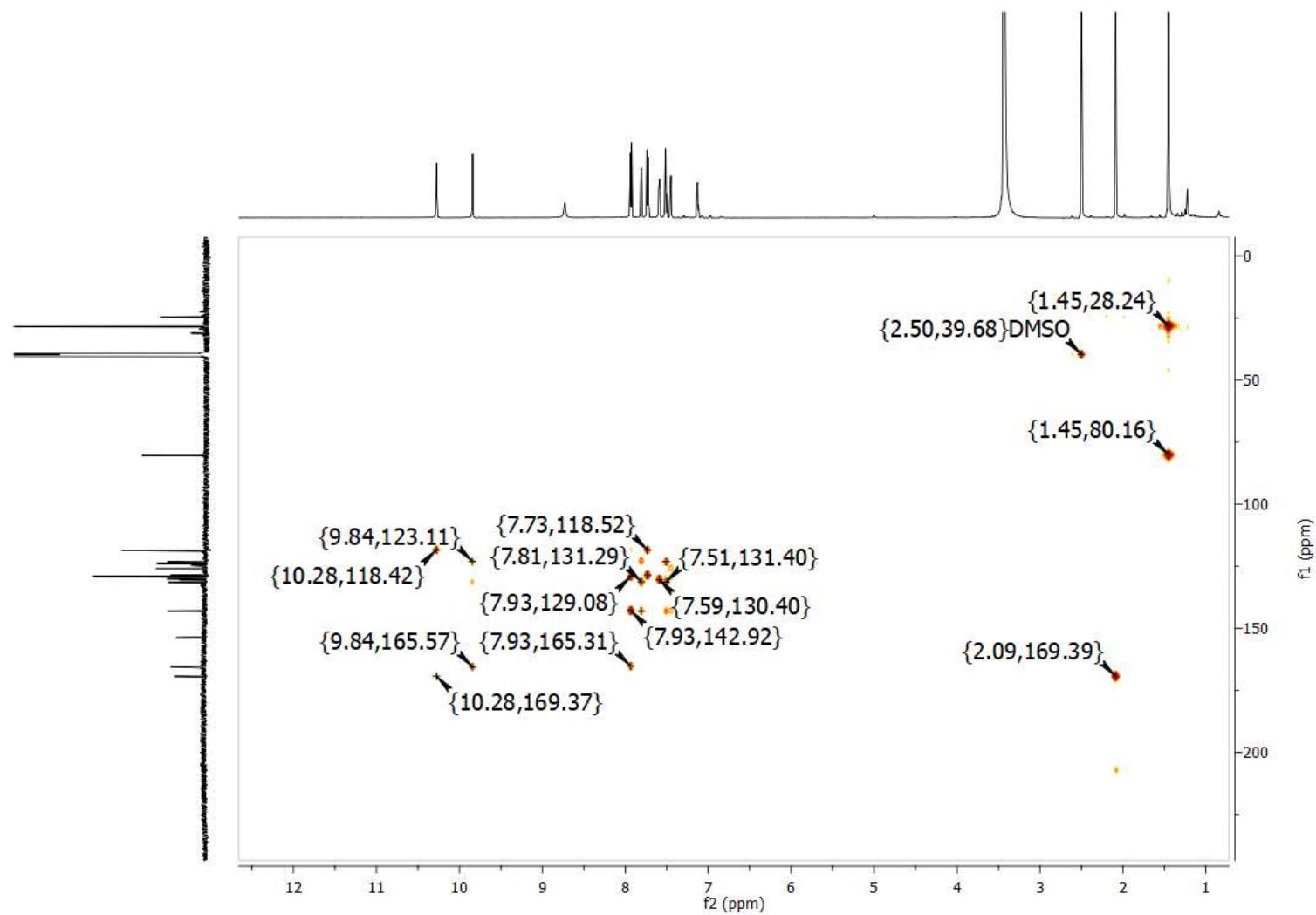
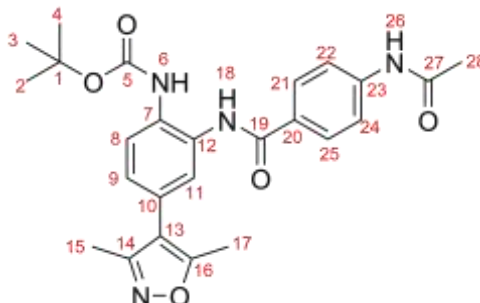


Figura 71. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.



xx) *tert*-butil(2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato



Método de purificação: Coluna de bancada (18 cm de altura e 3 cm de diâmetro), com os eluentes acetato de etila/hexano nas proporções 7:3.

Rendimento: 13%

Aspecto: Sólido de cor bege

Faixa de fusão: -

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 10,21 (s, 1H); 9,81 (s, 1H); 8,83 (s, 1H); 7,91 (d, J = 8.7, 2H); 7,73 (d, J = 8.7 Hz, 2H); 7,61 (d, J = 8.4 Hz, 1H); 7,54 (d, J = 1.8 Hz, 1H); 7,22 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H); 2,42 (s, 1H); 2,25 (s, 1H); 2,09 (s, 3H); 1,46 (s, 9H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 24,21 (C28); 168,95 (C27); 125,55 (C23); 118,22 (C22,24); 128,66 (C21,25); 142,20 (C20); 142,20 (C19); 11,37 (C17); 164,94 (C16); 10,55 (C15); 158,18 (C14); 128,28 (C13); 130,85 (C12); 126,39 (C11); 130,05 (C10); 128,28 (C9); 125,39 (C8); 142,65 (C7); 153,57 (C5); 28,07 (C2,3,4); 79,97 (C1) ppm.

Figura 72. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.

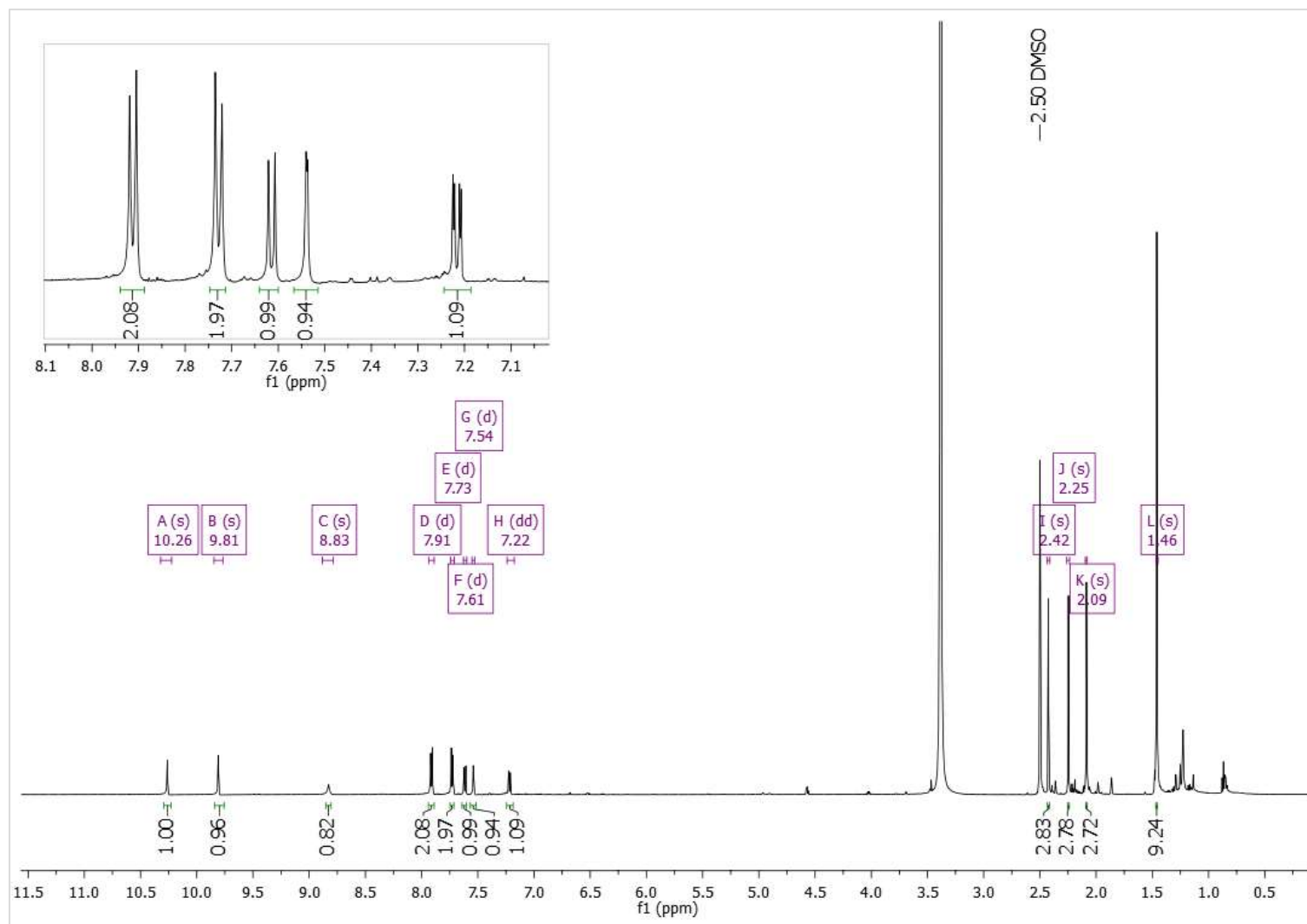
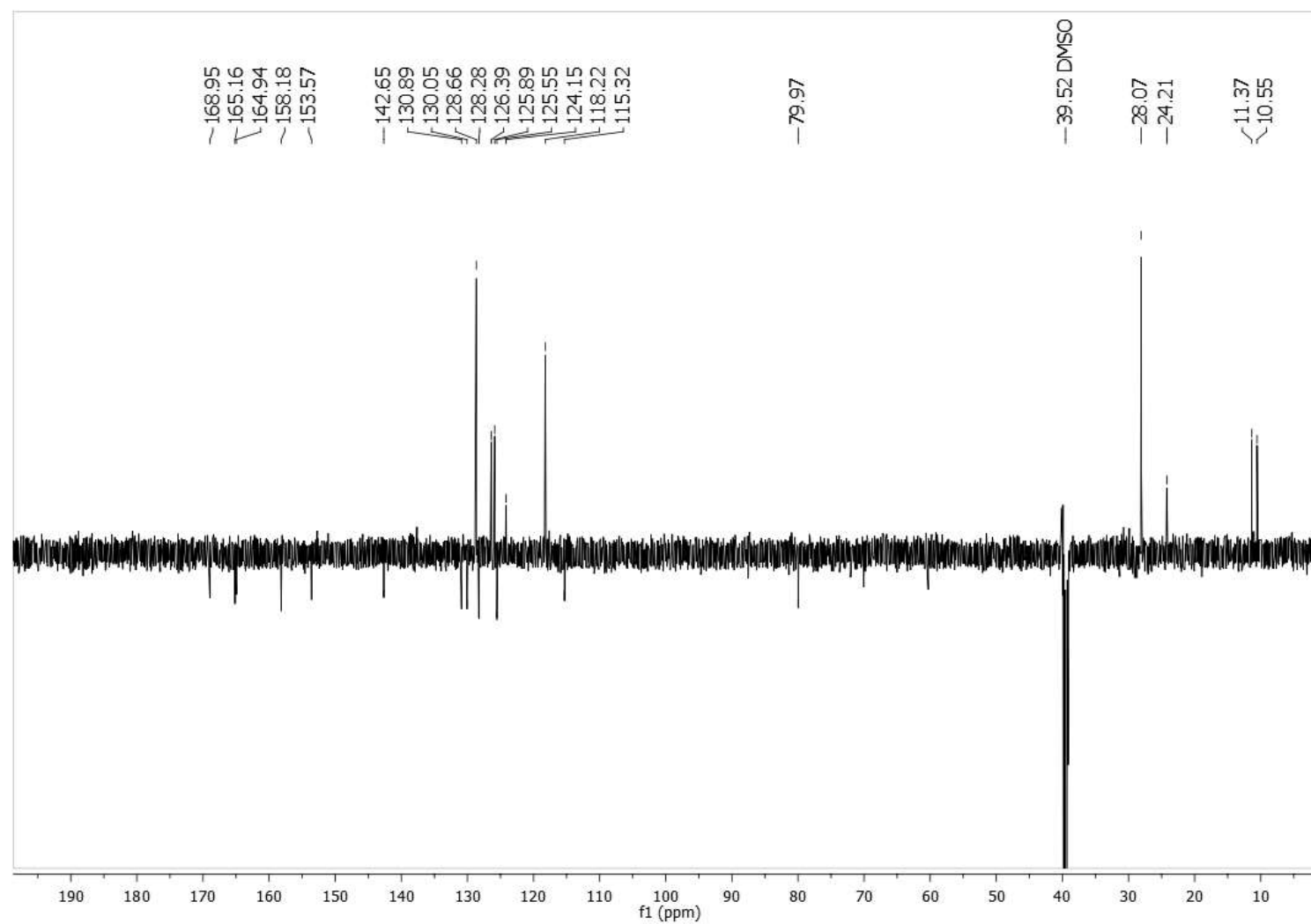
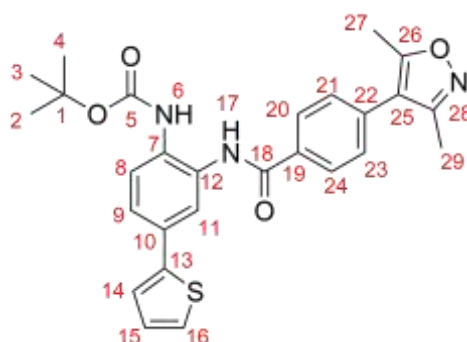


Figura 73. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-acetamidabenzamida)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)carbamato.



xxi) *tert*-butil(2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes hexano/acetato de etila nas proporções 7:3.

Rendimento: 35%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: -

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,98 (s, 1H); 8,76 (s, 1H); 8,08 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H); 7,82 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H); 7,65 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H); 7,59 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H); 7,54 (m, 2H); 7,46 (dd, $J = 3.6, 1.1$ Hz, 1H); 7,14 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H); 2,46 (s, 3H); 2,28 (s, 3H); 1,46 (s, 9H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 10,53 (C29); 158,11 (C28); 11,46 (C27); 165,79 (C26); 115,35 (C25); 133,51 (C22); 128,27 (C21,23); 128,90 (C20,24); 133,12 (C19); 165,23 (C18); 123,01 (C16); 122,80 (C15); 142,67 (C13); 123,53 (C12); 128,56 (C11); 131,46 (C10); 123,46 (C9,14); 125,49 (C8); 129,79 (C7); 153,28 (C5); 28,06 (C2,3,4); 79,82 (C1) ppm.

Figura 74. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.

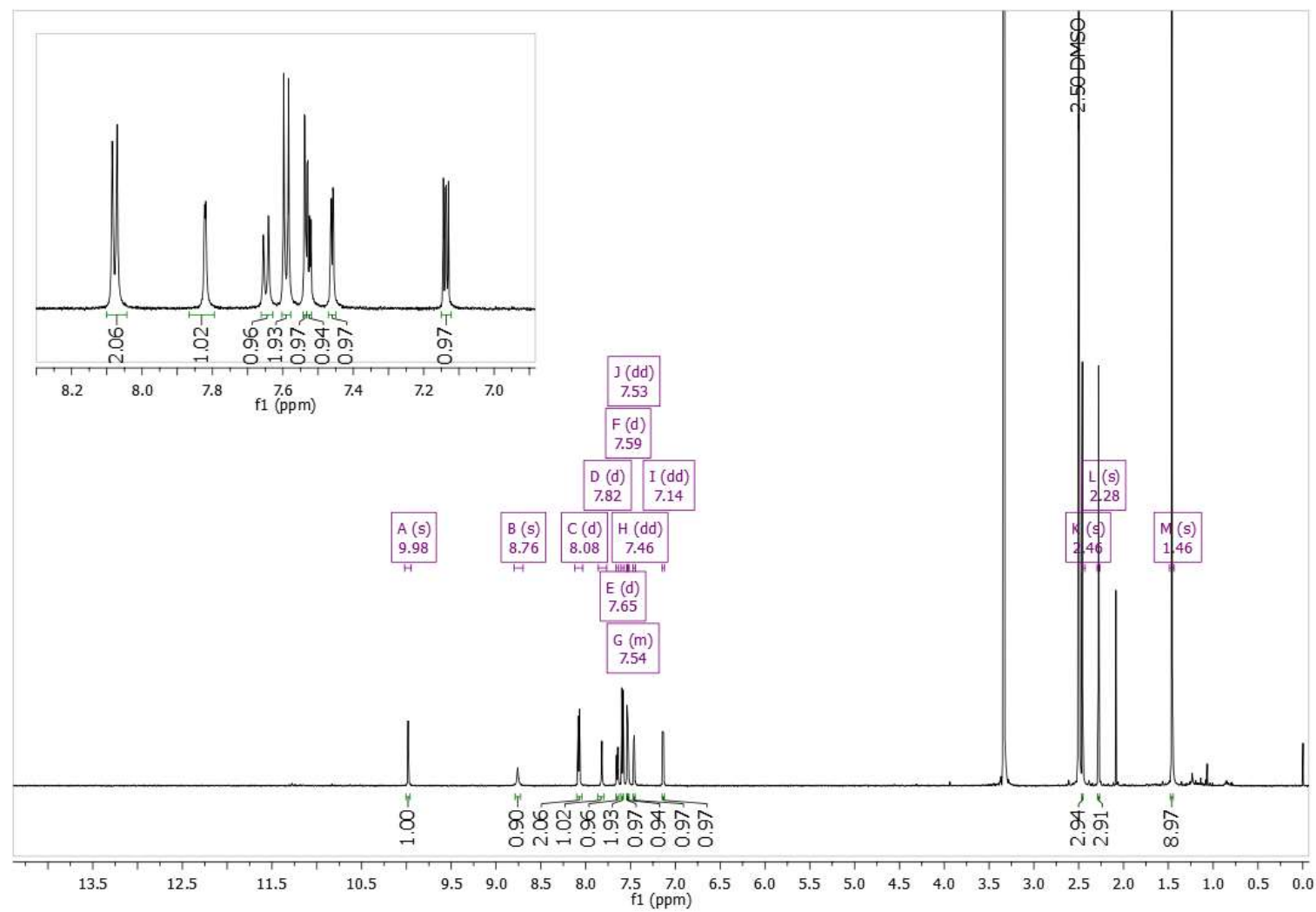
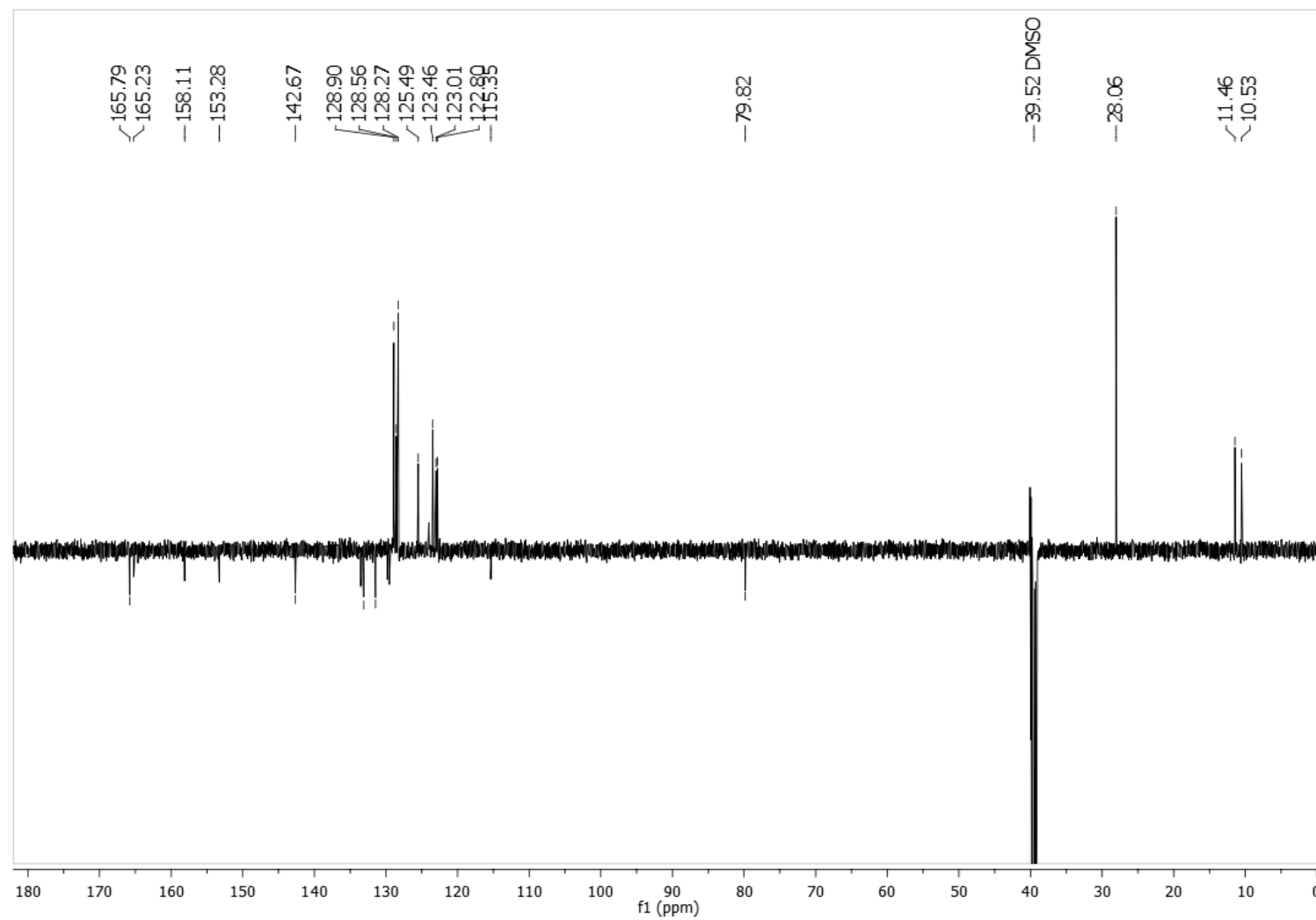
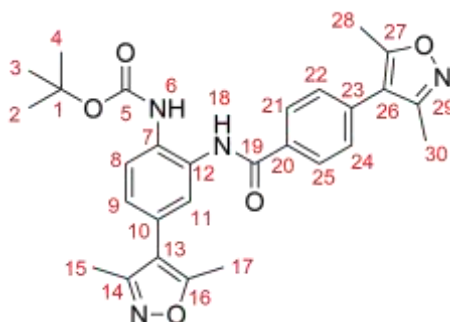


