

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação em Farmácia**

**SÍNTSE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE INIBidores HÍBRIDOS COM  
POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO HEMATOLÓGICO**

**Vinícius Albuquerque Moreira de Souza**

Trabalho de Conclusão de Curso de  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da Universidade de  
São Paulo

**Orientador(a): Prof.(a). Dr(a) Roberto Parise  
Filho**

São Paulo

2025

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	3
LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABELAS .....	7
RESUMO .....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Fisiopatologia, epidemiologia e tratamento de neoplasias .....	9
1.2 Sobre a enzima PI3K e seus inibidores .....	11
1.3 Sobre a enzima HDAC6 e seus inibidores .....	14
1.4 Sobre a hibridação molecular.....	17
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Planejamento e síntese dos híbridos moleculares .....	20
3.1.2 Reação para formação dos compostos intermediários 2.....	21
3.1.3 Reação para formação dos compostos intermediários 3.....	23
3.1.4 Reação para formação dos produtos 4.....	24
3.1.5 Reação para formação do intermediário chave .....	24
3.2 Caracterização e pureza .....	25
3.3 Ensaios biológicos .....	26
3.3.1 Viabilidade celular .....	26
3.3.2 Inibição enzimática.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1 Síntese e caraterização dos híbridos moleculares.....	28
4.2 Proposta de alteração da rota sintética .....	44
4.3 Avaliação biológica dos compostos finais sintetizados.....	47

4.4 Avaliação da inibição enzimática dos compostos finais sintetizados .....	50
5. CONCLUSÃO .....	51
6. REFERÊNCIAS .....	52
7. ANEXOS .....	57
7.1 Moléculas sintetizadas .....	57
7.2 Espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	64
7.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	89
7.3 Resultados de inibição enzimática .....	107
7.4 Participação em congressos .....	110
7.5 Artigos publicados .....	112

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Rita de Cássia de Albuquerque Moreira de Souza, e minha vó, Célia Apparecida de Camargo, que desde pequeno me guiaram pelo caminho dos estudos e da educação, que sempre me apoiaram e ensinaram tanto. Grandes batalhadoras que me deram amor, carinho e companhia nos momentos mais difíceis, meus e seus. Obrigado por me mostrar que o respeito, a empatia e compaixão são os sentimentos mais belos e que devem sempre ser cultivados. Essa conquista é de vocês.

Aos meus tios, primas e avôs que são minha base e referência de família, coragem, superação e força. Obrigado por todo amor e carinho, essa conquista também é de vocês.

A minha bisavó, Maria da Conceição Simpionato, base das minhas raízes e que sempre me viu com os olhos de um futuro brilhante. Sua força e luta ressoa em minhas vitórias.

Aos meus amigos de curso, que fizeram essa trajetória ser mais leve, feliz e bem-humorada. Agradeço o companheirismo dentro e fora de classe, principalmente durante os dois anos de pandemia que nos acompanharam. Sem vocês, isso não seria possível.

Aos professores que compartilharam todo o seu conhecimento conosco e foram peça chave durante a graduação. Também, a todos os professores que me acompanharam na trajetória da minha vida; vocês acreditaram em mim e me mostraram que a educação vale a pena.

Ao meu orientador, Profº Drº Roberto Parise Filho, pela oportunidade, confiança e ensinamentos em química farmacêutica. Aos especialistas e técnicos de laboratório por todo suporte em nossas atividades. A minha parceira de pesquisa, Karol de Barros, pelo compartilhamento de conhecimento e de ideias, além de todo o aprendizado obtido em conjunto. As minhas parceiras de laboratório, Giovanna Cavalcante, Lara Gimenez e Valeria Vassiliades, que foram de extrema importância para o meu desenvolvimento e aprendizado dentro e fora de laboratório, responsáveis por grandes ensinamentos de vida e boas gargalhadas que deixaram todo o processo mais leve.

Ao meu pai, Walter Moreira de Souza Júnior, pelo apoio, carinho e me mostrar que na vida sempre há espaço para a renovação e para luta por algo melhor. Obrigado, essa conquista também é sua.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, seu corpo docente, direção, administração e todos os funcionários responsáveis pela manutenção dela, que além de abrirem a janela pela qual hoje vislumbro o meu horizonte, foi o palco onde pude escrever os primeiros capítulos da minha história.

Obrigado.

*“Tenho apenas duas mãos e o sentimento do mundo”*

**Carlos Drummond de Andrade**

## LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiêncıa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
HDAC	Histona Desacetilase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMC	Leucemia mieloide crônica
RMN	Ressonância magnética nuclear
ZBG	<i>Zinc binding group</i> (grupo quelante de zinco)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR .....	11
Figura 2 -Inibidores de quinase aprovados para tratamento do câncer.....	12
Figura 3 - Modelo genérico bidimensional do sítio de ligação do ATP em proteínas.....	13
Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento homeostático de modulações epigenéticas ...	14
Figura 5 - Modelo farmacofórico dos inibidores de HDAC e a estrutura dos inibidores de HDAC aprovados para uso terapêutico, ou em estudos clínicos .....	16
Figura 6 - Estrutura dos inibidores seletivos de HDAC6 ricolinostate e citarinostate, cujas seletividades são conferidas pela região do <i>cap</i> .. .....	17
Figura 7 - Estruturas de híbridos com ação dual em PI3K e HDAC. ....	18
Figura 8 - A) Planejamento dos compostos híbridos de idelalisibe e nexturastate A. B) Série a ser sintetizada e seus respectivos substituintes.....	20
Figura 9 - Reação geral para a formação dos intermediários 2.....	22
Figura 10 - Reação geral para a formação dos intermediários 3.....	23
Figura 11 - Reação geral para a formação dos produtos 4.....	24
Figura 12 - Reação para a formação do intermediário-chave.....	25
Figura 13 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 2d (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	33
Figura 14 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 2d (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	33
Figura 15 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 3d (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	38
Figura 16 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 3d (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	38
Figura 17 – Sete compostos finais inéditos sintetizados.....	40
Figura 18 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 4d (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	42
Figura 19 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto 4d (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	43
Figura 20 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 10 (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	45
Figura 21 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 10 (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	46
Figura 22: Avaliação da viabilidade celular.....	47
Figura 23 - Espectro de RMN 1H do intermediário 2a (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	64
Figura 24 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 2a (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	64
Figura 25 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 2b (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	65
Figura 26 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 2b (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	65
Figura 27 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 2c (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm).....	66
Figura 28: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 2c (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	66
Figura 29: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 2d (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	67
Figura 30: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 2d (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	67
Figura 31: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário 2e (300 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	68
Figura 32: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário 2e (75 MHz, DMSO-d6, δ = ppm). ....	68

Figura 33: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 2g (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	69
Figura 34: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 2g (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	69
Figura 35: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 2h (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	70
Figura 36: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 2h (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	70
Figura 37: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 2i (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	71
Figura 38: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 2i (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	71
Figura 39: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 2j (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	72
Figura 40: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 2j (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	72
Figura 41: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3a (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	73
Figura 42: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3a (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	73
Figura 43: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3b (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	74
Figura 44: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3b (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	74
Figura 45: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3c (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	75
Figura 46: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3c (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	75
Figura 47: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3d (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	76
Figura 48: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3d (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	76
Figura 49: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3e (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	77
Figura 50: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3e (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	77
Figura 51: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3g (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	78
Figura 52: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3g (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	78
Figura 53: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3h (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	79
Figura 54: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3h (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	79
Figura 55: : Espectro de RMN $^1\text{H}$ do intermediário 3i (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	80
Figura 56: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do intermediário 3i (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	80
Figura 57: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto final 4a (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	81
Figura 58: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto final 4a (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	81
Figura 59: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto final 4b (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	82
Figura 60: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto final 4b (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	82
Figura 61: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto final 4c (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	83
Figura 62: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto final 4c (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	83
Figura 63: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto final 4d (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	84
Figura 64: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto final 4d (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	84
Figura 65: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto final 4e (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	85
Figura 66: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto final 4e (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	85
Figura 67: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto final 4g (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	86
Figura 68: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto final 4g (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	86
Figura 69: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto final 4h (300 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	87
Figura 70: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto final 4h (75 MHz, DMSO-d6, $\delta$ = ppm). ....	87

Figura 71: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do intermediário-chave 10 (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , δ = ppm). ....	88
Figura 72: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do intermediário-chave 10 (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , δ = ppm). ....	88
Figura 73: Corrida de HPLC do composto 4a, página 1. ....	89
Figura 74: Corrida de HPLC do composto 4a, página 2. ....	90
Figura 75: Corrida de HPLC do composto 4a, página 3. ....	91
Figura 76: Corrida de HPLC do composto 4b, página 1. ....	92
Figura 77: Corrida de HPLC do composto 4b, página 2. ....	93
Figura 78: Corrida de HPLC do composto 4b, página 3. ....	94
Figura 79: Corrida de HPLC do composto 4c, página 1. ....	95
Figura 80: Corrida de HPLC do composto 4c, página 2. ....	96
Figura 81: Corrida de HPLC do composto 4d, página 1. ....	97
Figura 82: Corrida de HPLC do composto 4d, página 2. ....	98
Figura 83: Corrida de HPLC do composto 4d, página 3. ....	99
Figura 84: Corrida de HPLC do composto 4e, página 1. ....	100
Figura 85: Corrida de HPLC do composto 4e, página 2. ....	101
Figura 86: Corrida de HPLC do composto 4e, página 3. ....	102
Figura 87: Corrida de HPLC do composto 4g, página 1. ....	103
Figura 88: Corrida de HPLC do composto 4g, página 2. ....	104
Figura 89: Corrida de HPLC do composto 4h, página 1. ....	105
Figura 90: Corrida de HPLC do composto 4h, página 2. ....	106
Figura 91 – Inibição da enzima HDAC 6. ....	107
Figura 92 – Inibição da enzima HDAC 1. ....	108
Figura 93 – Inibição da enzima HDAC 8. ....	109
Figura 94: Certificado de apresentação de poster na 46 <sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. ....	110
Figura 95: Certificado de apresentação de poster na XXV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. ....	110
Figura 96: Apresentação do trabalho no 31º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo (SIICUSP) ....	111
Figura 97 - Artigo publicado com parte dos dados obtidos por este projeto, página 1-102. ....	112
Figura 98 - Artigo publicado com parte dos dados obtidos por este projeto. ....	113

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Rendimento dos compostos 2a-e, 2g-i.....	30
Tabela 2 - Rendimento dos compostos 3a-e, 3g-i.....	35
Tabela 3 - Caracterização dos sete compostos finais inéditos sintetizados. ....	40
Tabela 4 - Tabela do IC <sub>50</sub> em diferentes isoformas de HDACs obtidos para os compostos selecionados. 51	

## RESUMO

SOUZA, V. A. M. SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE INIBIDORES HÍBRIDOS COM POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO HEMATOLÓGICO. 2025. no. 114. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2025.

Palavras-chave: hibridação molecular; HDAC6; PI3K; câncer hematológico.

**INTRODUÇÃO:** O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada e rápida de células anormais, com um vasto número de genes mutados. Mutações na PI3K $\delta$  (fosfoinositídeo 3-quinase delta) são prevalentes nas linhagens leucocitárias, tornando a sua inibição uma estratégia bastante explorada, apesar da aparente resistência à monoterapia. Para superar este problema, moléculas híbridas, principalmente a combinação de inibidores da PI3K e de HDAC6 (histona desacetilase 6), têm demonstrado eficácia como abordagem alternativa. **OBJETIVO:** O presente estudo propõe-se a sintetizar compostos híbridos que ajam sinergicamente em PI3K e HDAC6. Para tanto, planejou-se compostos por meio da fusão de unidades farmacofóricas derivadas do idelalisibe, um inibidor seletivo da PI3K $\delta$ , e do nexturastate A, um inibidor seletivo da HDAC6. **MATERIAL E MÉTODOS:** Os compostos híbridos propostos foram sintetizados a partir da reação da 6-cloropurina (1) com anilinas para-substituídas, por meio da substituição nucleofílica aromática (SNAr), formando os intermediários anilino-purínicos (2). Estes foram submetidos à reação com 4-(bromometil)benzoato de metila, seguindo o mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (SN2), para formar intermediários metil-benzoatos (3). Por fim, reagiu-se os intermediários (3) com hidroxilamina (NH2OH) para formação dos hidroxamatos (4) correspondentes por meio da aminólise do éster. Todos os compostos sintetizados foram submetidos à caracterização por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Todos os compostos finais tiveram sua pureza avaliada por HPLC e determinação da faixa de fusão, além de terem a atividade biológica comprovada por estudos em diferentes linhagens celulares de câncer. Os compostos de maior destaque possuíram sua inibição enzimática avaliada. **RESULTADOS:** Sete compostos finais foram preparados com sucesso, exibindo bons rendimentos globais. Os resultados de rendimento, faixa de fusão e concentração em HPLC indicam alta pureza dos compostos. Os compostos foram então encaminhados para os ensaios de citotoxicidade, nos quais quatro destacaram-se devido à maior seletividade para linhagens de LLA. Os ensaios enzimáticos evidenciaram a seletividade dos compostos para a enzima HDAC 6 quanto a outras isoformas para os quatro compostos selecionados. **CONCLUSÃO:** Este estudo sintetizou com sucesso sete híbridos de idelalisibe e nexturastate A, com quatro demonstrando seletividade para linhagens de LLA e inibição de HDAC6. Futuras pesquisas devem elucidar suas mecanísticas de morte celular, comparar os resultados contra células saudáveis e avaliar a superação de resistência, além do possível avanço para estudos *in vivo*, visando o desenvolvimento de terapias multialvo mais eficazes para leucemias.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Fisiopatologia, epidemiologia e tratamento de neoplasias

O câncer se apresenta como um amplo grupo de doenças neoplásicas malignas caracterizadas pelo surgimento acelerado e desordenado de células anormais, resultante da perda de mecanismos regulatórios do ciclo celular. Essas células adquirem a capacidade de invadir, se estabelecer e multiplicar em tecidos adjacentes e/ou distantes e modular o microambiente tumoral para sustentar seu crescimento e disseminação (HANAHAN, 2022).

A origem da doença é multifatorial, surgindo a partir de interações complexas entre alterações genéticas e/ou epigenéticas (YOU; JONES, 2012). As alterações genéticas, sejam herdadas ou adquiridas ao longo da vida, manifestam-se como mutações que inativam genes supressores de tumor (e.g., TP53), ativam proto-oncogenes a oncogenes (e.g., superexpressão de MYC) ou resultam de rearranjo cromossômico, como a translocação t(9:22) formando o gene de fusão BCR-ABL1 no cromossomo Philadelphia, cuja proteína tirosina quinase constitutivamente ativa impulsiona a leucemogênese (CASAUBON; KASHYAP; REGAN, 2025; MENDIRATTA et al., 2021; NOWELL; HUNGERFORD, 1960). Ao mesmo tempo, as alterações epigenéticas se dão através da interação do organismo com o ambiente, afetando mecanismos que levam ao silenciamento ou ativação, através da metilação/desacetilação ou acetilação/desmetilação, respectivamente, de histonas sem a alteração (i.e., mutação) dos pares de base da sequência genética, como o silenciamento do gene PTEN (BAYLIN; JONES, 2011; YOU; JONES, 2012).

Dentre os diversos subtipos de câncer, destacam-se as neoplasias hematológicas, com apresentação clínica como leucemias, linfomas e mielomas. A leucemia linfoblástica aguda (LLA), caracterizada pela proliferação de linfócitos imaturos e comprometimento da medula óssea e do sistema imunológico, representa cerca de 30% dos casos de câncer pediátrico e 80% dos casos de leucemia na mesma faixa etária, com maior incidência em crianças de 2 a 9 anos (GRIPP et al., 2024; PUI, 2020). Embora possua taxa de sobrevida em 5 anos maior que 90% em casos pediátricos, o cenário não é o mesmo para os casos em adultos (PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016;

TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Estima-se que para esse grupo a probabilidade seja entre 30% e 40%, com chance de apenas 20% para a cura, e alta taxa de recidiva (INABA; PUI, 2021; JABBOUR et al., 2015; PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016).

No Brasil, de acordo com o INCA, estima-se que entre 2023 e 2025 sejam diagnosticados 483590 casos de neoplasias do tipo não melanoma por ano em todo o território nacional, sendo 5,5% (26660 casos) neoplasias hematológicas, e destas, 43% (11540 casos) são leucemias (SANTOS et al., 2023).

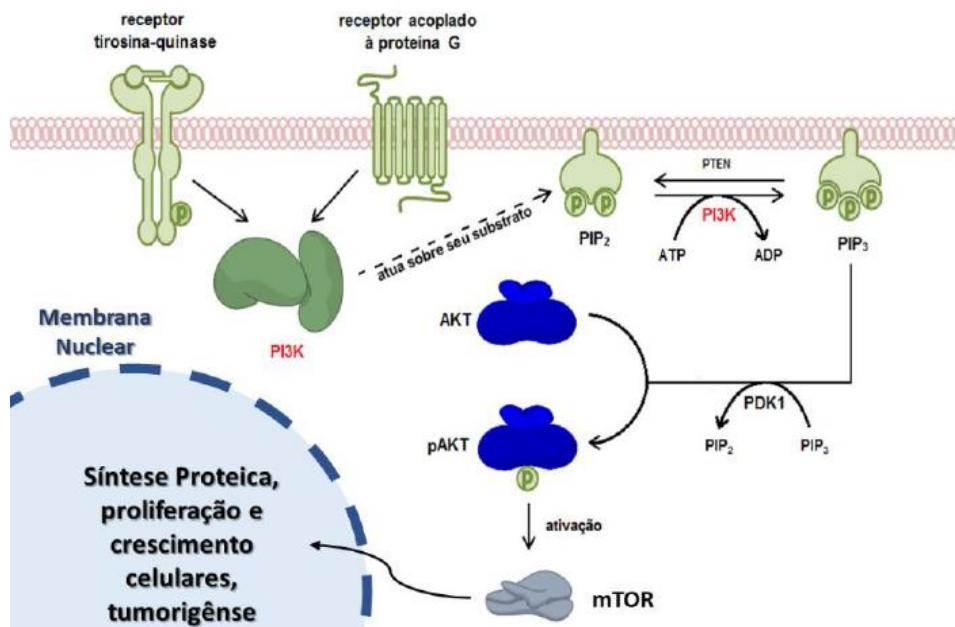
O tratamento do câncer, após diagnóstico conclusivo, pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia, transplante de medula óssea ou quimioterapia. Atualmente, há um grande arsenal quimioterápico que pode ser utilizado junto com medicamentos anti-inflamatórios esteroidais, como a prednisona e dexametasona, que vão desde a terapia convencional (e.g. metotrexato, ciclofosfamida, vincristina, pegaspargase etc.), a tratamentos mais sofisticados, como terapias alvo-molecular, representados por inibidores seletivos (e.g. idelalisib – inibidor de PI3K $\delta$ , nexturastat A – inibidor de HDAC6, sirolimus – inibidor de mTor, imatinib – inibidor de BCR-ABL1 etc.), e imunoterapia (e.g rituximabe e bliatumombe) (INABA; PUI, 2021; INCA, 2025). O tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível, idealmente dentro de 60 dias no Brasil, para evitar a progressão da doença e o desenvolvimento de efeitos tardios relacionados à toxicidade dose-dependente dos fármacos, manifestando-se como insuficiência renal e cardiomiopatia, principalmente na população infantil (LOPES; CAMARGO; BIANCHI, 2000). Embora as terapias seletivas apresentem maior segurança e menor risco de reações adversas, ainda não são amplamente utilizadas devido ao alto custo, restando à maior parcela da população as terapias convencionais, onde a toxicidade e o desenvolvimento de resistência são comuns devido aos mecanismos de evasão da celular e ativação de vias de sinalização alternativas, são desafios significativos (UEDA et al., 2022; WANG; TORTORELLA, 2022).

Neste cenário, a química farmacêutica desempenha um papel central no design e síntese de novos candidatos a fármacos, explorando estratégias como a hibridação molecular, visando terapias mais eficazes e com menor impacto na qualidade de vida dos pacientes.

## 1.2 Sobre a enzima PI3K e seus inibidores

As fosfoinositídeo-3-quinases (PI3Ks), quinases iniciadoras da via, foram identificadas como responsáveis por propagar sinais extracelulares para o meio intracelular, por meio da formação de mensageiros intracelulares fosforilados, neste caso o PIP3. As PI3Ks estão geralmente associadas a vias de sinalização disparadas por receptores do tipo tirosina-quinase ou acoplados à proteína G (**Figura 1**) (VANHAESEBROECK et al., 2001). Após a formação do complexo ligante-receptor há o recrutamento, ao nível intracelular, de enzimas PI3K que, ao se ligarem com o receptor de membrana, ativam seu sítio catalítico e passam a ser capazes de promover a fosforilação do seu substrato (PIP2 a PIP3), dando início então à cascata de eventos intracelulares PI3K/Akt/mTOR (YANG et al., 2019; ZHAO; VOGT, 2008).

**Figura 1 – Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR**

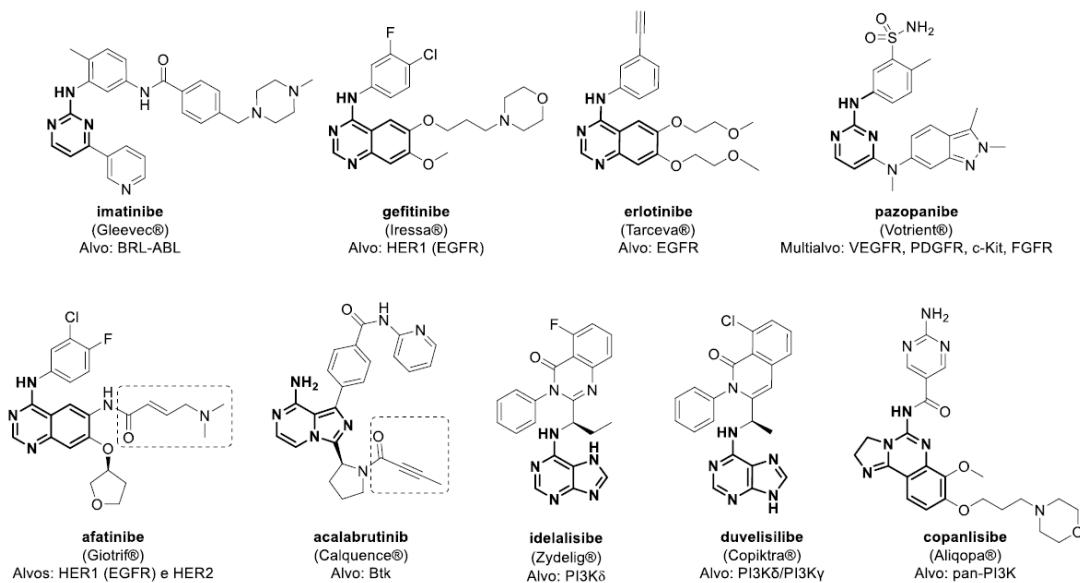


Fonte: Adaptado de Vanhaesbroeck et al. (2001).

A via de sinalização PI3K/AKT/mTor (**Figura 1**) é uma das mais importantes para as células de um organismo, envolvendo a regulação do crescimento, a motilidade celular, a sobrevivência, o metabolismo e a angiogênese (MARTINI et al., 2014). No caso de mutações específicas, amplificações ou deleções de informações genéticas, que

codificam enzimas indutoras desta via (como a PI3K), ou ainda inibidoras (como a PTEN), tornam-se grandes as possibilidades deste evento resultar no crescimento tecidual maligno e desenfreado, corroborando a formação de massas tumorais agressivas (MARTINI et al., 2014; YANG et al., 2019). É sabido que a via pode se encontrar desregulada em quase todos os tipos de câncer, sendo a sobreativação da enzima PI3K, especialmente a isoforma PI3K $\delta$  em linhagens linfoïdes, uma das responsáveis pela progressão das neoplasias hematológicas (JANKU; YAP; MERICK-BERNSTAM, 2018; YANG et al., 2019). Cabe destacar que a ativação da via está relacionada com o mau prognóstico e à resistência a fármacos em leucemias (MORISHITA et al., 2012).

**Figura 2** -Inibidores de quinase aprovados para tratamento do câncer. Os núcleos destacados em negrito representam a porção das moléculas que exploram a região de interação da adenina, no bolsão de ligação do ATP (presente no domínio catalítico das quinases). As regiões destacadas pelos quadros tracejados indicam os grupos farmacofóricas responsáveis pela ação não-competitiva destes fármacos

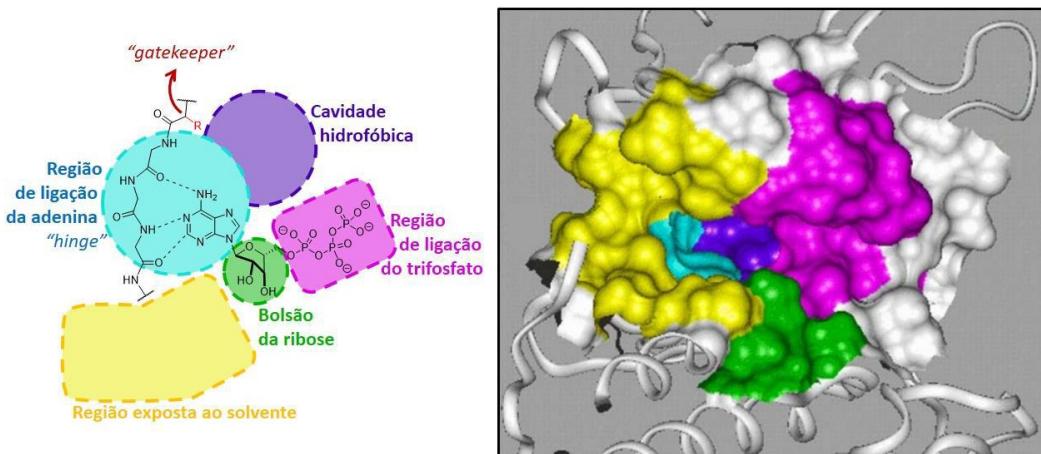


Fonte: De autoria própria.

Dada a importância no ciclo celular e prevalência de alterações em neoplasias, a via PI3K/AKT/mTor, e em especial a enzima PI3K, mostra-se como um proeminente alvo molecular para o planejamento de fármacos. A pesquisa por medicamentos inibidores de quinases foi estimulada com a aprovação do imatinibe em 2001 para o tratamento de

LMC, com atualmente cerca de 20% dos esforços mundiais voltado à superfamília de enzimas (**Figura 2**) (CHAUDHRY et al., 2021; ROSKOSKI, 2019). Atualmente, existem três inibidores da PI3K aprovados para uso: a) idelalisibe, inibidor da PI3K $\delta$ , para LLC recidivante ou refratária, linfoma não-Hodgkins de células B recidivante e linfoma linfocítico; b) copanlisibe, inibidor das isoformas PI3K $\alpha$  e PI3K $\delta$ , para o tratamento de pacientes adultos com linfoma folicular recidivante e; c) duvelisibe, inibidor de PI3K $\delta$  e PI3K $\gamma$ , para o tratamento de pacientes adultos com leucemia linfocítica crônica recidiva ou refratária (CLL) e para linfoma linfocítico pequeno. Entretanto, a utilização destes medicamentos como monoterapia tem se mostrado ineficaz devido ao fácil surgimento de mutações que evadem o efeito citotóxico do fármaco e a compensação por meio de outras vias (WAITMAN; PARISE-FILHO, 2022). Ademais, estudos têm apontado que os mecanismos de resistência aos inibidores de quinases podem ser superados com abordagens terapêuticas multifatoriais, que utilizam associações farmacológicas ou pelo uso de fármacos híbridos que atacam a massa cancerosa por múltiplas vias de sinalização independentes entre si (SAWYERS, 2007).

**Figura 3 - (Esquerda)** Modelo genérico bidimensional do sítio de ligação do ATP em proteínas quinases. (Direita) Modelo tridimensional do sítio de ligação do ATP da enzima quinase dependente de ciclina 2 (CDK2). Cores semelhantes em ambos os modelos representam as mesmas regiões. Os inibidores de quinases normalmente exploraram uma ou mais das regiões indicadas pelas diferentes cores. Adaptado de Vulpetti & Bosotti (2004).



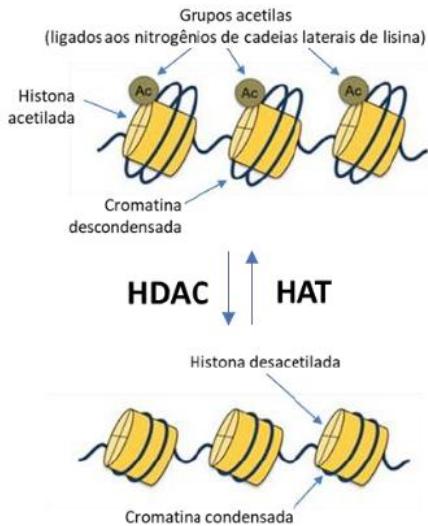
Fonte: Adaptado de Vulpetti & Bosotti (2004).

O arcabouço molecular dessas moléculas leva em consideração importantes regiões da enzima. Como exemplo, os inibidores ditos acima exploram a utilização de anéis heterocíclicos para interação através de ligações de hidrogênio com a região *hinge*, mimetizando um ATP (**Figura 3**). Alterações na porção superior das moléculas são realizadas para que diferentes interações sejam realizadas na cavidade hidrofóbica e seja conferida seletividade aos inibidores, dado que há variações do sítio dentre as isoformas da enzima. Ainda, devido à natureza hidrofílica dos bolsões da ribose e de ligação do trifosfato, os inibidores de quinases que exploram essas regiões e que possuem grupos muito polares e volumosos, são bem tolerados e possuem alta afinidade pelos seus alvos.

### 1.3 Sobre a enzima HDAC6 e seus inibidores

Dentre as modulações epigenéticas conhecidas estão a acetilação e a metilação de histonas, proteínas envolvidas no enovelamento e condensação da cromatina. Segmentos de cromatina que apresentam ampla desacetilação das histonas possuem a informação genética condensada, tornando-a silenciada para transcrição gênica.

**Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento homeostático de modulações epigenéticas**



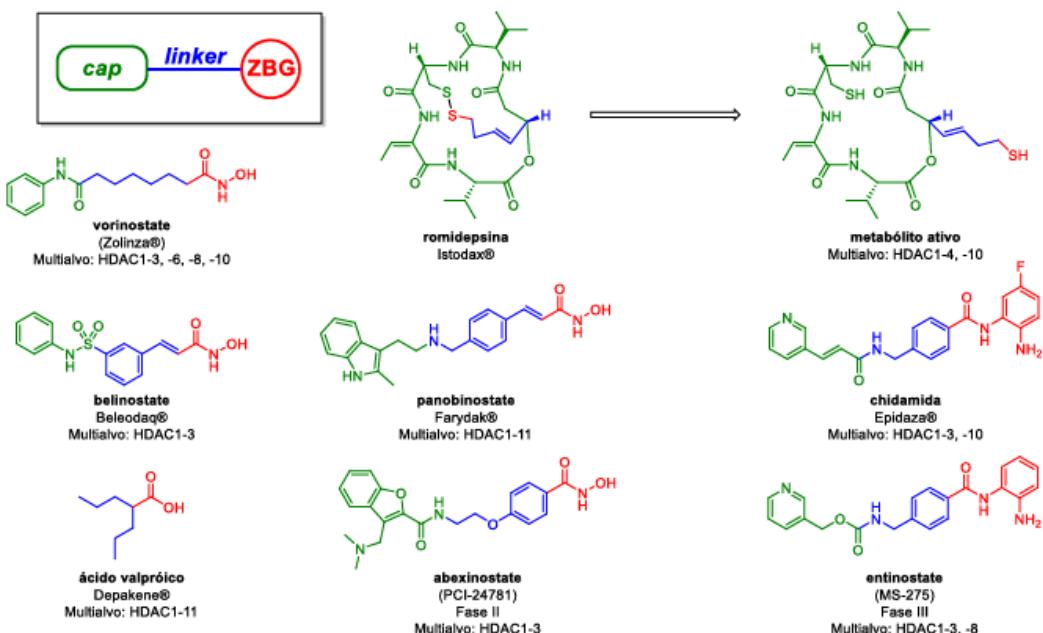
Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2015).

O equilíbrio homeostático entre acetilação versus desacetilação de proteínas histonas é modulado por duas enzimas, conhecidas respectivamente como histona acetiltransferases (HAT) e HDACs (**Figura 4**) (GALLINARI et al., 2007; ROPERO; ESTELLER, 2007)

As HDACs são enzimas responsáveis pela desacetilação de histonas, tornando os segmentos afetados da cromatina menos susceptíveis à transcrição e, por consequência, genes são silenciados. Dentre todas as isoformas de HDAC, a enzima HDAC6 tem ganhado atenção como potencial alvo terapêutico isolado, por apresentar características distintas das demais HDAC (LOSSON et al., 2020). Apesar de sua presença e atuação nuclear, a HDAC6 se encontra majoritariamente no citosol, sendo capaz de desacetilar outros substratos, como a  $\alpha$ -tubulina, afetando o transporte intracelular, a morfologia celular e migração das células, sendo a sua superexpressão também associada à progressão de neoplasias hematológicas (MEHRPOURI; POURBAGHERI-SIGAROODY; BASHASH, 2021).

Embora existam moléculas com efeito inibidor de HDACs aprovadas, como o vorinostate (**Figura 5**), primeiro inibidor de HDAC aprovado para o tratamento de linfoma cutâneo de células T; o belinostate (**Figura 5**), aprovado para o tratamento de linfoma de células T periférico e linfoma de células T reincidentes; e, o panobinostate, último inibidor de HDAC a receber aprovação pelo FDA para o tratamento de mieloma múltiplo, além é claro de uma série de outras moléculas que estão em estudos clínicos, todos apresentam amplo espectro inibitório, não possuindo ação seletiva a uma isoenzima específica (DUVIC; AND VU, 2007; FENICHEL, 2015; PU et al., 2024). É sabido que a ampla inibição de HDAC apresenta uma série de efeitos adversos incluindo cardiototoxicidade, mielossupressão, trombocitopenia, neutropenia, além de diarreia, náusea, vômito e fadiga (FU et al., 2017; ROSIK et al., 2014).

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

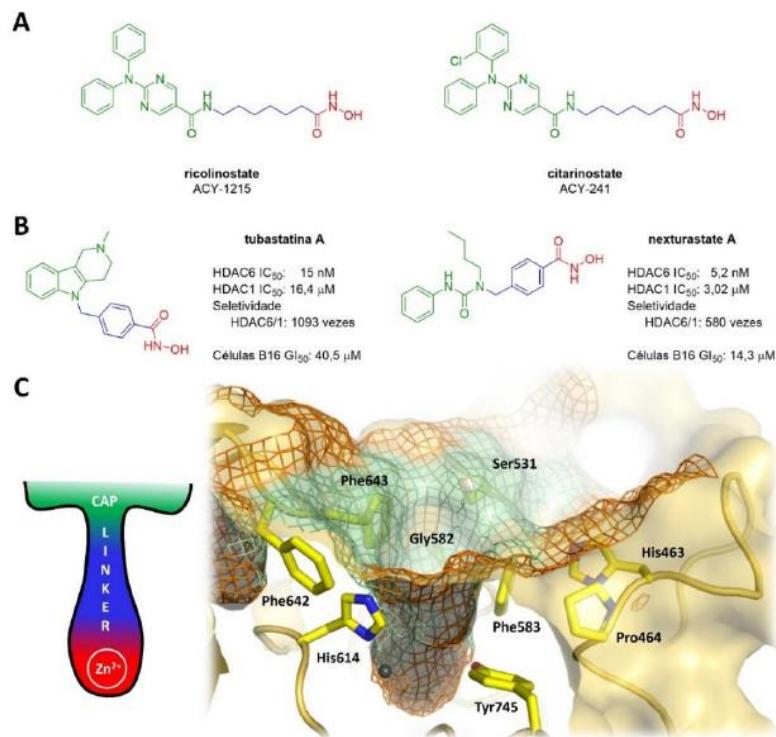


Fonte: De autoria própria.

Embora nenhum inibidor seletivo de HDAC 6 tenha sido aprovado para uso clínico, muitas tentativas têm sido feitos explorando a região *cap* e *linker* (**Figura 5**) da enzima para lhe conferir seletividade, como o ricolinostate, citarinostate e o Nexturastat A.(GU et al., 2024; WANG; WAN; LIU, 2018; YUE et al., 2025). O mecanismo de ação das moléculas explora a existência de um cátion de zinco localizado ao fim do bolso hidrofóbico das HDACs, especificamente um  $Zn^{2+}$  na HDAC6 (WANG; WAN; LIU, 2018). Dessa forma a região ZBG da molécula (**Figura 5**) possui grupos quelantes, como o ácido hidroxâmico e *ortho*-aminobenzamidas, a fim do aumento de interação com a enzima. A região *linker* ajuda a conferir seletividade para as isoformas da enzima, uma vez que a cavidade catalítica de cada uma possui formas e tamanhos diferentes (BERGMAN et al., 2012; WANG; WAN; LIU, 2018). Uma vez que o canal da cavidade catalítica da HDAC6 é mais tolerante a *linkers* volumosos, o planejamento de seus inibidores tem adotado sistemas benzílicos ou heterocíclicos para a região, como é o caso do Nexturastat A (LEE et al., 2018; PU et al., 2024; YUE et al., 2025). Já a região *cap* (**Figura 6**) pode ser utilizada a fim de se conferir maior potência e seletividade às moléculas devido a

interações específicas que fortalecem sua permanência no local (GU et al., 2024; WANG; WAN; LIU, 2018).

