

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO  
FARMACOLÓGICA DE INIBIDORES DE BROMODOMÍNIO-3  
INDUTORES DE HEMOGLOBINA FETAL

GABRIEL DALIO BERNARDES DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de  
inibidores de bromodomínio-3 indutores de hemoglobina  
fetal**

GABRIEL DALIO BERNARDES DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP

2018

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**S586p** Silva, Gabriel Dalio Bernardes da  
Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de inibidores de Bromodomínio-3 indutores de hemoglobina fetal / Gabriel Dalio Bernardes da Silva. – Araraquara, 2018.  
151 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. Anemia falciforme. 2. Hemoglobina Fetal. 3. Bromodomínio. I. Santos, Jean Leandro dos orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

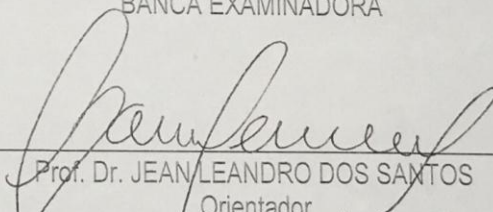
GABRIEL DALIO BERNARDES DA SILVA

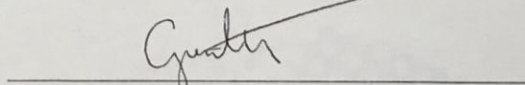
SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE INIBIDORES DE BROMODOMÍNIO-3 PLANEJADOS COMO  
INDUTORES DE HEMOGLOBINA FETAL

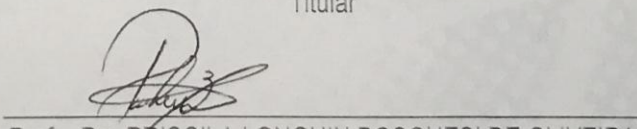
Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 29 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS  
Orientador

  
Prof. Dr. GUSTAVO TROIANO FELICIANO  
Titular

  
Profa. Dra PRISCILA LONGHIN BOSQUESI DE OLIVEIRA  
Titular

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha  
esposa Camila, a minha filha Bella,  
e aos meus pais Celso e Ana.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo milagre da vida, e pela oportunidade de realizar mais um sonho. Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos!

Ao meu alicerce, minha esposa Camila e a minha pequena Bella, por todo o amor e compreensão durante os últimos anos de pós-graduação que fizeram toda a diferença. Vocês me inspiram por sempre buscar mais!

Aos meus pais Ana e Celso, por todo apoio durante a minha formação acadêmica e por acreditarem no meu sonho. Eternamente grato.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos que me aceitou de braços abertos em seu grupo mesmo sem experiência algum em síntese. Obrigado pela confiança em mim depositada e por todo incentivo e toda orientação durante a execução deste trabalho.

Aos pós-graduandos e demais alunos de graduação do Lapdesf, por toda a ajuda e contribuição na execução deste trabalho.

À equipe da seção de Pós-Graduação pela ajuda e orientações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo nº 08880-8/2016 pelo apoio financeiro para a manutenção e desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara pelo apoio na execução deste trabalho.

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma das doenças hematológicas genéticas mais prevalentes no mundo. Atualmente, as estratégias terapêuticas visando aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF) contribuem significativamente na redução da morbidade e mortalidade associadas à doença. A compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pelo silenciamento gênico para produção de hemoglobina fetal pode permitir o desenvolvimento de fármacos indutores de HbF mais efetivos e seguros. Durante a eritropoiese, a expressão gênica de gama-globina é silenciada, em partes, pela ligação de um complexo protéico contendo entre outras proteínas a GATA-1, que se liga em sítios próximos aos promotores do gene de gama-globina impedindo o processo de transcrição. Especificamente, o recrutamento de GATA-1 é realizada pelo bromodomínio-3 (BRD-3). Neste trabalho, nossa hipótese foi a de que a inibição de BRD-3 possa constituir uma nova abordagem terapêutica capaz de promover o aumento dos níveis de HbF. Para tal, foi realizado um estudo prévio de triagem virtual com 2.2 milhões de moléculas, em que se identificaram alguns candidatos a ligantes do bromodomínio-3 (BRD-3). A partir destes, e aplicando a técnica do planejamento de fármacos baseado em fragmentos (FBDD), foi realizado um estudo de docagem molecular (*docking*) destes derivados, a fim de se explorar o padrão de substituição mais adequado para as interações com os resíduos de aminoácidos presentes no BRD-3. Os compostos finais apresentaram interações com os resíduos de asparagina-116, prolina-58, glutamina-61 e triptofano-57 e valores de *docking score* entre -10,357 kcal/mol e -7,152 kcal/mol. Foram sintetizados, identificados e caracterizados doze compostos inéditos planejados como inibidores de BRD-3 com rendimentos reacionais de até 86%. Os compostos apresentaram inibição enzimática atingindo valores de até 80% para BRD-3 (BD1). Após 24 horas, o composto 4-ciano-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida foi capaz de induzir os valores de gama-globina em cultura de células K562. Estes resultados sugerem que este composto é um novo protótipo, inibidor de BRD-3, capaz de atuar como indutor da expressão de gama-globina.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme. Hemoglobina Fetal. Bromodomínio.

## ABSTRACT

The sickle cell anemia (SCA) is the most common inherited hemoglobinopathy in the world. The therapies currently available to increase the levels of fetal hemoglobin contribute significantly to reduce morbidity and mortality associated with the disease. An understanding of the molecular mechanisms for drug development in order to increase the fetal hemoglobin levels may allow the development of more effective and safe HbF-inducing drugs. During erythropoiesis, gamma-globin gene expression is partially inhibited by the binding of a protein complex containing GATA-1 among other proteins, which binds at sites close to the gamma-globin gene promoters by preventing the transcription. Specifically, recruitment of GATA-1 is performed by bromodomain-3 (BRD-3). In this work, our hypothesis was the BRD-3 inhibition may be a new therapeutic approach capable of promoting the increase of HbF levels. Preliminary study of virtual screening was carried out with 2.2 million molecules. It was identified some candidates for bromodomain-3 (BRD-3) ligands. Using Fragment Based Drug Design (FBDD), the fragments were optimized and a docking study was carried out, in order to explore the most adequate substitution pattern in order to improve the interactions present in BRD-3. The final compounds showed interactions with residues of asparagine-116, proline-58, glutamine-61 and tryptophan-57, and docking scores between -10.357 kcal/mol and -7.152 kcal/mol. It has been synthesized, identified and characterized nine compounds with yields between 17 and 86%. The compounds showed enzymatic inhibition range between 13 and 80% in BRD-3 (BD1). After 24 hours, compound IX was able to induce gamma globin expression in culture of K562 cells. These results suggest that compound IX is a novel prototype, BRD-3 inhibitor, able to induce gamma-globin expression.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Fetal hemoglobin. Bromodomain.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
BET	Bromodomínio extra-terminal
BRD	Bromodomínio
CAM	Moléculas de adesão celular
CCD	Cromatografia em camada delgada
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	<i>Docking score</i>
FBDD	Planejamento de fármacos baseado em fragmentos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
Gln	Glutamina
GS	<i>Glide e-model</i>
HAT	Histona acetiltransferase
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HDAC	Histona deacetilase
HMBC	<i>Heteronuclear MultipleBond Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear MultipleQuantum Coherence</i>
HU	Hidroxiuréia
IL	Interleucina
IV	Espectrofotometria na região do Infravermelho

<i>LigPrep</i>	<i>Ligand Preparation</i>
NCoR	Co-repressor de receptor nuclear
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
NO	Óxido nítrico
PAINS	<i>Pan-Assay Interference compounds</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pro	Prolina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square</i>
RNA	Ácido ribonucleico
THF	Tetrahidrofurano
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TR-FRET	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer</i>
Trp	Triptofano

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de <i>docking</i> dos derivados ftalimídicos contra BRD-3 expressos em <i>docking score</i> (DS) e <i>Glide E-model</i> (G).....	33
Tabela 2 – Relação das interações dos resíduos Trp-57, Gln-61 e Pro-58 com os compostos I-XII.....	37
Tabela 3 – Rendimento reacional e características químicas dos intermediários .....	38
Tabela 4 – Deslocamentos químicos do intermediário 4-aminoftalimida .....	39
Tabela 5 – Deslocamentos químicos dos intermediários ácidos 3-acetoxi e 4-acetoxibenzóico .....	40
Tabela 6 - Rendimento reacional e características químicas dos compostos I-IV .....	41
Tabela 7 - Rendimento reacional e características químicas dos compostos V-IX .....	42
Tabela 8 - Rendimento reacional e características químicas dos compostos X-XII .....	43
Tabela 9 – Deslocamentos químicos do composto final I.....	44
Tabela 10 – Deslocamentos químicos dos compostos finais II-IV .....	45
Tabela 11 – Deslocamentos químicos dos compostos finais V-VII.....	46
Tabela 12 – Deslocamentos químicos dos compostos finais VIII e IX.....	47
Tabela 13 – Deslocamentos químicos dos compostos finais X-XII.....	48
Tabela 14 – Componentes do <i>GlideScore</i> .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de moléculas indutoras de hemoglobina fetal. ....	18
Figura 2 – Compostos inibidores de BRD-3 .....	24
Figura 3 - Esquema do ensaio de triagem virtual utilizado na identificação dos protótipos inibidores de BRD-3 .....	26
Figura 4 – Interações do fragmento 5-aminoisindolina-1,3-diona com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio do BRD-3.....	27
Figura 5 - Planejamento estrutural dos derivados ftalimídicos a partir da estrutura do fragmento 5-aminoisindolina-1,3-diona.....	28
Figura 6 – Derivados ftalimídicos planejados como inibidores de BRD-3 (I-XII).....	35
Figura 8 – Interações do composto VII com os resíduos do sítio ativo do BRD-3.....	36
Figura 9 - Interações do composto XI com os resíduos do sítio ativo do BRD-3.....	36
Figura 10 – Gráfico da porcentagem do ensaio de inibição enzimática dos compostos testados a 100 $\mu$ M contra BRD-3 (BD-1). ....	49
Figura 11 – Expressão de gama-globina gênica induzida pelo composto IX (n=1) .....	50
Figura 12 – Espectro na região de infravermelho do intermediário 4-aminoftalimida (pastilha de KBr) .....	92
Figura 13- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do intermediário 4-aminoftalimida (300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	93
Figura 14 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do intermediário ácido 3-acetoxibenzóico (300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	94
Figura 15 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do intermediário ácido 4-acetoxibenzóico (300 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	95
Figura 16 - Espectro na região de infravermelho composto final I (pastilha de KBr) .....	96
Figura 17 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final I (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	97
Figura 18 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final I (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	98
Figura 19 - Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final I .....	99
Figura 20 - Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final I .....	100
Figura 21 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final II (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	101
Figura 22 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final II (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	102

Figura 23 - Espectro na região de infravermelho composto final III (pastilha de KBr).....	103
Figura 24 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final III (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	104
Figura 25 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final III (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	105
Figura 26 – Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final III .....	106
Figura 27 – Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final III .....	107
Figura 28 - Espectro na região de infravermelho composto final IV (pastilha de KBr) .....	108
Figura 29 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final IV (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	109
Figura 30 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final IV (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6); .....	110
Figura 31 – Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final IV .....	111
Figura 32 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto IV .....	112
Figura 33 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final V (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	113
Figura 34 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final V (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	114
Figura 35 - Espectro na região de infravermelho composto final VI (pastilha de KBr) .....	115
Figura 36 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final VI (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	116
Figura 37 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final VI (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	117
Figura 38 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final VI.....	118
Figura 39 – Expansão do mapa de correlação HMBC do composto final VI .....	119
Figura 40 - Espectro na região de infravermelho composto final VII (pastilha de KBr) .....	120
Figura 41 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final VII (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	121
Figura 42 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final VII (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	122
Figura 43 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final VII.....	123
Figura 44 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final VII ...	124
Figura 45 - Espectro na região de infravermelho composto final VIII (pastilha de KBr).....	125
Figura 46 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final VIII (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	126
Figura 47 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final VIII (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	127
Figura 48 – Expansão do mapa de correlação HSQC do composto final VIII .....	128
Figura 49 - Expansão do mapa de correlação HMBC do composto final VIII.....	129

Figura 50 - Espectro na região de infravermelho composto final IX (pastilha de KBr) .....	130
Figura 51 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final IX (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	131
Figura 52 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final IX (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	132
Figura 53 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final IX .....	133
Figura 54 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final IX .....	134
Figura 55 - Espectro na região de infravermelho composto final X (pastilha de KBr).....	135
Figura 56 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final X (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	136
Figura 57 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final X (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6).....	137
Figura 58 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final X .....	138
Figura 59 – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final X .....	139
Figura 60 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final XI (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	140
Figura 61 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final XI (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	141
Figura 62 - Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final XI .....	142
Figura 63 - Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final IX .....	143
Figura 64 - Espectro na região de infravermelho composto final XII (pastilha de KBr) .....	144
Figura 65 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final XII (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	145
Figura 66- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final XII (75 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) .....	146
Figura 67– Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final XII.....	147
Figura 68– Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final XII ....	148

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Síntese das moléculas planejadas .....	29
Esquema 2 – Síntese dos intermediários para os compostos finais II-IV .....	29
Esquema 3 – Síntese dos compostos V-VII .....	30
Esquema 4 - Mecanismo proposto para a acetilação dos derivados do ácido hidroxibenzóico...55	
Esquema 5 - Mecanismo proposto da cloração dos derivados do ácido benzoico com cloreto de tionila .....	56
Esquema 6 – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos finais .....	57
Esquema 7 – Etapa sintética para obtenção do intermediário 4-aminoftalimida .....	71
Esquema 8 – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto de benzoíla .....	72
Esquema 9 – Etapa sintética para obtenção do composto <i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida .....	73
Esquema 10 - Etapa sintética para obtenção do intermediário ácido 3-acetoxibenzóico .....	74
Esquema 11 – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 3-acetoxibenzoíla .....	75
Esquema 12 - Etapa sintética para obtenção do composto 3-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato .....	76
Esquema 13 – Etapa sintética para obtenção do intermediário ácido 4-acetoxibenzóico .....	77
Esquema 14 – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-acetoxibenzoíla .....	78
Esquema 15 – Etapa sintética para obtenção do composto 4-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato .....	79
Esquema 16 – Etapa sintética para obtenção do composto <i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il)-3-hidroxibenzamida .....	80
Esquema 17 – Etapa sintética para obtenção do composto <i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-hidroxibenzamida .....	82
Esquema 18 – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-cianobenzoíla .....	83
Esquema 19– Etapa sintética para obtenção do composto 4-ciano- <i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida .....	84
Esquema 20 – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 3-cianobenzoíla .....	85
Esquema 21 – Etapa sintética para obtenção do composto 3-ciano- <i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida .....	86

Esquema 22 – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-nitrobenzoila.....	87
Esquema 23 – Etapa sintética para obtenção do composto <i>N</i> -(1,3-dioxisoindolin-5-il)-4-nitrobenzamida .....	88
Esquema 24 – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-bromobenzoila .....	89
Esquema 25 – Etapa sintética para obtenção do composto 4-bromo- <i>N</i> -(1,3-dioxisoindolin-5-il)benzamida .....	90

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1	ANEMIA FALCIFORME: ASPECTOS GERAIS E FISIOPATOLOGIA.....	16
2.2	AUMENTO DE HEMOGLOBINA FETAL COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA.....	17
2.3	MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE GAMA- GLOBINA .....	19
2.4	EPIGENÉTICA E OS BROMODOMÍNIOS.....	20
2.5	INIBIDORES DE BROMODOMÍNIO COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTO DE HBF.....	22
2.6	BROMODOMÍNIO-3 (BRD-3) E RESPECTIVOS COMPOSTOS INIBIDORES ...	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL .....	26
4.2	MODELAGEM MOLECULAR .....	28
4.3	METODOLOGIA SINTÉTICA.....	29
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
5.1	MODELAGEM MOLECULAR .....	33
5.2	SÍNTESE.....	38
5.3	INIBIÇÃO ENZIMÁTICA BRD-3 (BD1) .....	49
5.4	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE GAMA-GLOBINA EM CÉLULAS K562.....	50
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
6.1	MODELAGEM MOLECULAR .....	51
6.2	SÍNTESE.....	54
6.3	ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DE BRD-3 (BD1) .....	64
6.4	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE GAMA-GLOBINA EM CÉLULAS K562.....	64
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é a desordem hematológica de caráter genético mais prevalente no mundo, caracterizada pela herança de cada um dos progenitores do gene para a hemoglobina S (HbS). Este gene apresenta uma mutação pontual no gene da  $\beta$ -globina, caracterizada pela simples substituição de nucleotídeos (GTG para GAG) no sexto códon deste gene. Esta troca resulta na substituição de um ácido glutâmico por uma valina na cadeia beta da molécula de hemoglobina (SINGH; BALLAS, 2015).

Em situações com baixos níveis de oxigênio (hipóxia), esta valina substituída pode ligar-se a sítios hidrofóbicos de uma outra subunidade  $\beta$  do tetrâmero da hemoglobina. Este processo leva à polimerização das moléculas de hemoglobina, com consequente deformação na estrutura das hemácias que tomam a forma de foice. O aumento da adesão das células falciformes ao endotélio vascular promove obstrução microvascular, causando o processo vaso-oclusivo. Este é caracterizado por episódios de dor e lesão de órgãos (VICHINSKY, 2012).

Apesar da doença apresentar origem africana e ser mais comum na população negra, pode ser encontrada também em pessoas brancas devido a miscigenação (ADORNO, 2005). No Brasil, é estimado o nascimento de uma criança com anemia falciforme para cada mil recém-nascidos vivos (SALVADOR, 2015). O quadro é ainda mais grave no estado da Bahia em que a proporção é de uma criança com a doença para cada 627 nascimentos, de acordo com a triagem neonatal realizada no ano de 2014 (FIGUEIREDO, 2016).

As complicações da AF resultam em sucessivas internações hospitalares e, caso o indivíduo não receba os cuidados necessários pode resultar em óbito. A elevada morbimortalidade acomete principalmente os mais jovens, sendo necessária a identificação precoce dos fatores de risco que possam gerar ações profiláticas para minimizar as complicações da doença (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005)

Não existe até o momento, fármacos específicos para o tratamento da AF. Os fármacos disponíveis melhoram a qualidade de vida dos pacientes reduzindo alguns sintomas, mas não tratam a doença. A hidroxiureia (HU) é um exemplo. A eficácia deste fármaco deve-se, em partes, ao aumento de óxido nítrico (NO) sendo este um dos responsáveis pela vaso dilatação, inibição da agregação plaquetária e da estimulação da produção de hemoglobina fetal (HbF) (CONRAN et al., 2004).

A indução da HbF tem sido uma estratégia bastante investigada e promissora para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dos sintomas da AF (MELO; CHIN; DOS SANTOS, 2014). Altos níveis de HbF estão relacionados com a diminuição da polimerização de HbS (STEINBERG, 2006).

Durante a gestação, a HbF é responsável pelo transporte de oxigênio ao feto. Próximo ao nascimento, os níveis de HbF diminuem devido a diminuição da produção de gama-globina; ao passo que, a produção de  $\beta$  globina aumenta gradualmente, originando a hemoglobina adulta. A inibição da transcrição gênica de gama-globina deve-se a ligação do complexo repressor constituído por BCL11A, FOG1 e GATA-1 ao locus do gene  $\beta$  globina localizado no cromossomo 11 (SANKARAN; ORKIN, 2013). A inibição direta dos fatores de transcrição envolvidos na regulação gênica de gama-globina é bastante complexa e pouco específica em regular apenas a substituição de HbF para hemoglobina adulta. Considerando que a inibição de enzimas que regulam a expressão gênica através das proteínas nucleares, como por exemplo os bromodomínios, constitui uma alternativa para o planejamento de novos fármacos que visam regular a produção de hemoglobina fetal (SANKARAN; WEISS, 2015), este trabalho teve como objetivo o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de compostos inibidores de BRD-3 (BD1) indutores de HbF.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ANEMIA FALCIFORME: ASPECTOS GERAIS E FISIOPATOLOGIA

A anemia falciforme (AF) é uma anemia hemolítica hereditária crônica, devido à herança de cada um dos progenitores do gene para hemoglobina S. A doença é caracterizada por uma mutação pontual no gene da  $\beta$ -globina, mais especificamente uma simples substituição de nucleotídeos (GTG para GAG) no sexto códon do gene  $\beta$ -globina, resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na superfície da cadeia  $\beta$ -globina variante ( $\beta^s$ -globina) (SAFO et al., 2004).

Em ambientes com baixa tensão de oxigênio, a valina “substituída” pode-se ligar por complementariedade à sítios hidrofóbicos de outras subunidades  $\beta$  do tetrâmero de hemoglobina, em um processo de polimerização que pode levar ao afoçamento das hemácias (BUNN, 1997).

Os polímeros, por vezes, causam danos ao citoesqueleto do eritrócito e podem provocar a lise da hemácia, liberando hemoglobina. Quando há rompimento da hemácia, o grupo heme é liberado na circulação, e o átomo de ferro central deste núcleo, é capaz de coordenar moléculas de óxido nítrico produzidas pelo endotélio vascular durante o processo homeostático, gerando nos pacientes falciformes um “caráter vasoconstritor” (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Esse processo é agravado com a vaso-oclusão, decorrente da obstrução, principalmente da microcirculação, causado pelas células falciformes e pela maior adesão das células sanguíneas ao endotélio vascular. Esse quadro, frequentemente, leva

ao infarto diversos tecidos por uma perfusão tissular inadequada. Ademais, contribui para crises dolorosas, disfunção dos órgãos, e em alguns casos, morte (CROIZAT, 1994; DUTS et al., 1996; STEINBERG, 2006; WUN et al., 1997).

Destaca-se ainda na doença o processo inflamatório crônico, com aumento dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas (IL) IL-1 $\beta$  e IL-6. Níveis elevados destas citocinas estimulam a produção de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1), quimiotaxia de células inflamatórias, aumento da produção de radicais livres e síntese de outros mediadores inflamatórios (INGLIS et al., 2005; LANARO et al., 2009). Todas essas alterações agravam ainda mais o quadro da doença contribuindo para elevadas taxas de morbidade e mortalidade (BLAKE et al., 2015).

Do ponto de vista epidemiológico, a Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 5% da população mundial carregam os genes para hemoglobinopatias (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Nos Estados Unidos, a AF afeta aproximadamente um em cada 500 recém-nascidos afro-americanos por ano, e entre 90.000 e 100.000 indivíduos no total (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). No Brasil, dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal estimam em 2 milhões o número de portadores do gene da hemoglobina S (HbS) e de 25 a 50 mil indivíduos apresentando a forma homozigótica (Hb SS). Por ano, calcula-se que nasçam no país em torno de 3.500 crianças com AF e 300.000 portadores de traço falciforme (SIMÕES et al., 2010).

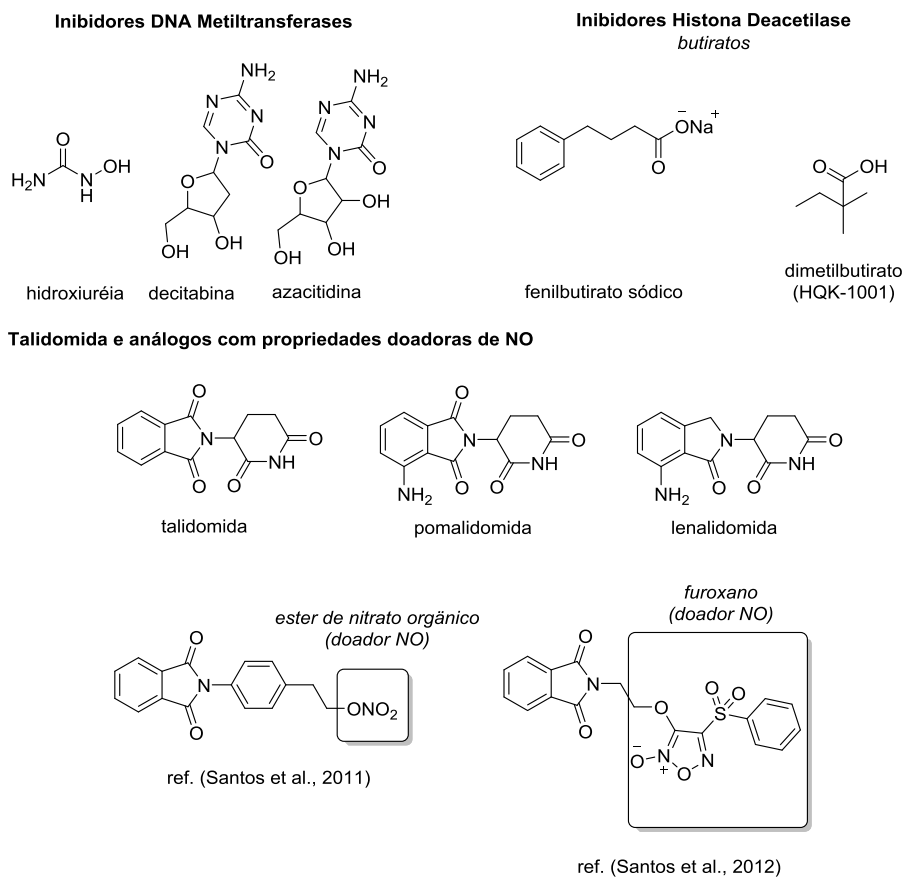
Apesar desse panorama complexo, atualmente o único fármaco aprovado pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da anemia falciforme é a HU. Na AF, o mecanismo benéfico de atuação deste fármaco está relacionado a indução dos níveis de HbF. Apesar disso, HU causa efeitos deletérios que limitam seu uso em longo prazo, como por exemplo, hiperpigmentação cutânea, lesões ulcerativas em membros inferiores, mielossupressão e genotoxicidade (DOS SANTOS et al., 2012; WARE, 2013). Estudos estimam ainda que o número de pacientes que não respondem a HU varie de 14-30% (CHAND et al., 2014). Esses fatores tornam urgente a descoberta de novos fármacos mais efetivos e seguros para tratamento da AF.

## 2.2 AUMENTO DE HEMOGLOBINA FETAL COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA

Das estratégias que tem sido investigadas nos últimos anos, a indução da HbF parece ser a mais promissoras na busca de novos fármacos para tratamento dos sintomas da AF (MELO; CHIN; DOS SANTOS, 2014). Baixos níveis de HbF e elevados níveis de hemoglobina S (HbS) em pacientes estão correlacionados com maior severidade clínica e altas taxas de mortalidade nos pacientes. Isso porque altos níveis de HbS

desencadeiam e agravam os processos vaso-oclusivos (MELO; CHIN; DOS SANTOS, 2014; PACE; ZEIN, 2006; SANTOS; CHUNG, 2012).

Diversos agentes são descritos na literatura como indutores de hemoglobina fetal, entre eles: HU, azacitidina, decitabina, ácido butírico e derivados, doadores de óxido nítrico e talidomida e derivados (Figura 1).



**Figura 1** - Estrutura química de moléculas indutoras de hemoglobina fetal (Fonte: próprio autor).

A decitabina (5-aza-2'-desoxicidina) e azacitidina (Figura 1) são potentes fármacos indutores da síntese de HbF com atividade inclusive em pacientes não responsivos à HU (SAUNTHARARAJAH et al., 2003). Estudos sugerem que ambos fármacos atuam através da hipometilação do gene promotor de gama-globina por inibição da enzima DNA metiltransferase (RUIZ et al., 2015). Em humanos, baixas doses de decitabina aumenta os níveis de HbF. Entretanto, graves efeitos adversos foram relatados para a decitabina e azacitidina incluindo carcinogenicidade, neutropenia, trombocitopenia e leucopenia, limitando seu uso no tratamento da AF (CARR et al., 1984; OLIVIERI et al., 2011).

O ácido butírico e derivados (Figura 1) são ácidos graxos de cadeia curta que estimulam a produção de HbF em modelos *in vitro* e *in vivo* (KUTLAR et al., 2012; ZEIN et al., 2010). Estudos mostram que essa atividade está relacionada à inibição de histonas deacetilases (LI et al., 2013; RONZONI et al., 2014). Acredita-se ainda que os butiratos possam induzir a expressão de gama-globina por induzir a dissociação da histona deacetilase classe 3 (HDAC-3) e do co-repressor de receptor nuclear (NCoR) do gene promotor de gama-globina, com coincidente recrutamento a este sítio promotor da RNA polimerase II (MANKIDY et al., 2006). Apesar dos efeitos benéficos, em geral os butiratos apresentam curto tempo de meia vida e baixa biodisponibilidade, limitando seu uso clínico no tratamento da AF.

Durante os últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem identificado novas moléculas com capacidade de induzir a expressão gênica de gama-globina e aumentar a produção de hemoglobina fetal tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Figura 1). Exemplo são as moléculas híbridas entre talidomida e doadores de NO (ésteres de nitrato orgânico e furoxanos). Essas moléculas demonstraram atividade superior a HU no aumento de HbF em animais transgênicos para AF. Além disso, apresentaram efeito antiinflamatório quando avaliadas em estudos *in vitro* e *in vivo* (DOS SANTOS et al., 2012; DOS SANTOS; LANARO; CHIN, 2011).

### 2.3 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE GAMA-GLOBINA

A HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) é um tetrâmero composto por duas cadeias gama e duas cadeias alfa, e é responsável durante a gestação pelo transporte de oxigênio no feto. Próximo ao nascimento, a produção de gama-globina regulada pelo genes HBG1 e HBG2 diminui, enquanto a produção de  $\beta$ -globina regulado pelo gene HBB aumenta gradualmente, substituindo assim HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) por hemoglobina adulta ( $\alpha_2\beta_2$ ). Essa troca se completa próximo aos seis meses de idade do recém-nascido, e coincide exatamente com o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença falciforme em crianças (SANKARAN & ORKIN, 2013). Entretanto, a produção total de HbF não é completamente cessada, e é possível encontrar em adultos baixos níveis de HbF (0,1-1% hemoglobinas totais) (BAUER; KAMRAN; ORKIN, 2012).

O locus humano da  $\beta$ -globina no cromossomo 11 contém os genes das diferentes formas de hemoglobina (embriônico –  $\epsilon$ ; fetal -  $G\gamma$  e  $A\gamma$ ; e adulto -  $\delta$  e  $\beta$ ) expressas durante os estágios do desenvolvimento humano. No cromossomo 11, o silenciamento do gene de gama-globina é complexo e envolve a participação de diversos repressores da transcrição, a exemplo do BCL11A. Este é considerado o repressor-chave e o mediador fisiológico da troca da transcrição de gama-globina para  $\beta$ -globina (SANKARAN et al., 2008). Estudos usando camundongos, demonstraram que a supressão de BCL11A aumenta os níveis de HbF com efeitos mínimos em outros genes

eritróides (XU et al., 2011). Entretanto, apesar de parecer um atraente alvo para planejamento de novos fármacos, é sabido que BCL11A também apresenta importantes funções em células não eritróides, como linfócitos e neurônios, e sua completa inibição poderia levar a efeitos deletérios graves. Além disso, moléculas orgânicas com baixo peso molecular dificilmente conseguem inibir fatores de transcrição como o BCL11A (SANKARAN, 2011).

Outros fatores de transcrição envolvidos na regulação de gama-globina cuja repressão eleva os níveis de HbF incluem MYB, KLF1, GATA-1, FOG-1, TR2, TR4, SOX-6, COUP-TF, FOP, Ikaros, MBD2, NF-E4, NRF2 entre outros (AERBAJINAI et al., 2009; VAN DIJK et al., 2010; LOPEZ et al., 2002; RUPON et al., 2006; ZHOU et al., 2004; MACARI & LOWREY, 2011; ZUBER et al., 2011; ZHOU et al., 2010; CAMPBELL et al., 2011; FUJIWARA et al., 1996; NICHOLS et al., 2000; MICCIO & BLOBEL, 2010; MICCIO et al., 2010).

A complexidade e as dificuldades em inibir diretamente os fatores de transcrição envolvidos na regulação gênica de gama-globina dificultam o planejamento de novos fármacos, principalmente, porque até o momento nenhum desses fatores parece ser específico em regular apenas a substituição de HbF para hemoglobina adulto. Atualmente, estratégias que visam inibir enzimas que regulam a expressão gênica através das proteínas nucleares, a exemplo dos bromodomínios, parecem ser promissoras e atraentes (SANKARAN & WEISS, 2015).

## 2.4 EPIGENÉTICA E OS BROMODOMÍNIOS

O termo epigenética refere-se a modificações no material genético que não afetam a sequência de nucleotídeos e resultam na regulação da expressão gênica. As marcas epigenéticas clássicas são: metilação do DNA, modificações pós-traducionais em histonas, RNAs não codificantes e posicionamento dos nucleossomos (BIRD, 2007). A regulação epigenética na ativação ou silenciamento gênico em resposta a estímulos fisiológicos e ambientais tem sido realizado por modificações químicas reversíveis no DNA e nucleossomo (LI; CAREY; WORKMAN, 2007).

As duas principais classes de remodeladores de cromatina são as proteínas que alteram a acetilação de histonas (histonas acetiltransferases – HATs e histonas deacetilases – HDACs) e complexos multiprotéicos, que são capazes de remodelar nucleossomos ou modificar seu espaçamento usando energia da hidrólise de ATP (NARLIKAR; FAN; KINGSTONE, 2002).

Modificações covalentes pós-translacionais da cauda amino-terminal das histonas influencia a estrutura da cromatina e a acessibilidade do DNA pela maquinaria transcricional (LAMOUREUX et al., 2014). A acetilação de um resíduo de lisina, na

região amino-terminal da cauda das histonas, diminui sua afinidade pelo DNA. Desta forma, as histonas acetilases alteram a conformação nucleossomal, aumentando o acesso de proteínas regulatórias transcricionais às regiões específicas do DNA (TSE et al., 1998). Cromatina enriquecida em histonas acetiladas é mais eficientemente transcrita (NIGHTGALE et al., 1998). Já as histonas deacetilases são responsáveis por uma repressão da transcrição gênica, por fortalecer a compactação do DNA em nucleossomos. Tanto as histonas acetilases, como as deacetilases fazem parte de complexos protéicos ou interagem diretamente com proteínas relacionadas à transcrição gênica (ZHONG et al., 2002).

A estratégia de inibição da enzima HDAC é validada na AF. Moléculas como fenilbutirato sódico são descritos como sendo capazes de aumentar em humanos os níveis de HbF devido inibição de HDAC (DOVER; BRUSILOW; CHARACHE, 1994). Em estudos clínicos, o derivado dimetilbutirato (HQB-1001) aumentou HbF em cerca de 80% dos voluntários (KUTLAR et al., 2013). Entretanto, alta variabilidade nas respostas clínicas ainda são observadas, e a terapia usando ‘pulsos’ de butiratos (doses menores e mais frequentes) parecem ser mais efetivas que doses únicas diárias (REID et al., 2014). Atualmente, estudos clínicos envolvendo o vorinostat (pan-inibidor de HDAC) estão sendo conduzidos em pacientes com anemia falciforme (CLINICAL TRIALS, 2016) e diversos inibidores tem sido desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa.

Das modificações em histonas, a acetilação de lisina é uma das mais conhecidas e apresenta um papel importante na condução de remodelação da cromatina e a transcrição de genes (BERGER, 2002; NEELY & WORKMAN, 2002). O papel da acetilação de lisina na transcrição do gene é, em certo modo, resultado da ação do bromodomínio das proteínas. O bromodomínio, encontrado em diversas proteínas associadas à cromatina e histonas acetiltransferases, é a única família de domínios de proteínas atualmente conhecidas capazes de reconhecer resíduos de acetil-lisina (ZENG & ZHOU, 2002). Nos últimos anos, um grande número de trabalhos tem demonstrado que os bromodomínios podem ser potenciais alvos terapêuticos para descoberta de novos fármacos de diversas classes terapêuticas. Proteínas humanas contendo bromodomínio estão relacionadas a uma série de doenças incluindo câncer, doenças inflamatórias, obesidade, diabetes, doenças infecciosas, desordens metabólicas e doenças cardiovasculares (DENIS, 2010).

Bromodomínios (BRD) são pequenos módulos de aproximadamente 110 aminoácidos, conservados estruturalmente e evolutivamente, e identificados como motivos em *Drosophila brahma*, de onde se originou o nome (TAMKUN et al., 1992). Eles são mais comumente encontrados com outros domínios de leitura epigenéticas como PHD, PWWP e Tudor. As proteínas contendo bromodomínio possuem papel na regulação da transcrição e remodelamento da cromatina. Múltiplos bromodomínios podem ser encontrados em uma única proteína apresentando grande similaridade

estrutural entre si, entretanto podem possuir distintas funções. Atualmente, 61 diferentes bromodomínios são identificados em 46 diferentes proteínas e agrupados em 8 famílias (FILIPPAKOPOULOS et al., 2012; FILIPPAKOPOULOS & KNAPP, 2012).

As famílias de proteínas contendo bromodomínio e domínio extra-terminal (BET) (BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT) constituem uma importante classe de proteínas de leitura epigenéticas que atuam no reconhecimento de *N*-acetilação de resíduos lisina na cauda das histonas (HEWINGS et al., 2012). Proteínas contendo bromodomínio atuam como suporte para complexos moleculares em sítios de reconhecimento das histonas para regular a acessibilidade da cromatina para fatores de transcrição e RNA polimerase (PRINJHA; WITHERINGTON; LEE, 2012).

Estruturalmente os bromodomínios compartilham uma dobra comum, que consiste em 4  $\alpha$ -hélices anti-paralelas ( $\alpha$ Z-  $\alpha$ A-  $\alpha$ B-  $\alpha$ C) organizado com uma torção à esquerda bem como as regiões variáveis de alça (ZA e BC) que determinam a especificidade do substrato.

## 2.5 INIBIDORES DE BROMODOMÍNIO COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTO DE HBF

As modificações pós-translacionais relacionadas à acetilação de lisina servem como sítio de ancoramento para os bromodomínios que são encontrados em diversas proteínas relacionadas à cromatina (ZENG et al., 2002). Dessa forma, os bromodomínios podem ser entendidos como ‘leitores’ de resíduos de lisina acetiladas, e podem influenciar uma série de processos relacionados à cromatina. Um dos primeiros fatores de transcrição descritos e envolvidos com a acetilação de lisina é a proteína hematopoiética (*zinc finger*) denominada GATA-1 (FUJIWARA et al., 1996).

GATA-1 apresenta um papel importante no desenvolvimento eritróide por regular uma grande quantidade de genes que irão mediar o amadurecimento e função dos eritrócitos. A inibição direta de GATA-1 é complexa e mostra-se inviável como alvo terapêutico devido sua importância fisiológica. Estudos demonstram que camundongos modificados geneticamente para não expressar GATA-1 morrem durante a gestação, devido a falhas em formar células eritróides maduras (FUJIWARA et al., 1996). Além disso, diversos tipos de anemia congênita em humanos são associadas a mutações de GATA-1 (NICHOLS et al., 2000; CAMPBELL et al., 2013). GATA-1 tem sido associada à ativação de genes eritróides específicos e ao silenciamento de genes associados com estado de proliferação imaturo (WELCH et al., 2004; CHENG et al., 2009).

Na anemia falciforme, a regulação dos genes de gama-globina no cromossomo 11 tem sido relacionadas a formação de um complexo repressor, envolvendo entre outras proteínas GATA-1, BCL11A, FOG1 e SOX-6 (XU et al., 2010). Tem sido

descrito que a capacidade de compostos, a exemplo do resveratrol, em aumentar a transcrição gênica de gama-globina e produção de hemoglobina fetal estão relacionadas em parte à capacidade deste produto natural em modular os níveis de GATA-1 e BCL11A (AGYEKUM et al., 2011).

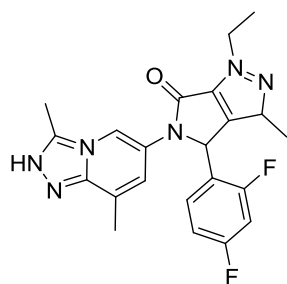
O recrutamento de GATA-1 no gene de gama-globina se dá pela ação dos bromodomínios. Especificamente, o bromodomínio-3 (BRD-3) se liga a GATA-1 acetilada. Estudos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) sugerem que BRD-3 está presente na maioria dos sítios ocupados de GATA-1. Além disso, foi demonstrado que a exposição de células eritróides aos inibidores BET-bromodomínios diminuem a ocupação de GATA-1 podendo regular a transcrição de uma série de genes (LAMONICA et al., 2011; STONESTROM et al., 2015). Assim, nossa hipótese foi a de que a inibição de BRD-3 poderia reduzir os níveis de GATA-1 no gene de gama-globina, e consequentemente aumentar a transcrição gênica de gama-globina por impedir a formação do complexo repressor.

## 2.6 BROMODOMINIO-3 (BRD-3) E RESPECTIVOS COMPOSTOS INIBIDORES

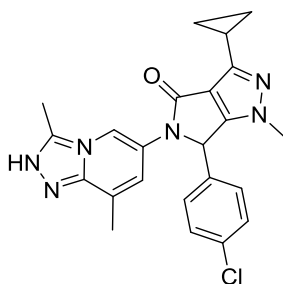
O BRD-3 (I) pertence à família de bromodomínios e motivos extra terminais (BET) da classe II. Como todos os representantes desta classe, possuem duas sequências homólogas de bromodomínio (BRD3(I) e BRD3(II)) e um motivo extra-terminal; entretanto, diferentemente de BRD-4 e BRDT, não possui um domínio extraterminal C longo (BELKINA & DENIS, 2012).

O papel de BRD-3 na fisiopatologia de algumas doenças ainda não está completamente bem elucidado, entretanto, sabe-se que este bromodomínio participa ativamente no remodelamento do nucleossomo no contexto de transcrição gênica. Além disso, sua inibição parece estar relacionada ao controle de diversas doenças hematológicas (LEROY; RICKARDS; FLINT, 2008). Em algumas condições, sabe-se que pode ocorrer sobreposição entre as atividades de BRD-3 e BRD-2, o que implica, que a inibição seletiva de BRD-3 não deva ser uma exigência exclusiva como intervenção terapêutica (STONESTROM et al., 2015). Entretanto, devido a ampla relação de BRD-3 e GATA-1, este alvo parece ser atraente na regulação da transcrição de gama-globina.

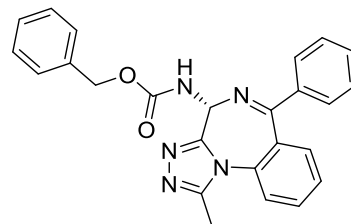
Poucas estruturas químicas tem sido descritas por indústrias farmacêuticas multinacionais como inibidoras de bromodomínio-3 (Figura 2). Embora ainda seja limitado o número de moléculas inibidoras de BRD-3, alguns exemplos apresentaram valores de  $IC_{50}$  promissores, variando de 13 nM até 31 nM em ensaios de *bromoscan*.



IC<sub>50</sub> = 31 nM  
US Patente: US8975417 (2015)  
(Novartis)



IC<sub>50</sub> = 13 nM  
US Patente: US8975417 (2015)  
(Novartis)



IC<sub>50</sub> = 28.4 nM  
(Glaxo-Smith Kline)

**Figura 2** – Compostos inibidores de BRD-3

Apesar disso, muitos desses compostos encontram-se protegidos por patentes e nenhum deles foi avaliado para anemia falciforme, justificando assim a busca por novas moléculas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho visou o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de inibidores de bromodomínio-3 (BRD-3) desenhados como possíveis indutores da produção de hemoglobina fetal.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Modelagem molecular (*docking*) dos compostos derivados ftalimídicos a fim de selecionar os 12 compostos mais promissores planejados como inibidores de BRD-3 (I).
- 3.2.2 Síntese, isolamento, purificação e caracterização estrutural dos derivados ftalimídicos selecionados.
- 3.2.3 Estudo *in vitro* de inibição enzimática de BRD-3 (I) dos novos análogos inéditos sintetizados.
- 3.2.4 Avaliação da expressão genica de gama-globina e produção de hemoglobina fetal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

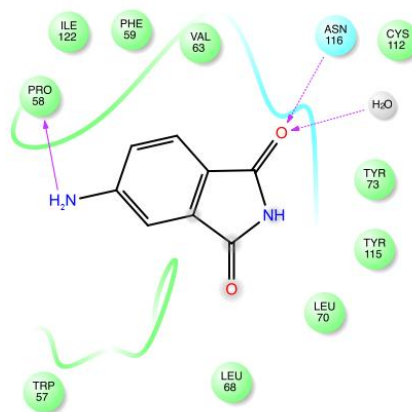
A triagem virtual é uma ferramenta amplamente usada na indústria farmacêutica nos dias atuais para busca de novos protótipos. Trata-se de um processo de análise computacional usando elevado número de compostos (que variam de milhares a milhões) com fins de estimar a afinidade de ligação ao um sítio específico previamente determinado (CERQUEIRA et al., 2015). Usando a base de dados ZINC, e aplicando uma série de filtros (incluindo ‘regra dos 5’, PAINS - *Pan-Assay Interference compounds*), com fins de eliminar estruturas não promissoras, foram identificados 2.2 milhões de estruturas na biblioteca virtual criada no *Minnesota Supercomputing Institute*. A partir dessa biblioteca, e usando o programa Maestro Schrodinger<sup>®</sup> foi realizado a docagem (*docking*) dos compostos contra bromodomínio-3 (BRD-3 pdb: 3S91) e os resultados foram expressos em valores de *docking score* e *Glide Emodel*. Deste estudo foram selecionadas, usando as ferramentas de quimio-informática (Canvas<sup>®</sup>), as duas mil estruturas com melhores valores de *docking score* (Figura 3). Ensaio secundários de validação foram realizados a fim de confirmar os resultados obtidos e identificar os compostos mais promissores.

#### Virtual High Throughput Screening de uma biblioteca de 2.2 Milhões de Compostos contra BRD3



**Figura 3** - Esquema do ensaio de triagem virtual utilizado na identificação dos protótipos inibidores de BRD-3 (Fonte: próprio autor).

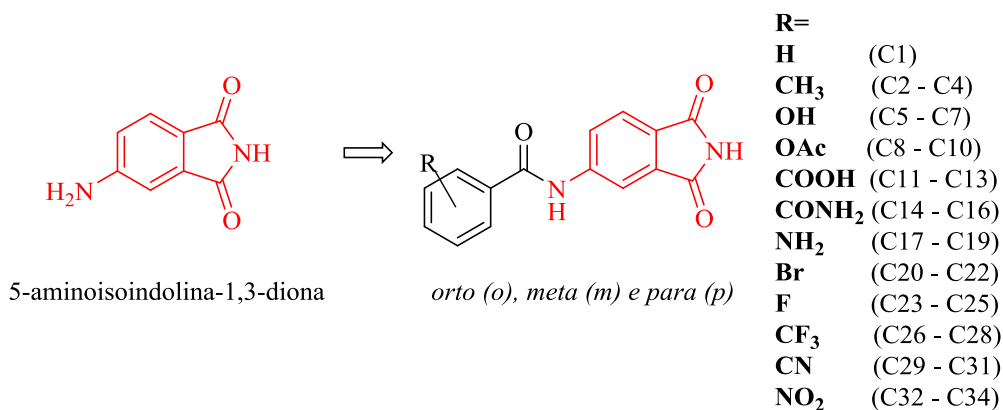
Este ensaio prévio de triagem virtual foi realizado em colaboração com o grupo de pesquisa de Química Medicinal da Universidade de Minnesota (Estados Unidos). Destes resultados, foram identificados pelas ferramentas de quimio-informática os derivados ftalimídicos como padrões estruturais potencialmente promissores na inibição de BRD-3 (resultados não publicados). Para os derivados ftalimídicos identificou-se o fragmento 5-aminoisindolina-1,3-diona (Figura 4), como sendo importante para interação com: a) os resíduos presentes no sítio ativo de BRD-3 e; b) as moléculas de água conservadas características da família dos bromodomínios. No sítio ativo, a asparagina-116 interage com o núcleo ftalimídico através de ligações hidrogênio em uma rede envolvendo as moléculas de água conservadas de BRD-3. Já a amina aromática interage através de ligação de hidrogênio com o resíduo de prolina-58 do sítio ativo de BRD-3.



**Figura 4** – Interações do fragmento 5-aminoisindolina-1,3-diona com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio do BRD-3.

Assim, neste trabalho, utilizando-se da técnica de planejamento de fármacos baseado em fragmentos (FBDD – *Fragment-based Drug Design*) o fragmento identificado foi otimizado. Especificamente, para fins de otimização foram exploradas interações adicionais das moléculas planejadas com os resíduos BRD-3, a exemplo do triptofano-57 e glutamina-61.

Foi realizado um estudo de ancoragem dos derivados ftalimídicos otimizados. Para esta etapa, a subunidade benzamida foi adicionada ao fragmento a fim de explorar interações adicionais no sítio ativo hidrofóbico do BRD-3. Ainda, foi proposta a funcionalização do anel aromático benzamida a fim de se explorar o padrão mais adequado de substituição, permitindo assim, estudar a melhor interação com os resíduos presentes no BRD-3 (Figura 5), a exemplo do triptofano-57 e glutamina-61.



**Figura 5** - Planejamento estrutural dos derivados fthalimídicos a partir da estrutura do fragmento 5-aminoisindolin-1,3-diona.