Figura 75. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto *tert*-butil (2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)-4-(tiofen-2-il)fenil)carbamato.



xxii) *tert*-butil(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato



Método de purificação: Biotage®, método isocrático dos eluentes hexano/acetato de etila nas proporções 7:3.

Rendimento: 33%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: -

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,96 (s, 1H); 8,84 (s, 1H); 8,07 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H); 7,68 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H); 7,59 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H); 7,56 (s, 1H); 7,25 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H); 2,46 (s, 3H); 2,44 (s, 3H); 2,28 (s, 3H); 2,27 (s, 3H); 1,48 (s, 9H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 10,49 (C30); 158,11 (C29,14); 11,42 (C28); 165,76 (C27,16); 115,33 (C26); 133,50 (C23); 128,91 (C22,24); 128,20 (C21,25); 133,15 (C20); 165,09 (C19); 11,31 (C17); 10,49 (C15); 115,25 (C13); 129,63 (C12); 126,50 (C11); 125,35 (C10); 126,04 (C9); 123,90 (C8); 131,14 (C7); 153,41 (C5); 28,03 (C2,3,4); 79,86 (C1) ppm.

Figura 76. RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato.

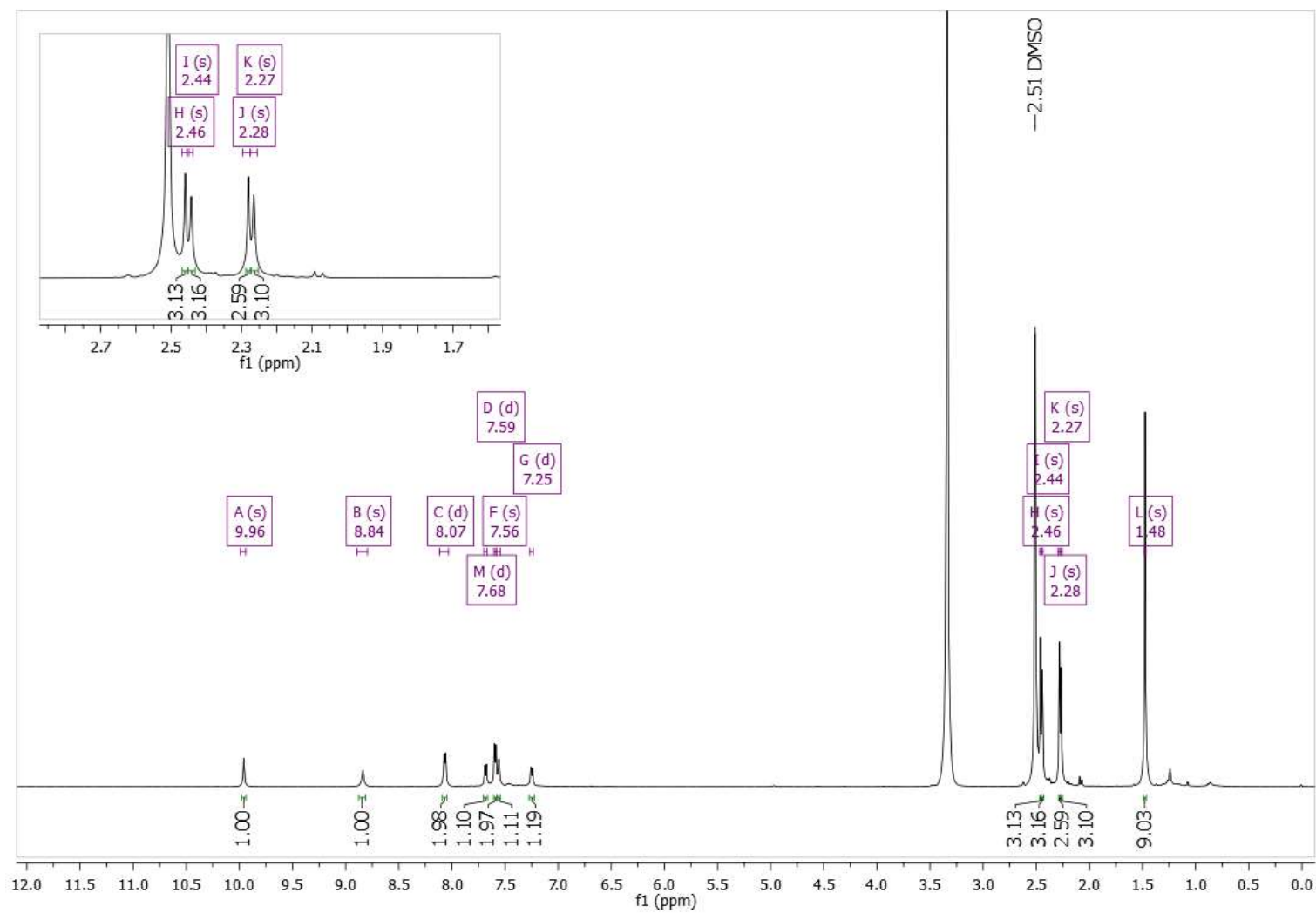


Figura 77. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto *tert*-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato

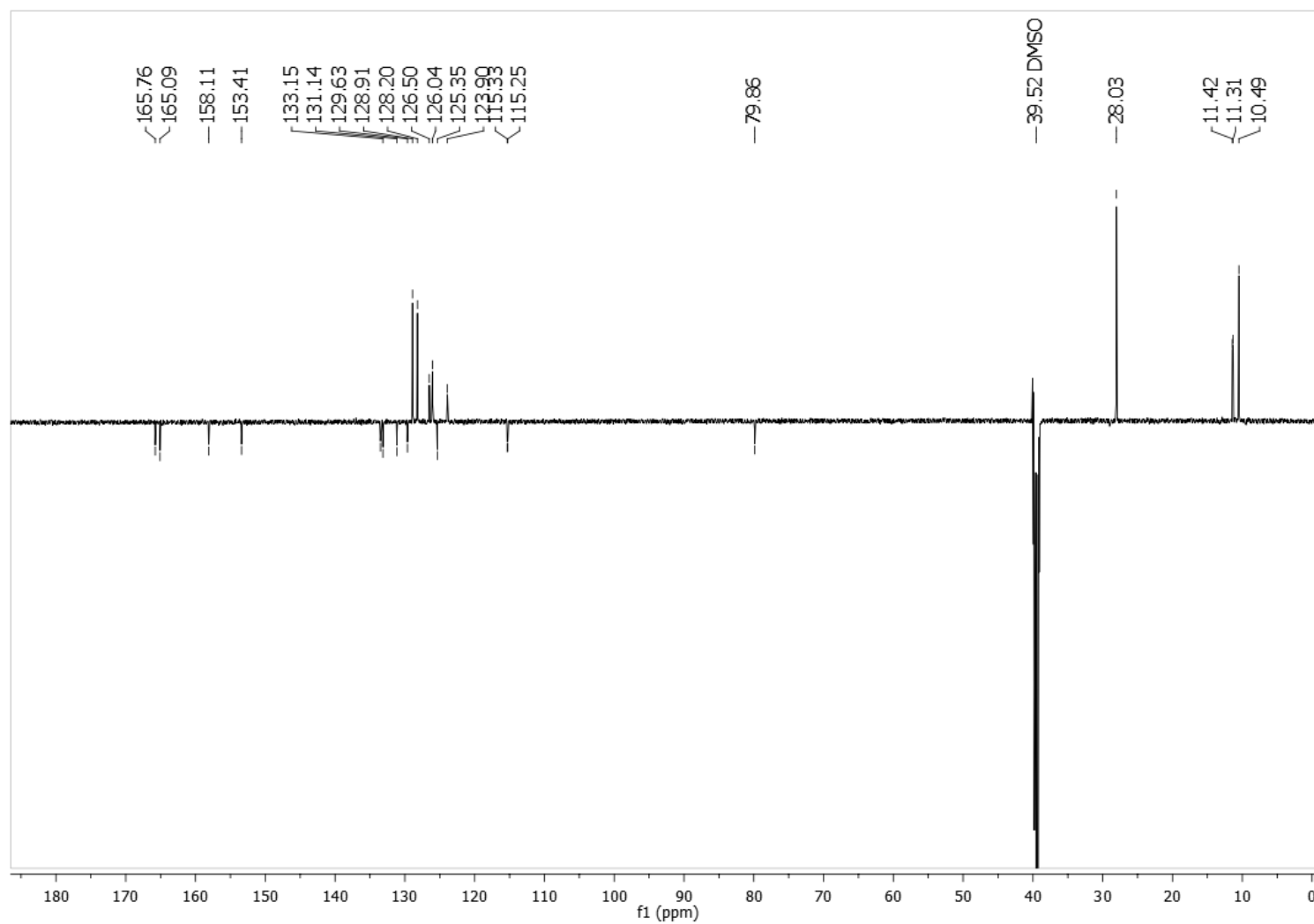


Figura 78. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato.

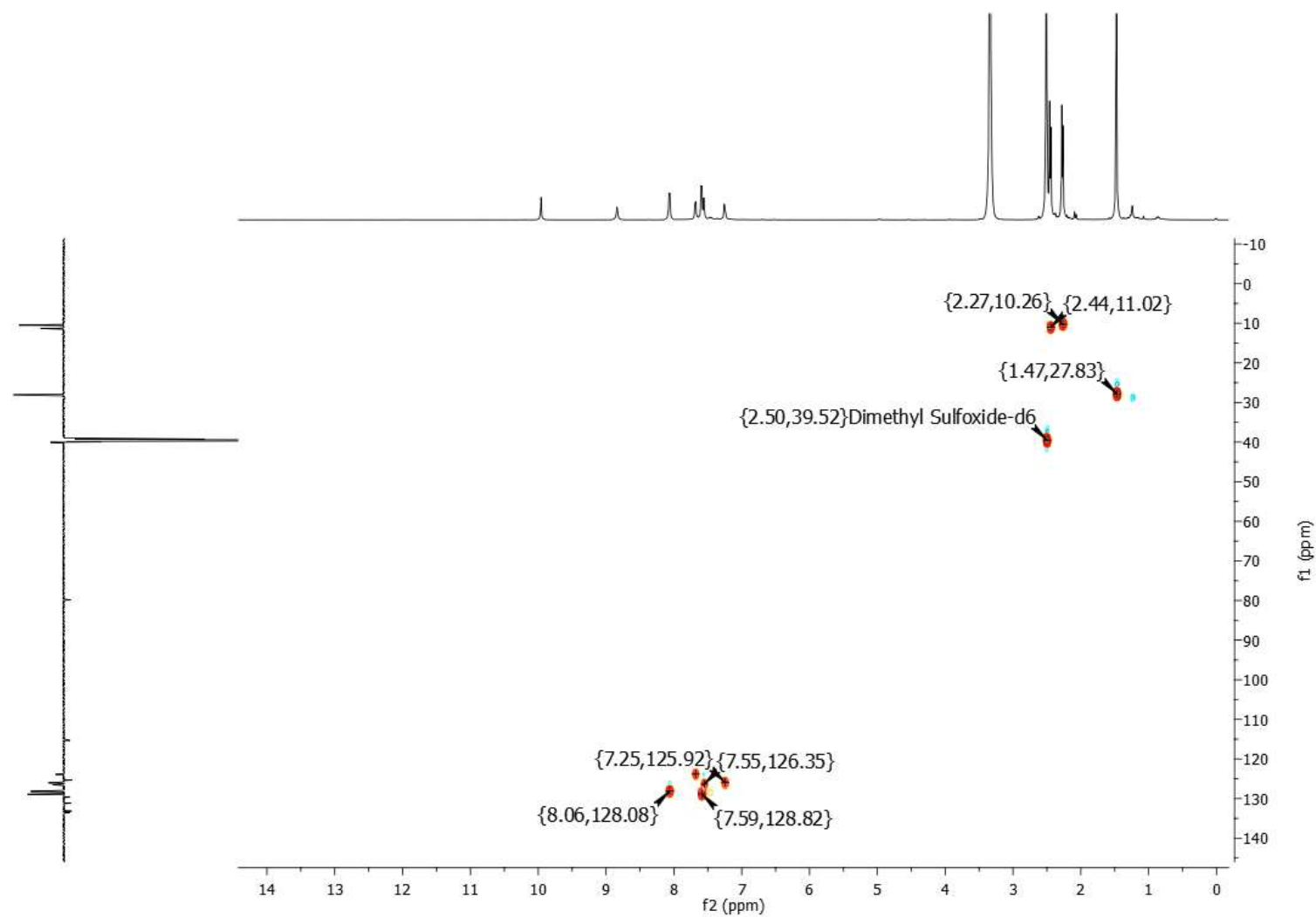
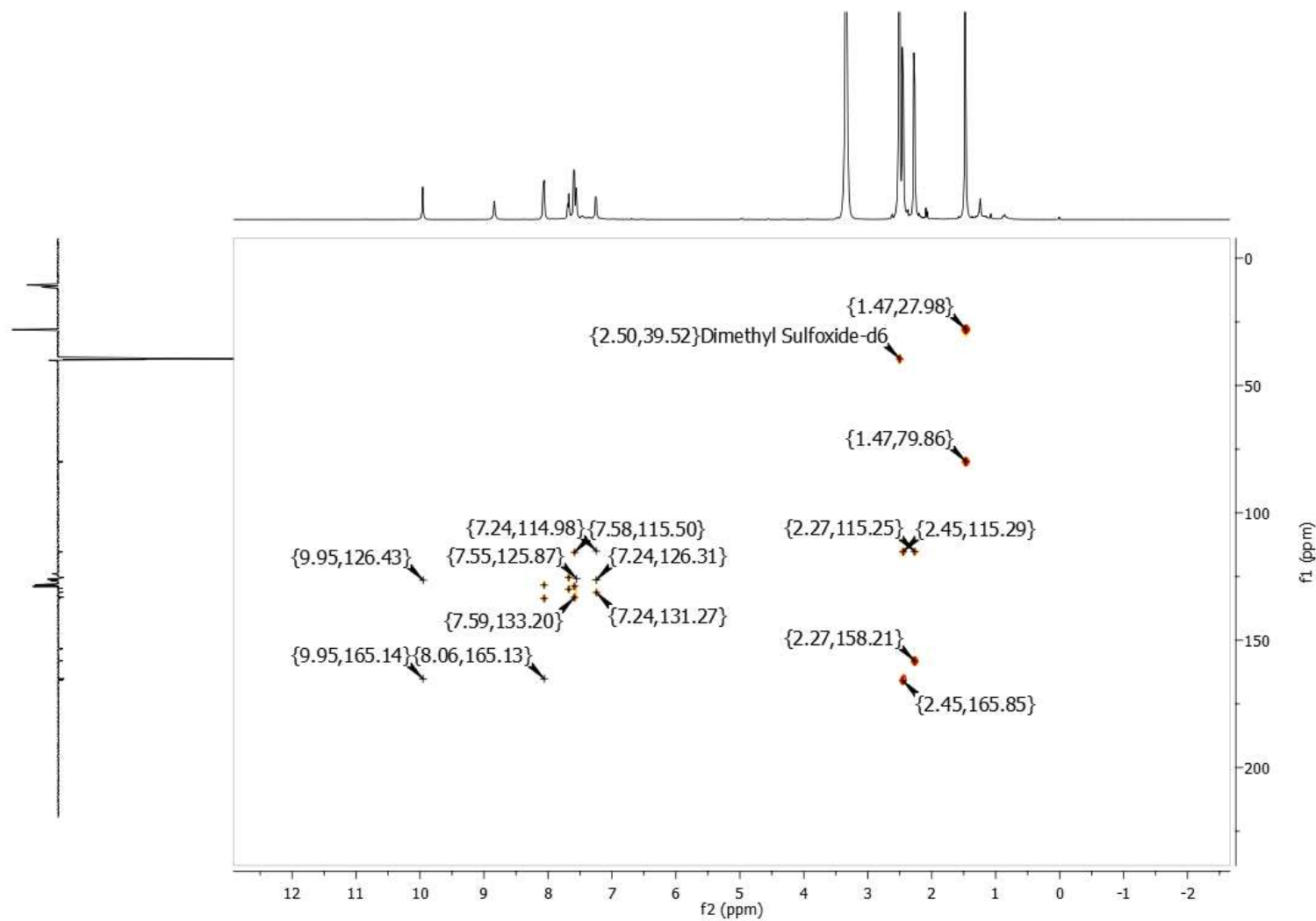
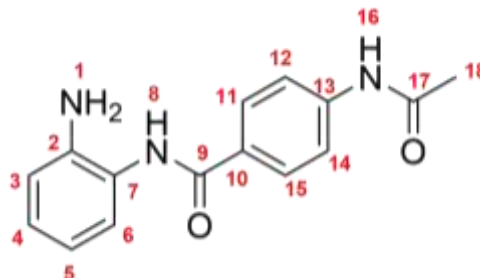


Figura 79. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *tert*-butil (4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)-2-(4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida)fenil)carbamato.



APÊNDICE B - CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FINAIS

i) 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida - (4)



Método de purificação: Cristalização em CH₂Cl₂.