**Figura 6** - (A) Estrutura dos inibidores seletivos de HDAC6 ricolinostate e citarinostate, cujas seletividades são conferidas pela região do *cap*. (B) Estrutura dos inibidores seletivos de HDAC6 tubastatina A e nexturastate A, cujas seletividades são conferidas pela região de *linker*. (C) Modelo esquemático bidimensional e tridimensional do bolsão catalítico 2 (CD2) da HDAC6. O átomo de zinco está representado como uma esfera cinza no fundo do bolsão tridimensional. Código PDB: 5g0i.118 Imagem gerada utilizando o programa PyMOL 1.3 (Schrödinger, LLC).



Fonte: De autoria própria.

Considerados em conjunto, esses achados revelam o potencial tanto de quinases, particularmente PI3K, quanto da enzima HDAC6 como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer e demais doenças.

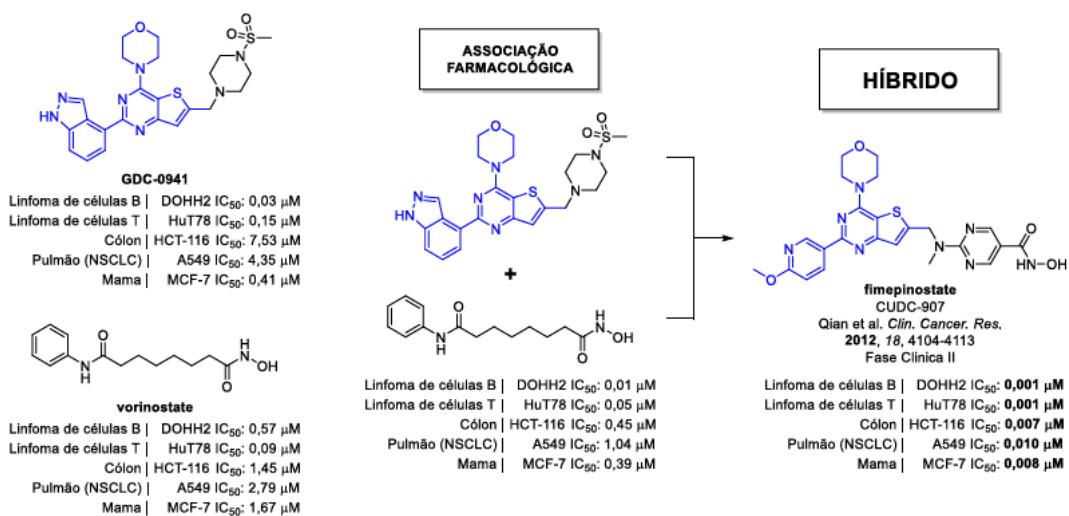
#### 1.4 Sobre a hibridação molecular

As modificações moleculares possuem como objetivo melhorar o perfil farmacológico de uma molécula a partir da alteração, simples ou complexa, de sua estrutura química (DEB et al., 2018). As modificações podem ser obtidas através da

simplificação ou complexificação molecular, ciclização, introdução ou substituição de grupos funcionais e/ou volumosos, introdução de centro quirais etc.(DEB et al., 2018; NADENDLA, 2023). Dentre elas, destaca-se a hibridação molecular. A técnica consiste em fundir, sobrepor ou mesclar dois ou mais farmacóforos, fármacos ou compostos bioativos, na expectativa de se obter uma nova entidade química híbrida, que apresente propriedades sinérgicas e de maior potência, se comparada às propriedades isoladas de cada um dos protótipos originais (DEB et al., 2018; VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

A abordagem em utilizar fármacos híbridos com ação multialvo é bastante promissora, pois permite modular simultaneamente dois ou mais alvos envolvidos em condições multifatoriais, como é o caso de neoplasias (BOLOGNESI; CAVALLI, 2016). Do ponto de vista farmacoterapêutico, o uso de fármacos híbridos com ação multialvo pode promover efeitos sinérgicos, reduzir efeitos adversos e facilitar o regime terapêutico através da redução de dose e/ou frequência de administração (BOLOGNESI, 2013; QIAN et al., 2012a; WANG; TORTORELLA, 2022).

**Figura 7 - Estruturas de híbridos com ação dual em PI3K e HDAC.** O núcleo destacado em azul retrata a porção responsável pela ação em quinases. A região em preto das estruturas é responsável pela ação em HDAC. O fimepinostate (canto inferior direito) é um exemplo bem-sucedido de hibridação molecular de fármacos antitumorais de ação dual.



Fonte: De autoria própria.

Neste contexto, Chen e colaboradores (2018) reportaram a síntese de inibidores duais das proteínas PI3K e HDAC a partir da fusão do núcleo do protótipo GDC-0941, de conhecida ação em PI3K, com o ácido hidroxâmico de cadeia alquílica do vorinostate, *pan*-inibidor HDAC (**Figura 7**). Os autores reportaram ganhos significativos de seletividade para linhagens tumorigênicas oriundas de cânceres hematológicos, com resultados de ganho em até mil vezes na potência do composto, em comparação com a associação de vorinostate e GDC-0941, e de até trinta mil vezes comparado às estruturas administradas isoladamente (**Figura 7**) (CHEN et al., 2018a; QIAN et al., 2012b). A molécula, nomeada fimepinostate (CUDC-907), segue em ensaios clínicos de fase 2 para o tratamento de tumores sólidos refratários, tumores que acometem o sistema nervoso central e linfomas (THAKUR et al., 2020). Vale ressaltar que nos estudos reportados até o momento, o fimepinostate tem mostrado reversão de quadros de resistência às terapias convencionais (LUAN et al., 2019).

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A abordagem multialvo emerge como uma estratégia promissora ao tratamento de câncer. A hibridação molecular de grupos farmacofóricas contendo dois ou mais mecanismos de ação distintos representa uma valiosa ferramenta para a descoberta de moléculas capazes de inibir seletivamente e simultaneamente múltiplas vias de sinalização, visando a redução de reações adversas e melhor manejo da terapia. A combinação de inibidores de PI3K e HDAC demonstra sinergismo e maior atividade antineoplásica, especialmente em tumores hematológicos.

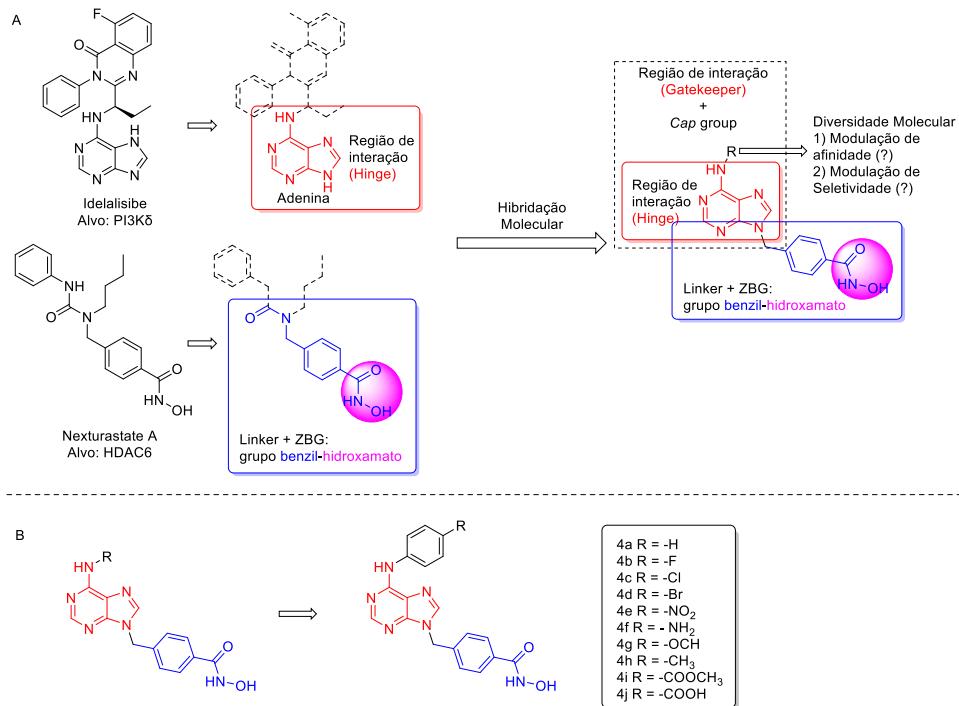
Dado o exposto, o presente trabalho possui como objetivo a obtenção de uma série de compostos, planejados por meio da hibridação molecular do idelalisibe (inibidor seletivo da PI3K $\delta$ ) e do nexturastate A (inibidor seletivo de HDAC6), com vistas ao tratamento do câncer, e melhor compreensão das bases moleculares da ação destes híbridos. Para este fim, os análogos serão sintetizados, caracterizados e avaliados com relação à sua atividade biológica em linhagens tumorais e inibição enzimática.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Planejamento e síntese dos híbridos moleculares

A estrutura geral dos compostos planejados consiste em um núcleo de adenina, vindo do composto idelalisibe, importante para a interação com a região de *hinge* da PI3K, incorporado a um grupo *p*-benzil-hidroxamato, proveniente do nexturastate A, atuando como *linker* e ZBG, subunidade importante para a ação na HDAC. A diversidade molecular será obtida por meio da incorporação de diferentes anilinas substituídas na posição 6 do núcleo purínico, interagindo com a região *gatekeeper* na PI3K e formando o *cap* dos inibidores de HDAC, que pode estar relacionado à modulação de seletividade e afinidade por isoformas de proteínas PI3K (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e, potencialmente, outras quinases. Conforme a **Figura 8**, planeja-se utilizar ao menos 10 (dez) substituintes R'. Sendo assim, dez produtos estão programados para serem obtidos no período de execução deste projeto. O planejamento pode ser visualizado na **Figura 8**.

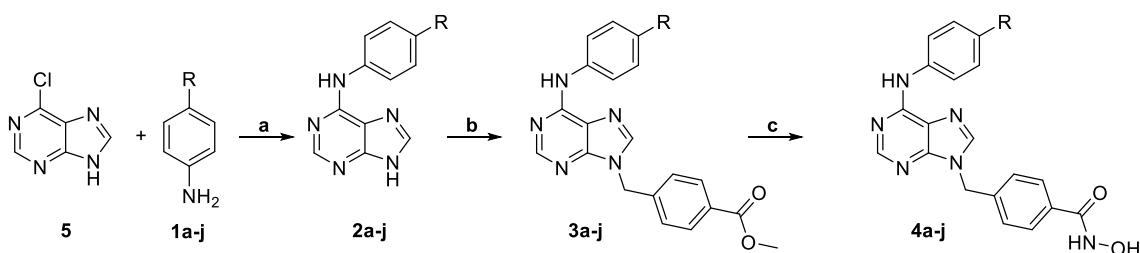
**Figura 8** - A) Planejamento dos compostos híbridos de idelalisibe e nexturastate A. B) Série a ser sintetizada e seus respectivos substituintes.



Fonte: De autoria própria.

Para a síntese, utilizou-se vidrarias comumente empregadas a rotina de laboratórios que trabalham com síntese orgânica, como balões de fundo redondo, bêqueres e funis de separação. Os reagentes e solventes utilizados foram obtidos comercialmente dos fornecedores Synth<sup>TM</sup>, Merck<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich-Merck<sup>TM</sup>, e Oakwood Chemicals<sup>TM</sup>. Cada reação e suas etapas foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatofolhas de alumínio e sílica gel GF254 (Merck-Milipore<sup>TM</sup>), reveladas por luz ultravioleta (UV,  $\lambda$ : 254 nm), pó de iodo ( $I_2$ ) e vanilina. Quando necessário, os compostos foram purificados por cromatografia em coluna com sílica gel (tamanho do poro: 60 Å).

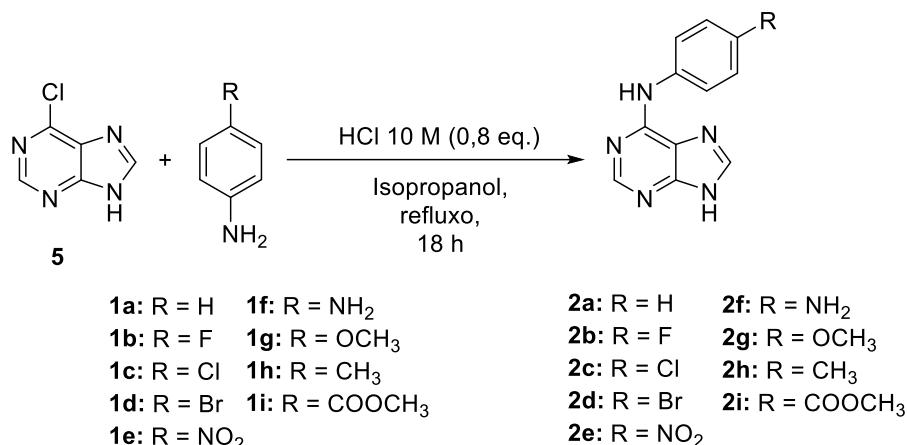
Conforme apresentado no Esquema 1, os compostos finais serão obtidos a partir da reação da 6-cloropurina (**1**) com a anilina, e com anilinas substituídas, por meio de substituição nucleofílica aromática (SNAr), formando os intermediários **2**. Os intermediários **2** serão submetidos à reação com 4- (bromometil)benzoato de metila via reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN2), para a formação dos intermediários ésteres **3**. Por fim, os ésteres **3** serão reagidos com hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) para a formação dos hidroxamatos correspondentes **4**. A mesma rota sintética planejada no **Esquema 1** será utilizada para todos os compostos, considerando as devidas adaptações nas condições reacionais e nos reagentes de partida.



**Esquema 1:** Proposta sintética para obtenção dos compostos 4a-j. Reagentes e condições: a) HCl 10 M (0,8 eq.), isopropanol, refluxo, 18 h; b) p-(bromometil) benzoato de metila 6 (1 eq.),  $K_2CO_3$  (3 eq.), acetona, refluxo, 18 h; c)  $NH_2OH$  (hidroxilamina) 7 (50 eq.), NaOH (8 eq.), THF-MeOH-Dioxano (1:1:1), 0 °C – t.a., 2 h.

### 3.1.2 Reação para formação dos compostos intermediários 2

O método sintético para a síntese dos intermediários **2** estão descritos a seguir na Figura 9 e no **Procedimento Geral A**.

**Figura 9** - Reação geral para a formação dos intermediários 2.

Fonte: De autoria própria

**Procedimento Geral A:** Em um balão de fundo redondo de 25 mL, colocou-se quantidades equimolares de 6-cloropurina (1 mmol – 154,6 mg) e da respectiva anilina substituída (1,0 eq.). Em seguida, adicionou-se ao balão quantidade suficiente de isopropanol para preencher metade do balão e 0,8 mmol de HCl concentrado (0,08 mL – 0,8 eq.) O sistema foi deixado sob agitação constante e refluxo por 18 h. Após o fim da reação, a mistura amarelada resultante foi filtrada a vácuo e lavada com isopropanol (3 x 30 mL). O sólido foi ressuspenso em 50 mL de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) saturado e deixado sob agitação por 10 minutos, o que levou a alteração de cor da suspensão para branca esverdeada. Por último, a suspensão foi filtrada a vácuo, lavada com H<sub>2</sub>O (3 x 30 mL) e seca em dessecador para obtenção de um pó esverdeado.

O composto **2j** pôde ser obtido através da hidrólise do composto **2i**, como o descrito pelo seguinte procedimento.

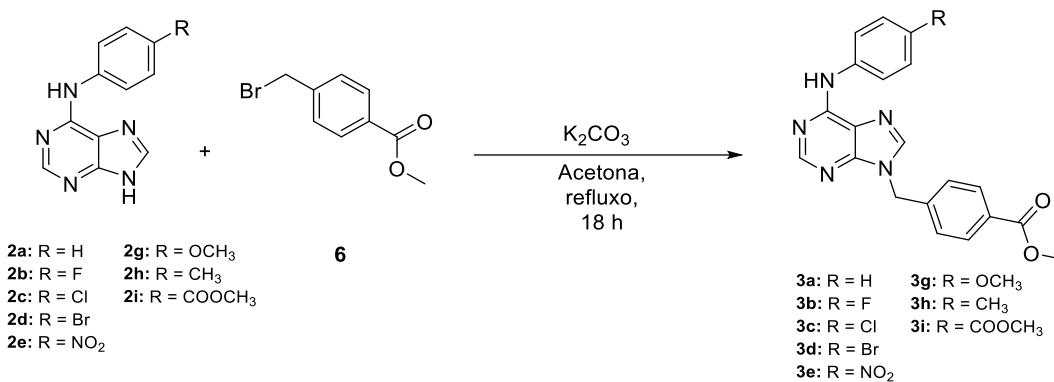
**Procedimento geral E:** Em um balão de fundo redondo, solubilizou-se 1,5 mmol (403,9 mg) do intermediário **2i** em 4,5 mL de dioxano. Em seguida, com o reagente em agitação, adicionou-se 9,9 mmol (4,95 mL; 6,6 eq.) de solução de KOH 2M ao balão. A mistura foi deixada em refluxo e agitação por aproximadamente 2h. Após a finalização da reação, observada por cromatografia em camada delgada, o balão foi levado a banho maria invertido até atingir 0°C onde, em seguida, teve seu pH ajustado para 1 com a utilização de HCl 2M para garantia da protonação das espécies. Após, o balão foi deixado

no congelador por cerca de 1 hora para formação dos cristais de precipitado. Por fim, a solução foi filtrada a vácuo para a obtenção de um pó de coloração amarelada com 94% de rendimento.

### 3.1.3 Reação para formação dos compostos intermediários 3

O método sintético para a síntese dos intermediários **3** estão descritos a seguir na **Figura 10** e no **Procedimento Geral B**.

**Figura 10** - Reação geral para a formação dos intermediários 3.



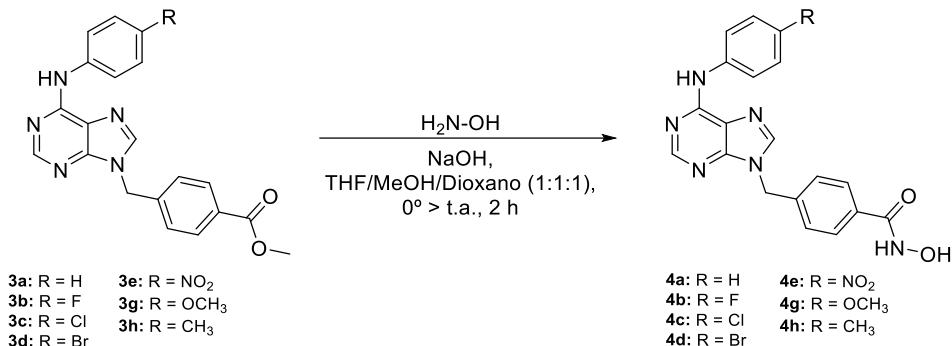
Fonte: De autoria própria.

**Procedimento Experimental Geral B:** Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 1 mmol do intermediário 2, junto de 1 mmol de 4-bromometil benzoato de metila (229 mg – 1 eq.) e 3 mmol de carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ; 414 mg - 3 eq.), em 20 mL de acetona. A mistura foi mantida em agitação constante e refluxo por 18 h. Em seguida, a reação foi interrompida com cerca de 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e extraída com acetato de etila ( $\text{EtOAc}$ , 3 x 20 mL). A fase orgânica combinada foi então lavada com solução cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), seca com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e concentrada em evaporador rotativo. Por fim, a mistura foi purificada por cromatografia em coluna utilizando fase móvel em gradiente de  $\text{EtOAc}$ -metanol (10:0) a (9,5:5) para obtenção de um composto de cor branca e cristalino.

### 3.1.4 Reação para formação dos produtos 4

O método sintético para a síntese dos produtos **4** estão descritos a seguir na **Figura 11** e no **Procedimento Geral C**.

**Figura 11 - Reação geral para a formação dos produtos 4.**



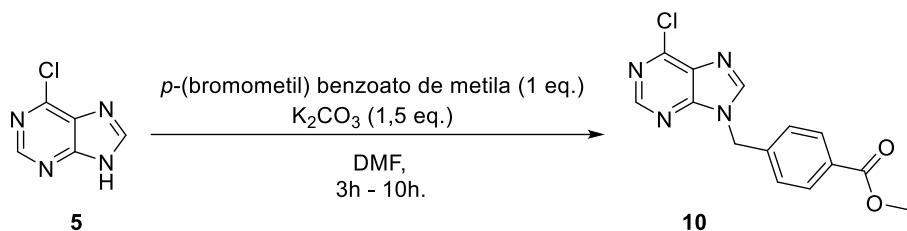
Fonte: De autoria própria.

**Procedimento Experimental Geral C:** Em um banho de gelo ( $0\text{ }^\circ\text{C}$ ), adicionou-se a um balão de fundo redondo, dissolveu-se 4 mmol de hidróxido de sódio (NaOH; 160 mg - 8 eq.) em 25 mmol de solução aquosa de hidroxilamina (50% p/v; 1,7 mL - 50 eq.). Após a completa dissolução do NaOH, adicionou-se, gota a gota, uma solução de tetraidrofurano, dioxano e metanol (1:1:1, 3 mL) contendo 0,5 mmol do intermediário 3 (212,1 mg - 1 eq.). Após a adição, o balão foi retirado do banho de gelo para que a reação voltasse à temperatura ambiente sendo mantida assim por 2 h sob agitação. Após o período, a reação foi neutralizada com HCl 2M, concentrada em evaporador rotativo e vertida em 20 mL de água gelada, sendo finalmente filtrada a vácuo e lavada com água gelada (3 x 30 mL) para obtenção de um produto sólido de coloração branca.

### 3.1.5 Reação para formação do intermediário chave

O método sintético para a síntese do intermediário chave está descrito a seguir na **Figura 12** e no **Procedimento Geral D**.

**Figura 12** - Reação para a formação do intermediário-chave.



Fonte: De autoria própria

**Procedimento Experimental Geral D:** Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 1 mmol do composto 5, junto de 1 mmol de 4-bromometil benzoato de metila (229 mg – 1 eq.) e 1,5 mmol de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 212 mg – 1,5 eq.), em 5 mL de DMF. A mistura foi mantida em agitação constante por um período de 3h a 10h. Em seguida, a reação foi interrompida com cerca de 20 mL de H<sub>2</sub>O e extraída com acetato de etila (EtOAc, 3 x 20 mL). A fase orgânica combinada foi então lavada com solução cloreto de amônio, seca com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentrada em evaporador rotativo. Por fim, a mistura foi purificada por cromatografia em coluna utilizando fase móvel EtOAc/MeOH (9,9:0,1) para obtenção de um composto de cor esverdeada

### **3.2 Caracterização e pureza**

Todos os compostos intermediários e finais da síntese foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono-13 ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ), utilizando espectrômetro BruckerTM Advanced-DPX-300® nas frequências 300 MHz e 75 MHz, respectivamente. Os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*6, Cambridge Isotope LaboratoriesTM). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm). Para calibração interna das análises, utilizou-se o sinal residual do solvente utilizado. As multiplicidades dos sinais foram reportadas como simpleto (s), dublete (d), triploto (t), duplo-dublete (dd) e multiploto (m). As constantes de acoplamento ( $J$ ) dos sinais foram expressas em Hertz (Hz).

Os pontos de fusão dos produtos sólidos serão obtidos em aparelho para

determinação de ponto de fusão capilar, modelo M565, da marca Büchi.

A pureza dos compostos foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em um equipamento Shimadzu<sup>TM</sup> Proeminence® com uma coluna analítica C-18 Gemini® (5 µm, 150 x 4,6 mm). Preparou-se as amostras da seguinte forma: solubilizou-se 2,5 mg de cada composto em 0,25 mL de DMSO para formação da mãe; em seguida, 50 µL destas soluções foi diluído em 1 mL de solução composta por 70% acetonitrila e 30% água. A separação dos compostos foi monitorada por um detector de arranjo de fotodiodos (PDA), sendo apresentado os perfis dos cromatogramas em 254 nm. A fase móvel utilizada foi água-acetonitrila (5-100%) com 0,1% de ácido trifluoracético em fluxo de 1 mL/minuto. Fixou-se o tempo de análise de cada composto em 20 minutos, com volume de injeção igual a 20 µL.

### **3.3 Ensaios biológicos**

#### **3.3.1 Viabilidade celular**

Os produtos obtidos foram enviados para avaliação em ensaios de viabilidade celular para realização em laboratório parceiro no Instituto de Ciências Biomédicas da USP liderado pela Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo e Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto. Os compostos Vorinostate e Ruxolitinibe foram utilizados como fármacos de referência.

Os compostos foram diluídos em DMSO para a concentração final de 50 mM (Ruxolitinibe, **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4e**, **4g**, **4g**), Vorinostate foi diluído em DMSO na concentração final de 10 mM e armazenados à -20°C. As células foram tratadas com os compostos nas concentrações de 0,0032 à 50 µM por 72 h, e então submetidas por ensaios de viabilidade por MTT (CARLOS et al., 2021; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018b).

Um total de  $2 \times 10^4$  células por poço foram dispostas em uma placa de 96 poços, utilizando o meio apropriado, na presença de diferentes concentrações dos compostos (0,0032 a 50 µM) por 72 horas. Em seguida, 10 µL de solução de MTT (Sigma Aldrich) (5 mg/mL) foram adicionados e incubados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas. A reação foi interrompida com a adição de 150 µL de HCl 0,1 N em isopropanol anidro. A viabilidade

celular foi avaliada medindo-se absorbância a 570 nm. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados utilizando análise de regressão não linear no GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) (CARLOS et al., 2021; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018b).

### **3.3.2 Inibição enzimática**

As moléculas que obtiveram resultados promissores nos ensaios biológicos foram enviadas para ensaios de inibição enzimática para a avaliação de sua seletividade para HDAC 6 quando comparada com outras isoformas. Os ensaios foram realizados em colaboração com o laboratório do professor doutor Wolfgang Sippl, da *Faculty of Biosciences da Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg*.

Os ensaios de inibição em HDAC foram realizados utilizando proteínas recombinantes adquiridas da ENZO Life Sciences AG (Lausen, Suíça) para HDAC 1 e 6, enquanto a HDAC 8 foi produzida conforme descrito no trabalho de Zessin e colaboradores (2019). Todos os inibidores foram testados em um ensaio enzimático *in vitro*, conforme descrito previamente, utilizando placas de 384 poços (GreinerONE, catálogo nº 784900) (HEIMBURG et al., 2017; ZESSIN et al., 2019). Após cinco minutos de incubação dos inibidores com a respectiva (HDAC 1: 10 nM, HDAC 6nM: 1nM, HDAC 8: 2nM), as reações foram iniciadas pela adição de substrato.

Para HDAC 1 e 6, um substrato peptídico acetilado derivado de p53 (Ac-RHKK(Acetil)-AMC) foi utilizado em um ensaio de fluorescência descontínuo, conforme descrito por Heimburg e colaboradores (2017). Todas as reações foram realizadas em tampão de ensaio (20nM HEPES, 140 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM TCEP e 0,2 mg/mL BSA, pH 7,4 ajustado com NaOH) à temperatura ambiente para HDAC 6 e a 37°C para HDAC 1. Após 45 minutos para HDAC 6 e 90 minutos para a HDAC 1, a reação foi interrompida pela adição de tripsina e SAHA. A intensidade de fluorescência foi medida após 1 hora de incubação usando um Leitor de Placas Multilabel Envision 2104 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) com um comprimento de onda de excitação de 380 ± 8 nm e comprimento de onda de emissão de 430 ± 8 nm.

A inibição da HDAC 8 foi medida de forma contínua usando osubstrato peptídico

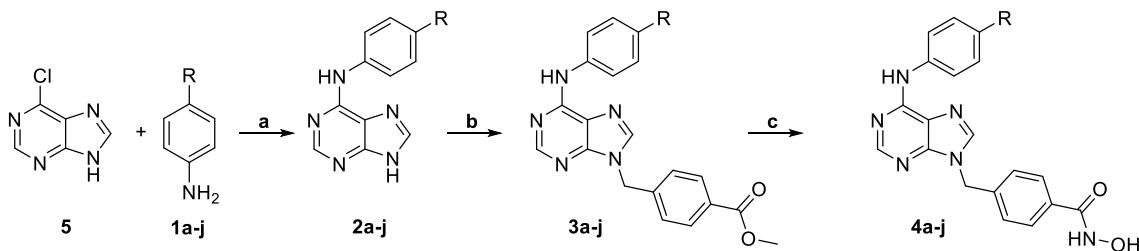
tioacetilado (Abz-SRGKG(tio-TFA)FFRR-NH<sub>2</sub>) como descrito por Zessin e colaboradores (2019). O aumento da fluorescência foi monitorado por uma hora com duas leituras por minuto, com um comprimento de onda de excitação de 320 ± 8 nm e comprimento de onda de emissão de 430 ± 8 nm.

Para todas as medições, controles positivos (enzima, substrato, DMSO e tampão) e negativos (substrato, DMSO e tampão) foram incluídos em cada medição e definidos como 100% e 0%, respectivamente. Para todas as enzimas, o Nexturastat A foi utilizado como controle positivo como inibidor seletivo de HDAC 6. Curvas dose-resposta foram geradas a partir de 20 µM dos compostos para gerar gráficos com 8 pontos. Os valores de IC<sub>50</sub> foram então gerados a partir dos resultados obtidos

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese e caracterização dos híbridos moleculares

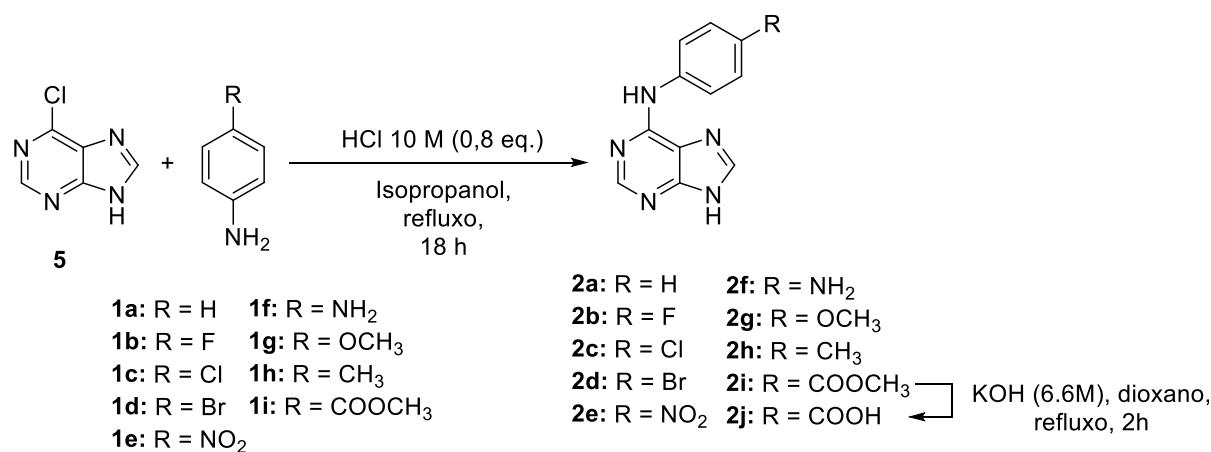
No período do projeto, foi possível a síntese de sete compostos finais inéditos (4a-e, 4g-h) e outros dezoito compostos intermediários (**2a-e**, **2g-j**, **3a-e**, **3i-j**), seguindo a rota sintética visualizada no **Esquema 2**.



**Esquema 2:** Proposta sintética para obtenção dos compostos 4a-j. Reagentes e condições: a) HCl 10 M (0,8 eq.), isopropanol, refluxo, 18 h; b) p-(bromometil) benzoato de metila 6 (1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), acetona, refluxo, 18 h; c) NH<sub>2</sub>OH (hidroxilamina) 7 (50 eq.), NaOH (8 eq.), THF-MeOH-Dioxano (1:1:1), 0 °C – t.a., 2 h.

O primeiro composto escolhido para a síntese e para adaptação das técnicas de laboratório e condições experimentais foi o 4d, o qual é o composto *p*-bromo-substituído. Assim, a primeira etapa da rota sintética inicia-se com a reação entre a 6-cloropurina 5 e a *p*-bromoanilina **1d**, segundo **Esquema 3**, para obtenção do intermediário **2d**. Além

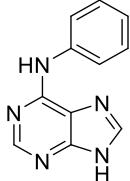
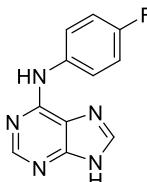
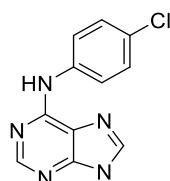
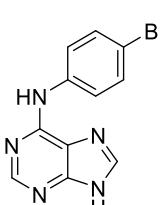
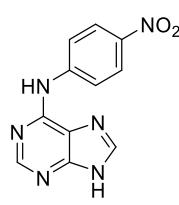
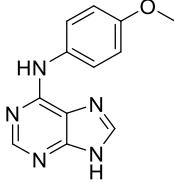
da p-bromoanilina **1d**, esta etapa também foi concluída para outras sete anilinas substituídas, a saber: anilina **1a**, p-fluoranilina **1b**, p-cloroanilina **1c**, p-nitroanilina **1e**, p-anisidina **1g**, p-toluidina **1h** e p-aminobenzoato de metila **1i** (**Esquema 3**). Os experimentos foram realizados em triplicatas para todos os substituintes. Cabe destacar que todos os procedimentos realizados nessa etapa se encontram detalhados no **Procedimento Geral A** e foram realizados de acordo com o protocolo já descrito em nosso grupo (TAVARES, 2019). Além dos oito compostos obtidos de acordo com o **Procedimento Geral A**, o composto **2j** pode ser obtido através da hidrólise do composto **2i** (**Esquema 3**). Optou-se por esta alternativa devido a facilidade e velocidade da reação. O procedimento encontra-se mais detalhado no **Procedimento Geral E**, adaptado de acordo com protocolo utilizado por SILVA, 2020.



**Esquema 3:** Condição reacional para a formação dos intermediários **2a-e**, **2g-j**.

O intermediário **2d** foi sintetizado com êxito, alcançando-se um rendimento médio de 81%. Até o momento, nenhum problema para a realização da reação e seu work up foi identificado. Sendo assim, foram obtidos ainda os intermediários **2a-e**, **2g-j** com rendimentos médios que variam de bons a ótimos, como pode ser verificado na **Tabela 1**.

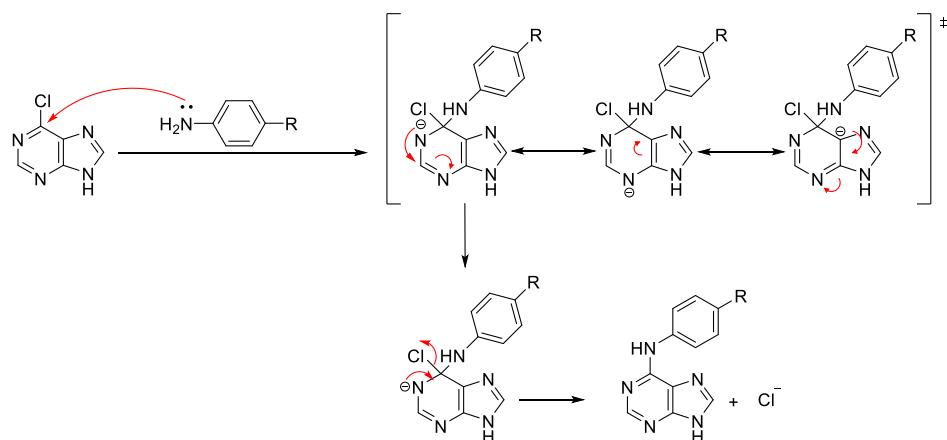
**Tabela 1** - Rendimento dos compostos **2a-e, 2g-i.**

Composto	Estrutura	Rendimento médio (%)
<b>2a</b>		74
<b>2b</b>		77
<b>2c</b>		68
<b>2d</b>		81
<b>2e</b>		72
<b>2g</b>		76
<b>2h</b>		86

Composto	Estrutura	Rendimento médio (%)
2i		91
2j		81

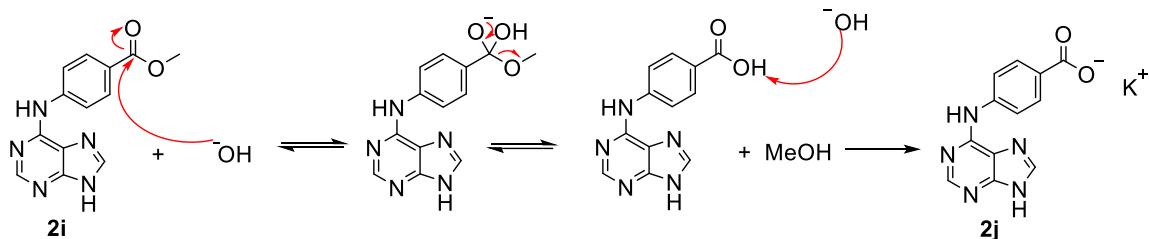
Tabela 1 – Continuação.

O mecanismo de reação envolvido nesta primeira etapa da síntese é uma substituição nucleofílica aromática (SNAr), muito utilizada na síntese de fármacos para a modificação do arcabouço de anéis aromáticos (KWAN et al., 2018). O mecanismo ocorre de forma concertada (**Esquema 4**), com a amina primária da anilina agindo como um nucleófilo e atacando o carbono eletrofílico na posição 6 do anel pirimidínico, com consequente liberação de um íon cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) como grupo abandonador. Essa reação é altamente favorecida devido ao efeito estabilizador da carga negativa pelos centros nitrogenados presentes no anel pirimidínico da 6-cloropurina, como também pela presença de um bom grupo de partidas (cloreto) (KWAN et al., 2018).