#### 4.2 MODELAGEM MOLECULAR

Inicialmente, a estrutura cristalográfica do BRD-3 de melhor resolução (2,06 Å), foi obtida do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), sob o código 3S91 (PDB, 2017). A referida estrutura apresenta-se cristalizada com um o inibidor JQ-1 (FILIPPAKOPOULOS et al., [s.d.]).

Para os estudos de *docking*, a proteína obtida do PDB foi importada para o programa Maestro<sup>®</sup> (SCHRÖDINGER, 2017a) e preparada para os estudos de docking utilizando a função *Protein Preparation Wizard*. Para tanto, o seguinte protocolo foi utilizado: (i) remoção das moléculas de água (exceto aquelas conservadas presentes no sítio ativo); (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 Glide (SCHRÖDINGER, 2017b), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å.

Os ligantes foram importados (em formato SDF) para o programa Maestro<sup>®</sup> e foram preparados utilizando-se a 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  $7 \pm 2$  (SCHRÖDINGER, 2017c).

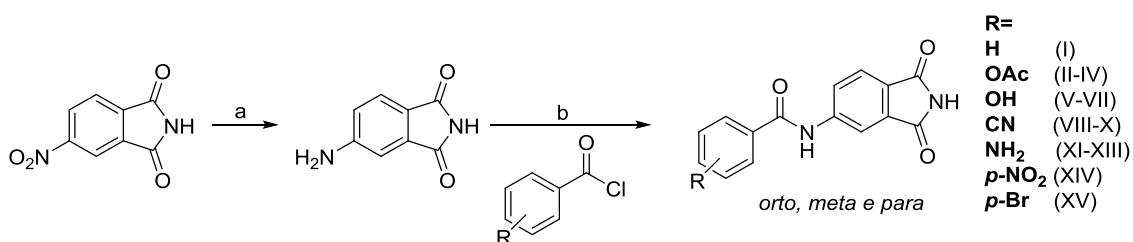
Para determinar a eficiência de todos os parâmetros utilizados neste estudo, o modelo foi validado por redocking, sendo o ligante original da proteína (JQ-1) removido, e posteriormente, ancorado no mesmo sítio. A qualidade deste resultado foi analisado pelo cálculo *Root Mean Square (RMSD)* entre o ligante co-cristalizado e o “reancorado”.

### 4.3 METODOLOGIA SINTÉTICA

#### 4.3.1 Método sintético geral

Para a síntese dos compostos, inicialmente o grupamento nitro do composto 4-nitroftalimida foi reduzido para o seu respectivo derivado aminado (RAMADAS; SRINIVASAN, 1992). Posteriormente, este intermediário foi reagido com o respectivo cloreto de acila para a formação do composto final (Esquema 1).

**Esquema 1** – Síntese das moléculas planejadas

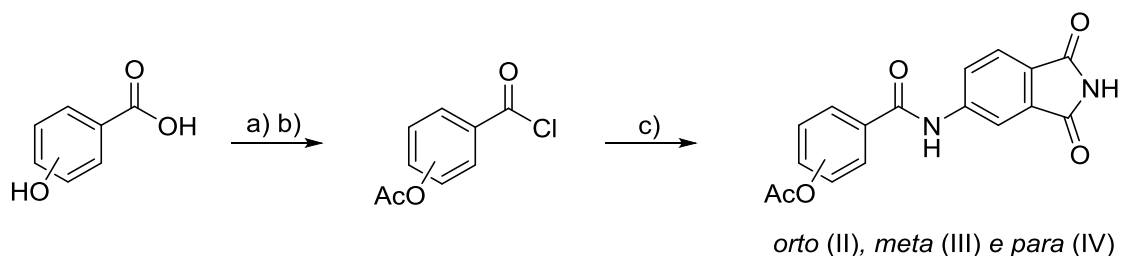


a) Fe, NH<sub>4</sub>Cl, MeOH, 60°C, 1h; b) NMP, 0°C - t.a, 4h.

Fonte: próprio autor

Para os compostos II-IV, foi realizado a acetilação do ácido hidroxibenzóico correspondente através de uma reação com anidrido acético em meio básico contendo hidróxido de sódio (Esquema 2).

**Esquema 2** – Síntese dos intermediários para os compostos finais II-IV

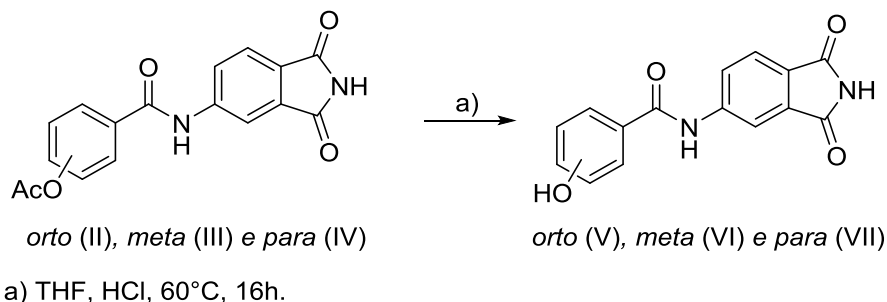


a) Ac<sub>2</sub>O, NaOH, H<sub>2</sub>O, t.a., 16h. b) SOCl<sub>2</sub>, DMF, 75°C, 1h. c) 4-aminofthalimida, NMP, 0°C - t.a, 4h.

Fonte: próprio autor

Os compostos finais V-VII foram obtidos através de uma hidrólise ácida quimiosseletiva seletiva para o grupamento acetoxi presente nos compostos II-IV (Esquema 3).

### Esquema 3 – Síntese dos compostos V-VII



Fonte: próprio autor

Os procedimentos detalhados para obtenção de cada um dos compostos apresentados neste trabalho estão descritos na seção Apêndice I. Em geral, para obtenção da 4-aminoftalimida foi reagido 2,6 mmol do 4-nitroftalimida com 9,3 mmol de ferro em uma solução contendo 2% de cloreto de amônio.

Para obtenção do cloreto de acila foi reagido 0,81 mmol do respectivo derivado do ácido benzoico substituído com 4,1 mmol de cloreto de tionila. Em seguida, o composto final foi obtido através de uma reação entre 0,81 mmol do respectivo cloreto de acila e 0,81 mmol do 4-aminoftalimida, utilizando *N*-metil pirrolidona (NMP) como solvente.

## 4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

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

### 5.3.2 Determinação da faixa de fusão

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

Scientific<sup>®</sup>, disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas no Laboratório de Química Farmacêutica.

### 5.3.3 Análise de espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho na região de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , foram obtidos em pastilhas de KBr em um espectrofotômetro no infravermelho IR Prestige-21 da SHIMADZU<sup>®</sup>, disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas no Laboratório de Química Farmacêutica.

### 5.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram obtidos nos espectrômetros a 300 ou 600 MHz para  $^1\text{H}$  e a 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ , utilizando-se solventes deuterados no preparo das amostras (DMSO-*d*6). As análises foram realizadas no Instituto de Química (UNESP-Araraquara), utilizando, especificamente, um espectrômetro de 300 MHz (7.0 Tesla;  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) Fourier com Dual probe  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  – Bruker<sup>®</sup> e espectrômetro de 600 MHz (14.0 Tesla;  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) Ascend – Bruker<sup>®</sup>. Os deslocamentos químicos foram reportados em partes por milhão ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (*J*) foram mostrados em Hertz (Hz). Os deslocamentos foram representados por s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete).

### 5.4 Inibição enzimática de BRD-3 (BD1)

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. O ensaio foi realizado em colaboração com a empresa BPS Bioscience Inc.

Os compostos foram solubilizados em DMSO e diluídos (1:20) em *buffer* reacional. Desta solução foram pipetados 2  $\mu\text{l}$  e transferidos para 20  $\mu\text{l}$  da mistura reacional (BRD3 (BD1), 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 ( $F_t$ ) foi considerado como 100% de atividade. Nos poços em que o controle (inibidor) era maior que 100 vezes o  $IC_{50}$  foi utilizado para determinar o sinal TR-FRET ( $F_b$ ) como 0% de atividade. A porcentagem de atividade na presença de cada composto foi calculada utilizando a seguinte equação: % atividade =  $[(F - F_b)/(F_t - F_b)] \times 100$ , onde  $F$  = sinal TR-FRET na presença do composto. A porcentagem de inibição foi calculada a partir da seguinte equação: % inibição =  $100 - \% \text{ atividade}$ .

### 5.5 Avaliação da expressão de gama-globina em células K562

O ensaio da expressão de gama-globina foi realizado em parceria com a Profa. Dra. Carolina Lanaro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As células da linhagem celular eritroleucêmica K562 foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino, 100 IU/mL de benzilpenicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina, em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células foram cultivadas a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/100 mL e tratadas com o composto IX com concentração de 50 e 75  $\mu\text{M}$ , e 100  $\mu\text{M}$  de HU. As amostras foram coletadas após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento.

RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído com Super Script III, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os seguintes primers foram planejados e sintetizados pela Invitrogen para amplificar o cDNA de gama-globina:

F-5': TGTGGAAGATGCTGGAGGAGA-3';

R-5': CAAAGAACCTCTGGGTCCATG-3'.

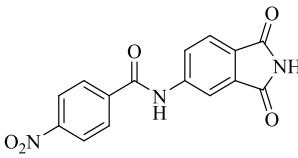
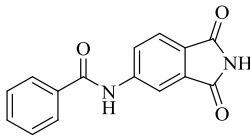
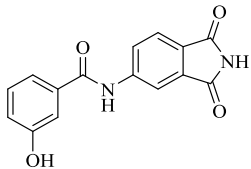
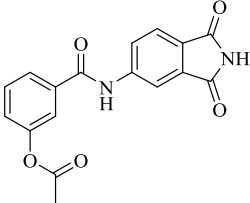
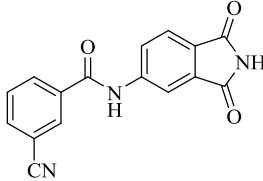
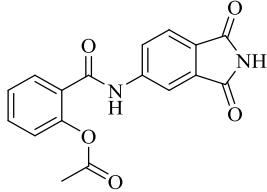
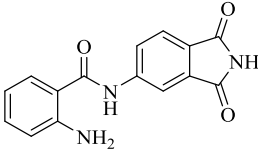
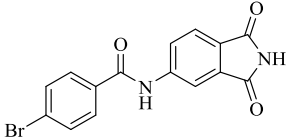
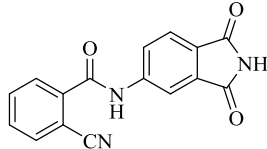
Todas as amostras continham um volume final de 12  $\mu\text{L}$ , sendo 1 ng de cDNA (3  $\mu\text{L}$ ), 6  $\mu\text{L}$  de SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems), e 3  $\mu\text{L}$  do primer em microplaca de 96 poços MicroAmp Optical (Applied Biosystems). A expressão gênica foi quantificada através do programa Gnorm. Os resultados foram expressos em níveis de mRNA de gama-globina, utilizando-se como controle interno a expressão de  $\beta$ -actina e GAPDH.

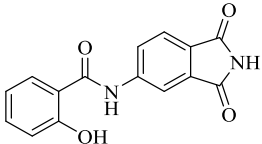
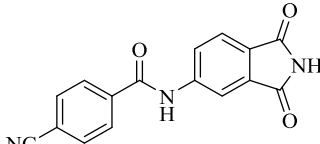
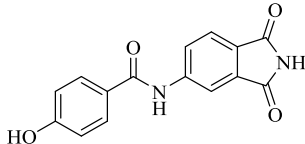
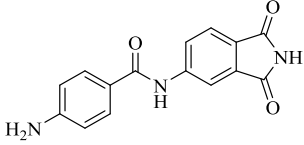
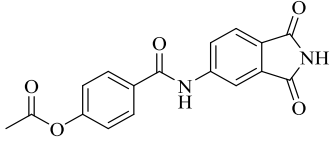
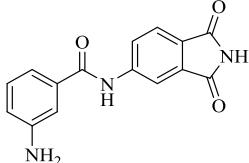
## 5 RESULTADOS

### 5.1 MODELAGEM MOLECULAR

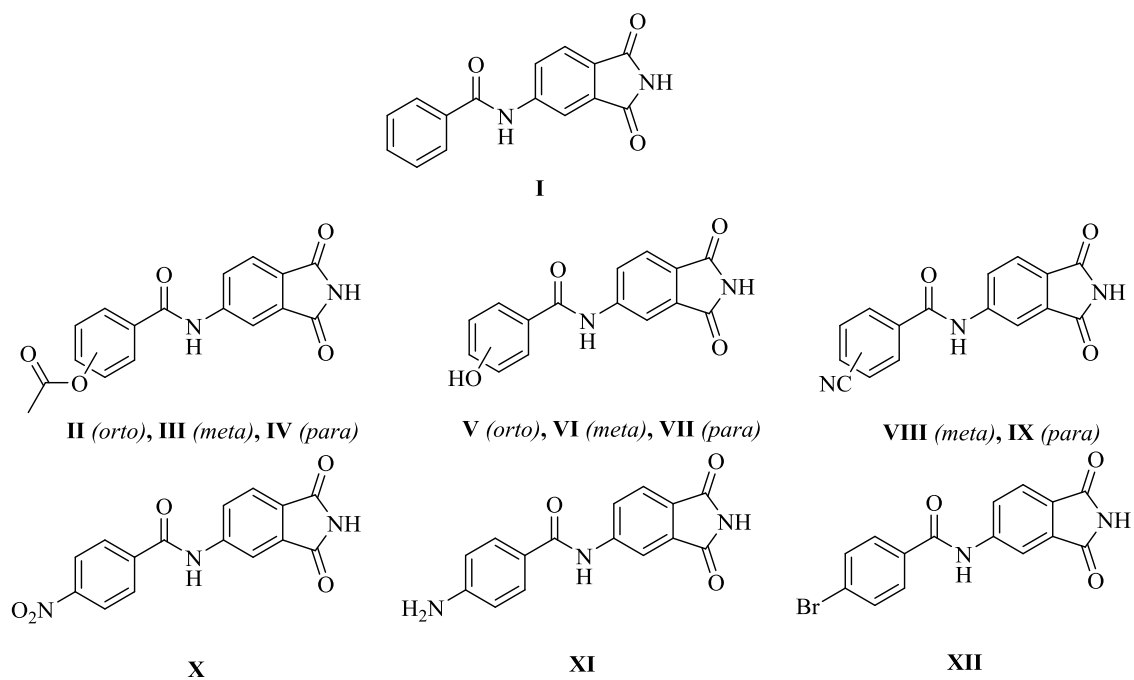
Os resultados obtidos a partir do estudo de modelagem molecular dos derivados ftalimídicos contra o BRD-3 estão apresentados na Tabela 1 com os valores de *docking score* e *glide E-model*.

**Tabela 1** - Resultados de *docking* dos derivados ftalimídicos contra BRD-3 expressos em *docking score* (DS) e *Glide E-model* (G)

<p><b>C34</b> DS: -10.357 kcal/mol G: -45.198</p>	<p><b>C1</b> DS: -10.356 kcal/mol G: -47.228</p>	<p><b>C6</b> DS: -10.351 kcal/mol G: -52.979</p>
		
<p><b>C9</b> DS: -10.267 kcal/mol G: -54.926</p>	<p><b>C30</b> DS: -10.228 kcal/mol G: -56.099</p>	<p><b>C8</b> DS: -10.086 kcal/mol G: -54.932</p>
		
<p><b>C17</b> DS: -10.069 kcal/mol G: -50.124</p>	<p><b>C22</b> DS: -9.972 kcal/mol G: -46.799</p>	<p><b>C29</b> DS: -9.864 kcal/mol G: -55.878</p>
		

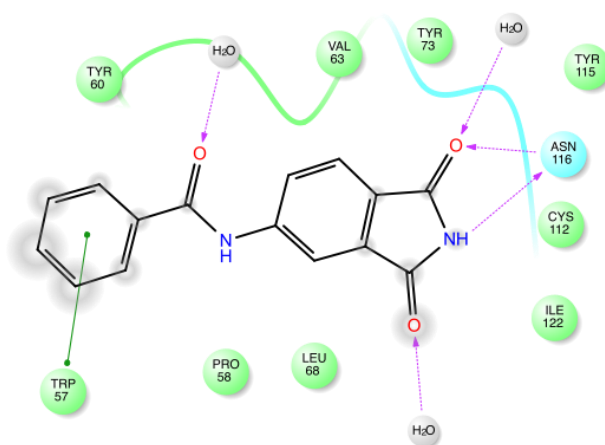
<p><b>C5</b> DS: -9.805 kcal/mol G: -50.030</p>	<p><b>C31</b> DS: -9.515 kcal/mol G: -45.528</p>	<p><b>C7</b> DS: -8.893 kcal/mol G: -46.099</p>
		
<p><b>C19</b> DS: -7.825 kcal/mol G: -56.491</p>	<p><b>C10</b> DS: -7.250 kcal/mol G: -52.906</p>	<p><b>C18</b> DS: -7.152 kcal/mol G: -52.477</p>
		

Levando em consideração os resultados obtidos no estudo de *docking* (Tabela 1), foram propostas as seguintes moléculas a fim de explorar os efeitos eletrônicos dos substituintes no anel aromático benzamida nas posições orto, meta e para (Figura 6).



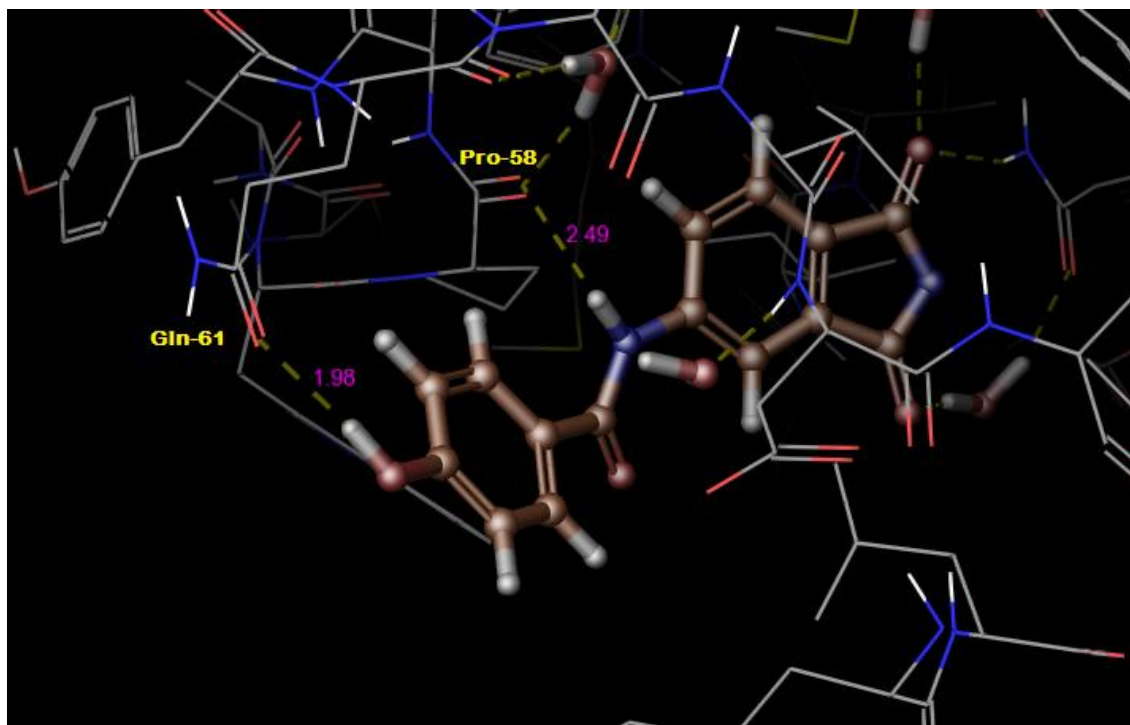
**Figura 6** – Derivados ftalimídicos planejados como inibidores de BRD-3 (I-XII)

A Figura 7 apresenta as interações do composto I com os resíduos do BRD-3 através de um mapa 2D.

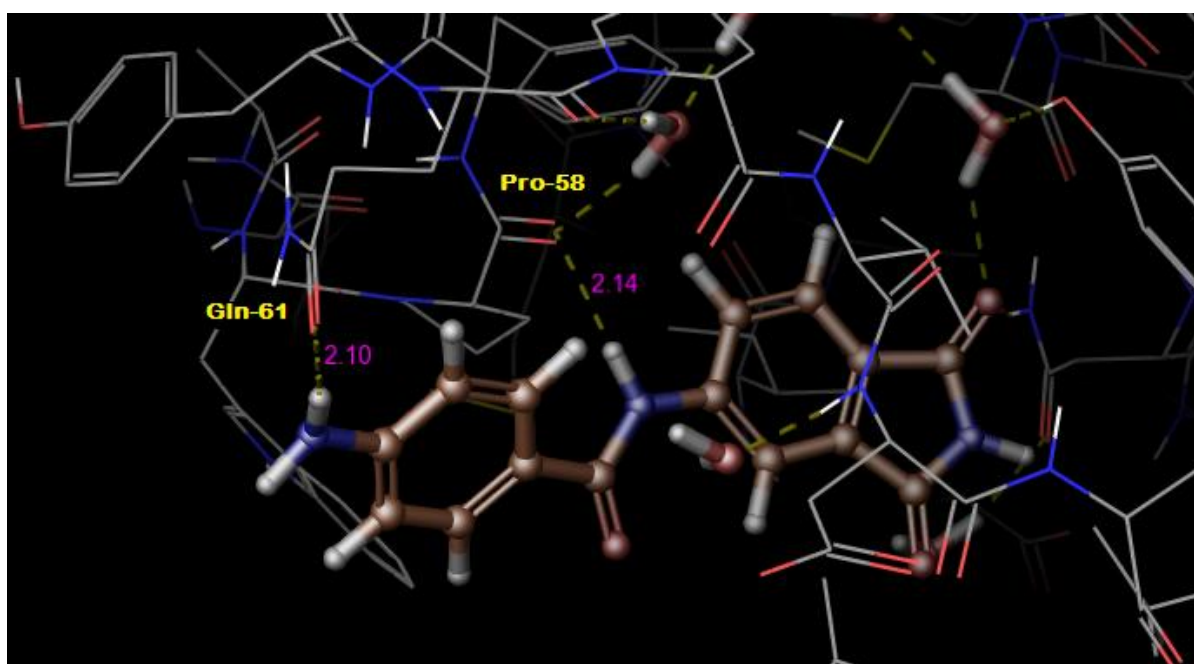


**Figura 7** – Mapa 2D de interações dos resíduos do sítio ativo do BRD-3 com o composto I (Fonte: próprio autor).

As Figuras 8 e 9 apresentam a pose do composto VII e XII, respectivamente, no sítio ativo do BRD-3, e em destaque os resíduos de aminoácidos com os quais os compostos interagem.



**Figura 8** – Interações do composto VII com os resíduos do sítio ativo do BRD-3 (Fonte: próprio autor)



**Figura 9** - Interações do composto XII com os resíduos do sítio ativo do BRD-3 (Fonte: próprio autor).

A

Tabela 2 apresenta os principais resíduos com os quais os compostos I-XII interagem, no sítio ativo do BRD-3.

**Tabela 2** – Relação das interações dos resíduos Trp-57, Gln-61 e Pro-58 com os compostos I-XII

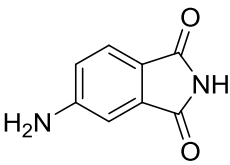
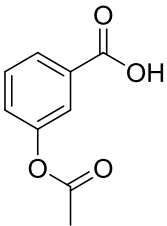
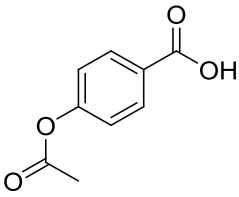
Resíduo	Composto											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Triptofano-57	■	□	■	□	■	■	□	■	■	□	□	■
Glutamina-61	□	■	□	□	□	□	■	□	□	□	■	□
Prolina-58	□	□	□	■	□	□	■	□	□	■	■	■

## 5.2 SÍNTESE

### Intermediários

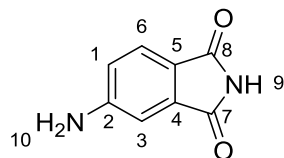
Os intermediários 4-aminofthalimida, 3- e 4-acetoxibenzóico foram obtidos com bons rendimentos, e suas características químicas e os rendimentos reacionais estão dispostos na Tabela 3.

**Tabela 3** – Rendimento reacional e características químicas dos intermediários

			
	<b>4-aminofthalimida</b>	<b>Ácido 3-acetoxibenzóico</b>	<b>Ácido 4-acetoxibenzóico</b>
Nome químico	5-aminoisoindoline-1,3-dione	Ácido 3-acetoxibenzóico	Ácido 4-acetoxibenzóico
Rendimento (%)	65	65	82
Faixa de fusão (°C)	289-291	131-134	190-194
Fórmula molecular	$C_8H_6N_2O_2$	$C_9H_8O_4$	$C_9H_8O_4$
Massa molecular	162,15	180,16	180,16
Aspecto	sólido amarelo	sólido branco	sólido branco

As Tabelas 4 e 5 apresentam os dados obtidos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos intermediários.

**Tabela 4** – Deslocamentos químicos do intermediário 4-aminofalimida



Posição	$\delta$ $^1\text{H}$
1	6,78 (dd, $J = 8,4$ Hz, 1H)
2	-
3	6,86 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)
4	-
5	-
6	7,43 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)
7	-
8	-
9	10,72 (s, 1H)
10	6,4 (s, 2H)

Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 5** – Deslocamentos químicos dos intermediários ácidos 3-acetoxi e 4-acetoxibenzóico

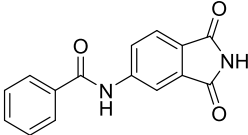
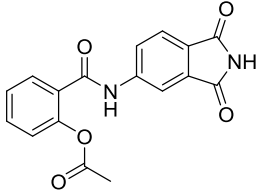
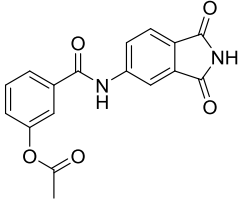
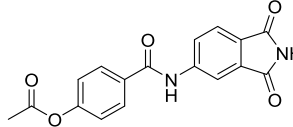
Posição	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>1</sup> H
1	-	-
2	7,66 (s, 1H)	7,98 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H)
3	-	7,26 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H)
4	7,42-7,35 (m, 1H)	-
5	7,54 (t, <i>J</i> = 7,9 Hz, 1H)	7,26 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H)
6	7,83 (d, <i>J</i> = 7,9 Hz, 1H)	7,98(d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H)
7	-	-
8	13,21 (s, 1H)	13,06 (s, 1H)
9	-	-
10	2,29 (s, 3H)	2,29 (s, 3H)

Fonte: dados da pesquisa

### Compostos Finais

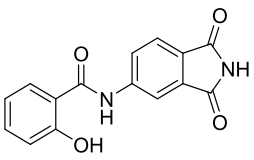
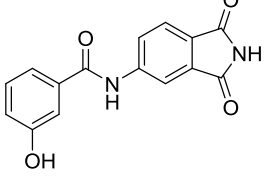
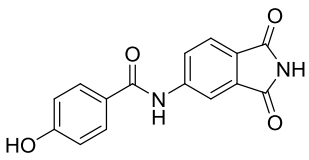
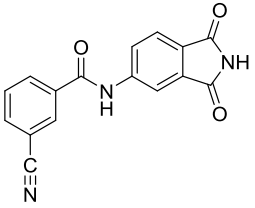
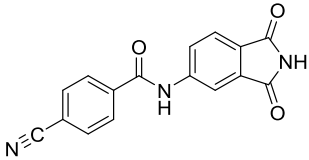
Os dados referentes ao rendimento reacional e características químicas dos compostos I-XII estão apresentados nas tabelas a seguir:

**Tabela 6** - Rendimento reacional e características químicas dos compostos I-IV

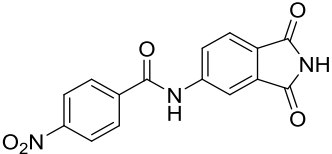
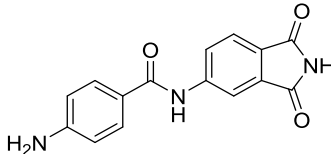
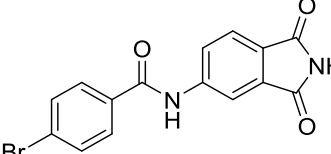
				
	<b>Composto I</b>	<b>Composto II</b>	<b>Composto III</b>	<b>Composto IV</b>
Nome químico	<i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida	2-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoyl)fenil acetato	3-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoyl)fenil acetato	4-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoyl)fenil acetato
Rendimento (%)	42	28	82	60
Faixa de fusão (°C)	314 – 318°C	206-213	201-206	195-198
Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Massa molecular	266,26	324,29	324,29	324,29
Aspecto	sólido branco	Sólido branco	sólido branco	sólido branco

Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 7 - Rendimento reacional e características químicas dos compostos V-IX**

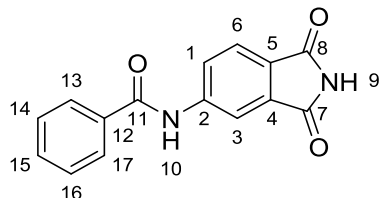
					
	<b>Composto V</b>	<b>Composto VI</b>	<b>Composto VII</b>	<b>Composto VIII</b>	<b>Composto IX</b>
Nome químico	<i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il)-2-hidroxibenzamida	<i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il)-3-hidroxibenzamida	<i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-hidroxibenzamida	3-ciano- <i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il)benzamida	4-ciano- <i>N</i> -(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida
Rendimento (%)	42	86	80	46	42
Faixa de fusão (°C)	251-264	245-251	271-274	310-312	285-288
Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
Massa molecular	282,26	282,26	282,26	291,27	291,27
Aspecto	sólido branco	sólido branco	sólido branco	sólido branco	sólido branco

**Tabela 8** - Rendimento reacional e características químicas dos compostos X-XII

	 <b>Composto X</b>	 <b>Composto XI</b>	 <b>Composto XII</b>
Nome químico	<i>N</i> -(1,3-dioxoindolin-5-il)-4-nitrobenzamida	4-amino- <i>N</i> -(1,3-dioxoindolin-5-il)benzamida	4-bromo- <i>N</i> -(1,3-dioxoindolin-5-il)benzamida
Rendimento (%)	17	35	75
Faixa de fusão (°C)	263-265	223-241	285-293
Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Massa molecular	311,25	281,27	345,15
Aspecto	sólido branco	sólido amarelo	sólido amarelo

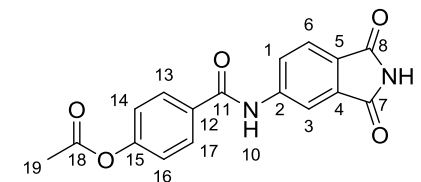
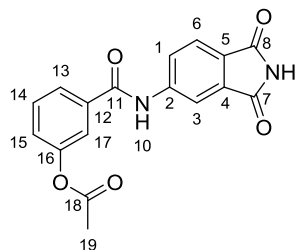
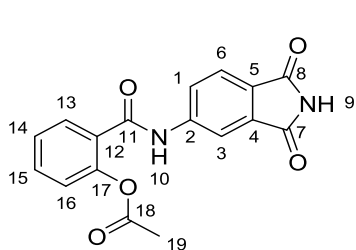
As Tabelas 9 -13 apresentam os dados referentes aos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos finais I-XII.

**Tabela 9** – Deslocamentos químicos do composto final I



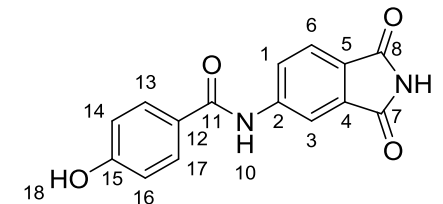
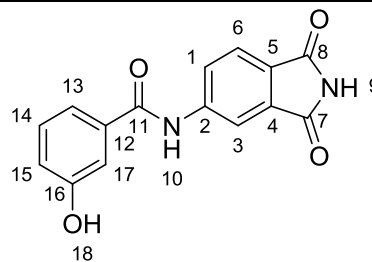
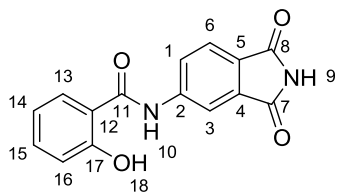
Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	8,15 (dd, $J = 8,2; 1,6$ Hz, 1H)	124,46
2	-	134,31
3	8,34 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H)	113,74
4	-	126,88
5	-	133,99
6	7,83 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,0
7	-	169,09
8	-	168,93
9	11,26 (s, 1H)	-
10	10,80 (s, 1H)	-
11	-	166,28
12	-	144,71
13	7,99 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H)	127,91
14	7,57 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H)	128,58
15	7,64 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H)	132,17
16	7,57 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H)	128,58
17	7,99 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H)	127,91

Tabela 10 – Deslocamentos químicos dos compostos finais II-IV

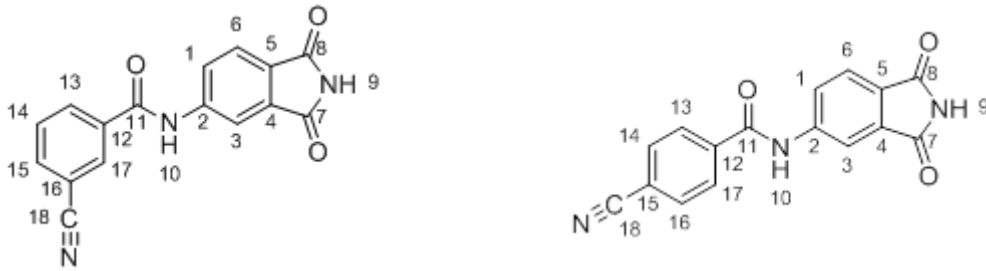


Posição	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	8,04 (dd, $J = 8,1; 1,7$ Hz, 1H)	124,06	8,13 (dd, $J = 8,2; 1,9$ Hz, 1H)	124,57	8,13 (dd, $J = 8,2; 1,9$ Hz, 1H)	124,45
2	-	143,96	-	127,05	-	126,91
3	8,29 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H)	113,99	8,31 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H)	113,85	8,32 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H)	113,72
4	-	126,13	-	133,98	-	133,99
5	-	131,42	-	144,6	-	144,65
6	7,82 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H)	124,83	7,83 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124	7,82 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,01
7	-	169,04	-	169,05	-	169,01
8	-	168,9	-	168,9	-	168,92
9	11,27 (s, 1H)	-	11,27 (s, 1H)	-	11,26 (s, 1H)	-
10	10,80 (s, 1H)	-	10,82 (s, 1H)	-	10,81 (s, 1H)	-
11	-	165,65	-	165,18	-	165,51
12	-	118,66	-	135,6	-	131,83
13	7,92 (dd, $J = 7,8; 1,9$ Hz, 1H)	129,56	7,91-7,88 (m, 1H)	125,34	8,04 (dd, $J = 8,8$ Hz, 1H)	129,5
14	6,98 (t, $J = 7,7; 7,7$ Hz, 1H)	119,29	7,62 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H)	129,8	7,33 (dd, $J = 8,8$ Hz, 1H)	122,06
15	7,38 (t, $J = 7,7; 7,7$ Hz, 1H)	133,86	7,42 (ddd, $J = 8,1; 2,3; 0,9$ Hz, 1H)	125,81	-	153,33
16	7,02 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)	117,13	-	150,49	7,33 (dd, $J = 8,8$ Hz, 1H)	122,06
17	-	157,54	7,74 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H)	121,35	8,04 (dd, $J = 8,8$ Hz, 1H)	129,5
18	-	169,25	-	169,2	-	169,08
19	2,24 (s, 3H)	20,9	2,32 (s, 3H)	20,87	2,31 (s, 3H)	20,92

Tabela 11 – Deslocamentos químicos dos compostos finais V-VII



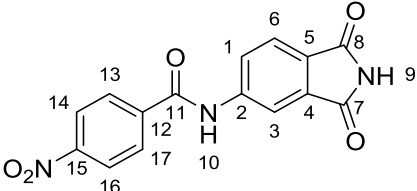
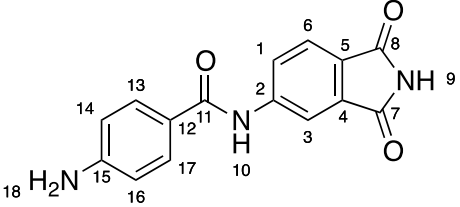
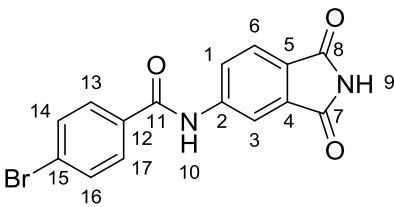
Posição	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	8,03 (dd, $J = 8,2; 1,8$ Hz, 1H)	124,07	8,13 (dd, $J = 8,2; 1,9$ Hz, 1H)	124,43	8,12 (dd, $J = 8,2; 1,9$ Hz, 1H)	124,66
2	-	143,99	-	135,71	-	145,09
3	8,29 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H)	114,01	8,32 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H)	113,72	8,31 (d, $J = 1,7$ Hz; 1H)	113,6
4	-	127,13	-	126,81	-	126,46
5	-	133,81	-	133,98	-	133,98
6	7,82 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,84	7,81 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124	7,79 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,25
7	-	169,06	-	169,11	-	169,16
8	-	168,92	-	168,94	-	168,98
9	11,27	-	11,24 (s, 1H)	-	11,22 (s, 1H)	-
10	10,84	-	10,71 (s, 1H)	-	10,52 (s, 1H)	-
11	-	166,67	-	166,28	-	165,72
12	-	118,65	-	144,75	-	123,93
13	7,88 (dd, $J = 7,8; 1,5$ Hz, 1H)	129,58	7,42-7,40 (m, 1H)	129,65	7,89 (dd, $J = 8,7$ Hz, 1H)	130,1
14	7,0 – 6,96 (m, 1H)	119,26	7,37-7,34 (m, 1H)	114,67	6,89 (dd, $J = 8,7$ Hz, 1H)	115,11
15	7,45 (m, 1H)	134,08	7,01 (ddd, $J = 8,0; 2,5; 1,0$ Hz, 1H)	119,1	-	161,12
16	7,01 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H)	117,18	-	157,48	6,89 (dd, $J = 8,7$ Hz, 1H)	115,11
17	-	157,64	7,37-7,34 (m, 1H)	118,43	7,89 (dd, $J = 8,7$ Hz, 1H)	130,1
18	nd	-	9,84 (s, 1H)	-	10,23 (s, 1H)	-

**Tabela 12** – Deslocamentos químicos dos compostos finais VIII e IX


Posição	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	8,10-8,12 (m, 1H)	124,59	8,11 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	124,66
2	-	134,0	-	144,22
3	8,3 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H)	113,82	8,30 (d, $J = 1,6$ , 1H)	113,88
4	-	127,27	-	127,31
5	-	144,24	-	133,99
6	7,84 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,06	7,84 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,05
7	-	169,01	-	169
8	-	168,87	-	168,86
9	11,29 (s, 1H)	-	11,28 (s, 1H)	-
10	10,93 (s, 1H)	-	10,99 (s, 1H)	-
11	-	164,39	-	164,9
12	-	135,32	-	138,06
13	8,27 (ddd, $J = 1,2; 1,7; 7,9$ Hz, 1H)	132,74	8,13 (dd, $J = 8,6$ Hz, 1H)	128,76
14	8,10-8,12 (m, 1H)	135,49	8,06 (dd, $J = 8,6$ , 1H)	132,61
15	7,79 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H)	130,01	-	114,32
16	-	111,66	8,06 (dd, $J = 8,6$ , 1H)	132,61
17	8,45 (t, $J = 1,4$ Hz, 1H)	131,53	8,13 (dd, $J = 8,6$ , 1H)	128,76
18	-	118,26	-	118,27

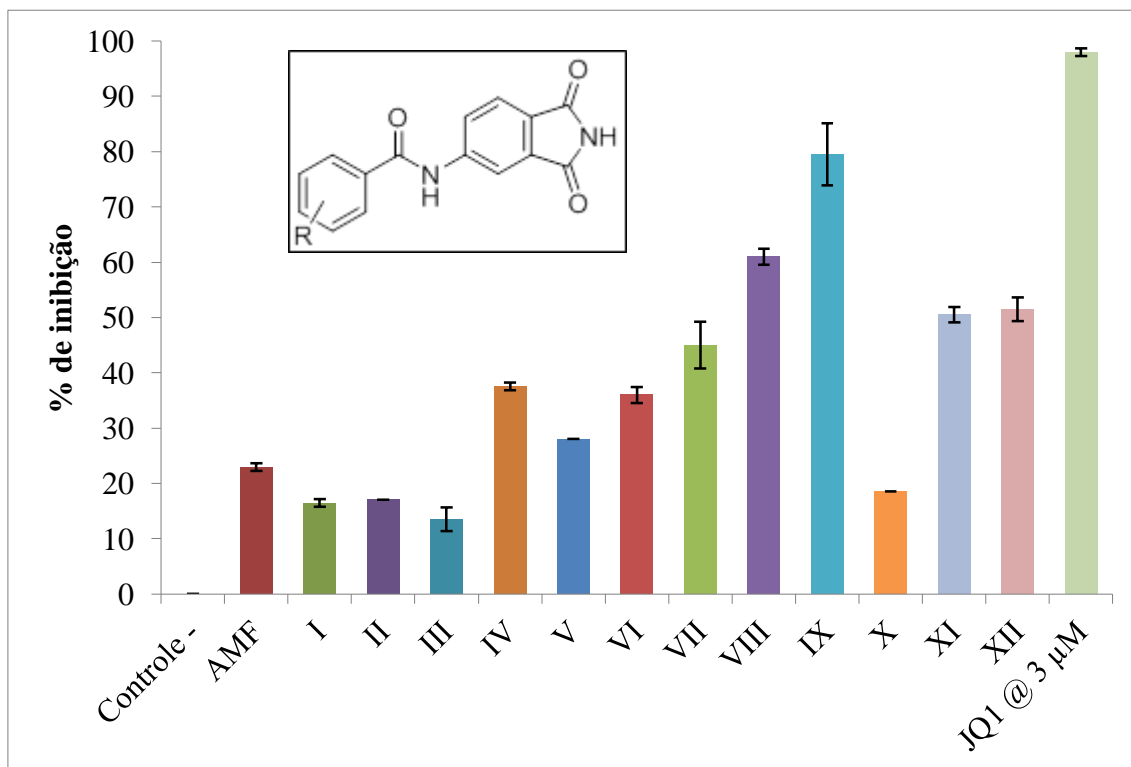
Fonte: dados da pesquisa

Tabela 13 – Deslocamentos químicos dos compostos finais X-XII

Posição						
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	8,13 (dd, $J = 8,2; 1,9$ , 1H)	124,78	8,09 (dd, $J = 8,2; 1,8$ , 1H)	124,35	8,11 (dd, $J = 8,2; 1,8$ Hz, 1H)	124,99
2	-	144,21	-	120,25	-	127,48
3	8,32 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	113,98	8,3 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	113,71	8,3 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H)	114,25
4	-	127,43	-	134,12	-	126,43
5	-	134,04	-	145,61	-	133,76
6	7,86 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,11	7,77 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,11	7,82 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H)	124,44
7	-	169,06	-	169,46	-	169,49
8	-	168,92	-	169,28	-	169,34
9	nd	-	11,20 (s)	-	11,26 (s, 1H)	-
10	nd	-	10,32 (s)	-	10,83 (s, 1H)	-
11	-	164,71	-	166,12	-	165,72
12	-	149,49	-	126,23	-	144,91
13	8,22 (dd, $J = 8,9$ Hz, 1H)	129,51	7,75 (dd, $J = 9,0$ Hz, 1H)	129,97	7,93 (dd, $J = 8,6$ Hz, 1H)	130,46
14	8,41 (dd, $J = 8,9$ Hz, 1H)	123,74	6,63 (dd, $J = 9,0$ Hz, 1H)	112,87	7,78 (dd, $J = 8,6$ Hz, 1H)	132,03
15	-	139,96	-	152,95	-	134,41
16	8,41 (dd, $J = 8,9$ Hz, 1H)	123,74	6,63 (dd, $J = 9,0$ Hz, 1H)	112,87	7,78 (dd, $J = 8,6$ Hz, 1H)	132,03
17	8,22 (dd, $J = 8,9$ Hz, 1H)	129,51	7,75 (dd, $J = 9,0$ Hz, 1H)	129,97	7,93 (dd, $J = 8,6$ Hz, 1H)	130,46
18	-	-	5,88 (s)	-	-	-

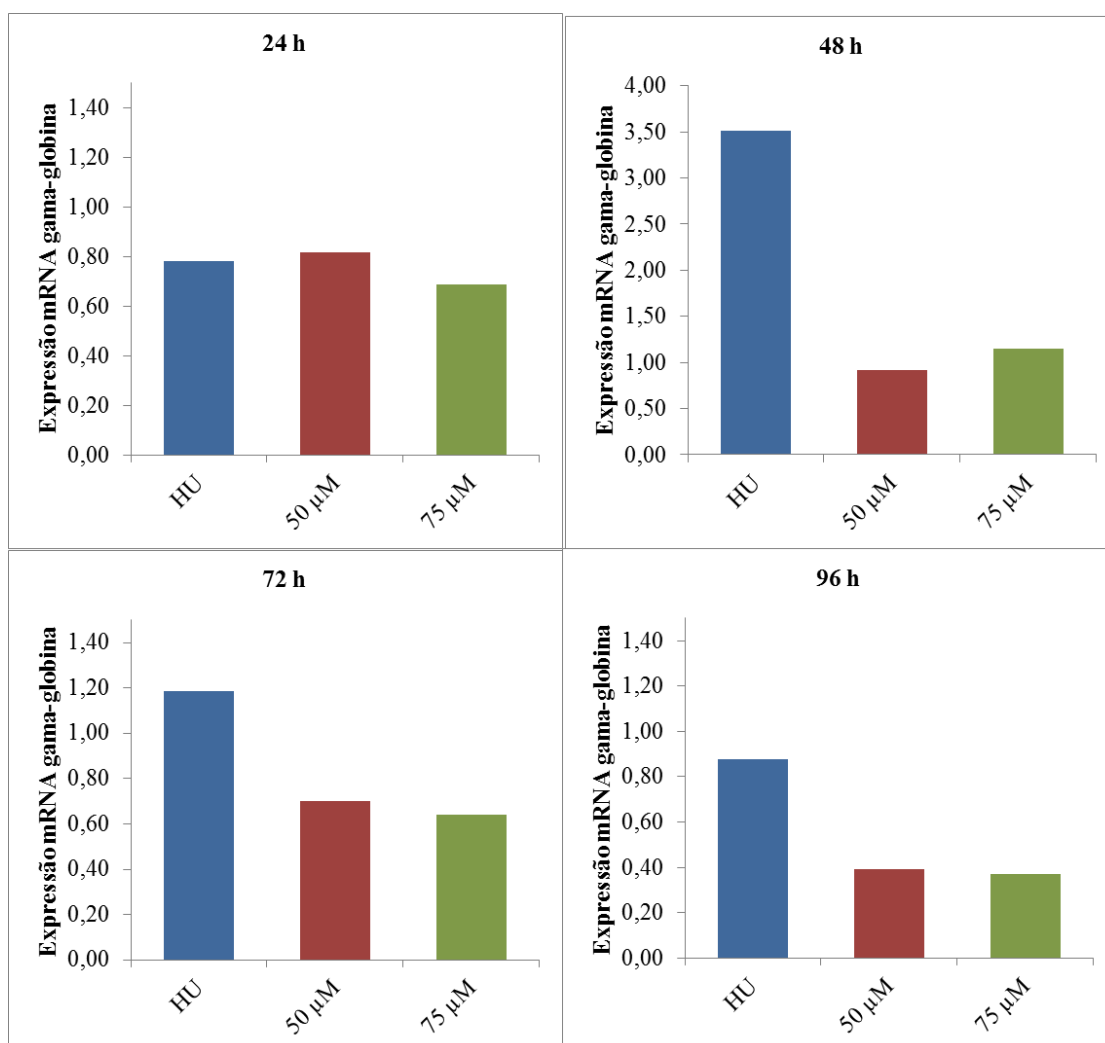
### 5.3 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA BRD-3 (BD1)

A Figura 10 apresenta o gráfico contendo a porcentagem de inibição da atividade enzimática do intermediário 4-aminoftalimida (AMF) e dos compostos finais I-XII frente ao BRD-3 (BD1).



**Figura 10** – Gráfico da porcentagem do ensaio de inibição enzimática dos compostos testados a 100 µM contra BRD-3 (BD-1); R= *o*-AcO (II); *m*-AcO (III); *p*-AcO (IV); *o*-OH (V); *m*-OH (VI); *p*-OH (VII); *m*-CN (VIII); *p*-CN (IX); *p*-NO<sub>2</sub> (X); *p*-NH<sub>2</sub> (XI); *p*-Br (XII).