Rendimento: 12%

Aspecto: Sólido de cor branca

Faixa de fusão: 236-240 °C

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 10,21 (s; 1H); 9,57 (s; 1H); 7,93 (d; *J* = 8,5 Hz; 2H); 7,69 (d; *J* = 8.6 Hz; 2H); 7,14 (d; *J* = 7.6 Hz; 1H); 6,96 (m; 1H); 6,77 (dd; *J* = 8.0, 1.1 Hz; 1H); 6,59 (m; 1H); 4,86 (s; 2H); 2,08 (s, 3H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 24,68 (C18); 169,29 (C17); 118,42 (C12,14); 129,21 (C13); 129,06 (C11,15); 142,53 (C10); 165,24 (C9); 143,58 (C7); 127,18 (C6); 126,72 (C5); 116,68 (C4); 116,51 (C3); 123,92 (C2) ppm.

IV (KBr, cm⁻¹): 3471,87; 1670,35; 1647,21; 1602,85; 1541,12; 1456,26; 1404,18; 1309,67.

Figura 80. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)

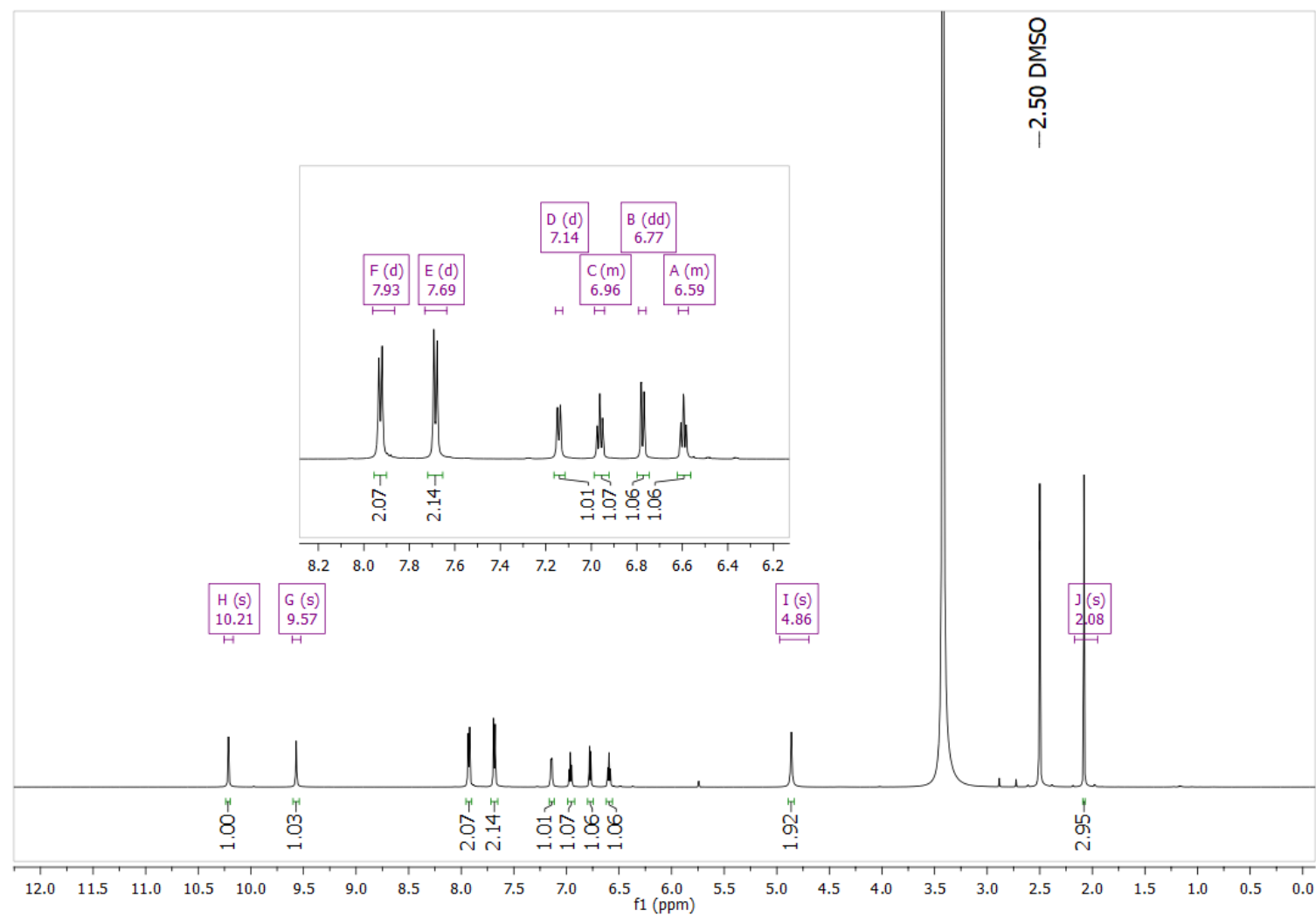


Figura 81. RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)

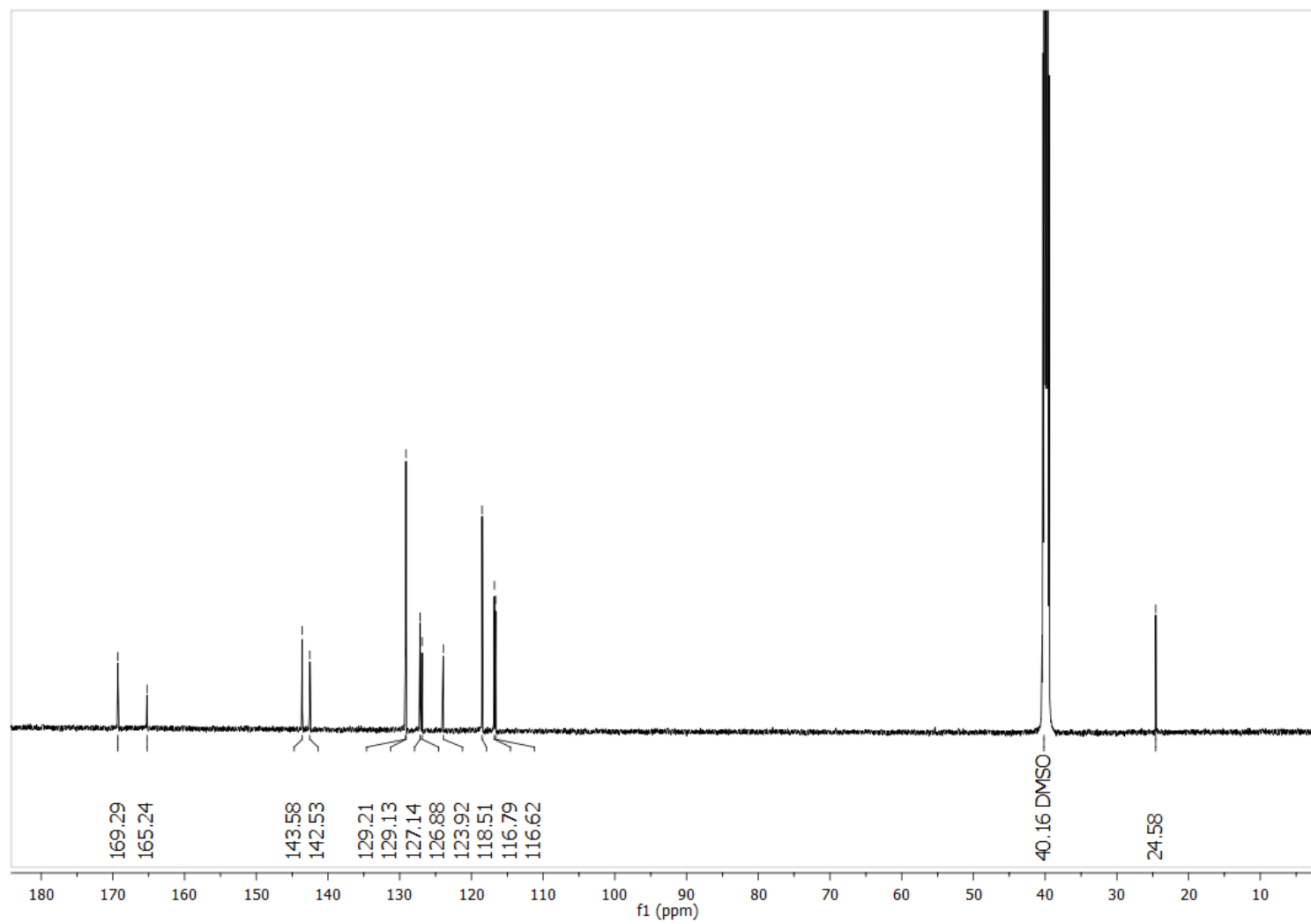


Figura 82. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)

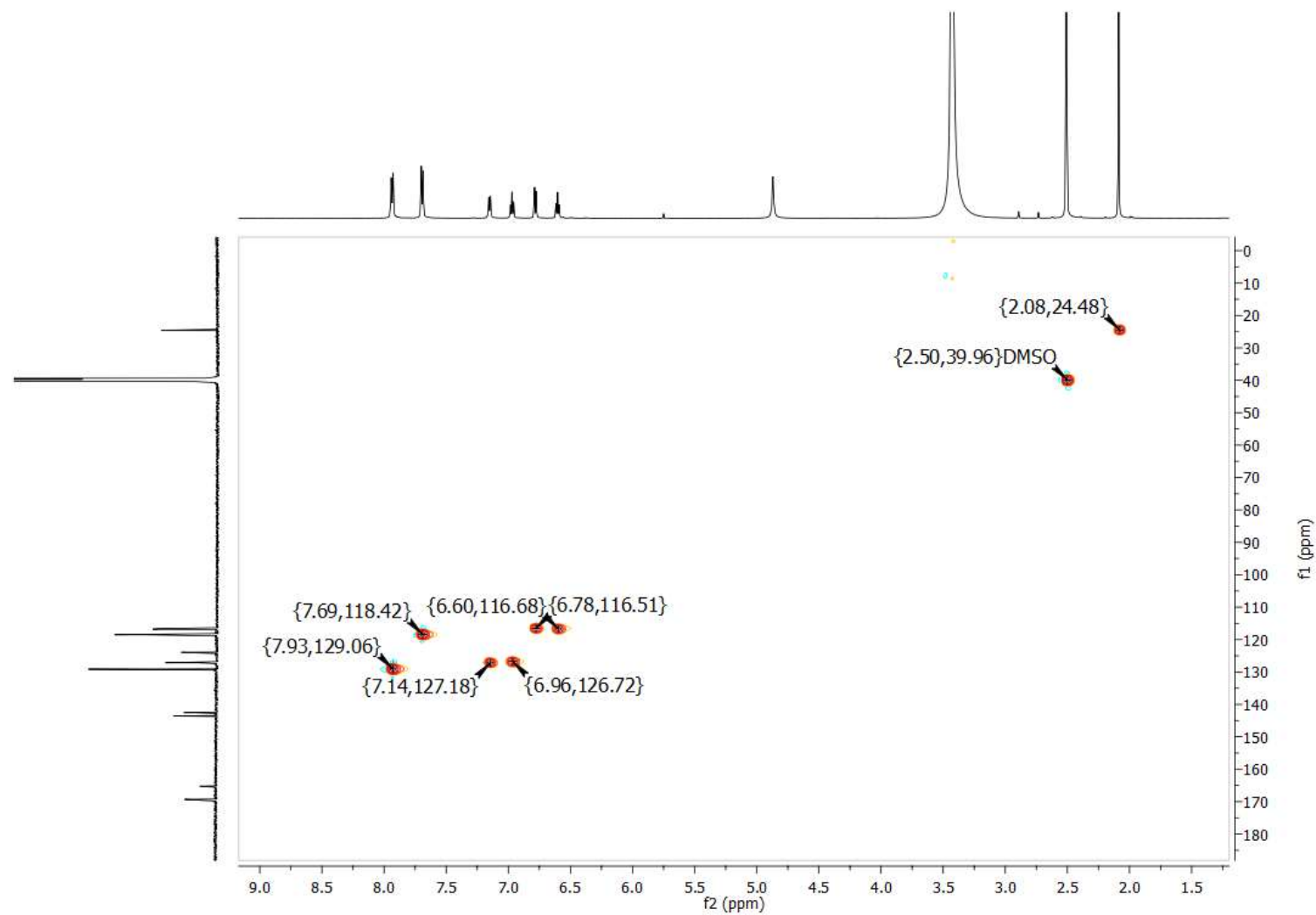


Figura 83. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4)

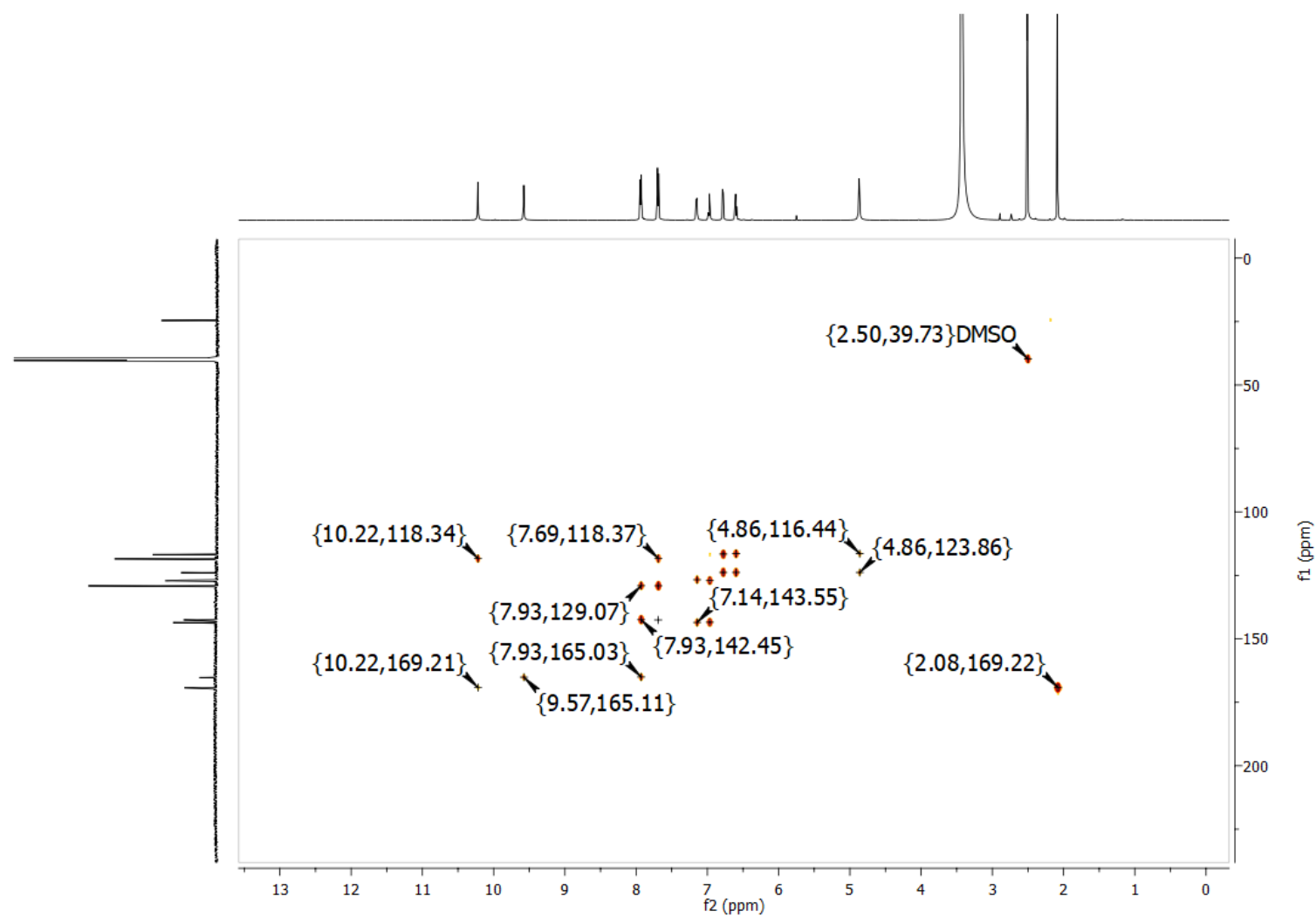
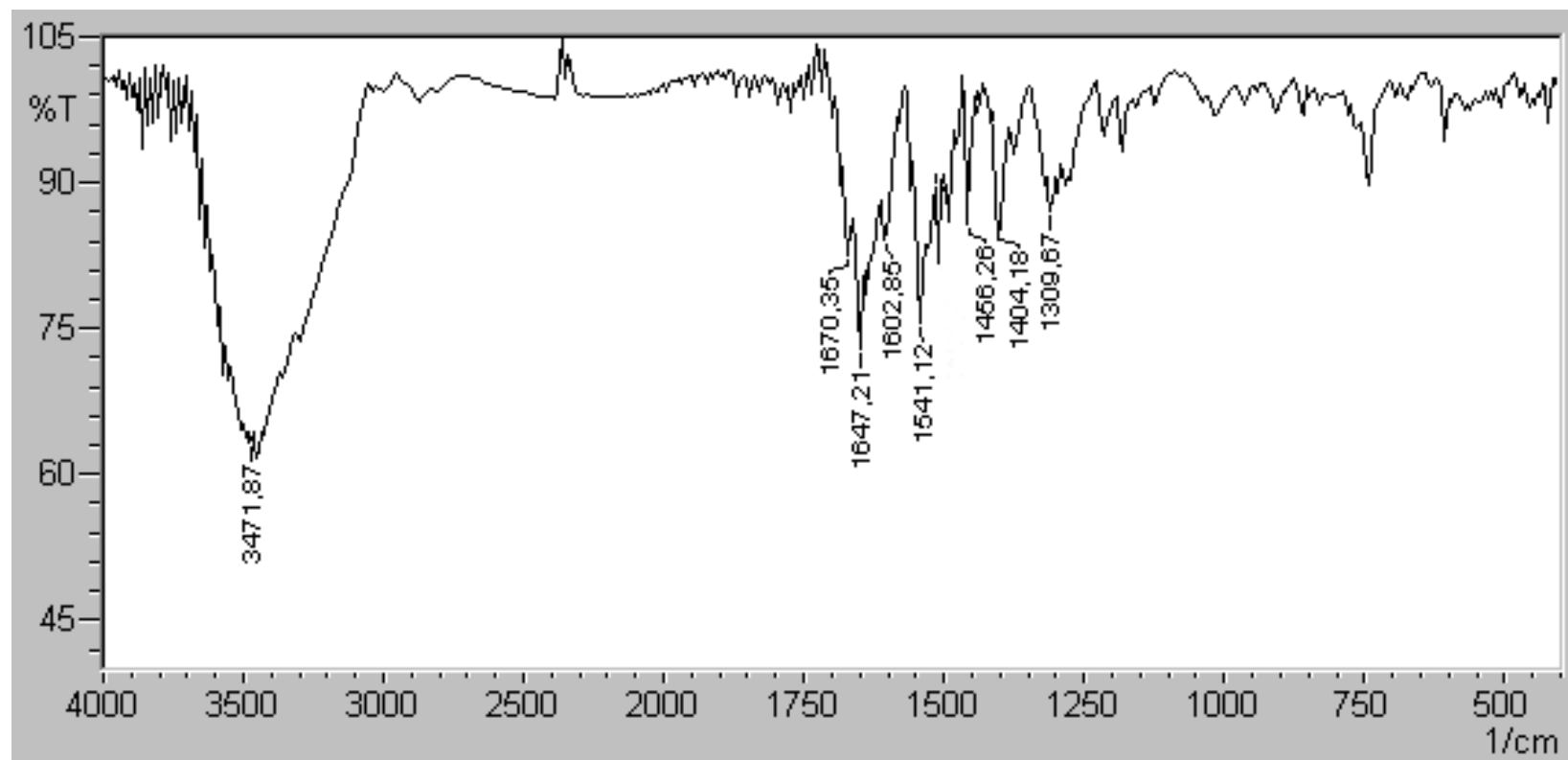
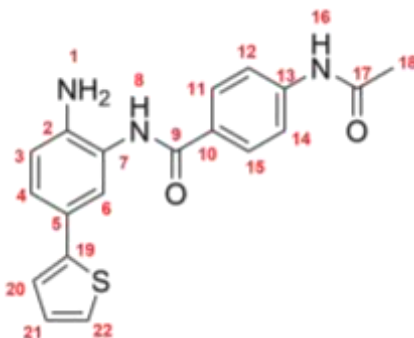


Figura 84. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-aminofenil)benzamida (4).



ii) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida - (9)



Método de purificação: Extração líquido/líquido.