**Esquema 2:** Mecanismo reacional de SNAr para formação do primeiro intermediário.

Em relação ao composto **2j**, sua síntese envolve um mecanismo de adição seguido por eliminação (**Esquema 5**). Primeiro, o íon hidróxido realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do composto **2i** e é adicionado à molécula. O intermediário então passa por um rearranjo eletrônico, ocorrendo em sequência a eliminação do metanol e formação do ácido carboxílico desejado. O mecanismo pode ser mais bem visualizado no **Esquema 5** (CLAYDEN, J. et al., 2000, p. 291).

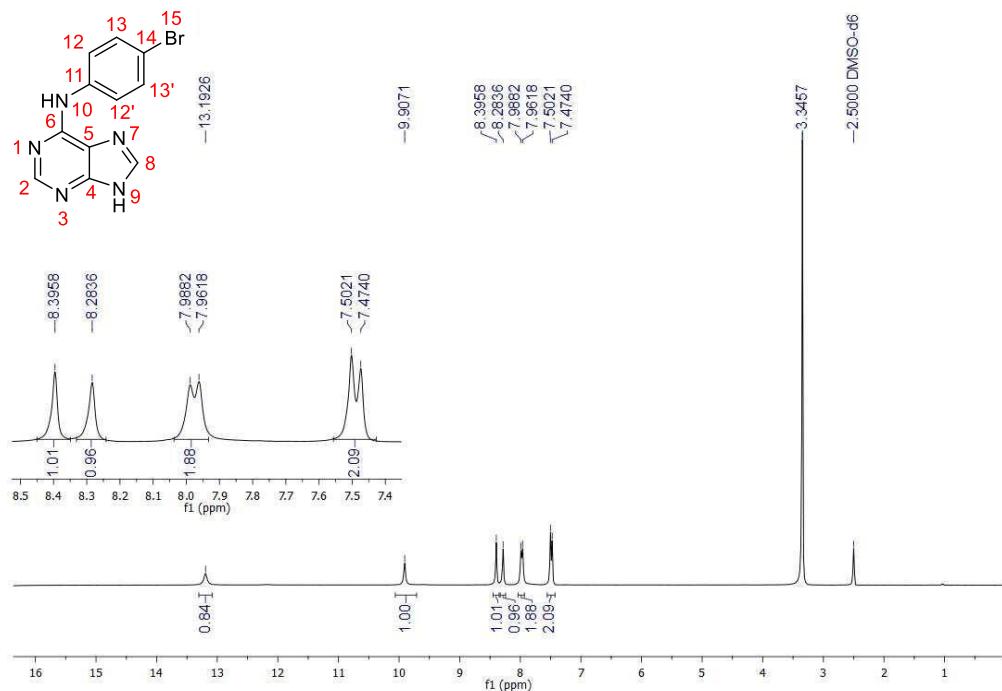


**Esquema 5:** Mecanismo reacional de adição e eliminação para formação do intermediário **2j**.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos para todos os nove intermediários sintetizados. Como exemplo, tem-se a seguir, nas **Figuras 13 e 14**, os espectros obtidos para o composto **2d**. Todos os demais espectros podem ser visualizados nos itens em Anexo.

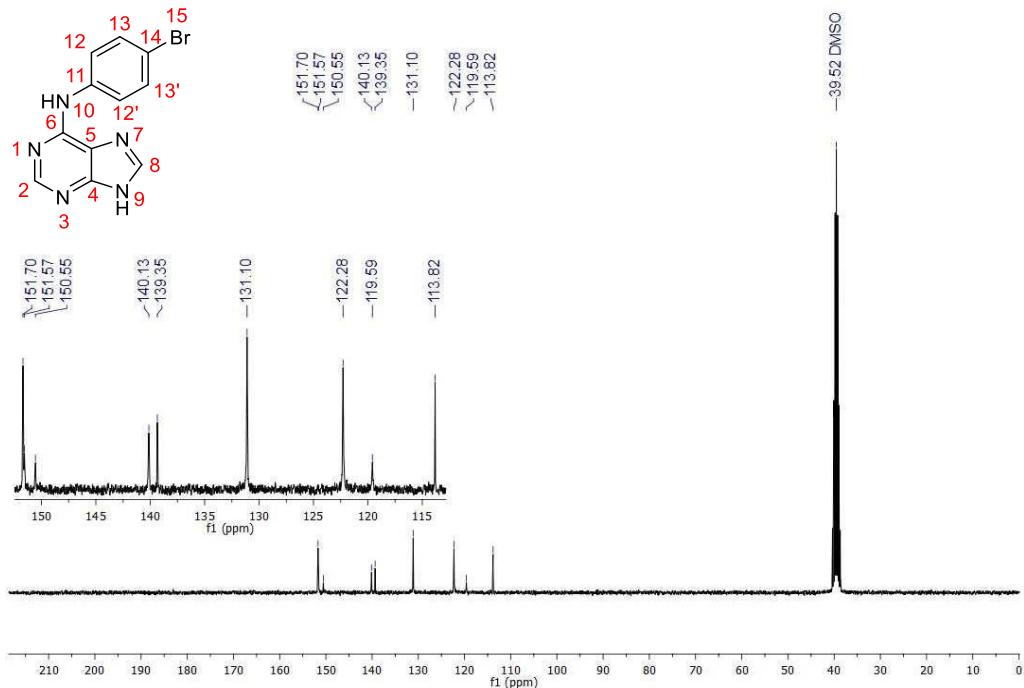
Analizando o espectro de RMN <sup>1</sup>H obtido para o intermediário **2d** (**Figura 13**), é importante notar a presença dos dois dupletos que surgem em 7,98 ppm e 7,50 ppm, ambos com integral para dois hidrogênios e constante de acoplamento igual a 7,92 Hz e 8,43 Hz, respectivamente. Estes sinais são característicos de um anel aromático p-substituído, indicando que houve a formação do produto esperado. Também é possível visualizar um sinal em 13,10 ppm referente ao hidrogênio ligado ao N7 do anel purínico, fortemente desblindado por sua ligação a um nitrogênio e ao sistema purínico. Em 9,82 ppm, aparece o sinal referente ao hidrogênio ligado ao N10, inserido entre dois sistemas aromáticos e, logo em seguida, dois singuletos muito próximos em 8,31 e 8,19 ppm, referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C8.

**Figura 13 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2d** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).**



Fonte: De autoria própria.

**Figura 14 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2d** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).**

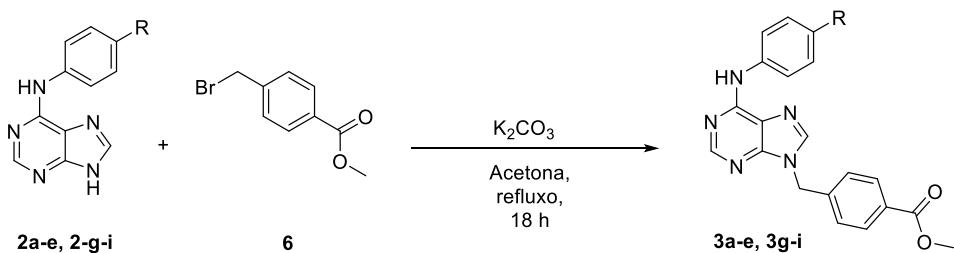


Fonte: De autoria própria.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  obtido para o intermediário **2d** (Figura 14) também é possível visualizar o padrão da anilina para-substituída, onde os sinais em 131,1 e 122,2 ppm representam os carbonos C12 e C12', C13 e C13', respectivamente. Os sinais pertencentes ao anel purínico aparecem em 151,7 ppm e 151,5 ppm, referentes aos carbonos C2 e C4, respectivamente, ambos fortemente desblindados; o sinal em 150,5 ppm refere-se ao C6 e os dois seguintes, em 140,1 e 139,3 ppm aos carbonos C5 e C8. Por fim, aparece o sinal em 119,6 ppm, referente ao C11, e outro em 113,8, referente ao C14.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para o composto **2j**, proveniente da hidrólise do composto **2i**, podem ser visualizados no **Anexo 7.2** e comprovam a formação do composto pelo desaparecimento do sinal da metila anteriormente ligada ao éster.

Com a obtenção dos intermediários anilino-purínicos em quantidades suficientes, prosseguiu-se para a próxima reação da rota sintética proposta. Seguindo o **Esquema 6**, os intermediários **2a-e**, **2g-i** foram submetidos à reação com o p-bromo-metil benzoato de metila **6** para obtenção dos intermediários **3a-e**, **3g-i** na presença de base e sob condição de refluxo. Todos os procedimentos realizados nessa etapa encontram-se mais detalhados no **Procedimento Geral B** e, da mesma forma que para a reação anterior, foram realizados de acordo com o protocolo previamente estabelecido (TAVARES, 2019).



**Esquema 6:** Condição reacional para a formação dos intermediários **3a-e**, **3g-i**.

A síntese e o work up para a obtenção dos intermediários **3a-e**, **3g-i** ocorreu como o esperado, atingindo rendimentos médios que variaram de 26% a 91%. Entretanto, para

o composto **3g**, a purificação padrão (coluna cromatográfica – gradiente 100% EtOAc até EtOAc:MeOH (94%-6%)), não foi eficiente. Como primeira alternativa, optou-se por testar a fase móvel isocrática composta por EtOAc:Hexano (7:3). O resultado foi excelente, inclusive para a purificação dos intermediários que possuíam outro substituinte. Sendo assim, seguiu-se com esta fase móvel até o fim dos experimentos. Os rendimentos médios podem ser visualizados na **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Rendimento dos compostos **3a-e, 3g-i**.

Composto	Estrutura	Rendimento médio (%)
<b>3a</b>		63
<b>3b</b>		87
<b>3c</b>		60
<b>3d</b>		81

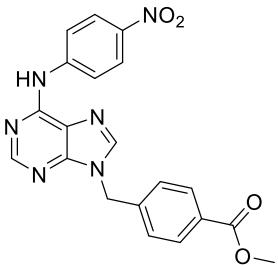
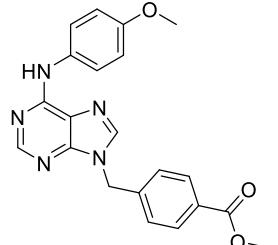
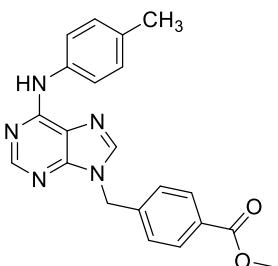
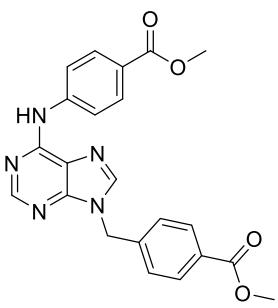
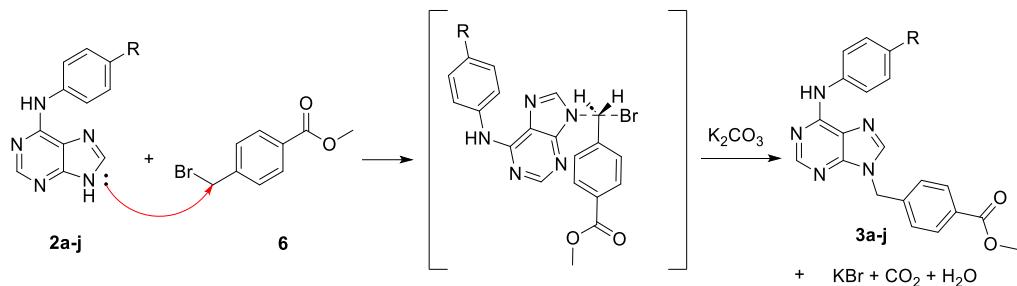
Composto	Estrutura	Rendimento médio (%)
3e		38
3g		59
3h		63
3i		26

Tabela 2 – Continuação.

Nesta reação, o mecanismo envolvido é uma substituição nucleofílica bimolecular ( $SN_2$ ), como é observado no **Esquema 7**. Inicialmente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio imidazólico presente nos intermediários **2a-j** ao carbono  $\alpha$ -halogenado do composto **6**, com formação do respectivo intermediário tetraédrico e subsequente liberação do íon Br<sup>-</sup> - como grupo abandonador, gerando os intermediários

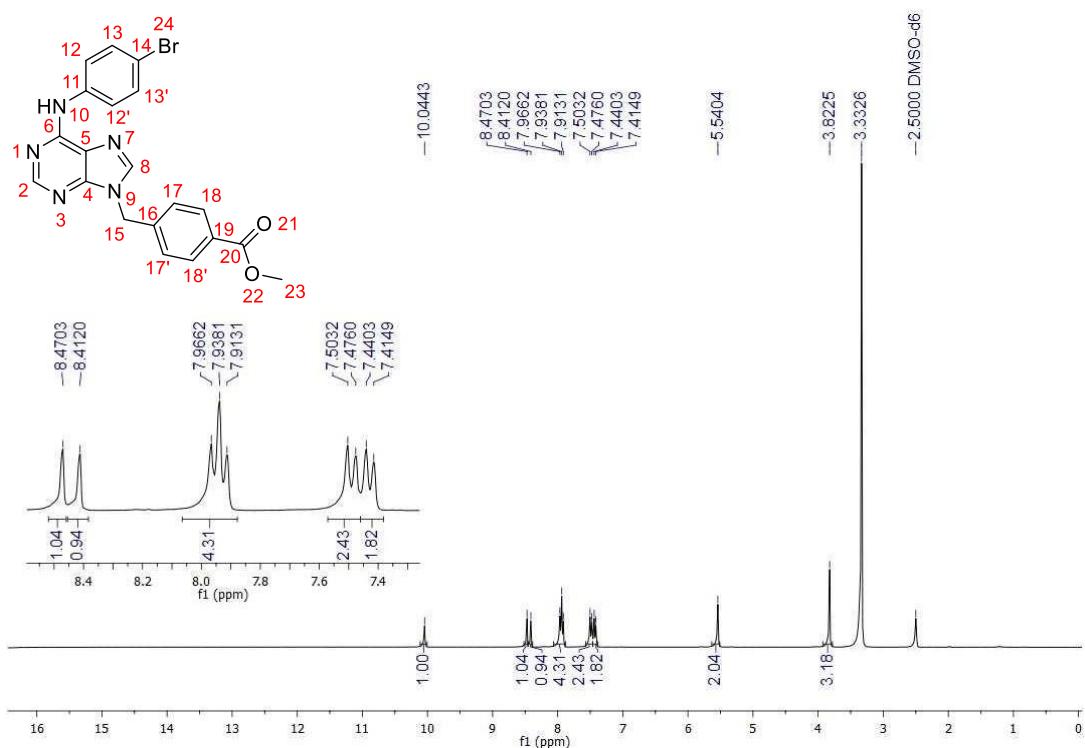
**3a-j.** Como uma SN<sub>2</sub>, a reação ocorre em um único passo, com sua velocidade sendo afetada pelo solvente utilizado, a concentração dos reagentes e pela presença de grupos volumosos ao redor do carbono eletrofílico (BRUICE, P.Y, 2006, p. 358–367). O uso da base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se faz necessário para neutralizar o HBr gerado durante o processo reacional.



**Esquema 7:** Mecanismo reacional de SN<sub>2</sub> para formação do segundo intermediário.

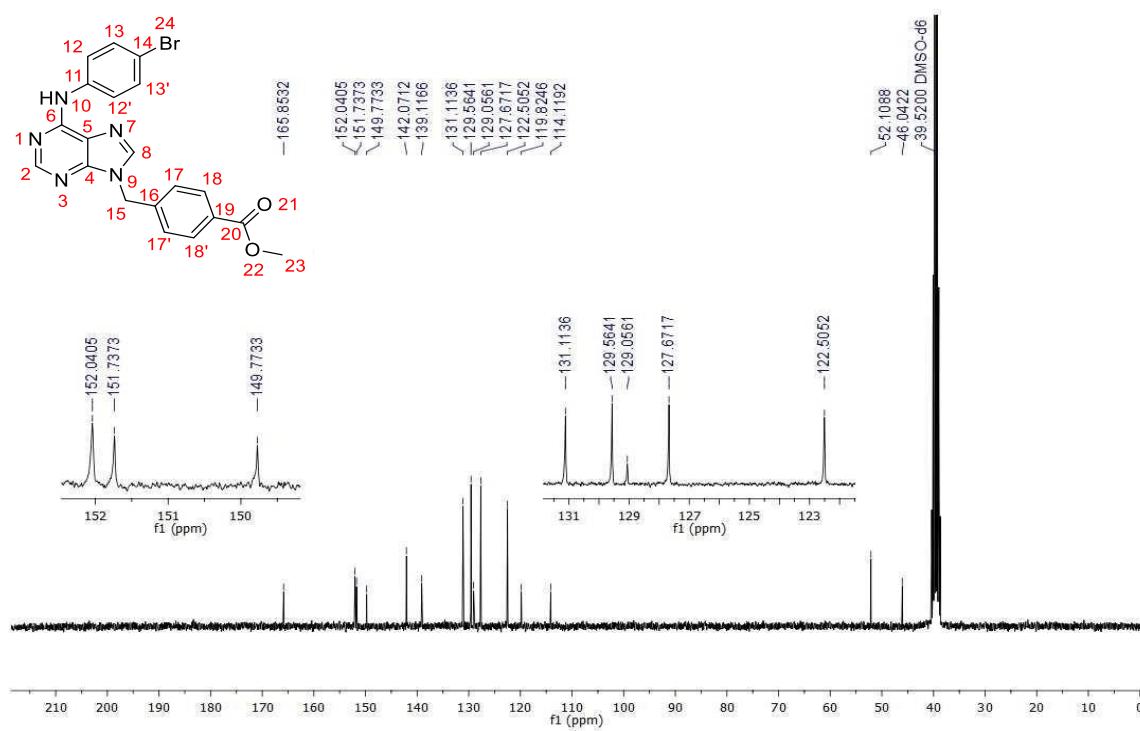
Da mesma forma, também foram obtidos os espectros para todos os compostos intermediários desta reação. Como exemplo, tem-se nas **Figuras 15 e 16** os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente, do composto intermediário **3d**. Os demais espectros podem ser visualizados nos itens em Anexo **7.2**. No espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Figura 15**), nota-se três principais sinais que comprovam a formação do produto desejado, a saber: a ausência do pico na região de 13,0 ppm, referente ao hidrogênio anteriormente ligado ao N9; surgimento do sinal em 3,82 ppm, referente à metila ligada ao éster do composto 6 e; o pico em 5,54 ppm, referente aos dois hidrogênios ligados ao C15.

**Figura 15** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3d** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



Fonte: De autoria própria.

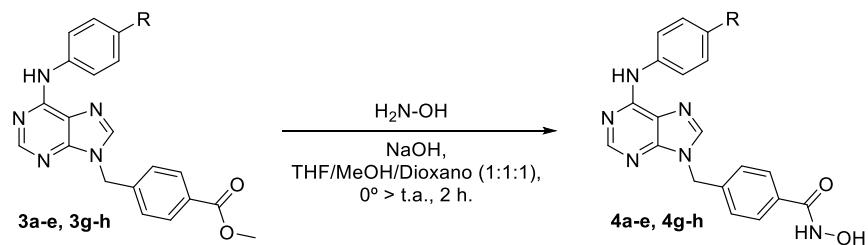
**Figura 16** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3d** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



Fonte: De autoria própria.

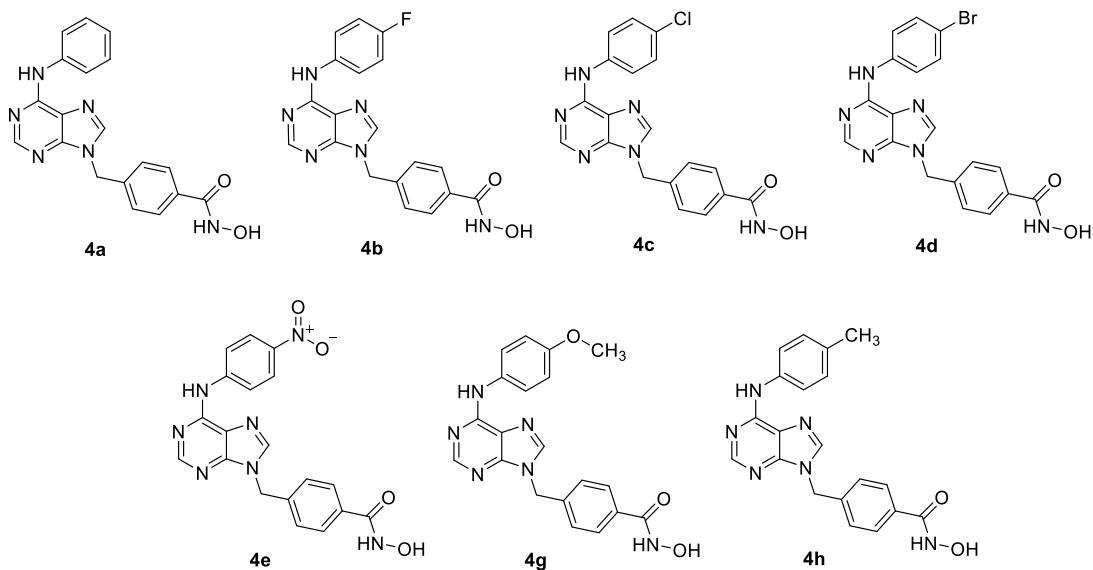
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , nota-se a presença do sinal em 52,1 ppm referente ao carbono da metoxila C23 e do sinal em 46,0 ppm referente ao carbono metilênico C15. Destaca-se o sinal em 165,8 referente à carbonila do grupamento éster (C20). Tomados em conjunto, estes dados indicam que o produto **3d** foi formado com sucesso.

Com a obtenção dos intermediários ésteres **3a-e, 3g-j**, prosseguiu-se então para a última etapa da rota sintética. Devido à disponibilidade de reagentes, foram sintetizados sete compostos finais inéditos, sendo eles **4a-e, 4g-h**. A estratégia sintética geral para a obtenção de **4a-e, 4g-h** pode ser visualizada no **Esquema 8** a seguir. O protocolo para a última etapa foi baseado em estudos de TAVARES, 2019. Entretanto, adicionou-se também 1,4-dioxano em uma quantidade equivalente aos outros solventes para melhor solubilização dos intermediários **3a-e, 3g-h**. Todas as etapas estão descritas no **Procedimento Geral C**.



**Esquema 8:** Condição reacional para a formação dos intermediários **4a-e, 4g-h**.

A síntese e work up levaram à obtenção dos compostos finais com rendimento global que variou de 15% a 62%, os quais foram considerados satisfatórios quando comparados aos obtidos em outros estudos de síntese de ácido hidroxâmico a partir de um éster intermediário (ALAM, 2019). Mais informações sobre os compostos, como pureza e aspecto físico, podem ser visualizadas na **Tabela 3**.

**Figura 17 – Sete compostos finais inéditos sintetizados.**

Fonte: De autoria própria.

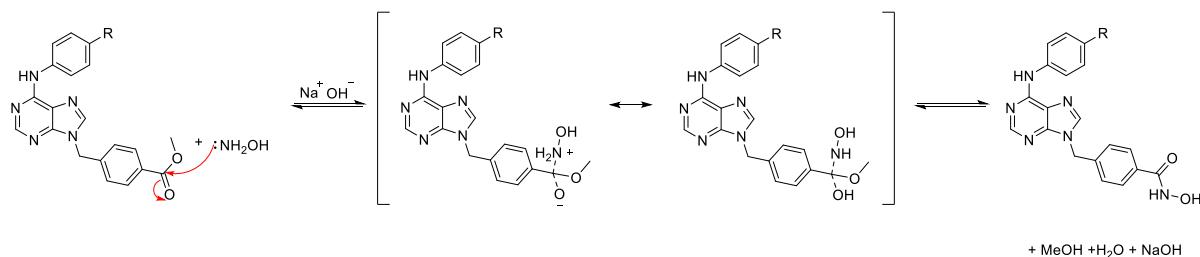
**Tabela 3 - Caracterização dos sete compostos finais inéditos sintetizados.**

Composto	Aspecto físico	Rendimento (%)	Rendimento Global (%)	Pureza (%)	Faixa de fusão (°C)
<b>4a</b>	Sólido fino branco	89	40	95,2	196,1 – 196,6
<b>4b</b>	Sólido fino branco rosado	92	62	95,0	181,6 – 182,6
<b>4c</b>	Sólido fino branco	83	40	99,1	187,5 – 188,7
<b>4d</b>	Sólido fino branco	77	51	95,7	190,6 – 191,2
<b>4e</b>	Sólido fino amarelado	55	15	75,6 <sup>a</sup>	167,3 – dec. <sup>b</sup>

Composto	Aspecto físico	Rendimento (%)	Rendimento Global (%)	Pureza (%)	Faixa de fusão (°C)
<b>4g</b>	Sólido fino branco	72	31	99,9	147,5 – 149,0
<b>4h</b>	Sólido fino branco	87	47	96,5	177,5 – 179,0

**Tabela 3 – Continuação.**<sup>a</sup> Pureza abaixo da esperada.<sup>b</sup> Dec = decomposição do material.

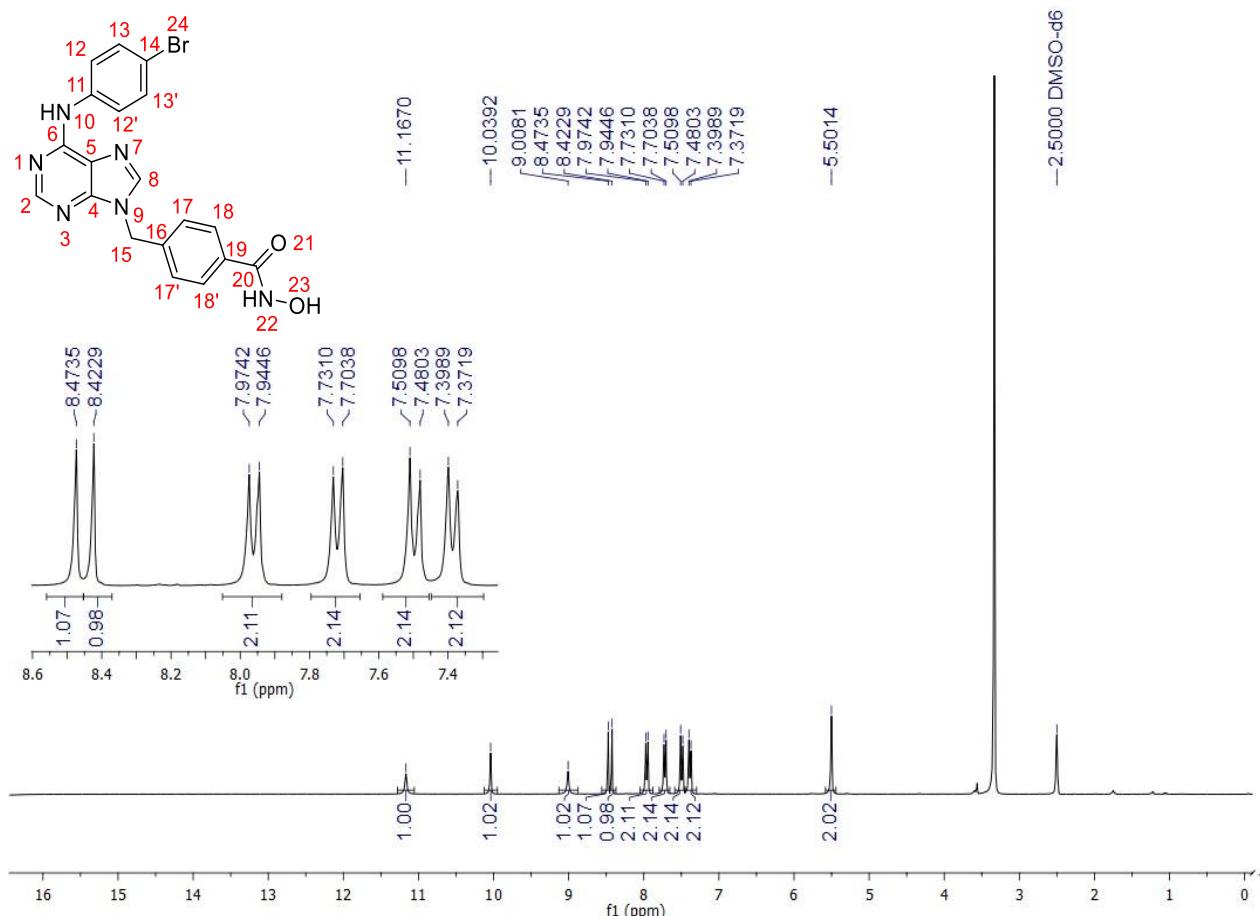
A aminólise envolvida na reação ocorre através de uma série de passos onde há adição da hidroxilamina ao composto e consequente eliminação de um grupo alcoxil, assim como o descrito por BUNNETT; DAVIS (1960). A hidroxilamina é adicionada ao carbono carboxílico presente no intermediário **3d**, formando um composto intermediário onde ocorre uma troca de prótons entre a amina e oxigênio carbonílico, sendo o último mais estável. Há a formação de um intermediário tetraédrico, com consequente liberação do grupo alcoxil (metanol), regeneração da base e formação do ácido hidroxâmico (BUNNETT; DAVIS, 1960). O mecanismo pode ser visualizado no **Esquema 9**.

**Esquema 9:** Mecanismo reacional da aminólise de éster.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que comprovam a formação do composto final **4d** podem ser visualizados nas **Figuras 18 e 19**.

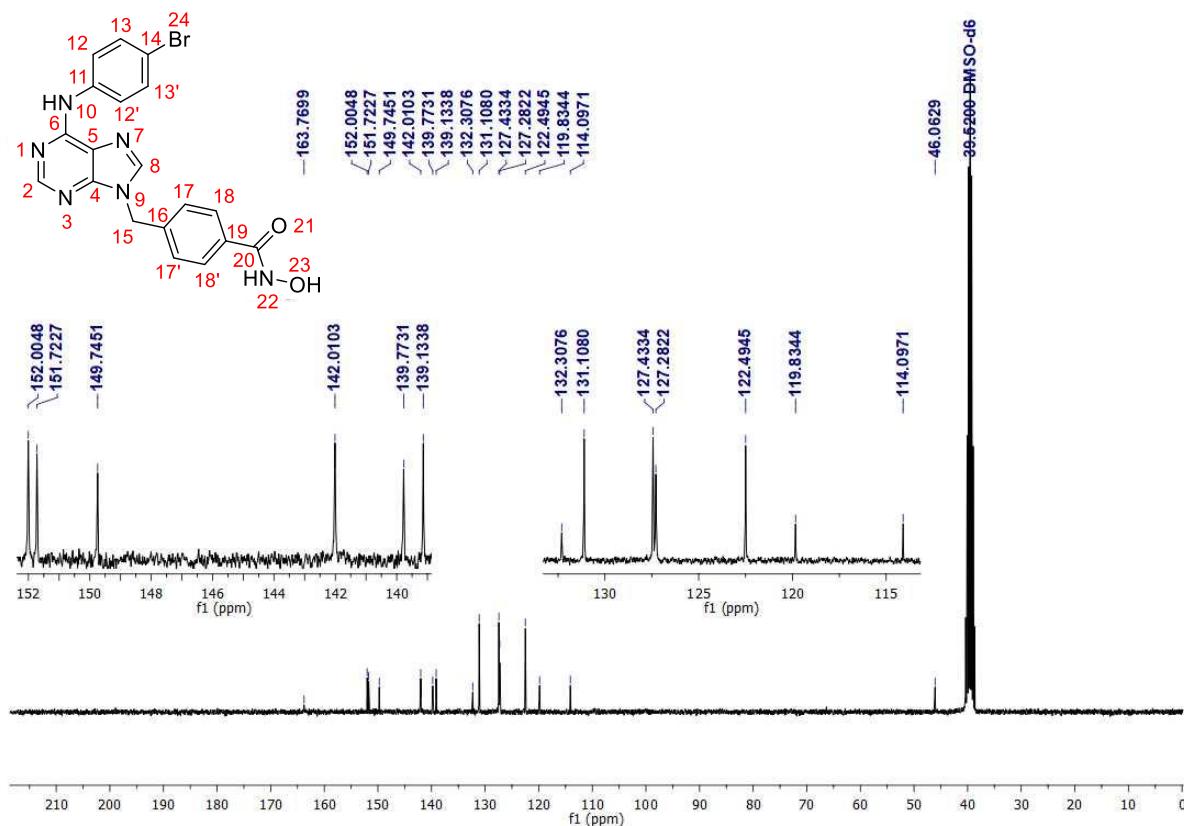
Como pode ser visto na **Figura 18**, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido para o composto **4d** é bastante semelhante àquele do intermediário éster **3d**. Dois sinais importantes são em 11,16 ppm e em 9,00 ppm, relativos aos hidrogênios ligados à amina e à hidroxila, respectivamente, provenientes da formação do ácido hidroxâmico. Destaca-se a ausência do sinal em 3,82 ppm, relativo à metila ligada ao éster, o que mais uma vez comprova a formação exitosa do produto.

**Figura 18** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **4d** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



Fonte: De autoria própria.

**Figura 19 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **4d** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).**



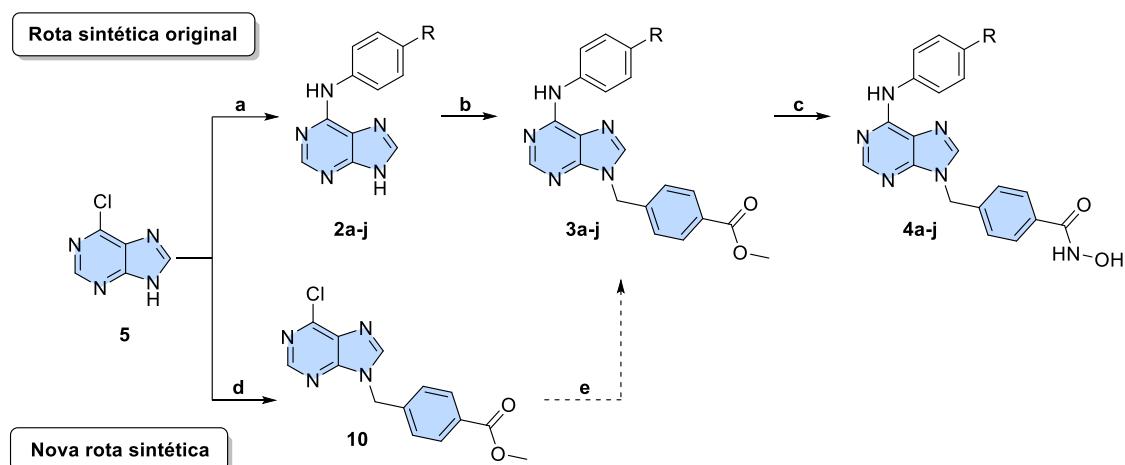
Fonte: De autoria própria.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  é possível observar a ausência do sinal em 52,1 ppm, relativo a antigametila do éster. Nota-se, ainda, que o sinal de carbono carbonílico C20 sofreu um leve deslocamento para campo mais blindado quando comparado ao C20 do intermediário anterior. A alteração da função orgânica pode explicar o deslocamento observado, uma vez que o grupo adicionado (hidroxilamina) proporciona um ambiente químico de maior desblindagem em relação à metoxila antes presente (BRUICE, P.Y, 2006, p. 560–568).

Embora tenham sido sintetizados nove intermediários iniciais, os compostos **2i**, **2j** e **3j** (produto da hidrólise do composto **2i**) não foram submetidos a continuação na rota sintética devido a falta do reagente **hidroxilamina** (solução aquosa 50%), essencial para a obtenção do composto final contendo o ácido hidroxâmico.

## 4.2 Proposta de alteração da rota sintética

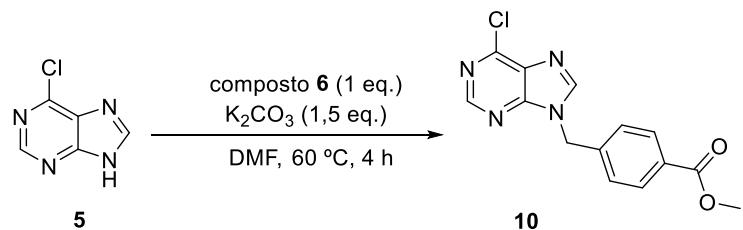
A partir de discussões em nosso grupo, notou-se a possibilidade de síntese do intermediário-chave **10**, por meio da inversão das etapas **a** e **b**, apresentadas no **Esquema 10**, a seguir. O novo intermediário possui uma estrutura comum a todos os compostos e a sua obtenção poderia gerar diversidade molecular de uma forma mais convergente, além de deixar a rota mais elegante. Portanto, buscou-se na literatura forma de proceder com esta inversão de forma eficiente.



**Esquema 10:** Nova rota sintética e semelhança entre o intermediário-chave **10** e os outros compostos. Reagentes e condições: a) HCl 10 M (0,8 eq.), isopropanol, refluxo, 18 h; b) *p*-(bromometil) benzoato de metila 6 (1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), acetona, refluxo, 18 h; c) NH<sub>2</sub>OH (hidroxilamina) 7 (50 eq.), NaOH (8 eq.), THF-MeOH-Dioxano(1:1:1), 0°C – t.a., 2 h; d) *p*-(bromometil) benzoato de metila 6 (1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 eq.), DMF, 60° C, 3 h.