## 5.4 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE GAMA-GLOBINA EM CÉLULAS K562



**Figura 11** – Expressão de gama-globina gênica induzida pelo composto IX (n=1), utilizando células K562 como modelo, em diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72, 96 horas) e duas concentrações diferentes (50 e 75 μM). A hidroxiuréia (HU) foi usada no teste na concentração de 100 μM.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 MODELAGEM MOLECULAR

O programa *Glide* analisa as interações favoráveis entre um ou mais ligantes e/ou entre alvo-ligante, alvo-alvo entre outros. A posição e a orientação do ligante em relação ao receptor, bem como a conformação do receptor no docking flexível, são fatores que interferem na pose do ligante. As poses dos ligantes geradas pelo programa passam por uma série de filtros hierárquicos que avaliam a interação do ligante com o receptor (FRIESNER et al., 2004).

Os filtros iniciais testam o ajuste espacial do ligante ao sítio ativo definido e examinam por complementariedade as interações ligante-receptor baseado no *grid*, utilizando a função empírica *ChemScore*. Este algoritmo reconhece ligações favoráveis de hidrogênio, hidrofóbicas, iônicas, e penaliza os efeitos estéricos. Neste estágio, é realizada uma pontuação minuciosa tendo em vista que a pontuação real de cada átomo, não depende apenas de sua posição em relação ao receptor; mas também, da melhor pontuação possível que poderia obter ao mover  $\pm 1 \text{ \AA}$  nos eixos x, y, ou z (HALGREN et al., 2004).

O *GlideScore* (GScore) é baseado no algoritmo *ChemScore* (FRIESNER et al., 2004), incluindo os efeitos estéricos, e pontua/penaliza algumas condições energéticas. O GScore é representado pela seguinte fórmula:

$$\mathbf{GScore} = \mathbf{0.05*vdW} + \mathbf{0.15*Coul} + \mathbf{Lipo} + \mathbf{Hbond} + \mathbf{Metal} + \mathbf{Rewards} + \mathbf{RotB} + \mathbf{Site}$$

Os seguintes termos são utilizados na fórmula: vdW (Energia van der Waals), Coul (Energia Coulomb), Lipo (Termo lipofílico), Hbound (ligação de hidrogênio), Metal (termo de ligação iônica), Rewards (recompensas), RotB (ligações rotativas), Site (interações polares no sítio ativo). Os componentes da fórmula do GScore estão descritos na **Tabela 14**.

A escolha da melhor estrutura ancorada para cada ligante é realizada utilizando um modelo de energia (*Glide E-model*) que combina a pontuação energética, a afinidade de ligação prevista pelo *Glide Score* e, nos casos em que utiliza-se o docking flexível, a energia de deformação interna para direcionar o algoritmo de busca conformacional. O programa também calcula uma pontuação de energia de interação de Coulomb-van der Waals (CvdW) que é utilizada para evitar interações de carga excessivamente recompensadoras à custa de interações dipolo e dipolo-dipolo (FRIESNER et al., 2006).

O *E-model* é a pontuação mais adequada para comparar a afinidade de ligação de diferentes ligantes quando comparado a energia de interação bruta de CvdW. Além disso, um outro score é utilizado: *docking score*. Para este *score*, soma-se ao *Glide Score*, as penalidades de estado do Epik quando ocorrem penalizações em que os

ligantes adotam estados de energia mais altas (incluindo aquelas onde os metais estão presentes) (FRIESNER et al., 2004, 2006; HALGREN et al., 2004).

**Tabela 14** – Componentes do *GlideScore*

<b>Componente</b>	<b>Descrição</b>
<b>vdW</b>	Energia van der Waals. Este termo é calculado com a redução de cargas iônicas em grupos com cargas formais, tais como: metais, carboxilatos, guanidinas.
<b>Coul</b>	Energia Coulomb. Assim como em vdW, este termo é calculado com a redução de cargas iônicas em grupos com cargas formais, tais como: metais, carboxilatos, guanidinas.
<b>Lipo</b>	Termo lipofílico. Atribui pontuações para interações hidrofóbicas favoráveis.
<b>HBond</b>	Ligação de hidrogênio. Atribui pesos diferentes em componentes que dependem do doador e/ou acceptor destas ligações serem neutros. Algumas situações em que um é neutro, e o outro é penalizado; ou ambos são penalizados.
<b>Metal</b>	Termo de ligação iônica. Apenas as interações com átomos aceitadores aniônicos ou altamente polares são levados em consideração.
<b>Rewards</b>	Recompensa e penalidades para várias situações. Grupos polares em posições internas, ligações de hidrogênio correlacionadas, torções de amidas, etc.
<b>RotB</b>	Penalidade por congelar ligações rotativas.
<b>Site</b>	Interações polares no sítio ativo. Átomos polares, mas não ligados ao hidrogênio, em uma região hidrofóbica são recompensados.

O grid foi validado utilizando o cálculo de RMSD, e o valor obtido foi de 1,58 Å, sendo o protocolo considerado de confiança (RMSD < 2 Å) (DASTMALCHI; HAMZEH-MIVEHROUD; SOKOUTI, 2016). De acordo com o resultado do estudo de docagem obtido e validado pelo colaborador no exterior, foram selecionados os derivados ftalimídicos (Tabela 1) que apresentaram melhor interação com o BRD-3.

Observou-se um padrão de interação entre o núcleo ftalimídico e o sítio ativo do BRD-3 para todas as moléculas. A principal interação ocorre entre o N-H da imida com o átomo de oxigênio amídico da asparagina-116. Este resíduo é considerado essencial para o reconhecimento da histona acetilada no bolsão do BRD-3, uma vez que ocorre a interação entre as duas porções amidícas: do resíduo e da histona acetilada (MARCHAND; CAFLISCH, 2015).

Várias moléculas de água permanecem conservadas nos sítios das famílias BET-BRD. A partir de estruturas cristalográficas destas enzimas, observa-se a interação dos inibidores triazolo-diazepínicos com o sítio ativo através de ligações de hidrogênio em uma rede envolvendo estas moléculas de água (MULLER; FILIPPAKOPOULOS; KNAPP, 2011). Interessantemente, no presente estudo observou-se que as carbonilas do núcleo ftalimídico interagem através desta rede de moléculas de água no sítio do BRD-3. A fim de ilustrar os dois padrões apresentados, a Figura 7 ilustra as interações observadas entre o composto I e o sítio ativo do BRD-3.

Além das interações com a asparagina-116 e as moléculas de água conservadas, observam-se outras três importantes interações podem ocorrer entre os compostos avaliados contra o sítio ativo do BRD-3: triptofano-57, glutamina-61 e prolina-58. Na

Tabela 2 encontram-se relacionados os compostos I-XV com as interações acima listadas.

O composto VII, que apresenta o anel aromático benzamida substituído na posição *para* com uma hidroxila, realiza *in silico* interações com a Gln-61 e Pro-58 (Figura 8). O grupamento hidroxila *para* substituído é responsável pela interação com a Gln-61 através de uma ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico do resíduo conservado (1,98 Å). A interação com a Pro-58 é realizada através de uma interação entre o hidrogênio amídico do composto com o átomo de oxigênio do ácido carboxílico (2,49 Å).

O mesmo padrão de interação é observado para o composto XI, em que possui uma amina *para*-substituída (Figura 9). A distância da ligação de hidrogênio com o resíduo Gln-61 é de 2,1 Å; e com o resíduo Pro-58 é de 2,14 Å.

## 6.2 SÍNTESE

### 6.2.1 Síntese dos intermediários

#### 6.2.1.1 Síntese do intermediário 4-aminoftalimida

Existem na literatura muitos métodos para a síntese de aminas aromáticas (BASU; BECKER; BANIK, 2000). Entre estes, destacam-se as reações de redução de grupo nitro-aromáticos na presença de paládio (BANIK et al., 2000). Para a obtenção do intermediário 4-aminoftalimida, optou-se por um método simples e econômico descrito por Ramadas & Srinivasan, utilizando ferro e cloreto de amônio (RAMADAS; SRINIVASAN, 1992).

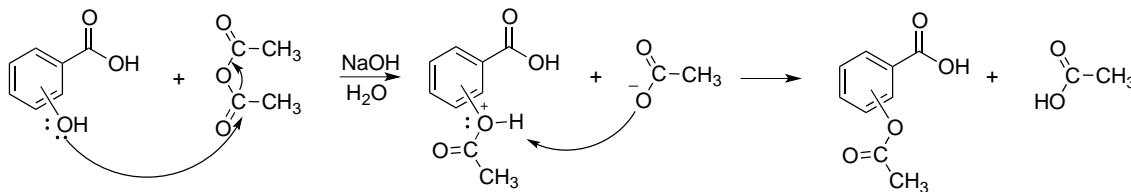
No espectro na região do infravermelho (**Figura 12**), podem ser observadas duas bandas de absorção em 3442,9 e 3358  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem às deformações axiais assimétricas e simétricas do N-H “livre”. Observa-se ainda a presença das deformações axiais assimétricas e simétricas das carbonilas do sistema imídico da ftalimida em 1761 e 1730,1  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 13) é possível observar um deslocamento químico na forma de um simpleto em  $\delta$  6,40, integrando para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios do grupo amina ligado ao carbono 2 do núcleo ftalimídico. Através deste único deslocamento, é possível sugerir que houve a formação da molécula pretendida. Ainda, é possível observar que os hidrogênios aromáticos  $\text{H}_1$  e  $\text{H}_3$  também se deslocaram na presença do grupo nitro, comparados com o grupo amino. Os deslocamentos químicos e as multiplicidades deste intermediário estão demonstrados na Tabela 4.

#### 6.2.1.2 Síntese dos intermediários ácido 3- e 4-acetoxibenzóico

A estratégia utilizada para a síntese dos intermediários ácido 3- e 4-acetoxibenzóico foi inicialmente a reação entre o ácido 3- e 4-hidroxibenzóico e o anidrido acético. O mecanismo proposto para esta reação está representado no Esquema 4. A reação de acetilação ocorre, inicialmente, através do ataque nucleofílico da hidroxila fenólica ao carbono carbonílico do anidrido acético, seguido da eliminação do ácido acético (sub produto da reação).

**Esquema 4** - Mecanismo proposto para a acetilação dos derivados do ácido hidroxibenzoico.



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido 3-acetoxibenzoico (Figura 14) é possível observar um deslocamento químico na forma de um simpleto em  $\delta$  2,29, integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao carbono 10. Através deste único deslocamento no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , é possível inferir que houve a formação da molécula desejada. Além disso, os quatro hidrogênios aromáticos podem ser observados em quatro deslocamentos diferentes: para o  $\text{H}_1$ , um deslocamento na forma de tripleto em  $\delta$  7,54; para o  $\text{H}_2$ , um multipletto  $\delta$  7,42-7,35; para o  $\text{H}_4$ , um singleto em  $\delta$  7,66; e por fim, para o  $\text{H}_6$  um dupletto em  $\delta$  7,83.

Para o outro intermediário ácido 4-acetoxibenzoico, também é possível observar um deslocamento químico na forma de um simpleto em  $\delta$  2,29, integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao carbono 10 (Figura 15). Ainda, observam-se dois deslocamentos em forma de dupletto integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  7,26 e  $\delta$  7,98 referentes, respectivamente, aos hidrogênios simétricos  $\text{H}_1$  e  $\text{H}_3$ ; e,  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_6$ .

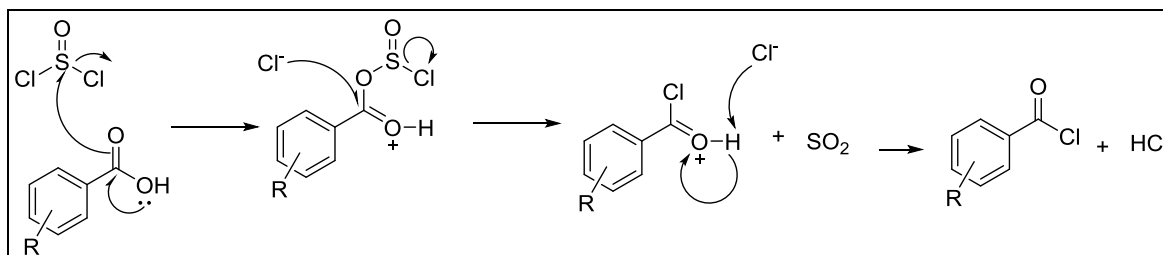
Os deslocamentos químicos e as multiplicidades destes intermediários estão demonstrados na Tabela 5.

### 6.2.2 Síntese dos compostos finais

A estratégia utilizada para a síntese dos compostos finais foi inicialmente a cloração dos derivados do ácido benzóico para que, posteriormente, fossem reagidos com o intermediário 4-aminofталimida para a formação das amidas.

O mecanismo proposto para a obtenção dos cloretos de acila está representado no Esquema 5. Inicialmente, ocorre um ataque nucleofílico entre o oxigênio da hidroxila do ácido carboxílico e o enxofre do sulfóxido, removendo um íon cloreto. Em seguida, ocorre a desprotonação, sendo o  $H^+$  liberado no meio. O íon cloreto realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico ocasionando na remoção de um bom grupo abandonador, e resultando no produto cloreto de acila.

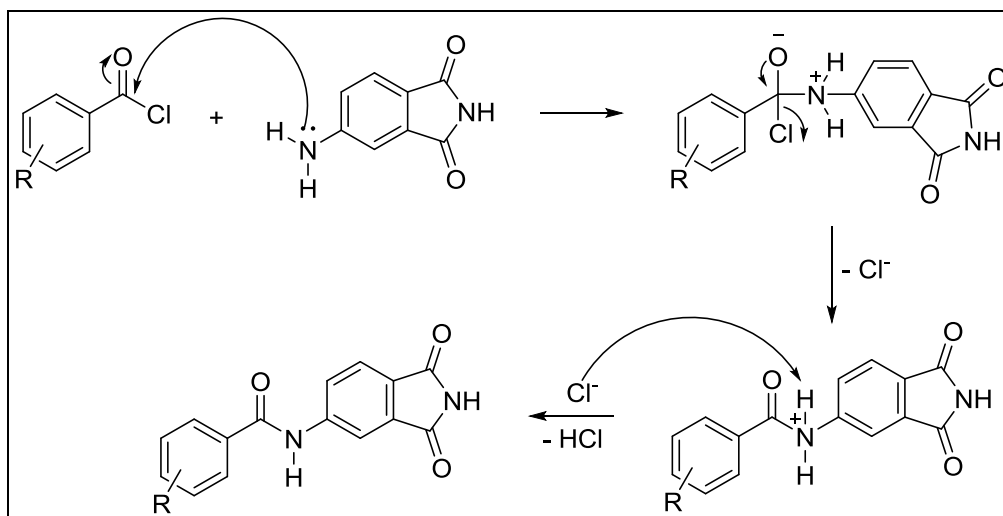
**Esquema 5** - Mecanismo proposto da cloração dos derivados do ácido benzoico com cloreto de tionila



Fonte: adaptado de (CLAYDEN et al., 2001)

A síntese para a formação da amida do produto final é realizada através de uma reação de substituição nucleofílica acílica. O mecanismo proposto para esta reação está ilustrado no Esquema 6. Inicialmente, ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons livres do nitrogênio ao carbono carbonílico hibridizado em  $sp^2$ , desfazendo a dupla ligação com o oxigênio. Ao reestabelecer a dupla ligação com o átomo de carbono, ocorre a remoção de um íon cloreto. Este mesmo íon, atuando como base, pode capturar um hidrogênio do nitrogênio amídico que está com carga positiva, formando o composto final planejado.

**Esquema 6** – Mecanismo proposto para a síntese dos compostos finais



Fonte: adaptado de (CLAYDEN et al., 2001)

6.2.2.1 Síntese do composto final *N*-(1,3-dioxoisoindolin-5-il) benzamida (I)

Inicialmente, foi obtido o cloreto de benzoíla através da reação entre o ácido benzoico e o cloreto de tionila. A reação foi acompanhada por CCD até observar consumo total do ácido benzoico. O cloreto de benzoíla foi então reagido com o intermediário 4-aminoftalimida através de uma reação de substituição nucleofílica acílica. A molécula foi caracterizada por IV, RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC e HMBC.

No espectro na região do infravermelho (Figura 16) podem ser observadas duas bandas de absorção em 1764,8 e 1728,2 cm<sup>-1</sup> que correspondem às deformações axiais assimétricas e simétricas das carbonilas do sistema imídico da ftalimida. Observa-se ainda a presença da deformação axial N-H da amida em 3209,5 cm<sup>-1</sup>.

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto final I (Figura 17) permitiu observar o simpleto da amida formada em δ 10,8 ppm integrando para um hidrogênio. Os hidrogênios do anel aromático ftalimídico H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>6</sub> apresentam-se bastante definidos com deslocamentos químicos em δ 8,15, δ 8,34 e δ 7,83, respectivamente. O duplete com integração para dois hidrogênios em δ 7,99 foi atribuído aos dois hidrogênios do anel aromático benzoico (H<sub>13</sub> e H<sub>17</sub>). Ainda, o duplo tripleto com integração para três hidrogênios em δ 7,61 foi atribuído aos três hidrogênios do outro anel aromático (H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub> e H<sub>16</sub>).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final I (Figura 18) observa-se o sinal  $\delta$  166,28 referente ao carbono carbonílico da amida formada ( $\text{C}_{11}$ ). Os carbonos carbonílicos da imida da ftalimida são observados em  $\delta$  169,09 e  $\delta$  168,93 referentes aos carbonos  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_8$  respectivamente.

Os deslocamentos químicos e as multiplicidades deste composto final estão demonstrados na Tabela 10.

#### 6.2.2.2 Síntese dos compostos finais 2-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato (II), 3-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato (III) e 4-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato (IV)

A síntese dos compostos finais II, III e IV consistiu na cloração do ácido acetilsalicílico, 3- e 4-acetoxibenzoico, respectivamente, com o cloreto de tionila. A reação foi acompanhada por CCD. O respectivo cloreto de acila foi então reagido com o intermediário 4-aminoftalimida através de uma reação de substituição nucleofílica acílica. A molécula foi caracterizada por IV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC. A Tabela 6 apresenta informações acerca do rendimento reacional e das informações químicas da molécula III e IV.

Nos espectro na região do infravermelho dos compostos III (Figura 23) e IV (Figura 28), podem ser observadas as deformações axiais assimétricas de  $\text{CH}_3$  do grupamento acetyl em 1490,9 e 1435  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. As bandas 1365,6 e 1367,5  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às deformações axiais simétricas de  $\text{CH}_3$  dos compostos III e IV, respectivamente. A deformação axial  $\text{C}(\text{=O})\text{-O}$  corresponde a banda 1242,1  $\text{cm}^{-1}$  para o composto III, e 1211,3  $\text{cm}^{-1}$  para o composto IV. As duas bandas de absorção em 1761 e 1735,9  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às deformações axiais assimétricas e simétricas das carbonilas do sistema imídico da ftalimida do composto III; para o composto IV, estas deformações estão representadas nas bandas 1757,1 e 1734  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos finais II, III e IV (Figura 21, Figura 24 e Figura 29) permitiu observar os simpletos das amidas formadas em  $\delta$  10,80, 10,82 e 10,81, respectivamente. Além disso, foi possível observar um simpleto integrando para três hidrogênios referentes aos hidrogênios da metila, com deslocamento em  $\delta$  2,24, 2,32 e 2,31 respectivamente. O hidrogênio ftalimídico  $\text{H}_1$  apresentou o mesmo deslocamento químico para os compostos III e IV em  $\delta$  8,13, integrando para um hidrogênio. Os outros dois hidrogênios ftalimídicos  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$  do composto III apresentaram deslocamentos  $\delta$  8,31 e  $\delta$  7,83, respectivamente. Os tripletos com deslocamento  $\delta$  7,62 e  $\delta$  7,74, integrando um hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos  $\text{H}_{14}$  e  $\text{H}_{17}$ , deste mesmo composto. Para o composto IV, foram observados deslocamentos em  $\delta$  8,32 e  $\delta$  7,82 para os dois hidrogênios ftalimídicos  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$ . Os duplos dupletos com deslocamentos em  $\delta$  8,04 e  $\delta$  7,33 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos simétricos  $\text{H}_{13}/\text{H}_{17}$  e  $\text{H}_{14}/\text{H}_{16}$  respectivamente.

Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos finais II, III e IV (Figura 22, Figura 25 e Figura 30) observam-se os sinais  $\delta$  165,65, 165,18 e 165,51 referentes ao carbono carbonílico da amida formada ( $\text{C}_{11}$ ) dos respectivos compostos. Os carbonos da metila dos compostos II, III e IV são observados em  $\delta$  20,90, 20,87 e 20,92, respectivamente. Os carbonos carbonílicos da imida da ftalimida são observados em  $\delta$  169,04 e  $\delta$  168,9 referentes aos carbonos  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_8$  respectivamente do composto II; e  $\delta$  169,05 e  $\delta$  168,9 referentes aos carbonos  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_8$  respectivamente do composto III; e  $\delta$  169,01 e  $\delta$  168,92 referentes aos carbonos  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_8$  respectivamente do composto IV.

Através do mapa de correlação heteronuclear HSQC dos compostos III (Figura 26), é possível observar a correlação direta entre os hidrogênios ftalimídicos  $\delta$  8,13,  $\delta$  8,31 e  $\delta$  7,83 com seus respectivos carbonos  $\delta$  124,57,  $\delta$  113,85 e  $\delta$  124,0. O mesmo é observado na Figura 31 para o composto IV, em que os hidrogênios  $\delta$  8,13,  $\delta$  8,32 e  $\delta$  7,82 correlacionam-se com os carbonos  $\delta$  124,45,  $\delta$  113,72 e  $\delta$  124,01.

Os deslocamentos químicos e as multiplicidades destes compostos finais estão demonstrados na Tabela 10.

#### 6.2.2.3 Síntese dos compostos finais *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-2-hidroxibenzamida (V), *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-3-hidroxibenzamida (VI) e *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-hidroxibenzamida (VII)

A síntese dos compostos finais V, VI e VII consistiu na hidrólise ácida do grupamento acetoxi dos compostos II, III e IV, respectivamente. Os compostos precipitaram no meio reacional e foram filtrados e caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC. A Tabela 6 apresenta informações acerca do rendimento reacional e das informações químicas da molécula VI e VII.

Nos espectro na região do infravermelho do compostos VI (Figura 35) e VII (Figura 40) observam-se as deformações axiais de O-H em ligação hidrogênio intermolecular em 3342,6 e 3217,2  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. As vibrações de deformação angular de O-H ocorrem em 1494,8 e 1373,3  $\text{cm}^{-1}$  para o composto VI; e, 1435 e 1325,1  $\text{cm}^{-1}$  para o composto VII. As duas bandas de absorção em 1780,3 e 1741,7  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às deformações axiais assimétricas e simétricas das carbonilas do sistema imídico da ftalimida do composto VI; para o composto VII, estas deformações estão representadas nas bandas 1764,8 e 1722,4  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos finais V, VI e VII (Figura 33, Figura 36, Figura 41) permitiu observar os simpletos das amidas formadas em  $\delta$  10,84, 10,71 e 10,52, respectivamente. Além disso, foi possível observar um singlete integrando para um hidrogênio referente ao hidrogênio da hidroxila, com deslocamento em  $\delta$  9,84 e  $\delta$  10,23 respectivamente para os compostos VI e VII. Os hidrogênios ftalimídicos  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$  do composto VI apresentaram deslocamentos  $\delta$  8,13,  $\delta$  8,32 e

7,81 respectivamente; para o composto VII estes hidrogênios apresentaram deslocamentos semelhantes em  $\delta$  8,12,  $\delta$  8,31 e 7,79. Para o composto VI, o multipletto com deslocamento  $\delta$  7,38 foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub> e H<sub>17</sub>. O duplo duplo dupletto com deslocamento em  $\delta$  7,01 foi atribuído ao hidrogênio aromático H<sub>15</sub> deste mesmo composto. Para o composto VII, o duplo dupletto com deslocamento em  $\delta$  7,89 foi atribuído aos hidrogênios aromáticos simétricos H<sub>13</sub> e H<sub>17</sub>; o duplo dupletto com deslocamento em  $\delta$  6,89 foi atribuído aos hidrogênios aromáticos simétricos H<sub>14</sub> e H<sub>16</sub>.

Nos espectros de RMN <sup>13</sup>C dos compostos finais V, VI e VII (Figura 34, Figura 37 e Figura 42), observam-se os sinais  $\delta$  166,67, 166,28 e 165,72 referentes ao carbono carbonílico da amida formada (C<sub>11</sub>) dos respectivos compostos. O carbono C16 do composto VI encontra-se mais desprotegido em relação ao composto III (grupo acetoxi) devido ao efeito eletrônico do oxigênio, com deslocamento  $\delta$  157,48. O carbono C15 do composto VII também encontra-se mais desprotegido em relação ao composto IV, pelo mesmo motivo com deslocamento  $\delta$  161,12. Os carbonos carbonílicos da imida da ftalimida são observados em  $\delta$  169,11 e  $\delta$  168,94 referentes aos carbonos C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub> respectivamente do composto VI; e  $\delta$  169,16 e  $\delta$  168,98 referentes aos carbonos C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub> respectivamente do composto VII.

Os carbonos C<sub>14</sub> e C<sub>17</sub> do composto VI foram distinguidos através do mapa de correlação HMBC (Figura 39). Observa-se que o carbono  $\delta$  114,67 correlaciona-se com os hidrogênios  $\delta$  7,01 (H<sub>15</sub>)  $\delta$  7,37-7,34 (H<sub>14</sub> e H<sub>17</sub>) e  $\delta$  9,84 (H<sub>18</sub>), sendo este atribuído ao carbono C<sub>14</sub>. O carbono  $\delta$  118,43 correlaciona-se com os hidrogênios  $\delta$  7,01 (H<sub>15</sub>) e  $\delta$  7,37-7,34 (H<sub>14</sub> e H<sub>17</sub>), sendo este atribuído ao carbono C<sub>17</sub>. Por fim, o carbono  $\delta$  129,65 foi atribuído ao carbono C<sub>13</sub> através da correlação com o hidrogênio do multipletto  $\delta$  7,42-7,40 no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 43)

Os deslocamentos químicos e as multiplicidades destes compostos finais estão demonstrados na Tabela 11.

#### 6.2.2.4 Síntese dos compostos 3-ciano-N-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida (VIII) e 4-ciano-N-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida (IX)

A síntese dos compostos finais VIII e IX consistiu na cloração do ácido 3- ou 4-cianobenzoico usando o cloreto de tionila. A reação foi acompanhada por CCD até observar consumo total do respectivo ácido cianobenzoico. O respectivo cloreto de acila, cloreto de 3- ou 4-cianobenzoila foi então reagido com o intermediário 4-aminofthalimida através de uma reação de substituição nucleofílica acílica. A molécula foi caracterizada por IV, RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC e HMBC. A Tabela 7 apresenta informações acerca do rendimento reacional e das informações químicas da molécula IX e X.

Nos espectro na região do infravermelho dos compostos VIII (Figura 45) e IX (Figura 49) observam-se as deformações axiais da ligação tripla referente à nitrila em  $2233,5\text{ cm}^{-1}$ . As duas bandas de absorção em  $1772,5$  e  $1749,4\text{ cm}^{-1}$  correspondem às deformações axiais assimétricas e simétricas das carbonilas do sistema imídico da ftalimida do composto VIII; para o composto IX, estas deformações estão representadas nas bandas  $1772,5$  e  $1747,5\text{ cm}^{-1}$ .

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos finais VIII e IX (Figura 46 e 51) permitiu observar os simpletos das amidas formadas em  $\delta 10,93$  e  $\delta 10,99$ , respectivamente. Os hidrogênios ftalimídicos  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$  do composto VIII apresentaram deslocamentos  $\delta 8,10$ - $8,12$ ,  $\delta 8,3$  e  $\delta 7,84$ , respectivamente. Os hidrogênios aromáticos  $\text{H}_{13}$ ,  $\text{H}_{14}$ ,  $\text{H}_{15}$  e  $\text{H}_{17}$  deste mesmo composto, apresentaram deslocamentos químicos em  $\delta 8,27$ ,  $\delta 8,10$ - $8,12$ ,  $\delta 7,79$  e  $\delta 8,45$  respectivamente. Para o composto IX, Os hidrogênios ftalimídicos  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$  apresentaram deslocamentos em  $\delta 8,11$ ,  $\delta 8,30$  e  $\delta 7,84$ , respectivamente. Os hidrogênios aromáticos simétricos  $\text{H}_{13}/\text{H}_{17}$  e  $\text{H}_{14}/\text{H}_{16}$ , correspondem ao duplo duplete com deslocamentos em  $\delta 8,13$  e  $\delta 8,06$ , respectivamente.

Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos finais VIII e IX (Figura 47 e 52), observam-se os sinais  $\delta 164,39$  e  $\delta 164,90$  referentes ao carbono carbonílico da amida formada ( $\text{C}_{11}$ ) dos respectivos compostos. O carbono  $\text{C}_{16}$  apresentou-se mais protegido devido ao efeito eletrônico do grupo nitrila, com deslocamento de  $\delta 111,66$  no composto VIII, e  $\delta 114,32$  no composto IX. Os carbonos carbonílicos da imida da ftalimida do composto VIII são observados em  $\delta 169,01$  e  $\delta 168,87$  referentes aos carbonos  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_8$ ; e  $\delta 169,00$  e  $\delta 168,86$  referentes aos carbonos  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_8$  respectivamente do composto IX.

Os deslocamentos químicos e as multiplicidades destes compostos finais estão demonstrados na Tabela 12.

#### 6.2.2.5 Síntese do *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-nitrobenzamida (X)

O cloreto 4-nitrobenzoíla foi obtido através da reação entre o ácido 4-bromobenzoico e o cloreto de tionila. A reação foi acompanhada por CCD até observar consumo total do ácido 4-nitrobenzoico. O cloreto 4-nitrobenzoico foi então reagido com o intermediário 4-aminofthalimida através de uma reação de substituição nucleofílica acílica. A molécula foi caracterizada por IV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC. A Tabela 8 apresenta informações acerca do rendimento reacional e das informações químicas da molécula X.

No espectro na região do infravermelho do composto X (Figura 55) observa-se a deformação axial  $(\text{N}=\text{O})_2$  assimétrica em  $1494,8\text{ cm}^{-1}$ , e simétrica em  $1328,9\text{ cm}^{-1}$ . A vibração da deformação axial C-N ( $\text{C}-\text{NO}_2$ ) ocorre em  $848,6\text{ cm}^{-1}$ . As duas bandas de absorção em  $1764,8$  e  $1718,5\text{ cm}^{-1}$  correspondem às deformações axiais assimétricas e simétricas das carbonilas do sistema imídico da ftalimida.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final X (Figura 56) permitiu observar os hidrogênios ftalimídicos  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$  apresentaram deslocamentos  $\delta$  8,13,  $\delta$  8,32 e  $\delta$  7,86, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos simétricos  $\text{H}_{13}/\text{H}_{17}$  e  $\text{H}_{14}/\text{H}_{16}$  apresentaram deslocamentos químicos em  $\delta$  8,22 e  $\delta$  8,41 respectivamente. Observaram-se os hidrogênios aromáticos simétricos  $\text{H}_{14}/\text{H}_{16}$  mais desprotegidos, devido ao efeito eletrônico do grupamento nitro.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final X (Figura 57), observa-se o sinal  $\delta$  164,71 referente ao carbono carbonílico da amida formada ( $\text{C}_{11}$ ). Os carbonos carbonílicos da imida da ftalimida são observados em  $\delta$  169,06 e  $\delta$  168,92 referentes aos carbonos  $\text{C}_7$  e  $\text{C}_8$  respectivamente.

Os deslocamentos químicos e as multiplicidades deste composto final estão demonstrados na Tabela 13.

#### 6.2.2.6 Síntese do 4-amino-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)benzamida (XI)

O composto final XI foi obtido através de uma reação de redução do grupamento nitro aromático do composto X, com ferro e cloreto de amônio. A reação foi acompanhada por CCD até observar o completo consumo do composto X. A molécula foi caracterizada por IV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC. A Tabela 8 apresenta informações acerca do rendimento reacional e das informações químicas da molécula XI.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final XI (Figura 60) permitiu observar os simpletos dos hidrogênios  $\text{H}_9$  e  $\text{H}_{10}$  das amidas formadas em  $\delta$  11,20 e  $\delta$  10,32, respectivamente. Os hidrogênios ftalimídicos  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_6$  do composto XI apresentaram deslocamentos  $\delta$  8,09,  $\delta$  8,3 e  $\delta$  7,77, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos simétricos  $\text{H}_{13}/\text{H}_{17}$  e  $\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$  correspondem aos duplo-dupletos com

deslocamentos químicos em  $\delta$  7,75 e  $\delta$  6,63 respectivamente. O hidrogênio amínico H<sub>18</sub> apresentou deslocamento químico em  $\delta$  5,88.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto final XI (Figura 61) observa-se o sinal  $\delta$  164,71 referente ao carbono carbonílico da amida formada (C<sub>11</sub>). Os carbonos carbonílicos da imida da ftalimida são observados em  $\delta$  169,06 e  $\delta$  168,92 referentes aos carbonos C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub> respectivamente.

Os deslocamentos químicos e as multiplicidades deste composto final estão demonstrados na Tabela 13.

#### 6.2.2.7 Síntese do 4-bromo-N-(1,3-dioxoisindolin-5-il)benzamida (XII)

Inicialmente, foi obtido o cloreto 4-bromobenzoíla através da reação entre o ácido 4-bromobenzoico e o cloreto de tionila. A reação foi acompanhada por CCD até observar consumo total do ácido 4-bromobenzoico. O cloreto 4-bromobenzoila foi então reagido com o intermediário 4-aminofthalimida através de uma reação de substituição nucleofílica acíclica. A molécula foi caracterizada por IV, RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC e HMBC. A Tabela 8 apresenta informações acerca do rendimento reacional e das informações químicas da molécula XII.

No espectro na região do infravermelho do composto XII (Figura 64) observa-se a deformação angular simétrica fora do plano C-H presente no grupamento CH<sub>2</sub>Br em 1323,1 cm<sup>-1</sup>. A vibração da deformação axial C-Br ocorre em 542 cm<sup>-1</sup>. As duas bandas de absorção em 1772,5 e 1714,7 cm<sup>-1</sup> correspondem às deformações axiais assimétricas e simétricas das carbonilas do sistema imídico da ftalimida.

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto final XII (Figura 65) permitiu observar os simpletos dos hidrogênios H<sub>9</sub> e H<sub>10</sub> das amidas formadas em  $\delta$  11,26 e 10,83, respectivamente. Observa-se a presença dos hidrogênios ftalimídicos H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>6</sub> com deslocamentos químicos em  $\delta$  8,11,  $\delta$  8,3 e  $\delta$  7,82, respectivamente. O duplo duplo com integração para dois hidrogênios em  $\delta$  7,93 foi atribuído aos dois hidrogênios simétricos do anel aromático (H<sub>13</sub> e H<sub>17</sub>). O outro duplo duplo com integração para dois hidrogênios foi atribuído aos dois hidrogênios simétricos do anel aromático (H<sub>14</sub> e H<sub>16</sub>) com deslocamento em  $\delta$  7,78, apresentando-se mais protegido devido ao efeito eletrônico do bromo.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto final XII (Figura 66) observa-se o sinal  $\delta$  165,72 referente ao carbono carbonílico da amida formada (C<sub>11</sub>). Os carbonos carbonílicos da imida da ftalimida são observados em  $\delta$  169,49 e  $\delta$  169,34 referentes aos carbonos C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub> respectivamente.

Os deslocamentos químicos e as multiplicidades deste composto final estão demonstrados na Tabela 13.

### 6.3 ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DE BRD-3 (BD1)

A inibição enzimática dos compostos planejados frente ao BRD3 (BD1) foi realizado pelo método TR-FRET. Os valores de inibição, testados a 100  $\mu\text{M}$ , obtidos dos doze compostos otimizados, assim como do fragmento 4-aminofalimida (AMF) estão apresentados no gráfico da Figura 10.

Com base nos resultados obtidos pelo teste de inibição enzimática, foi possível observar que oito dos doze compostos avaliados apresentaram porcentagem de inibição superior ao fragmento otimizado (AMF). Nota-se que, a presença de substituintes no anel aromático benzamida é importante para a inibição do BRD-3 (BD1).

Os substituintes do anel aromático benzamida na posição *para* (IV, VII e IX) demonstraram ser o melhor padrão de substituição em relação à posição *meta* (III, VI e VIII) e *orto* (II e V). Justifica-se o baixo valor de inibição apresentado pelo composto III devido ao impedimento estérico do grupamento acetil. Não foi possível determinar uma relação entre os efeitos eletrônicos dos substituintes com a atividade de inibição enzimática.

A substituição em *para* com uma amina (XI), demonstrou-se melhor do que o grupamento nitro nesta mesma posição (X). Nos estudos de modelagem molecular, observou-se a interação de um dos hidrogênios com o resíduo de glutamina-61, sendo este importante para a interação no sítio do BRD-3. Possivelmente este ganho na inibição, deve-se a interação adicional com este resíduo.

O composto IX substituído com um grupamento nitrila em *para* obteve o maior valor de inibição enzimática com 80%. Quando testado a uma concentração de 50  $\mu\text{M}$ , este mesmo composto obteve 42% de inibição em BRD-3.

### 6.4 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE GAMA-GLOBINA EM CÉLULAS K562

A linhagem celular K562 foi inicialmente isolada de um paciente com leucemia mielóide crônica, e desde então tem sido utilizada como modelo para estudos de diferenciação eritróide e regulação da expressão do gene de gama-globina. Esta linhagem possui um considerável grau de plasticidade, o qual permite sua diferenciação em células eritróides, quando submetida a diferentes agentes químicos, com produção de hemoglobina fetal (BIANCHI et al., 2001).

O composto IX apresentou-se como o mais promissor em relação aos demais testados no teste de inibição enzimática e, portanto, prosseguiu-se com este composto para a avaliação da indução de gama-globina utilizando como modelo a linhagem celular K562.

Após 24 horas de tratamento, o composto IX foi capaz de induzir aumento nos níveis de expressão gênica de gama-globina, quando comparado com os valores de indução pela hidroxiuréia no mesmo tempo de tratamento. A indução nos tempos 48, 72 e 96 horas não foram satisfatórios quando comparados com a hidroxiuréia. Apesar, deste aparente resultado promissor, cabe destacar que uma das limitações envolve o número de experimentos ( $n = 1$ ), sendo portanto, necessário maior repetição experimental destes dados a fim de confirmar o potencial do composto na indução da expressão gênica de gama-globina.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos até o momento, é possível concluir que:

- Dados *in silico*, sugerem que os derivados ftalimídicos interagem com o sítio ativo do BRD-3 (D1), sendo que os melhores compostos apresentaram valores de *docking score* entre  $-10,357$  kcal/mol e  $-7,152$  kcal/mol.
- Através dos estudos de modelagem molecular foram observadas interações entre os melhores compostos e os três resíduos adicionais do sítio ativo do BRD-3 (D1): triptofano-57, glutamina-61 e prolina-58.
- Foram obtidos doze compostos propostos a partir das metodologias desenvolvidas, e foram identificados e caracterizados por técnicas espectrométricas adequadas, com rendimentos reacionais entre 17 e 86%.
- Através do ensaio de inibição enzimática de BRD-3 (D1) foi possível identificar que os compostos sintetizados apresentaram atividade de inibição da proteína de até 80%.
- O composto IX na concentração de  $100 \mu\text{M}$  inibiu 80% da atividade enzimática.
- O composto IX parece aumentar os níveis de expressão gênica de gama-globina após 24 horas de tratamento em linhagem celular K562.

## 8 REFERÊNCIAS

- ADORNO, E. V. Hemoglobinopatias em recém-nascidos de Salvador, Bahia, Nordeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 292–298, 2005.
- BANIK, B. K. et al. Indium/Ammonium Chloride Mediated Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds: Practical Synthesis of 6-AminoChrysene. **Synthetic Communications**, v. 30, n. 20, p. 3745–3754, 2000.
- BASU, M. K.; BECKER, F. F.; BANIK, B. K. Ultrasound-promoted highly efficient reduction of aromatic nitro compounds to the aromatic amines by samarium/ammonium chloride. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n. 30, p. 5603–5606, 2000.
- BLAKE, K. G. et al. Clinical Factors Associated with Morbidity and Mortality in Patients Admitted with Sickle Cell Disease. **West Indian Medical Journal**, v. 63, n. 7, p. 101–104, 2015.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 762–767, 1997.
- CARR, B. I. et al. The tumorigenicity of 5-azacytidine in the male Fischer rat. **Carcinogenesis**, v. 5, n. 12, p. 1583–1590, 1984.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Sickle Cell Disease**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/data.html>>. Acesso em: 2 set. 2017.
- CERQUEIRA, N. M. F. S. A. et al. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 582, n. June, p. 56–67, 2015.
- CHAND, A. R. et al. Are There True Non-Responders to Hydroxyurea in Sickle Cell Disease? a Multiparameter Analysis. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 4073, 2014.
- CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. 1ed. ed. New York: Oxford University Press, 2001.
- CONRAN, N. et al. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br. J. Haematol.**, v. 124, p. 547–554, 2004.
- CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **British Journal of Haematology**, v. 87, n. 3, p. 592–597, 1994.
- DASTMALCHI, S.; HAMZEH-MIVEHROUD, M.; SOKOUTI, B. **Applied Case Studies and Solutions in Molecular Docking-Based Drug Design**. Hershey, PA: Medical Information

Science Reference, 2016.

DOS SANTOS, J. L. . et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. Part II: furoxan derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7583–7592, 2012.

DOS SANTOS, J. L. .; LANARO, C. .; CHIN, C. M. Advances in sickle cell disease treatment: from drug discovery until the patient monitoring. **Cardiovascular Hematological Agents Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 113–127, 2011.

DUITS, A. J. . et al. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clinical Immunology Immunopathology**, v. 81, n. 1, p. 96–98, 1996.

FIGUEIREDO, J. O. **Morbidade e mortalidade por doença falciforme em Salvador, Bahia.** [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2016.

FILIPPAKOPOULOS, P. et al. Crystal Structure of the first bromodomain of human BRD3 in complex with the inhibitor JQ1. **To be Published**, [s.d.].

FRIESNER, R. A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **J. Med. Chem**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 2004.

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

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. DA S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51–56, 2003.

HALGREN, T. A. et al. Glide : A New Approach for Rapid , Accurate Docking and Scoring . 2 . Enrichment Factors in Database Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1750–1759, 2004.

INGLIS, J. J. et al. The differential contribution of tumor necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. **Arthritis Research Therapy**, v. 7, n. 4, p. R807–R816, 2005.

KUTLAR, A. et al. A Phase 1/2 Trial of HQK-1001, an Oral Fetal Globin Inducer, in Sickle Cell Disease. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 11, p. 1017–1021, 2012.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and

- leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 235–242, 2009.
- LI, H. . et al. Development of phenotypic screening assays for  $\gamma$ -globin induction using primary human bone marrow day 7 erythroid progenitor cells. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 18, n. 10, p. 1212–1222, 2013.
- LOUREIRO, M. .; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por Doença Falciforme no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 39, n. 6, p. 943–949, 2005.
- MANKIDY, R. . et al. Short-chain fatty acids induce gamma-globin Complex, gene expression by displacement of a HDAC3-NCoR repressor. **Blood**, v. 108, p. 3179–3186, 2006.
- MARCHAND, J. R.; CAFLISCH, A. Binding Mode of Acetylated Histones to Bromodomains: Variations on a Common Motif. **ChemMedChem**, v. 10, n. 8, p. 1327–1333, 2015.
- MELO, T. R. F. .; CHIN, C. M. .; DOS SANTOS, J. L. What are the most promising emerging therapies for sickle cell disease? Future Medicine Chemistryo Title. **Future Medicine Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 979–982, 2014.
- MULLER, S.; FILIPPAKOPOULOS, P.; KNAPP, S. Bromodomains as therapeutic targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. September, p. e29, 2011.
- OLIVIERI, N. F. . et al. Thalassemia Clinical Research Network. A pilot study of subcutaneous decitabine in  $\beta$ -thalassemia intermedia. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2708–2711, 2011.
- PACE, B. S. .; ZEIN, S. Understanding mechanisms of gamma-globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 7, p. 1727–1737, 2006.
- PDB. **Protein Data Bank**. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/pdb/>>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- RAMADAS, K.; SRINIVASAN, N. Iron-Ammonium Chloride - A Convenient and Inexpensive Reductant. **Synthetic Communications**, v. 22, n. 22, p. 3189–3195, 1992.
- REES, D. C. .; WILLIAMS, T. N. .; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.
- RONZONI, L. . et al. Modulation of gamma globin genes expression by histone deacetylase inhibitors: an in vitro study. **British Journal of Haematology**, v. 165, n. 5, p. 714–721, 2014.

RUIZ, M. A. . et al. Hydroxymethylcytosine and demethylation of the  $\gamma$ -globin gene promoter during erythroid differentiation. **Epigenetics**, v. 10, n. 5, p. 397–407, 2015.

SAFO, M. K. . et al. Structural basis for the potent antisickling effect of a novel class of five-membered heterocyclic aldehydic compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 4665–4676, 2004.

SALVADOR (BAHIA). PREFEITURA MUNICIPAL DE SALVADOR. SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. **II Diagnóstico da população negra de Salvador 2005-2012**. Salvador, BA: Secretaria de Saúde, 2015.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2013.

SANKARAN, V. G.; WEISS, M. J. Anemia : Progress in molecular mechanisms and therapy. **Nature Medicine**, v. 21, n. 3, p. 221–230, 2015.

SANTOS, J. L.; CHUNG, M. C. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 783–790, 2012.

SAUNTHARARAJAH, Y. . et al. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels , red cell adhesion , and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. **Hemoglobin**, v. 102, n. 12, p. 3865–3870, 2003.

SCHRÖDINGER. **Maestro** New York, NY Schrödinger, LLC, 2017a.

SCHRÖDINGER. **Glide** New York, NY Schrödinger, LLC, 2017b.

SCHRÖDINGER. **LigPrep** New York, NY Schrödinger, LLC, 2017c.

SIMÕES, B. P. I. . et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 46–53, 2010.

SINGH, P. C.; BALLAS, S. K. Emerging drugs for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 20, n. 1, p. 47–61, 2015.

STEINBERG, M. . Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharmacology Science**, v. 27, p. 204–210, 2006.

VICHINSKY, E. Emerging “A” therapies in hemoglobinopathies: agonists, antagonists, antioxidants, and arginine. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2012, p. 271–5,

2012.

WARE, R. E. Hydroxycarbamide: clinical aspects. **Comptes Rendus Biologies**, v. 336, n. 3, p. 177–182, 2013.

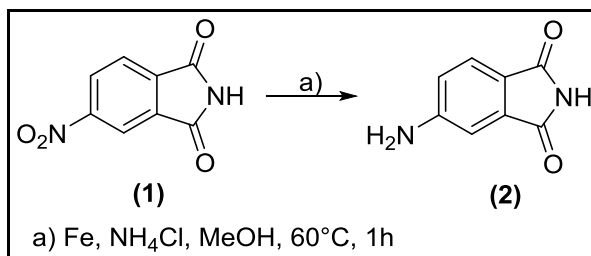
WUN, T. . et al. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 129, n. 5, p. 507–516, 1997.

ZEIN, S. . et al. Identification of fetal hemoglobin-inducing agents using the human leukemia KU812 cell line. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 11, p. 1385–1394, 2010.

## 9 APÊNDICE

### 9.1 Obtenção do intermediário 4-aminoftalimida

**Esquema 7** – Etapa sintética para obtenção do intermediário 4-aminoftalimida



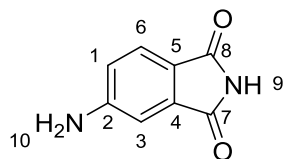
Fonte: próprio autor

#### *Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL, adicionou-se 87,1 mg de ferro (1,55 mmol) e a solução de cloreto de amônio (140 mg, 2,61 mmol em 6 mL de água destilada). Separadamente, foi preparada uma solução metanólica (1,7 mL) com o 4-nitroftalimida. Posteriormente, esta solução foi adicionada ao meio reacional. A reação foi mantida sob agitação e refluxo 60°C por 1 hora.

Após esse tempo, a mistura reacional foi filtrada em Celite<sup>®</sup> (*Terra diatomacea*) com metanol. Em seguida, o metanol foi retirado sob pressão reduzida, e o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada. O intermediário 4-aminoftalimida foi obtido como um sólido amarelo, com faixa de fusão entre 289-291°C e rendimento de 65%.

*Caracterização estrutural:*

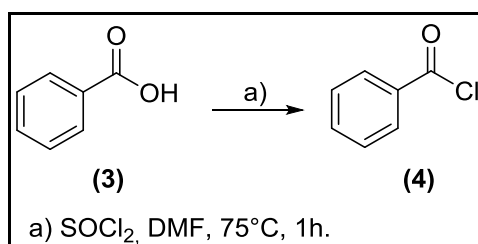


**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3442,9 ( $\nu_a \text{NH}_2$ ); 3358 ( $\nu_s \text{NH}_2$ ); 3238,4 ( $\nu \text{N-H}_{\text{amida}}$ ); 1761 e 1730,1 ( $\nu \text{C=O imida}$ ); 1614, 1587 e 1506 ( $\nu \text{C=C}_{\text{aromático}}$ ); 1388,7 ( $\nu \text{C-N}_{\text{aromático}}$ ); 748,3 ( $\delta \text{C-N imida}$ ); 643,3 ( $\delta_s \text{NH}_2$ ).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz; DMSO-*d*6)  $\delta$**  10.72 (s, 1H), 7.43 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz, 1H), 6.40 (s, 3H) ppm.