Rendimento: 88%

Aspecto: Sólido de cor marrom

Faixa de fusão: 120-130 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 10,22 (s, 1H); 9,79 (s, 1H); 7,97 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H); 7,72 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H); 7,52 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H); 7,42 (dd, $J = 5.1, 1.1$ Hz, 1H); 7,39 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H); 7,32 (dd, $J = 3.6, 1.0$ Hz, 1H); 7,07 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H); 6,93 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H); 2,09 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 122,42 (C22); 128,73 (C21); 124,56 (C20); 144,0 (C19); 24,59 (C18); 169,36 (C17); 131,71 (C16); 128,8 (C13); 118,52 (C12, C14); 129,30 (C11, C15); 142,08 (C10); 165,50 (C9); 138,7 (C7); 124,19 (C6); 125,8 (C5); 124,24 (C4); 119,0 (C3); 125,8 (C2).

IV (KBr, cm^{-1}): 3471,87; 1683,86; 1635,64; 1541,12; 1400,32; 1313,52.

Figura 85. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9).

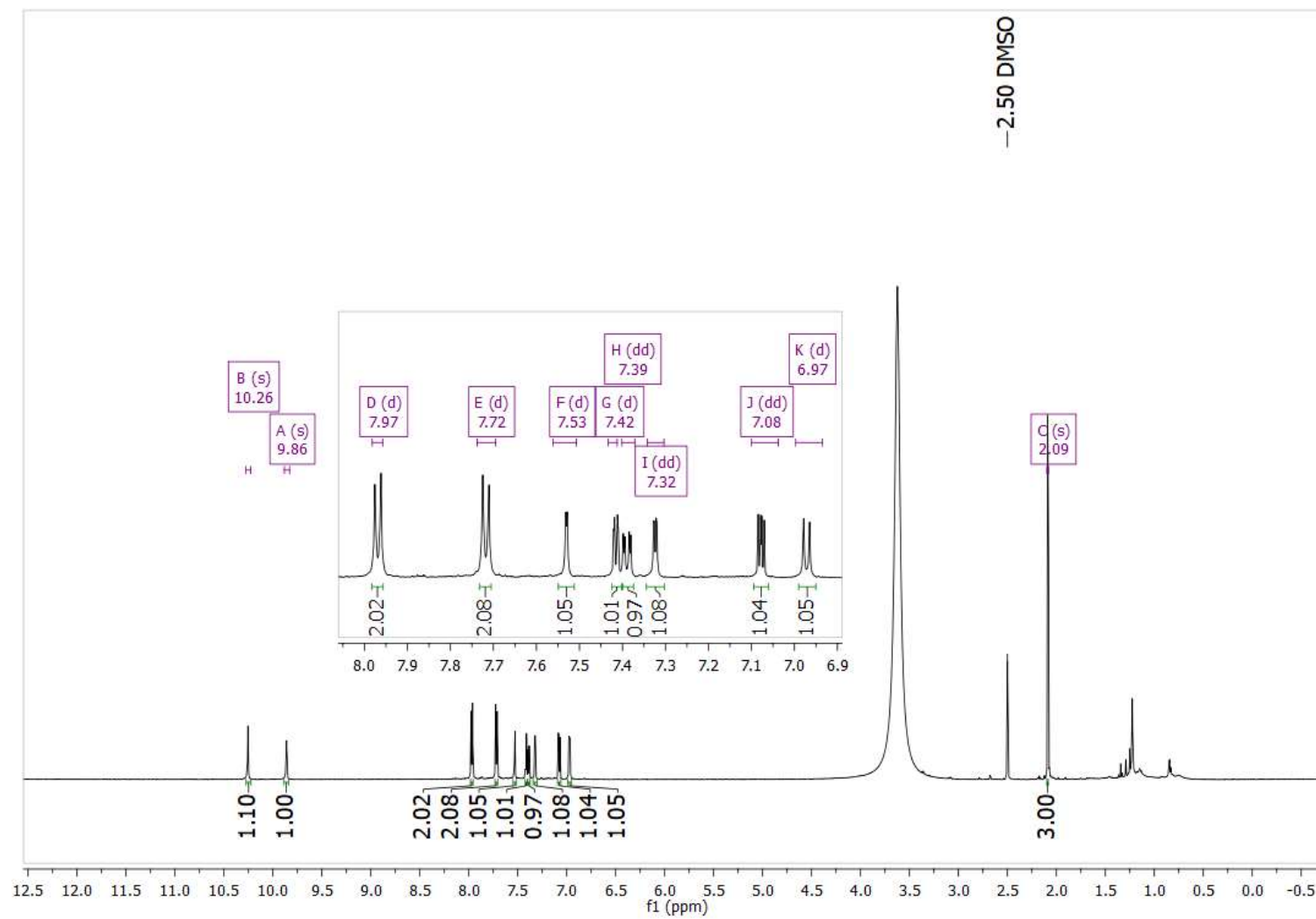


Figura 86. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9).

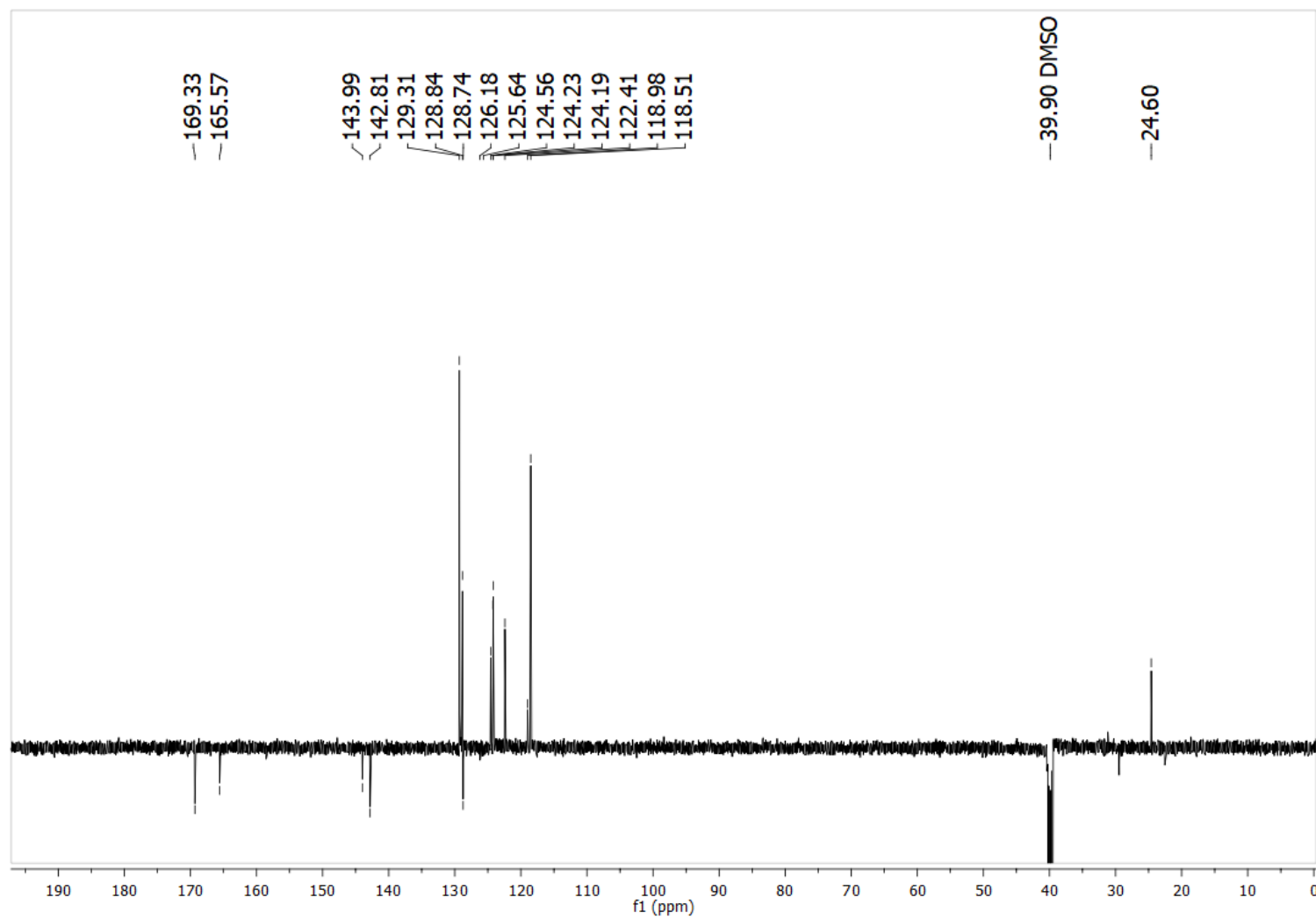


Figura 87. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9).

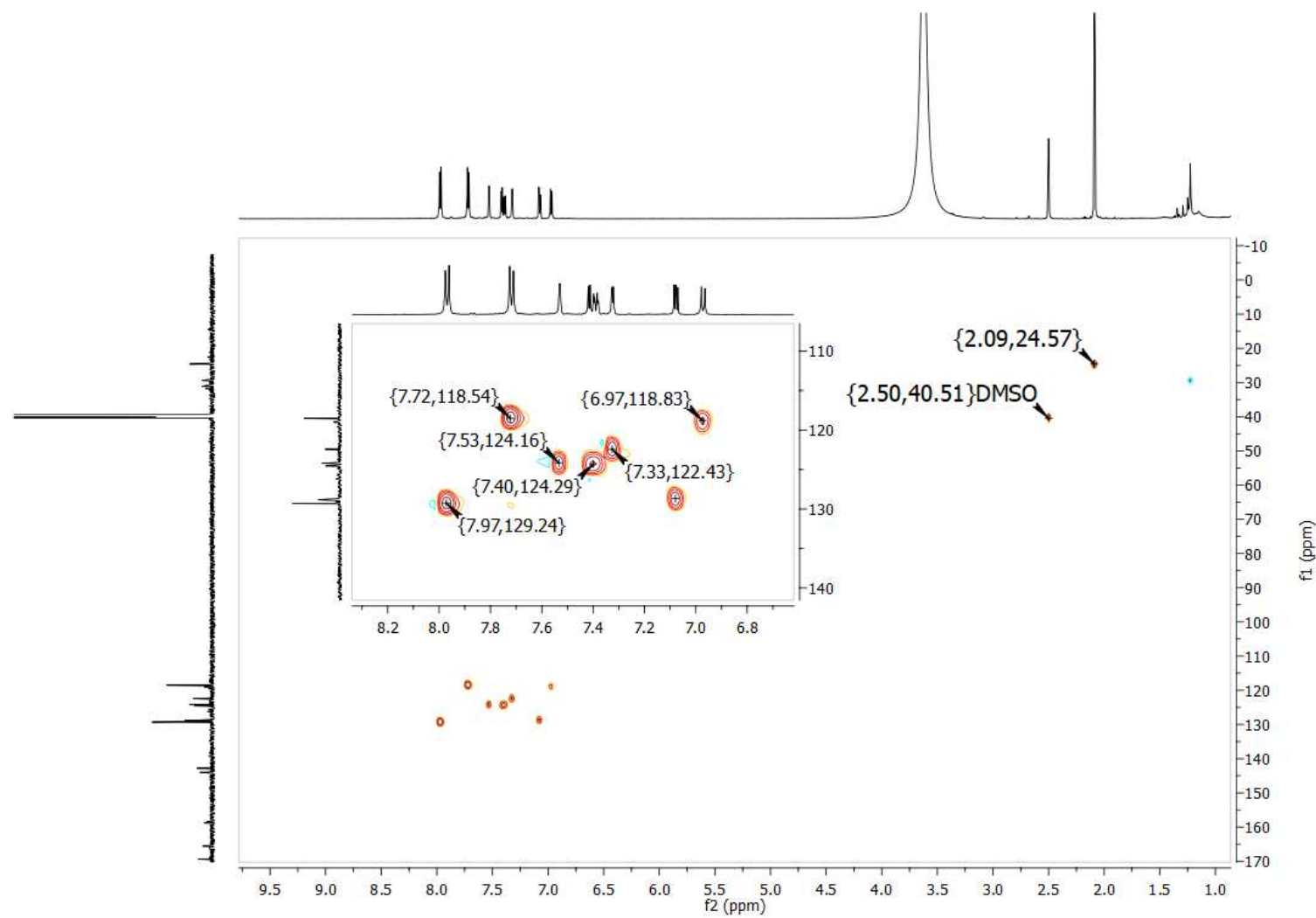


Figura 88. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9).

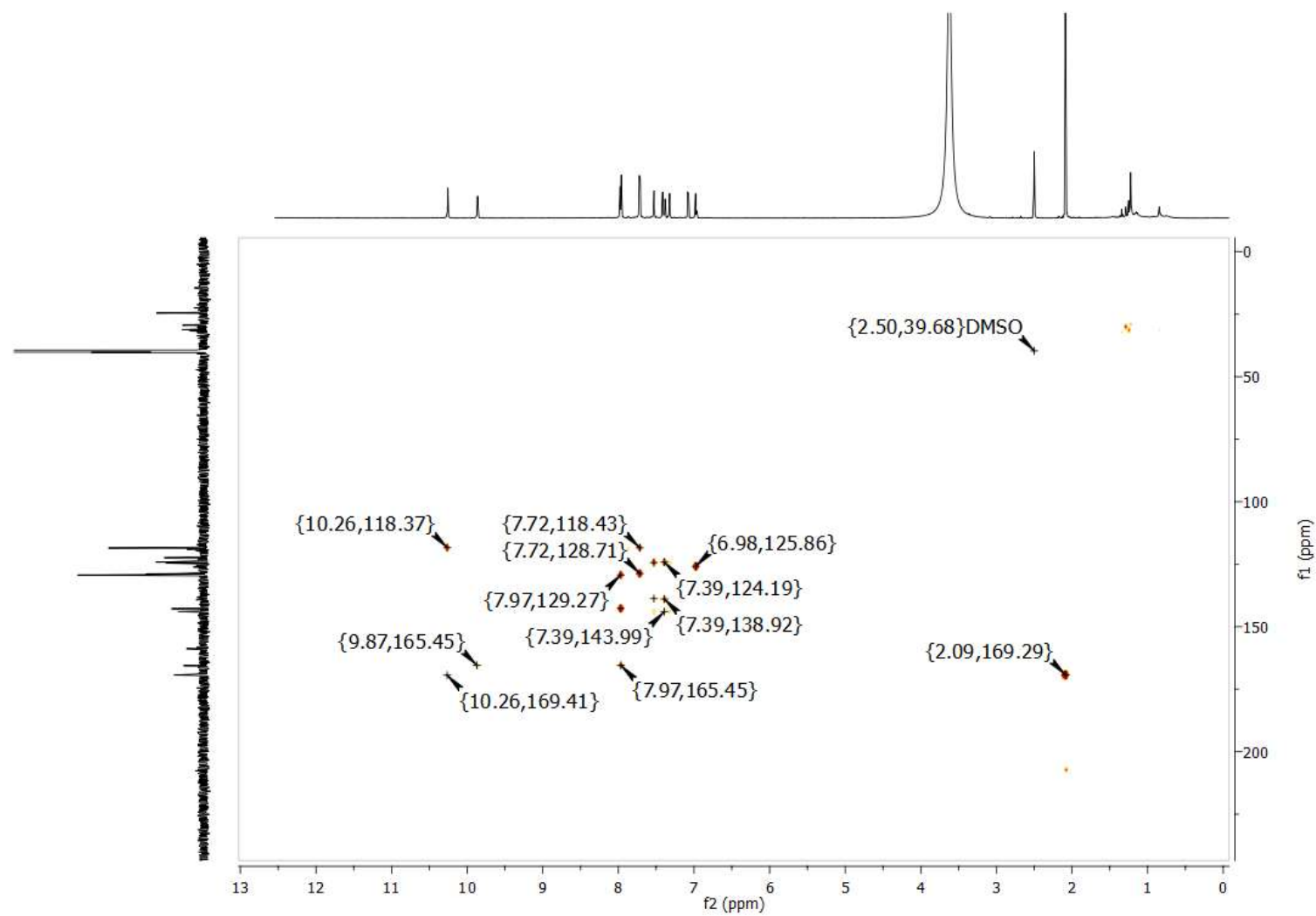
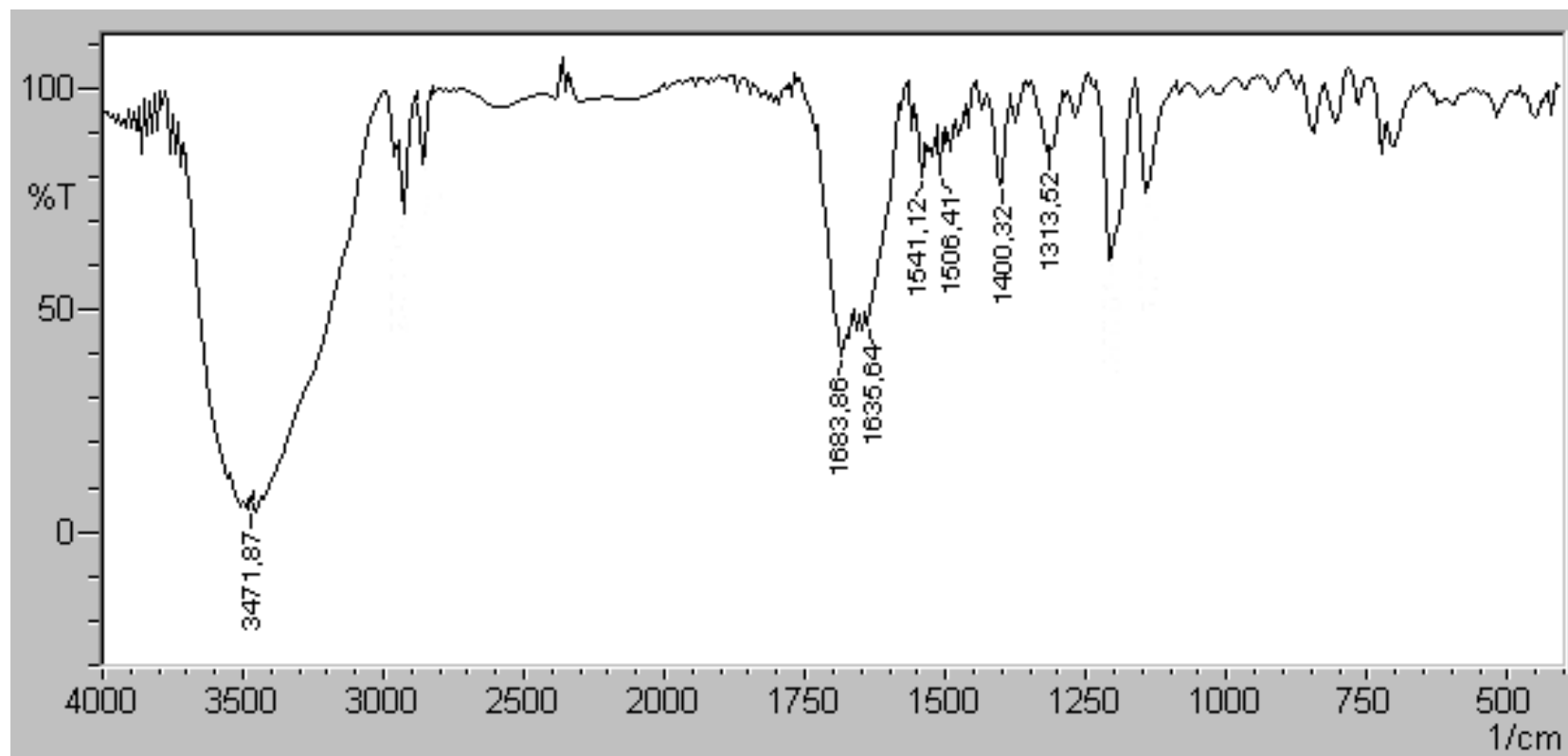
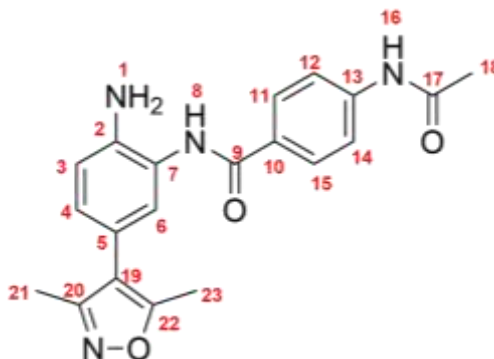


Figura 89. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)benzamida (9).



iii) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida - (12)



Método de purificação: Extração líquido/líquido.