A estratégia escolhida para síntese do intermediário **10** segue o protocolo descrito por Nepali et al., (2020) e está apresentada no **Esquema 10**. Como pode observado, os procedimentos se assemelham com aqueles desenvolvidos no **Procedimento Geral B**, contando com ligeiras alterações, incluindo a substituição de acetona por DMF e a redução de 3,0 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para 1,5 eq. Ainda, investigações preliminares mostraram ser possível a diminuição da temperatura da reação, mantendo o tempo reacionale obtendo rendimentos similares. Durante a purificação, parte do produto foi coletado como uma mistura, o que foi rapidamente revertido pela alteração da fase móvel utilizada na cromatografia em coluna. A alteração de EtOAc/MeOH (9,5:0,5) para EtOAc/MeOH (9,9:0,1), mostrou-se eficaz e todo o produto foi separado

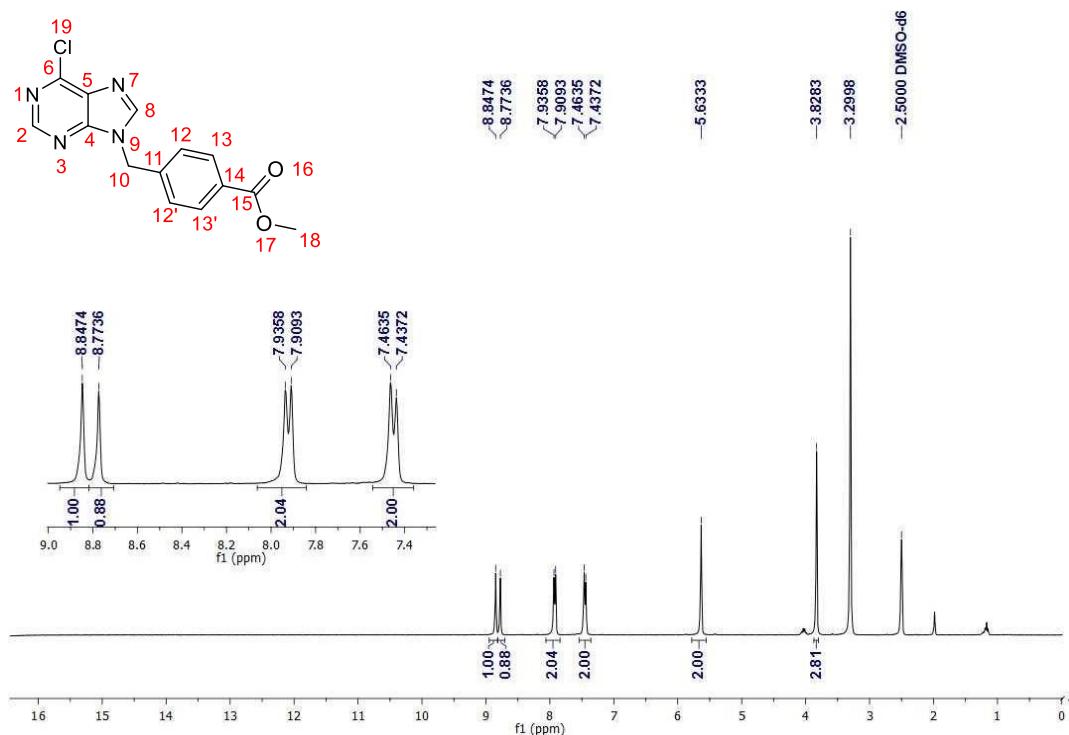
e isolado. Obteve-se ao final um sólido esverdeado com rendimento de 71%. O protocolo detalhado encontra-se descrito no **Procedimento Geral D**.



**Esquema 11:** Condição reacional para a obtenção do intermediário 10.

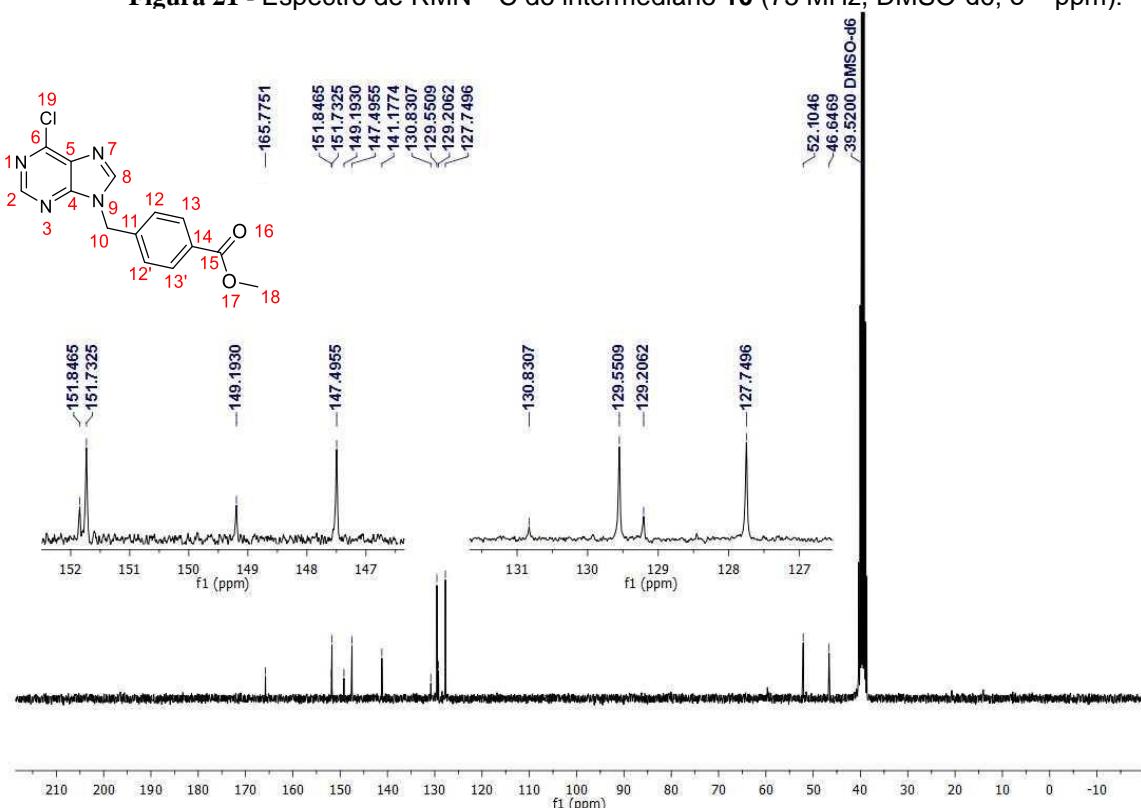
Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  comprovam a formação do intermediário **10** e podem ser visualizados nas **Figuras 20** e **21**. No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , pode-se evidenciar a presença dos dupletos em 7,93 ppm (d,  $J = 7,95$  Hz, 2 H) e em 7,46 ppm (d,  $J = 7,89$  Hz, 2 H), referente ao anel aromático do benzil-éster adicionado. Ainda, nota-se a presença dos sinais referentes aos hidrogênios ligados ao C10, da porção *linker* da molécula, e à metila ligada ao éster (C18), em 5,63 ppm e 3,82 ppm, respectivamente.

**Figura 20** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **10** (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  = ppm).



Fonte: De autoria própria.

**Figura 21 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **10** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).**



Fonte: De autoria própria.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , é importante notar a presença do sinal em 52,1 ppm, referente ao CH<sub>3</sub> da metoxila. Em sequência, observa-se o sinal em 46,6 ppm, referente ao C10 também presente na porção *linker* da molécula. Por fim, tem-se os sinais em 129,5 ppm (C12 e C12') e em 127,7 ppm (C13 e C13'), relativos ao anel aromático da *linker* incorporado à molécula.

A obtenção do intermediário-chave **10** revelou-se promissora, no entanto, a identificação de uma alternativa sintética eficaz para o **Procedimento Geral E**, visando à incorporação dos substituintes anilínicos (**Esquema 10**), mostrou-se desafiadora e tal impedimento comprometeu a continuidade da rota. Os procedimentos investigados na literatura assemelhavam-se muito com aqueles empregados na formação dos intermediários **2a-j**. Contudo, em várias tentativas, não se observou a formação de produto, mesmo após 24 h de reação. Espera-se que, em futuras abordagens, nova rota proposta possa ser empregada com êxito, proporcionando a obtenção dos compostos desejados.

#### 4.3 Avaliação biológica dos compostos finais sintetizados

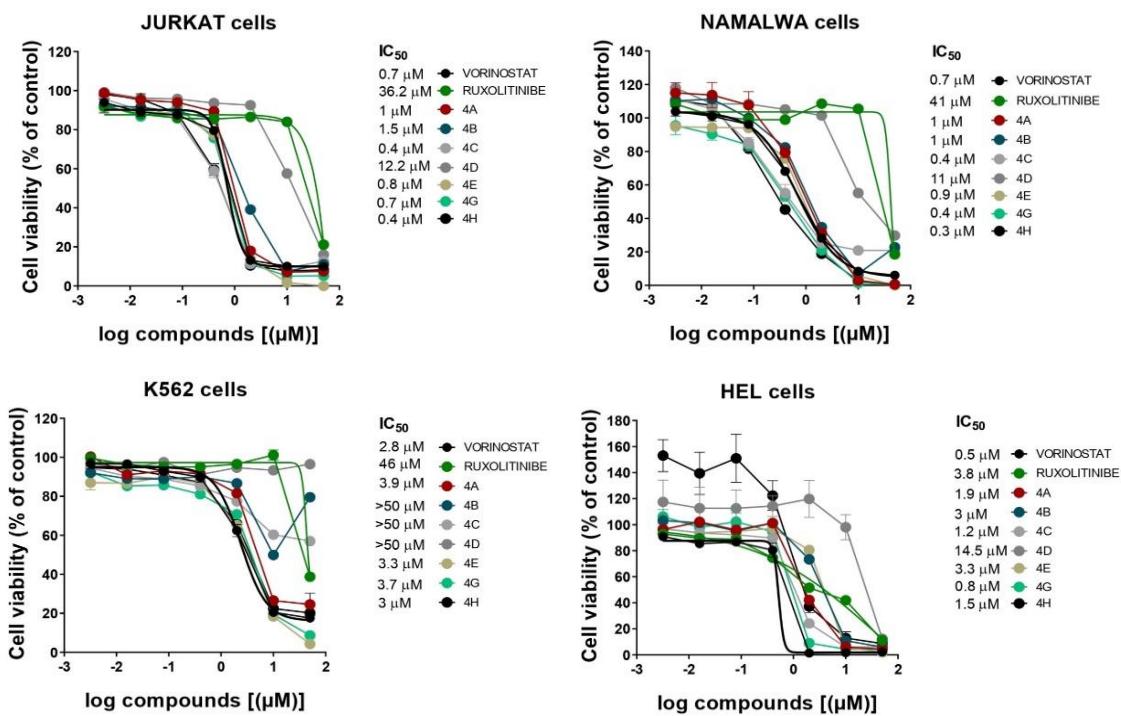
Com os compostos sintetizados, conduziram-se ensaios de viabilidade celular por ensaios MTT para determinação de IC<sub>50</sub> em quatro modelos experimentais distintos, a saber: linhagem de células Jurkat (leucemia linfoide aguda de linfócitos T), linhagem de células Namalwa (leucemia linfoide aguda de linfócitos B), HEL (neoplasia mieloproliferativa) e K5622 (leucemia mieloide crônica) (CARLOS et al., 2021; KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018a). Utilizaram-se o vorinostate (pan-inibidor de HDACs) e o ruxolitinibe (inibidor de algumas kinases) como os fármacos de referência. Esta etapa foi realizada por parceiros do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Doutorando Jorge Antônio Elias Godoy Carlos e o Prof. Dr. João Agostinho Machado-Neto), conforme descrito no **Procedimento Geral F**.

Na **Figura 23**, observa-se que os compostos **4c** e **4h** apresentaram valores de IC<sub>50</sub> nas células Jurkat, variando de 0,8 a 36,2 µM, destacando-se pela maior potência em comparação aos demais utilizados nesse modelo celular (IC<sub>50</sub> de 0,4 µM). Na linhagem HEL, o IC<sub>50</sub> variou de 0,8 a 14,5 µM, sendo o composto **4g** o mais potente, com IC<sub>50</sub> de 0,8 µM. Os compostos também exibiram boa atividade nas células Namalwa, com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 0,3 e 11 µM. Por outro lado, a linhagem K562 mostrou-se mais resistente aos compostos avaliados, com IC<sub>50</sub> na faixa de 3 a >50 µM.

Na análise dos compostos, é possível discernir quatro que demonstraram desempenho superior dentre os sete sintetizados. O composto **4g**, caracterizado pela presença de um grupo metoxila como substituinte, apresentou resultados promissores em três das quatro linhagens testadas (Jurkat, Namalwa e K562), alcançando uma IC<sub>50</sub> na faixa alto nanomolar ( $\leq$  0,8 µM). Esses resultados equiparam-se e, em alguns casos, superam os obtidos com o vorinostate e com o ruxolitinibe. Outros três compostos, nomeadamente **4c**, **4e** e **4h**, contendo grupos substituintes cloro, nitro e metila, respectivamente, também se destacaram, exibindo potência em nível nanomolar em ambas as linhagens de leucemia linfoide aguda, superando ou se equiparando aos resultados alcançados pelos vorinostate e com o ruxolitinibe.

**Figura 22:** Avaliação da viabilidade celular. Os resultados são expressos como porcentagem em relação

às células tratadas com veículo e apresentados como média e desvio padrão.



Fonte: De autoria própria.

Antecipadamente, esperava-se que o efeito retirador de elétrons dos substituintes desempenharia papel crucial no aprimoramento da potência dos compostos. Esta hipótese mostrou-se promissora, uma vez que três dos quatro compostos mais eficazes possuíam grupos com substancial efeito retirador de elétrons, a exemplo do cloro (compostos **4c** – cloro, **4e** – nitro, e **4g** – metoxila). Embora a expectativa fosse de que compostos com grupos semelhantes apresentassem resultados semelhantes, constatou-se que dois compostos contendo halogênios como grupos substituintes, **4b** (flúor) e **4d** (bromo), não demonstraram atividade interessante. Em particular, o composto **4d** destacou-se negativamente ao exibir os maiores valores de  $\text{IC}_{50}$  em todos os modelos testados, exceção feita ao ruxolitinibe. Esses resultados indicam que, além do efeito retirados de elétrons, o tamanho do grupo, e sua correlação com os efeitos estéricos no sítio de ligação nos alvos, desempenha papel importante em sua atividade.

Além disso, destaca-se o composto **4h**, caracterizado pela presença de um substituinte metila ( $\text{CH}_3$ ), o qual evidenciou a mais elevada potência nos modelos de

Jurkat e Namalwa, registrando 0,4 µM e 0,3 µM, respectivamente. Este resultado é interessante considerando a natureza doadora de elétrons desse substituinte, em contraposição ao padrão observado nos demais compostos. Tal constatação reforça a hipótese acerca da relevância do tamanho do substituinte na ação sobre o alvo, uma vez que a metila e o flúor (presente no composto **4c**, o segundo mais potente) apresentam dimensões aproximadas.

Com base nos resultados obtidos, destaca-se a maior seletividade dos compostos para as linhagens Jurkat e Namalwa, de leucemias linfoideas agudas (LLAs). As LLAs são de grande preocupação mundial, sendo a maior causa de câncer em crianças, com prevalência até quatro vezes maior que leucemias mieloides agudas (ARAÚJO et al., 2022; BARBOSA et al., 2002), além de ser o segundo tipo mais comum de leucemias em adultos, com 75% dos casos relacionados aos linfócitos B (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Embora o sucesso terapêutico em crianças possa chegar a 90%, o tratamento usual que consiste em medicamentos amplamente conhecidos como metotrexato, ciclofosfamida, doxorrubicina L-asparaginase e corticosteroides, não é assim tão eficaz em adultos, como a taxa de cura chegando a apenas 10%, além de ser acompanhado por uma série de efeitos adversos, como febre, náusea, perda de cabelo, neutropenia, anemia etc. (FIELDING et al., 2006; SAMRA et al., 2020; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Terapias mais avançadas, como o uso de anticorpos monoclonais e *CAR-T Cells*, oferecem maior taxa de cura e menos efeitos adversos (SAMRA et al., 2020); entretanto, seus custos são muito elevados, o que torna a descoberta de novos quimioterápicos sintéticos mais potentes e com menos efeitos adversos, como os híbridos moleculares, relevante como alternativa de melhor custo-benefício (SAMRA et al., 2020; WAITMAN; PARISE-FILHO, 2022). A busca por moléculas híbridas entre inibidores de PI3K e HDAC teve início em 2012 com a publicação do trabalho que divulgou o promissor CUDC-907/fimepinostate (QIAN et al., 2012b) que atualmente se encontra em fase de estudos clínicos (QIAN et al., 2012b; RODRIGUES et al., 2020). Desde então, tem-se tentado elaborar novas propostas de inibidores híbridos de PI3K e outras kinases com HDACs que possuam atividade semelhante ou superior ao encontrado para o fimepinostate.

Ao comparar os dados obtidos com outros estudos que também visam a síntese de inibidores duais PI3K/HDAC, observa-se uma tendência no planejamento de compostos ao incorporarem um núcleo purínico (ou similar) como base para a porção *cap* e um ácido hidroxâmico como ZBG (CHEN et al., 2018b, 2016; RODRIGUES et al., 2020). Nesses estudos, os compostos também alcançaram valores de IC<sub>50</sub> na faixa de nanomolar, reforçando o potencial de uma estrutura híbrida como agente anticâncer. Nos estudos citados, nota-se uma estrutura molecular muito semelhante àquela do CUDC-907 (fimepinostate), o primeiro inibidor híbrido de PI3K/HDAC (QIAN et al., 2012b), diferente dos compostos propostos neste trabalho que possuem mudanças inovadoras em outras regiões da molécula, conservando características importantes, como o núcleo purínico e o ZBG, ainda assim atingindo resultados biológicos satisfatórios. O potencial da estrutura molecular definida por nosso grupo fica ainda mais evidente no estudo realizado por WAITMAN et al. em 2023, no qual uma série de compostos contendo outros substituintes, como 3-cloro-4-fluoranilina, 4-bromo-2-fluoranilina, obtiveram IC<sub>50</sub> menor ou igual a 50 nM.

#### **4.4 Avaliação da inibição enzimática dos compostos finais sintetizados**

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios biológicos, os compostos **4c**, **4e**, **4g** e **4h** foram selecionados para avaliação de sua atividade de inibição em HDAC 6, frente a outras formas da isoforma. Escolheu-se as isoformas HDAC 1 e HDAC 8 para comparação quanto a sua seletividade com a enzima HDAC 6. Em todas as ocasiões, comparou-se os resultados com a potência obtidos pelo Nexturastat A, inibidor seletivo de HDAC 6.

Os resultados obtidos demonstram maior seletividade para HDAC6 em todos os compostos, com potência até 186 vezes maior em relação às outras isoformas (composto **4c**, IC<sub>50</sub>HDAC 6/IC<sub>50</sub> HDAC 1; **Tabela 4**). É digno de nota que todos os compostos obtiveram maior seletividade que o composto de referência para HDAC 6, além de apresentar potência entre 6 e 18 vezes maior que o Nexturastat A.

Cabe maior destaque ao composto **4c**, com grupo Cl- substituinte, e ao composto **4h**, com grupo CH<sub>3</sub>- , que também obtiveram resultados de extrema relevância nos

ensaios de avaliação biológica e são de menor complexidade sintética. Os resultados fortalecem o achado com as avaliações biológicas quanto a importância do tamanho reduzido do grupo substituinte para sua ação biológica. Tal resultado é evidenciado pela maior potência obtida pelo composto **4e**, com grupo NO<sub>2</sub>- substituinte, duas vezes maior que o composto **4h** e três vezes maior que o composto **4c**.

**Tabela 4** - Tabela do IC<sub>50</sub> em diferentes isoformas de HDACs obtidos para os compostos selecionados.

Composto	HDAC 6 (IC <sub>50</sub> ±DP nM)	HDAC 1 (IC <sub>50</sub> ±DP nM)	HDAC 8 (IC <sub>50</sub> ±DP nM)
<b>4c</b>	0,89 ± 1,85	165,9 ± 2,43	98,93 ± 2,01
<b>4e</b>	2,58 ± 1,78	200,8 ± 3,36	336,7 ± 2,00
<b>4g</b>	1,61 ± 1,91	259,5 ± 1,87	112,4 ± 1,94
<b>4h</b>	1,22 ± 1,75	179,0 ± 2,31	100,5 ± 1,84
<b>Nexturastat A</b>	15,87 ± 2,94	1453 ± 2,59	776,4 ± 1,92

## 5. CONCLUSÃO

Foram planejados 10 compostos híbridos a partir das subunidades farmacofóricas dos fármacos idelalisibe e nexturastate A, potentes inibidores de enzimas a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e a enzima histona desacetilase 6 (HDAC6), respectivamente. Sete compostos finais inéditos (**4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4e**, **4g** e **4h**) foram sintetizados e caracterizados, com rendimento global de 15% a 62% e alta pureza (> 95%). Quatro compostos (**4c**, **4e**, **4g** e **4h**) obtiveram resultados promissores nos ensaios de viabilidade celular, atingindo resultados na faixa de alto nanomolar (< 0,8 µM). O efeito elétron-aceptor parece ser importante para a atividade dos compostos, contudo, o composto com o menor IC<sub>50</sub> continha uma metila como substituinte (**4h**), o que sugere que outros efeitos podem estar presentes, como o estérico (PINHEIRO et al., 2023). A atividade enzimática dos compostos selecionados, especialmente às que se referem ao **4c** e **4h**, evidenciam a seletividade dos compostos para a enzima HDAC 6 quanto a outras isoformas, superando o resultado obtido para a molécula de referência (Nexturastat A).

Estudos mais aprofundados visando à elucidação dos mecanismos subjacentes à morte celular, incluindo ensaios enzimáticos em outras proteíns devem ser realizados para uma caracterização da citotoxicidade mais abrangente. Adicionalmente, investigações futuras devem se concentrar na obtenção e análise dos compostos com os substituintes restantes (COOMe, COOH, NH<sub>2</sub>), visando ampliar o escopo das características físico-químicas dos compostos propostos. Cabe destacar, ainda, que a proposta de uma nova rota sintética, centrada em um intermediário-chave (intermediário 10), permanece bastante relevante para o presente projeto. Contudo, é importante ressaltar que esta abordagem não foi completamente explorada, carecendo de estudos detalhados para sua conclusão.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALAM, M. A. Methods for Hydroxamic Acid Synthesis. <http://www.eurekaselect.com>, v. 23, n. 9, p. 978–993, 2019.
- ARAÚJO, L. G. L. et al. Perfil Demográfico e Clínico de Casos de Neoplasias Hematológicas em Crianças e Adolescentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 68, n. 2, p. e-242356, 22 jun. 2022.
- BARBOSA, C. M. P. L. et al. Manifestações músculo-esqueléticas como apresentação inicial das leucemias agudas na infância. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 481–484, dez. 2002.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726–734, out. 2011.
- BERGMAN, J. A. et al. Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Bearing Substituted Urea Linkers Inhibit Melanoma Cell Growth. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9891–9899, 26 nov. 2012.
- BOLOGNESI, M. L. Polypharmacology in a Single Drug: Multitarget Drugs. <http://www.eurekaselect.com>, v. 20, n. 13, p. 1639–1645, 2013.
- BOLOGNESI, M. L.; CAVALLI, A. Multitarget Drug Discovery and Polypharmacology. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1190–1192, 20 jun. 2016.

BUNNETT, J. F.; DAVIS, G. T. The Mechanism of Aminolysis of Esters<sup>1,2</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, n. 3, p. 665–674, 1 fev. 1960.

CARLOS, J. A. E. G. et al. AD80, a multikinase inhibitor, exhibits antineoplastic effects in acute leukemia cellular models targeting the PI3K/STMN1 axis. **Investigational New Drugs**, v. 39, n. 4, p. 1139–1149, 1 ago. 2021.

CASAUBON, J. T.; KASHYAP, S.; REGAN, J.-P. BRCA1 and BRCA2 Mutations. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

CHAUDHRY, C. et al. An innovative kinase platform to accelerate small-molecule inhibitor discovery and optimization from hits to leads. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 5, p. 1115–1125, 1 maio 2021.

CHEN, D. et al. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Fused Pyrimidine-Based Hydroxamates for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 1552–1575, 22 fev. 2018a.

CHEN, D. et al. Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Fused Pyrimidine-Based Hydroxamates for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 1552–1575, 22 fev. 2018b.

CHEN, Y. et al. Development of Purine-Based Hydroxamic Acid Derivatives: Potent Histone Deacetylase Inhibitors with Marked in Vitro and in Vivo Antitumor Activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5488–5504, 9 jun. 2016.

DEB, P. K. et al. Chapter 2 - Physicochemical Aspects to Be Considered in Pharmaceutical Product Development. Em: TEKADE, R. K. (Ed.). **Dosage Form Design Considerations**. Advances in Pharmaceutical Product Development and Research. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 57–83.

DUVIC, M.; AND VU, J. Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 7, p. 1111–1120, 1 jul. 2007.

FENICHEL, M. P. FDA Approves New Agent for Multiple Myeloma. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, p. djv165, 1 jun. 2015.

FIELDING, A. K. et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 944–950, 10 out. 2006.

FU, R. et al. Designing multi-targeted agents: An emerging anticancer drug discovery paradigm. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 195–211, 18 ago. 2017.

GALLINARI, P. et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. **Cell Research**, v. 17, n. 3, p. 195–211, mar. 2007.

GRIPP, I. M. et al. Leucemia Linfoblástica Aguda em Pediatria: Epidemiologia, diagnóstico, terapias-alvo e desafios no tratamento. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 9, p. e75785–e75785, 10 dez. 2024.

GU, Z. et al. Advances in dual-targeting inhibitors of HDAC6 for cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 275, p. 116571, 5 set. 2024.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022.

HEIMBURG, T. et al. Structure-Based Design and Biological Characterization of Selective Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitors with Anti-Neuroblastoma Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 10188–10204, 28 dez. 2017.

INABA, H.; PUI, C.-H. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 9, p. 1926, jan. 2021.

INCA. **Tratamento do câncer**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/tratamento-do-cancer>>. Acesso em: 12 abr. 2025.

JABBOUR, E. et al. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 121, n. 15, p. 2517–2528, 2015.

JANKU, F.; YAP, T. A.; MERIC-BERNSTAM, F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 5, p. 273–291, maio 2018.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095505, 6 jan. 2018a.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095505, jun. 2018b.

KWAN, E. E. et al. Concerted nucleophilic aromatic substitutions. **Nature Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 917–923, set. 2018.

LEE, H.-Y. et al. 5-Aroylindoles Act as Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Ameliorating Alzheimer's Disease Phenotypes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 16, p. 7087–7102, 23 ago. 2018.

LOPES, L. F.; CAMARGO, B. DE; BIANCHI, A. Os efeitos tardios do tratamento do câncer infantil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 277–284, set. 2000.

LOSSON, H. et al. HDAC6—An Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia? **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 318, 29 jan. 2020.

LUAN, Y. et al. Kinase and Histone Deacetylase Hybrid Inhibitors for Cancer Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 3171–3183, 11 abr. 2019.

MARTINI, M. et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. **Annals of Medicine**, 1 set. 2014.

MEHRPOURI, M.; POURBAGHERI-SIGARODI, A.; BASHASH, D. The contributory roles of histone deacetylases (HDACs) in hematopoiesis regulation and possibilities for pharmacologic interventions in hematologic malignancies. **International Immunopharmacology**, v. 100, p. 108114, 1 nov. 2021.

MENDIRATTA, G. et al. Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 5961, 13 out. 2021.

MORISHITA, N. et al. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 59, n. 1, p. 83–89, 15 jul. 2012.

NADENDLA, R. Molecular Modification: A Strategy in Drug Discovery and Drug Design. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 52, n. 2, p. 43511–43522, 15 ago. 2023.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 25, n. 1, p. 85–109, 1 jul. 1960.

PAUL, S.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 11, p. 1645–1666, 1 nov. 2016.

PU, J. et al. Exploring the role of histone deacetylase and histone deacetylase inhibitors in the context of multiple myeloma: mechanisms, therapeutic implications, and future perspectives. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, p. 45, 23 abr. 2024.

PUI, C.-H. Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers of Medicine**, v. 14, n. 6, p. 689–700, 1 dez. 2020.

QIAN, C. et al. Cancer Network Disruption by a Single Molecule Inhibitor Targeting Both Histone Deacetylase Activity and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 15, p. 4104–4113, 30 jul. 2012a.

QIAN, C. et al. Cancer Network Disruption by a Single Molecule Inhibitor Targeting Both Histone Deacetylase Activity and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 15, p. 4104–4113, 30 jul. 2012b.

RODRIGUES, D. A. et al. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of First-in-Class Multitarget N-Acylhydrazone Derivatives as Selective HDAC6/8 and PI3K $\alpha$  Inhibitors. **ChemMedChem**, v. 15, n. 6, p. 539–551, 2020.

ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Molecular Oncology**, v. 1, n. 1, p. 19–25, 2007.

ROSIK, L. et al. Limited efficacy of specific HDAC6 inhibition in urothelial cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**, 1 jun. 2014.

ROSKOSKI, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 19–50, 1 jun. 2019.

SAMRA, B. et al. Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: state-of-the-art treatment and future directions. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, p. 70, 5 jun. 2020.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023.

SAWYERS, C. L. Mixing cocktails. **Nature**, v. 449, n. 7165, p. 993–995, out. 2007.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, v. 7, n. 6, p. e577–e577, jun. 2017.

THAKUR, A. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Quinazolin-4-one-Based Hydroxamic Acids as Dual PI3K/HDAC Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 4256–4292, 23 abr. 2020.

UEDA, Y. et al. Mechanistic insights into cancer drug resistance through optogenetic PI3K signaling hyperactivation. **Cell Chemical Biology**, v. 29, n. 11, p. 1576- 1587.e5, 17 nov. 2022.

VANHAESEBROECK, B. et al. Synthesis and Function of 3-Phosphorylated Inositol Lipids. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. Volume 70, 2001, p. 535–602, 1 jul. 2001.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. <http://www.eurekaselect.com>, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

WAITMAN, K.; PARISE-FILHO, R. New Kinase and HDAC Hybrid Inhibitors: Recent Advances and Perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, 1 maio 2022.

WANG, X.-X.; WAN, R.-Z.; LIU, Z.-P. Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1406–1418, 1 jan. 2018.

WANG, Y.; TORTORELLA, M. Molecular design of dual inhibitors of PI3K and potential molecular target of cancer for its treatment: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 228, p. 114039, 15 jan. 2022.

YANG, J. et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 26, 19 fev. 2019.

YOU, J. S.; JONES, P. A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? **Cancer Cell**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 10 jul. 2012.

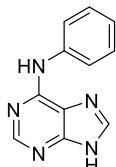
YUE, K. et al. Development of Hydrazide-Based HDAC6 Selective Inhibitors for Treating NLRP3 Inflammasome-Related Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, 7 abr. 2025.

ZESSIN, M. et al. One-Atom Substitution Enables Direct and Continuous Monitoring of Histone Deacetylase Activity. **Biochemistry**, v. 58, n. 48, p. 4777–4789, 3 dez. 2019.

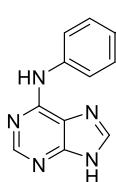
ZHAO, L.; VOGT, P. K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5486–5496, set. 2008.

## 7. ANEXOS

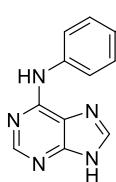
### 7.1 Moléculas sintetizadas



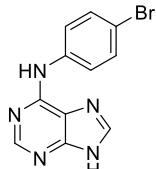
**N-fenil-9H-purina-6-amina (2a)** - Intermediário obtido a partir da anilina **1a** como um sólido amarelado (796,3 mg,  $\eta = 75\%$ ). **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  9,68 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,96 (d,  $J = 8,01$  Hz, 2 H), 7,34 - 7,29 (m, 2H), 7,01 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  151,7 (2C), 150,3, 139,8 (2C), 128,2 (2C), 122,2 (2C), 120,5, 119,4.

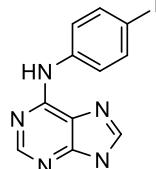


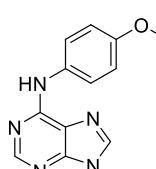
**N-(4-fluorofenil)-9H-purina-6-amina (2b)** - Intermediário obtido a partir da *p*-fluoranilinia **1b** como um sólido branco, levemente esverdeado (132, mg,  $\eta = 57\%$ ). **RMN DMSO- $d_6$** ,  $\delta$  9,76 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,97-7,93 (m, 2H), 7,15 (t,  $J = 8,7$  Hz, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  157,6 (d,  $J_1 = 237,5$  Hz, C-F), 151,7 (2C), 151,4, 140,1, 136,1 (d,  $J_4 = 2,3$  Hz, C-F), 122,3 (d,  $J_3 = 7,6$  Hz, C-F), 114,9 (d,  $J_2 = 21,9$  Hz, C-F).

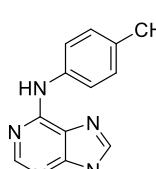


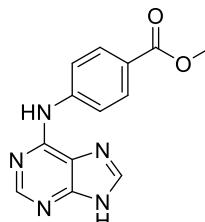
**N-(4-clorofenil)-9H-purina-6-amina (2c)** - Intermediário obtido a partir da *p*-cloroanilina **1c** como um sólido verde claro, levemente esverdeado (845,0 mg,  $\eta = 70\%$ ). **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  13,1 (sl, 1 H), 9,89 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,03 (d,  $J = 8,10$  Hz, 2H), 7,38 (d,  $J = 7,68$  Hz, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  151,6 (3C), 138,9 (2C), 128,1 (3C), 125,8, 121,8 (2C).

 **N-(4-bromofenil)-9H-purina-6-amina (**2d**)** - Intermediário obtido a partir da *p*-bromoanilina **1d** como sólido branco, levemente esverdeado (241,9 mg,  $\eta = 82\%$ ). **1H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  13,1 (s, 1 H), 9,82 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,90 (d,  $J = 7,92$  Hz, 2H), 7,41 (d,  $J = 8,43$  Hz, 2H). **13C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  151,7, 151,5, 150,5, 140,1, 139,5, 131,1 (2C), 122,2 (2C), 119,6, 113,8.

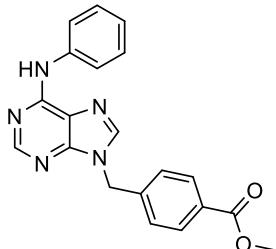
 **N-(4-nitrofenil)-9H-purina-6-amina (**2e**)** - Intermediário obtido a partir da *p*-nitroanilina **1e** como sólido branco amarelado (871,2 mg,  $\eta = 68\%$ ). **1H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  13,3 (s, 1H), 10,5 (s, 1H), 8,52 (s, 1 H), 8,38 (s, 1H), 8,31 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 8,22 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H). **13C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  151,4, 151,2, 150,8, 146,6, 141,0, 141,0, 124,6 (2C), 120,2, 119,2 (2C).

 **N-(4-metoxifenil)-9H-purina-6-amina (**2g**)** - Intermediário obtido a partir da *p*-anisidina **1g** como sólido cinza, levemente esverdeado (845,68 mg,  $\eta = 70\%$ ). **RMN 1H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  13,07 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,31 (d,  $J = 8,04$  Hz, 2H), 6,92 (d,  $J = 8,13$  Hz, 2H), 3,74 (s, 3H). **RMN 13C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  154,9, 152,0, 151,8, 150,1, 139,4, 132,7, 122,4 (2C), 119,1, 113,5 (2C), 55,1.

 **N-(p-toluil)-9H-purina-6-amina (**2h**)** - Intermediário obtido a partir da *p*-toluidina **1h** como sólido branco, levemente esverdeado (329,4 mg,  $\eta = 97\%$ ). **RMN 1H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  13,10 (s, 1H), 9,58 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,82 (d,  $J = 7,83$  Hz, 2H), 7,13 (d,  $J = 7,36$  Hz, 2H), 2,27 (s, 3H). **RMN 13C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  151,8 (2C), 137,2 (2C), 131,2 (2C), 128,7, 120,6 (2C), 20,4.

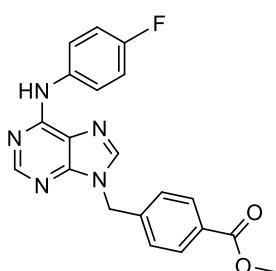
 **4-((9H-purin-6-il)amino)benzoato de metila (**2i**)** - Intermediário obtido a partir da *p*-aminobenzoato de metila **1i** como sólido branco, levemente esverdeado (387,7 mg,  $\eta = 96\%$ ). **RMN 1H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  10,14 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,67$  Hz, 2H), 7,94 (d,  $J =$

8,58 Hz, 2H), 3,82 (s, 3H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  165,9, 151,6, 150,9, 144,6 (2C), 140,9 (2C), 129,9, 122,6, 119,2, 51,7.