9.2 Obtenção do intermediário cloreto de benzoíla

**Esquema 8** – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto de benzoíla



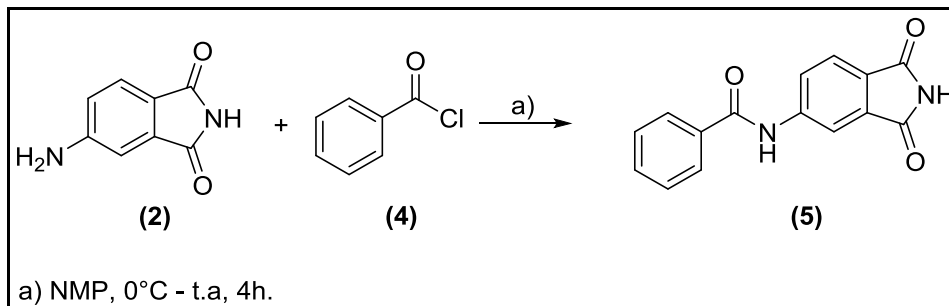
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados 100 mg de ácido benzóico (0,81 mmol), 1 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 hora. Ao término da reação, o cloreto de tionila foi retirado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido de cor branca. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

### 9.3 Obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida

**Esquema 9** – Etapa sintética para obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida



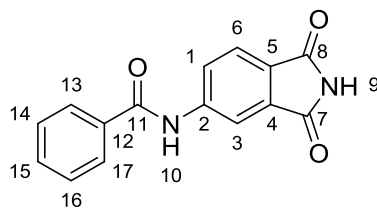
Fonte: próprio autor

#### *Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 2 mL de *N*-metil-2-pirrolidona e 131,3 mg do intermediário 4-aminofthalimida (0,81 mmol) em banho de gelo e agitação constante. Solubilizou-se o cloreto de benzoila (115,1 mg; 0,81 mmol) em 1 mL de diclorometano anidro, e foi adicionado ao balão gota a gota. A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 4 horas.

Para o isolamento, adicionou-se 30 mL de água destilada gelada, e o precipitado foi filtrado a vácuo para a obtenção de um sólido de cor branca, com faixa de fusão entre 314-318°C e rendimento de 42%.

#### *Caracterização estrutural:*



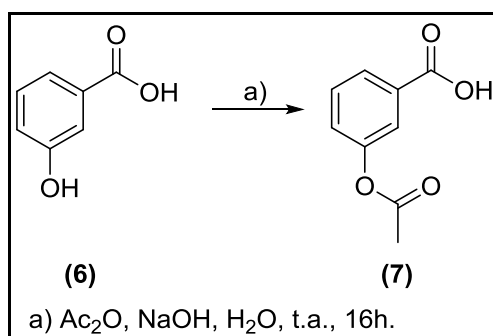
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3209,5 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 1764,8 e 1728,2 ( $\nu$  C=O imida); 1666, 1614 e 1541 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 746,4 ( $\delta$  C-N imida).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  11.26 (s, 1H), 10.79 (s, 1H), 8.33 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 8.14 (dd,  $J = 8.2, 1.6$  Hz, 1H), 7.98 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.82 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.64 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.57 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H). ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.09, 168.93, 166.28, 144.71, 134.31, 133.99, 132.17, 128.58, 127.91, 126.88, 124.46, 124.00, 113.74 ppm.

#### 9.4 Obtenção do intermediário ácido 3-acetoxibenzóico

**Esquema 10** - Etapa sintética para obtenção do intermediário ácido 3-acetoxibenzóico



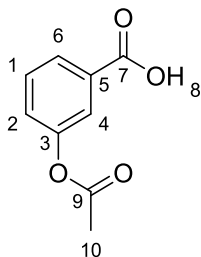
Fonte: próprio autor

#### *Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 1,5 de água destilada, 115,2 mg de hidróxido de sódio (2,88 mmol) e 200 mg de ácido 3-hidroxibenzóico (1,44 mmol) em banho de gelo. Após 10 minutos, adicionou-se 315  $\mu\text{L}$  de anidrido acético (3,33 mmol). A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 16 horas.

Para o isolamento, o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada para a obtenção de um sólido de cor branca, com faixa de fusão entre 131-134°C e rendimento de 65%.

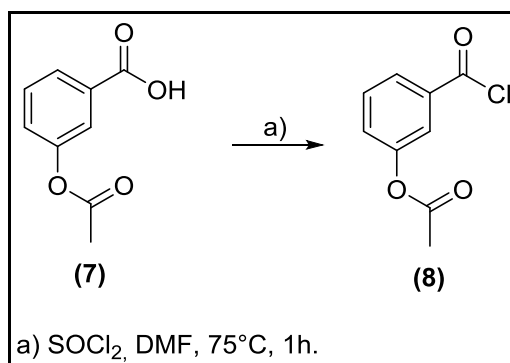
*Caracterização estrutural:*



**RMN <sup>1</sup>H NMR (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 13.21 (s, 1H), 7.83 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.54 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.42 – 7.35 (m, 1H) ppm.

10.5 Obtenção do intermediário cloreto 3-acetoxibenzoíla

**Esquema 11** – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 3-acetoxibenzoíla



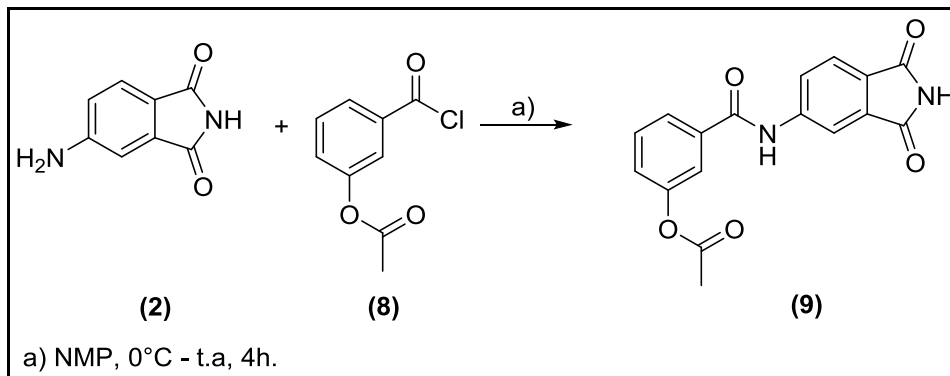
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados 100 mg de ácido 3-acetoxibenzoíco (0,55 mmol), 1 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 hora. Ao término da reação, o cloreto de tionila foi retirado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido amarelo. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

## 9.6 Obtenção do composto 3-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato

**Esquema 12** - Etapa sintética para obtenção do composto 3-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato



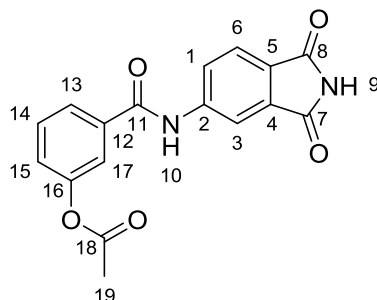
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 2 mL de *N*-metil-2-pirrolidona e 84,8 mg do intermediário 4-aminofalimida (0,55 mmol) em banho de gelo e agitação constante. Solubilizou-se o cloreto 3-acetoxibenzoíla (110 mg; 0,55 mmol) em 1 mL de diclorometano anidro, e foi adicionado ao balão gota a gota. A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 4 horas.

Para o isolamento, foram adicionados 30 mL de acetato de etila, e a fase orgânica foi extraída com água destilada (3 x 15 mL). O produto precipitou na fase orgânica e foi realizada uma filtração simples para a obtenção de um sólido de cor amarela, com faixa de fusão entre 201-206°C e rendimento de 82%.

Caracterização estrutural:



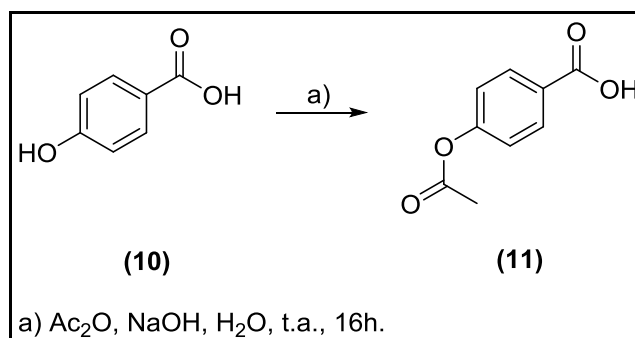
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3207,6 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 1770,6 ( $\nu$  C=O<sub>ester</sub>); 1761 e 1735,9 ( $\nu$  C=O<sub>imida</sub>); 1668, 1612 e 1585 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 1490,9 ( $\delta_a$  CH<sub>3</sub>); 1365,6 ( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>); 1242,1 ( $\nu$  C(=O)-O<sub>acetato</sub>); 1195,8 ( $\nu_a$  O-C=C); 746,4 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  11.27 (s, 1H), 10.82 (s, 1H), 8.31 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.13 (dd,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, 1H), 7.92 – 7.88 (m, 1H), 7.83 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.74 (t,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.62 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.42 (ddd,  $J = 8.1, 2.3, 0.9$  Hz, 1H), 2.32 (s, 3H) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.23, 169.05, 168.90, 150.49, 144.48, 135.67, 133.98, 129.80, 127.05, 125.81, 125.34, 124.57, 124.00, 121.35, 113.85, 20.87 ppm.

9.7 Obtenção do intermediário ácido 4-acetoxibenzóico

**Esquema 13** – Etapa sintética para obtenção do intermediário ácido 4-acetoxibenzóico

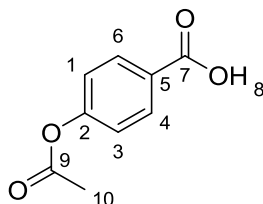


Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 1,5 de água destilada, 115,2 mg de hidróxido de sódio (2,88 mmol) e 200 mg de ácido 4-hidroxibenzoico (1,44 mmol) em banho de gelo. Após 10 minutos, adicionou-se 315  $\mu$ L de anidrido acético (3,33 mmol). A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 16 horas.

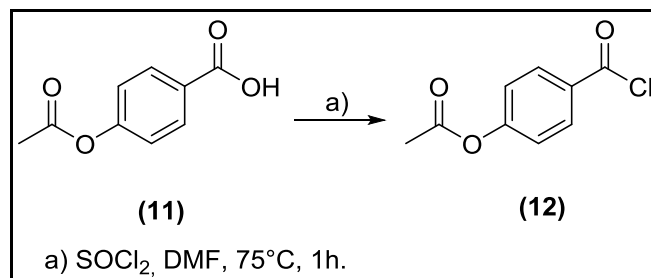
Para o isolamento, o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada para a obtenção de um sólido de cor branca, com faixa de fusão entre 190-194°C e rendimento de 82%.

*Caracterização estrutural:*

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  13.06 (s, 1H), 7.98 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.26 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 2.29 (s, 1H) ppm.

## 9.8 Obtenção do intermediário cloreto 4-acetoxibenzoíla

**Esquema 14** – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-acetoxibenzoíla



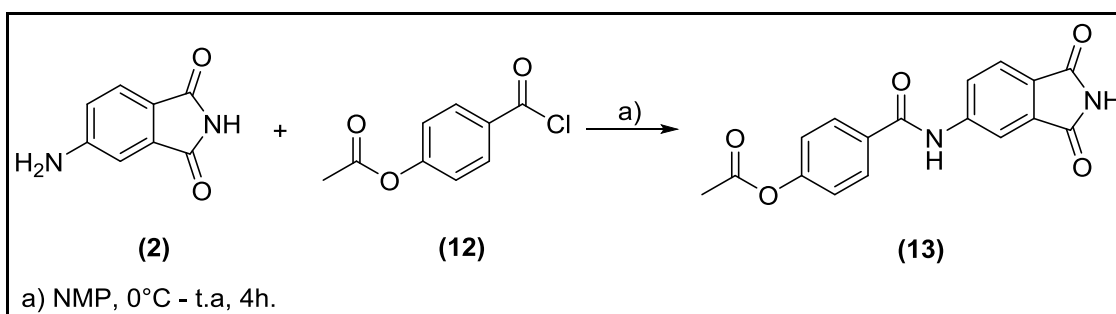
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados 100 mg de ácido 4-acetoxibenzóico (0,55 mmol), 1 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 hora. Ao término da reação, o cloreto de tionila foi retirado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido amarelo. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

## 9.9 Obtenção do composto 4-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato

**Esquema 15** – Etapa sintética para obtenção do composto 4-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato



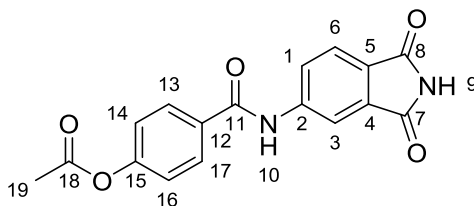
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 2 mL de *N*-metil-2-pirrolidona e 89,1 mg do intermediário 4-aminoftalimida (0,55 mmol) em banho de gelo e agitação constante. Solubilizou-se o cloreto 4-acetoxibenzoíla (110 mg; 0,55 mmol) em 1 mL de diclorometano anidro, e foi adicionado ao balão gota a gota. A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 4 horas.

Para o isolamento, foram adicionados 30 mL de acetato de etila, e a fase orgânica foi extraída com água destilada (3 x 15 mL). O produto precipitou na fase orgânica e foi realizada uma filtração simples para a obtenção de um sólido de cor amarela, com faixa de fusão entre 195-198°C e rendimento de 60%.

Caracterização estrutural:



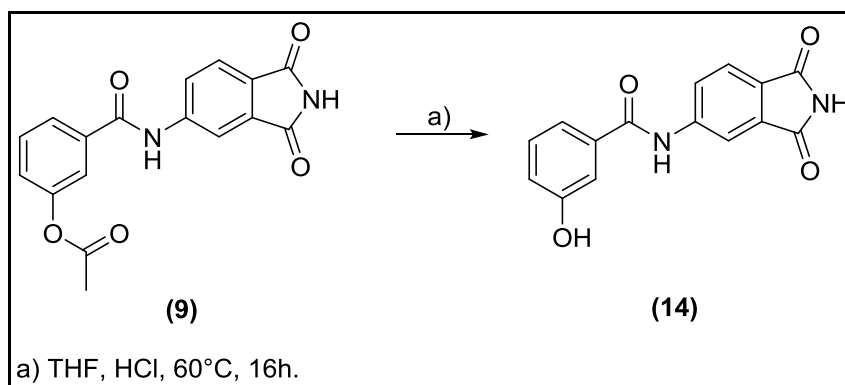
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3221,1 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 1770,6 ( $\nu$  C=O<sub>ester</sub>); 1757 e 1734 ( $\nu$  C=O<sub>imida</sub>); 1670, 1614 e 1546 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 1435 ( $\delta_a$  CH<sub>3</sub>); 1367,5 ( $\delta_s$  CH<sub>3</sub>); 1211,3 ( $\nu$  C(=O)-O<sub>acetato</sub>); 1193,9 ( $\nu_a$  O-C=C); 754,1 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  11.26 (s, 1H), 10.81 (s, 1H), 8.32 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 8.8 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.33 (dd, J = 8.8 Hz, 1H), 2.31 (s, 2H) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  169.08, 169.01, 168.92, 153.33, 144.65, 133.99, 131.83, 129.50, 126.91, 124.45, 124.01, 122.06, 113.72, 20.92 ppm.

9.10 Obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-3-hidroxibenzamida

**Esquema 16** – Etapa sintética para obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-3-hidroxibenzamida

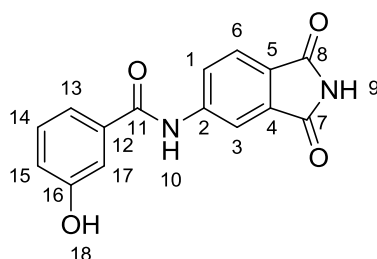


Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 5 mL de tetrahidrofurano e 100 mg do composto 3-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato. Após, adicionou-se 0,5 mL de solução de ácido clorídrico a 10%. A reação foi mantida a 60°C por 16 horas.

Para o isolamento, o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada para a obtenção de um sólido de cor branca, com faixa de fusão entre 245-251°C e rendimento de 86%.

*Caracterização estrutural:*

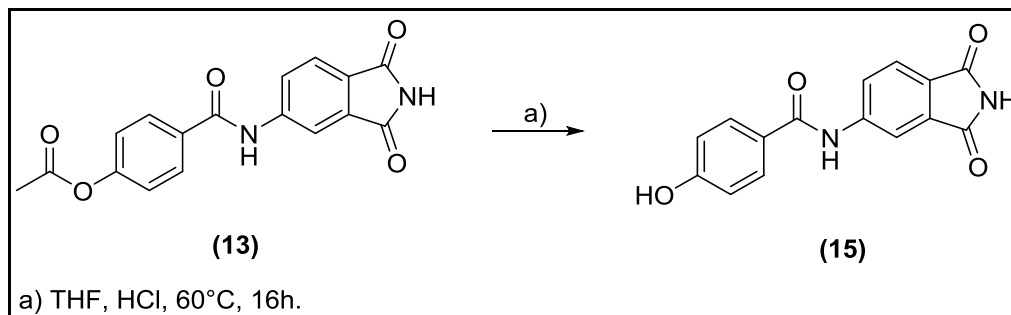
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3215,3 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 3342,6 ( $\nu$  O-H<sub>meta</sub>); 1780,3 e 1741,7 ( $\nu$  C=O<sub>imida</sub>); 1666, 1608 e 1585,4 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 1494,8 e 1373,3 ( $\delta$  O-H<sub>meta</sub>); 1276,8 ( $\nu$  C-O); 744,5 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  11.24 (s, 1H), 10.71 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 8.32 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.44 – 7.32 (m, 3H), 7.01 (ddd, J = 8.0, 2.5, 1.0 Hz, 1H) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.11, 168.94, 166.28, 157.48, 144.75, 135.71, 133.98, 129.65, 126.81, 124.43, 123.97, 119.10, 118.43, 114.67, 113.72 ppm.

9.11 Obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-hidroxibenzamida

**Esquema 17** – Etapa sintética para obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-hidroxibenzamida

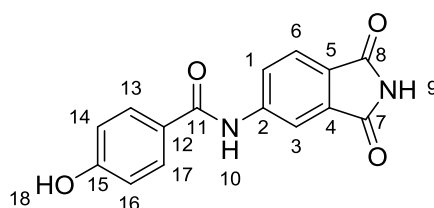


Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 5 mL de tetrahidrofurano e 100 mg do composto 4-((1,3-dioxoisindolin-5-il)carbamoil)fenil acetato. Após, adicionou-se 0,5 mL de solução de ácido clorídrico a 10%. A reação foi mantida a 60°C por 16 horas.

Para o isolamento, o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada para a obtenção de um sólido de cor branca, com faixa de fusão entre 271-274°C e rendimento de 80%.

*Caracterização estrutural:*

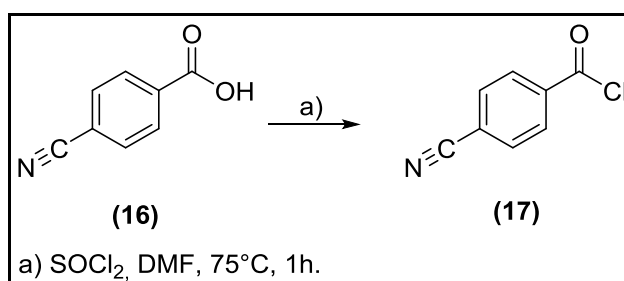
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3371,5 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 3217,2 ( $\nu$  O-H<sub>para</sub>); 1764,8 e 1722,4 ( $\nu$  C=O<sub>imida</sub>); 1656, 1616 e 1600,9 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 1435 e 1325,1 ( $\delta$  O-H<sub>para</sub>); 1224,8 e 1172,7 ( $\nu$  C-O); 850,6 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  11.22 (s, 1H), 10.52 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 8.31 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.12 (dd,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, 1H), 7,89 (dd,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.79 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.89 (dd,  $J = 8.7, 2$ H) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.16, 168.98, 165.72, 161.12, 145.09, 133.98, 130.10, 126.46, 124.66, 124.25, 123.93, 115.11, 113.60 ppm.

#### 9.12 Obtenção do intermediário cloreto 4-cianobenzoila

**Esquema 18** – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-cianobenzoila



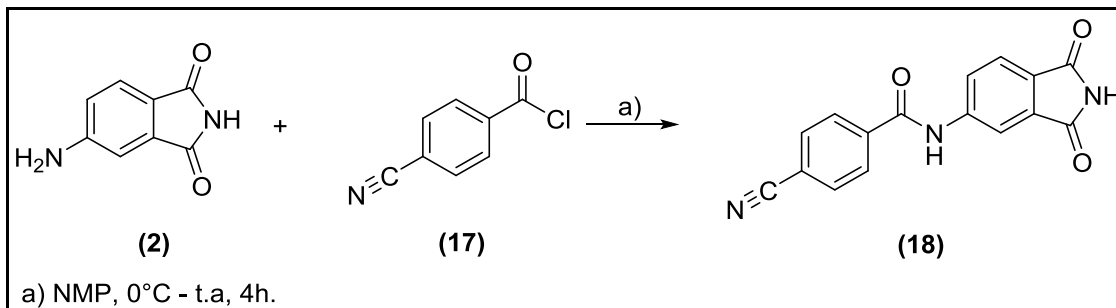
Fonte: próprio autor

#### *Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados 100 mg de ácido 4-cianobenzóico (0,68 mmol), 1 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 hora. Ao término da reação, o cloreto de tionila foi retirado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido amarelo. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

9.13 Obtenção do composto 4-ciano-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida

**Esquema 19**– Etapa sintética para obtenção do composto 4-ciano-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida



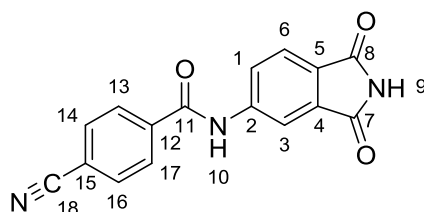
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 2 mL de *N*-metil-2-pirrolidona e 110,2 mg do intermediário 4-aminofthalimida (0,679 mmol) em banho de gelo e agitação constante. Solubilizou-se o cloreto 4-cianobenzoila (112,5 mg; 0,679 mmol) em 1 mL de diclorometano anidro, e foi adicionado ao balão gota a gota. A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 4 horas.

Para o isolamento, foram adicionados 30 mL de acetato de etila, e a fase orgânica foi extraída com água destilada (3 x 15 mL). O produto precipitou na fase orgânica e foi realizada uma filtração simples para a obtenção de um sólido de cor branca, com faixa de fusão entre 285-288°C e rendimento de 42%.

*Caracterização estrutural:*



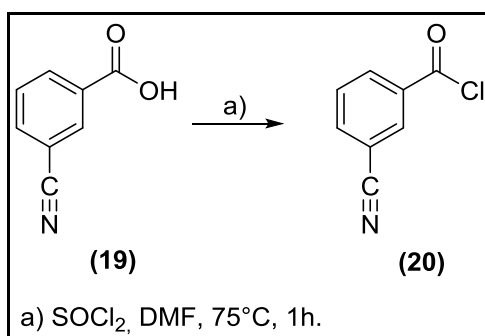
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3207,6 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 2233,5 ( $\nu$  C $\equiv$ N<sub>para</sub>); 1772,5 e 1747,5 ( $\nu$  C=O<sub>imida</sub>); 1674, 1614 e 1544,9 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 854,4 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  11.28 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 8.30 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 8.13 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 8.11 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.06 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.84 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.44, 169.30, 165.33, 144.66, 138.73, 134.42, 133.05, 129.20, 127.74, 125.10, 124.49, 118.71, 114.76, 114.31 ppm.

#### 9.14 Obtenção do intermediário cloreto 3-cianobenzoila

**Esquema 20** – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 3-cianobenzoila



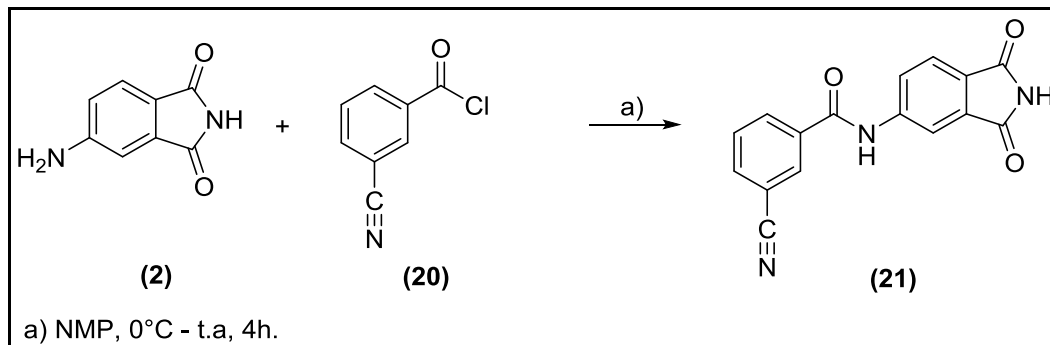
Fonte: próprio autor

#### *Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados 200 mg de ácido 3-cianobenzóico (1,36 mmol), 1 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 hora. Ao término da reação, o cloreto de tionila foi retirado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido amarelo. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

9.15 Obtenção do composto 3-ciano-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida

**Esquema 21** – Etapa sintética para obtenção do composto 3-ciano-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il) benzamida



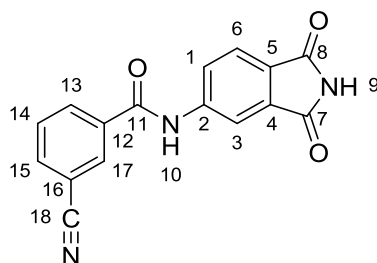
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 2 mL de *N*-metil-2-pirrolidona e 215 mg do intermediário 4-aminoftalimida (1,32 mmol) em banho de gelo e agitação constante. Solubilizou-se o cloreto 3-cianobenzoila (220 mg; 1,32 mmol) em 1 mL de diclorometano anidro, e foi adicionado ao balão gota a gota. A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 4 horas.

Para o isolamento, foram adicionados 30 mL de acetato de etila, e a fase orgânica foi extraída com água destilada (3 x 15 mL). O produto precipitou na fase orgânica e foi realizada uma filtração simples para a obtenção de um sólido de cor branca, com faixa de fusão entre 310-312°C e rendimento de 46 %.

*Caracterização estrutural:*



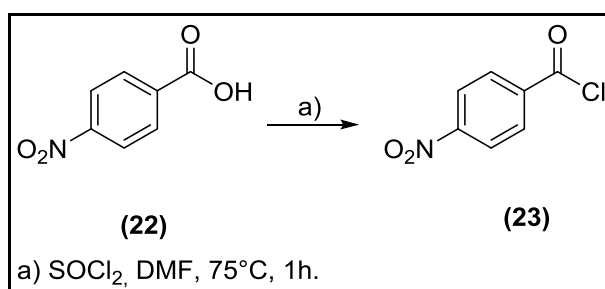
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3207,6 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 2233,5 ( $\nu$  C $\equiv$ N<sub>meta</sub>); 1772,5 e 1749,4 ( $\nu$  C=O<sub>imida</sub>); 1618, 1558 e 1490,9 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 748,3 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  11.29 (s, 1H), 10.93 (s, 1H), 8.45 (t,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 8.30 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 8.27 (ddd,  $J = 7.9, 1.7, 1.2$  Hz, 1H), 8.13 – 8.09 (m, 2H), 7.84 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.79 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.01, 168.87, 164.39, 144.24, 135.49, 135.32, 134.00, 132.74, 131.53, 130.01, 127.27, 124.59, 124.06, 118.26, 113.82, 111.66.

#### 9.16 Obtenção do intermediário cloreto 4-nitrobenzoila

**Esquema 22** – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-nitrobenzoila



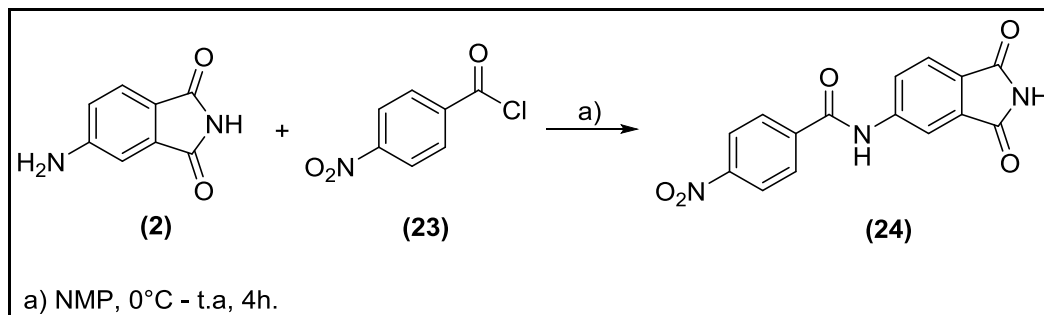
Fonte: próprio autor

#### *Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados 150 mg de ácido 4-nitrobenzóico (0,89 mmol), 1 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 hora. Ao término da reação, o cloreto de tionila foi retirado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido amarelo. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

9.17 Obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-nitrobenzamida

**Esquema 23** – Etapa sintética para obtenção do composto *N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)-4-nitrobenzamida



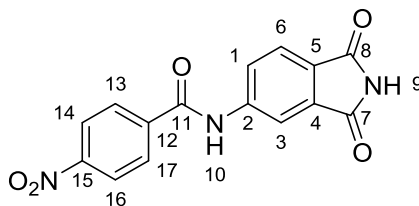
Fonte: próprio autor

*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 2 mL de *N*-metil-2-pirrolidona e 145 mg do intermediário 4-aminofthalimida (0,89 mmol) em banho de gelo e agitação constante. Solubilizou-se o cloreto 4-nitrobenzoila (166,5 mg; 0,89 mmol) em 1 mL de diclorometano anidro, e foi adicionado ao balão gota a gota. A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 4 horas.

Para o isolamento, foram adicionados 30 mL de acetato de etila, e a fase orgânica foi extraída com água destilada (3 x 15 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, e posteriormente foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida.

A purificação foi realizada em sílica Flash com fase móvel acetato de etila e hexano (5:5) para obtenção de um sólido branco com faixa de fusão entre 263-265°C e rendimento de 17 %.

*Caracterização estrutural:*

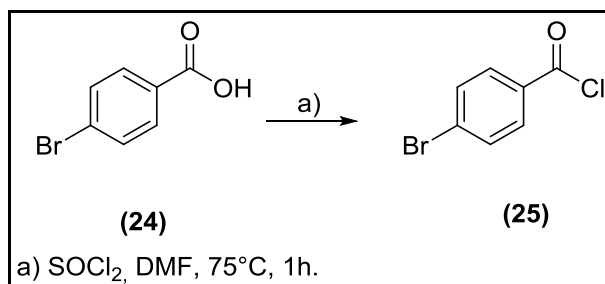
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3209,5 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 1764,8 e 1718,5 ( $\nu$  C=O imida); 1668, 1604 e 1541,1 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 1494,8 ( $\nu_a$  NO<sub>2</sub>); 1328,9 ( $\nu_s$  NO<sub>2</sub>); 848,6 ( $\delta$  C-N<sub>nitro</sub>); 746,4 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  8.41 (dd, J = 8.9 Hz, 2H), 8.32 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 8.9 Hz, 2H), 8.13 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.2 Hz, 1H) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.05, 168.91, 164.71, 149.51, 144.14, 139.88, 134.04, 129.51, 127.29, 124.78, 124.11, 123.74, 113.98 ppm.

#### 9.17 Obtenção do intermediário cloreto 4-bromobenzoila

**Esquema 24** – Etapa sintética para obtenção do intermediário cloreto 4-bromobenzoila



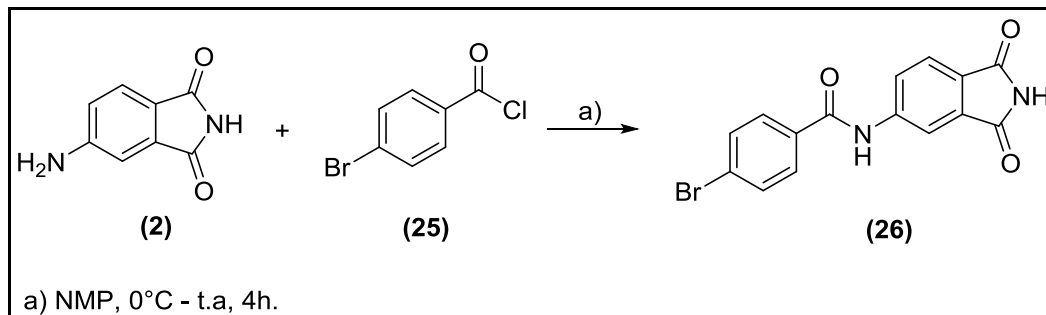
Fonte: próprio autor

#### *Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados 150 mg de ácido 4-bromobenzóico (0,74 mmol), 1 mL de cloreto de tionila e 2 gotas de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 hora. Ao término da reação, o cloreto de tionila foi retirado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido amarelo. O produto obtido foi utilizado na próxima etapa de síntese, sem purificação prévia.

9.18 Obtenção do composto 4-bromo-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)benzamida

**Esquema 25** – Etapa sintética para obtenção do composto 4-bromo-*N*-(1,3-dioxoisindolin-5-il)benzamida



Fonte: próprio autor

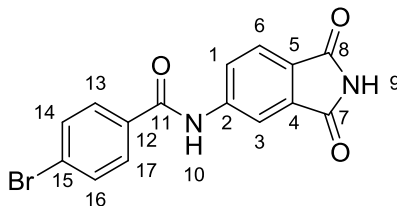
*Procedimento:*

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 2 mL de *N*-metil-2-pirrolidona e 145 mg do intermediário 4-aminofthalimida (0,89 mmol) em banho de gelo e agitação constante. Solubilizou-se o cloreto 4-bromobenzoila (195,3 mg; 0,89 mmol) em 1 mL de diclorometano anidro, e foi adicionado ao balão gota a gota. A reação foi mantida sob temperatura ambiente por 4 horas.

Para o isolamento, foram adicionados 30 mL de acetato de etila, e a fase orgânica foi extraída com água destilada (3 x 15 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, e posteriormente foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida.

A purificação foi realizada em sílica Flash com fase móvel acetato de etila e hexano (5:5) para obtenção de um sólido amarelo com faixa de fusão entre 285-293°C e rendimento de 75 %.

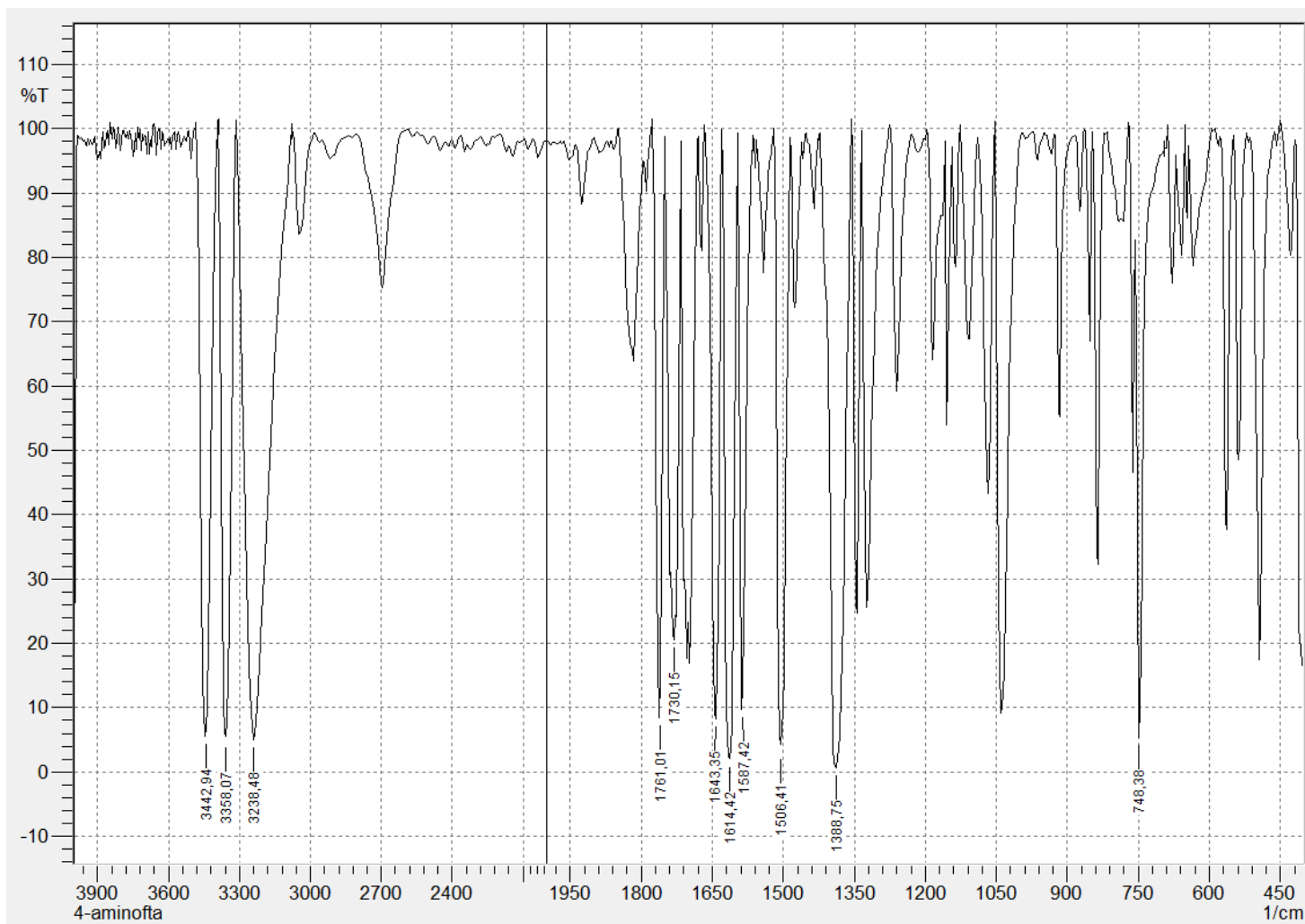
Caracterização estrutural:



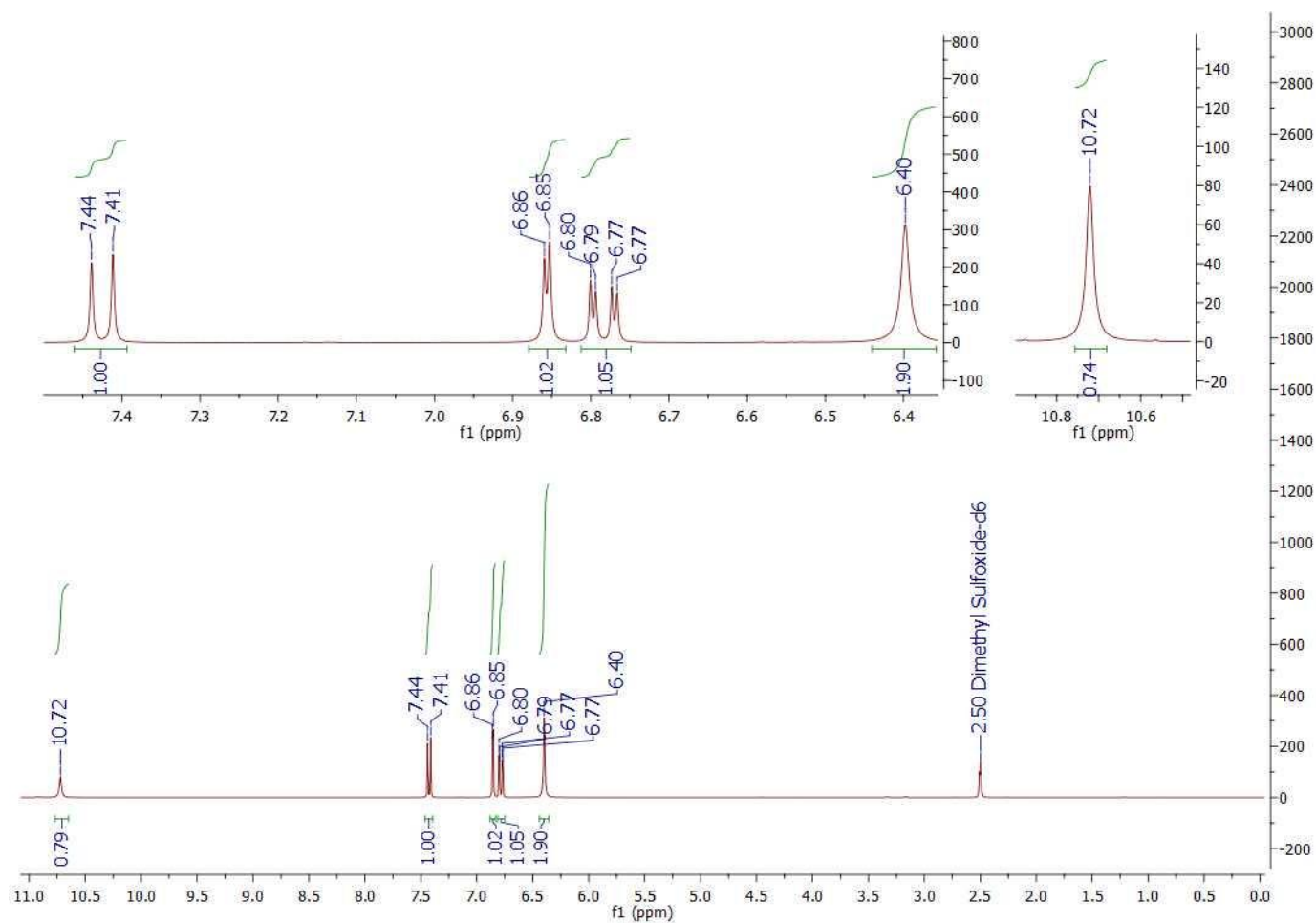
**Infravermelho (pastilha de KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 3228,8 ( $\nu$  N-H<sub>amida</sub>); 1772,5 e 1714,7 ( $\nu$  C=O imida); 1693, 1612 e 1589,3 ( $\nu$  C=C<sub>aromático</sub>); 1323,1 ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>Br); 748,3 ( $\delta$  C-N<sub>imida</sub>); 542 ( $\nu$  C-Br).

**RMN  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  11.26 (s, 1H), 10.83 (s, 1H), 8.30 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.11 (dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz, 1H), 7.93 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.82 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 2H) ppm.

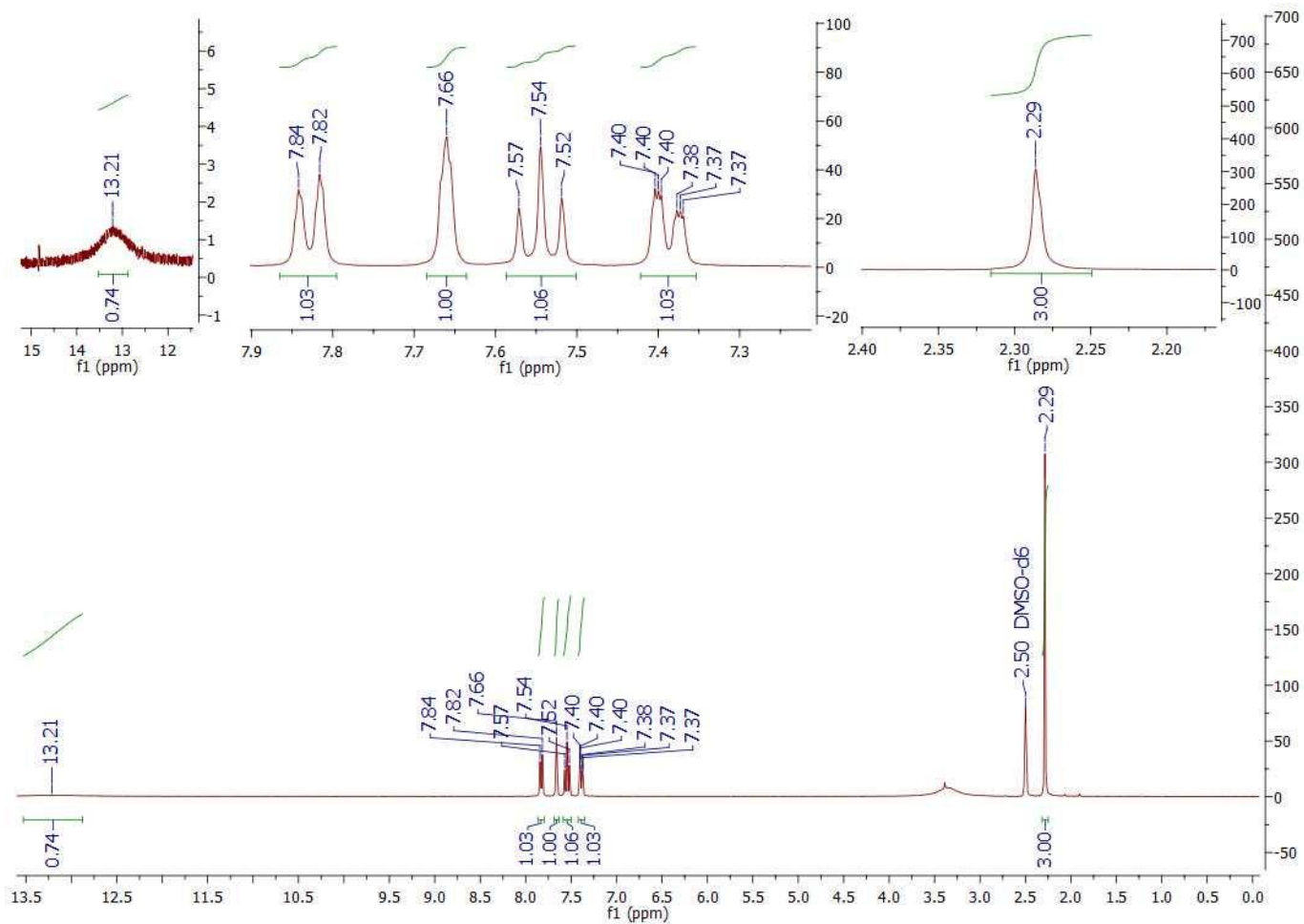
**RMN  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz; DMSO-*d*6)**  $\delta$  169.49, 169.34, 165.72, 144.91, 134.41, 133.76, 132.03, 130.46, 127.48, 126.43, 124.99, 124.44, 114.25.