Rendimento: 83%

Aspecto: Sólido de cor bege

Faixa de fusão: 182-185 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 10,21 (s, 1H); 9,60 (s, 1H); 7,94 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H); 7,70 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H); 7,17 (s, 1H); 6,97 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H); 6,86 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H); 5,09 (s, 2H); 2,38 (s, 3H); 2,20 (s, 3H); 2,08 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 11,30 (C23); 164,00 (C22); 10,57 (C21); 158,21 (C20); 115,90 (C19); 24,17 (C18); 168,28 (C17); 128,69 (C13); 118,02 (C12, C14); 128,76 (C11, C15); 142,20 (C10); 164,85 (C9); 142,47 (C7); 127,03 (C6); 117,25 (C5); 126,88 (C4); 116,33 (C3); 123,52 (C2) ppm.

IV (KBr, cm^{-1}): 3446,79; 1683,86; 1635,64; 1608,62; 1541,12; 1506,41; 1404,18; 1363,67.

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)

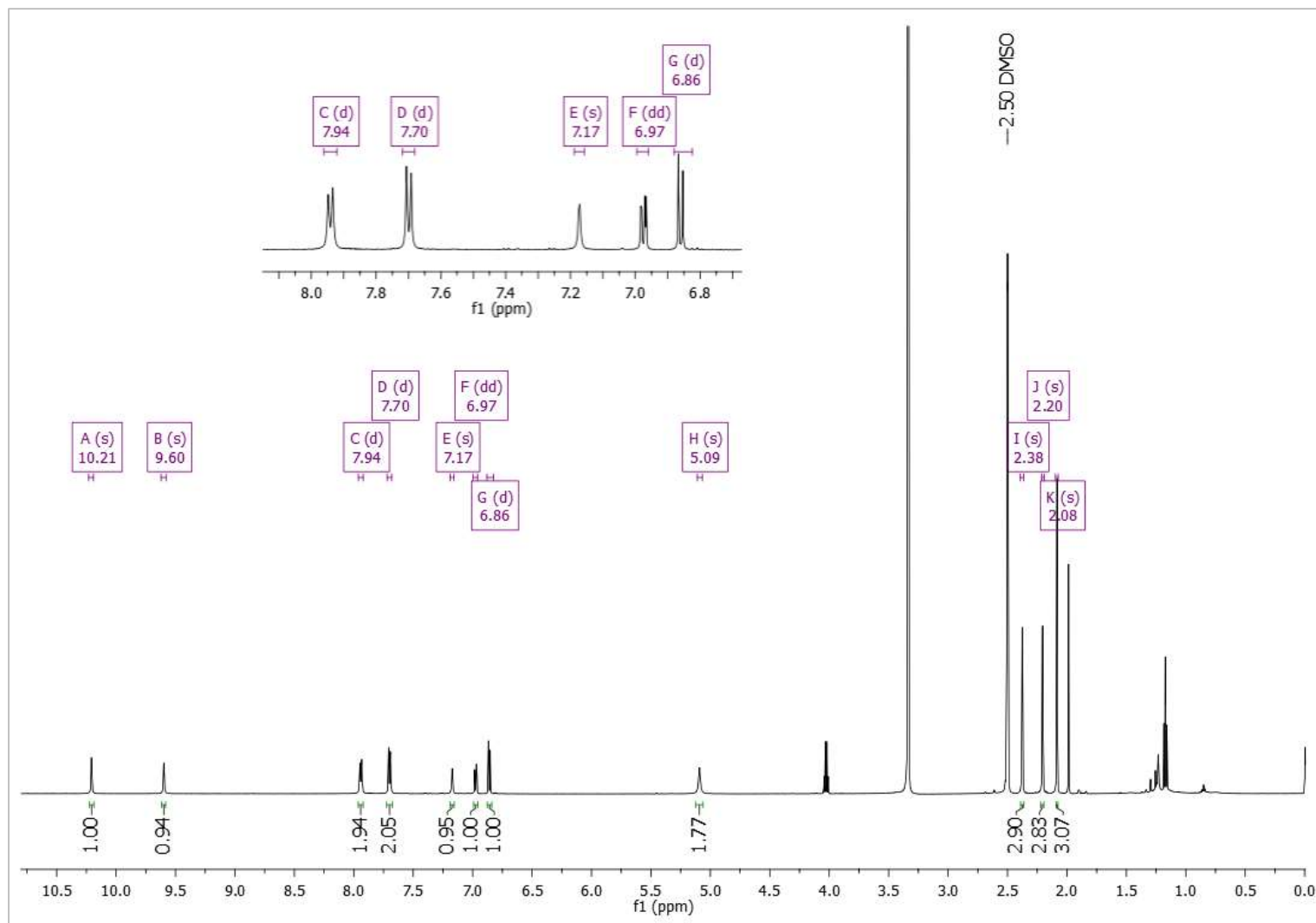


Figura 91. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO- d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)

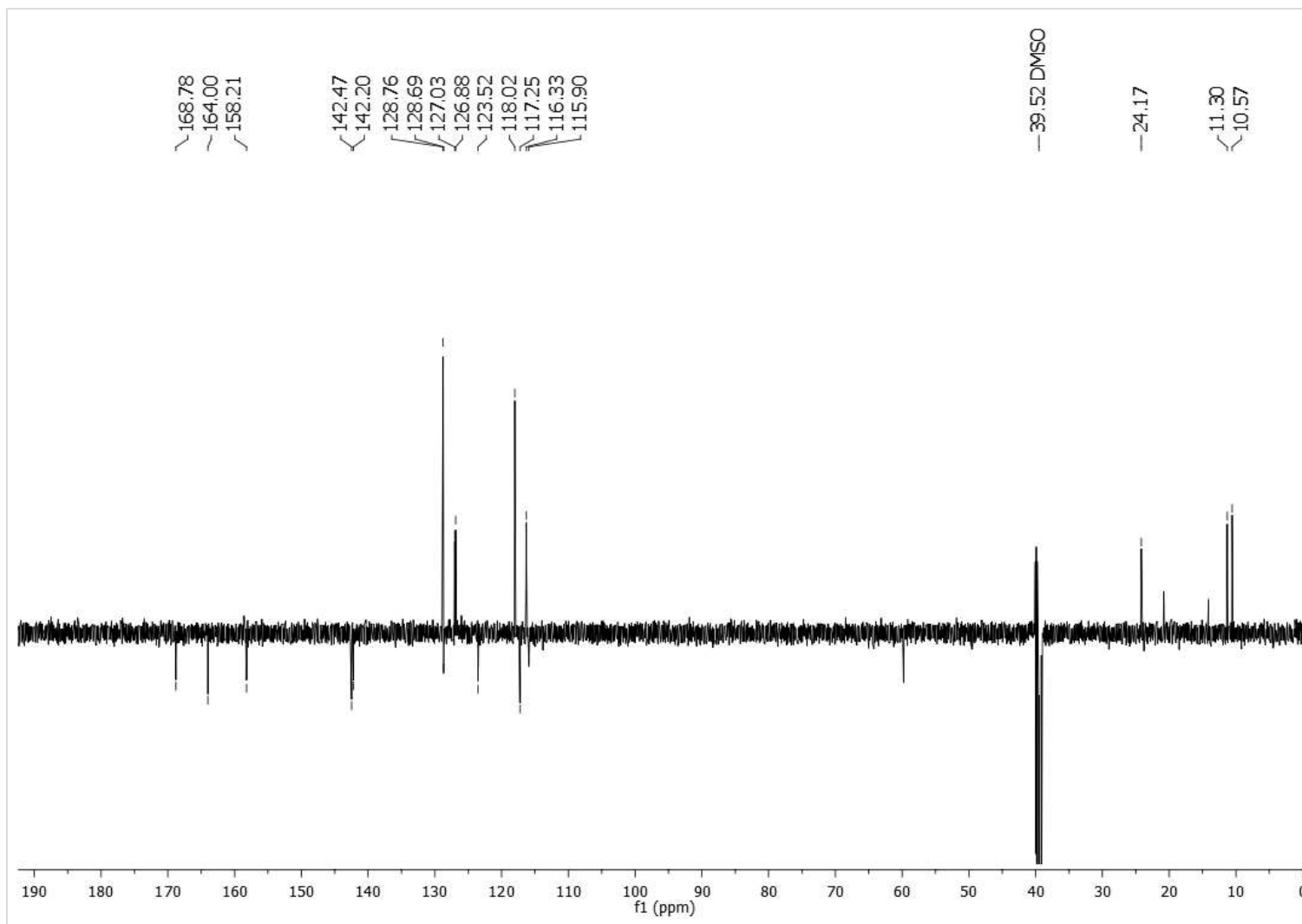


Figura 92. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)

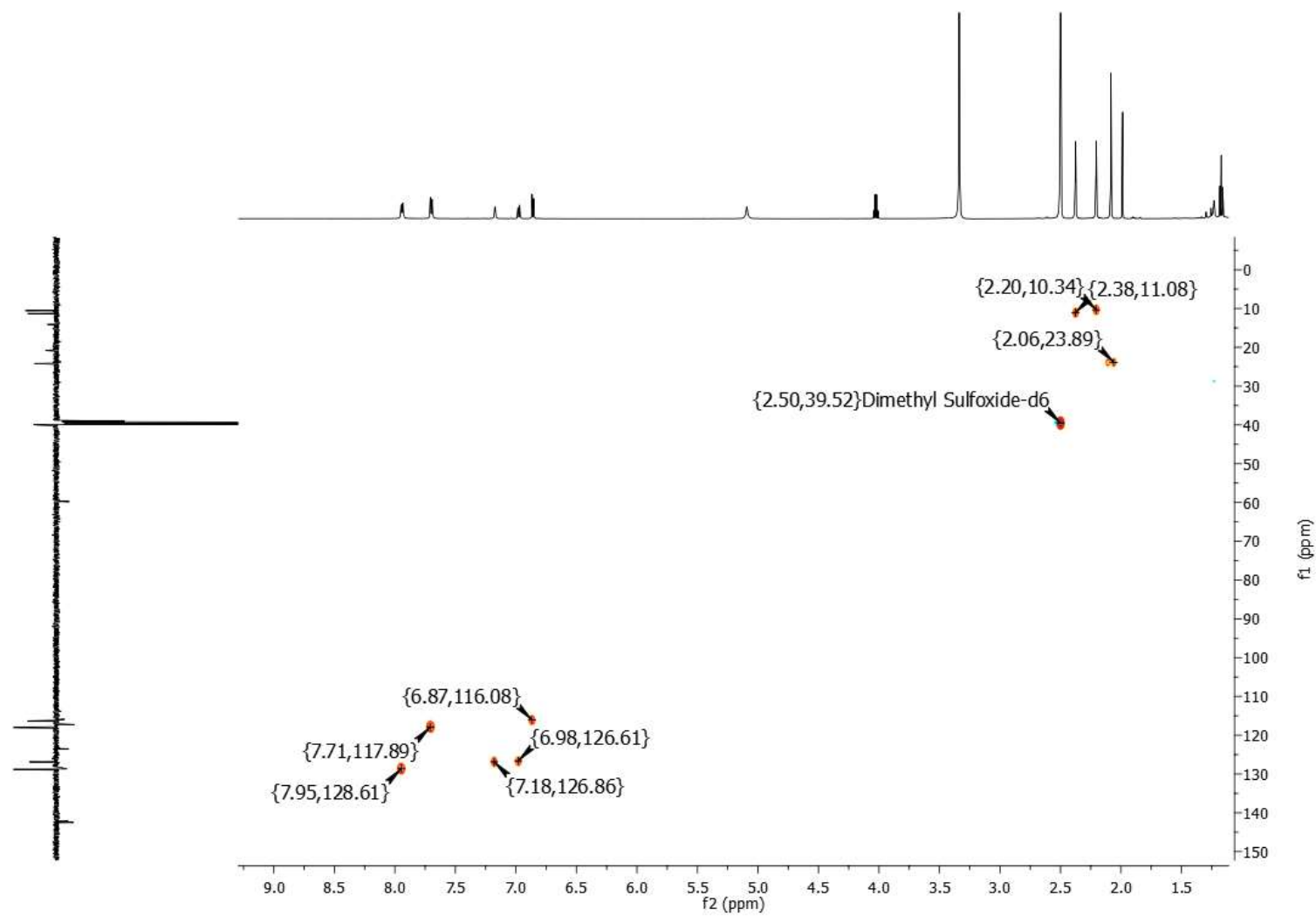


Figura 93. Mapa de contorno de HMBC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)

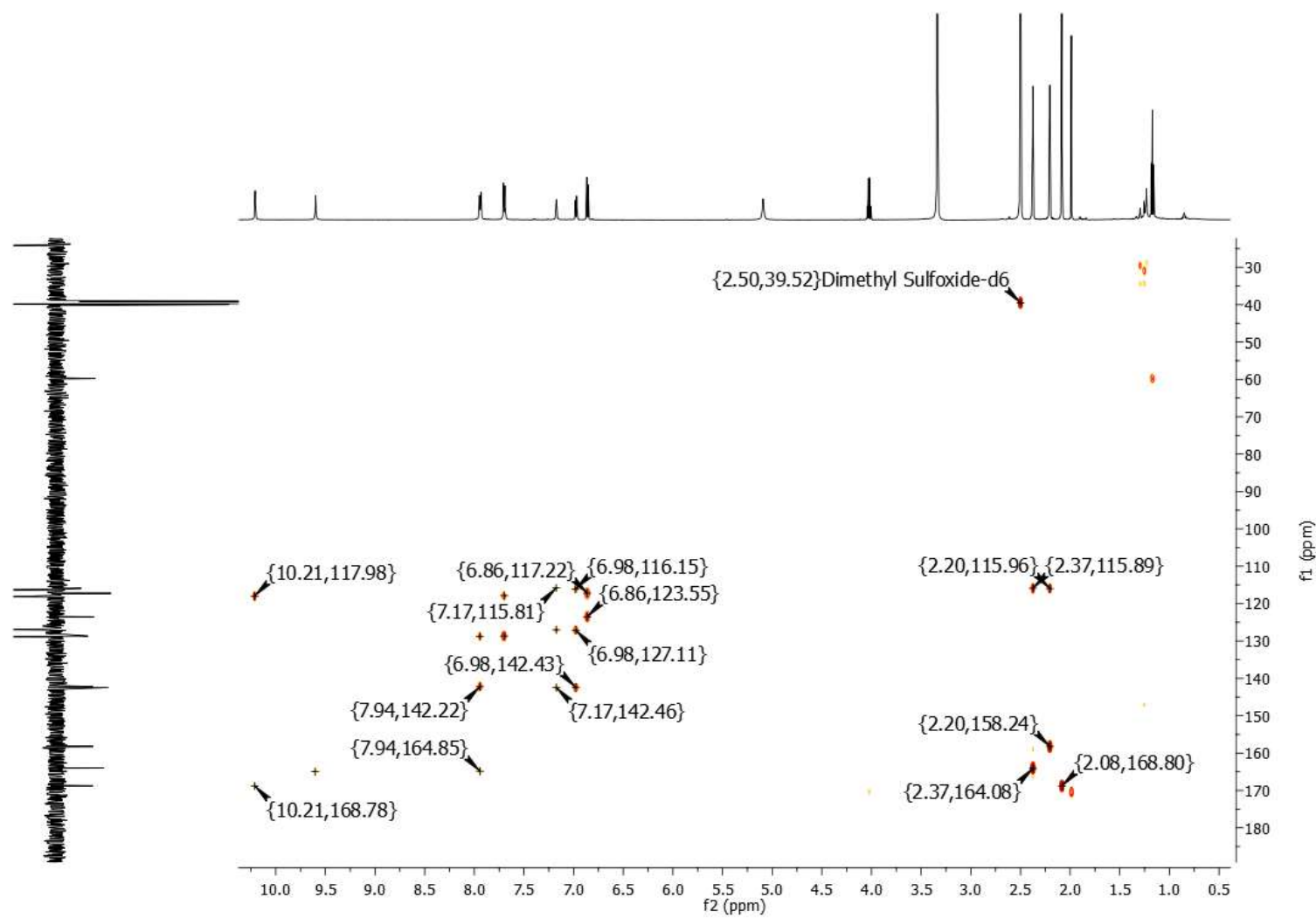
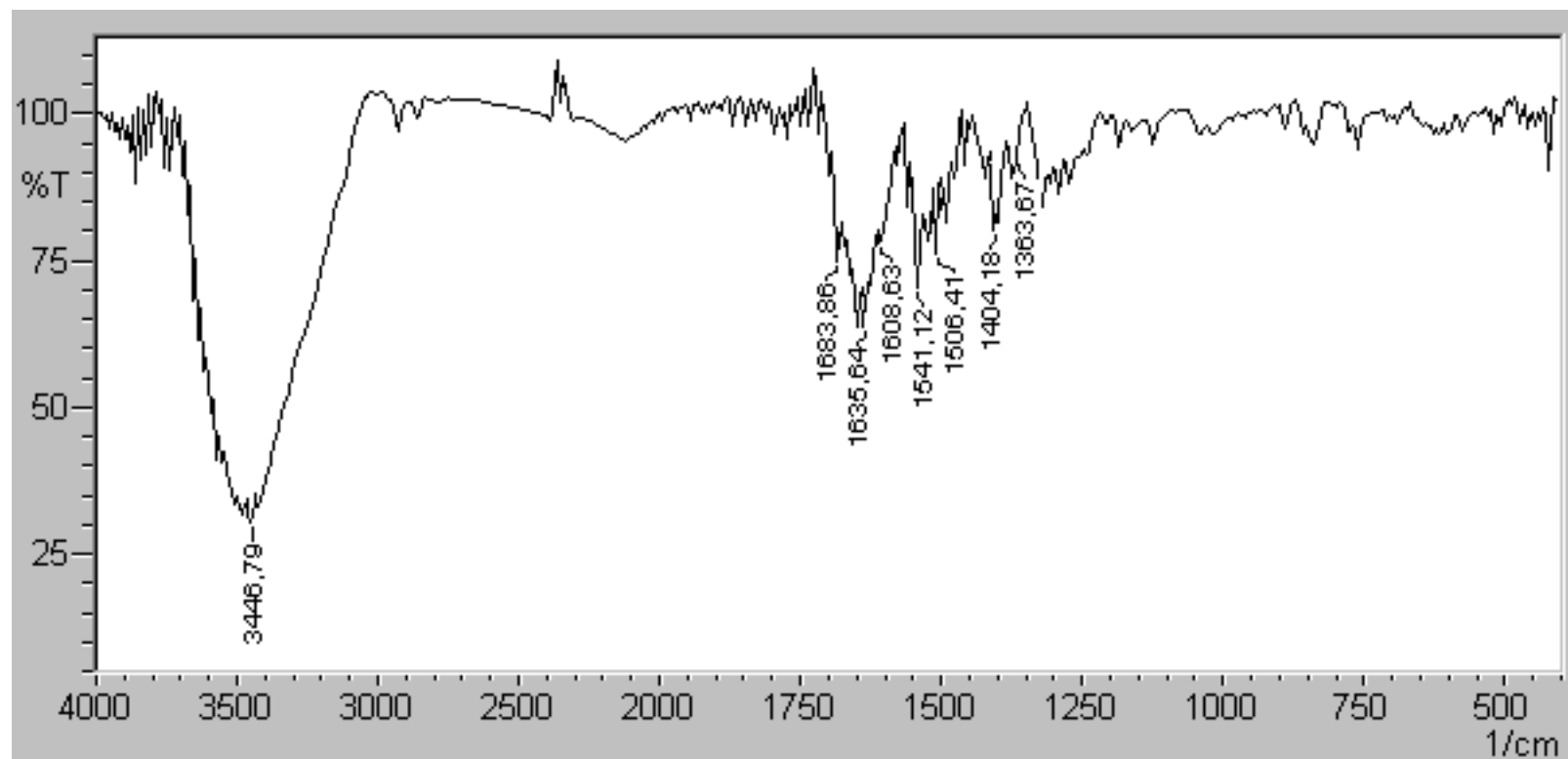
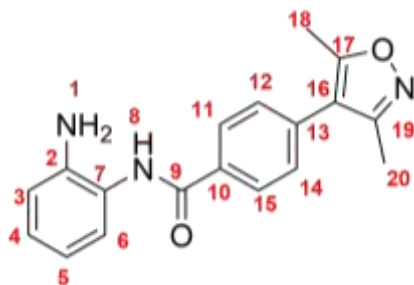


Figura 94. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N- (2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (12)



iv) 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida - (20)



Método de purificação: Cristalização em CH₂Cl₂.