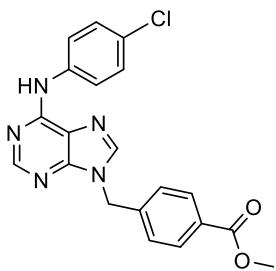
4-((6-(fenilamino)-9H-purina-9H-il)metil)benzoato de metila (3a):

Intermediário obtido a partir do intermediário **2a** como um sólido fino e branco (258,3 mg,  $\eta = 72\%$ ). **1H RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  9,86 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,95 (m, 4H), 7,44 (d,  $J = 8,19$  Hz, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,05 (t,  $J = 7,35$  Hz, 1H), 5,53 (s, 2H), 3,82 (s, 3H). **13C (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**, 165,0, 152,1 (2C), 149,6, 142,1, 141,7, 129,5 (2C), 129,0, 128,3 (2C), 127,6 (2C), 122,5 (2C), 120,7, 119,7, 52,0, 45,9.



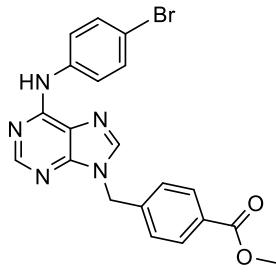
4-((6-((4-fluorofenil)amino)-9H-purina-9-il)metil)benzoato de metila (3b):

Intermediário obtido a partir do intermediário **2b** como um sólido fino e branco (306,3 mg,  $\eta = 81\%$ ). **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  9,93 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,94 (d,  $J = 7,71$  Hz, 4H), 7,44 (d,  $J = 7,71$  Hz, 2H), 7,18 (m, 2H), 5,53 (s, 2H), 3,82 (s, 3H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  165,8, 157,5 (d,  $J_1 = 240,0$ , C-F), 152,0, 151,9, 149,6, 142,1, 141,1, 135,9 (d,  $J_4 = 2,4$  Hz, C-F), 129,5 (2C), 129,0, 127,6 (2C), 122,6 (d,  $J_3 = 7,7$  Hz, C-F), 119,5, 114,8 (d,  $J_2 = 21,3$  Hz, C-F), 52,0, 45,98.

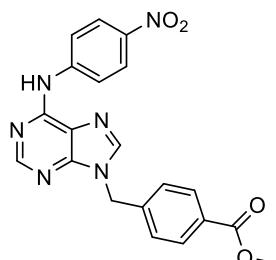


4-((6-((4-clorofenil)amino)-9H-purin-9-il)metil)benzoato de metila (3c)

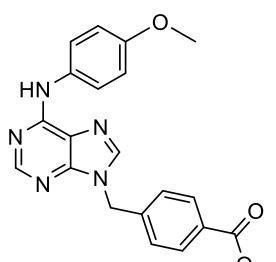
Intermediário obtido a partir do intermediário **2c** como um sólido fino e branco (472,6 mg,  $\eta = 60\%$ ). **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  10,0 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,01 (d,  $J = 7,9$ , 2H), 7,93 (d,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 7,43 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,37 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H) 5,54 (s, 2H), 3,82 (s, 3H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  165,8, 152,0, 151,7, 149,7, 142,0, 141,9, 138,6, 129,5 (2C), 129,0, 128,1 (2C), 127,6 (2C), 126,1, 122,0 (2C), 119,7, 52,0, 46,0.



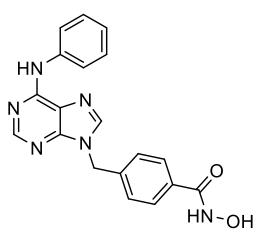
**4-((6-((4-bromophenyl)amino)-9H-purina-9-il)metil)benzoato de metila (**3d**)** - Intermediário obtido a partir do intermediário **2d** como um sólido fino e branco (380,3 mg,  $\eta = 89\%$ ). **1H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  10,44 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,96 (m, 4H), 7,50 (d,  $J = 8,16$  Hz, 2H), 7,44 (d,  $J = 7,62$  Hz, 2H), 5,54 (s, 2H), 3,82 (s, 3H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  165,8, 152,0, 151,7, 149,7, 142,0 (2C), 139,1, 131,1 (2C), 129,5 (2C), 129,0, 127,6 (2C), 122,5 (2C), 119,8, 114,1, 52,1, 46,0.



**4-((6-((4-nitrophenyl)amino)-9H-purina-9-il)metil)benzoato de metila (**3e**)** - Intermediário obtido a partir do intermediário **2e** como sólido branco amarelado (230,5 mg,  $\eta = 38\%$ ). **1H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  10,6 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,23 (m, 2H), 7,94 (m, 4H), 7,46 (m, 2H) 5,57 (s, 2H), 3,83 (s, 3H). **13C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  165,8, 151,8, 151,1, 150,3, 146,4, 142,9, 141,9, 141,2, 129,5 (2C), 127,8, 127,7 (2C), 124,6 (2C), 120,4, 119,4 (2C), 119,4 (2C), 51,5.

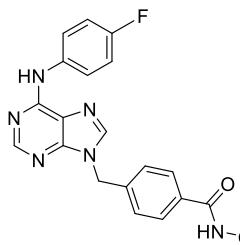


**4-((6-((4-metoxifenil)amino)-9H-purina-9-il)metil)benzoato de metila (**3g**)** - Intermediário obtido a partir do intermediário **2g** como um sólido fino, branco esverdeado (367,9 mg,  $\eta = 98\%$ ). **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  9,71 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 7,94 (d,  $J = 7,71$  Hz, 2H), 7,78 (d,  $J = 8,61$  Hz, 2H), 7,43 (d,  $J = 7,65$  Hz, 2H), 6,92 (d,  $J = 8,73$  Hz, 2H), 5,52 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,74 (s, 3H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  166,0, 155,2, 152,39, 152,32 149,5, 142,2, 141,5, 132,5 (2C), 129,6 (2C), 129,1, 127,7 (2C), 122,8 (2C), 119,5, 113,7, 55,3, 52,2, 46,1.



**N-hidroxi-4-((6-(fenilamino)-9H-purina-9-il)metil)benzamida (**4a**)** - Composto final obtido a partir do intermediário **3a** como um sólido branco (162,1 mg,  $\eta = 81\%$ ). **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  11,16 (s, 1H), 9,85 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,95 (d,  $J = 8,22$  Hz, 2H), 7,73 (m, 2H), 7,40 (d,  $J = 8,19$  Hz, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,03 (t,  $J = 7,33$  Hz, 1H) 5,49 (s, 2H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  152,1, 152,0

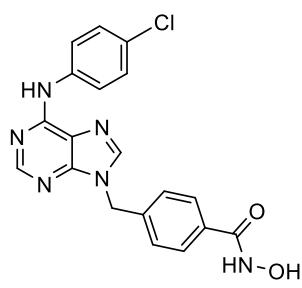
(2C), 149,6, 141,7, 139,8, 139,6, 132,3 (2C), 128,3 (2C), 127,4, 127,2 (2C), 122,5 (2C), 120,8 114,1, 46,0.



4-((6-((4-fluorofenil)amino)-9H-purina-9-il)metil)-N-

hidroxibenzamida (4b): Composto final obtido a partir do intermediário **3b** como um sólido fino e branco (174,0 mg,  $\eta = 92\%$ ).

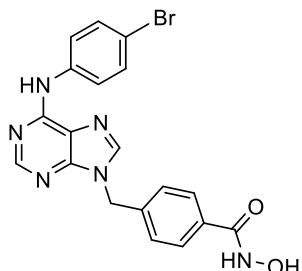
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  11,1 (sl, 1H) 9,92 (s, 1H), 9,03 (sl, 1H) 8,44 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,96 (m, 2H), 7,73 (d,  $J = 7,98$  Hz, 2H), 7,39 (d,  $J = 7,89$  Hz, 2H), 7,19 (m, 2H), 5,49 (s, 2H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  163,8, 159,4 (d,  $J_1 = 237,8$ , C-F), 152,1, 151,9, 149,6, 141,7, 139,8, 135,9, 132,30, 127,3 (d,  $J_4 = 11,2$  Hz, C-F), 129,5 (2C), 122,6 (d,  $J_3 = 7,7$  Hz, C-F), 119,5, 115,0 (d,  $J_2 = 21,9$  Hz, C-F), 66,9, 46,0.



4-((6-((4-clorofenil)amino)-9H-purina-9-il)metil)-

Nhidroxibenzamida (4c) – Composto final obtido a partir do intermediário **3c** como um sólido branco (163,9 mg,  $\eta = 83\%$ ).

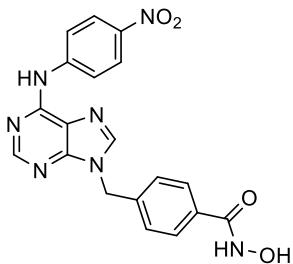
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  11,16 (sl, 1H), 10,0 (s, 1H), 9,02 (sl, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,01 (d,  $J = 7,1$ , 2H), 7,72 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 7,38 (m, 4H), 5,50 (s, 2H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  163,8, 152,0, 151,7, 149,7, 141,9, 139,7, 138,7, 132,3, 128,2 (2C), 127,4 (2C), 127,2 (2C), 126,1, 122,1 (2C), 119,7, 46,0.



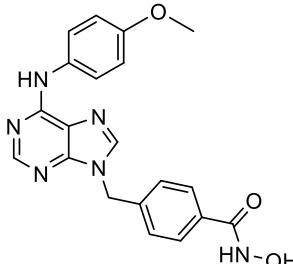
4-((6-((4-bromofenil)amino)-9H-purin-9-yl)metil)-N-

hidroxibenzamida (4d) - Composto final obtido a partir do intermediário **3d** como um sólido branco (416,3 mg,  $\eta = 94\%$ ).

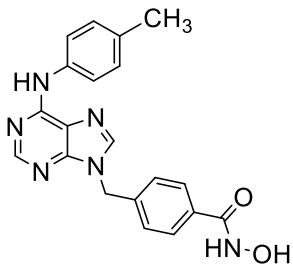
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  11,16 (s, 1H), 10,03 (s, 1H), 9,00 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,97 (d,  $J = 8,88$  Hz, 2H), 7,73 (d,  $J = 8,16$  Hz, 2H), 7,50 (d,  $J = 8,85$  Hz, 2H), 7,39 (d,  $J = 8,10$  Hz, 2H), 5,50 (s, 2H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  163,7, 152,0, 151,7 (2C), 149,7, 142,0, 139,7, 132,3 (2C), 127,4 (2C), 129,0, 127,2 (2C), 122,4 (2C), 119,8, 114,1, 46,0.



**N-hidroxi-4-((6-((4-nitrofenil)amino)-9H-purina-9-il)metil)benzamida (**4e**)** – Composto final obtido a partir do intermediário **3e** como sólido branco amarelado (138,1 mg,  $\eta = 68\%$ ). **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  8,50 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,16 (m, 2H), 7,989 (m, 2H), 7,73 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 5,51 (s, 2H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  163,7, 152,0, 151,6, 151,1, 146,4, 142,9, 142,2, 141,2, 127,4 (2C), 127,3, 124,6 (2C), 120,3 (2C), 120,4, 119,9, 119,4 (2C), 46,1.

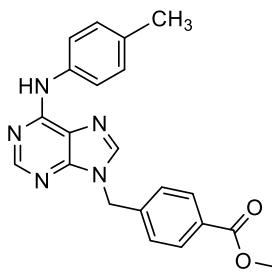


**N-hidroxi-4-((6-((4-metoxifenil)amino)-9H-purina-9-il)metil)benzamida (**4g**)** – Composto final obtido a partir do intermediário **3g** como um sólido branco (194,7 mg,  $\eta = 72\%$ ). **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  11,1 (sl, 1H), 9,70 (s, 1H), 9,04 (sl, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 7,78 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,72 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 7,38 (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 6,91 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 5,47 (s, 2H), 3,74 (s, 3H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  164,0, 155,3, 152,4 (2C), 149,6, 141,6, 140,1, 132,8, 132,5, 127,6 (2C), 127,5 (2C), 122,9 (2C), 119,7, 113,8 (2C), 55,4, 46,2.

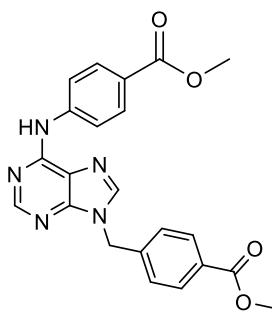


**N-hidroxi-4-((6-(p-tolilamino)-9H-purina-9-il)metil)benzamida (**4h**)** – Composto final obtido a partir do intermediário **3h** como um sólido fino, branco esverdeado (165,6 mg,  $\eta = 87\%$ ) **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  11,2 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 7,81 (d,  $J = 6,99$  Hz, 2H), 7,72 (d,  $J = 7,81$  Hz, 2H), 7,38 (d,  $J = 7,14$  Hz, 2H), 7,13 (d,  $J = 7,32$  Hz, 2H), 5,46 (s, 2H), 2,26 (s, 3H). **RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )**,  $\delta$  163,9, 152,2, 152,1, 149,5, 141,6, 139,9, 137,0 (2C), 132,3, 131,6 (2C), 128,8, 127,4, 127,3, 120,9 (2C), 119,6, 46,0, 20,5.

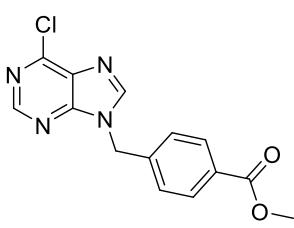
4-((6-(p-tolilamino)-9H-purina-9-il)metil)benzoato de metila (3h) - Intermediário obtido a



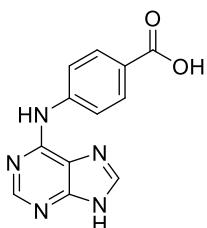
partir do intermediário **2h** como um sólido fino, branco esverdeado (314,2 mg,  $\eta = 61\%$ ) **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  9,76 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 7,94 (d,  $J = 7,38$  Hz, 2H), 7,82 (d,  $J = 7,65$  Hz, 2H), 7,44 (d,  $J = 7,68$  Hz, 2H), 7,13 (d,  $J = 7,86$  Hz, 2H), 5,53 (s, 2H), 3,82 (s, 3H) 2,26 (s, 3H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  165,8, 152,1, 152,0, 149,5, 142,1, 141,5, 137,0, 131,5, 129,5 (2C), 129,0, 128,7 (2C), 127,6 (2C), 120,9 (2C), 119,6, 52,0, 45,9, 20,4.



4-((9-(4-(metoxicarbonil)benzil)-9H-purin-6-il)amino)benzoato de metila (3i) - Intermediário obtido a partir do intermediário **2i** como um sólido fino, branco esverdeado (162,8 mg,  $\eta = 26\%$ ) **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  10,3 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,18 (d,  $J = 8,82$  Hz, 2H), 7,94 (m, 4H), 7,45 (d,  $J = 8,22$  Hz, 2H), 5,56 (s, 2H), 3,82 (s, 6H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  165,9, 165,8, 151,9, 151,5, 150,0, 144,4, 142,4, 141,9, 129,8 (2C), 129,5 (2C), 129,0, 127,6 (2C), 122,8, 120,15, 119,4 (2C), 52,0, 51,7, 46,0.



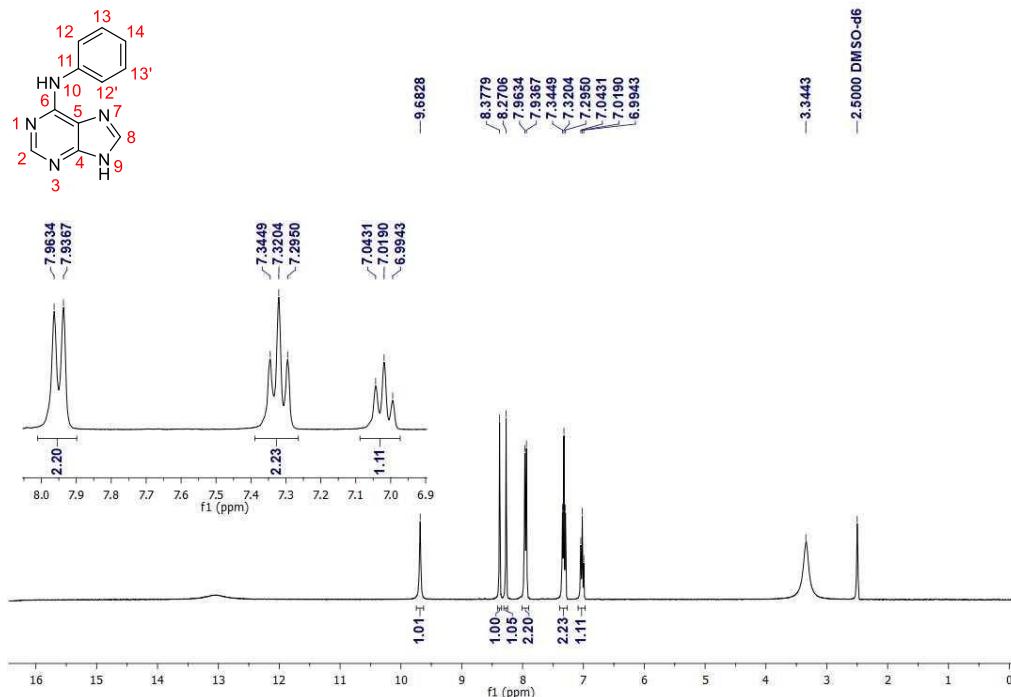
4-((6-chloro-9H-purin-9-yl)methyl)benzoato de metila (10): Intermediário-chave obtido como um sólido branco esverdeado (215,6 mg,  $\eta = 71\%$ ). **RMN <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  8,84 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 7,93 (d,  $J = 7,95$  Hz, 2H), 7,46 (d,  $J = 7,89$  Hz, 2H), 5,63 (s, 2H), 3,82 (s, 3H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**, 165,7, 151,8, 151,7 (2C), 141,1, 129,5 (2C), 127,4 (2C), 52,1, 46,6.



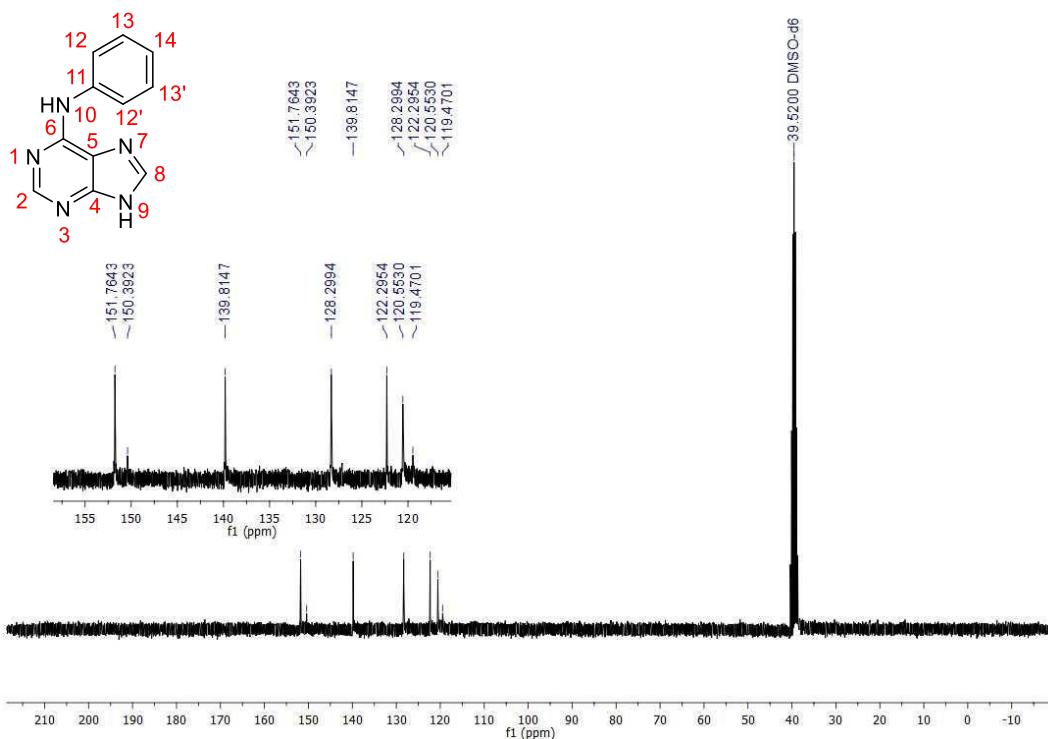
Ácido 4-((9H-purin-6-il)amino)benzoico (2j) - Intermediário obtido a partir do intermediário **2i** como sólido amarelado (2399,2 mg,  $\eta = 94\%$ ). **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  13,2 (s, 1H) 10,11 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,14 (m, 2H), 7,91 (m, 2H). **RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**,  $\delta$  167,0, 151,6 (2C), 144,2 (2C), 130,0 (2C), 123,8 (2C), 119,2.

## 7.2 Espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

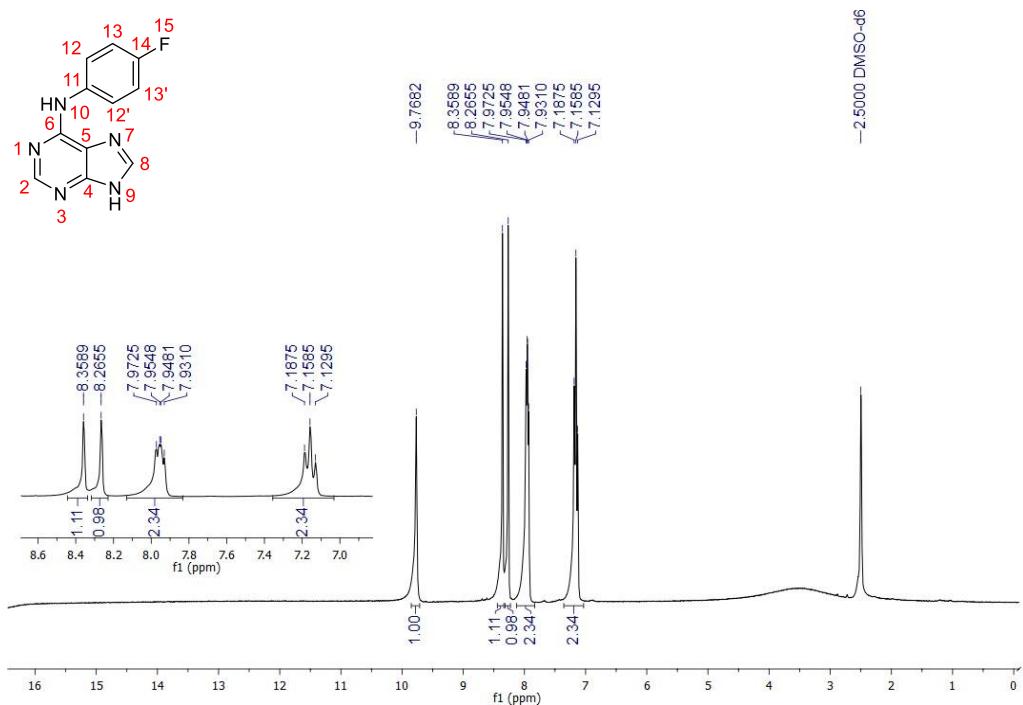
**Figura 23** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2a** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



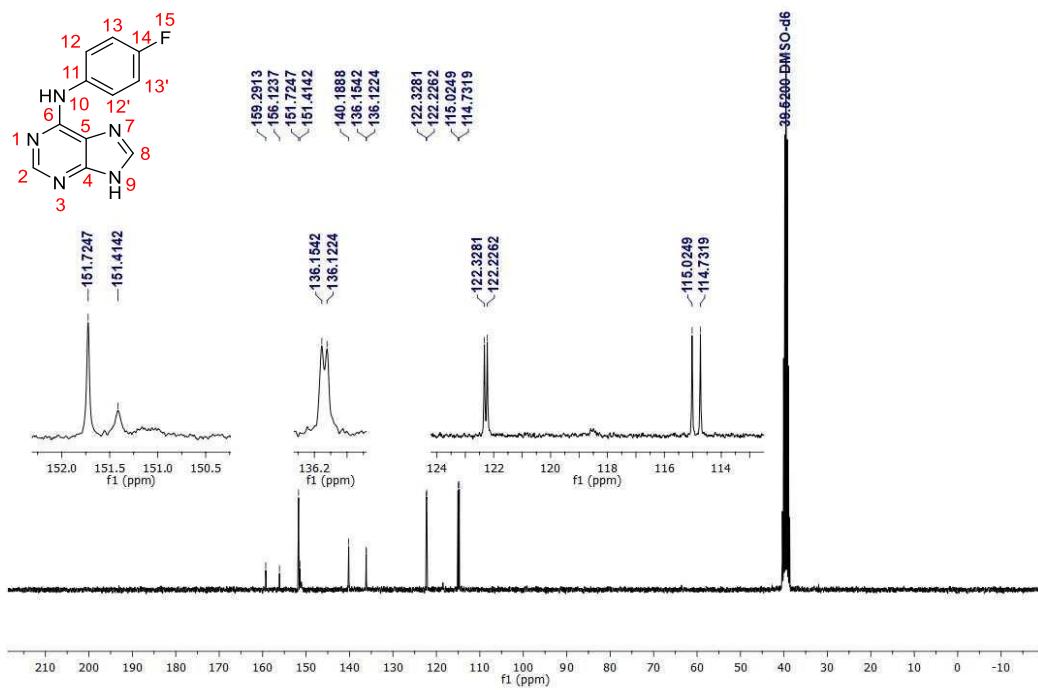
**Figura 24** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2a** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



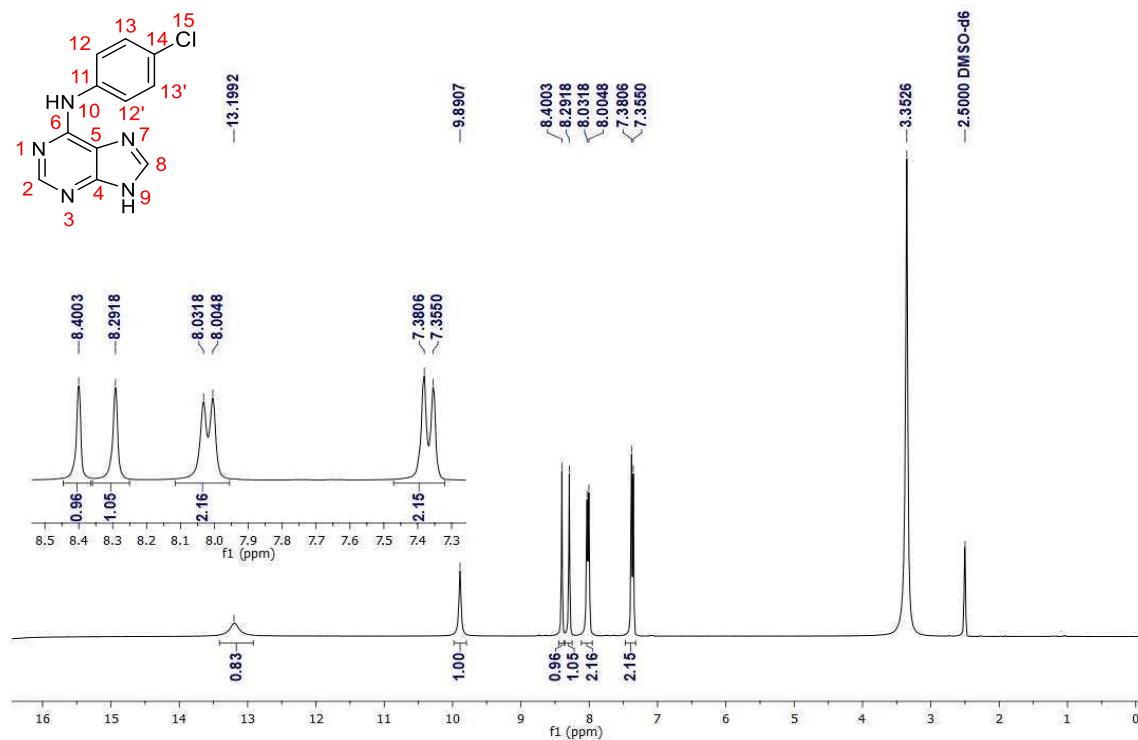
**Figura 25 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2b** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).**



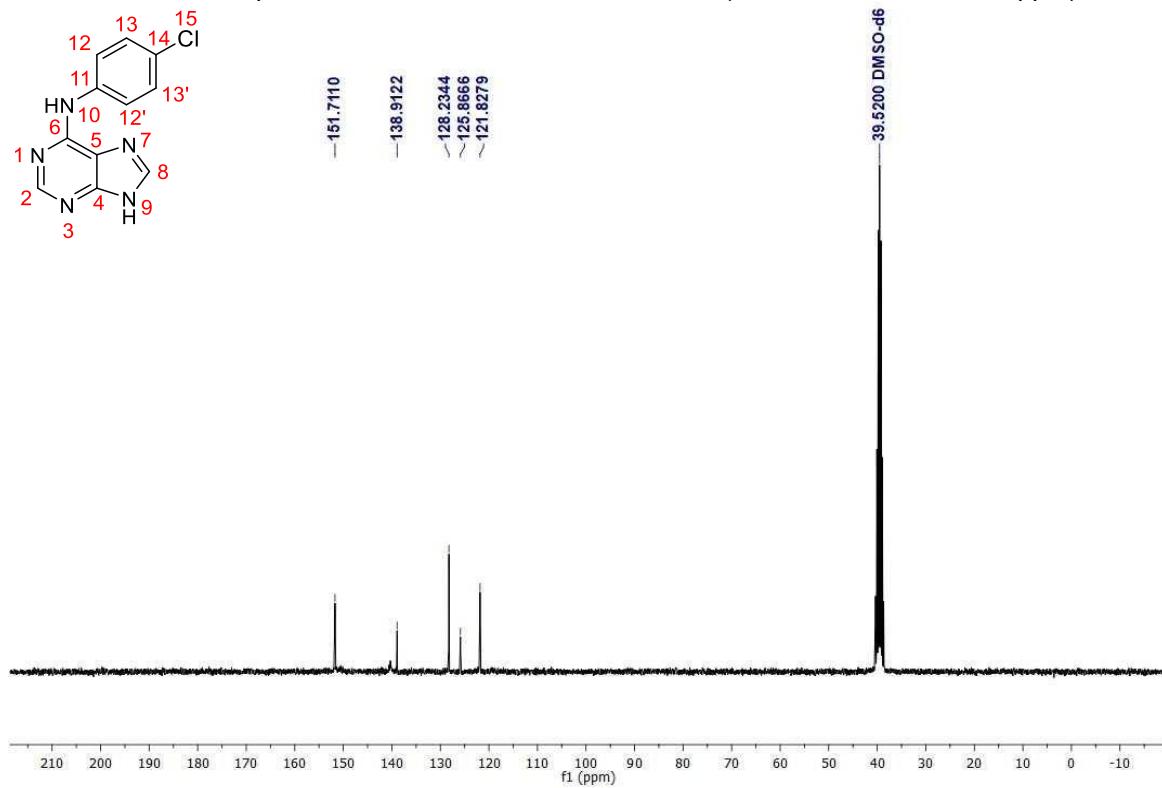
**Figura 26 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2b** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).**



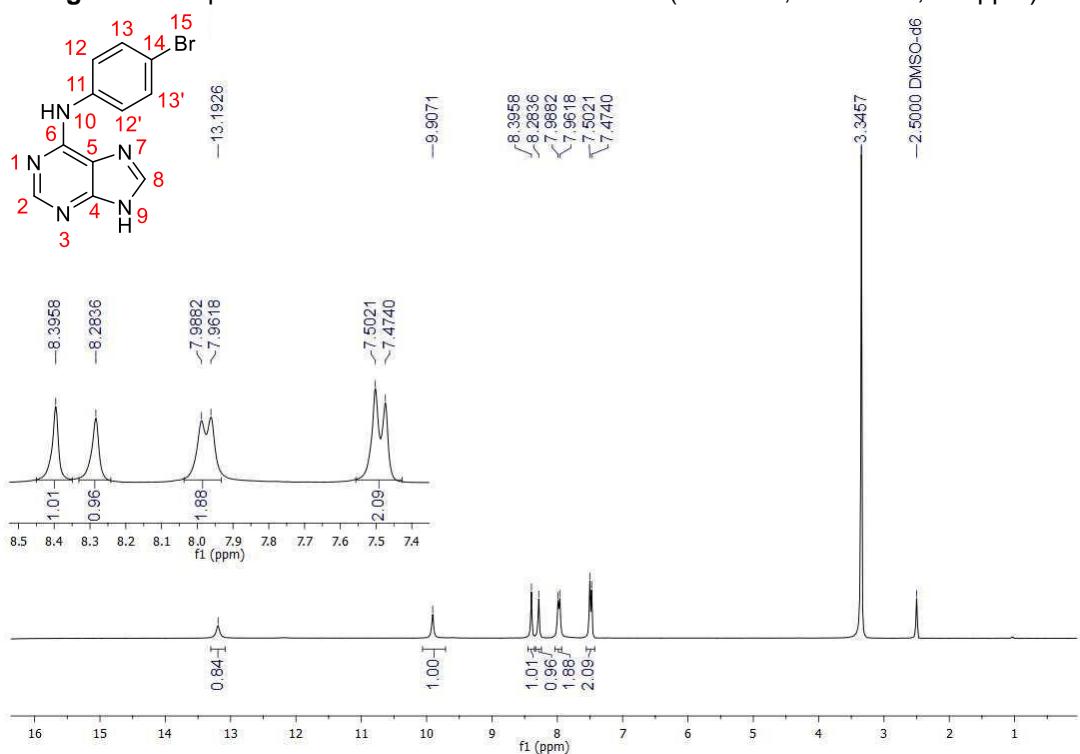
**Figura 27** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2c** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



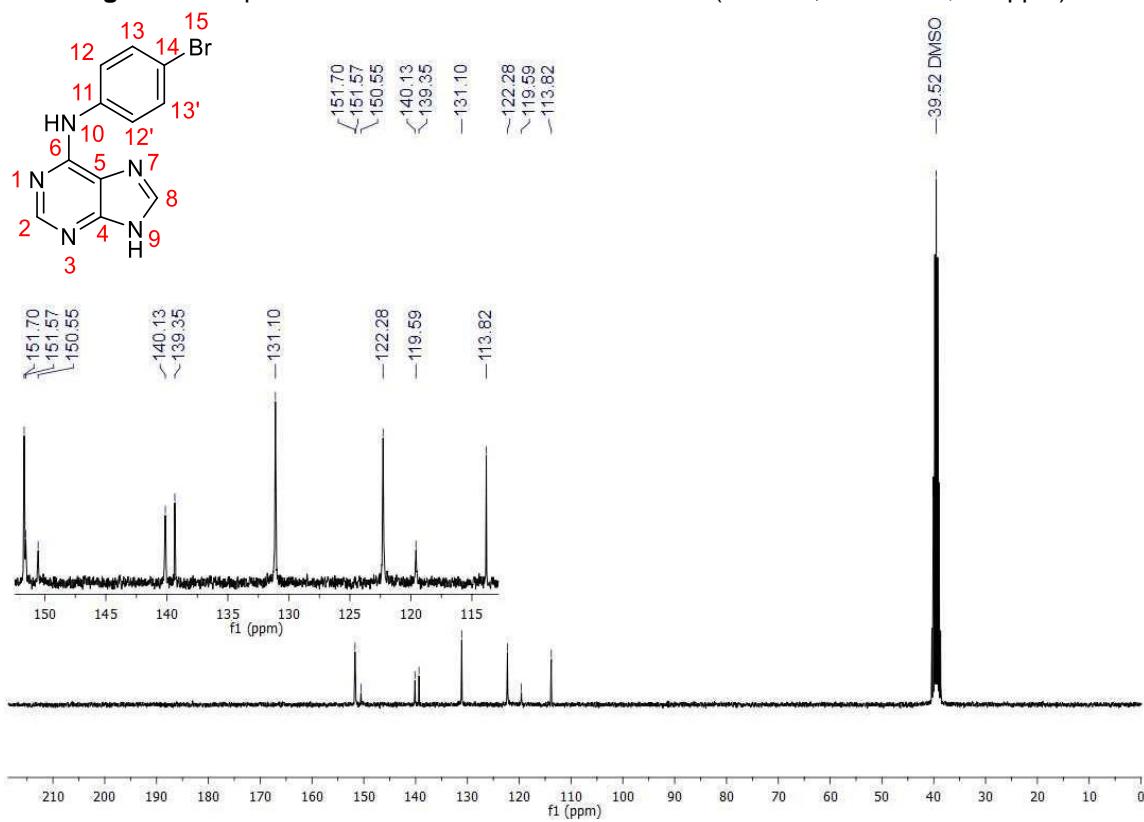
**Figura 28:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2c** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