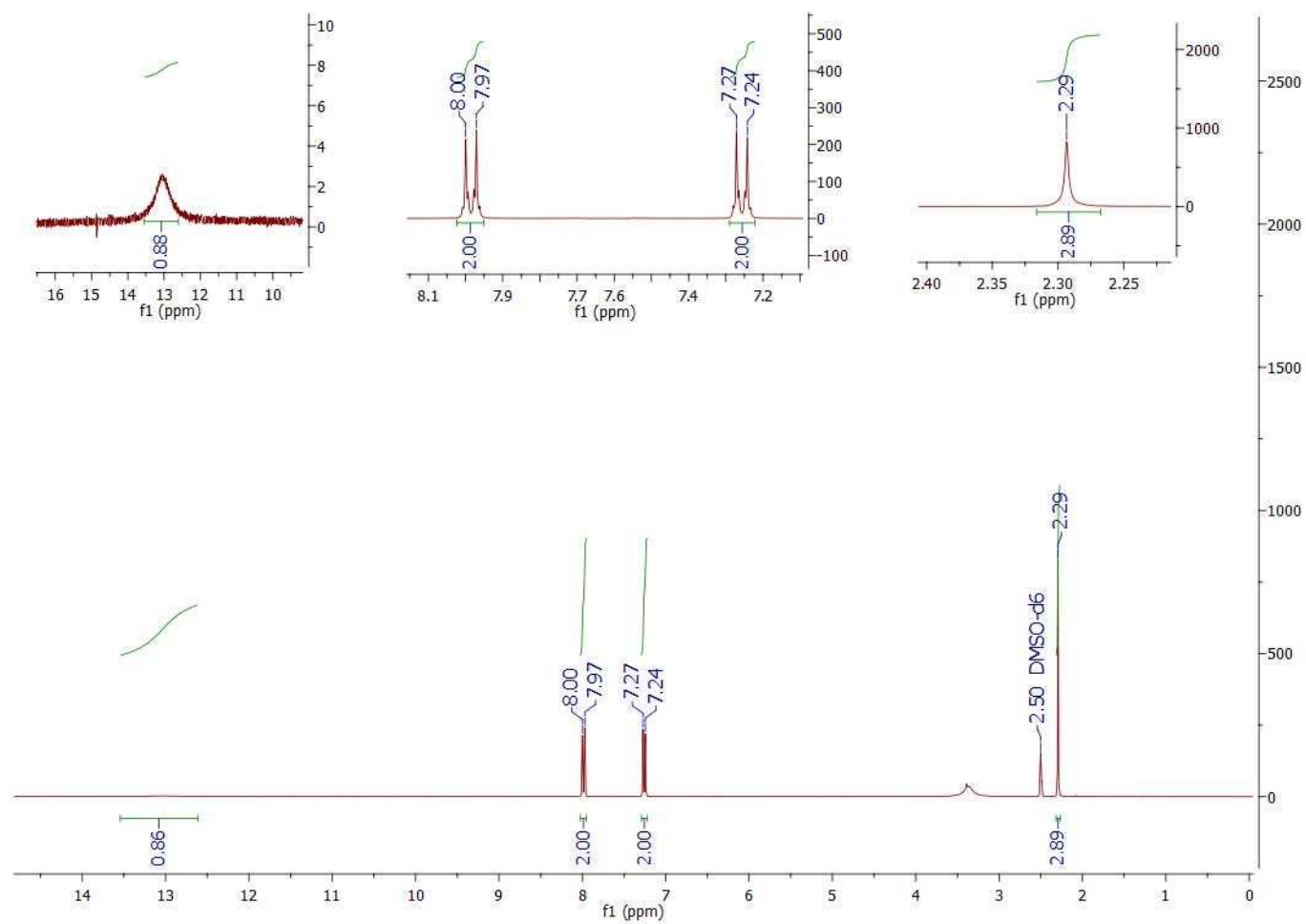
**Figura 12** – Espectro na região de infravermelho do intermediário 4-aminofthalimida (pastilha de KBr)



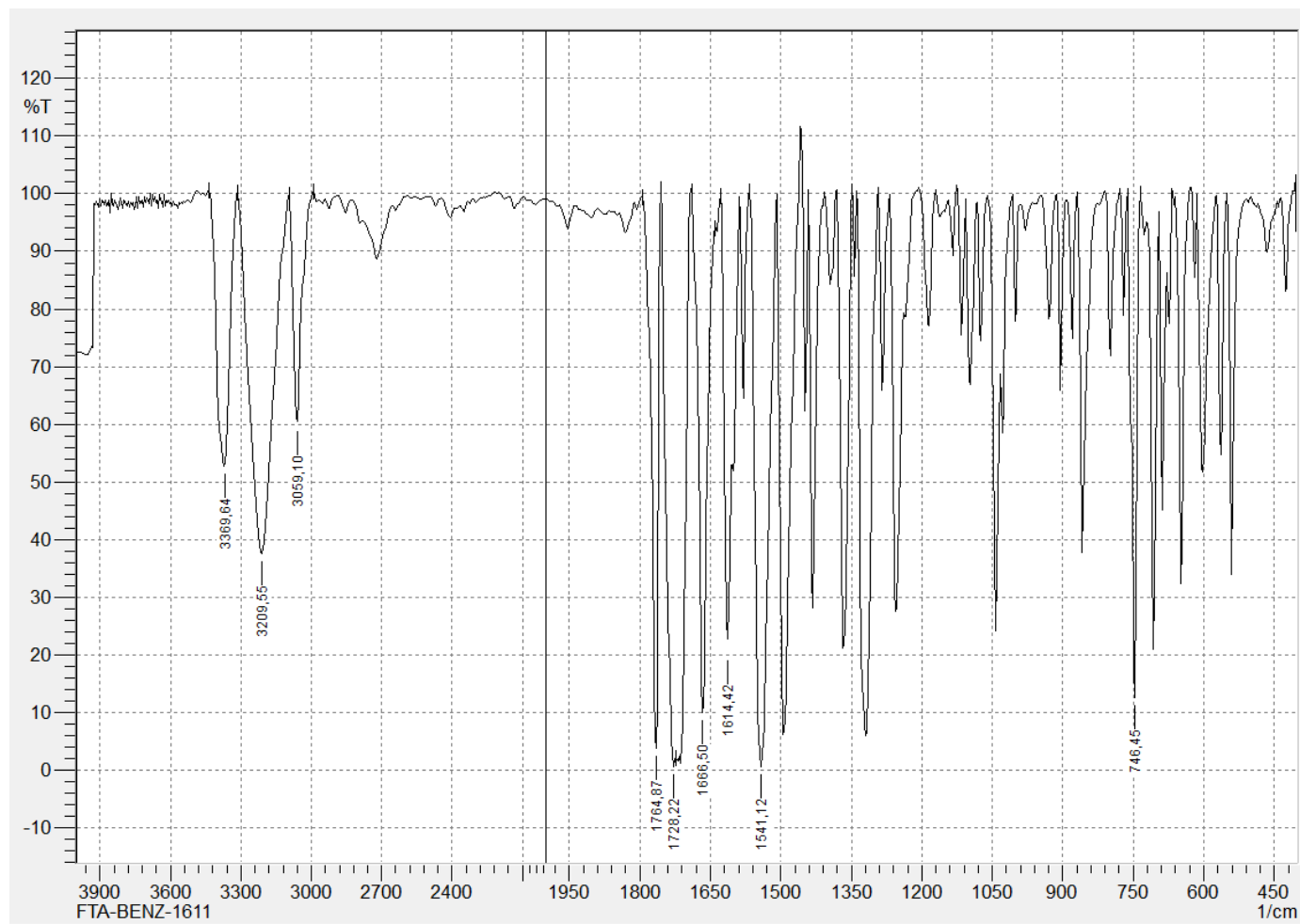
**Figura 13-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do intermediário 4-aminoftalimida (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



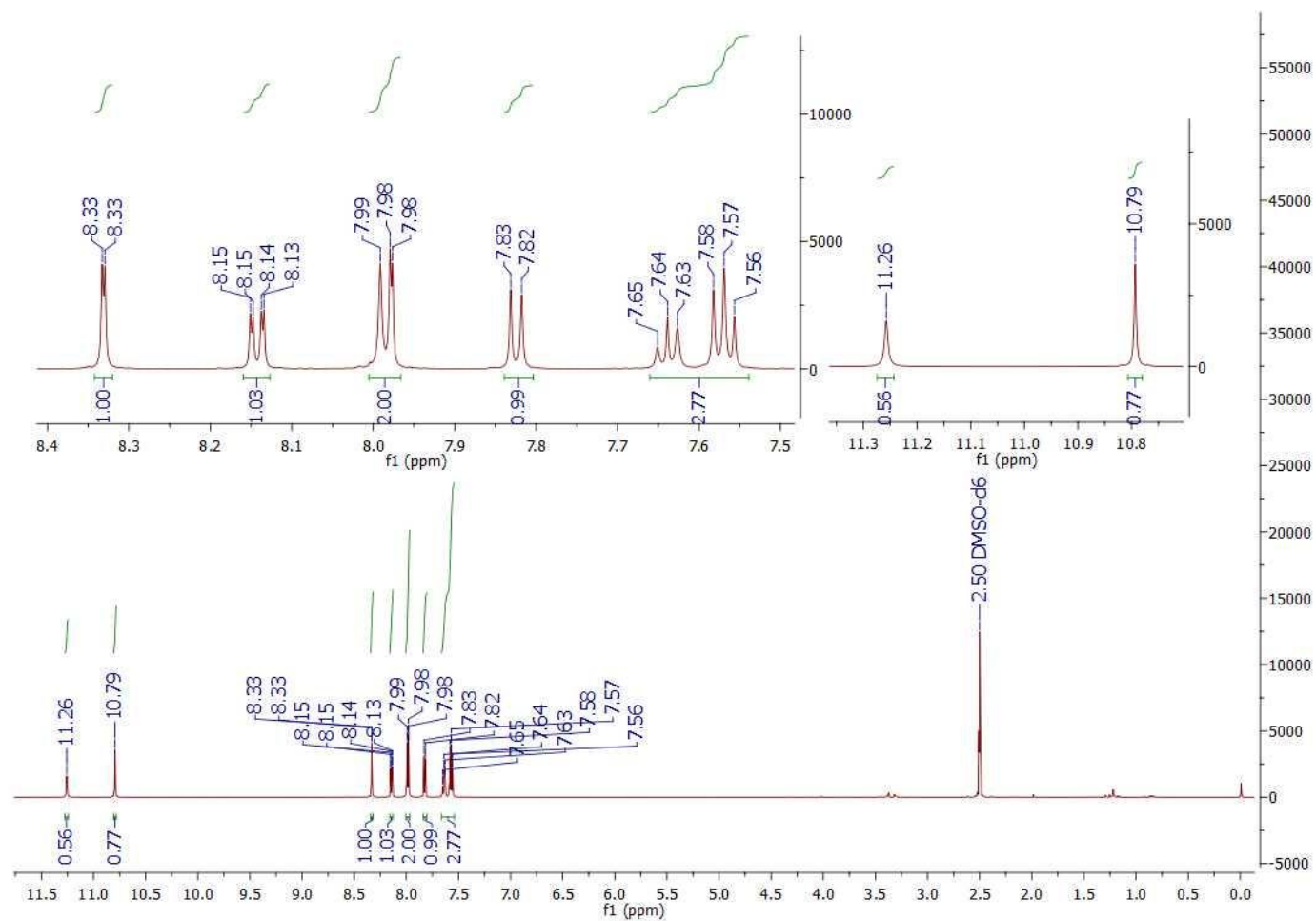
**Figura 14** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do intermediário ácido 3-acetoxibenzoico (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



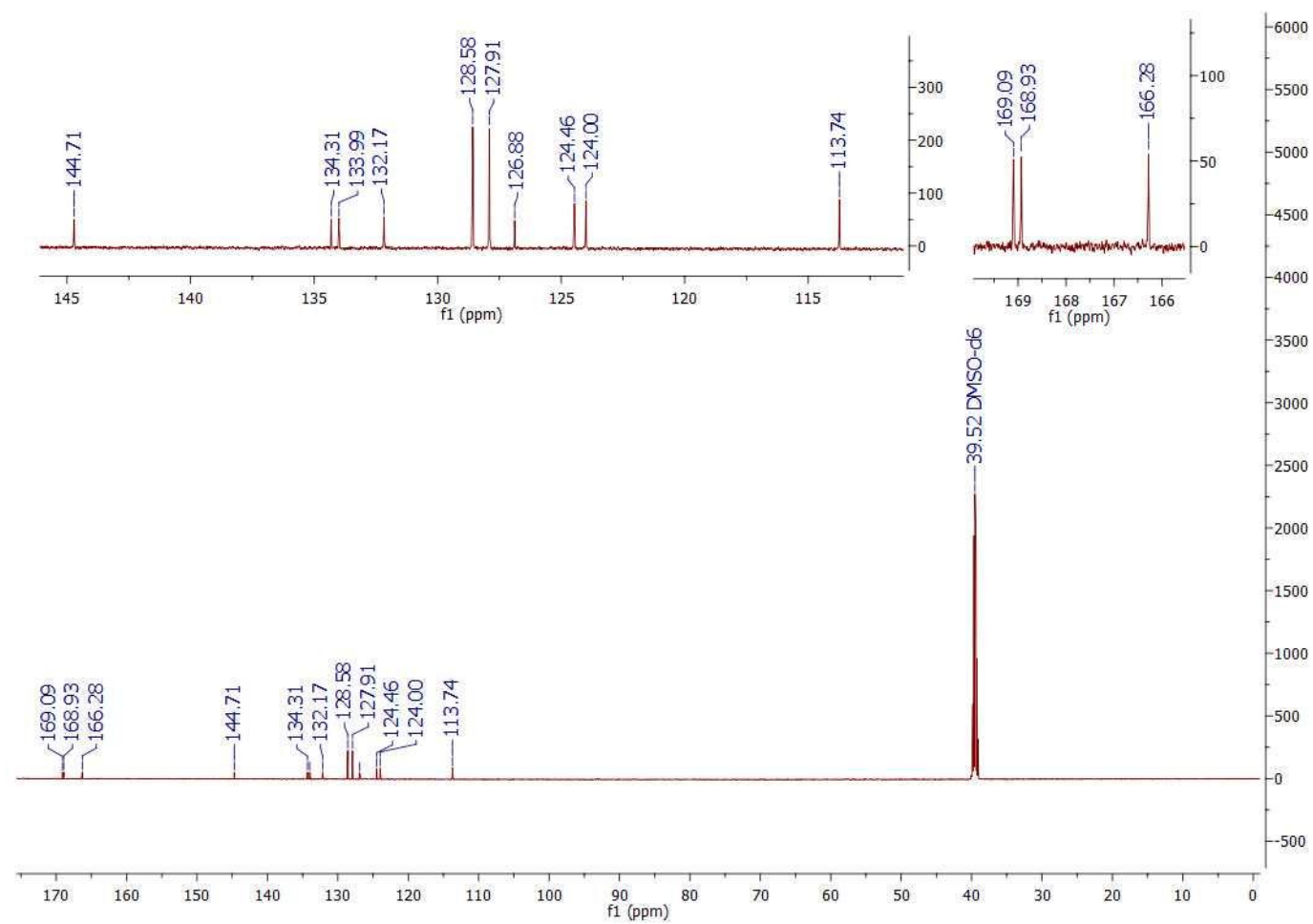
**Figura 15** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do intermediário ácido 4-acetoxibenzóico (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



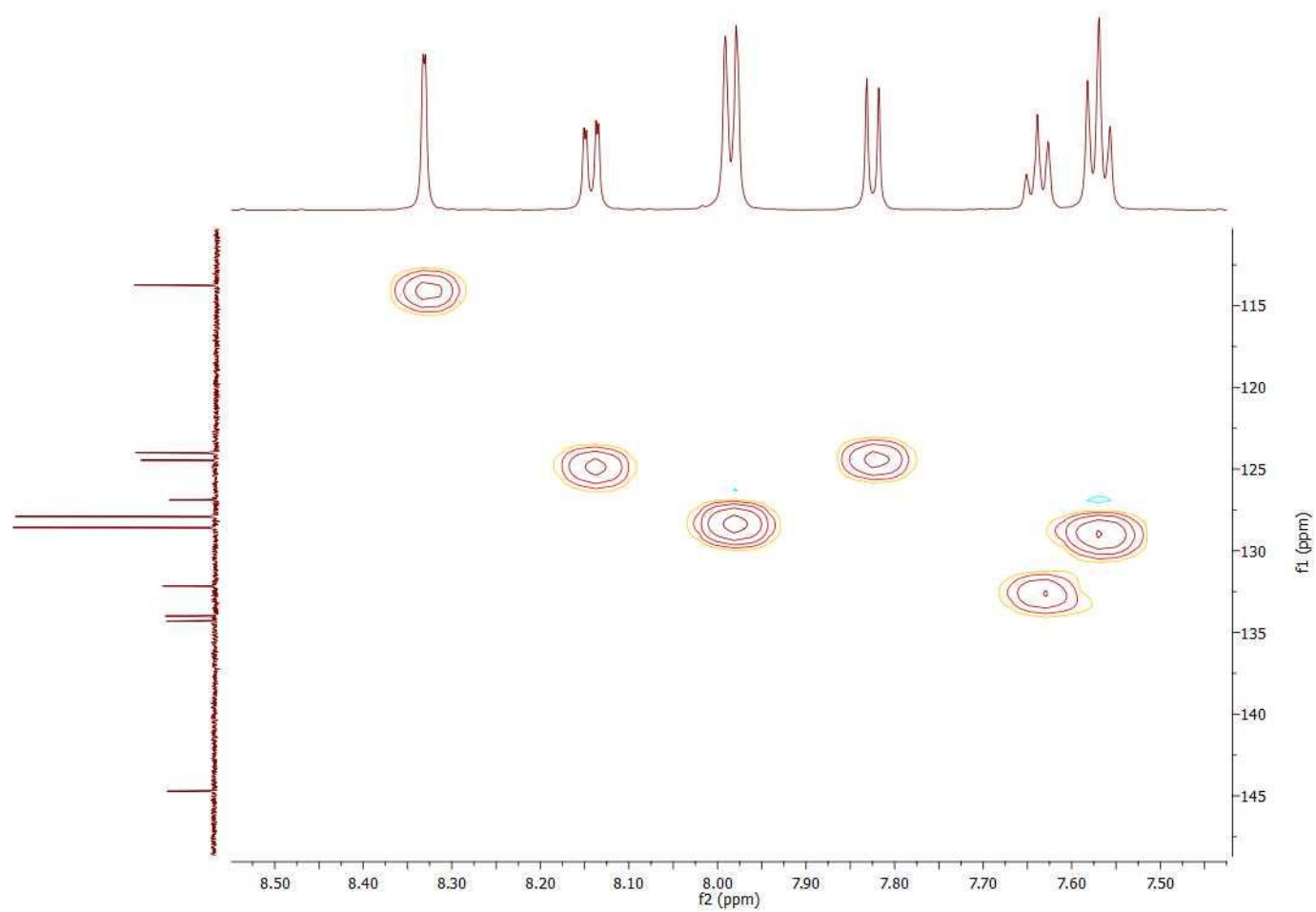
**Figura 16** - Espectro na região de infravermelho composto final I (pastilha de KBr)



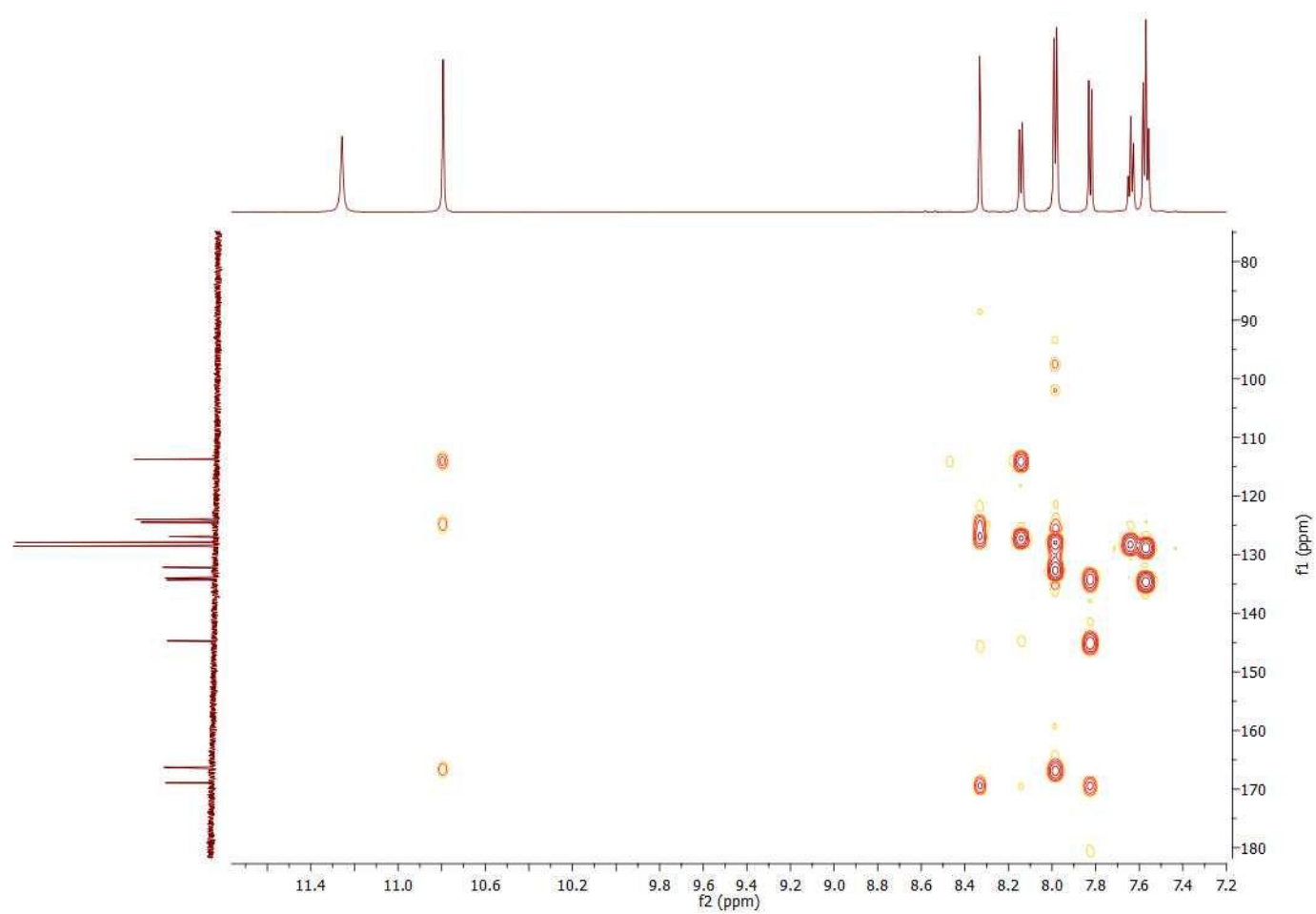
**Figura 17** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final I (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



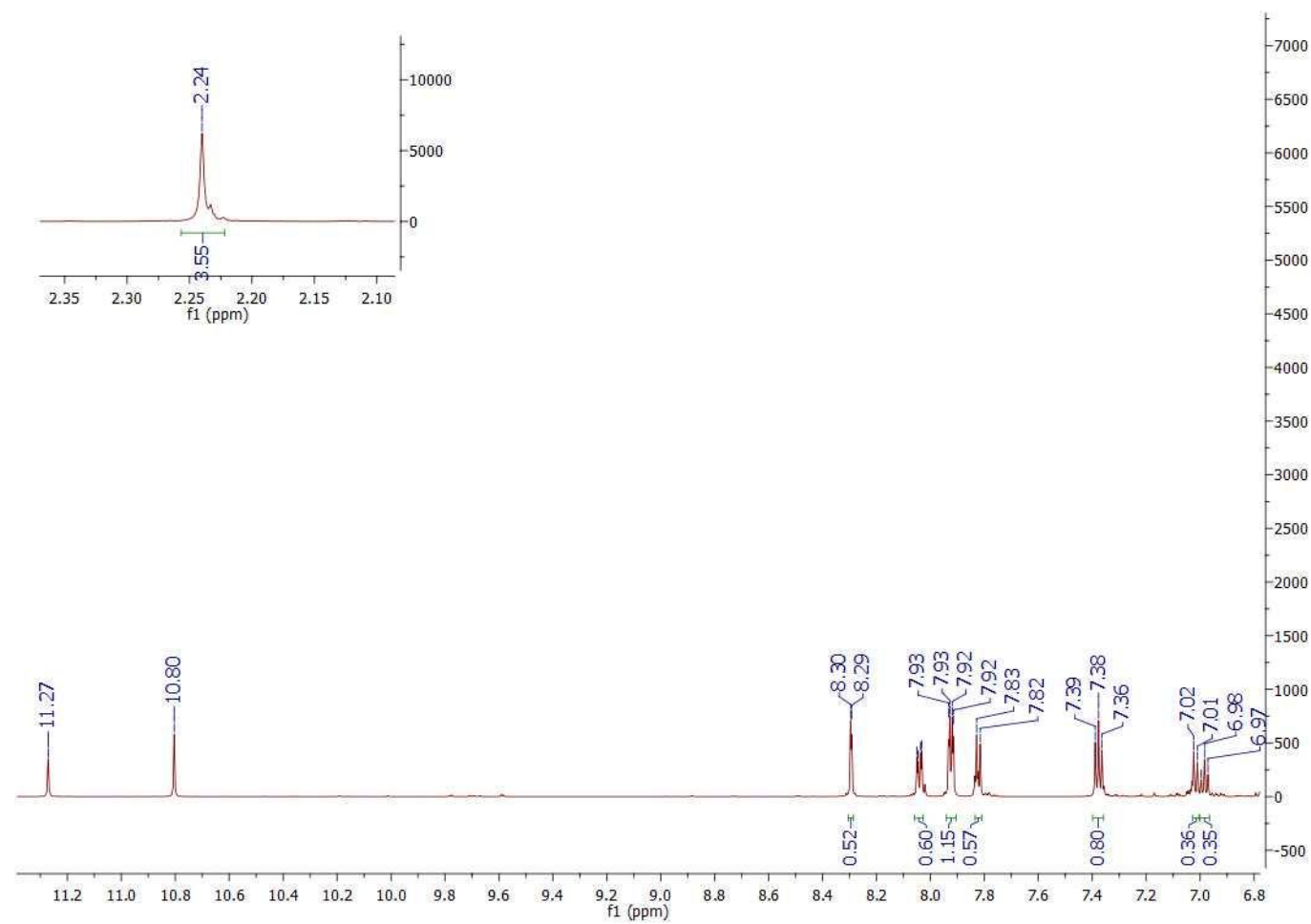
**Figura 18** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final I (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



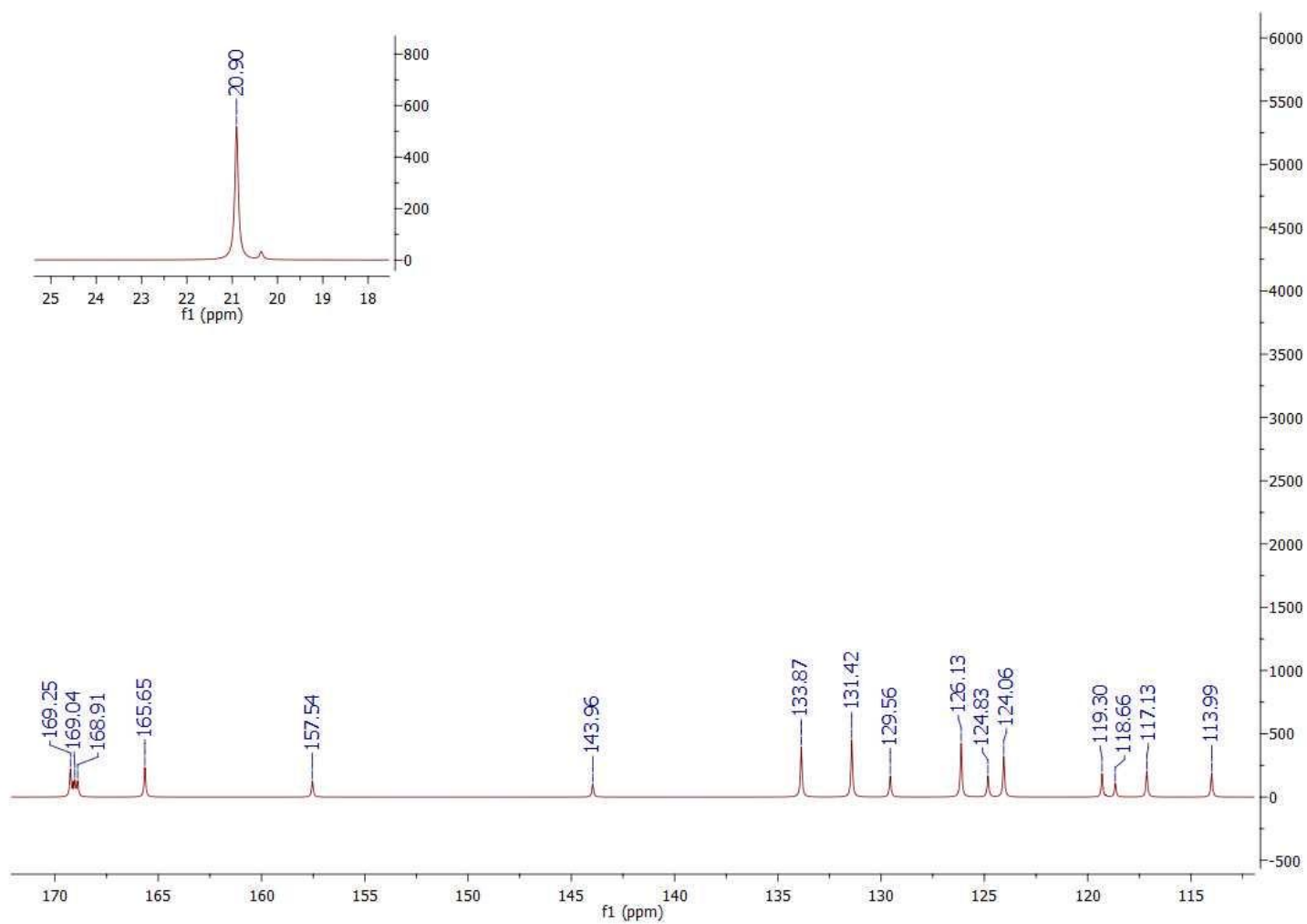
**Figura 19** - Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final I



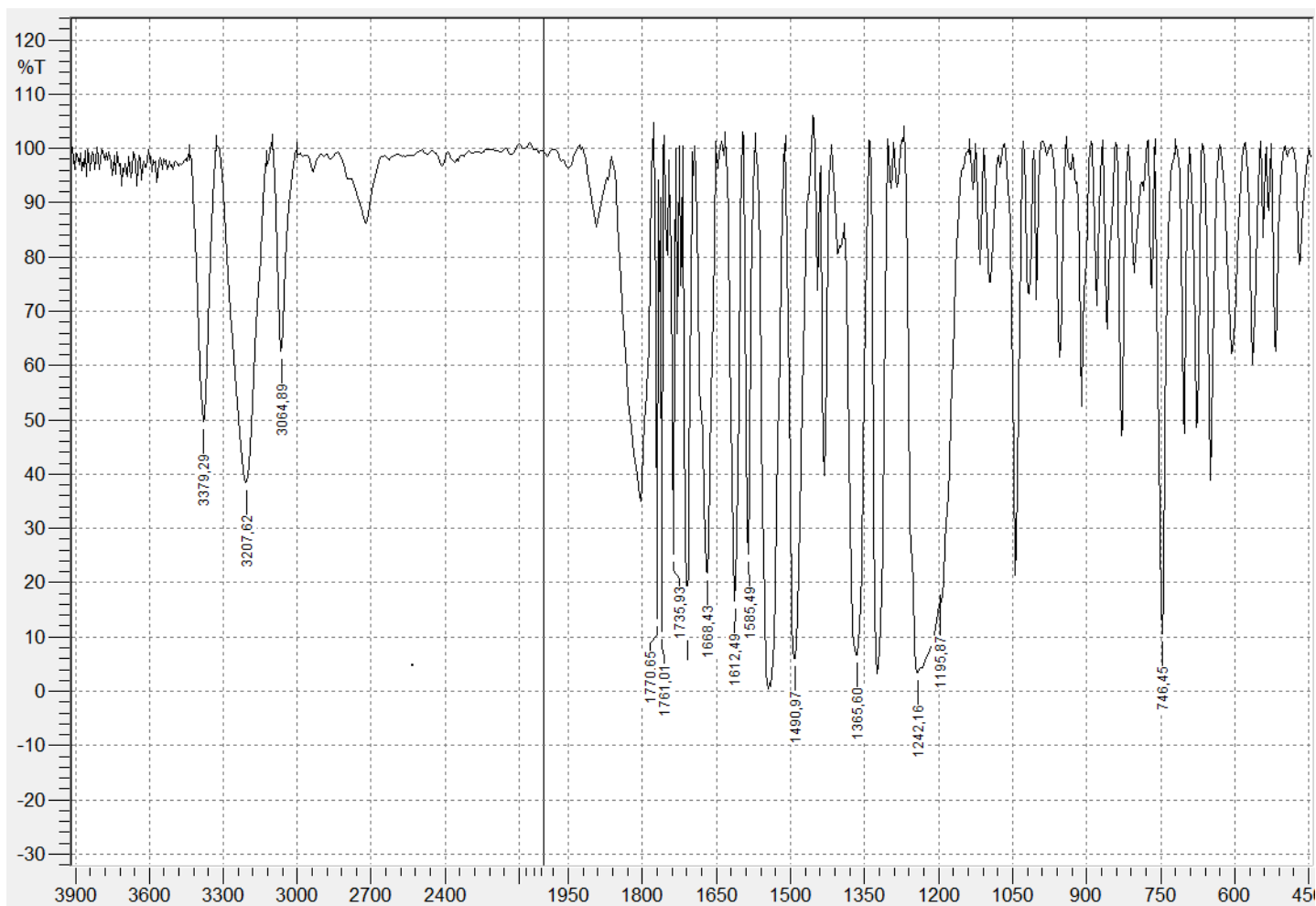
**Figura 20** - Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final I



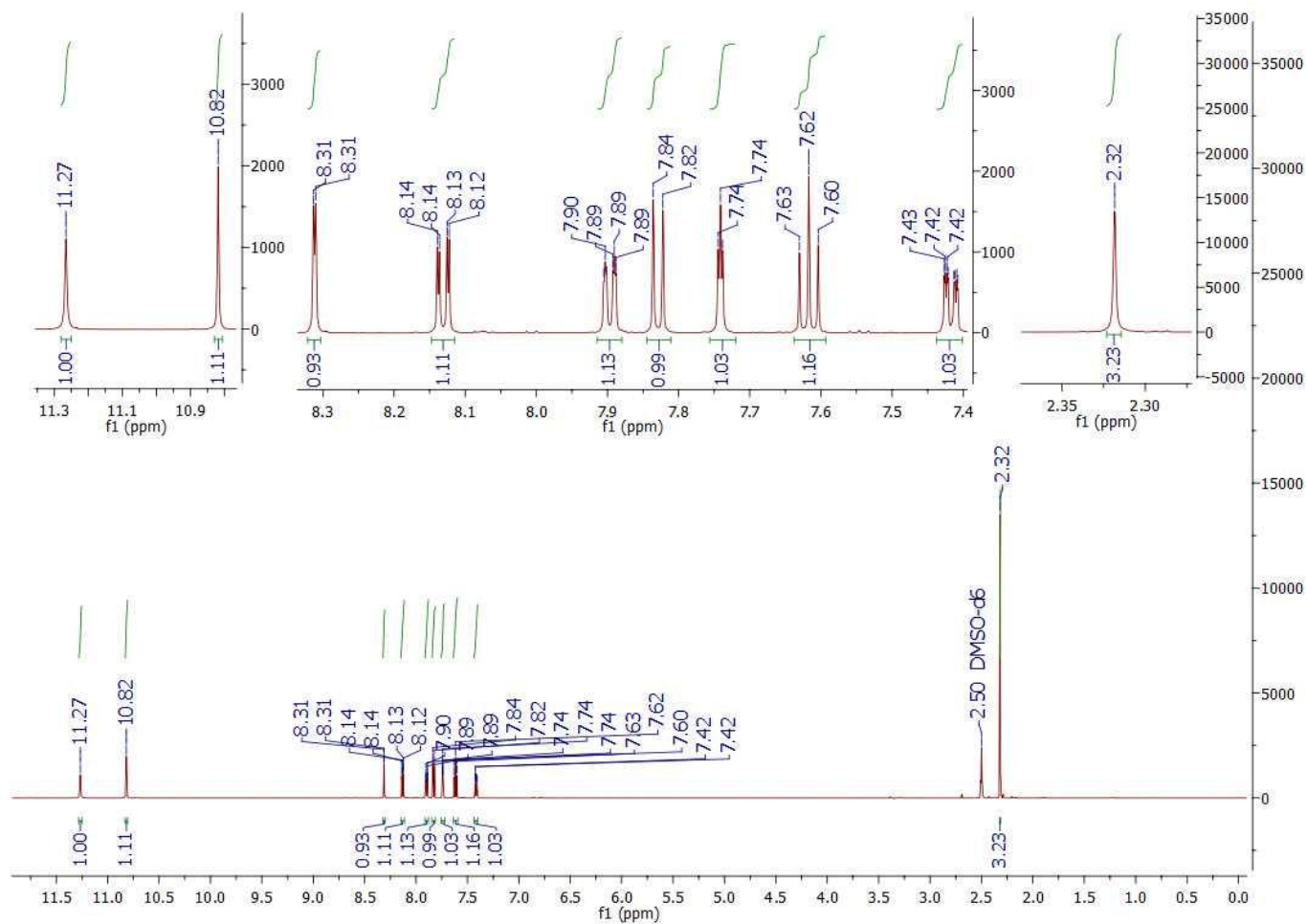
**Figura 21** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final II (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



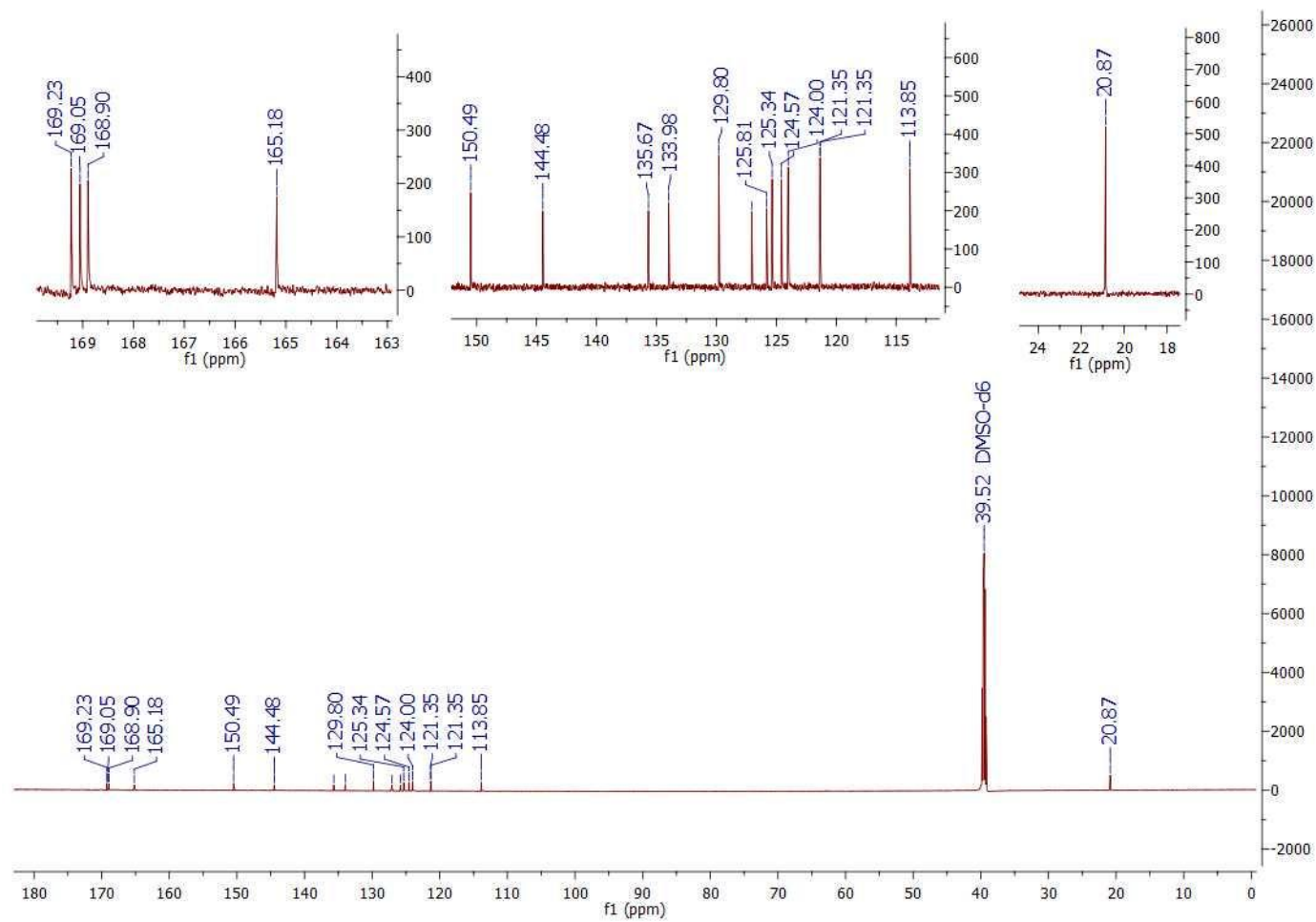
**Figura 22** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final II (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



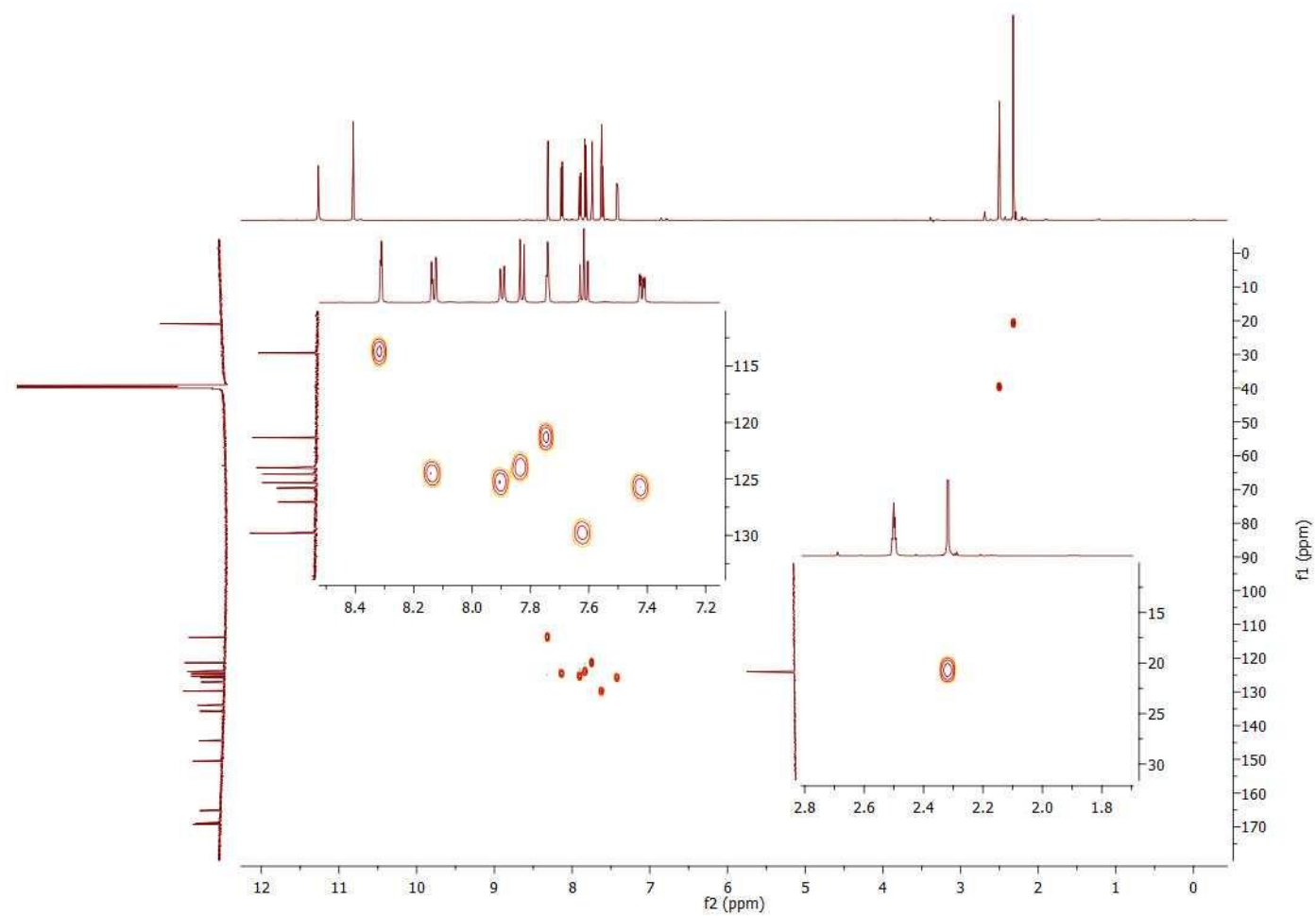
**Figura 23** - Espectro na região de infravermelho composto final III (pastilha de KBr)



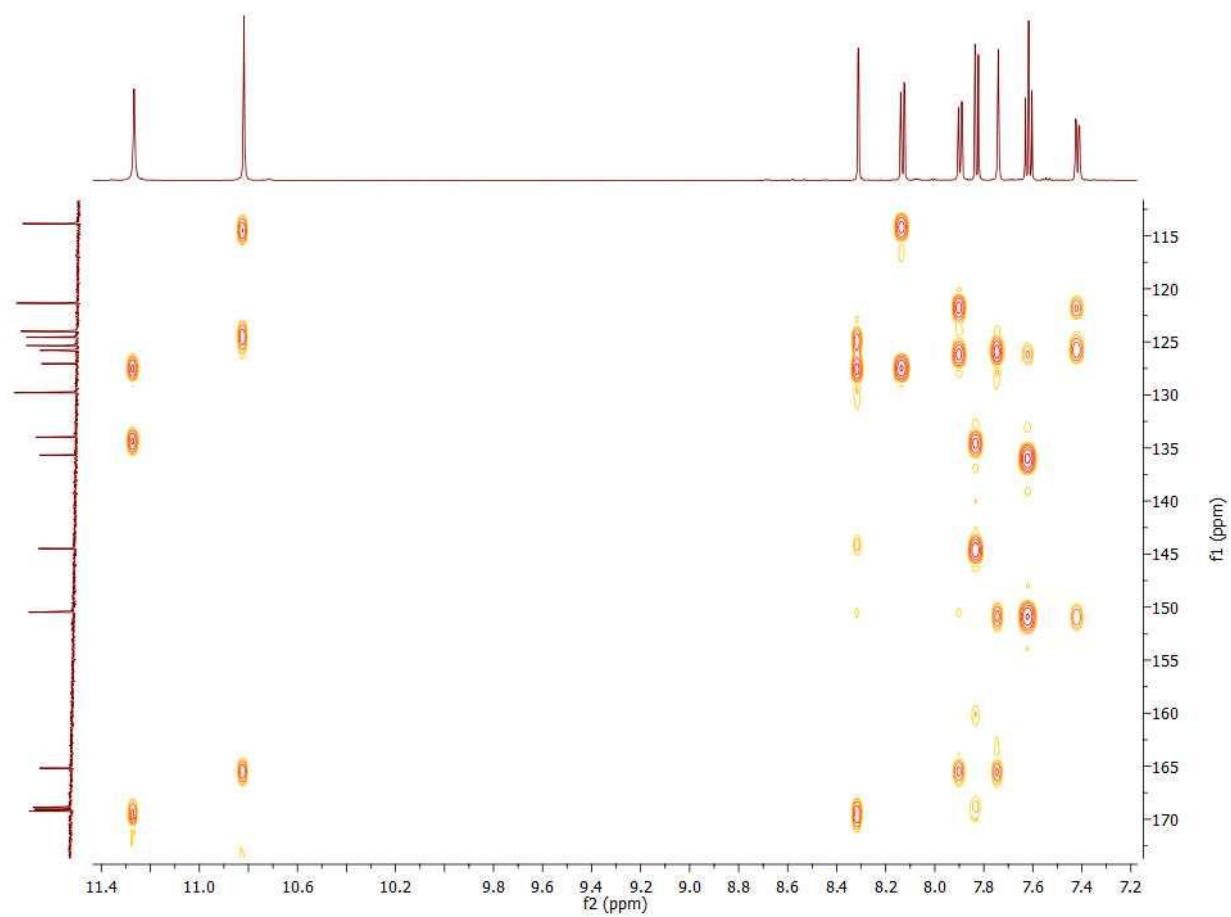
**Figura 24** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final III (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )



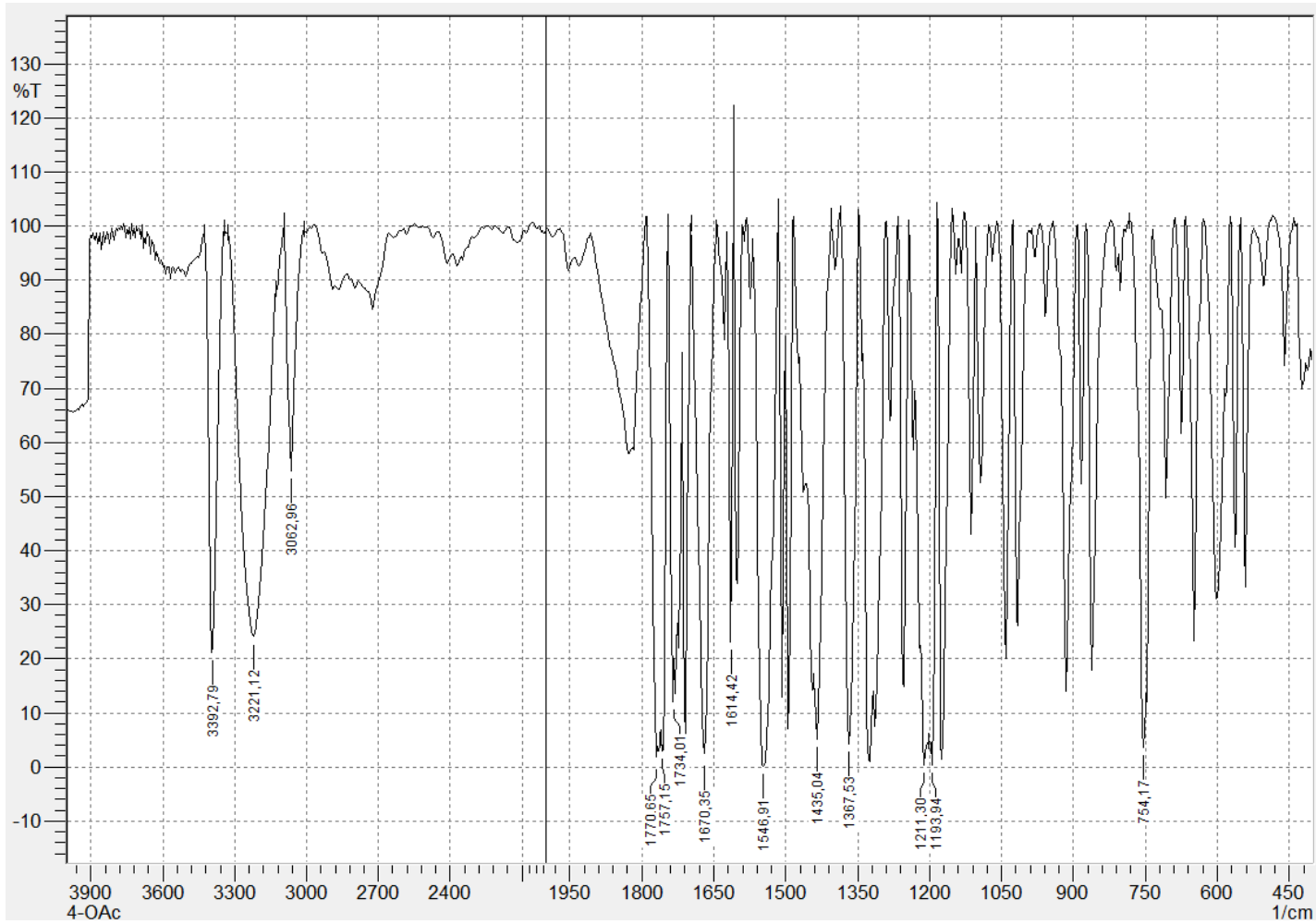
**Figura 25** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final III (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