Rendimento: 15%

Aspecto: Sólido de cor lilás

Faixa de fusão: 240-247 °C

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆): 9,74 (s, 1H); 8,07 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H); 7,53 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H); 7,17 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H); 6,98 (m, 1H); 6,79 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H); 6,61 (m, 1H); 4,91 (s, 1H); 2,44 (s, 3H); 2,26 (s, 3H) ppm.

RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-d₆): 10,61 (C20); 158,23 (C19); 11,52 (C18); 165,79 (C17); 115,52 (C16); 128,82 (C12,14); 133,07 (C13); 128,41 (C11,15); 133,61 (C10); 165,07 (C9); 143,32 (C7); 126,89 (C6); 126,73 (C5); 116,39 (C4); 116,22 (C3); 123,28 (C2) ppm.

IV (KBr, cm⁻¹): 3448,72; 1635,64; 1602,85; 1541,12; 1458,18; 1398,39; 1305,81.

Figura 95. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20)

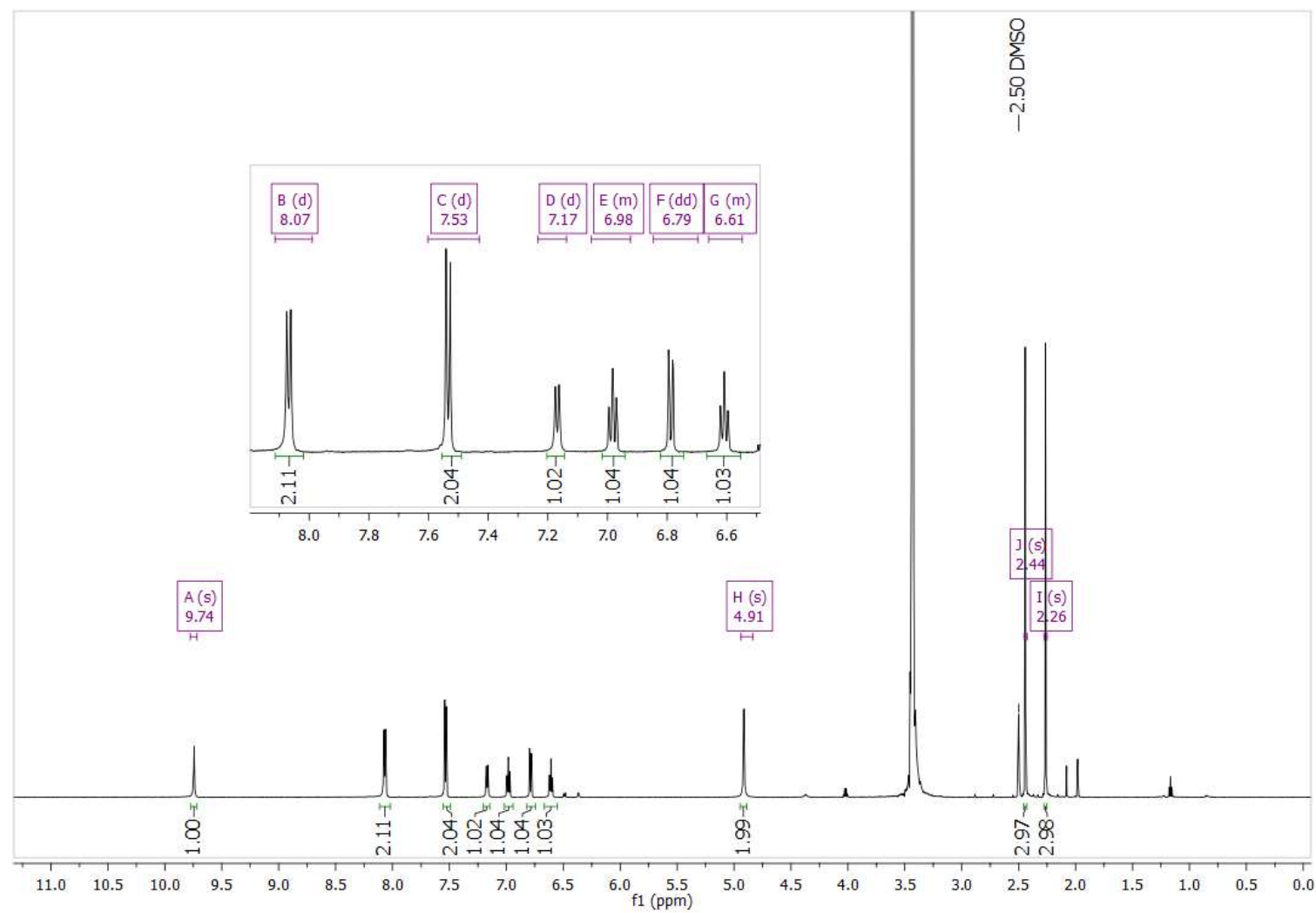


Figura 96. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).

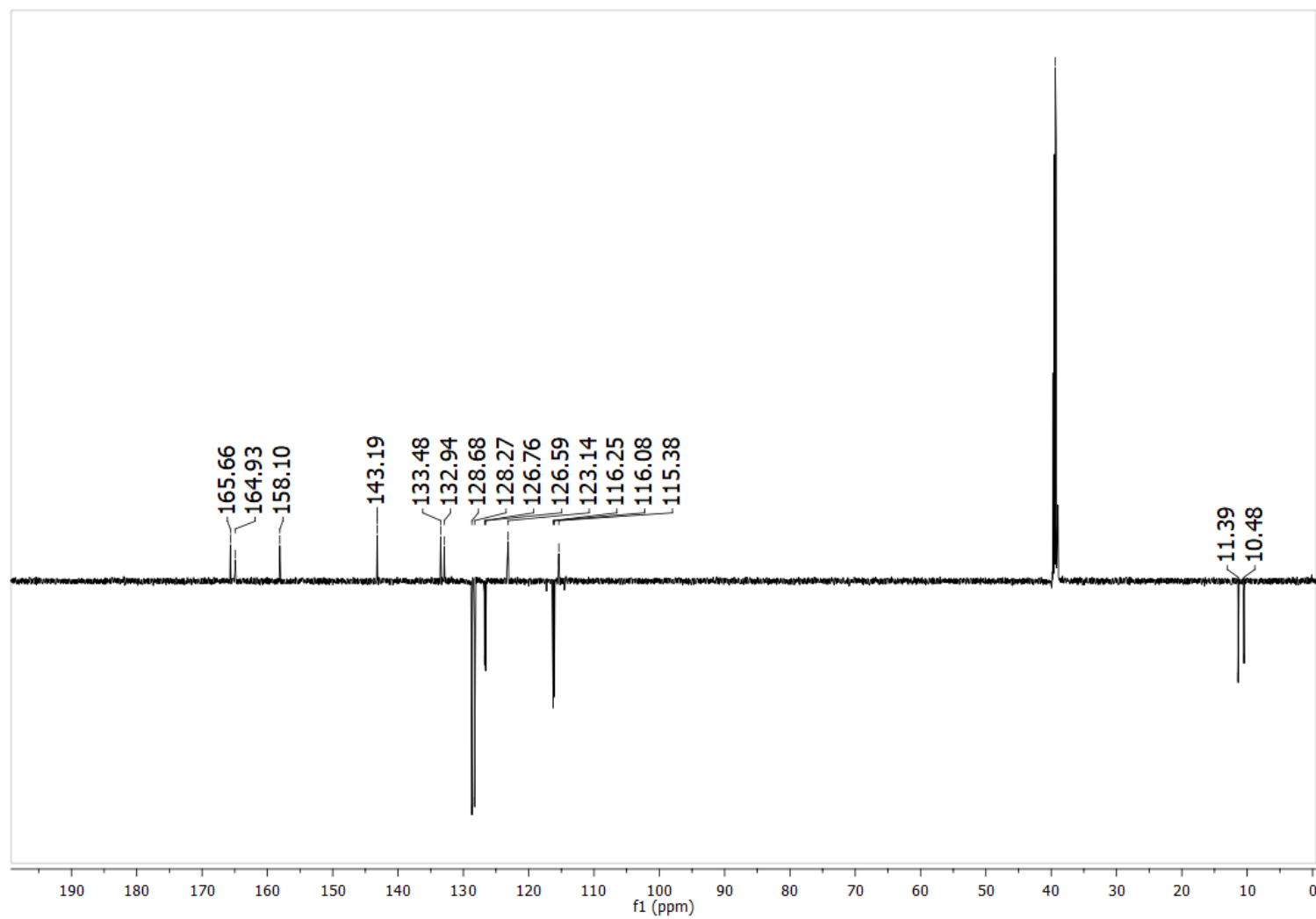


Figura 97. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).

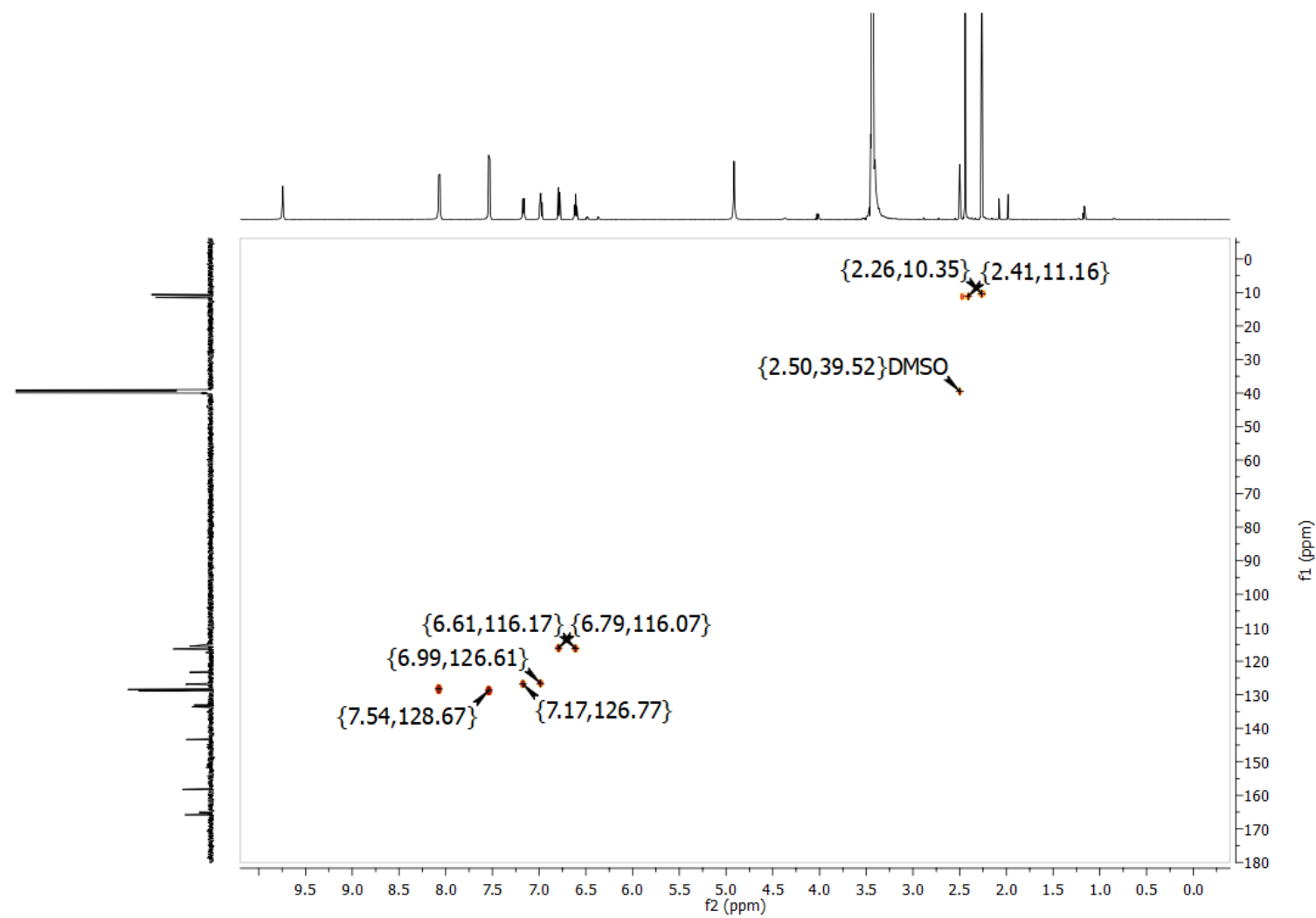


Figura 98. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).

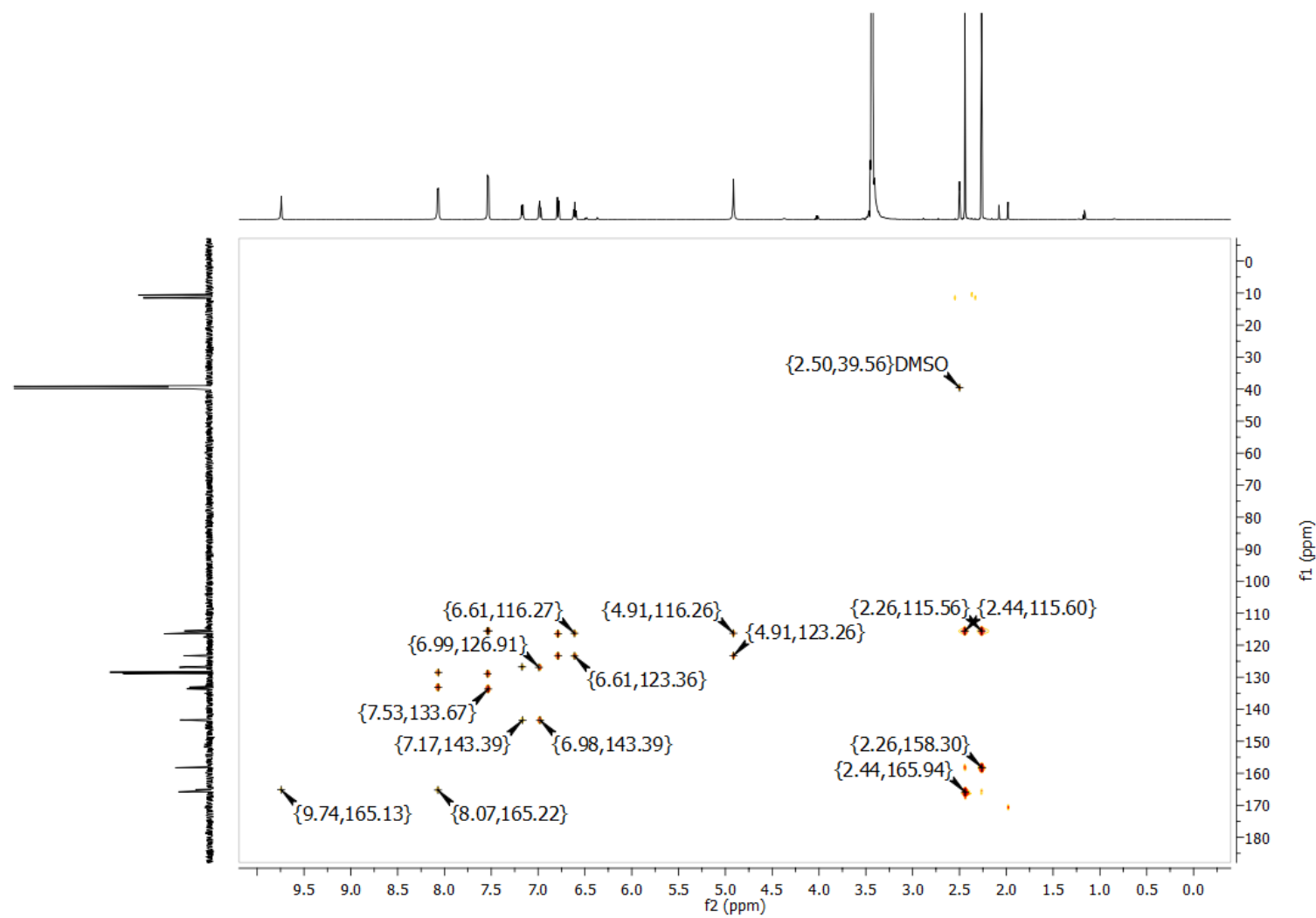
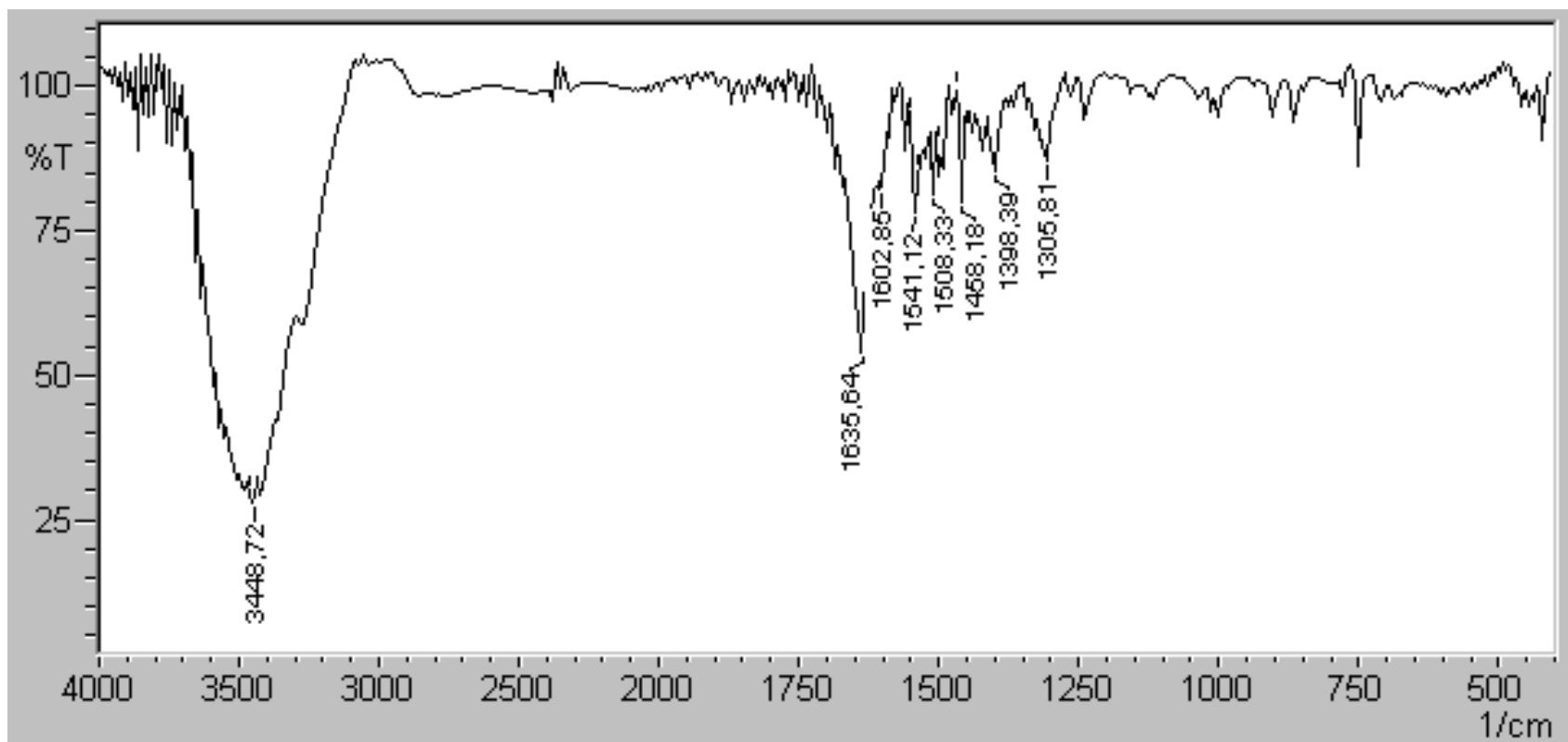
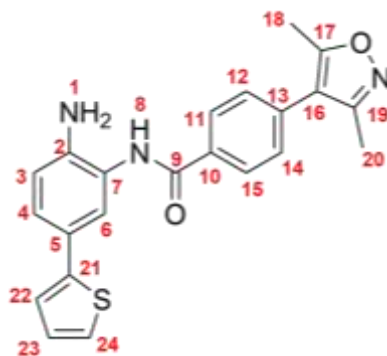


Figura 99. Espectro de IV (KBr) do composto 4-acetamida-N-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)benzamida (20).



v) *N*-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida - (23)



Método de purificação: Extração líquido/líquido.