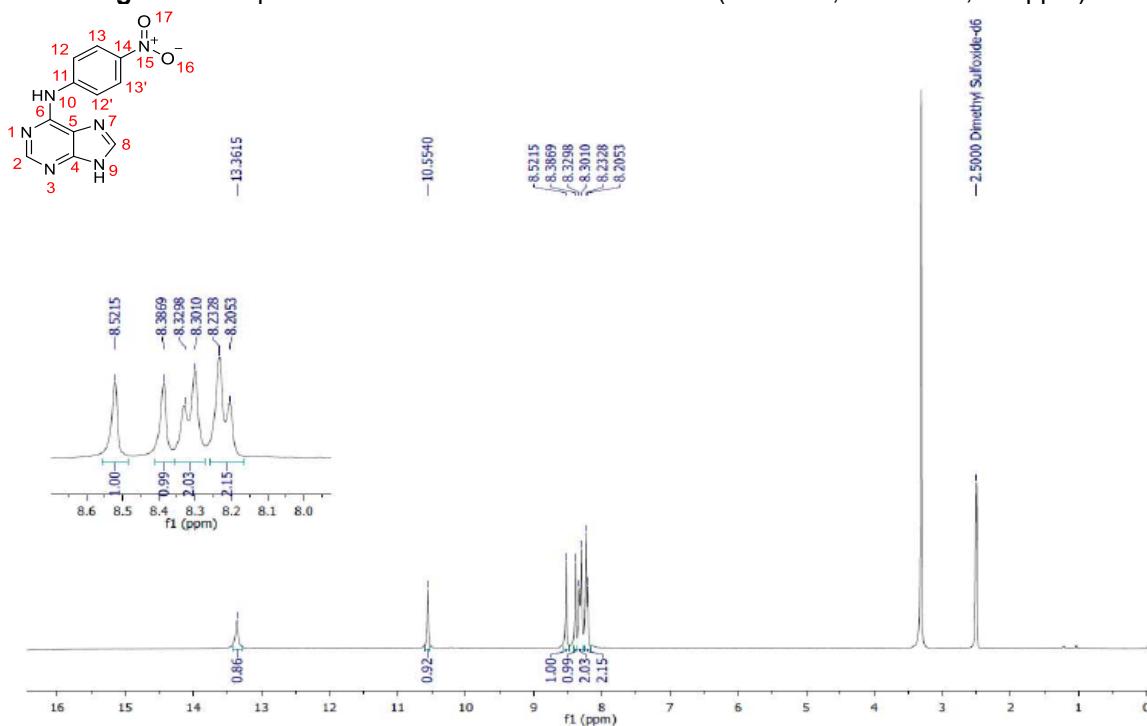
**Figura 29:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2d** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



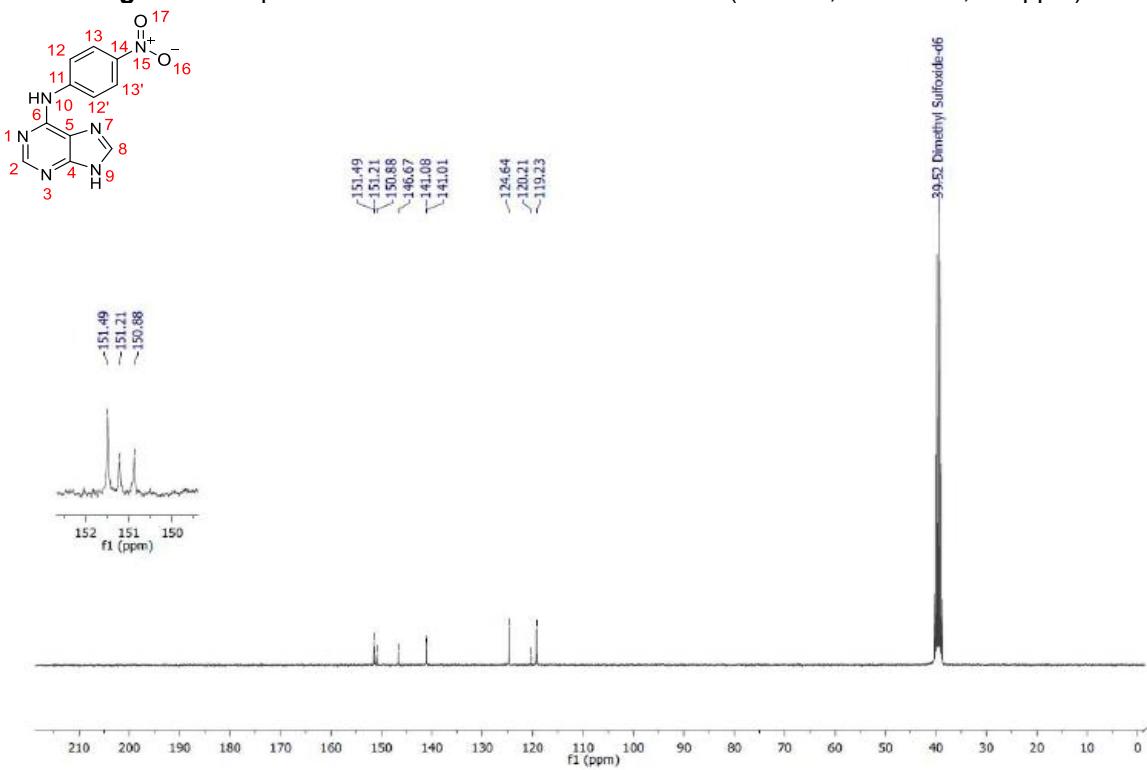
**Figura 30:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2d** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



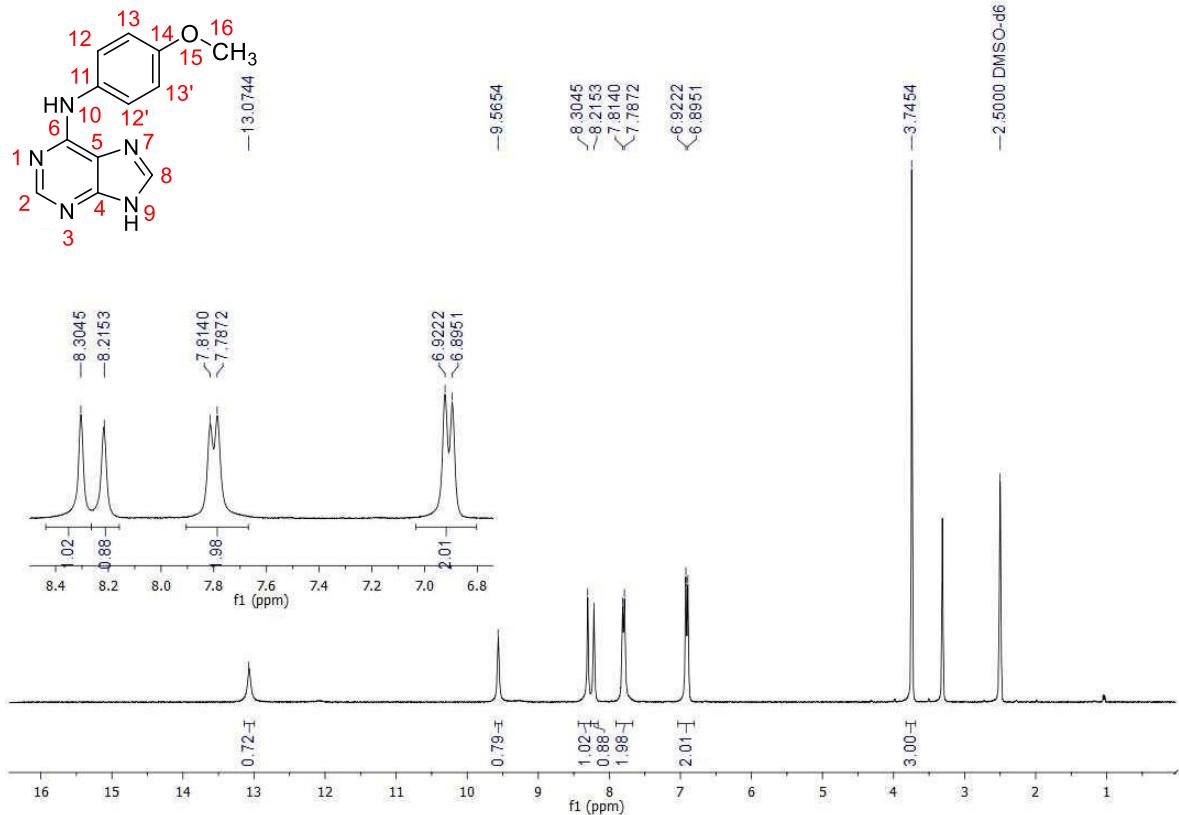
**Figura 31:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2e** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



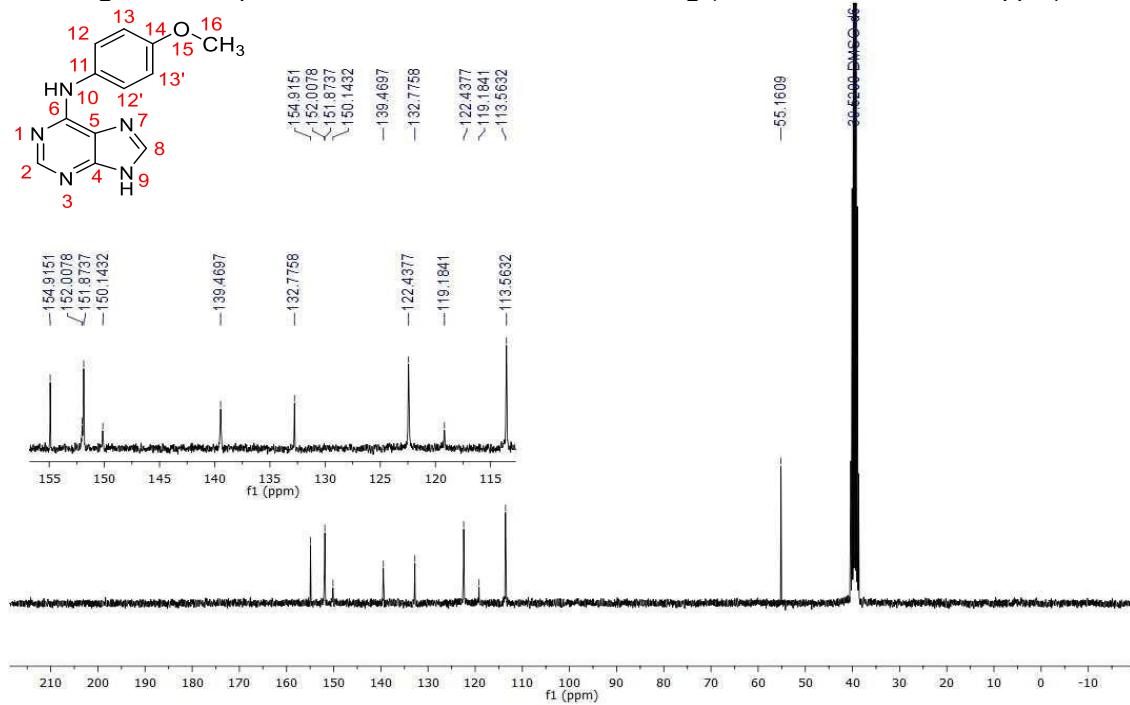
**Figura 32:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2e** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



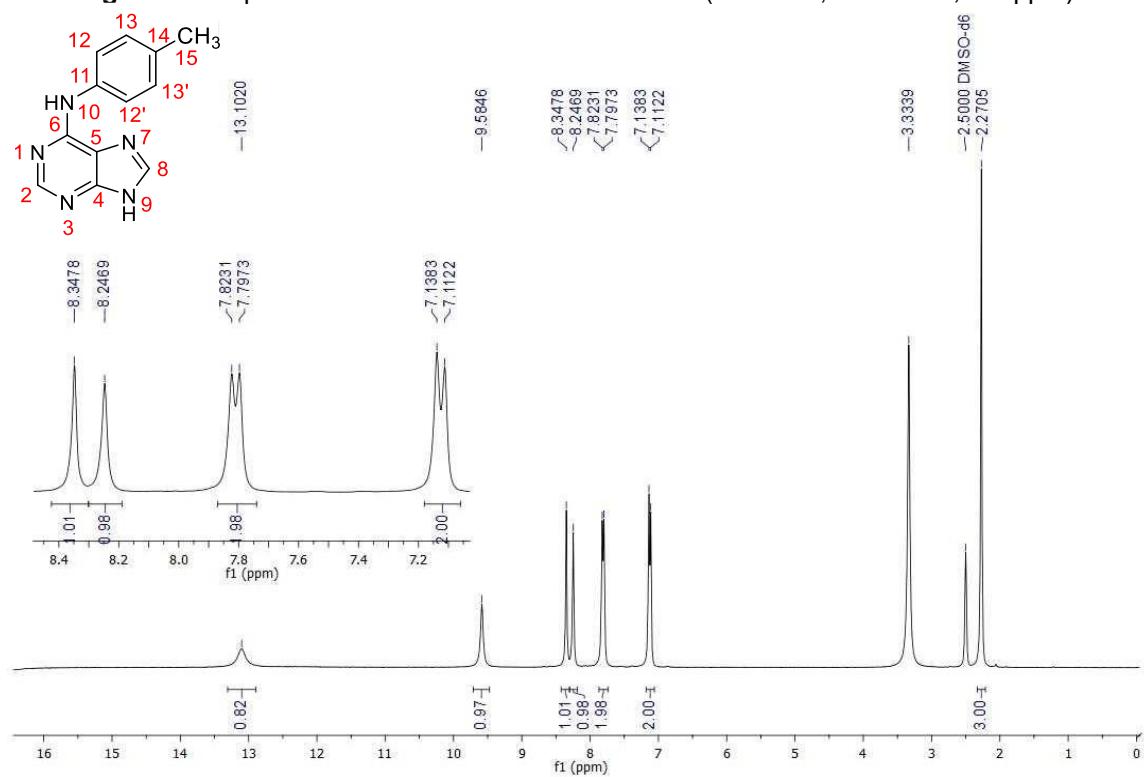
**Figura 33:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2g** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



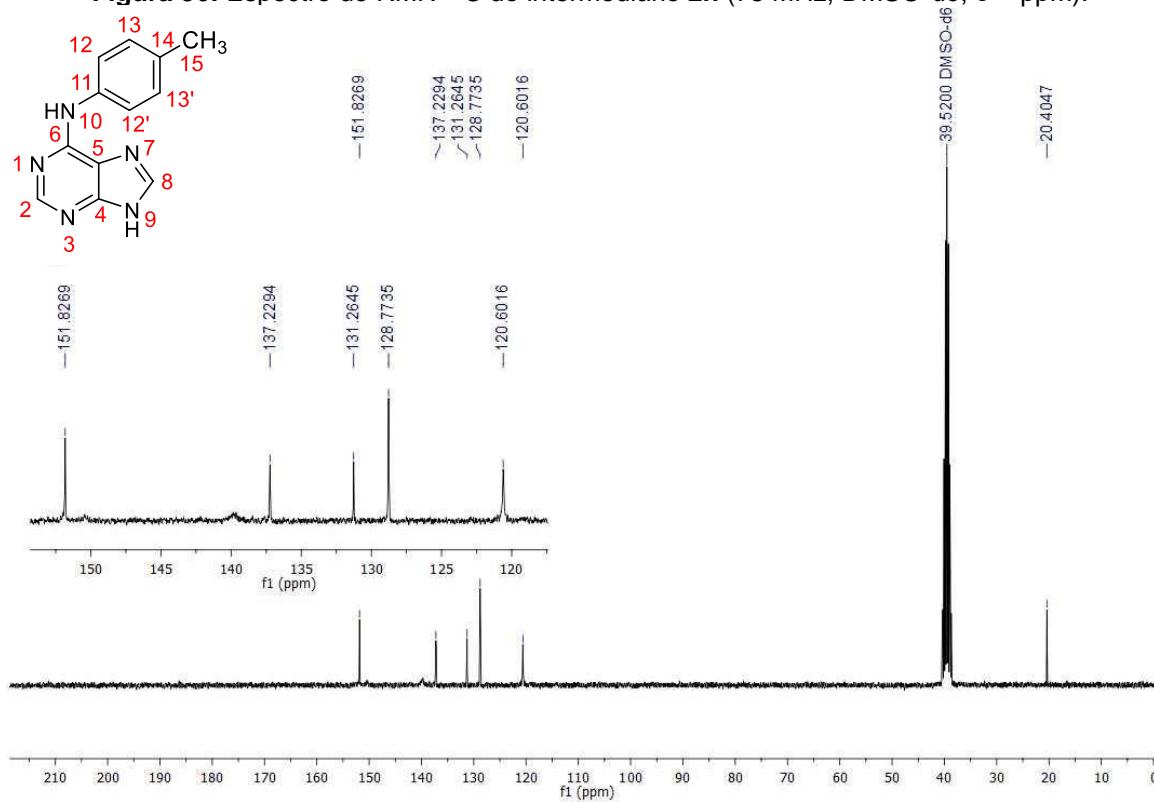
**Figura 34:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2g** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



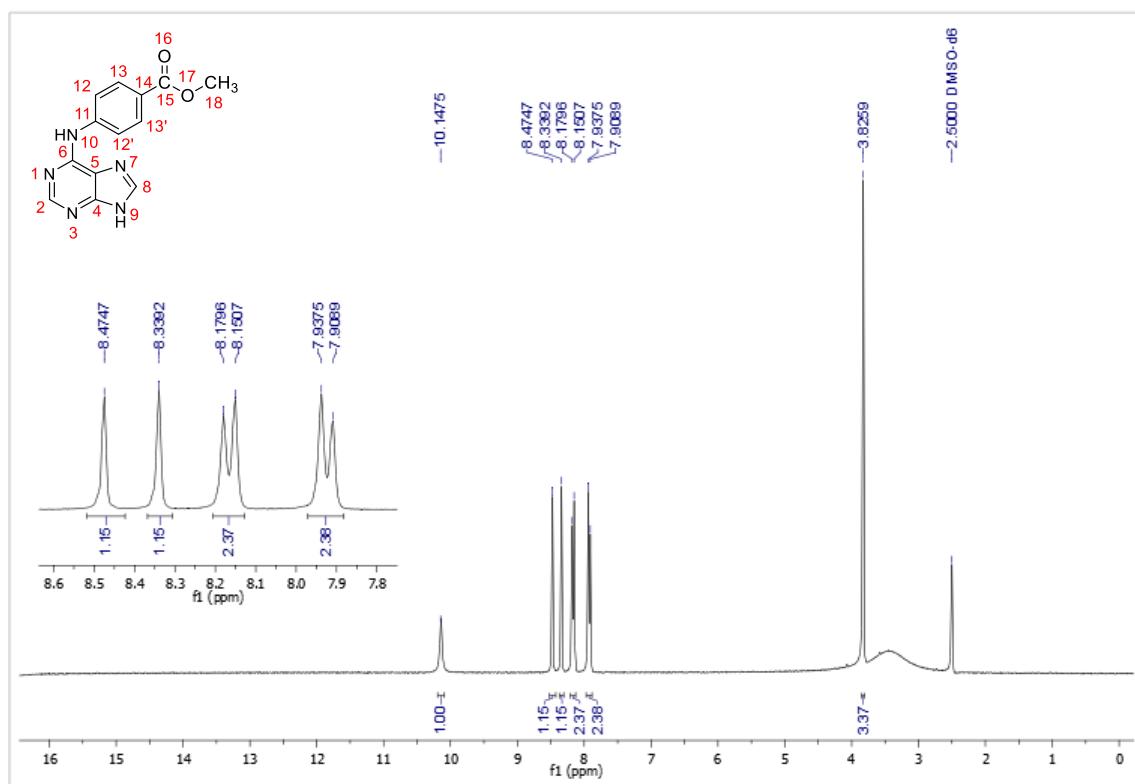
**Figura 35:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2h** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



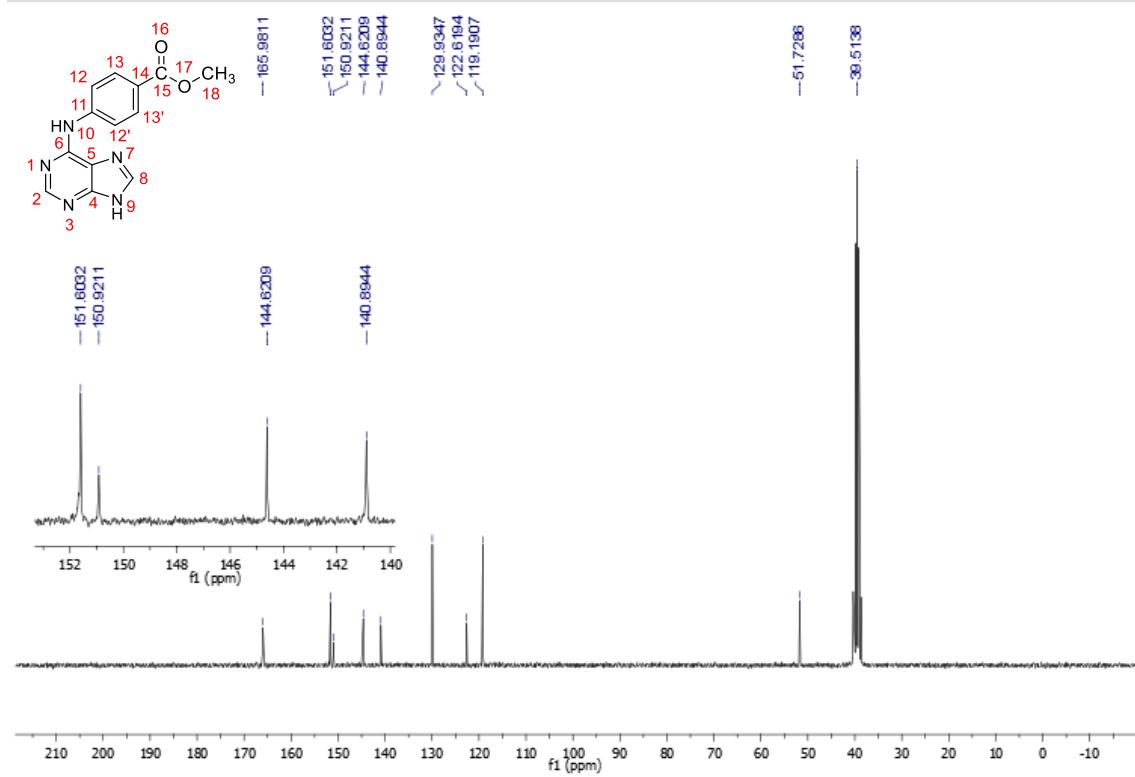
**Figura 36:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2h** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



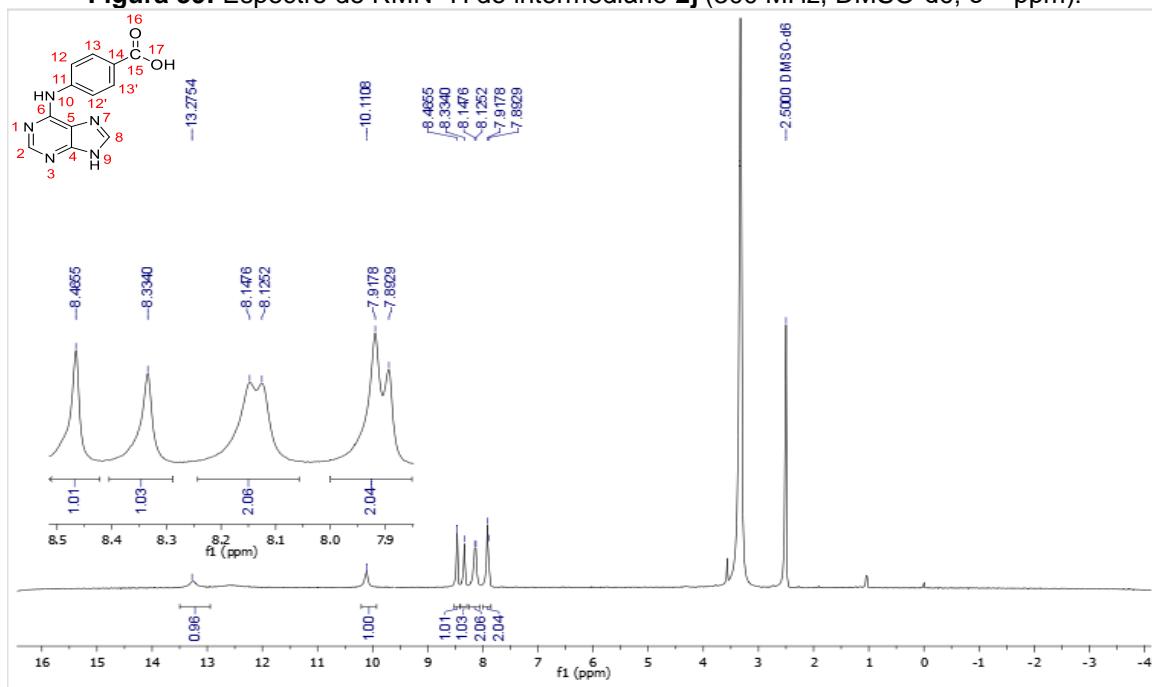
**Figura 37:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2i** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



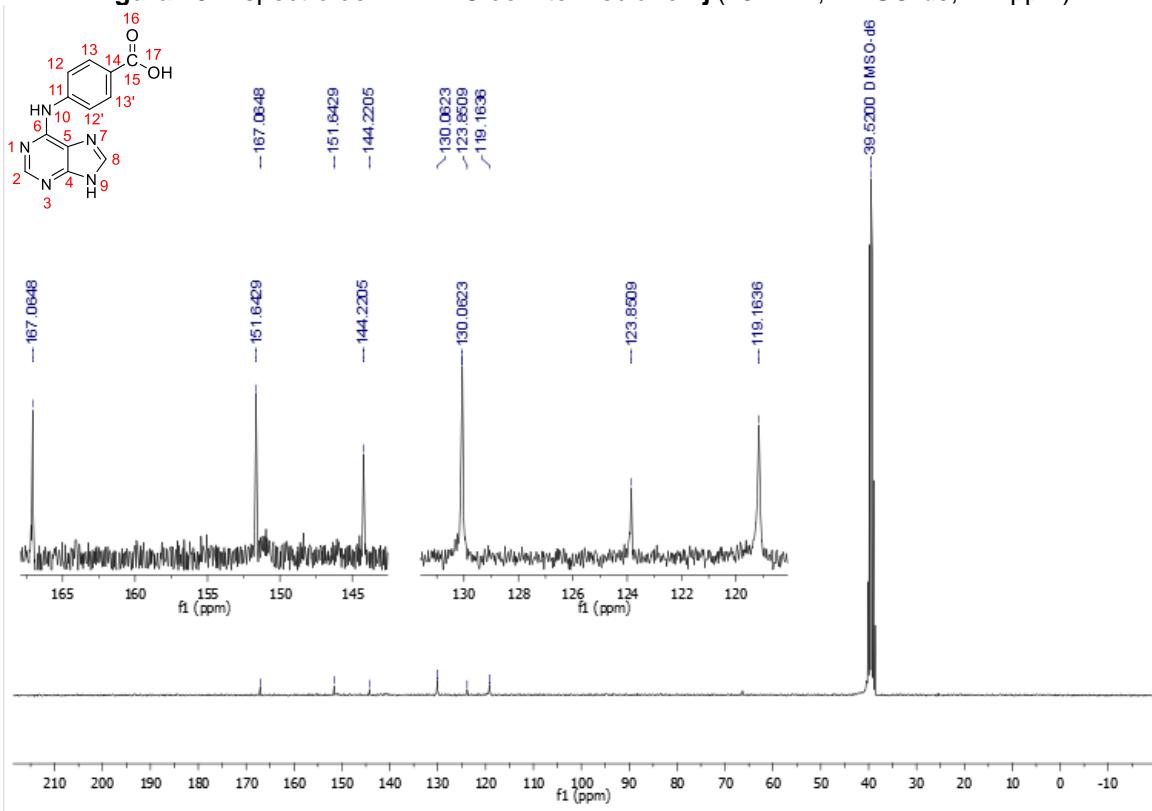
**Figura 38:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2i** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



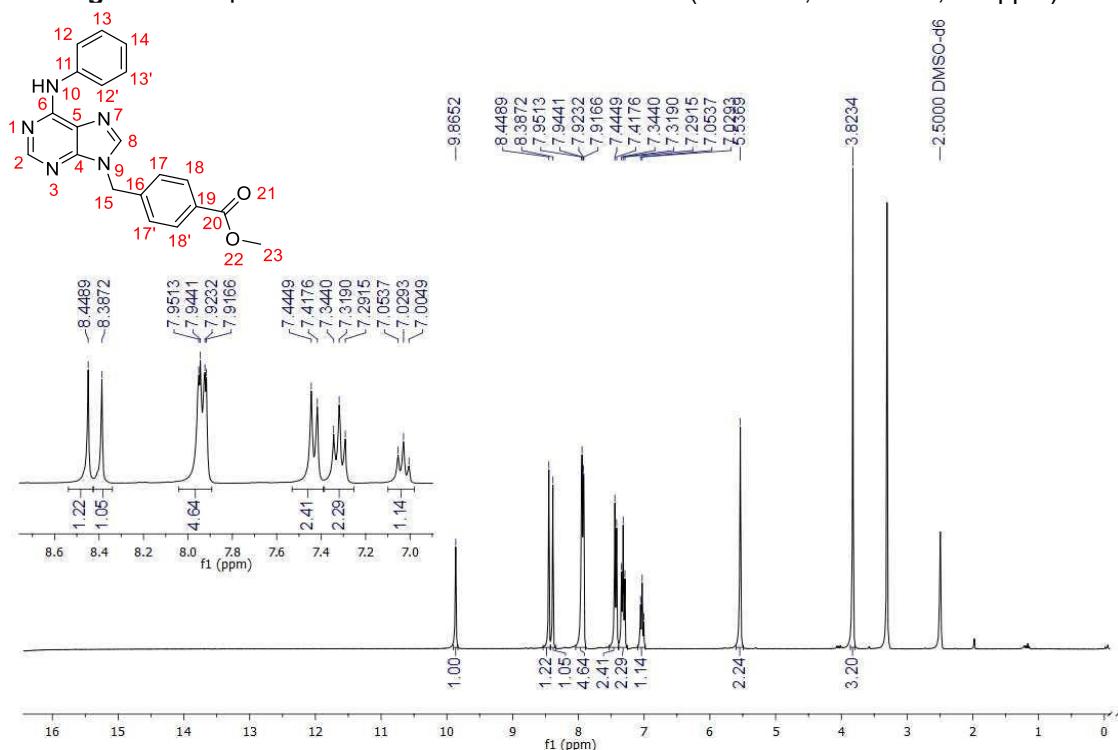
**Figura 39:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **2j** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



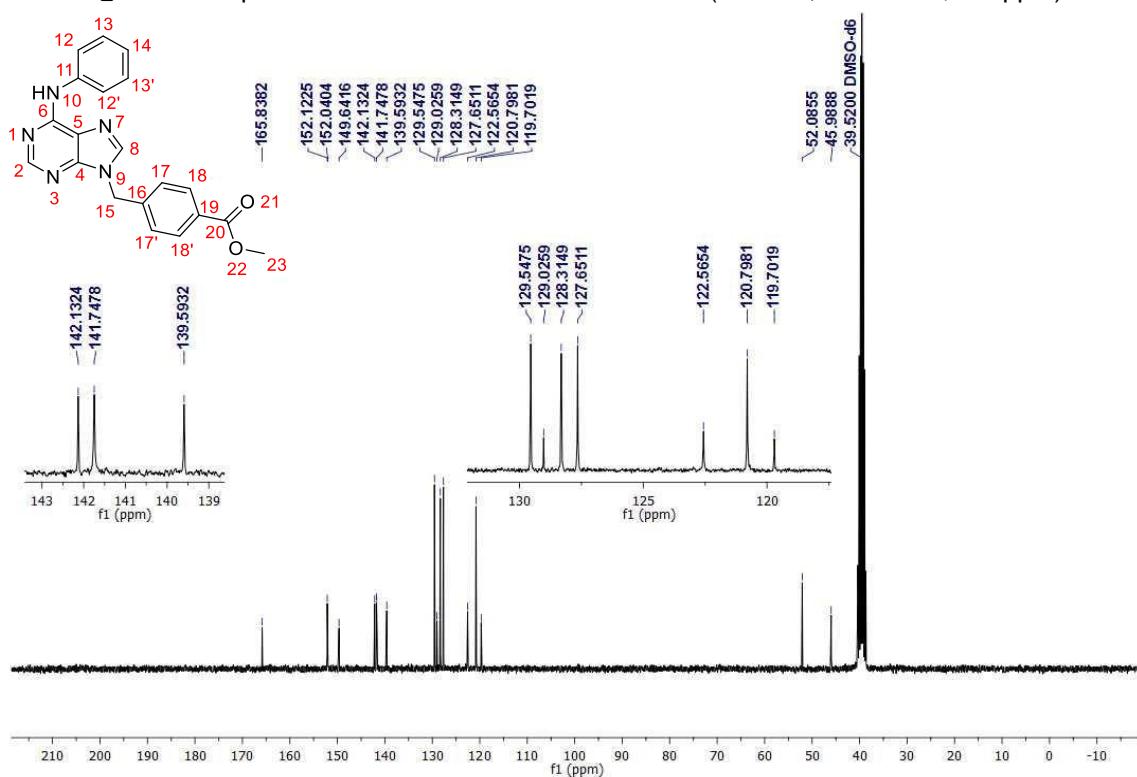
**Figura 40:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **2j** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



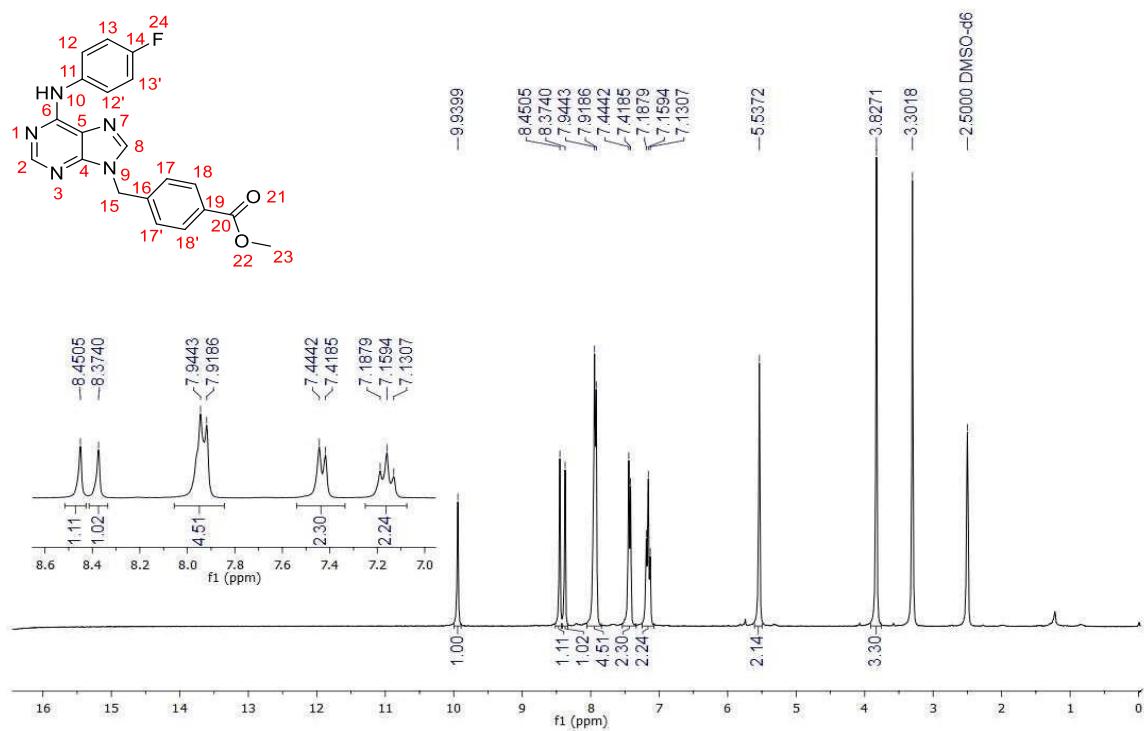
**Figura 41:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3a** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



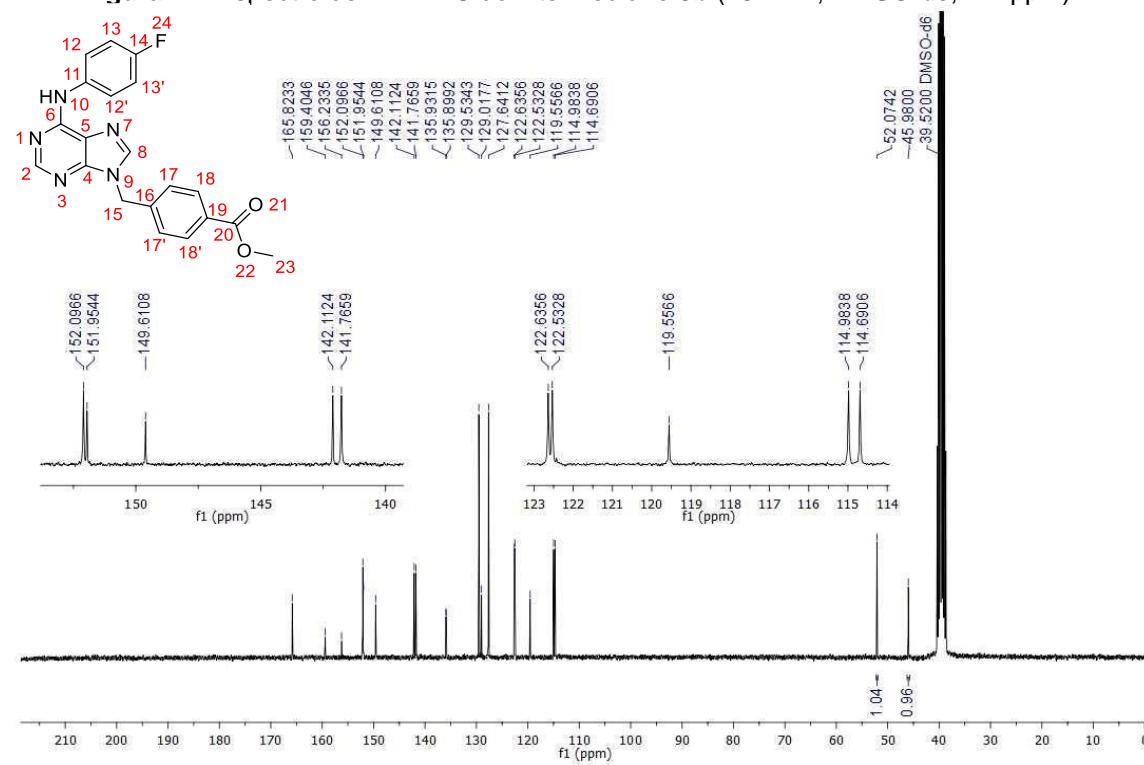
**Figura 42:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3a** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