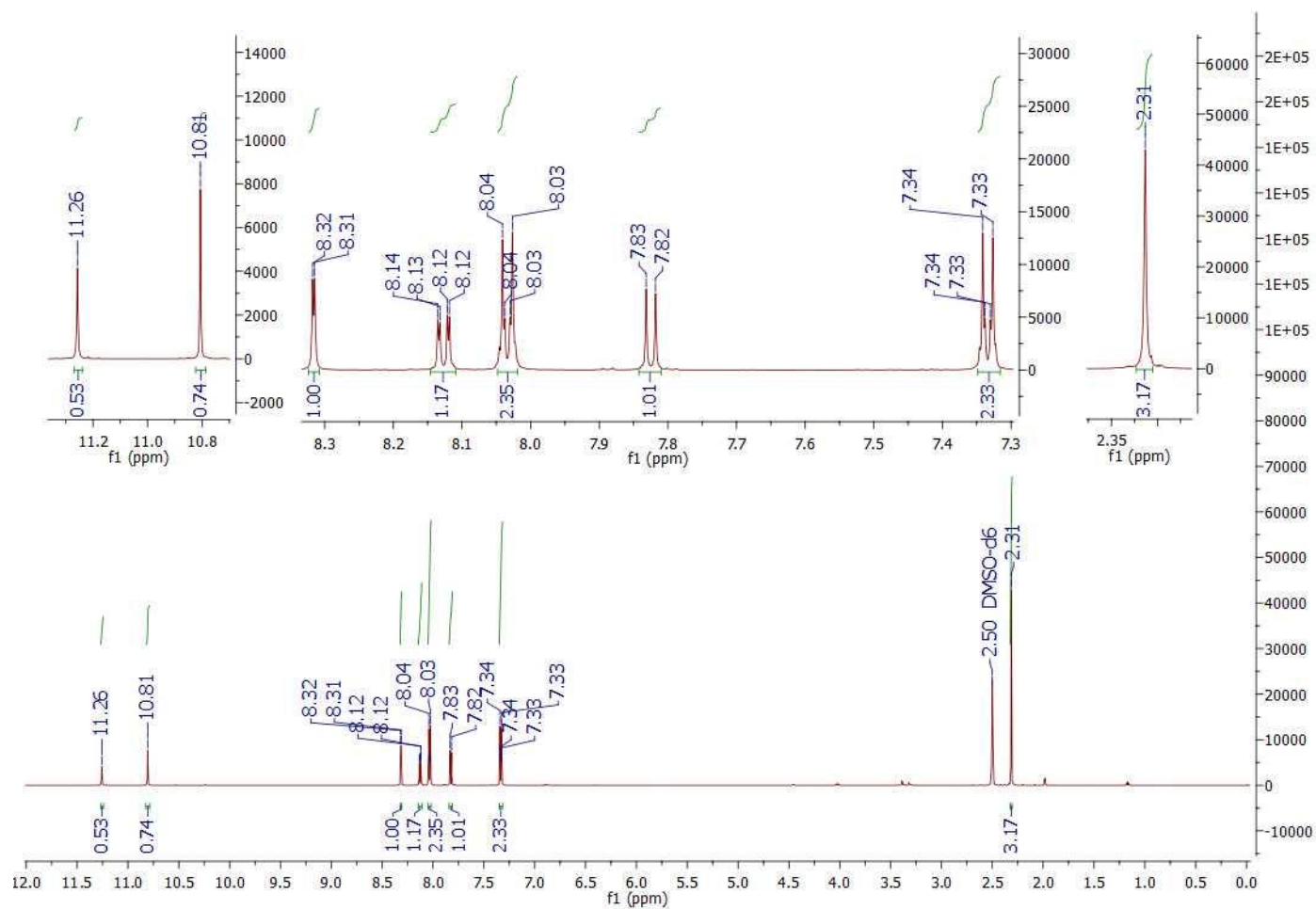
**Figura 26** – Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final III



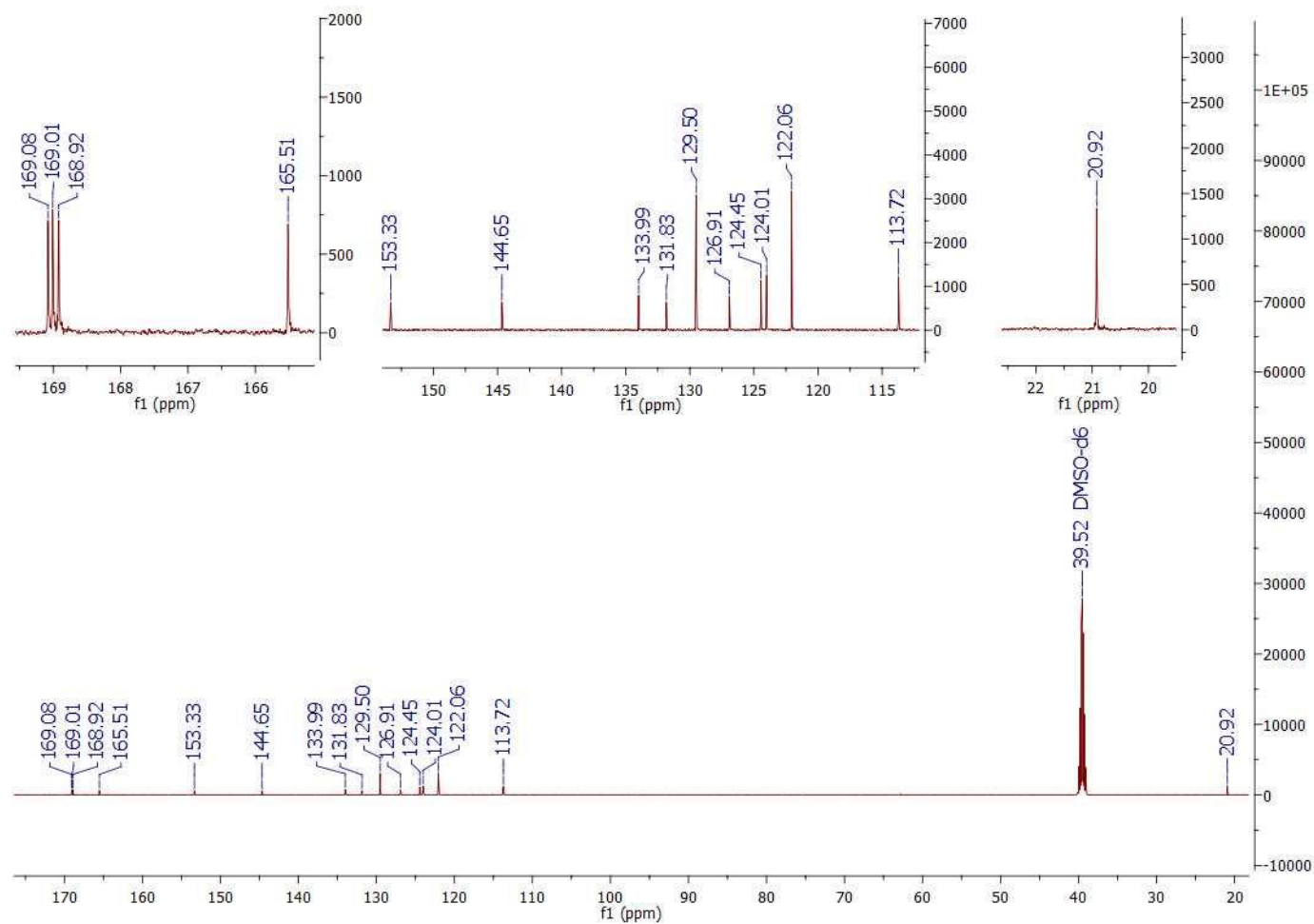
**Figura 27** – Mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final III



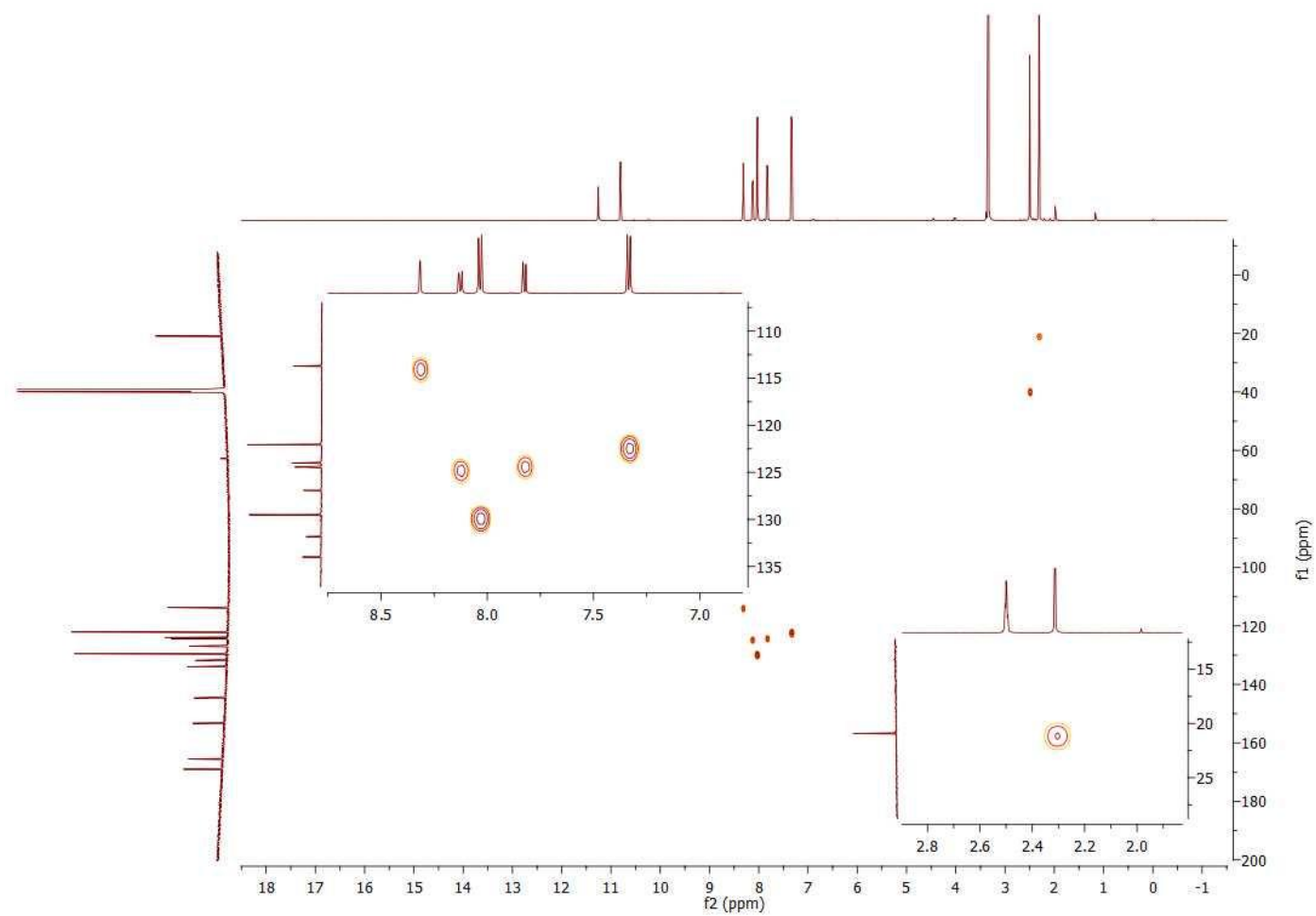
**Figura 28** - Espectro na região de infravermelho composto final IV (pastilha de KBr)



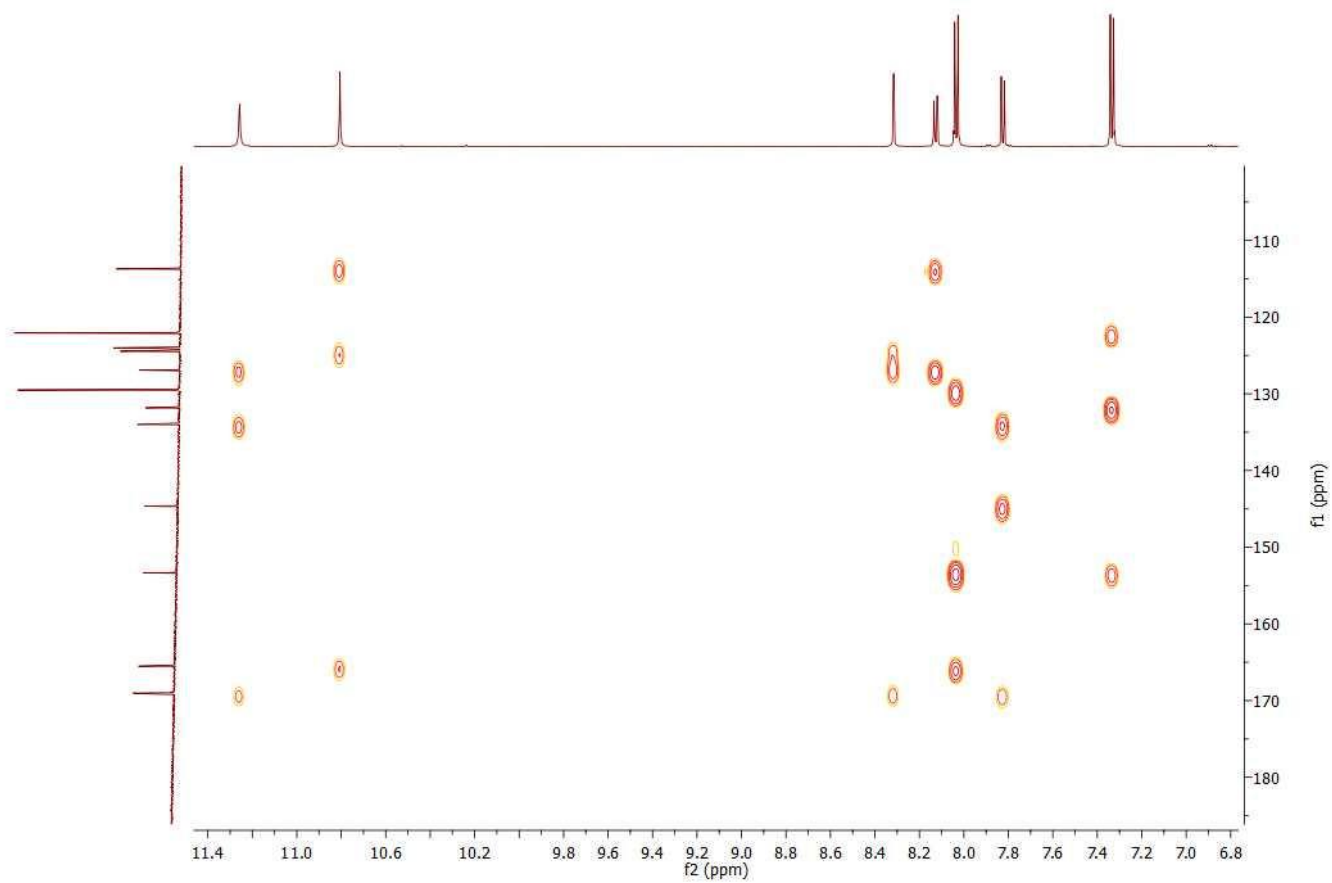
**Figura 29** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final IV (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



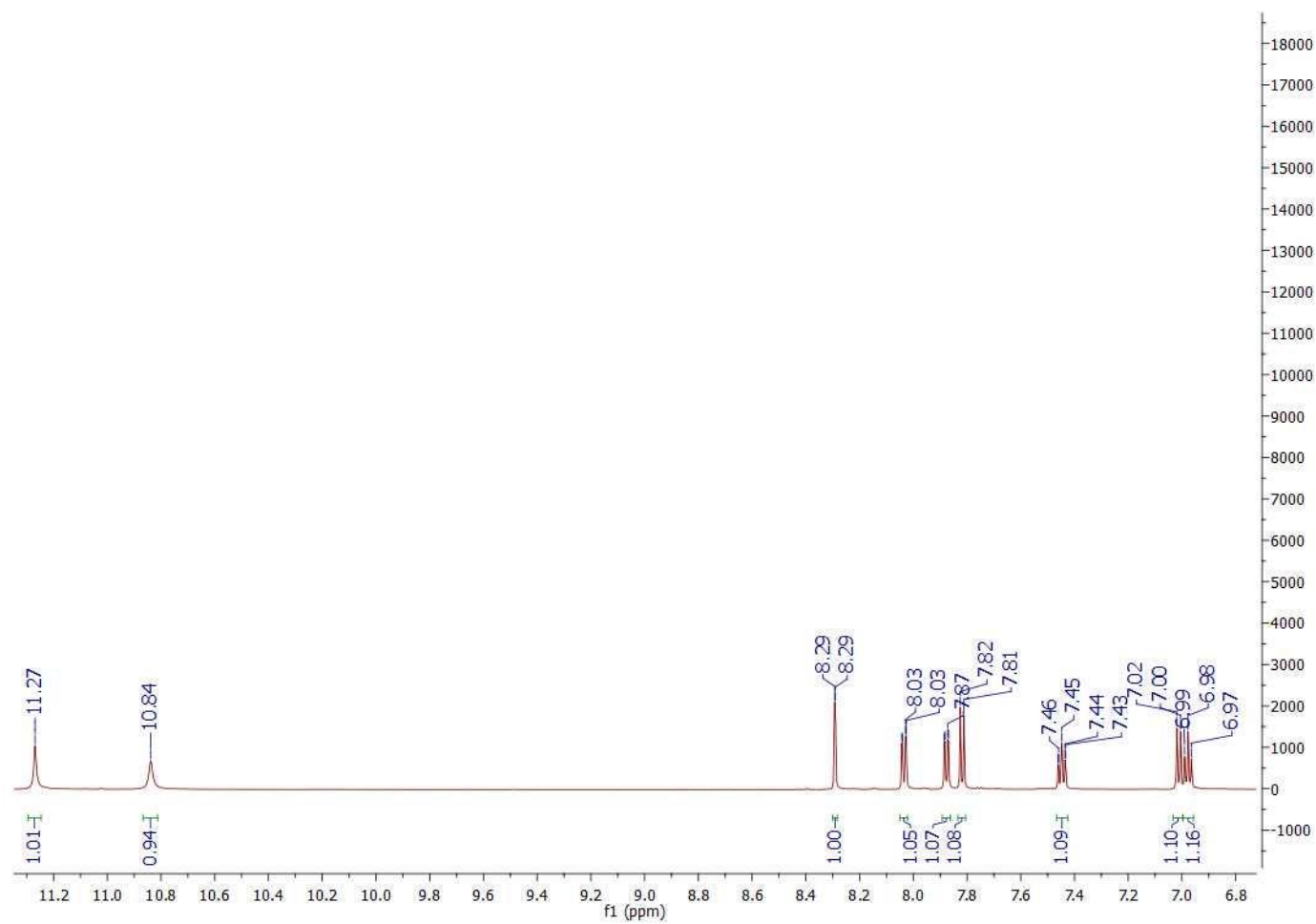
**Figura 30** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final IV (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>);



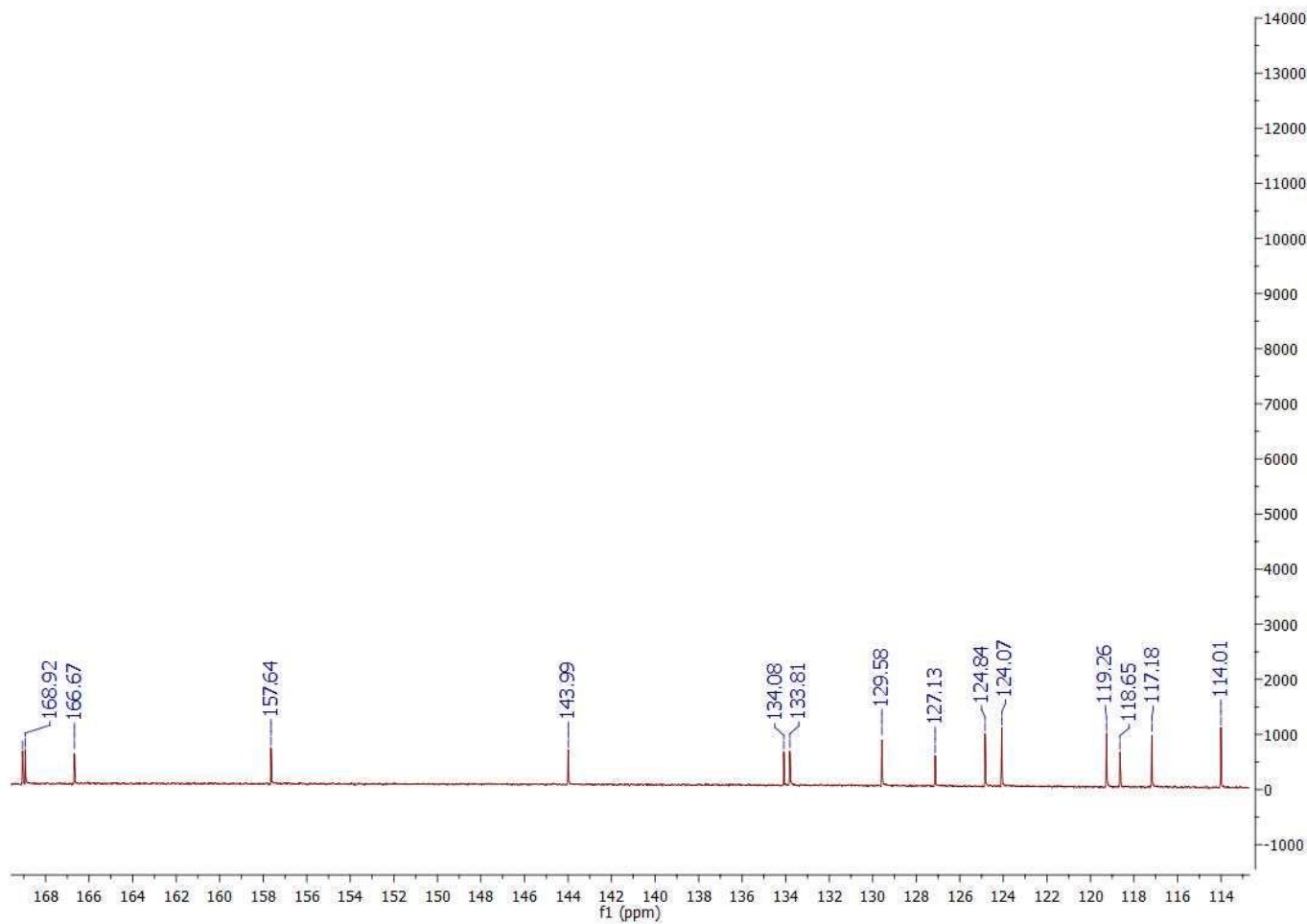
**Figura 31** – Mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final IV



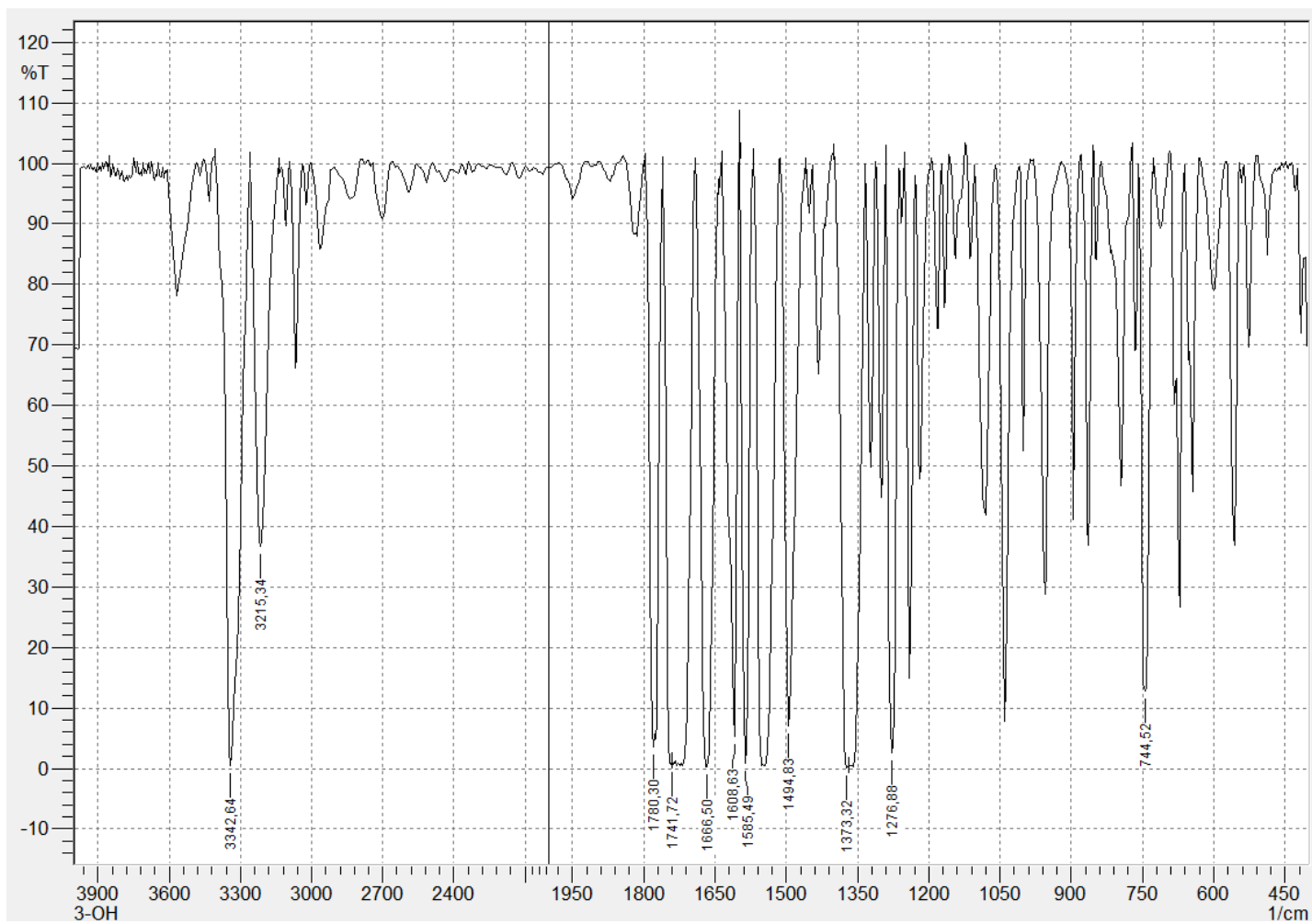
**Figura 32** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto IV



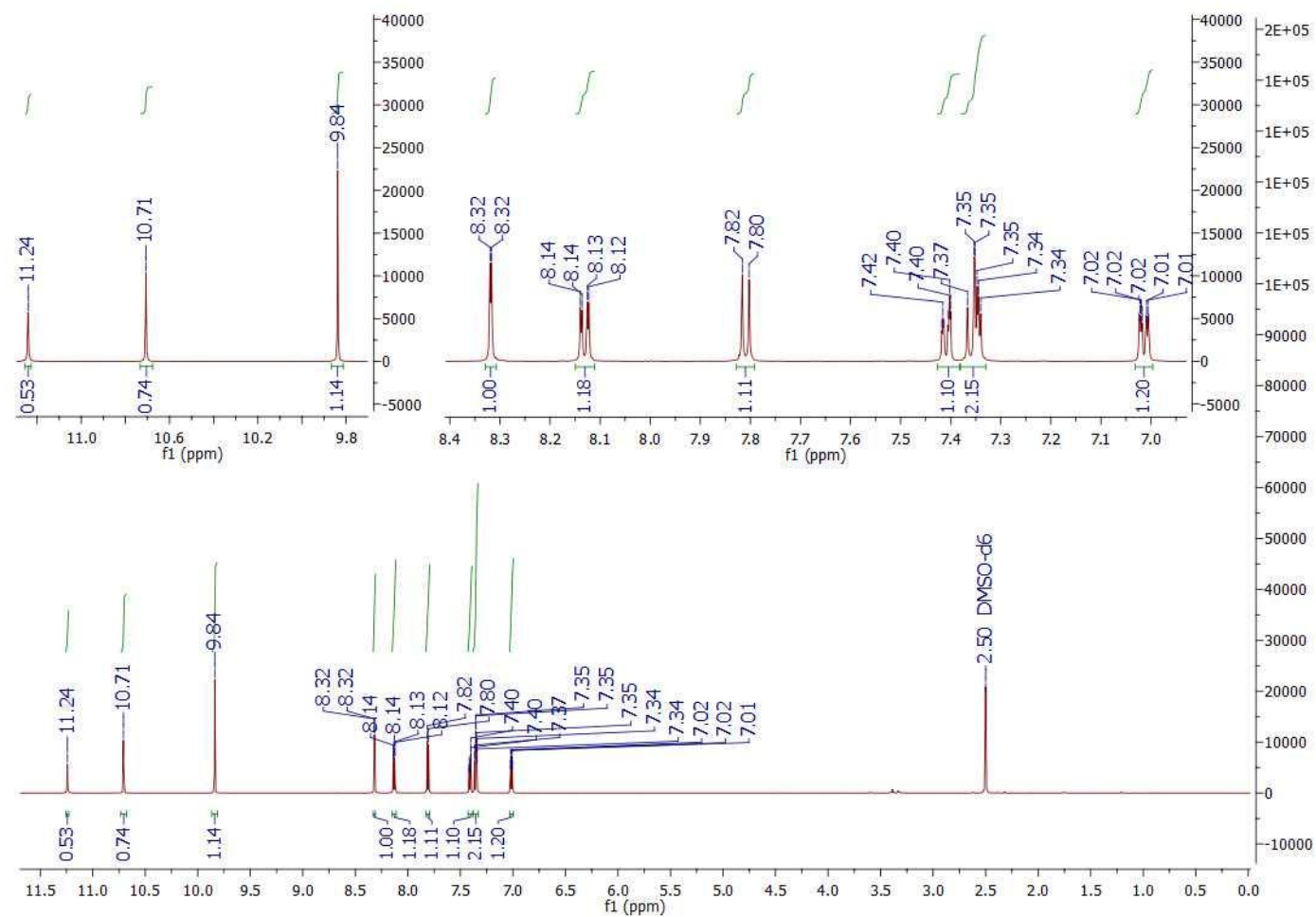
**Figura 33** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final V (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



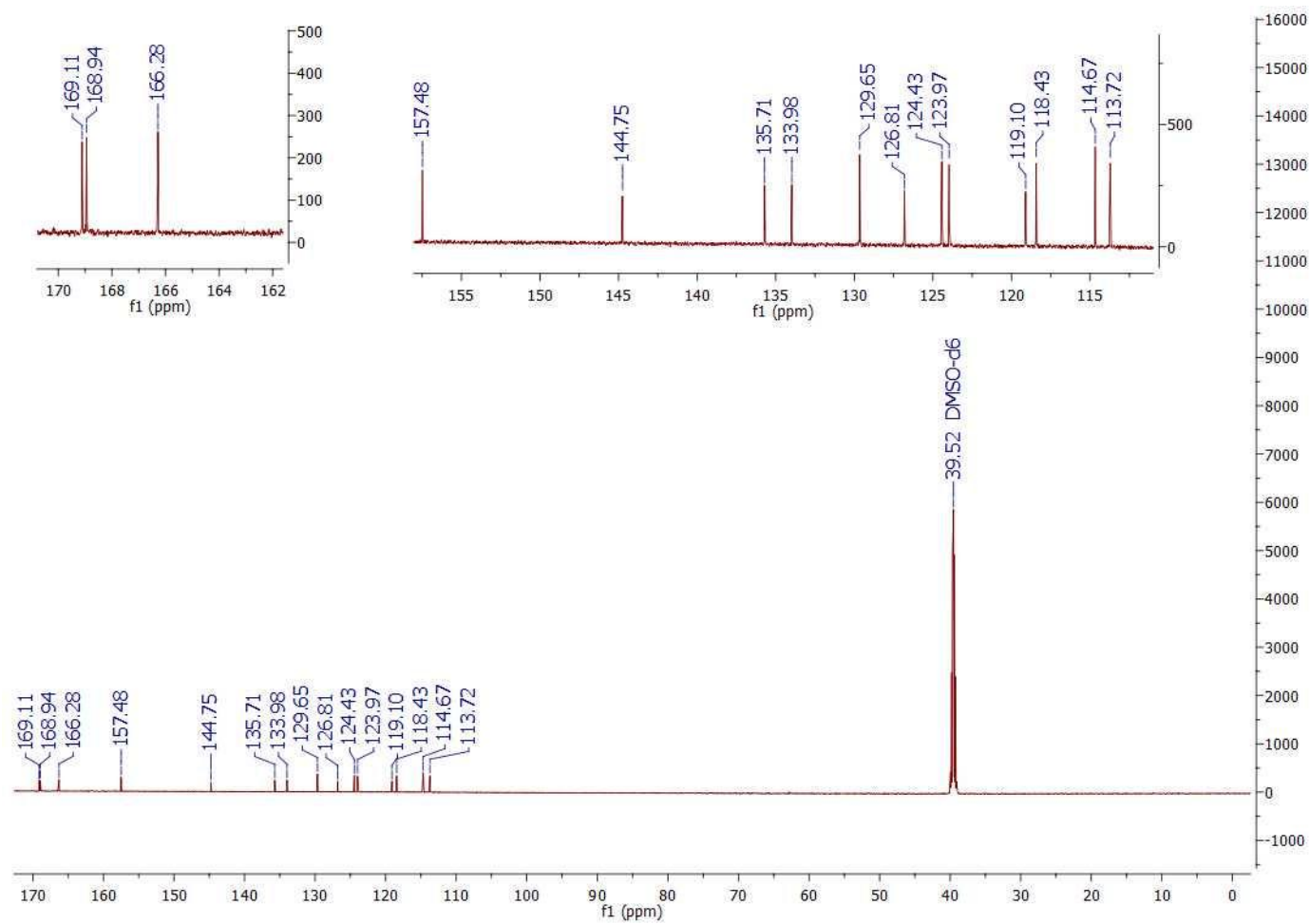
**Figura 34** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final V (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



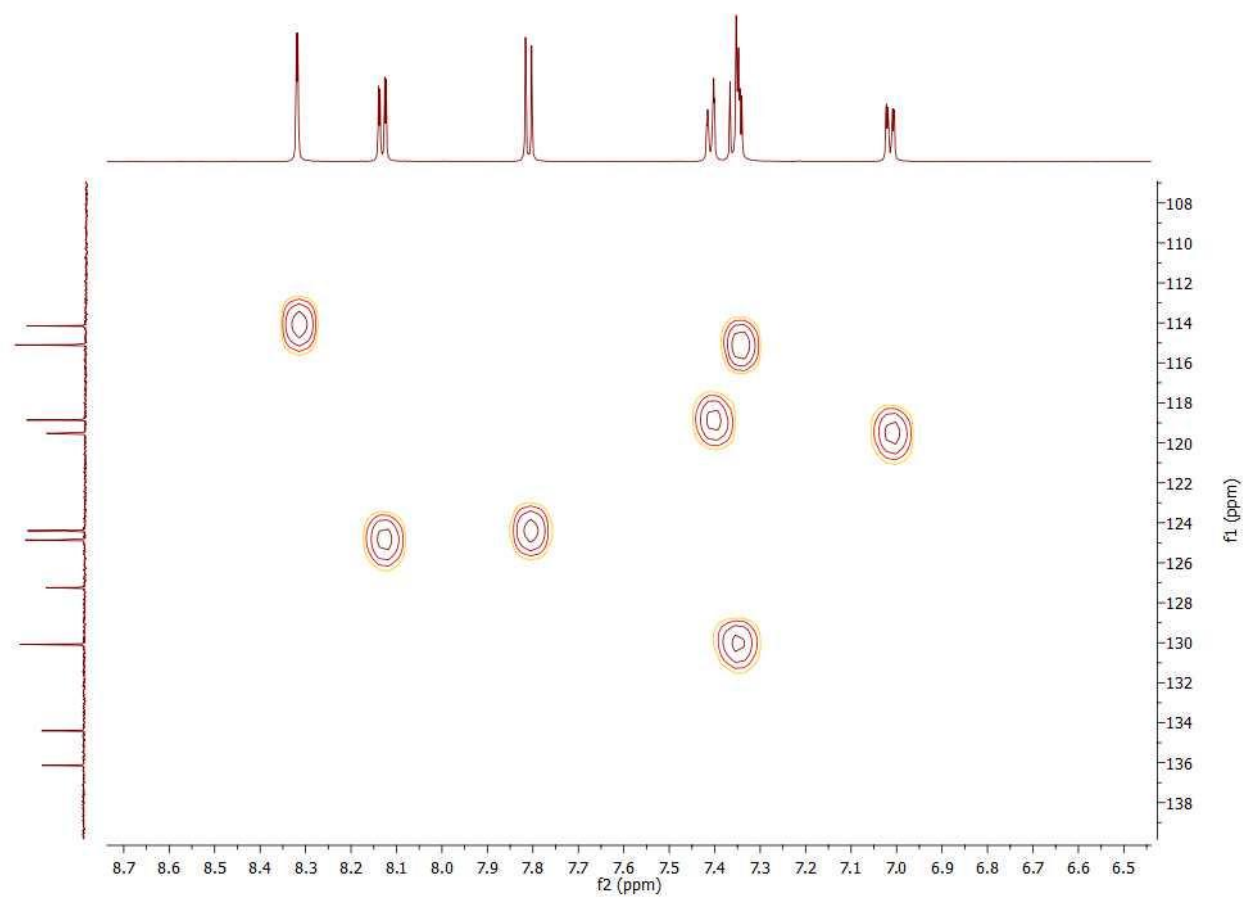
**Figura 35** - Espectro na região de infravermelho composto final VI (pastilha de KBr)



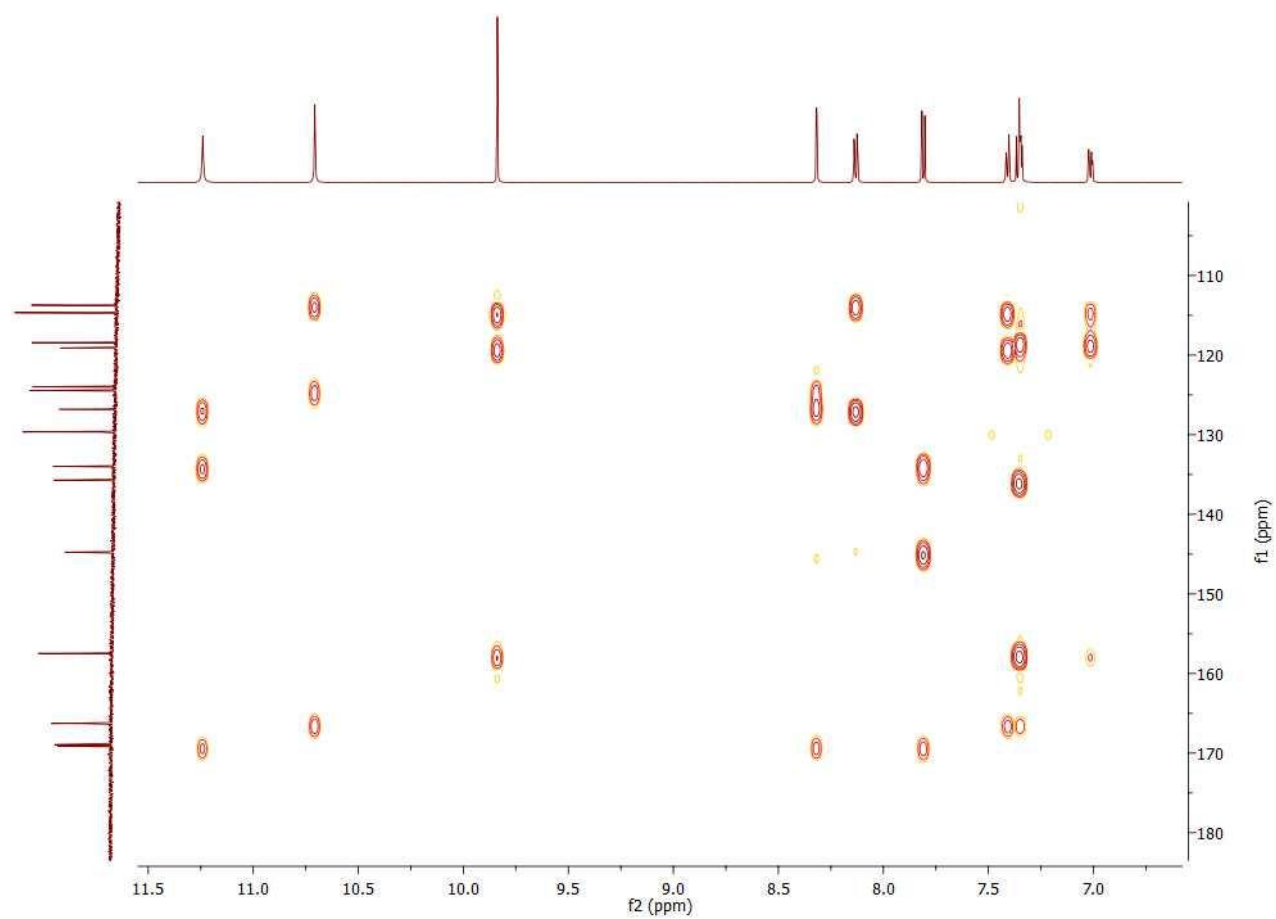
**Figura 36** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final VI (600 MHz, DMSO- $d_6$ )



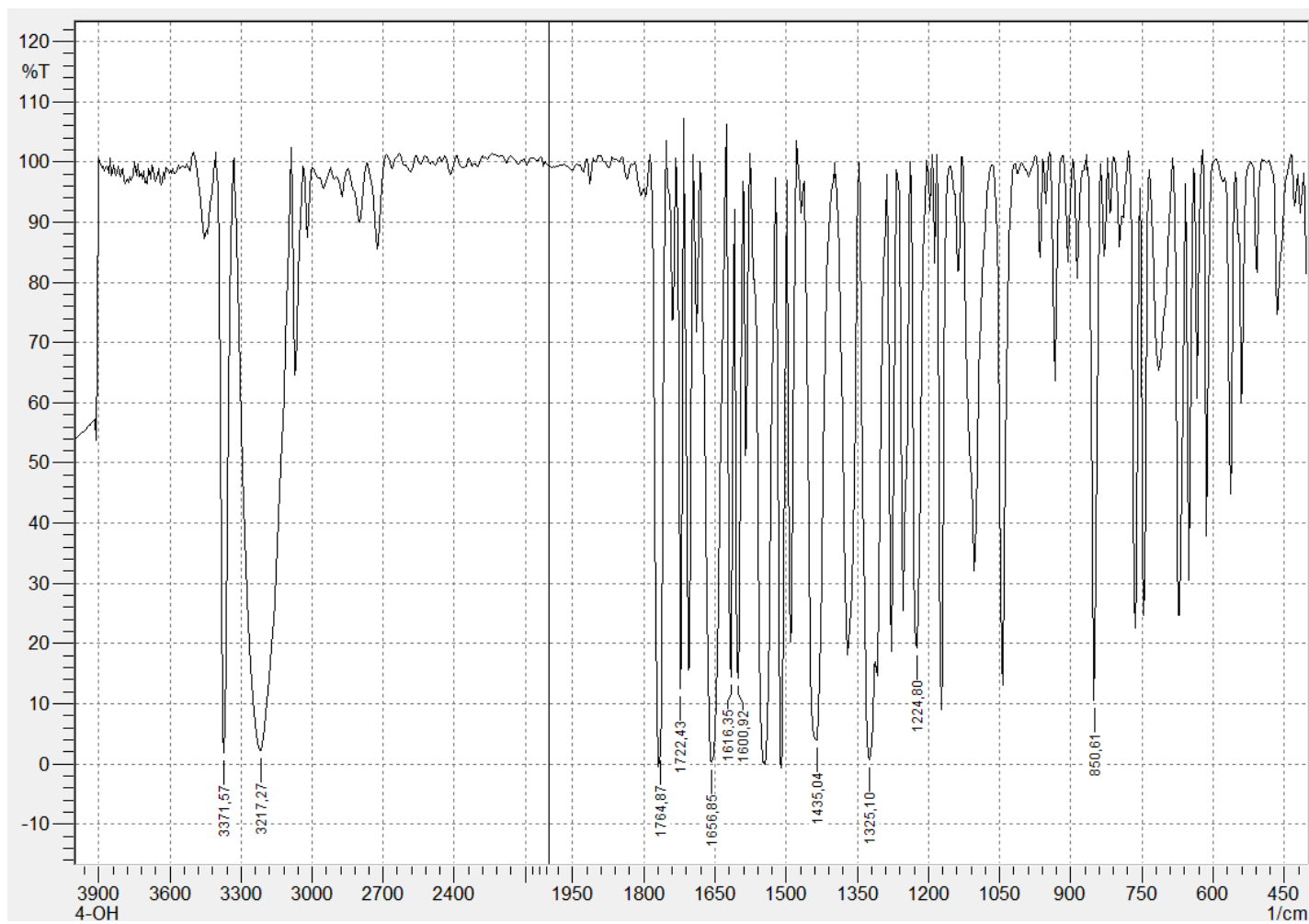
**Figura 37** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final VI (75 MHz, DMSO- $d_6$ )



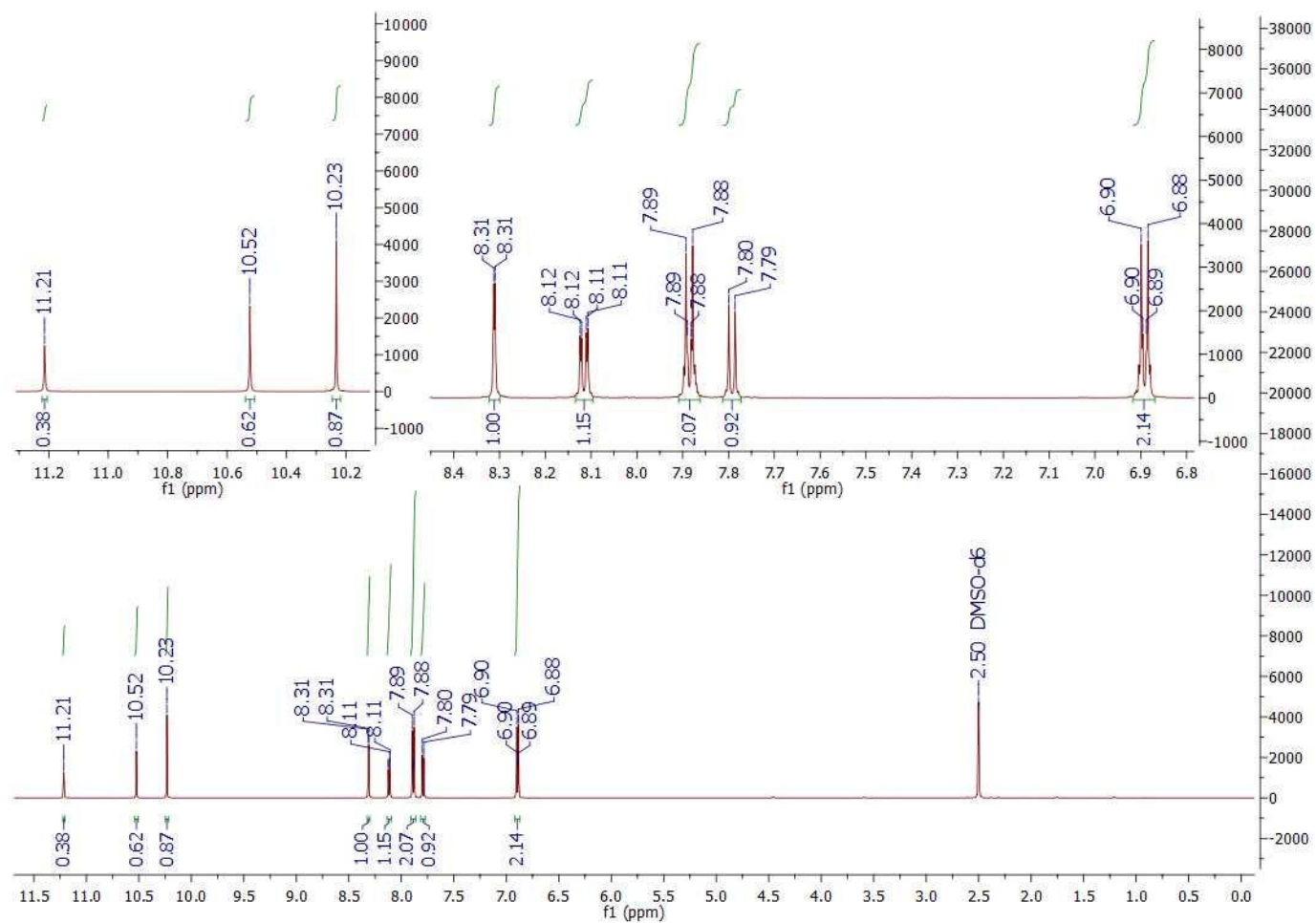
**Figura 38** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final VI