Rendimento: 85%

Aspecto: Sólido de cor bege

Faixa de fusão: 92-96 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,80 (s, 1H); 8,10 (d, J = 7.6 Hz, 2H); 7,55 (d, J = 7.9 Hz, 2H); 7,47 (d, J = 1.8 Hz, 1H); 7,35 (dd, J = 5.1, 0.9 Hz, 1H); 7,31 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H); 7,24 (dd, J = 3.5, 0.8 Hz, 1H); 7,05 (dd, J = 5.0, 3.6 Hz, 1H); 6,82 (d, J = 8.4 Hz, 1H); 5,19 (s, 2H); 2,45 (s, 3H); 2,28 (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 121,03 (C24); 128,23 (C23); 123,24 (C22); 144,23 (C21); 10,52 (C20); 158,10 (C19); 11,44 (C18); 165,67 (C17); 115,42 (C16); 128,8 (C13); 128,37 (C12, C14); 128,71 (C11, C15); 133,06 (C10); 165,07 (C9); 143,12 (C7); 124,04 (C6); 123,07 (C5); 124,02 (C4); 116,33 (C3); 122,22 (C2) ppm.

IV (KBr, cm^{-1}): 3462,22; 1558,48; 1653,00; 1541,12; 1506,41; 1404,18; 1313,52.

Figura 100. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto N-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23)

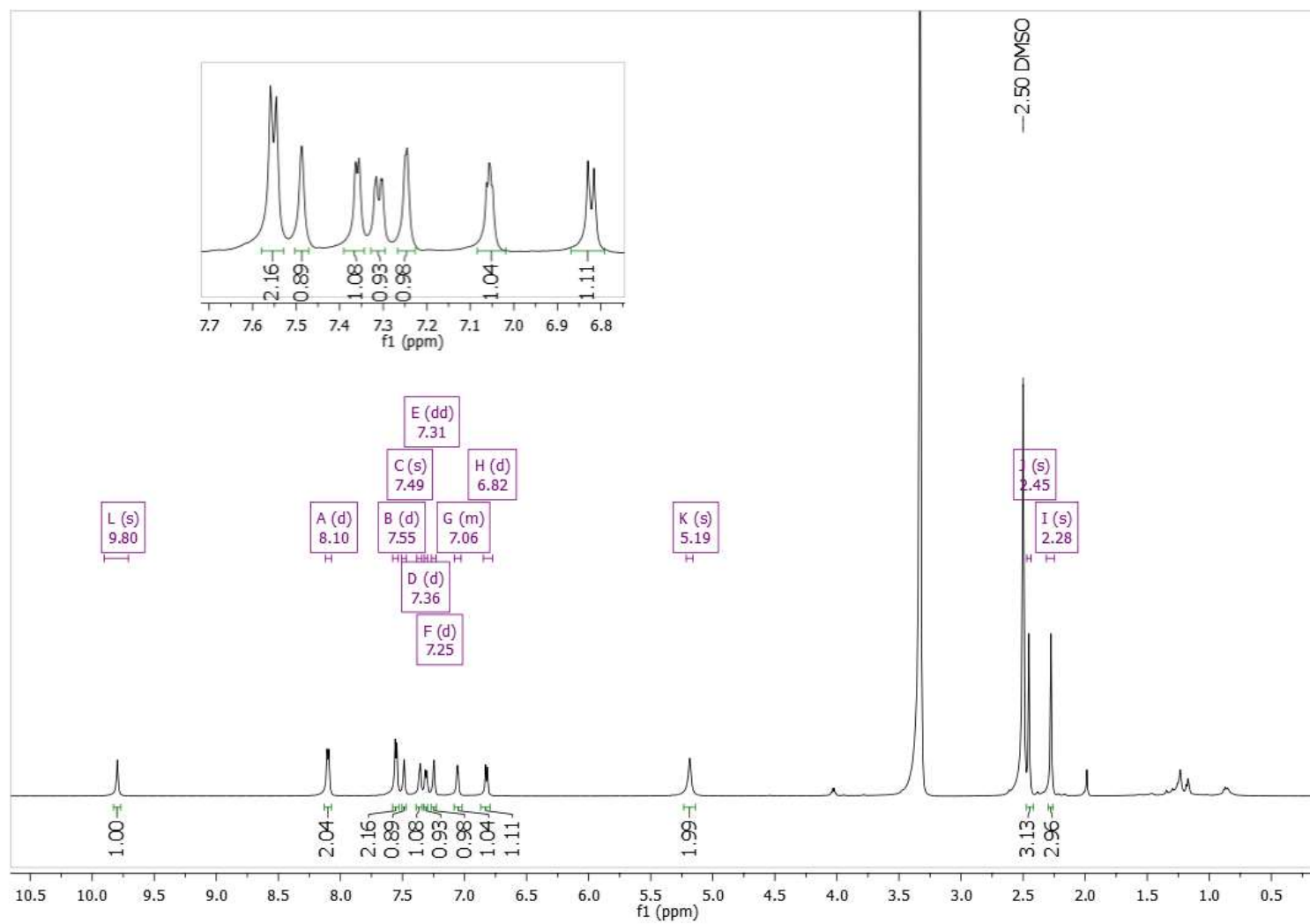


Figura 101. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto *N*-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).

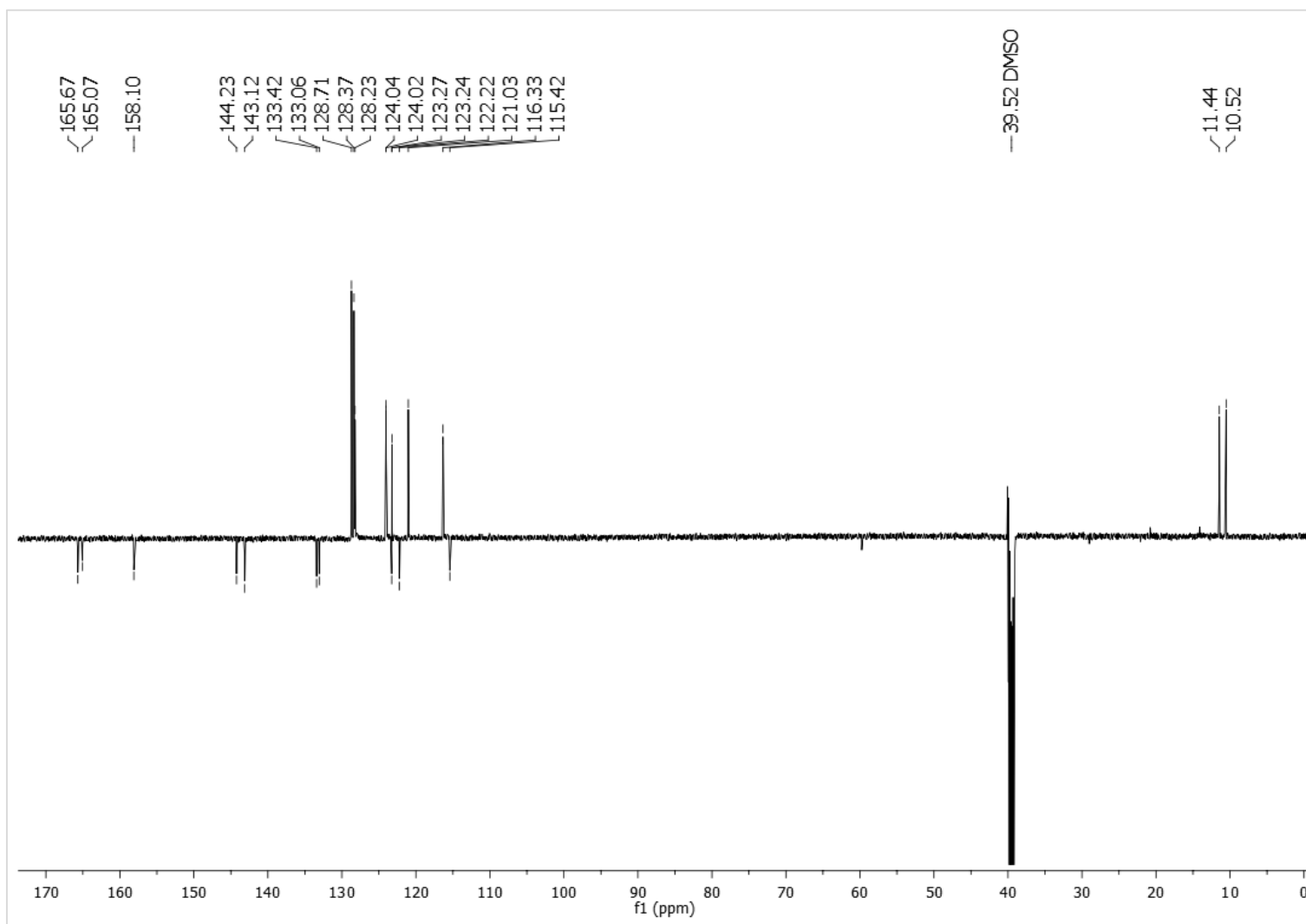


Figura 102. Mapa de contorno de HSQC (DMSO-d₆, 600 MHz) do composto *N*-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).

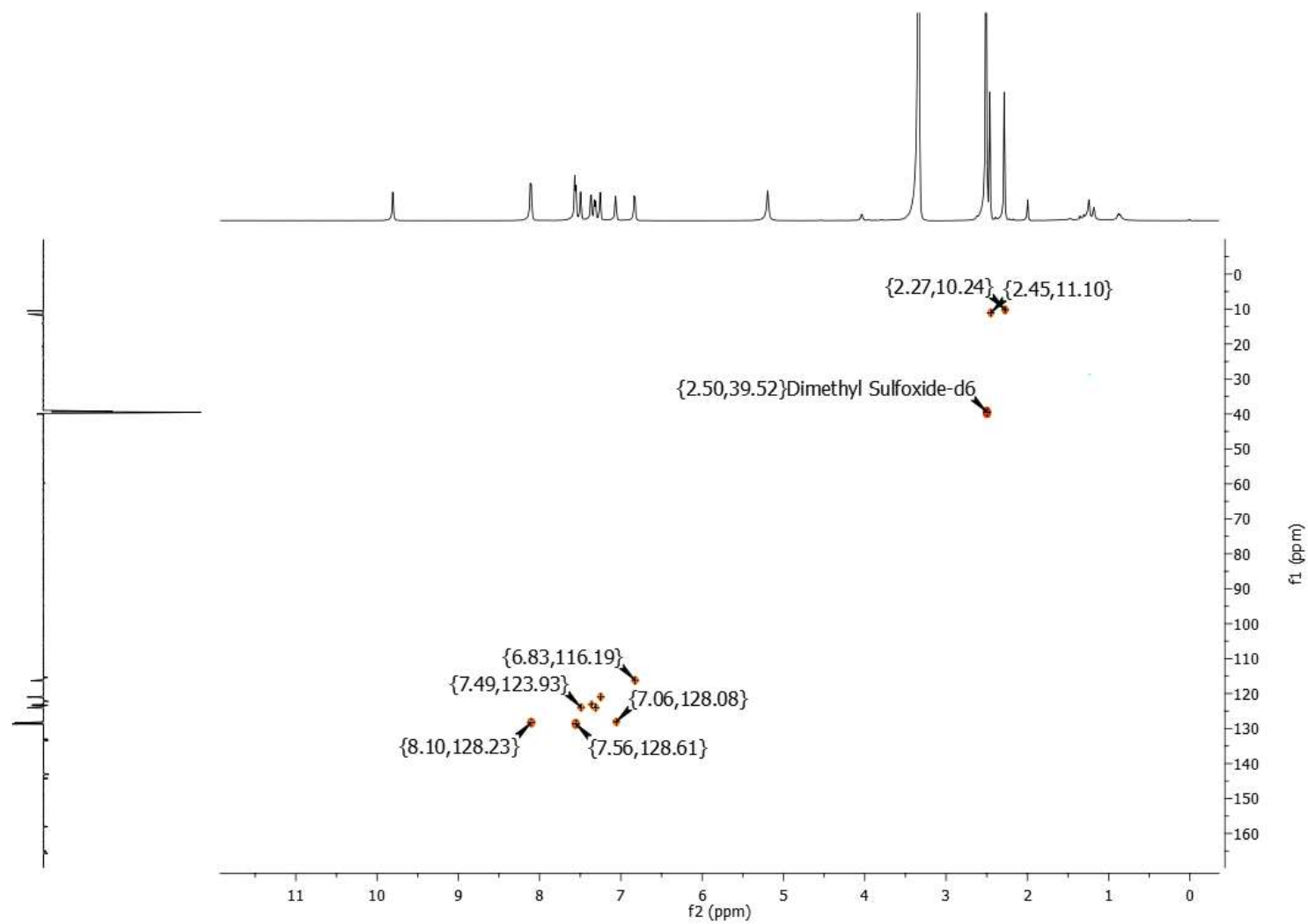


Figura 103. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *N*-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).

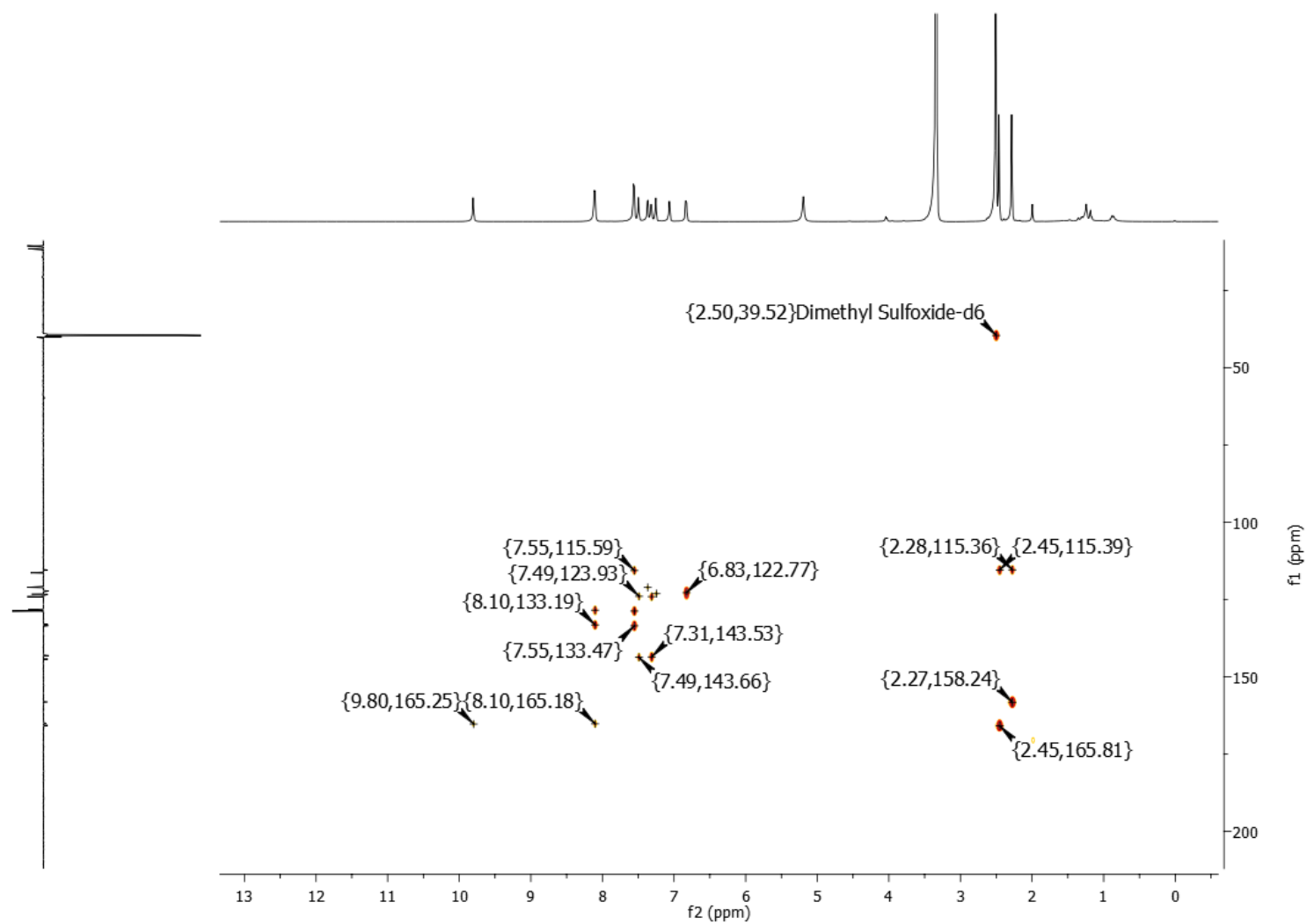
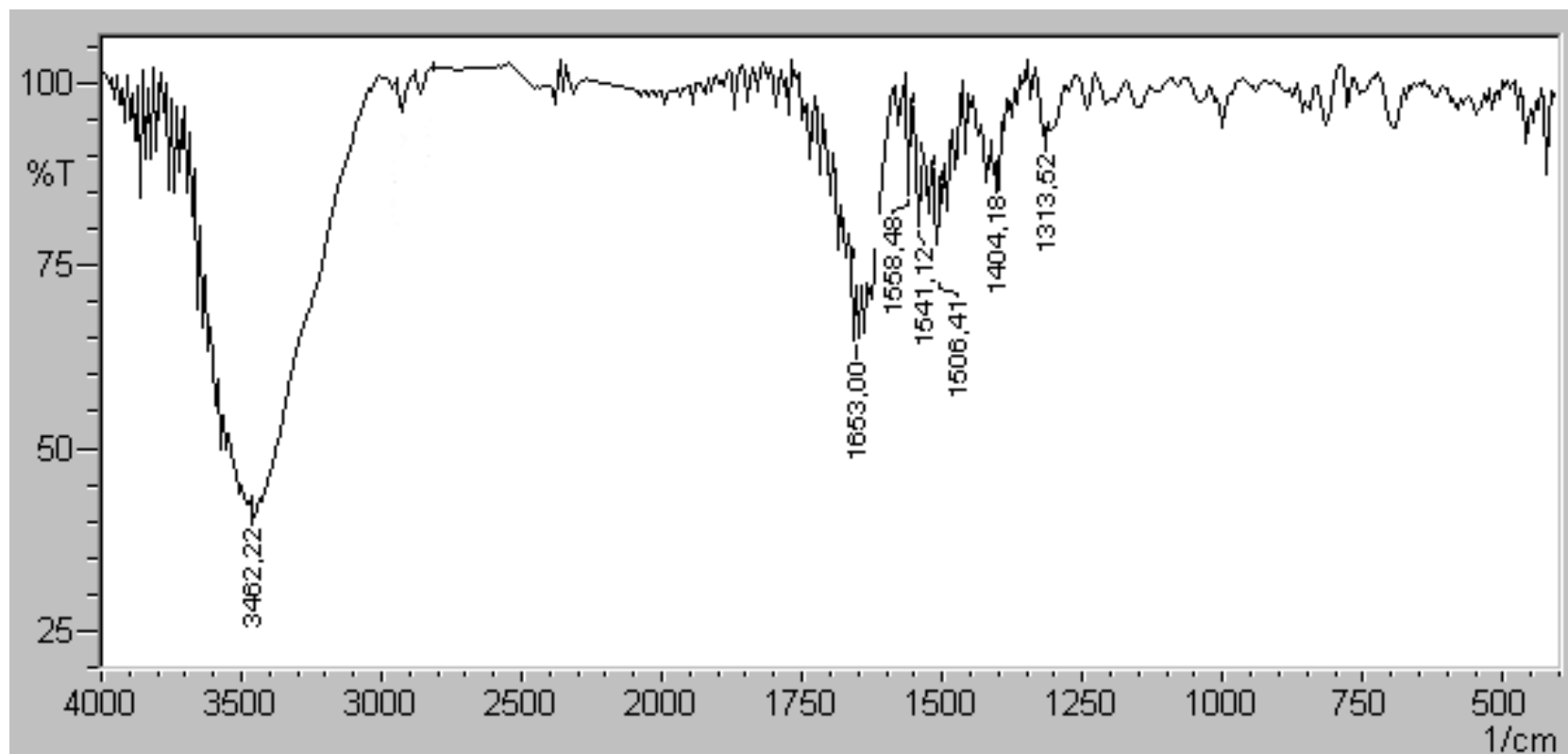
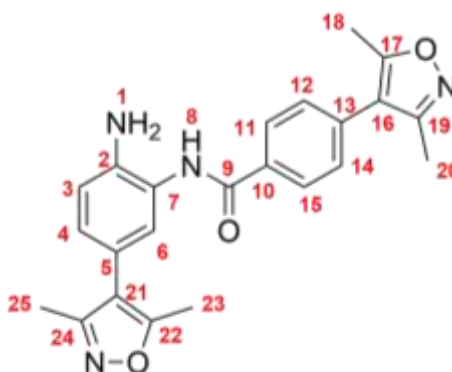