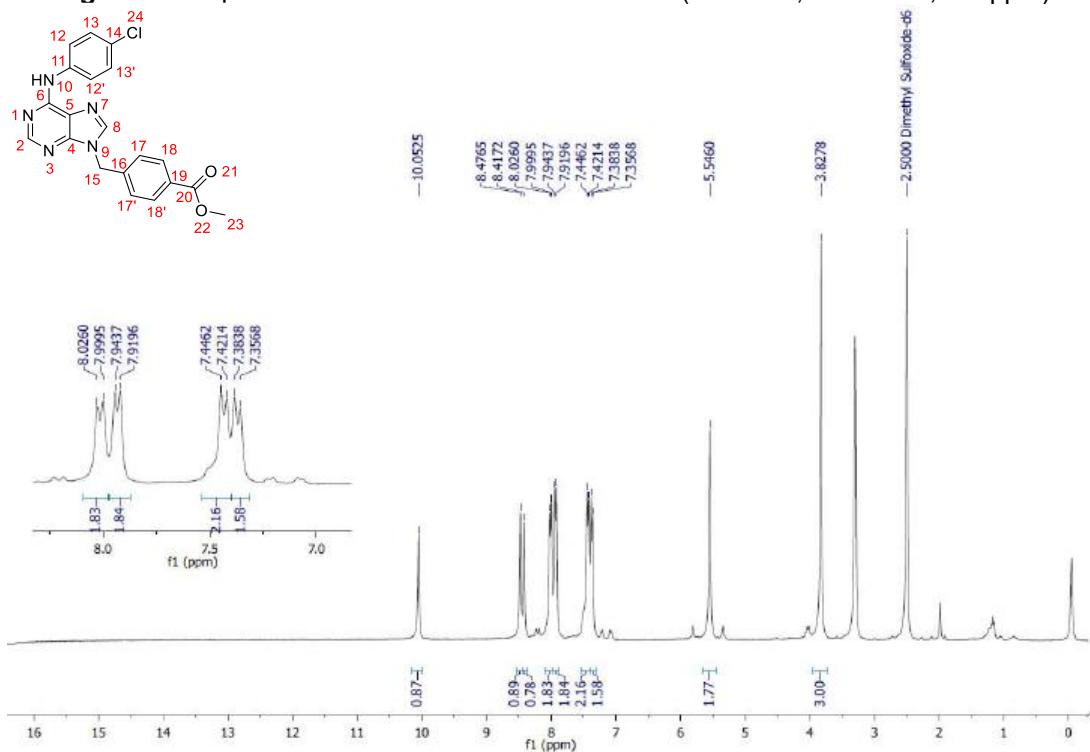
**Figura 43:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3b** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



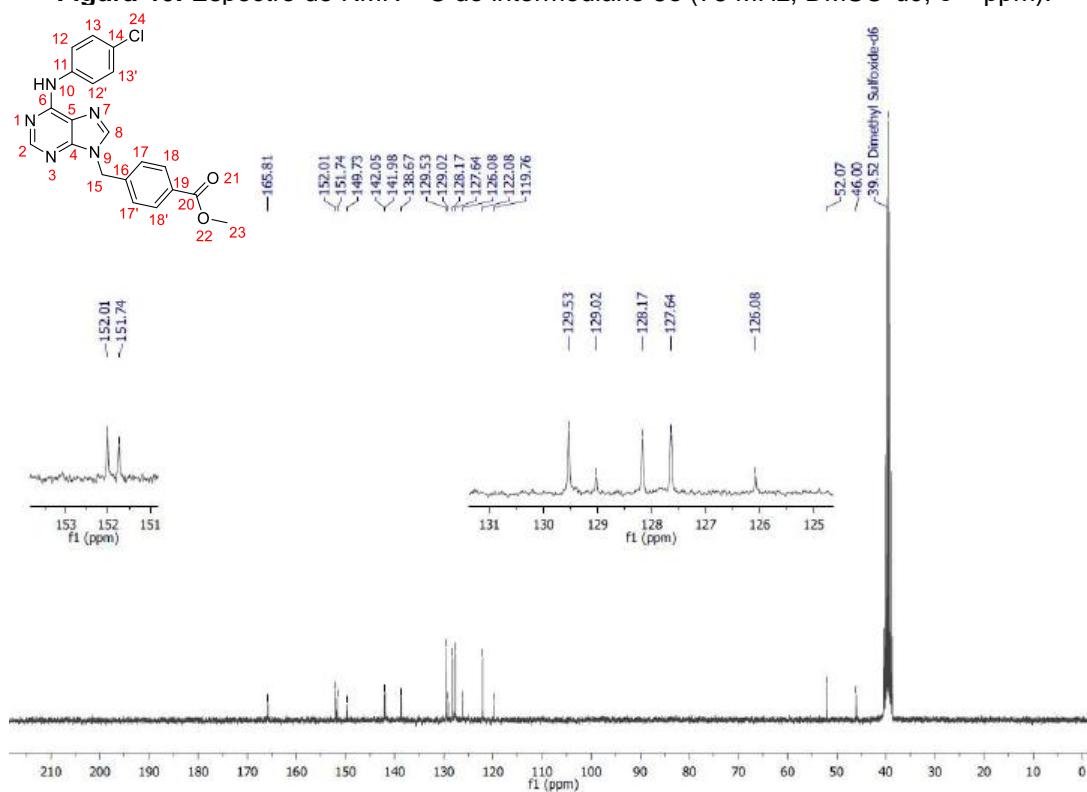
**Figura 44:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3b** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



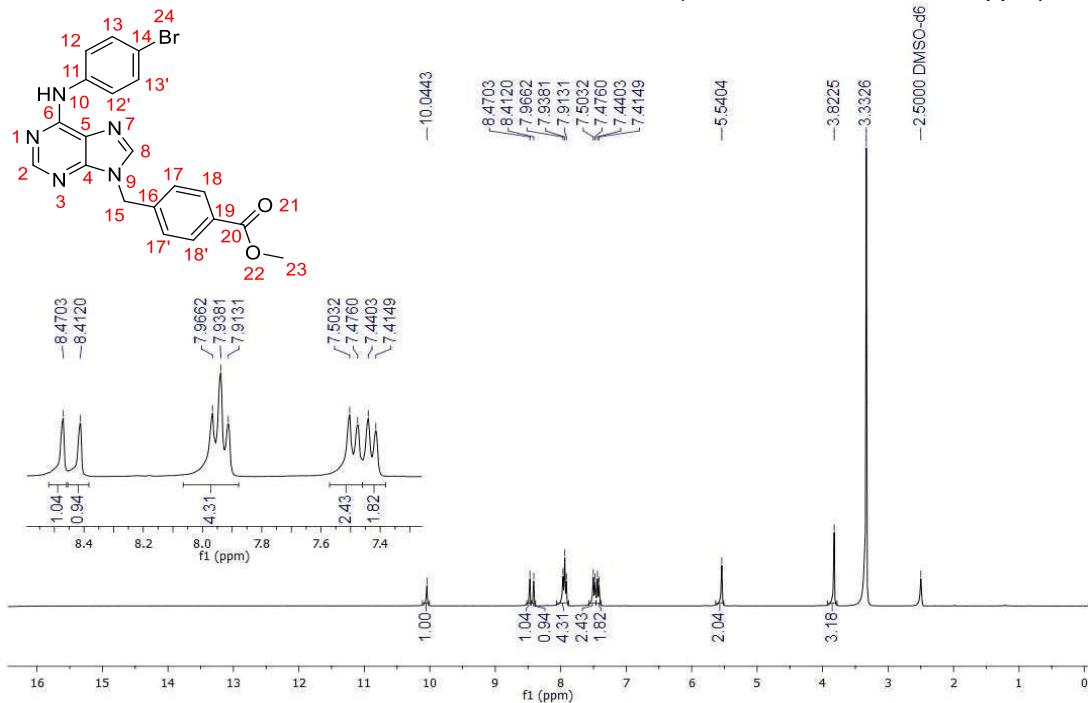
**Figura 45:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3c** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



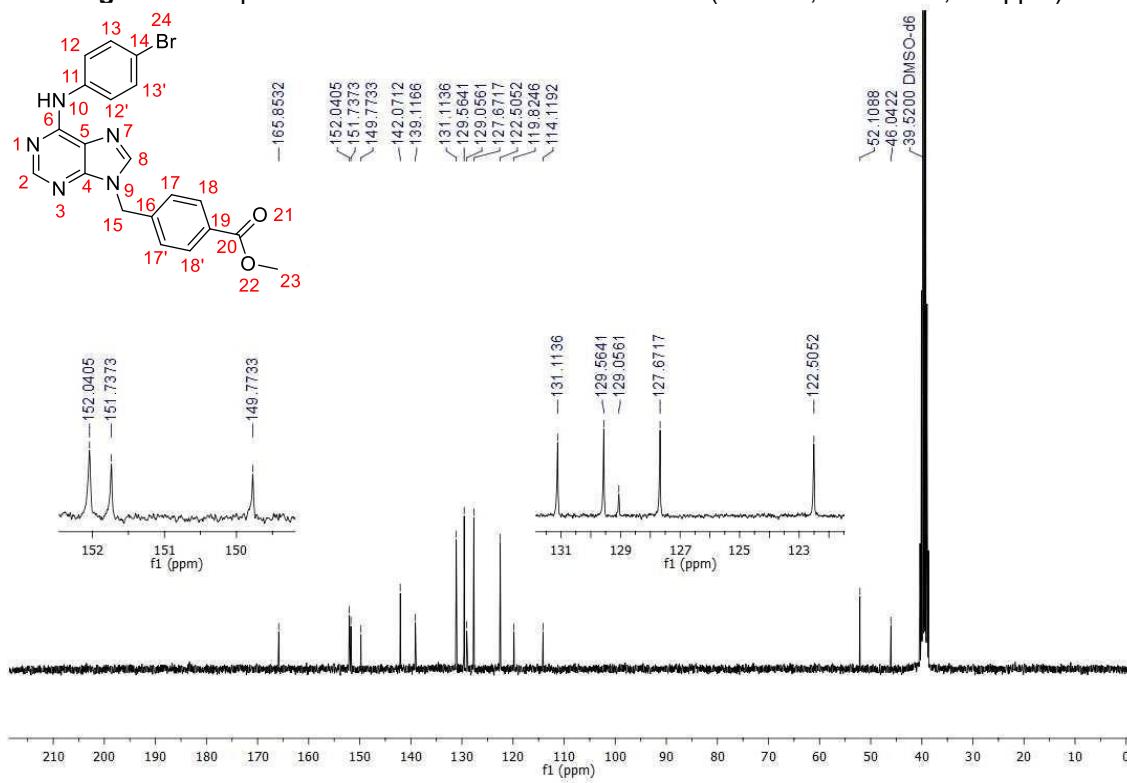
**Figura 46:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3c** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



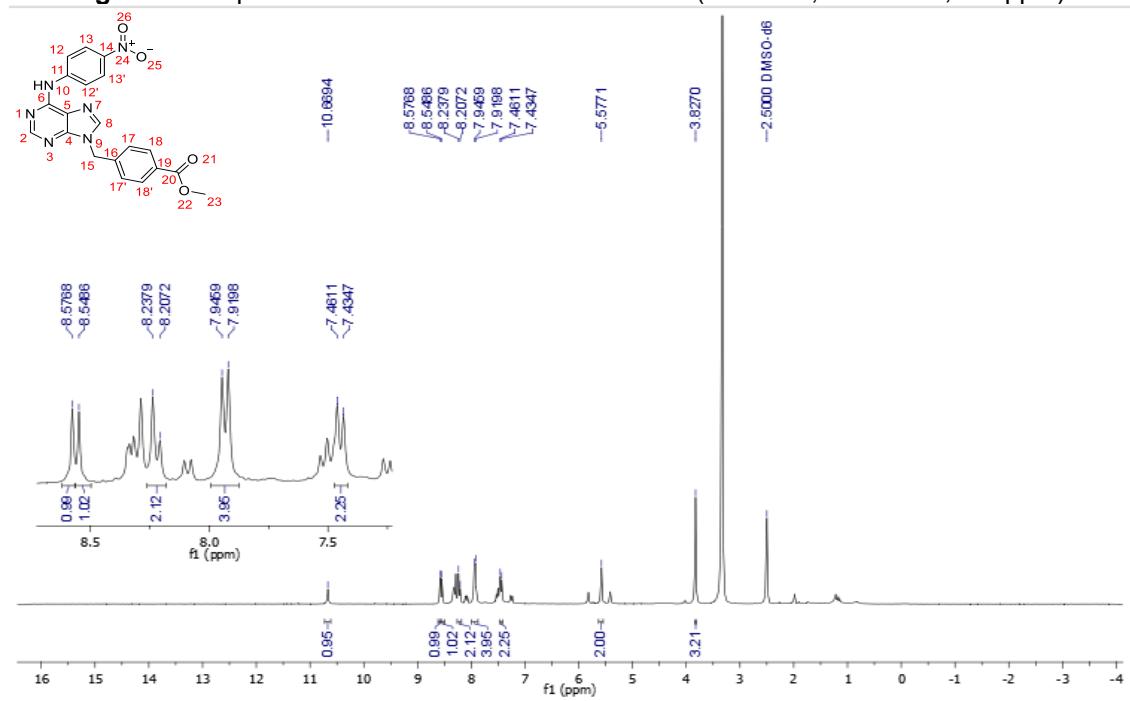
**Figura 47:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3d** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



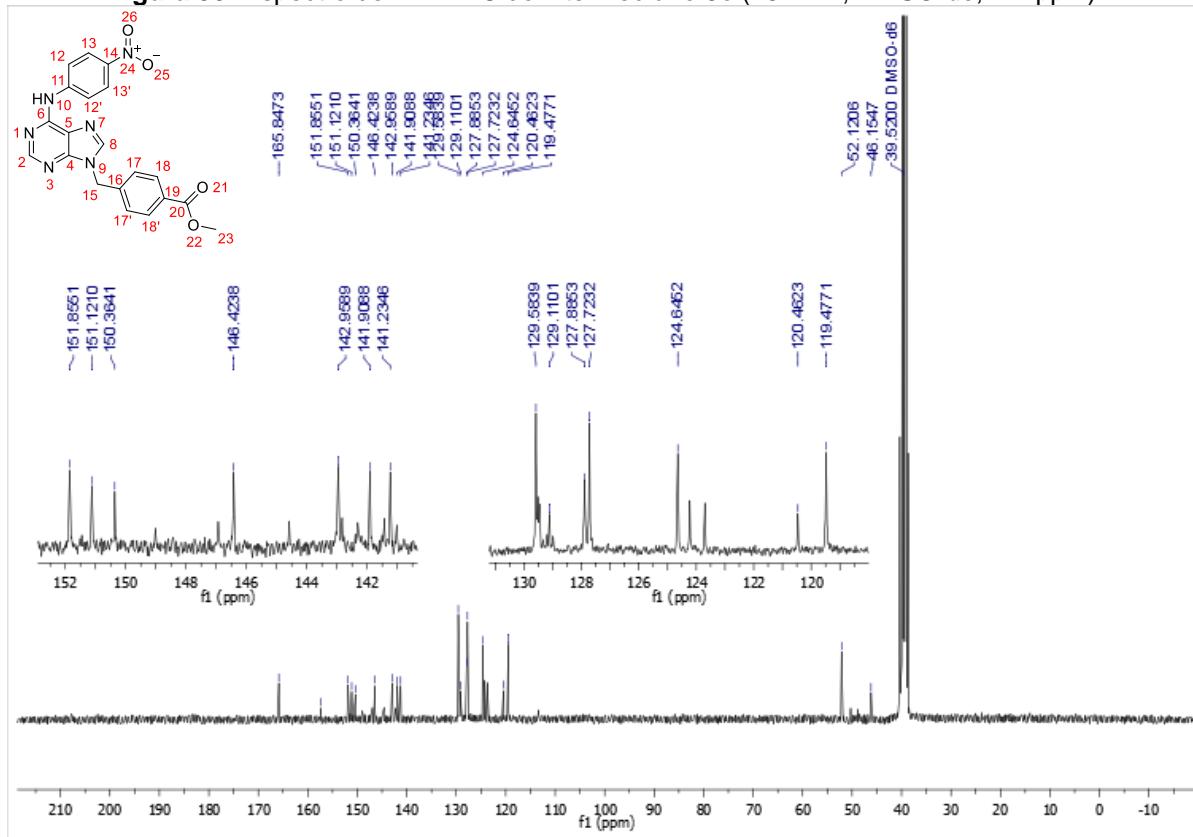
**Figura 48:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3d** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



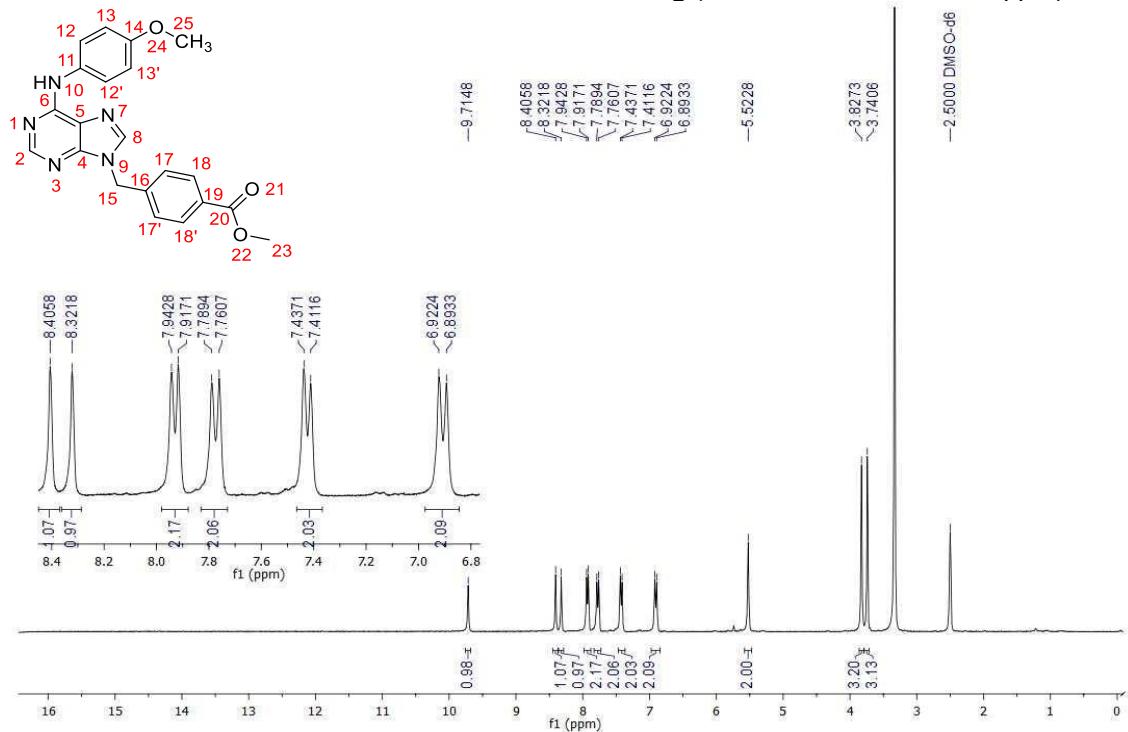
**Figura 49:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3e** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



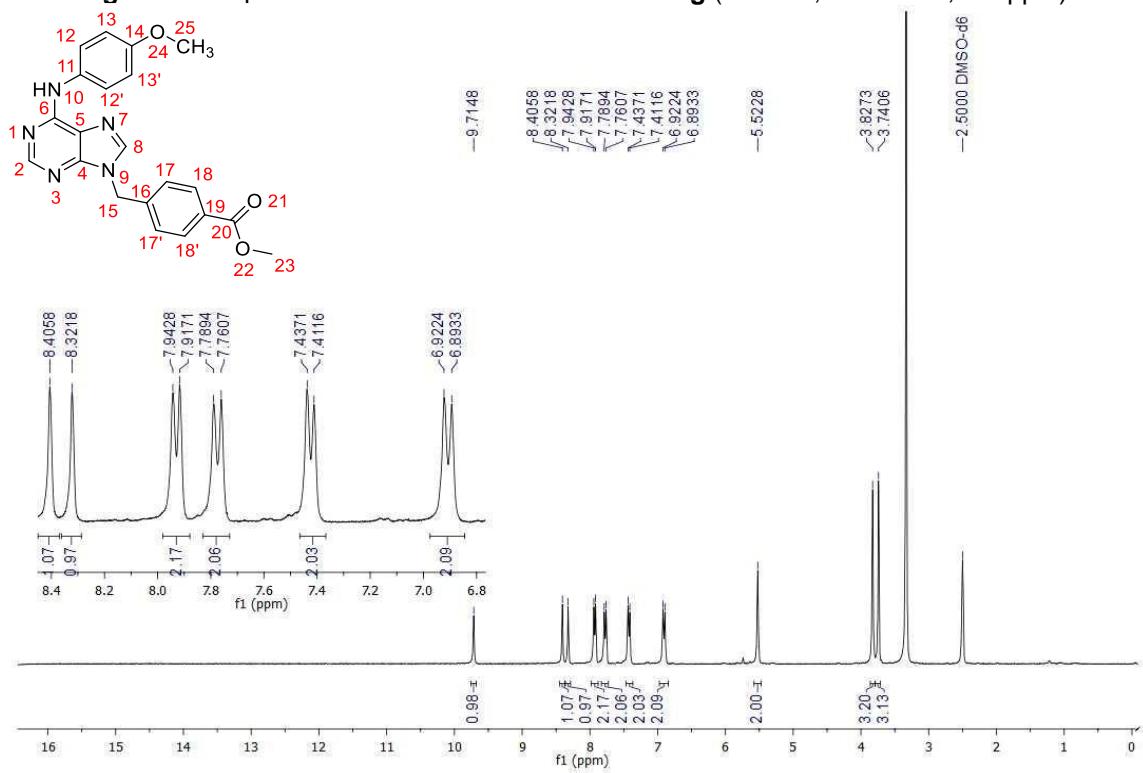
**Figura 50:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3e** (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



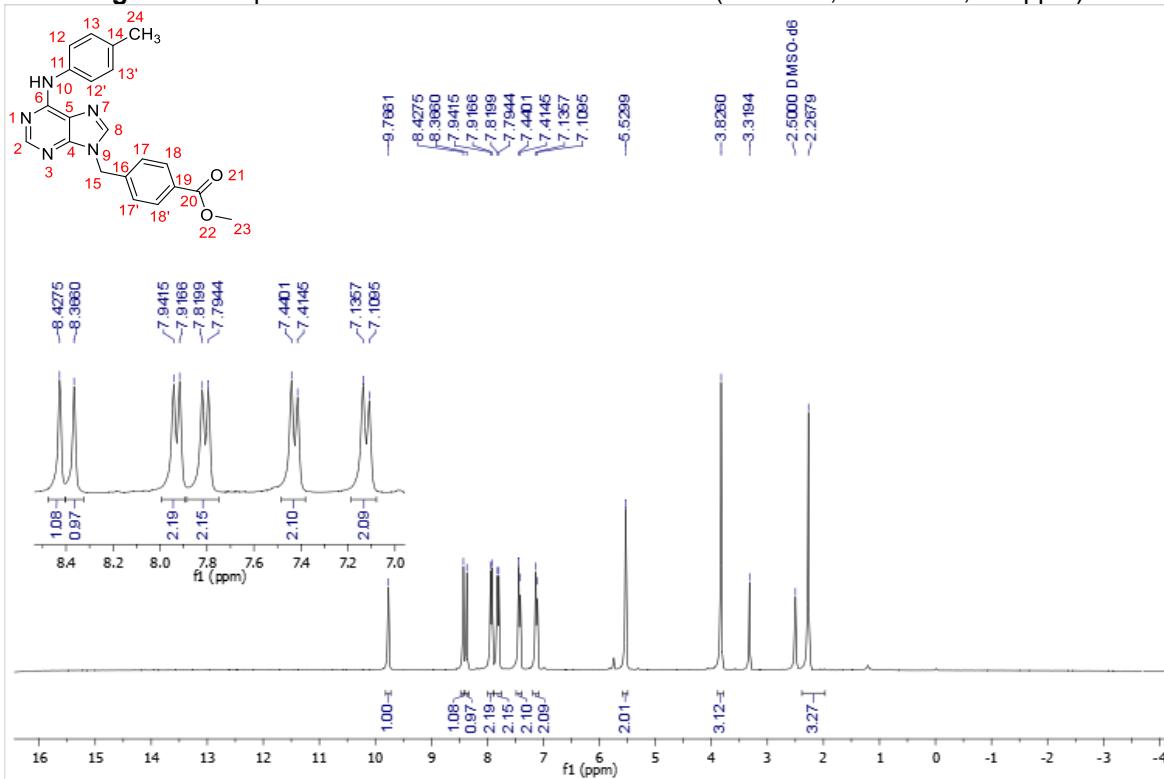
**Figura 51:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3g** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



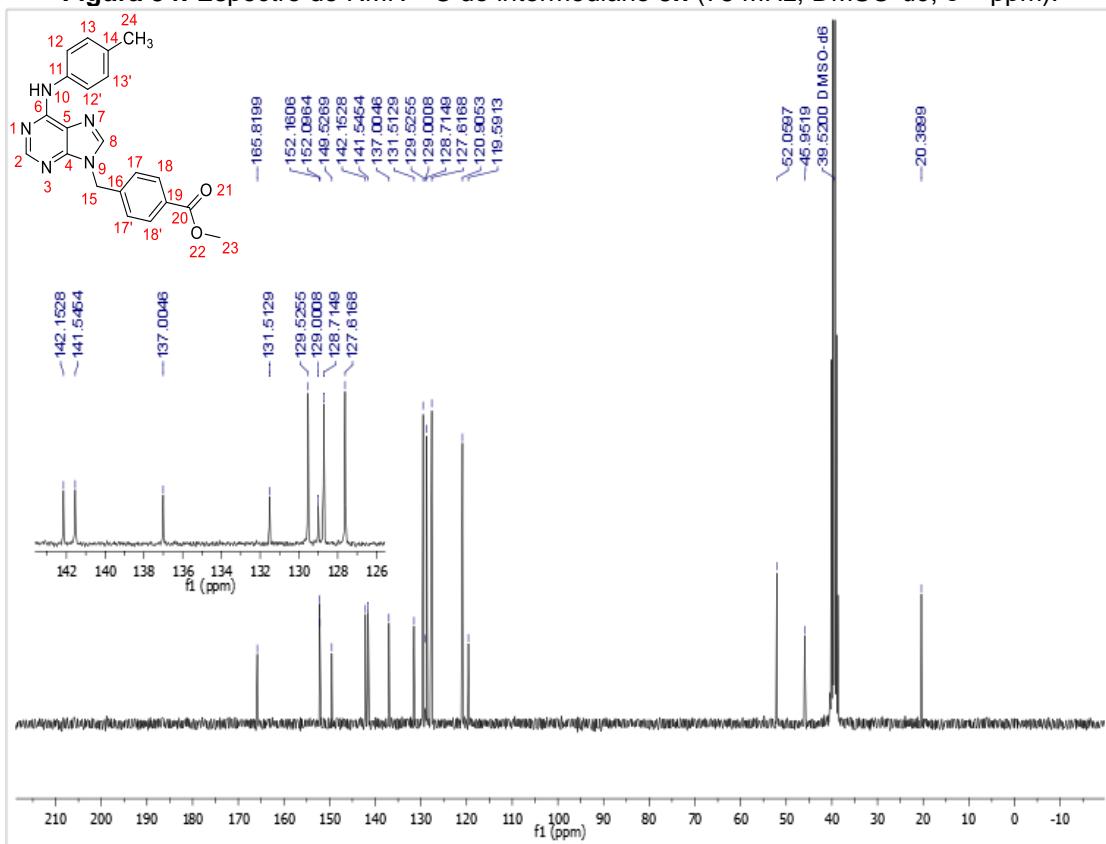
**Figura 52:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3g** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



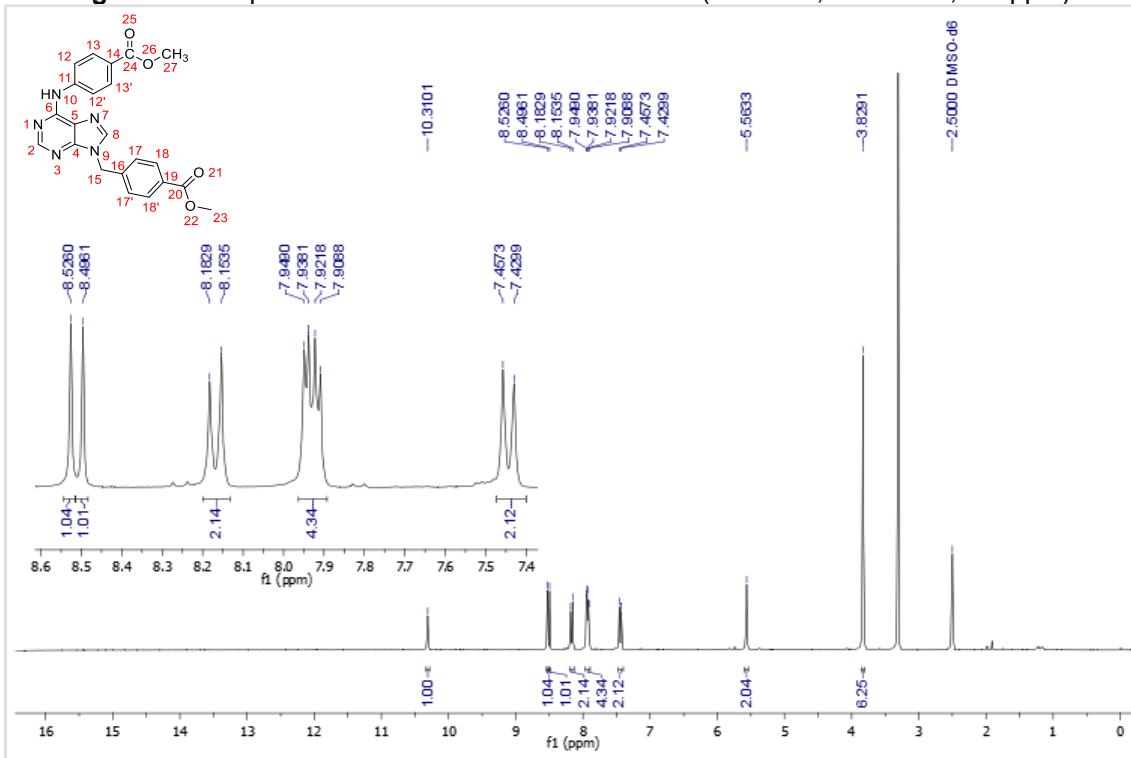
**Figura 53:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3h** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



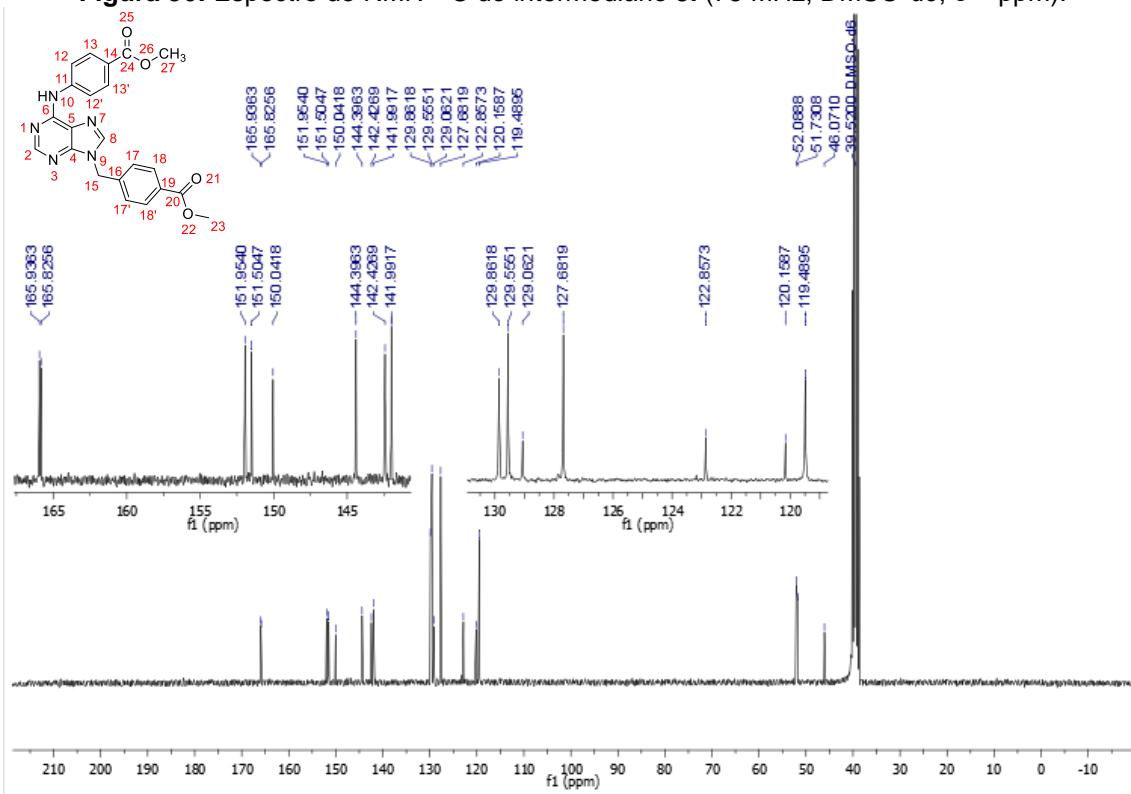
**Figura 54:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3h** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



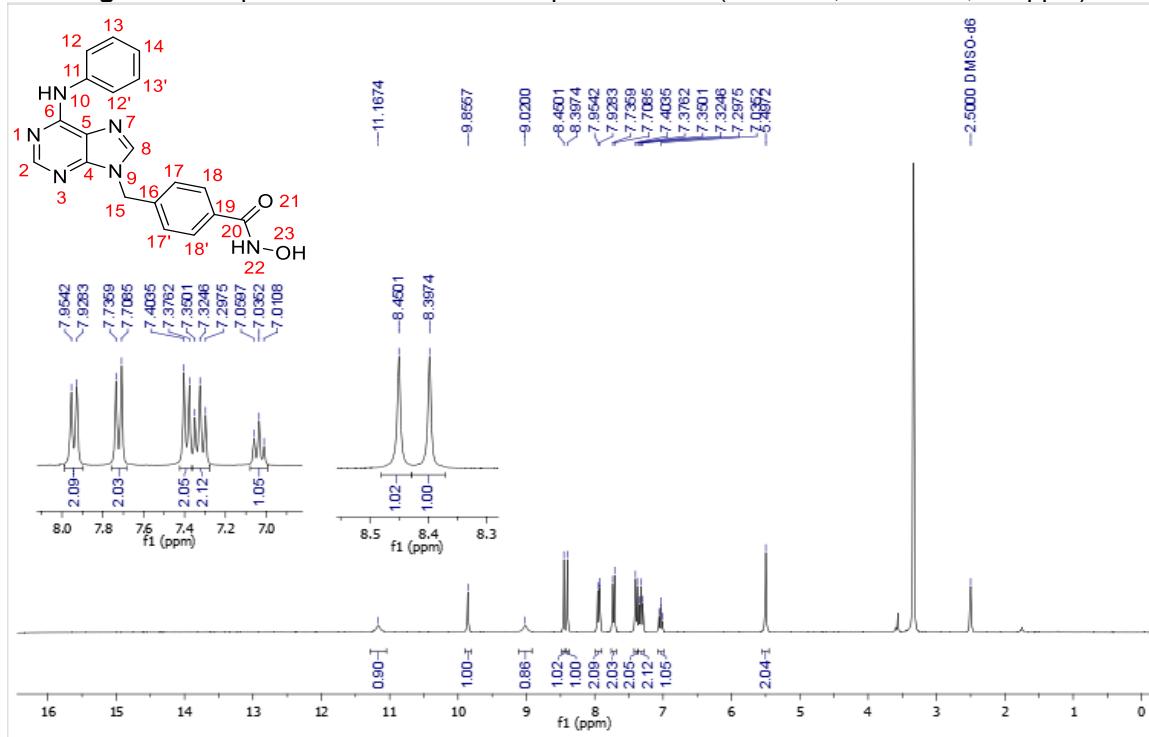
**Figura 55:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário **3i** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