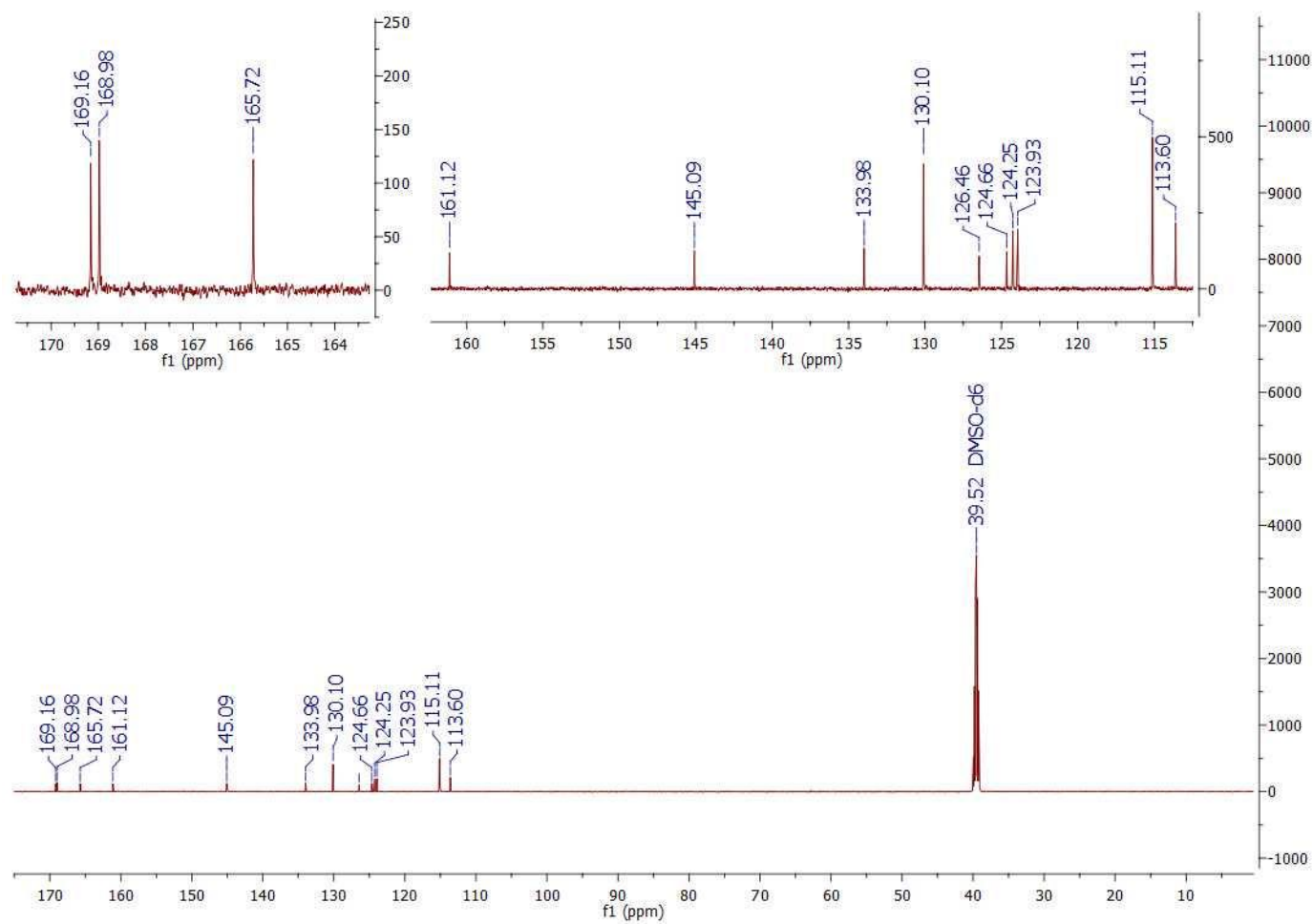
**Figura 39** – Expansão do mapa de correlação HMBC do composto final VI



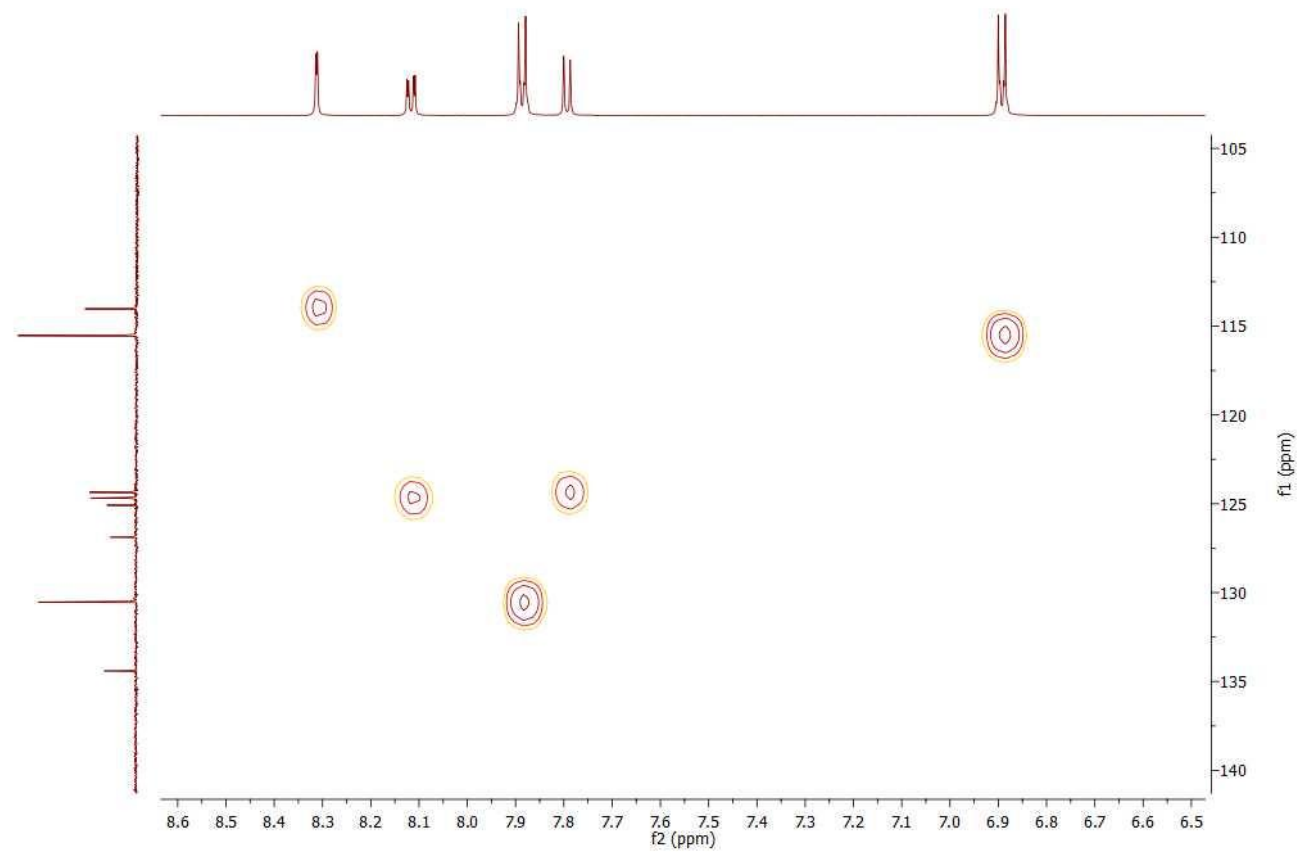
**Figura 40** - Espectro na região de infravermelho composto final VII (pastilha de KBr)



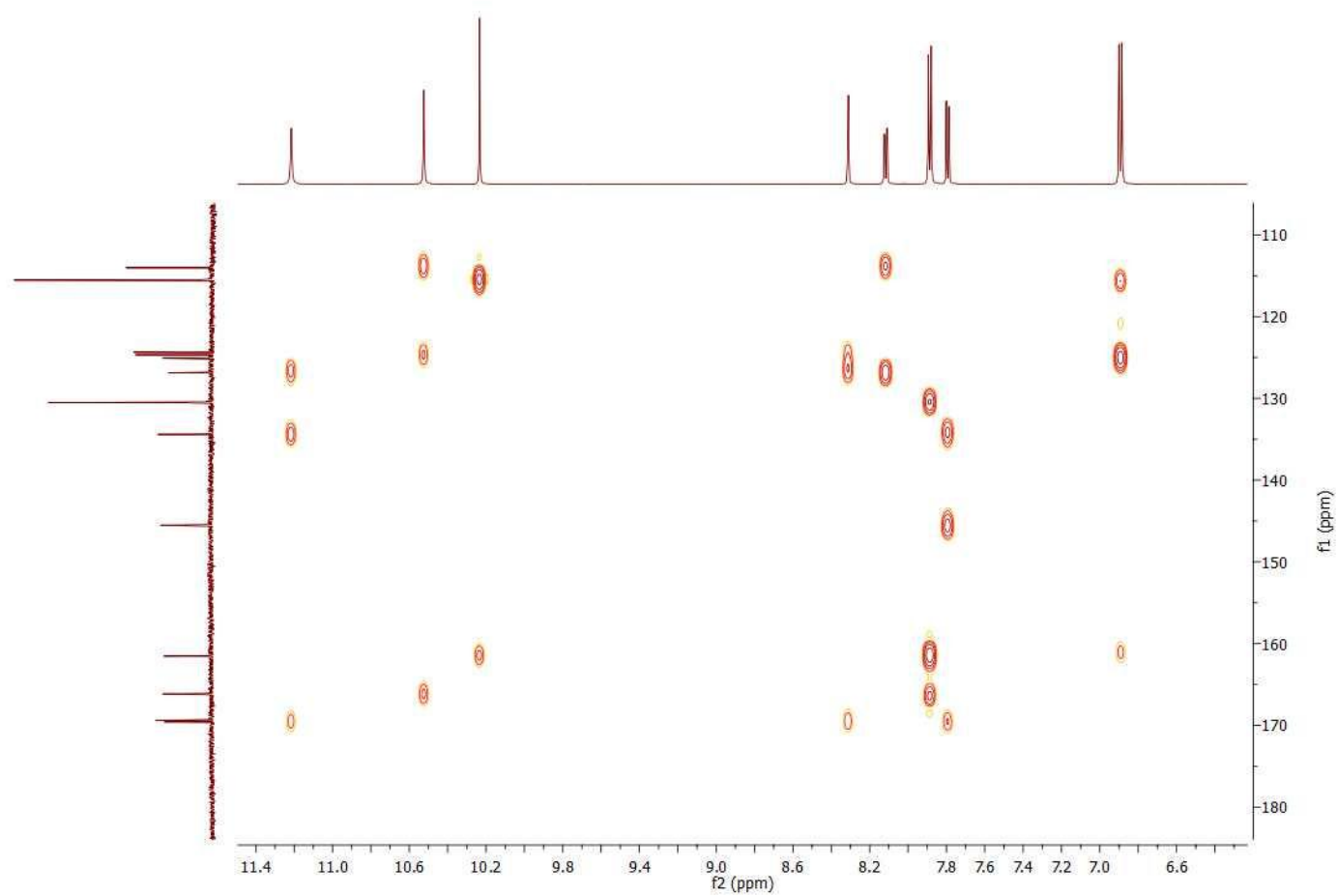
**Figura 41** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final VII (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



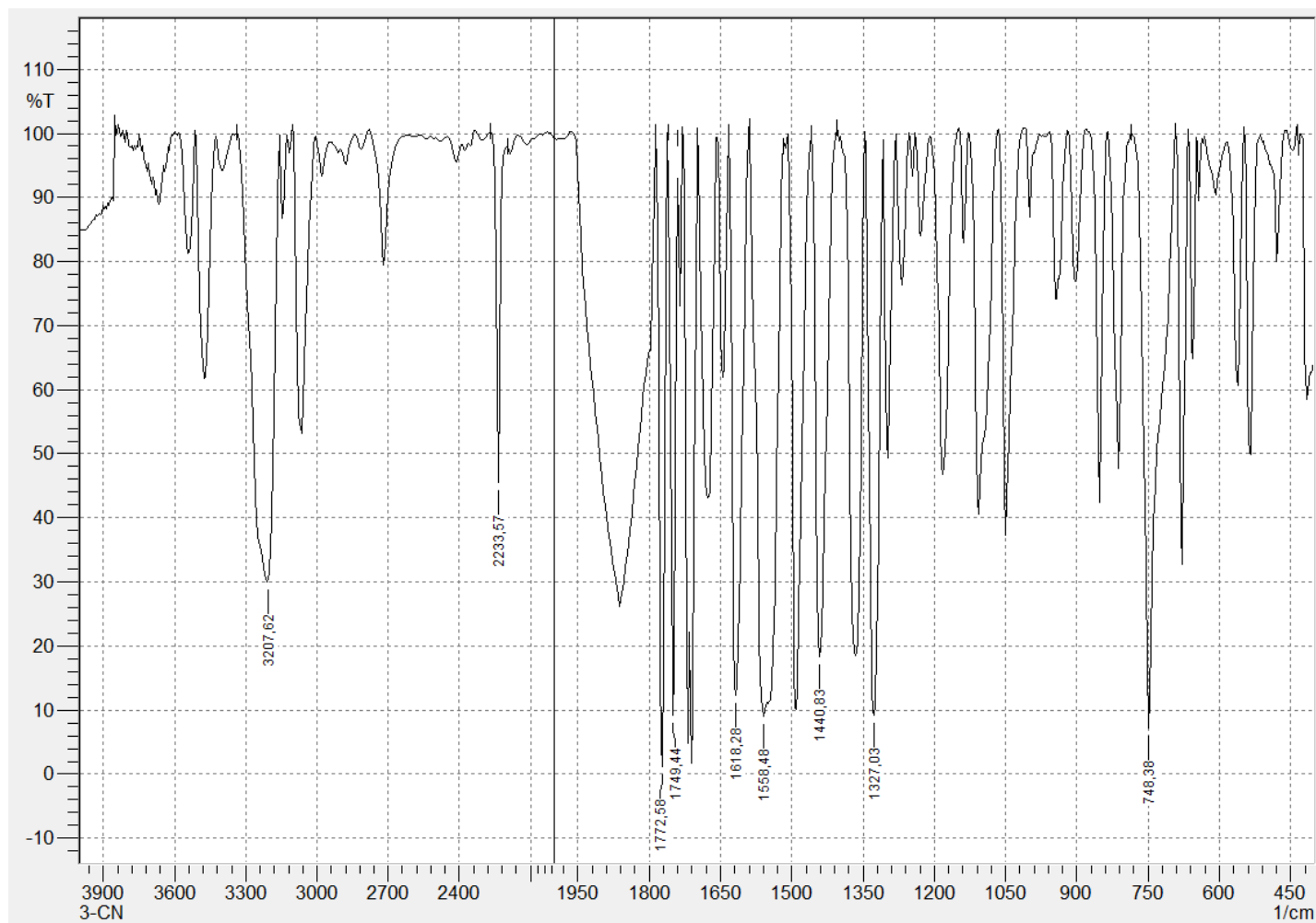
**Figura 42** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final VII (75 MHz, DMSO- $d_6$ )



**Figura 43** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final VII

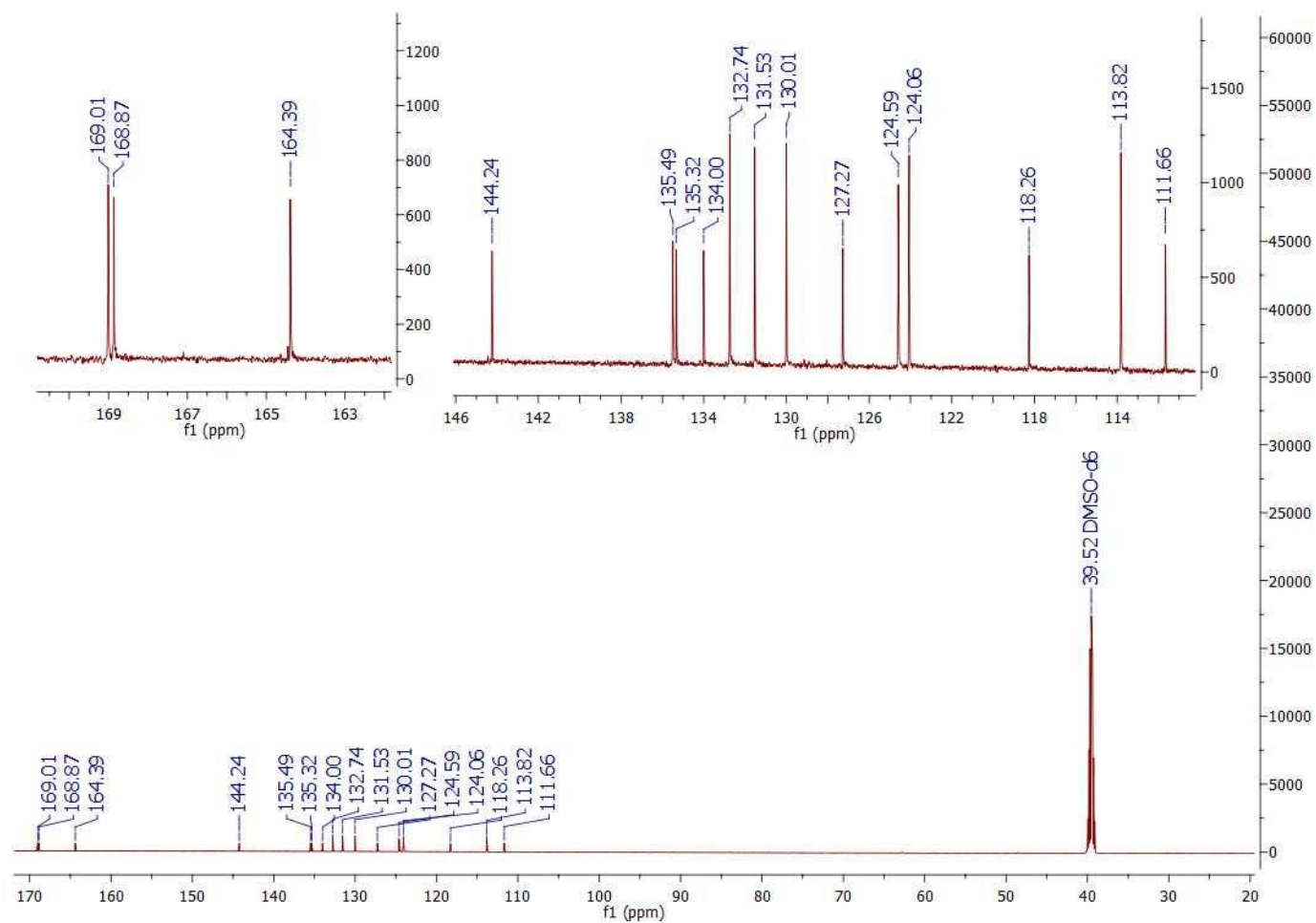


**Figura 44** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final VII

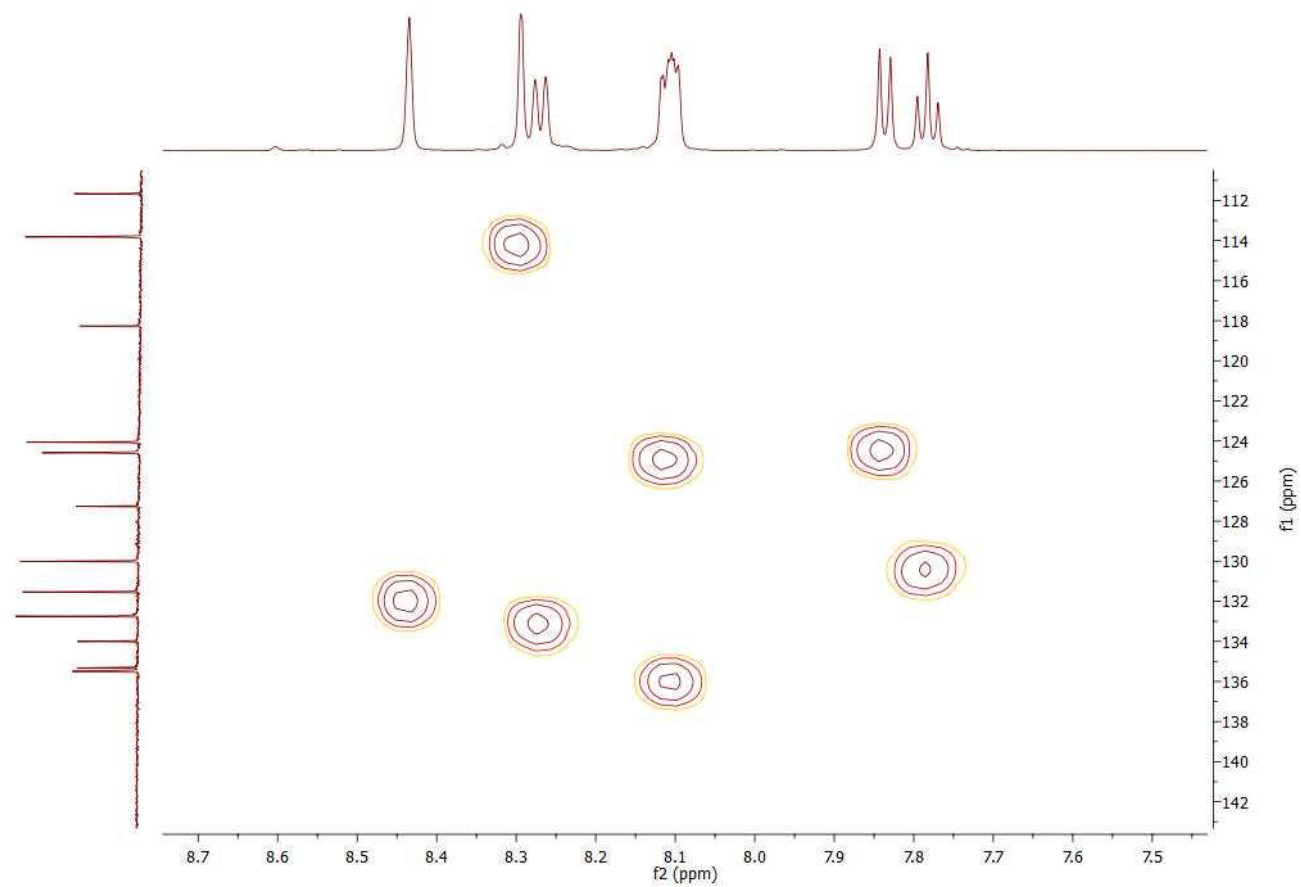


**Figura 45** - Espectro na região de infravermelho composto final VIII (pastilha de KBr)

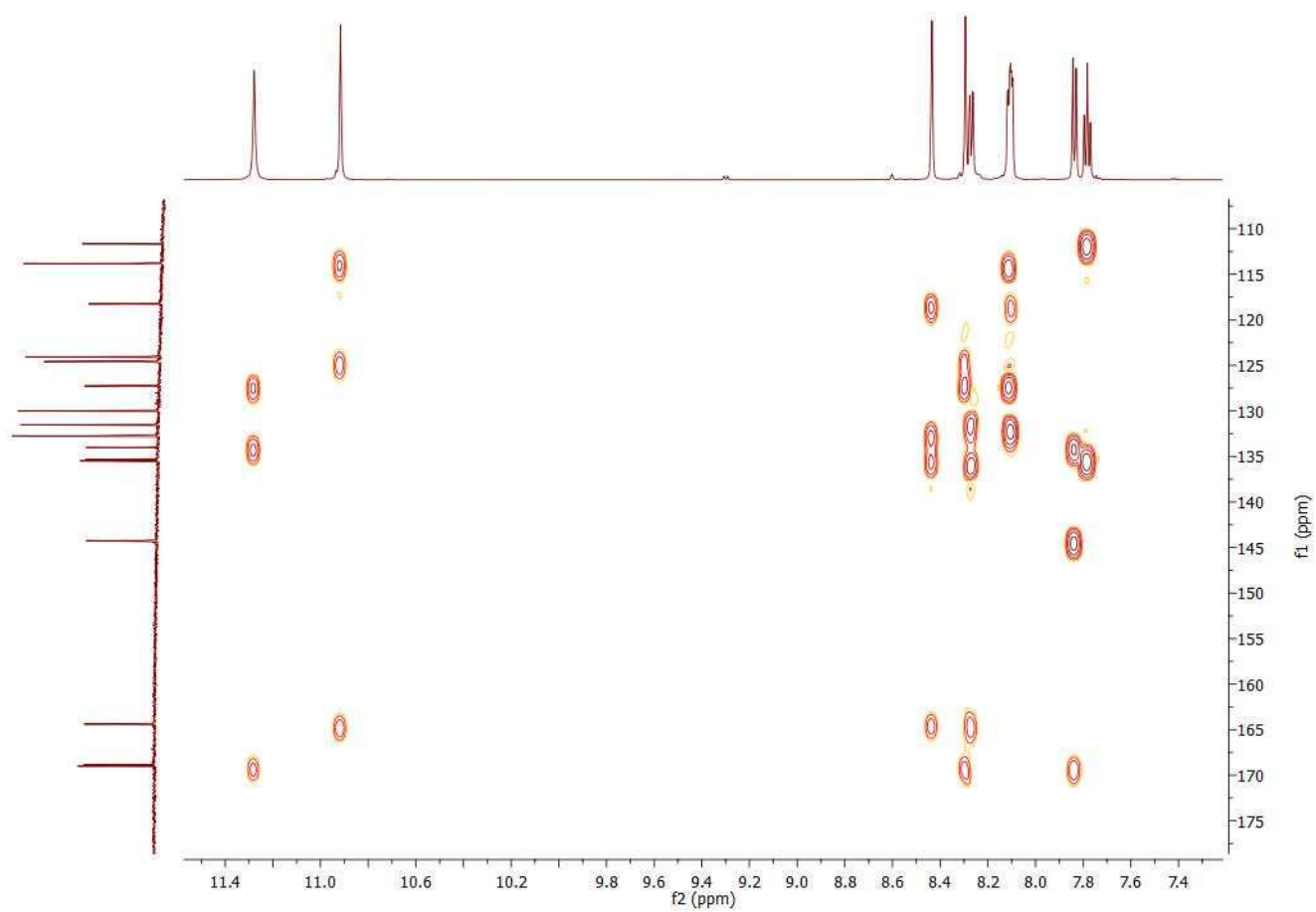




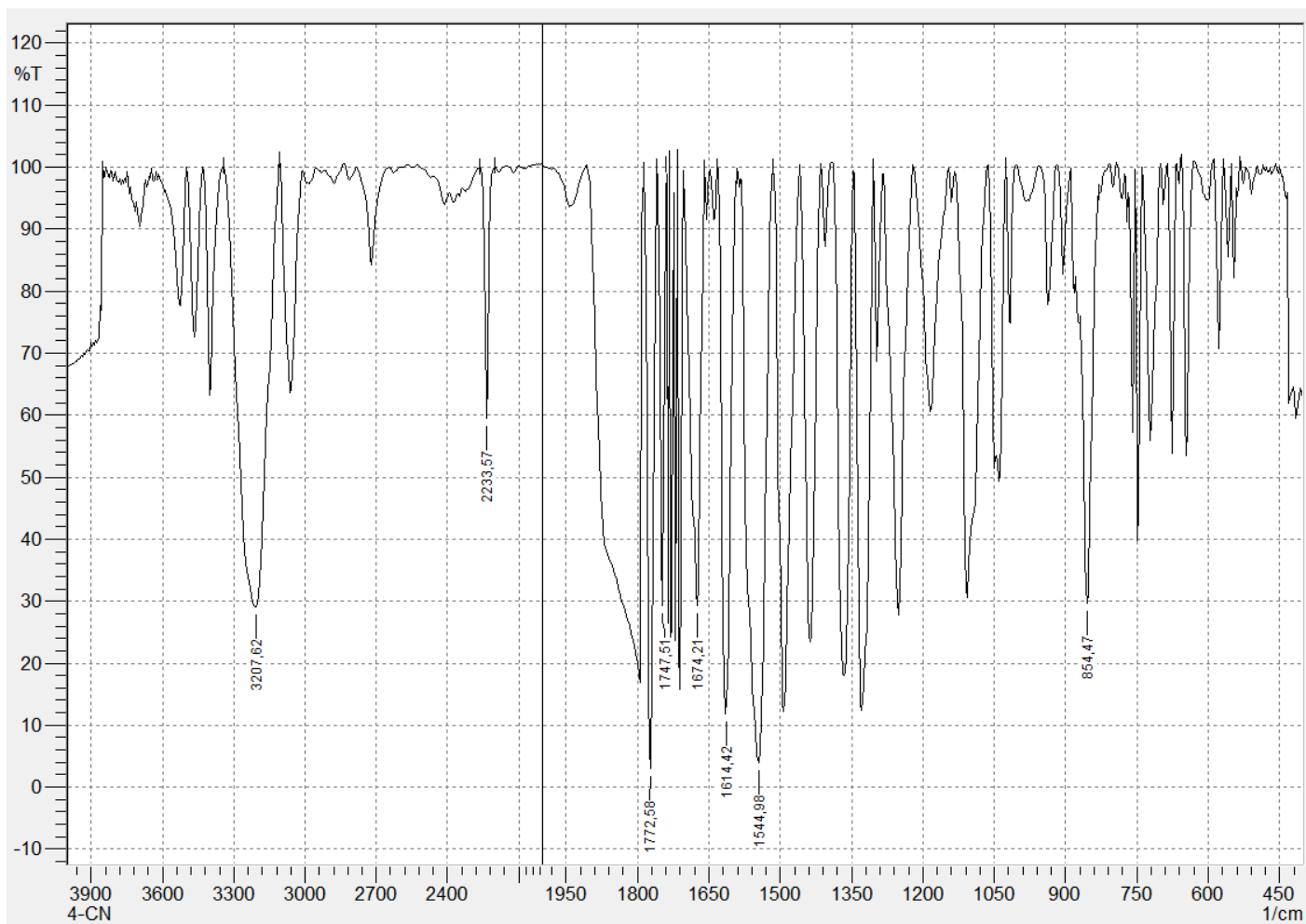
**Figura 47** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final VIII (75 MHz, DMSO- $d_6$ )



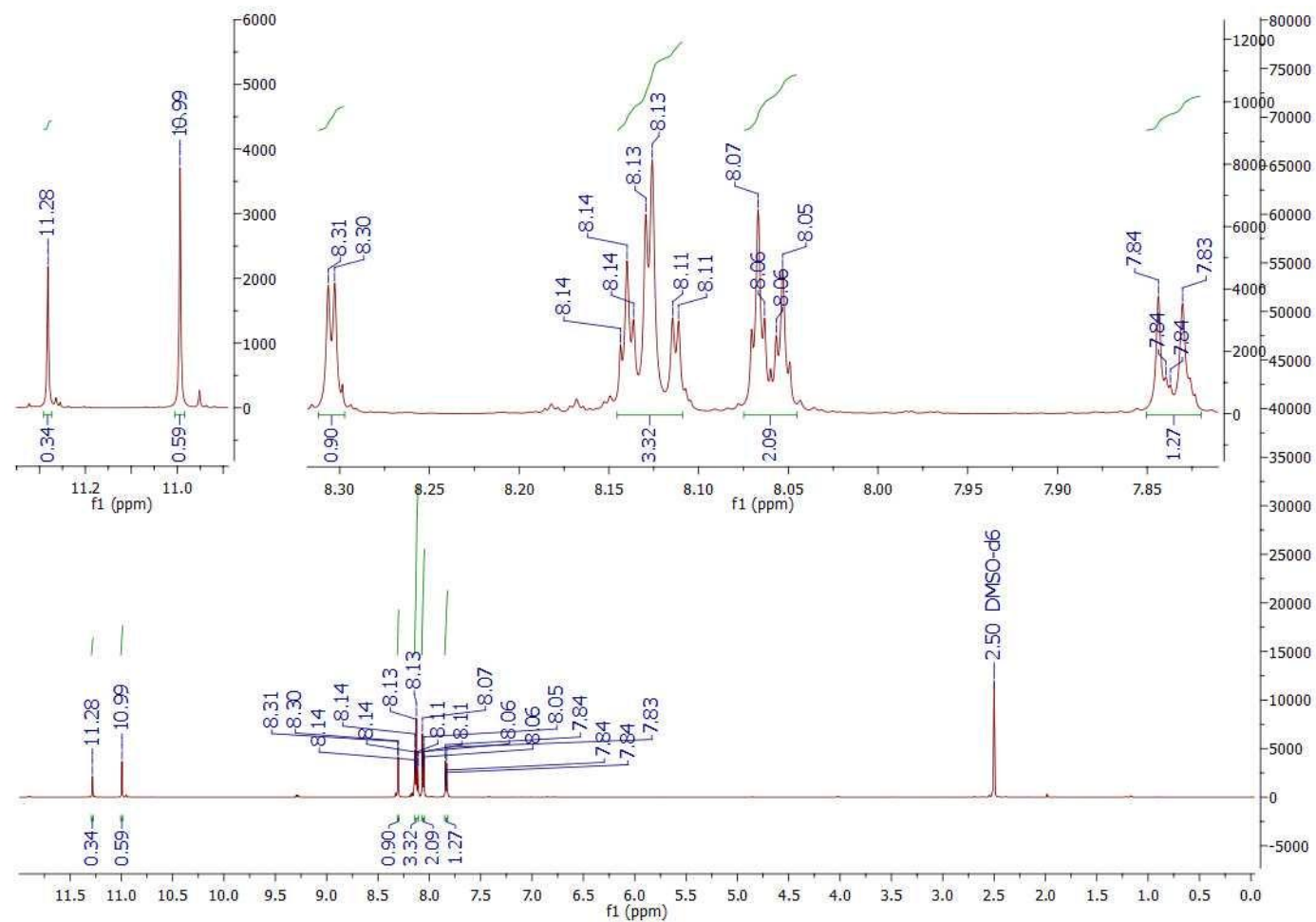
**Figura 48** – Expansão do mapa de correlação HSQC do composto final VIII



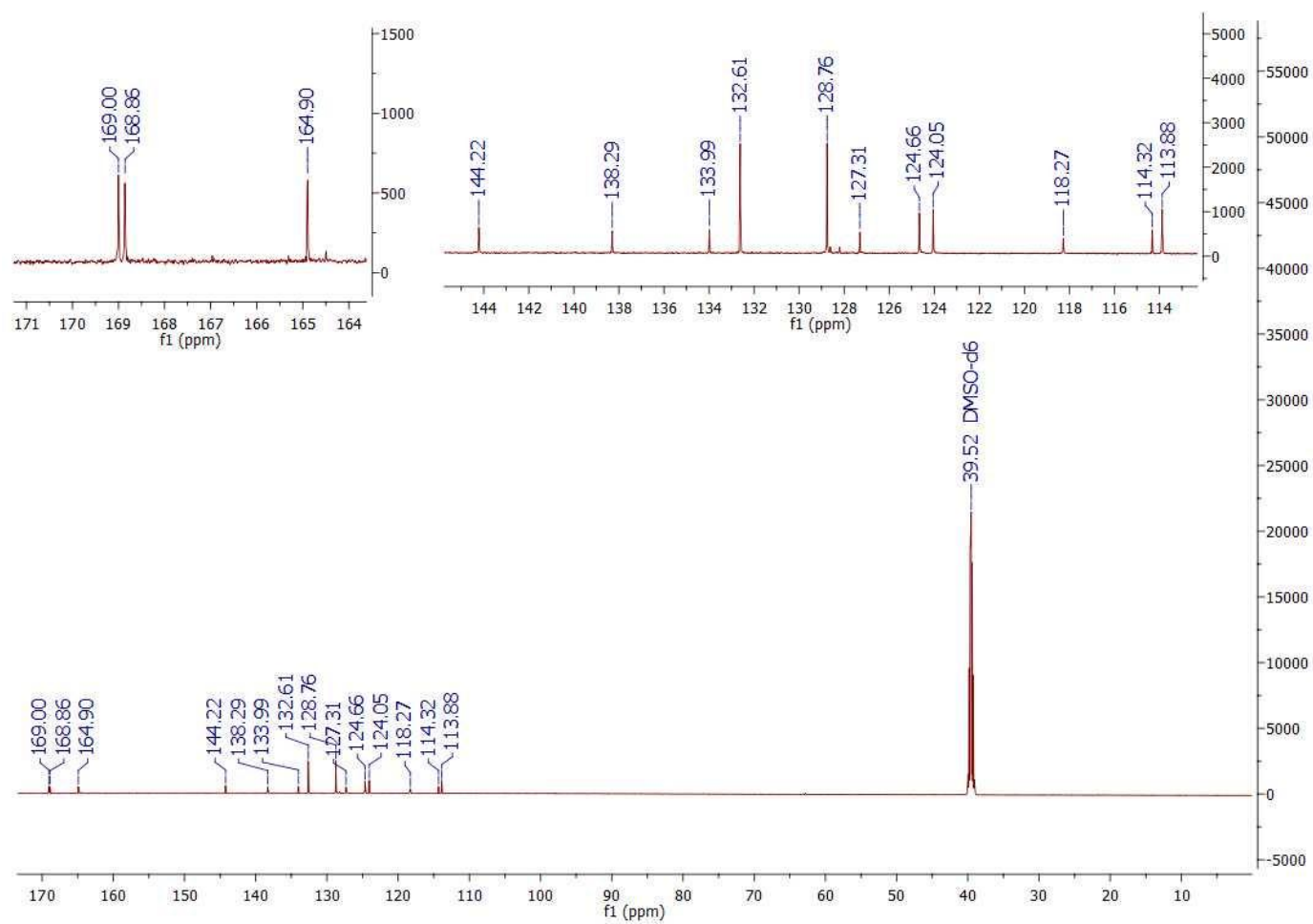
**Figura 49** - Expansão do mapa de correlação HMBC do composto final VIII



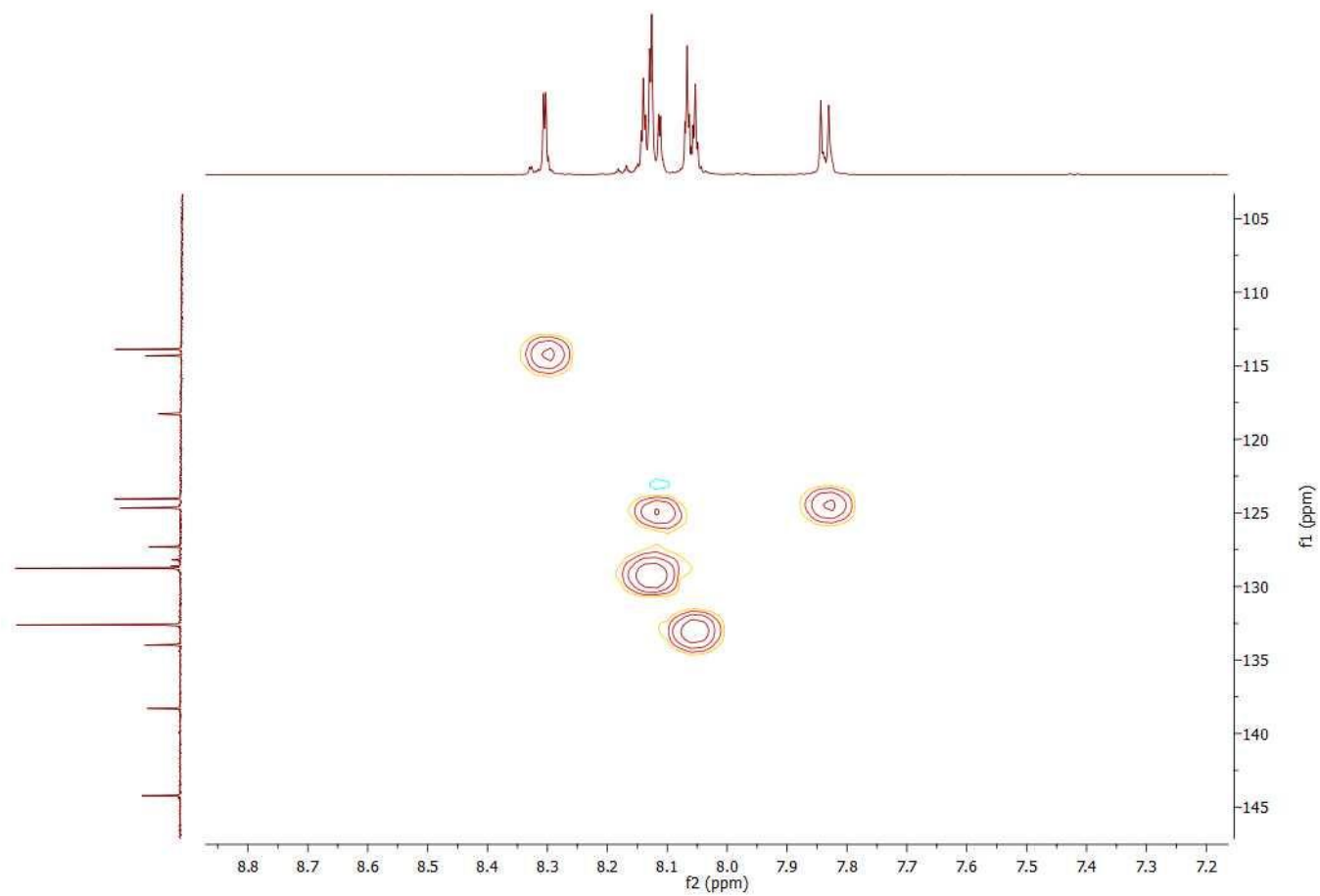
**Figura 50** - Espectro na região de infravermelho composto final IX (pastilha de KBr)



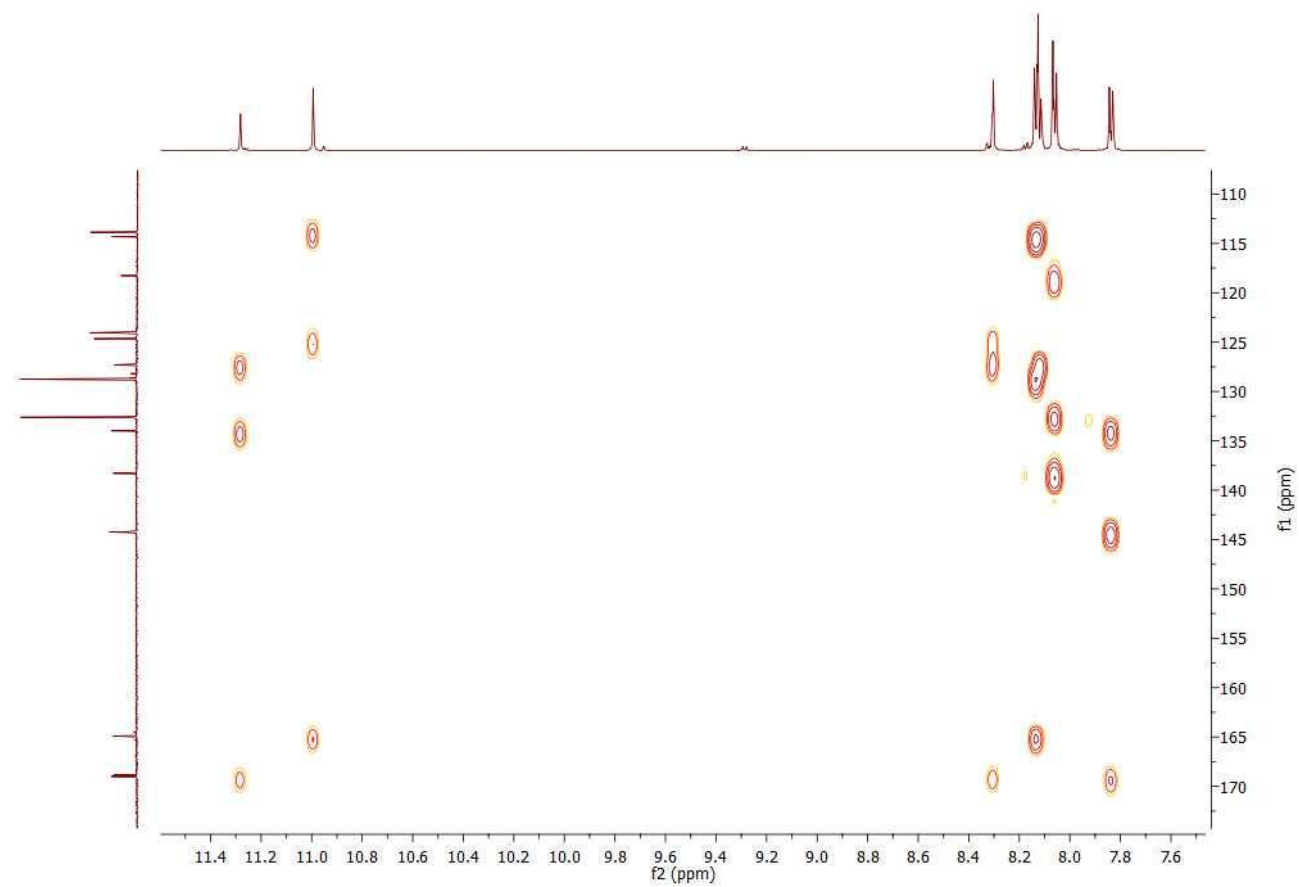
**Figura 51** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final IX (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



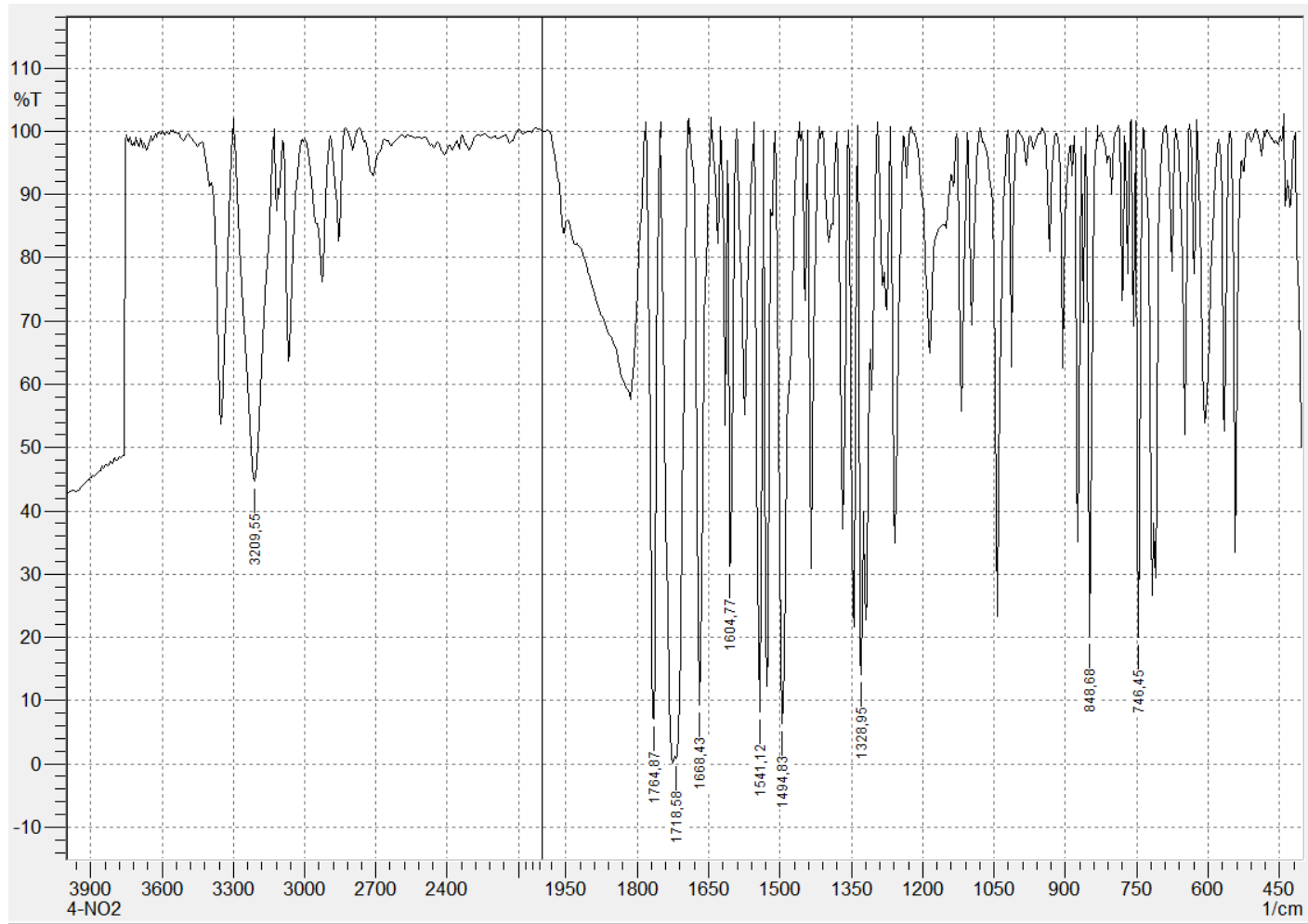
**Figura 52** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final IX (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