Figura 104. Espectro de IV (KBr) do composto composto *N*-(2-amino-5-(tiofen-2-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23).



vi) *N*-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida - (25)



Método de purificação: Extração líquido/líquido.

Rendimento: 83%

Aspecto: Sólido de cor marrom.

Faixa de fusão: 85-88 °C

RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): 9,77 (s, 1H); 8,08 (d, J = 8,1 Hz, 2H); 7,55 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 7,19 (m, 1H); 7,00 (dd, J = 8,2; 2,0 Hz, 1H); 6,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 2,44 (s, 3H); 2,27 (s, 3H).

RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6): 10,25 (C25); 158,22 (C24); 10,97 (C23); 164,02 (C22); 115,88 (C21); 10,24 (C20); 158,11 (C19); 11,08 (C18); 165,04 (C17); 115,43 (C16); 133,48 (C13); 128,56 (C12 e 14); 128,19 (C11 e 15); 133,07 (C10); 165,69 (C9); 142,60 (C7); 116,03 (C6); 117,17 (C5); 127,05 (C4); 127,00 (C3); 123,22 (C2).

IV (KBr, cm^{-1}): 3446,79; 1647,21; 1618,28; 1558,48; 1506,41; 1398,39; 1313,52.

Figura 105. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *N*-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)

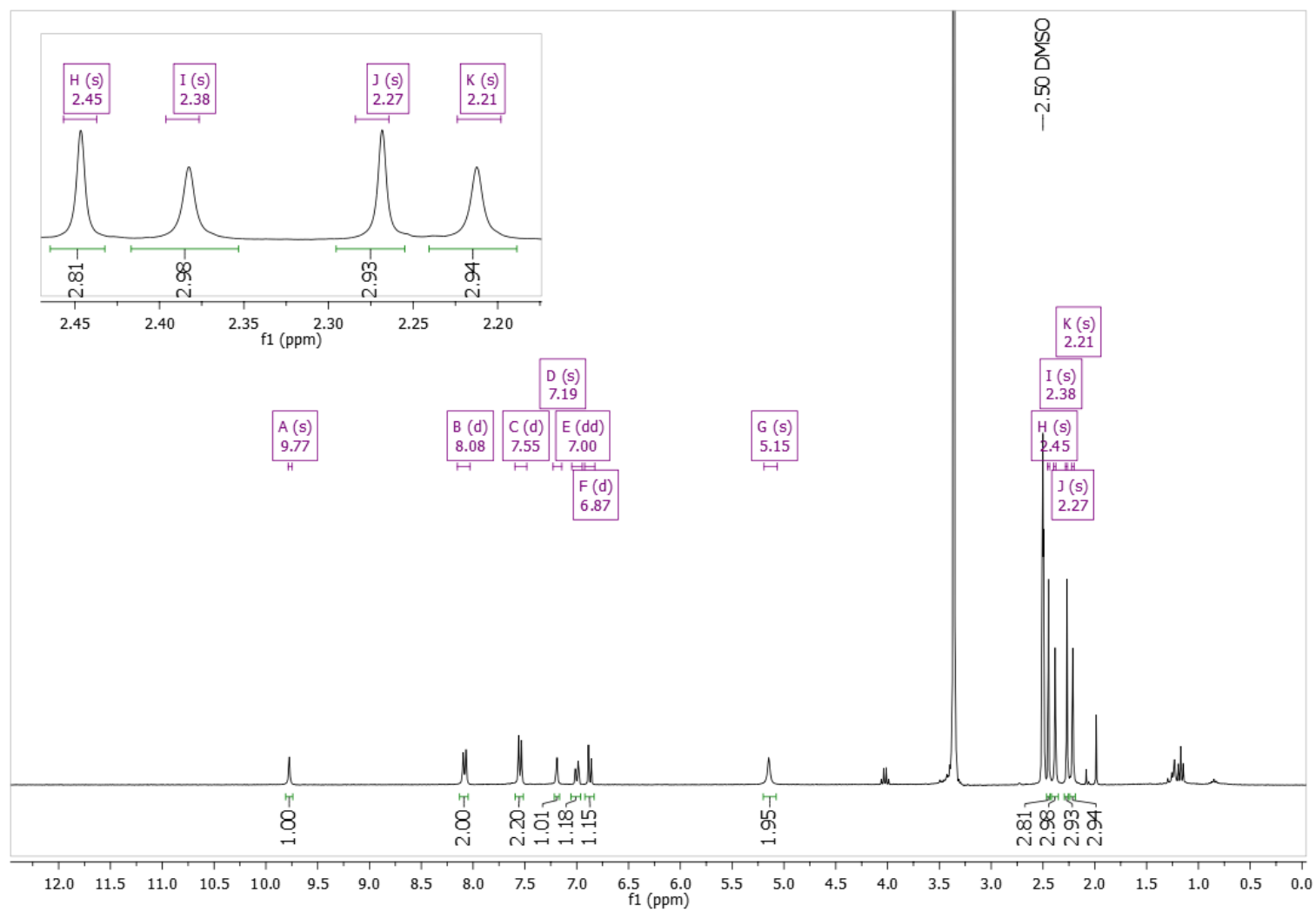


Figura 106. RMN de ^{13}C (APT) (DMSO-d_6 , 150 MHz) do composto *N*-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)

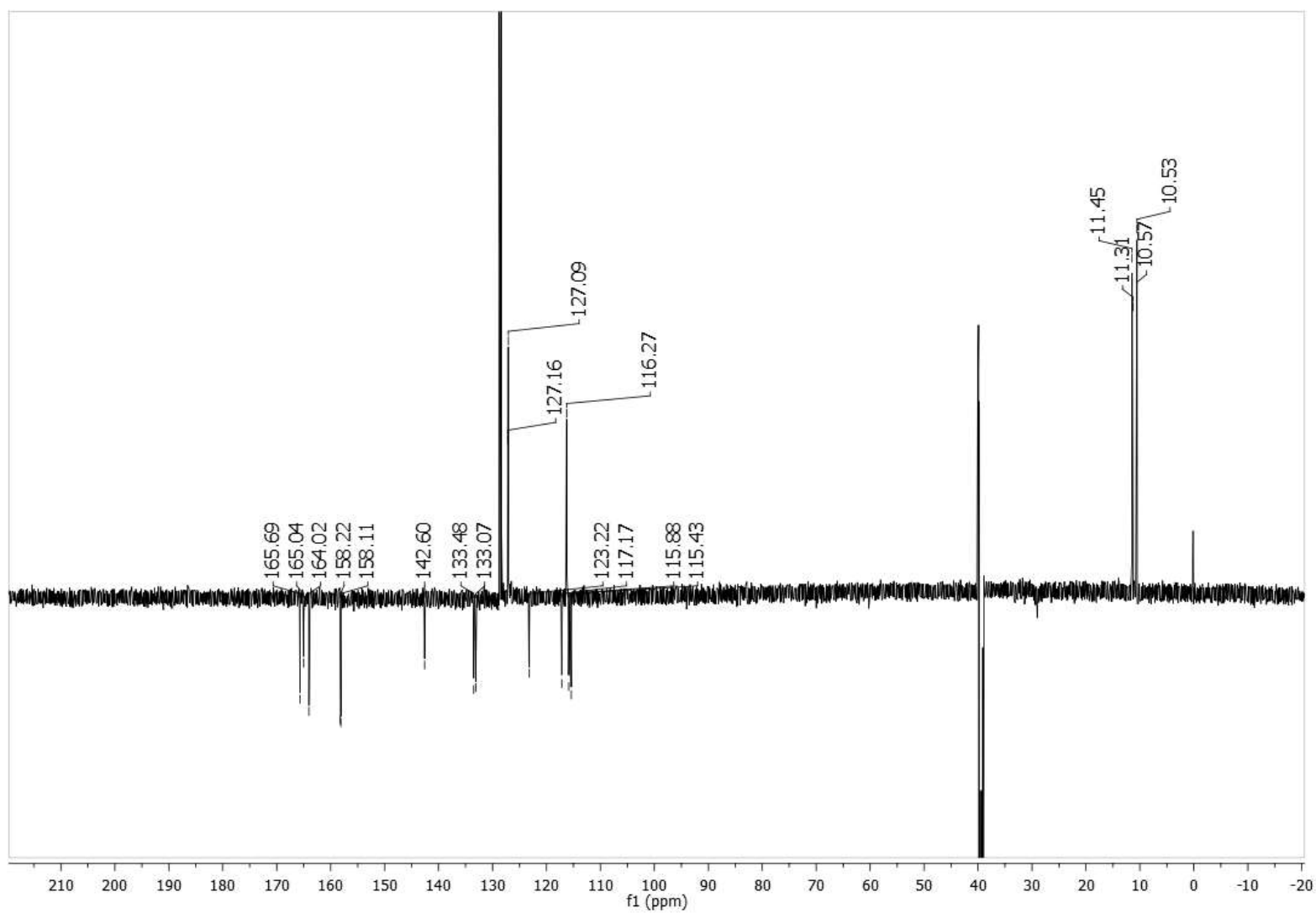


Figura 107. Mapa de contorno de HSQC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *N*-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)

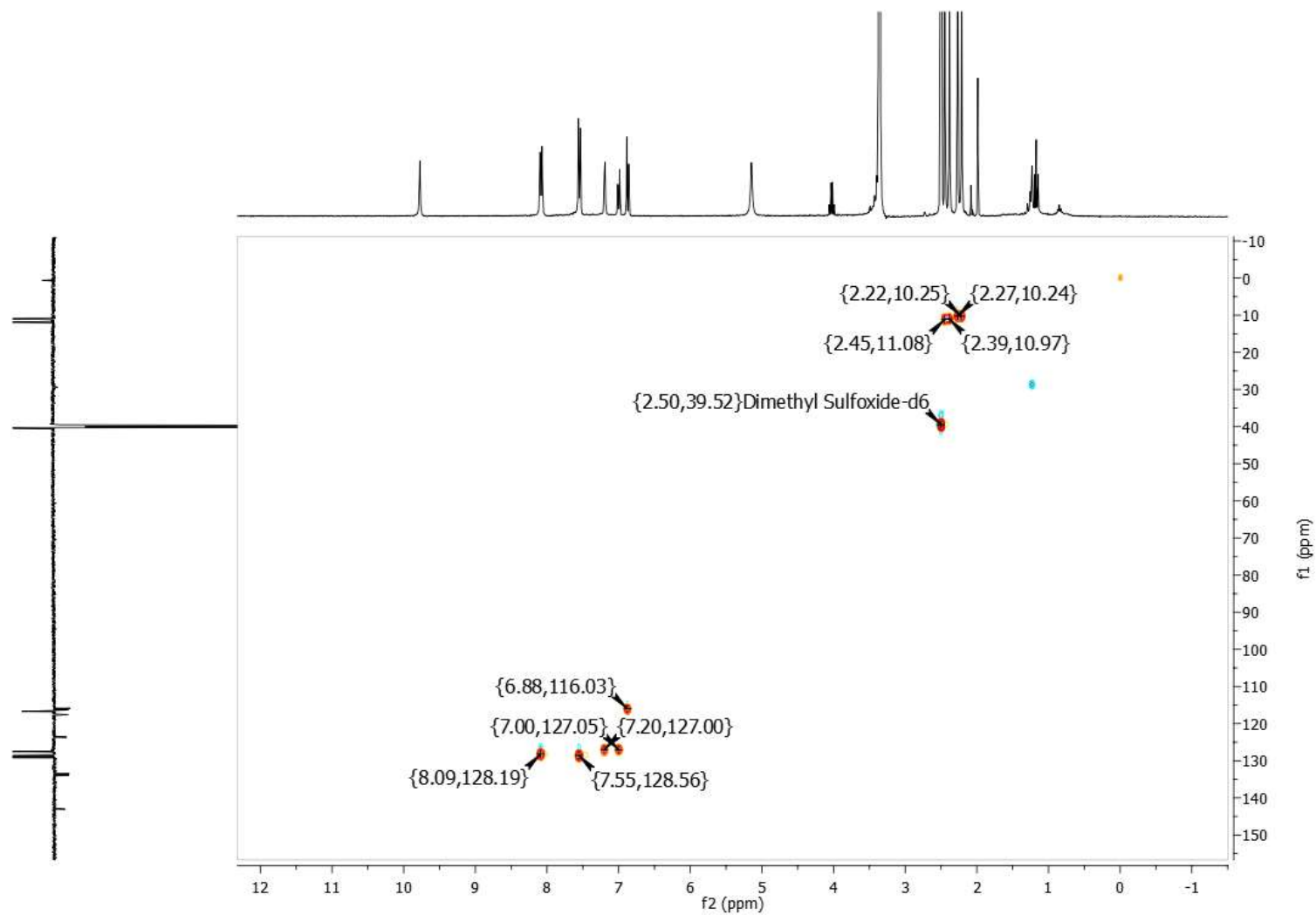


Figura 108. Mapa de contorno de HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz) do composto *N*-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (25)

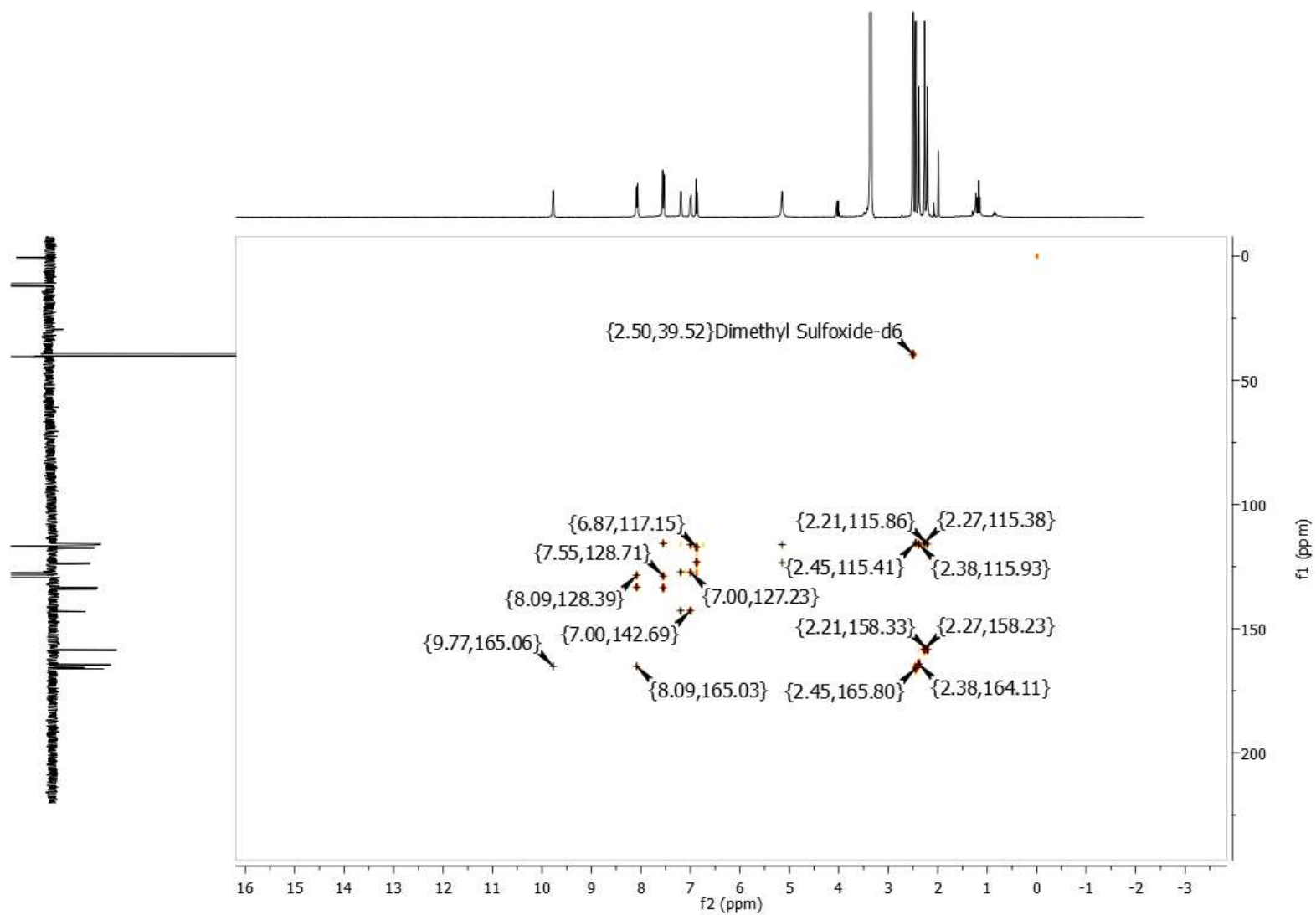


Figura 109. Espectro de IV (KBr) do composto *N*-(2-amino-5-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)fenil)-4-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)benzamida (23)