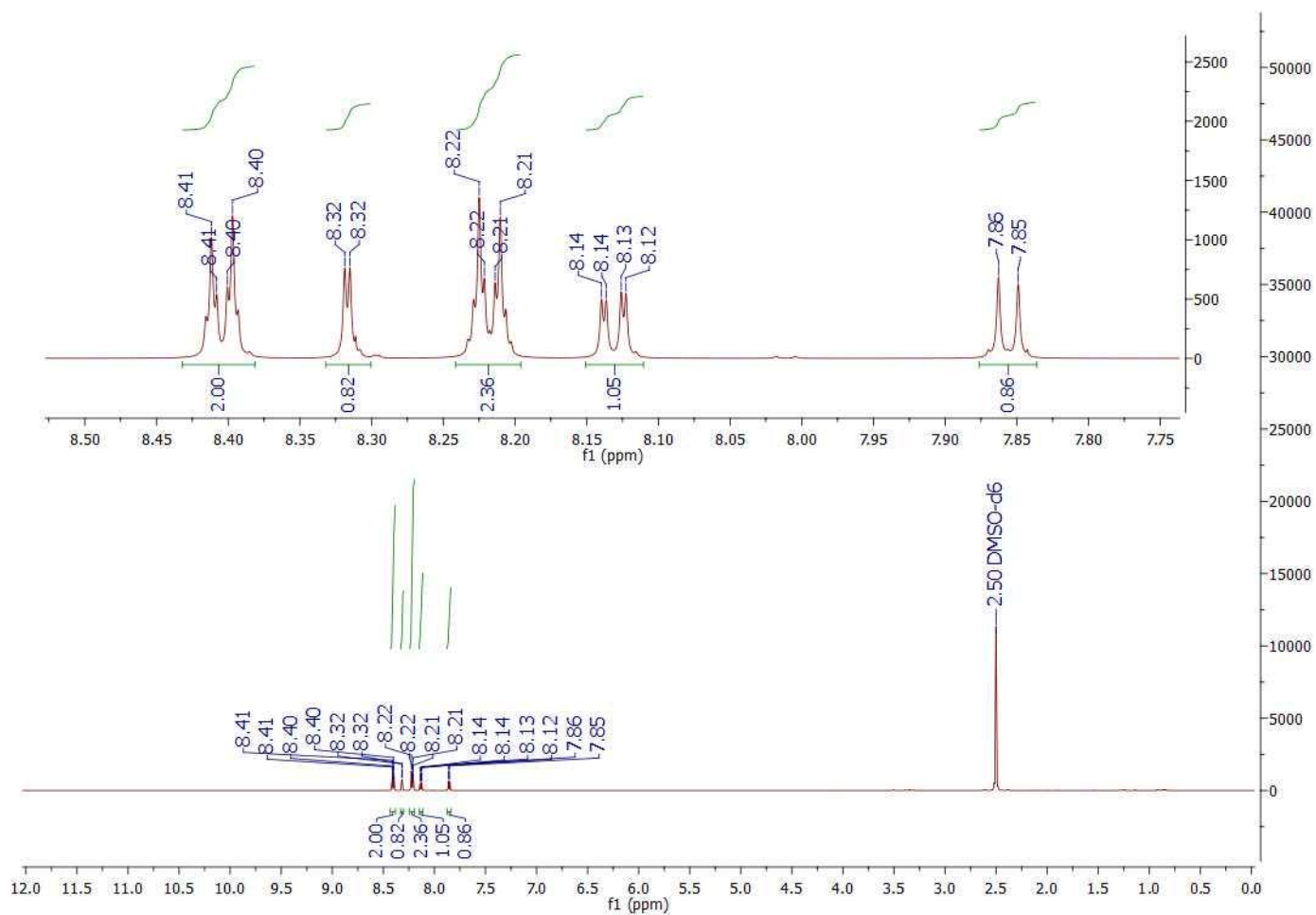
**Figura 53** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final IX



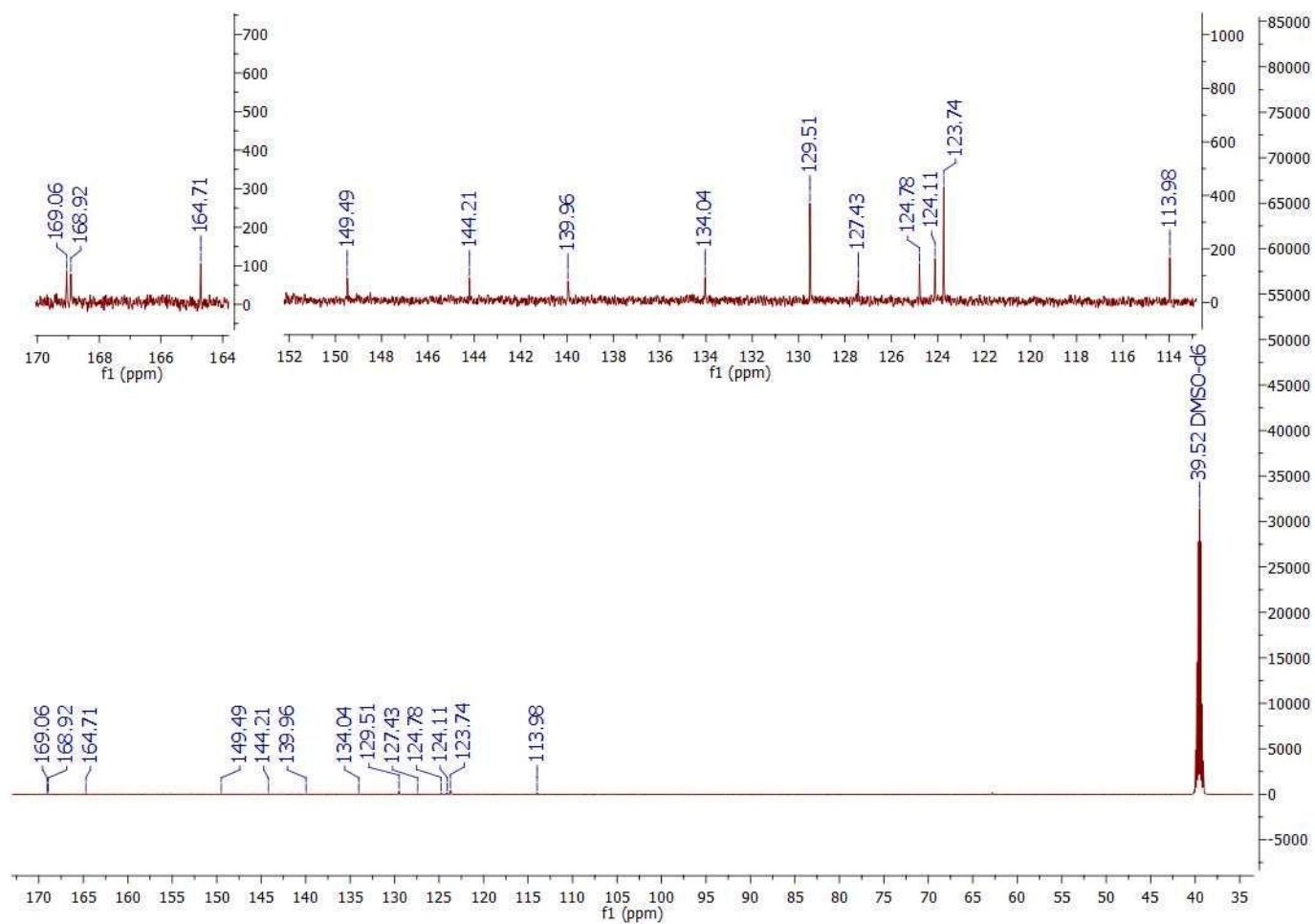
**Figura 54** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final IX



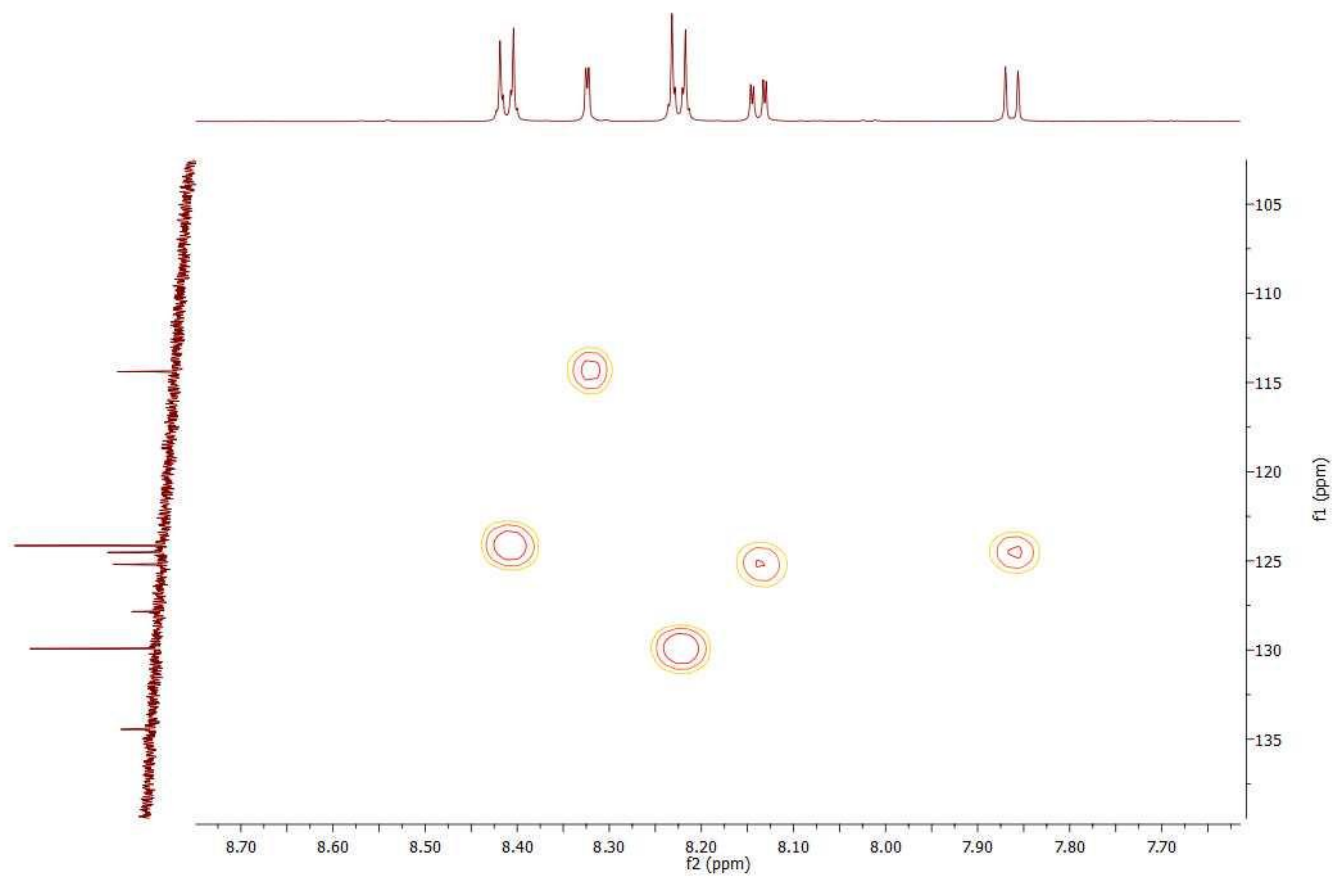
**Figura 55** - Espectro na região de infravermelho composto final X (pastilha de KBr)



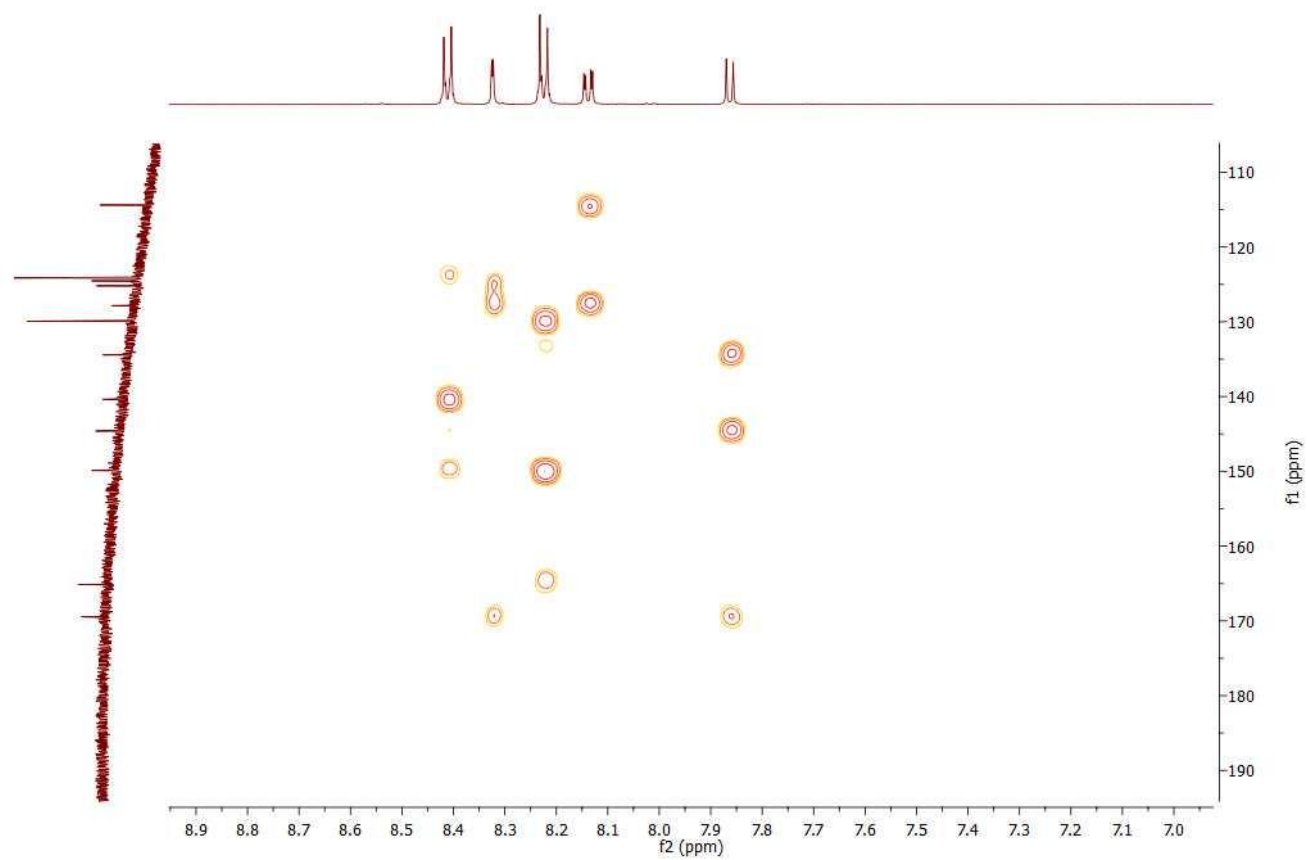
**Figura 56** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final X (600 MHz, DMSO- $d_6$ )



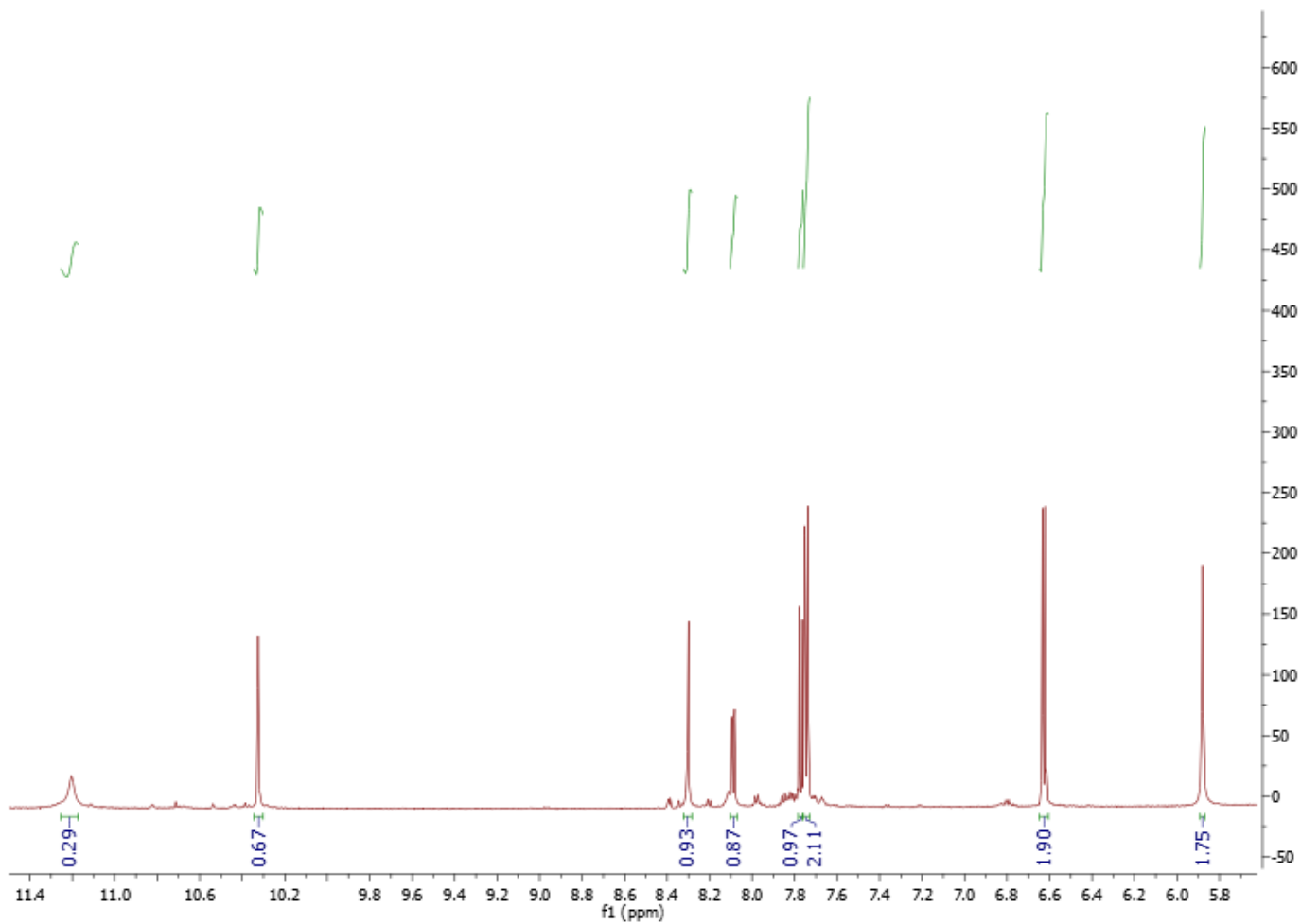
**Figura 57** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final X (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



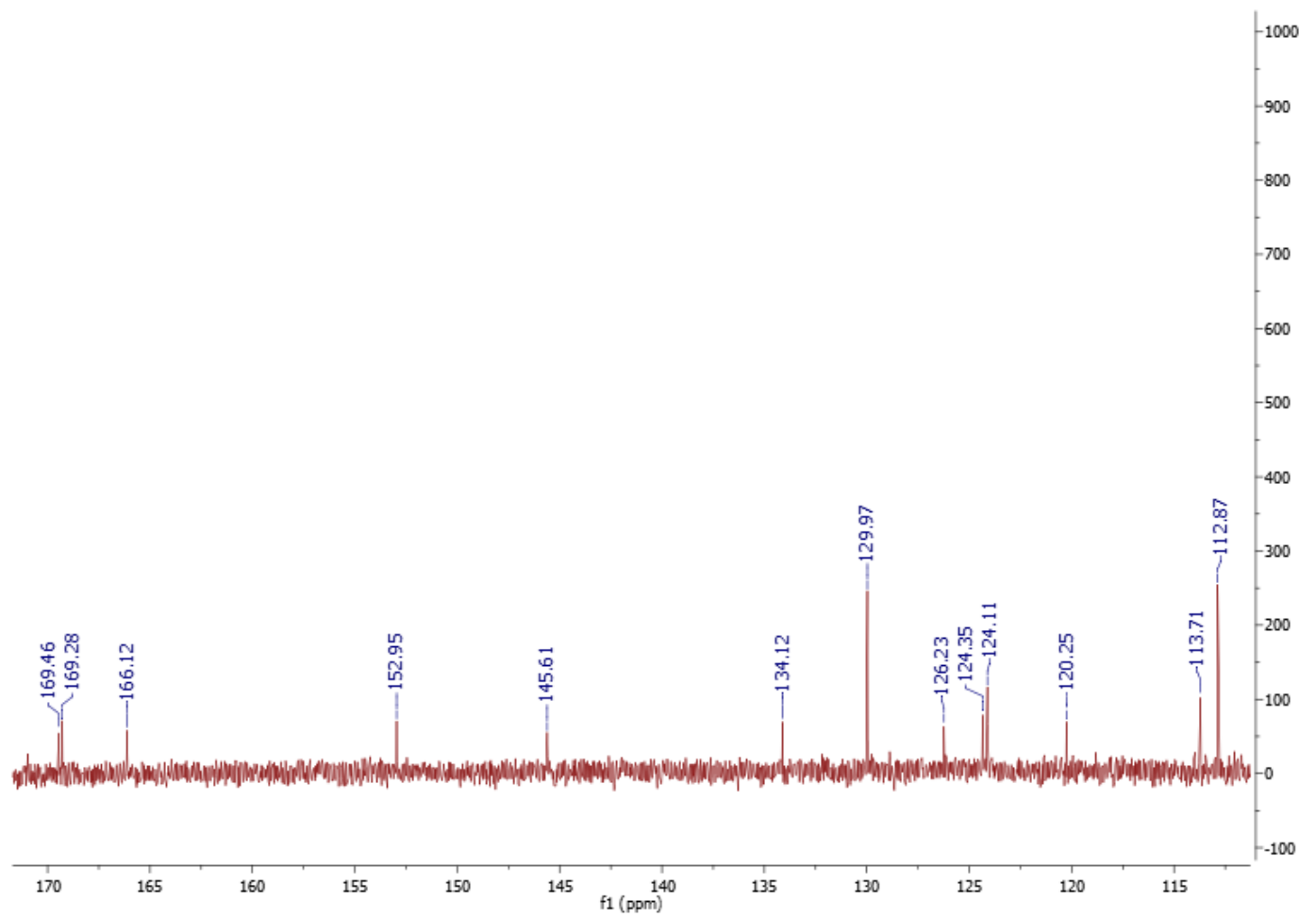
**Figura 58** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final X



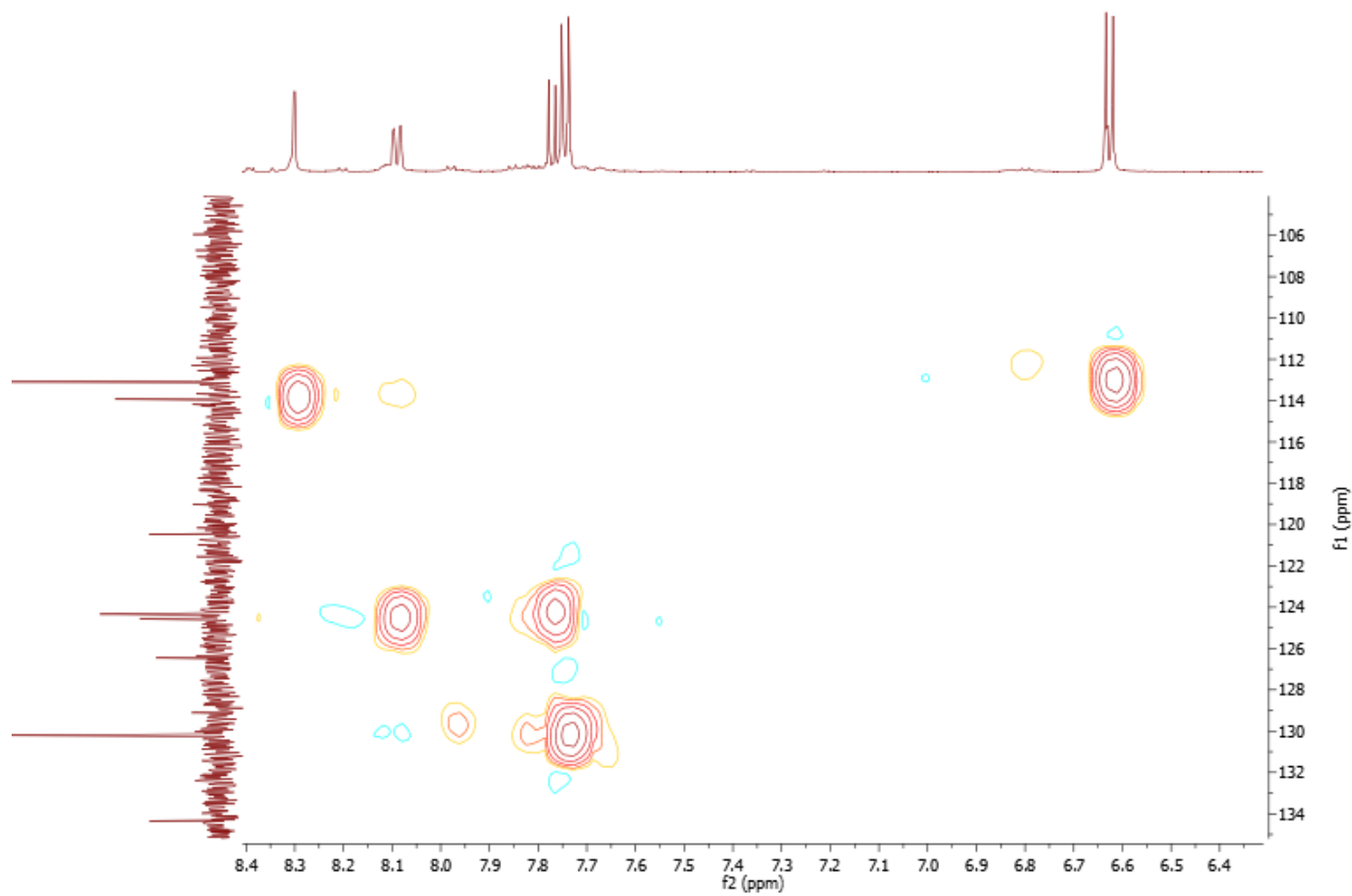
**Figura 59** – Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final X



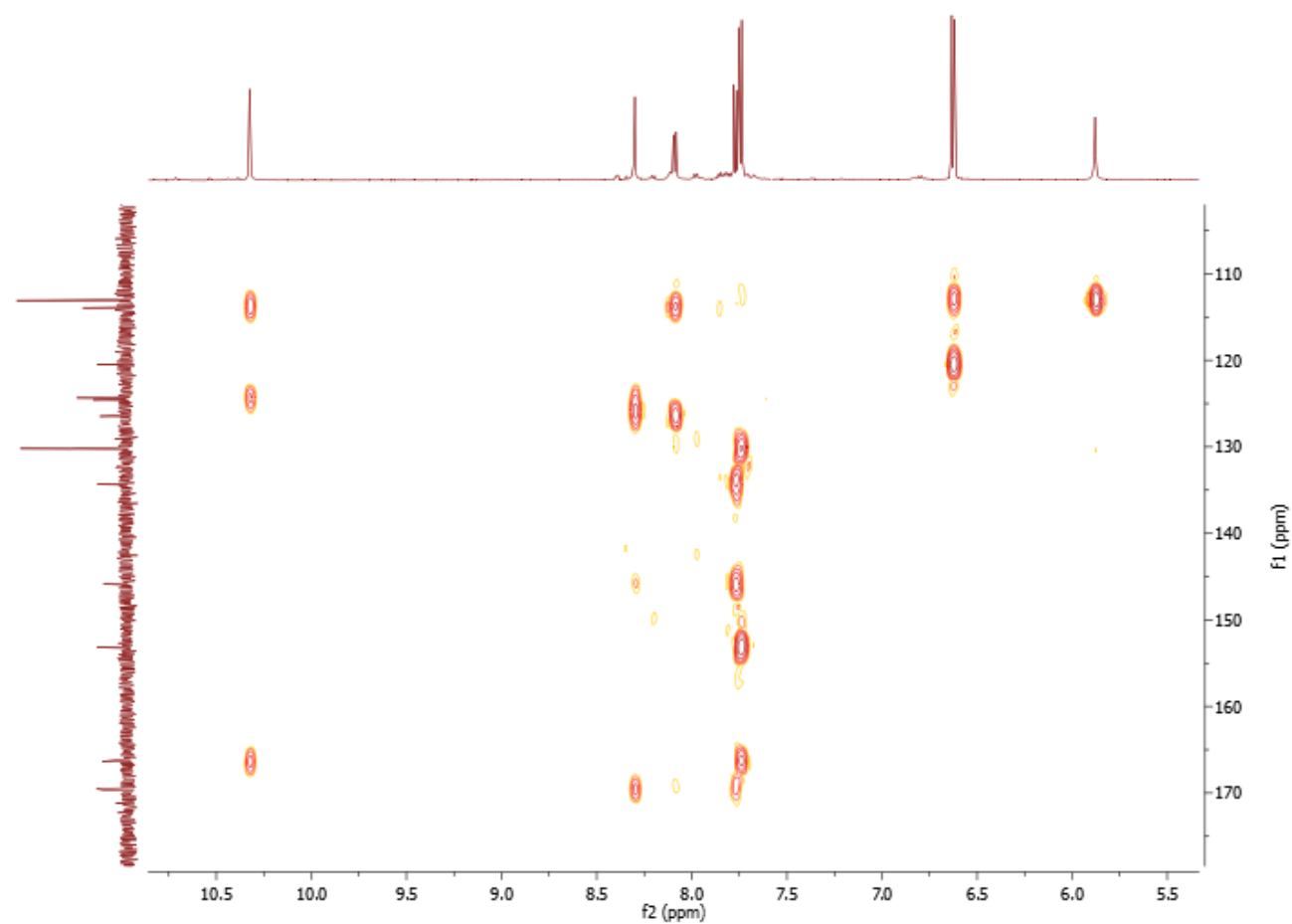
**Figura 60** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final XI (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



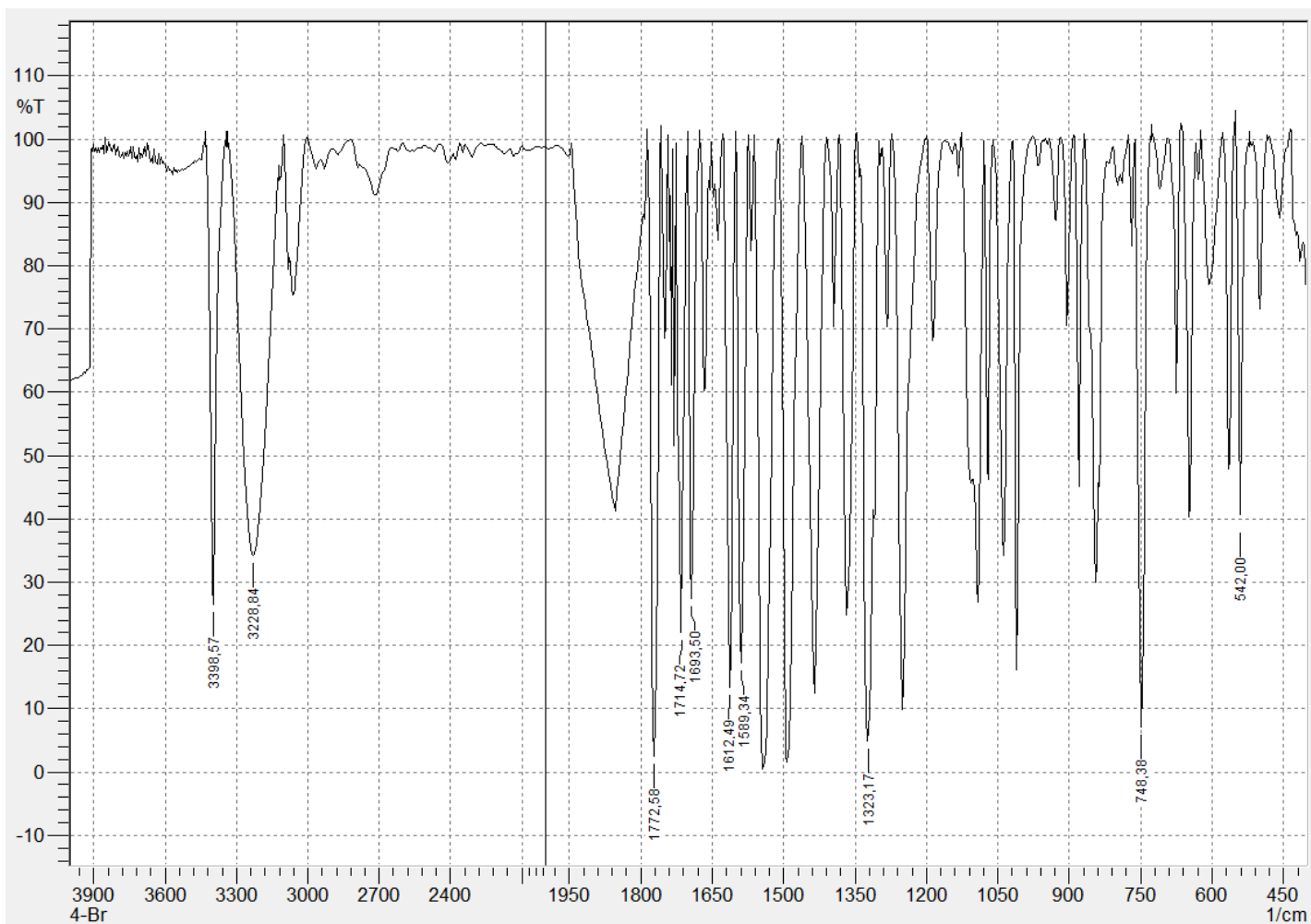
**Figura 61** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final XI (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



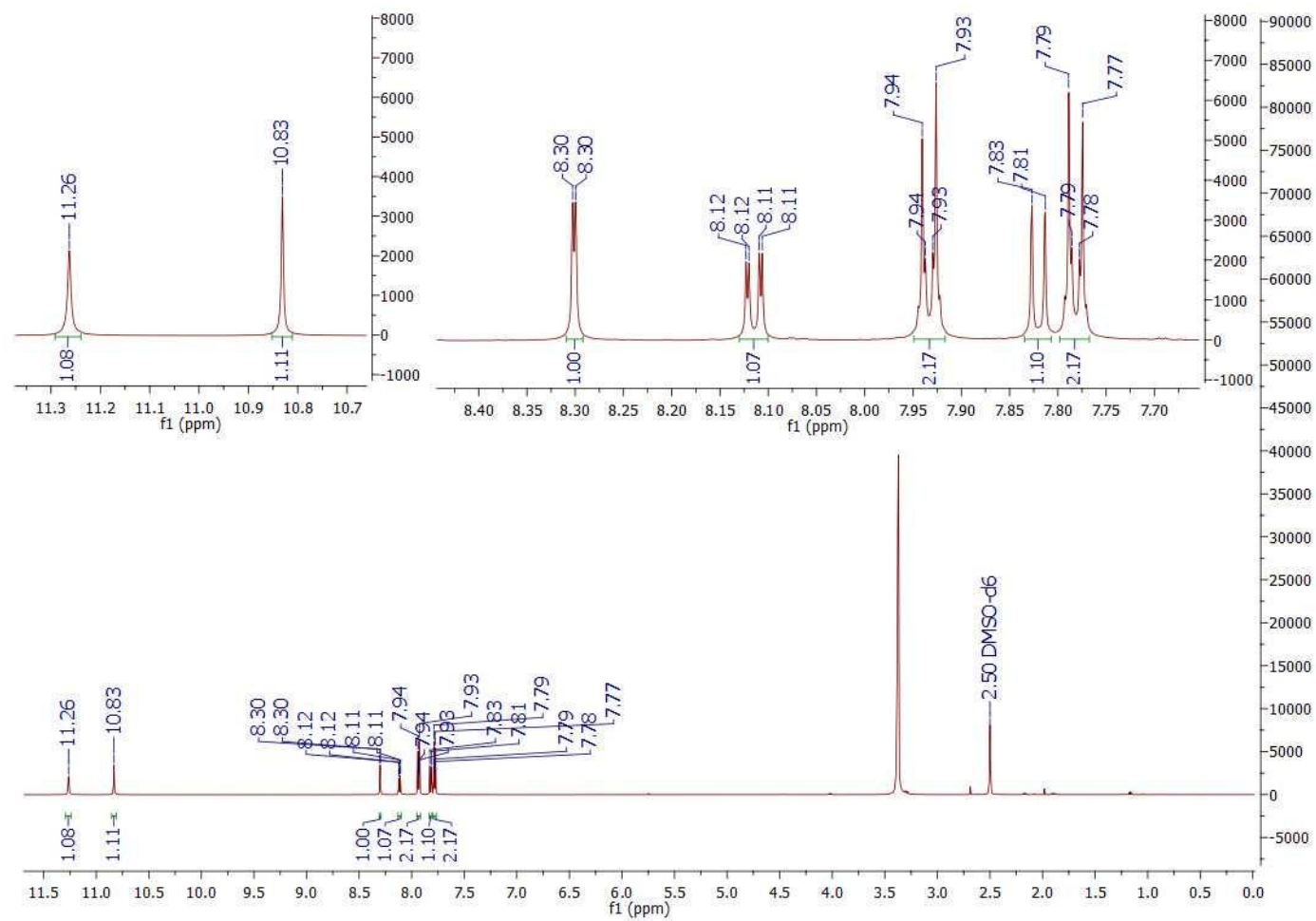
**Figura 62** - Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final XI



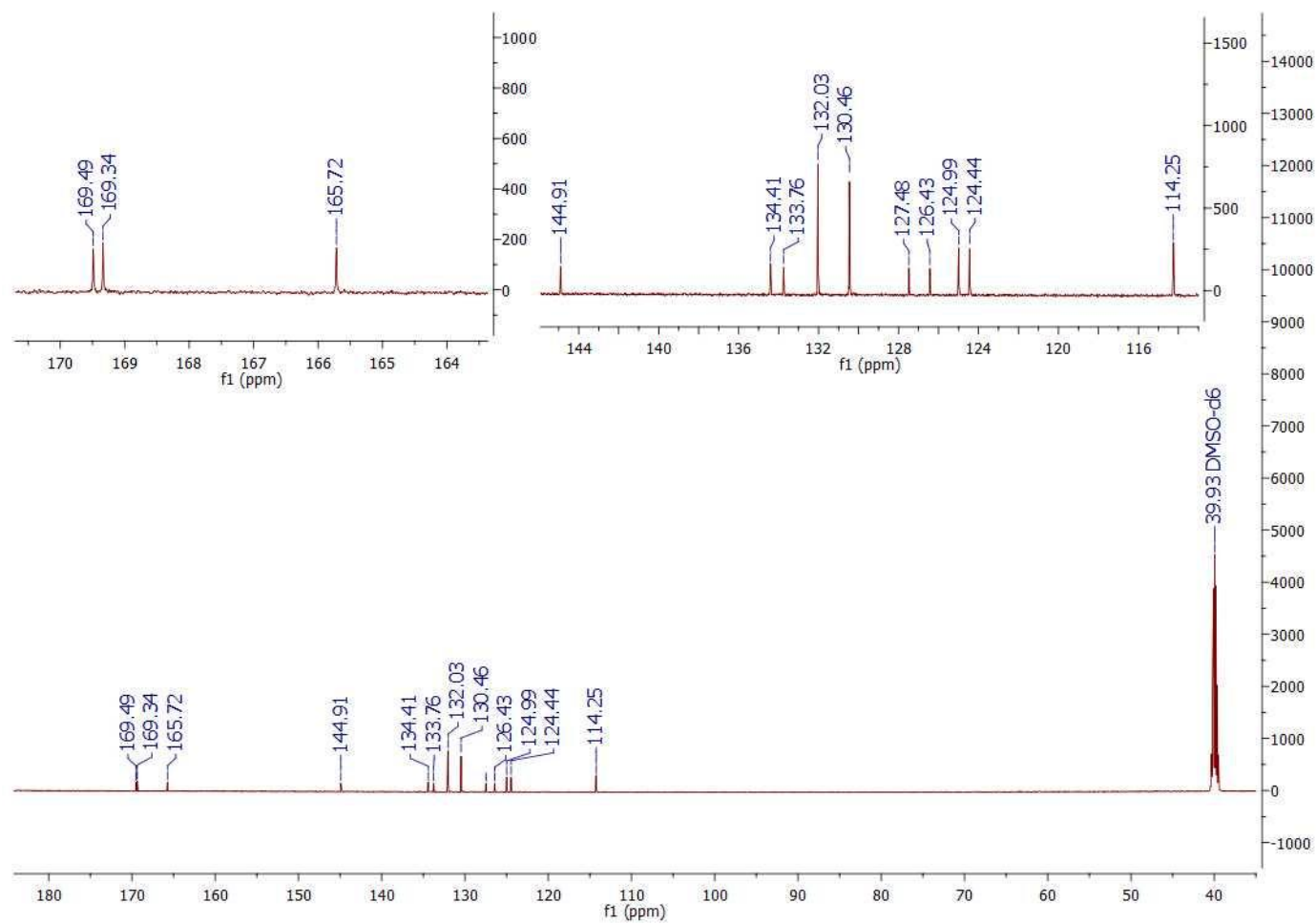
**Figura 63** - Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final IX



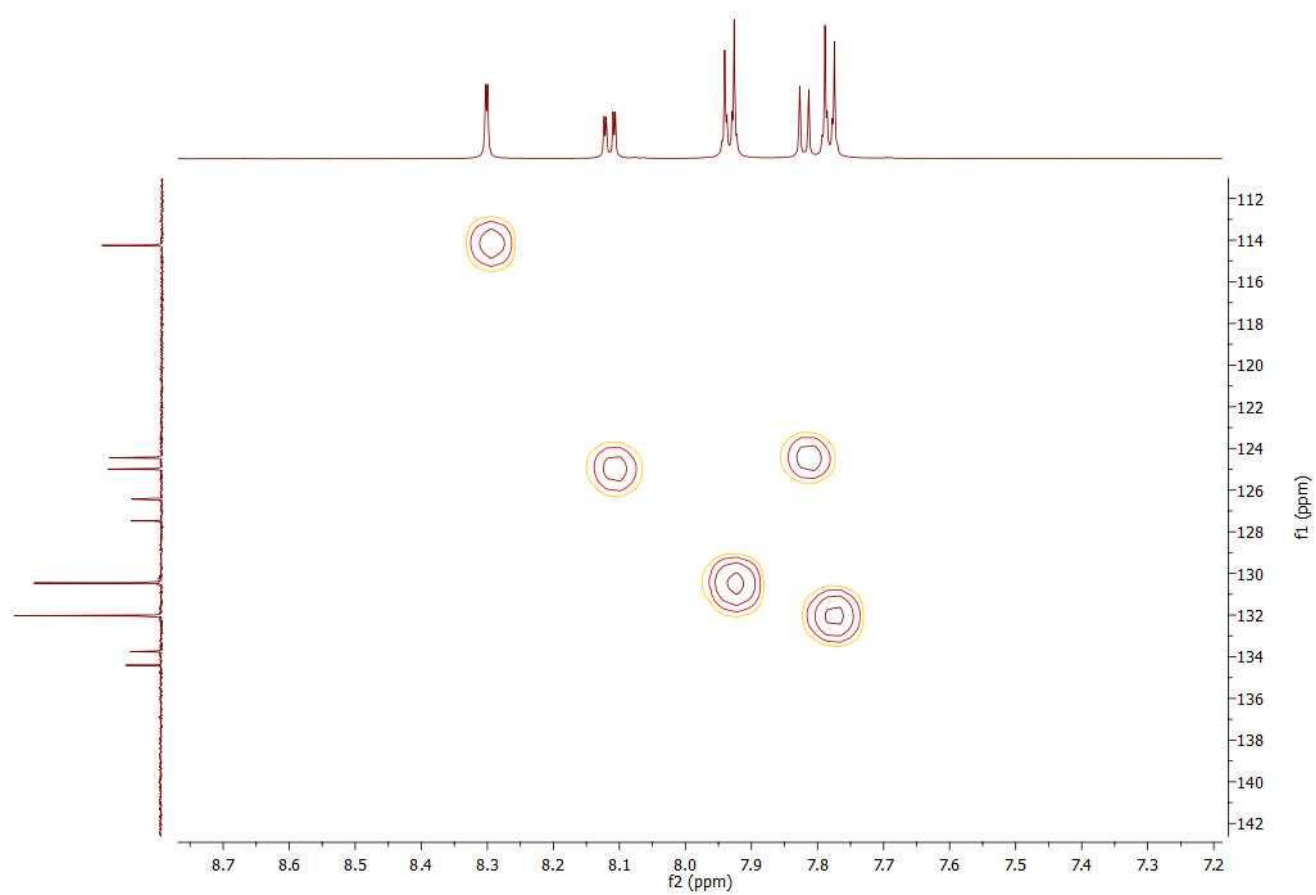
**Figura 64** - Espectro na região de infravermelho composto final XII (pastilha de KBr)



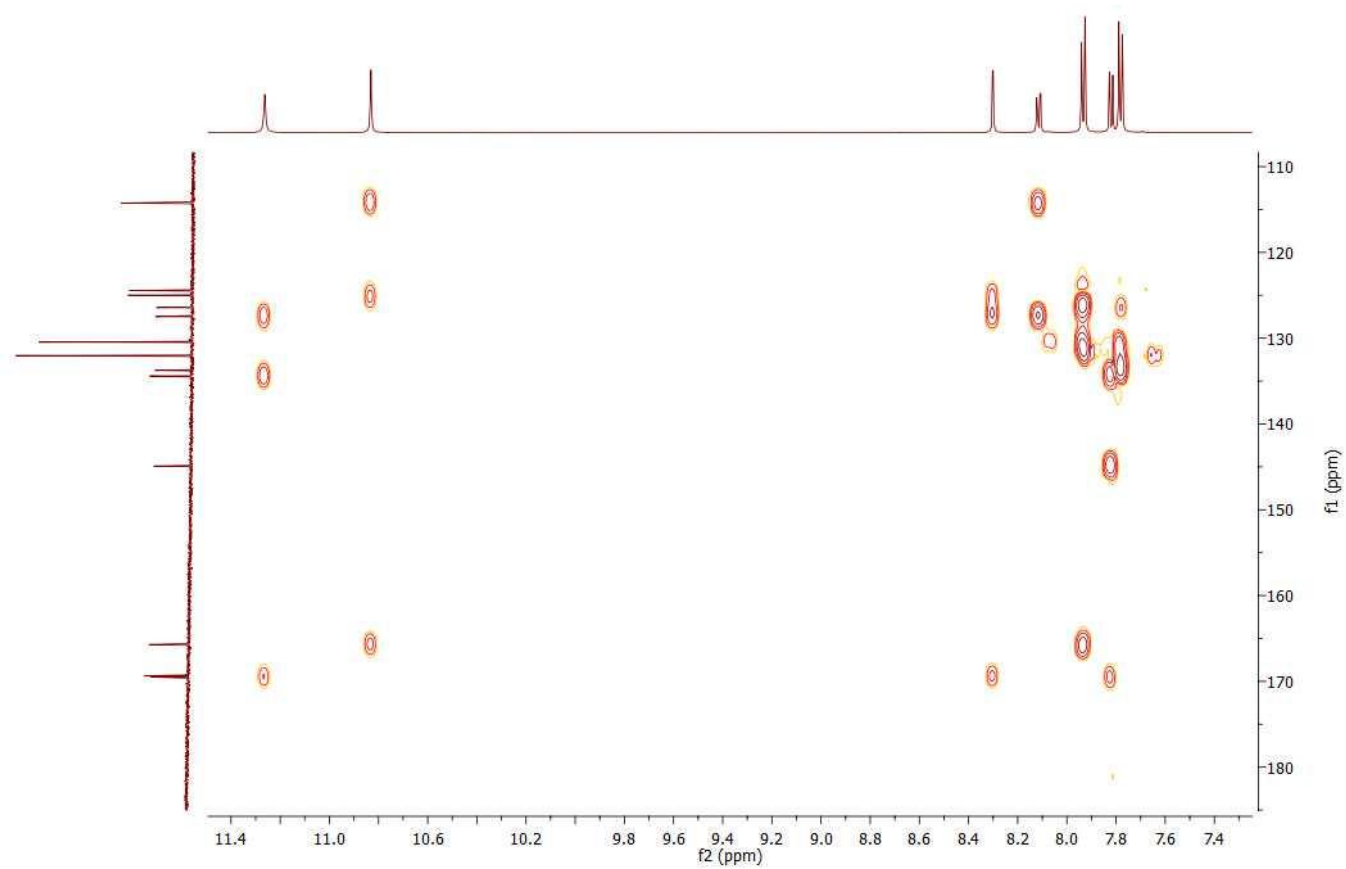
**Figura 65** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final XII (600 MHz, DMSO- $d_6$ )



**Figura 66-** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final XII (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



**Figura 67**– Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC do composto final XII



**Figura 68**– Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC do composto final XII