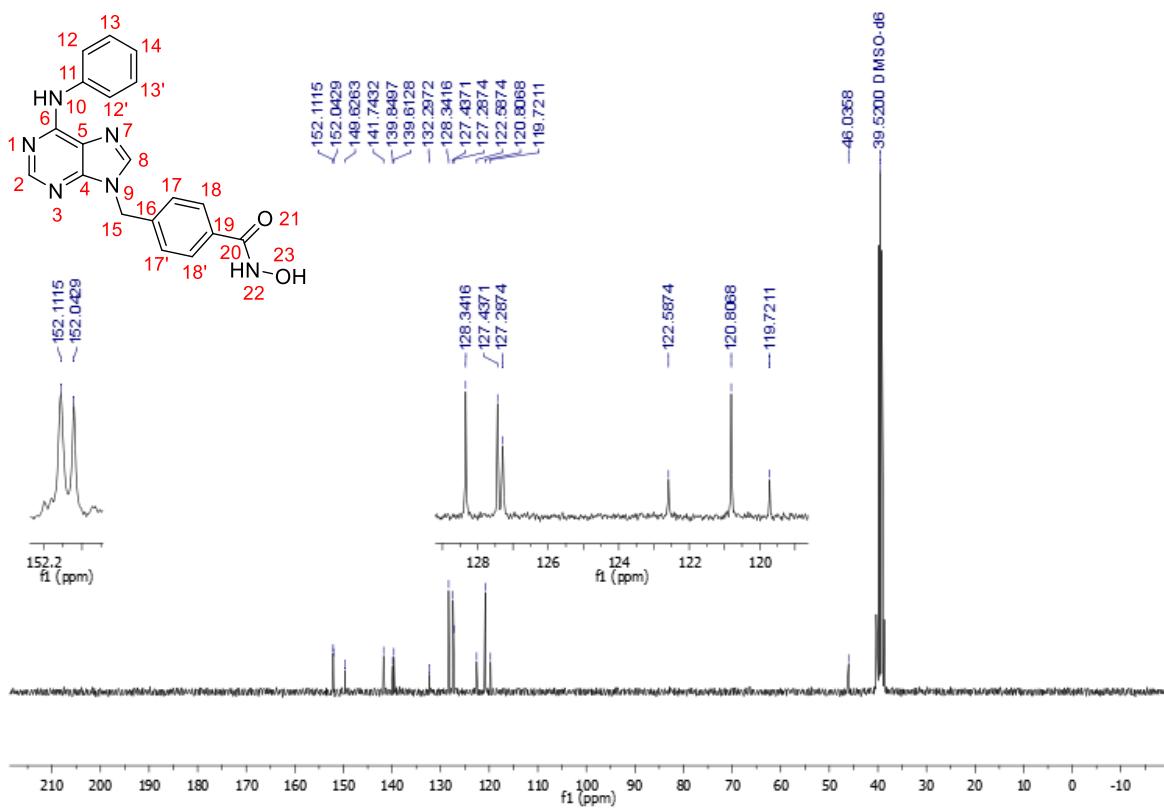
**Figura 56:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário **3i** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



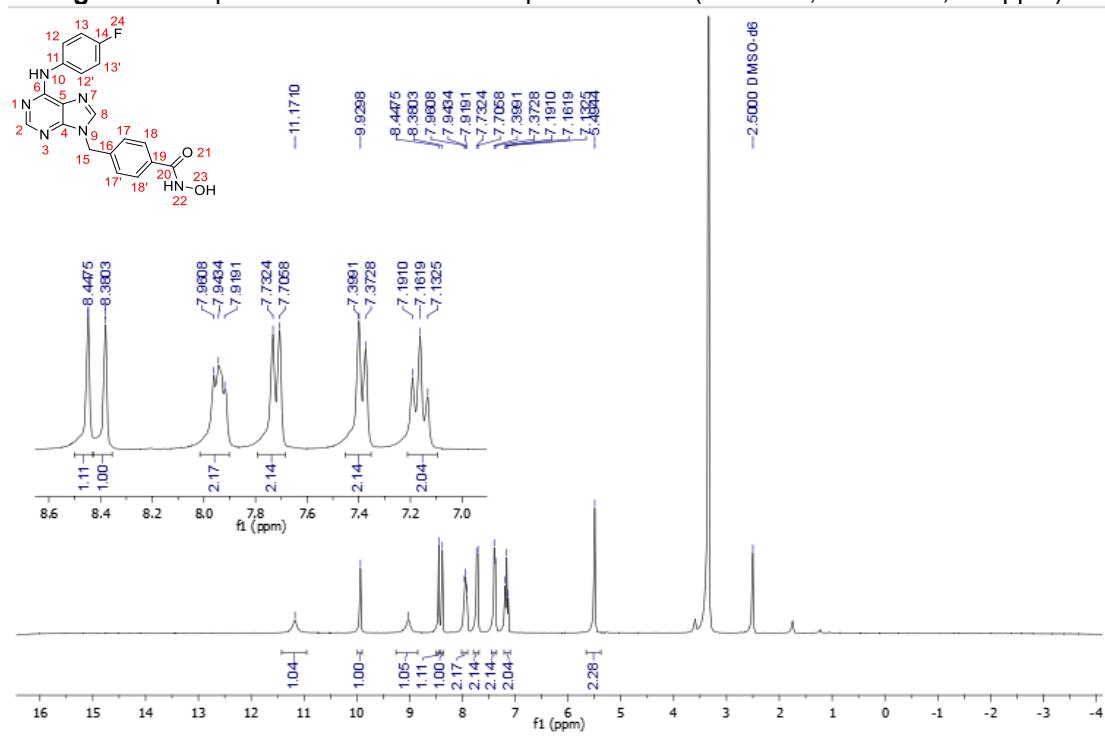
**Figura 57:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final **4a** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



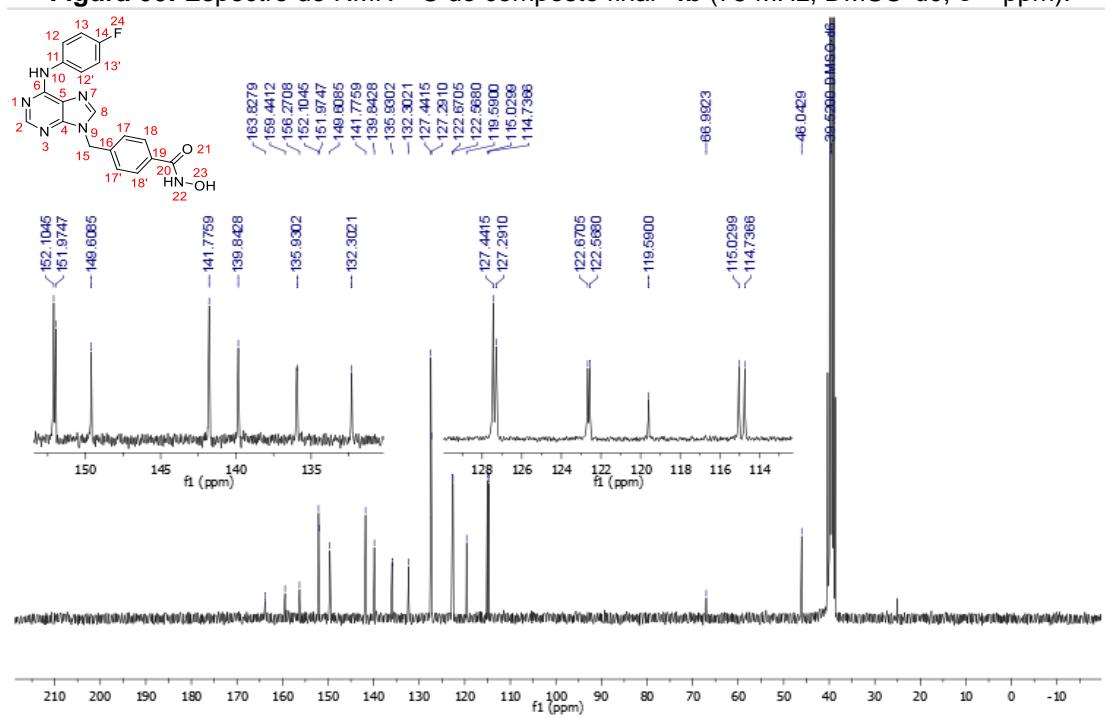
**Figura 58:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final **4a** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



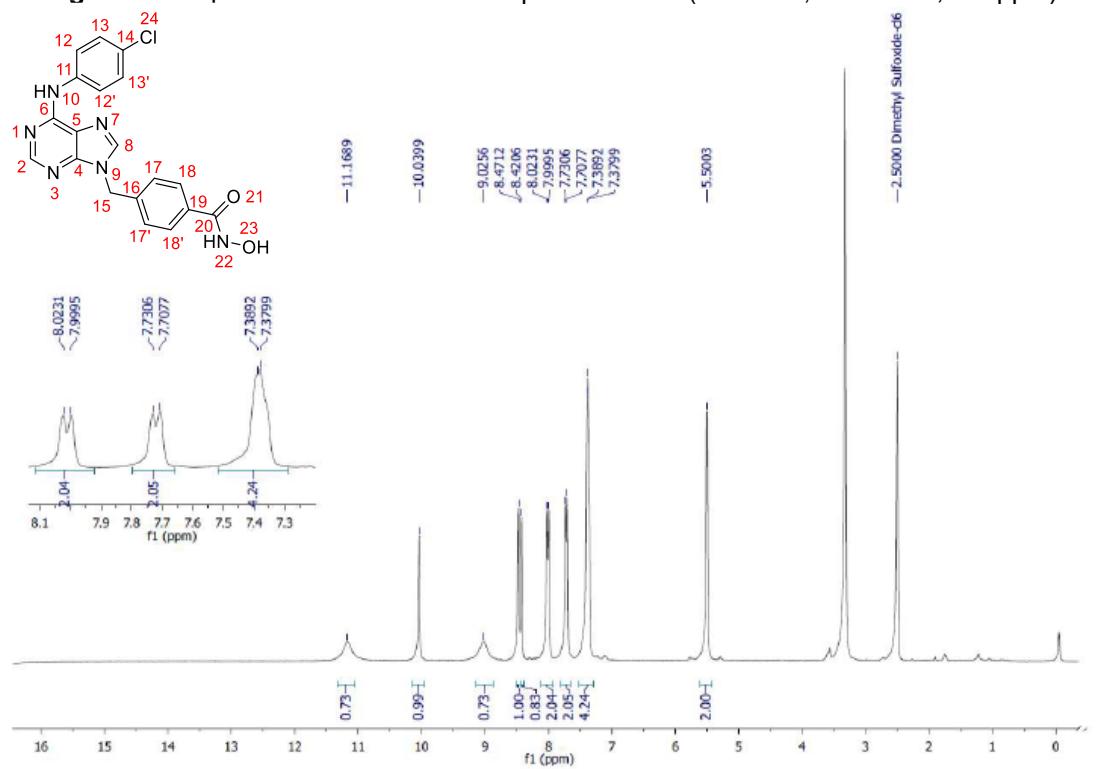
**Figura 59:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final **4b** (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  = ppm).



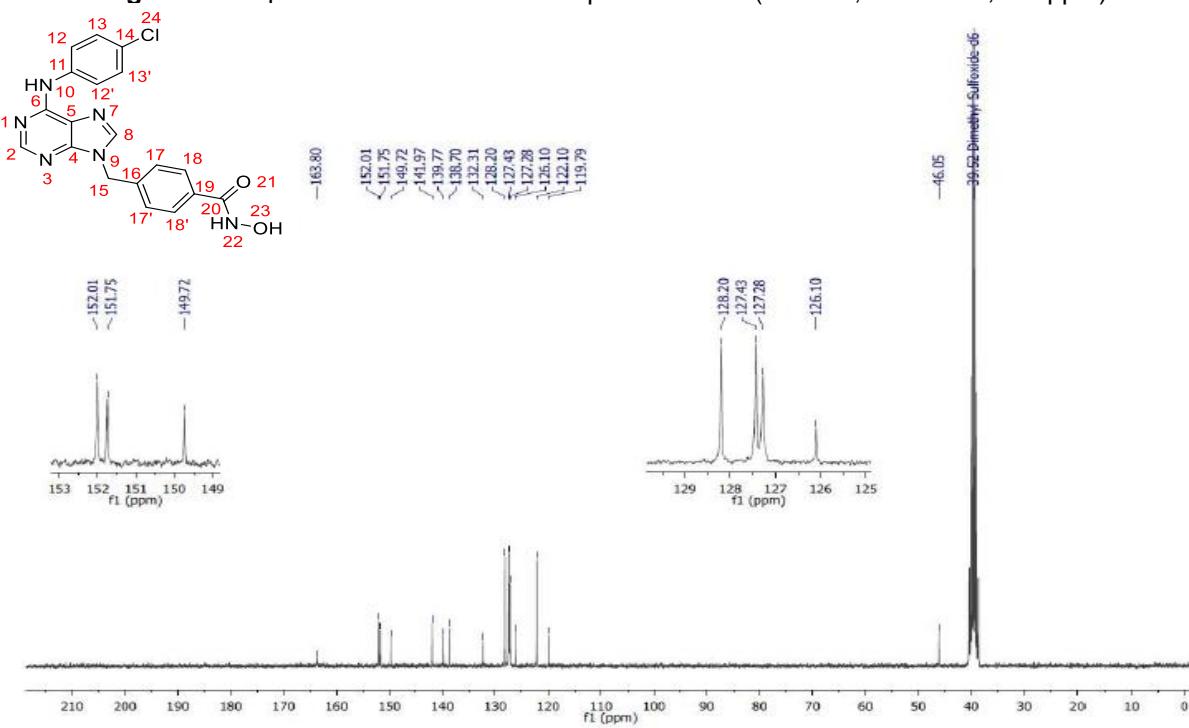
**Figura 60:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final **4b** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



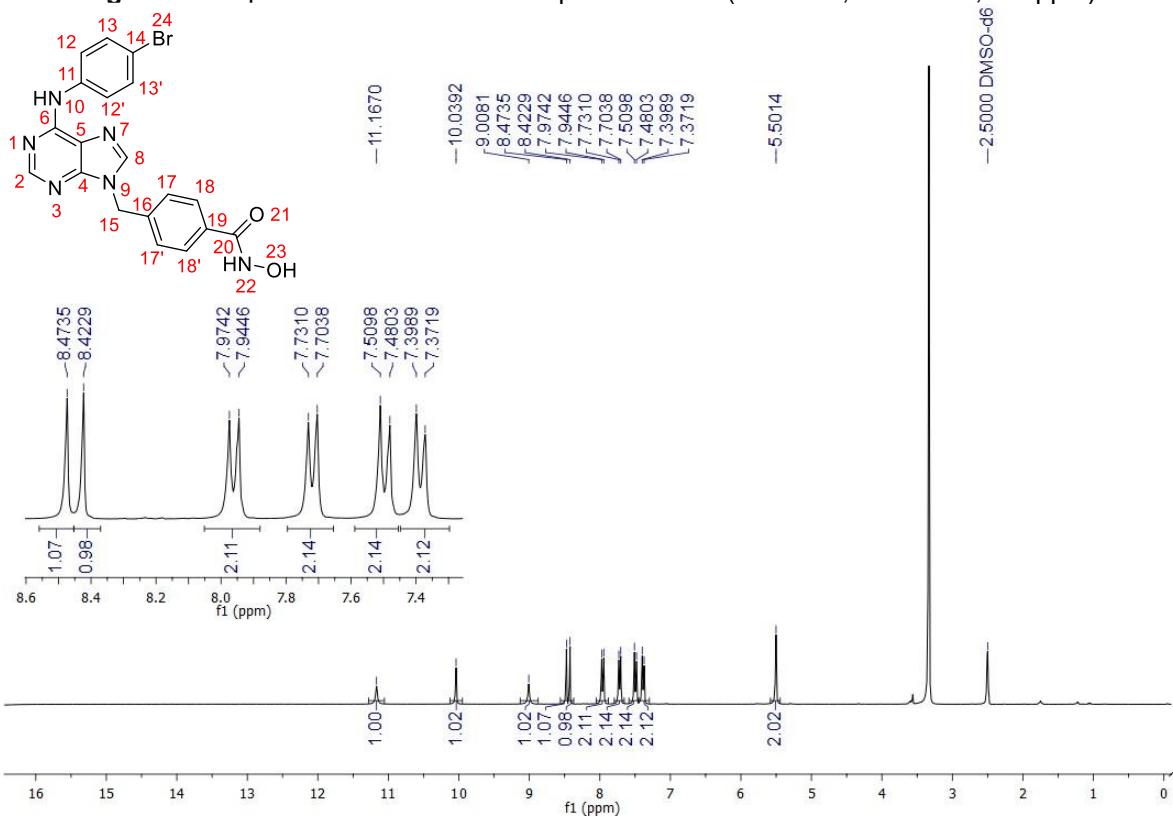
**Figura 61:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final **4c** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



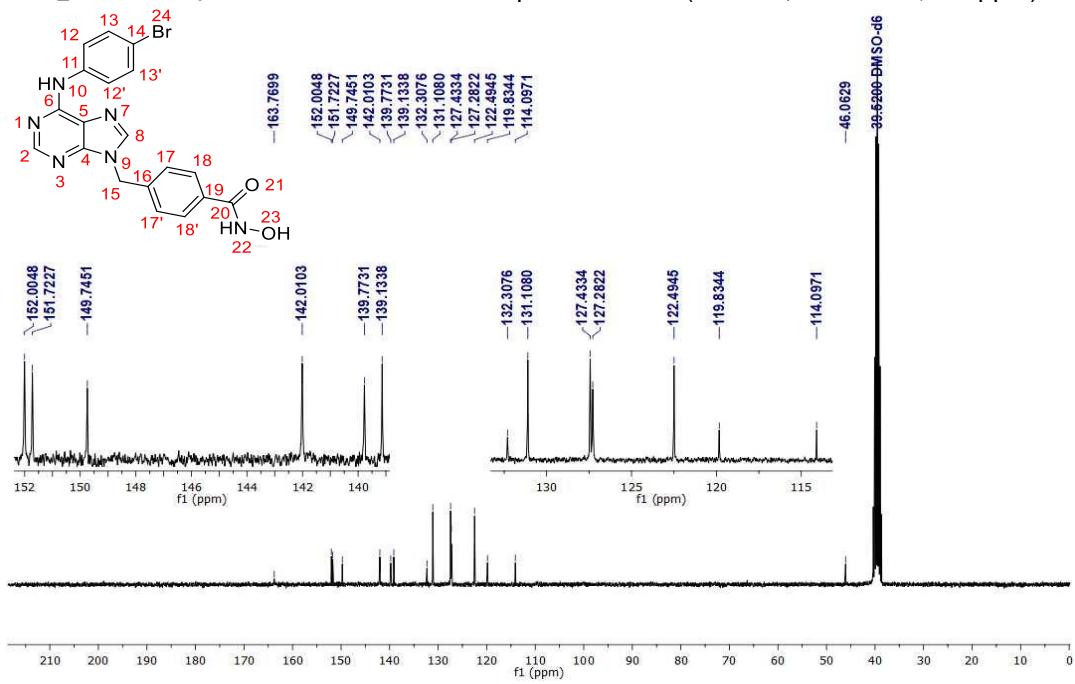
**Figura 62:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final **4c** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



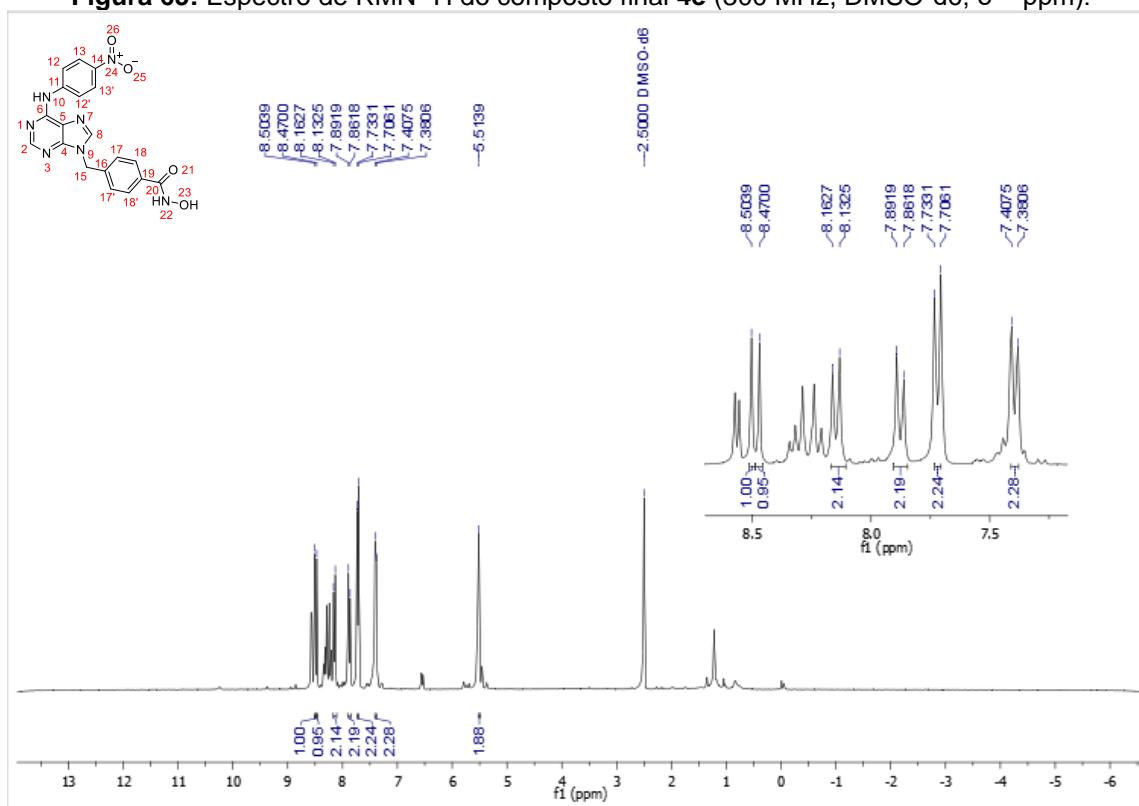
**Figura 63:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final **4d** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



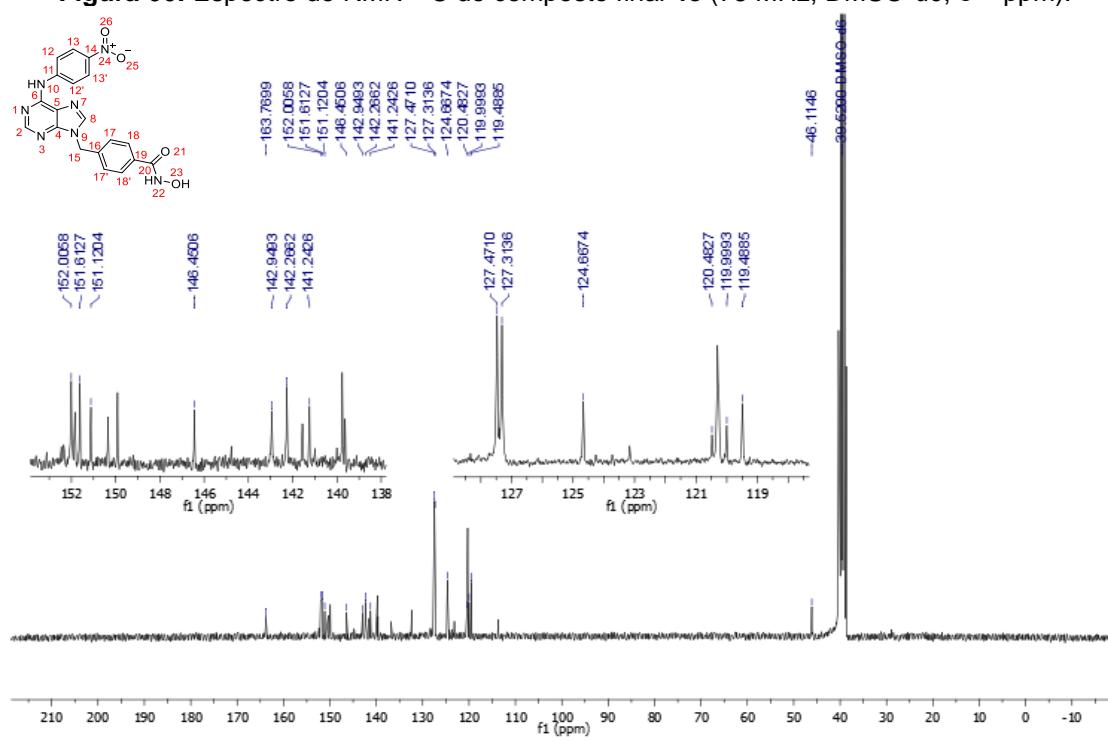
**Figura 64:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final **4d** (75 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  = ppm).



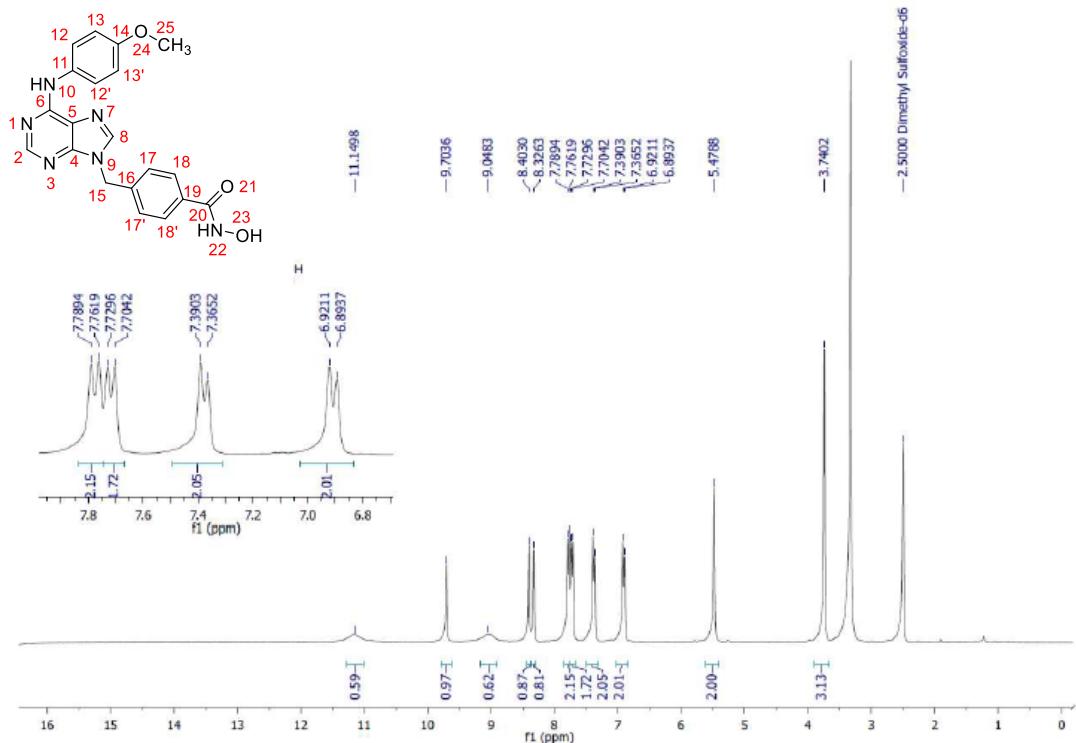
**Figura 65:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final **4e** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



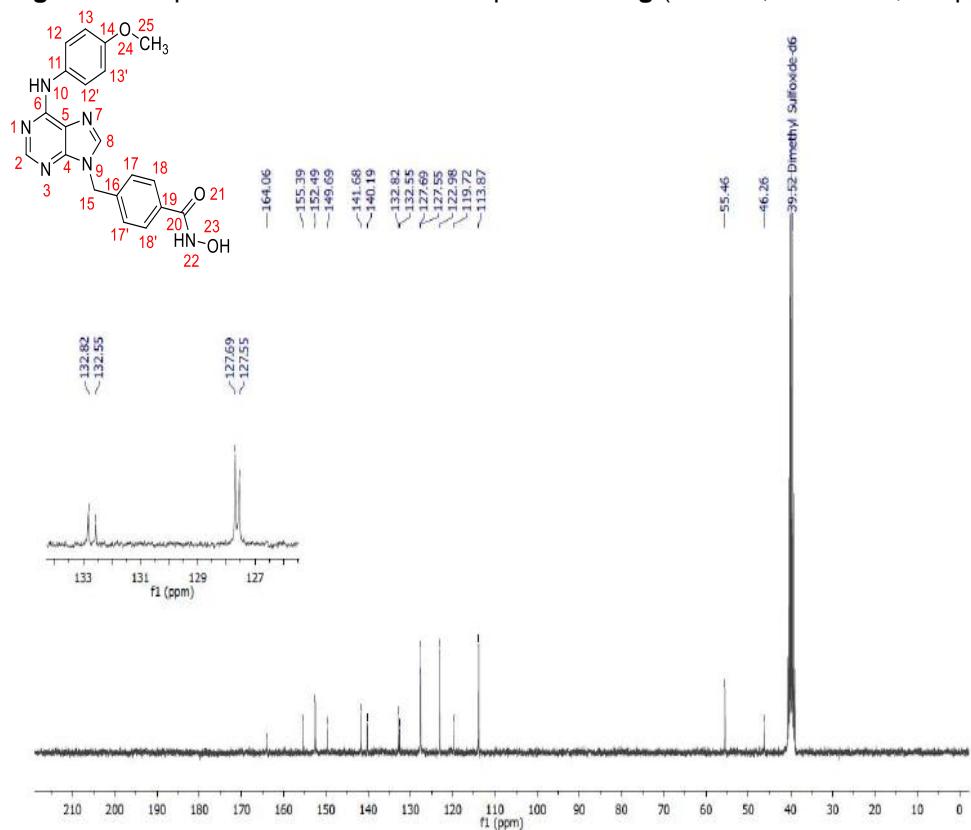
**Figura 66:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final **4e** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



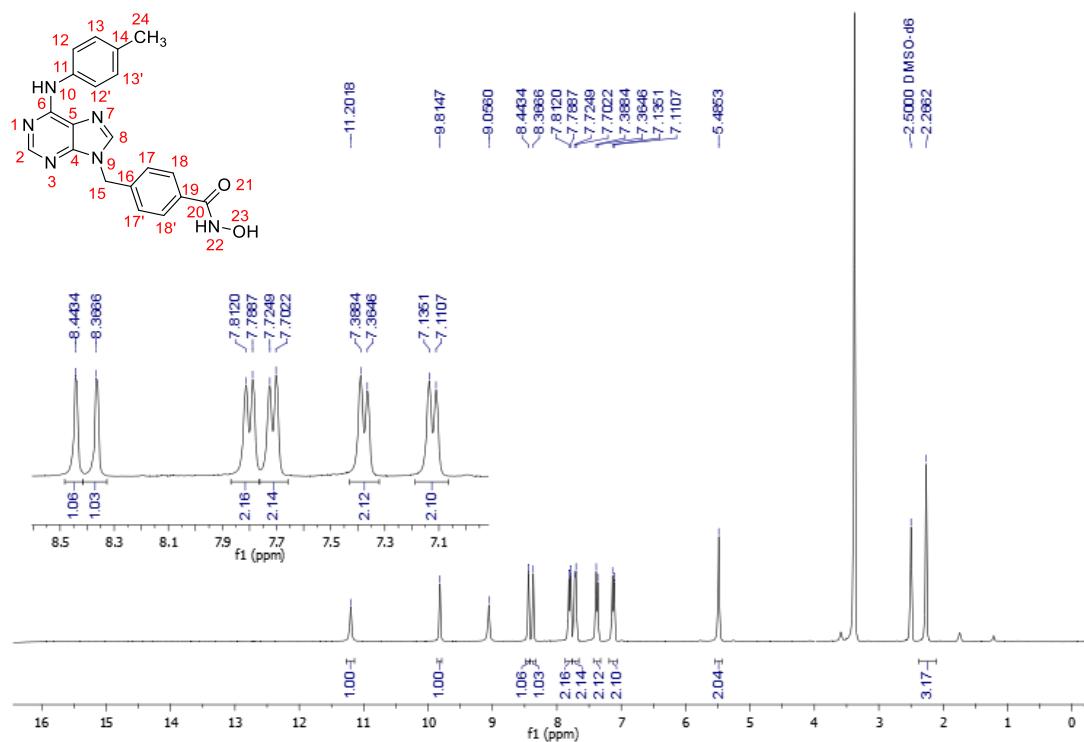
**Figura 67:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final **4g** (300 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



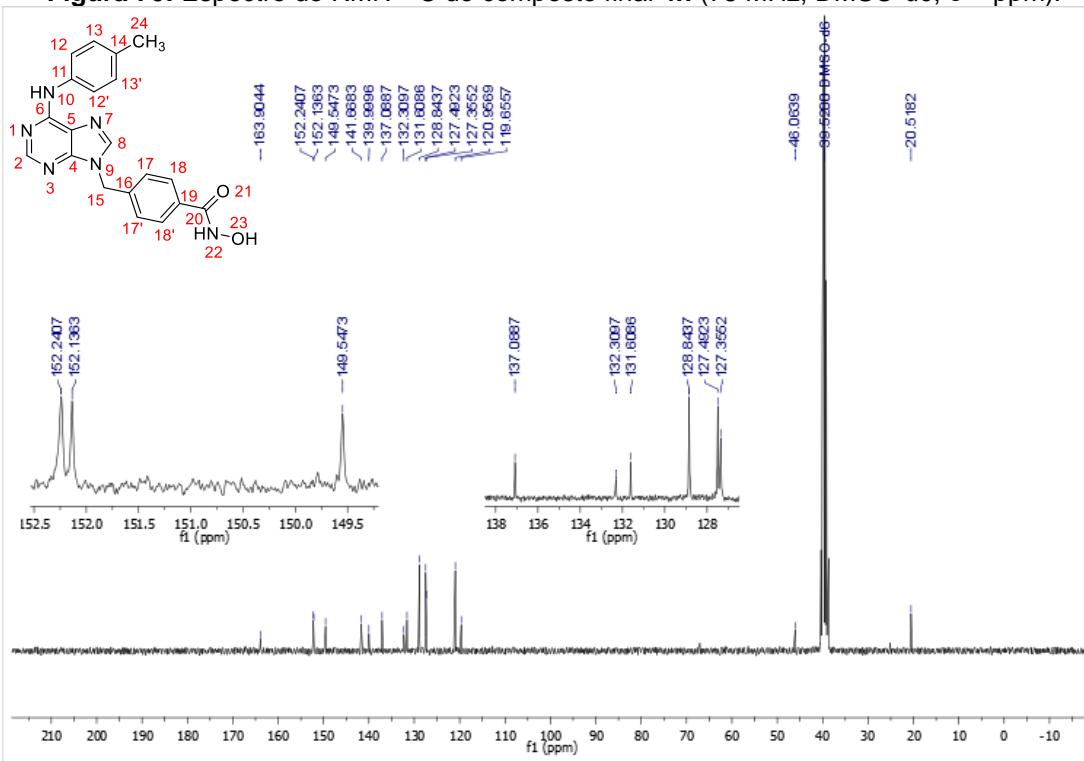
**Figura 68:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final **4g** (75 MHz, DMSO-d6,  $\delta$  = ppm).



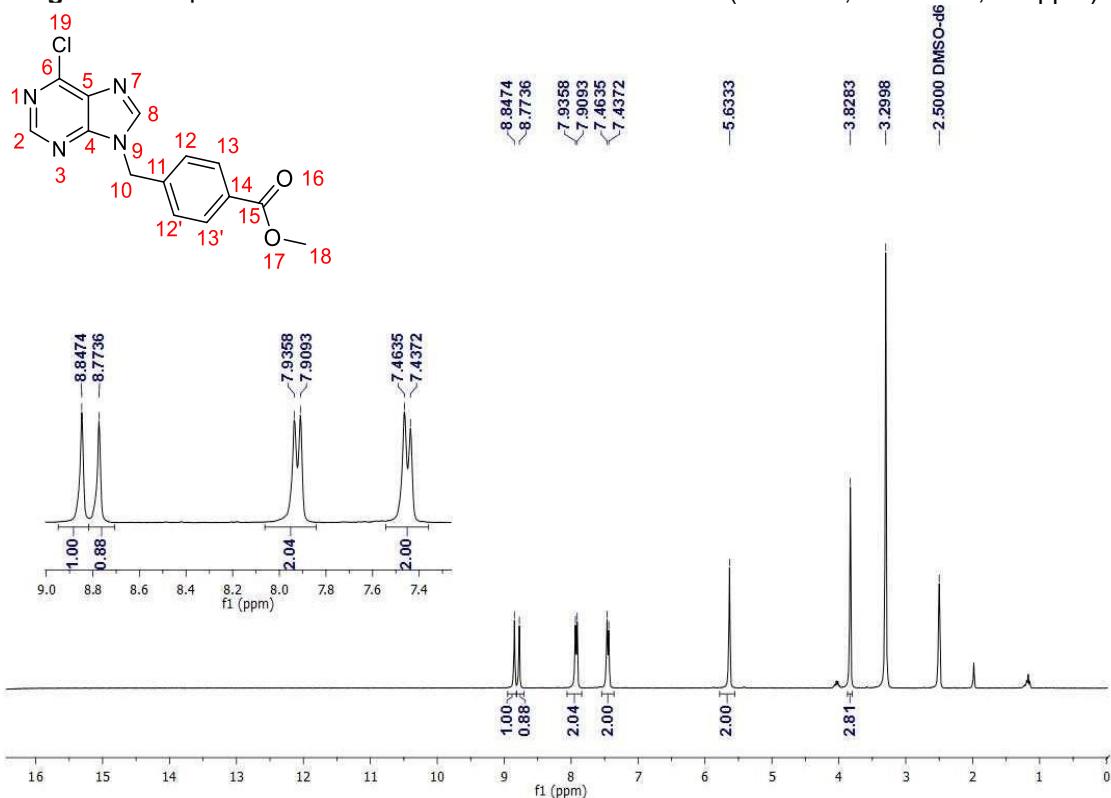
**Figura 69:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto final **4h** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



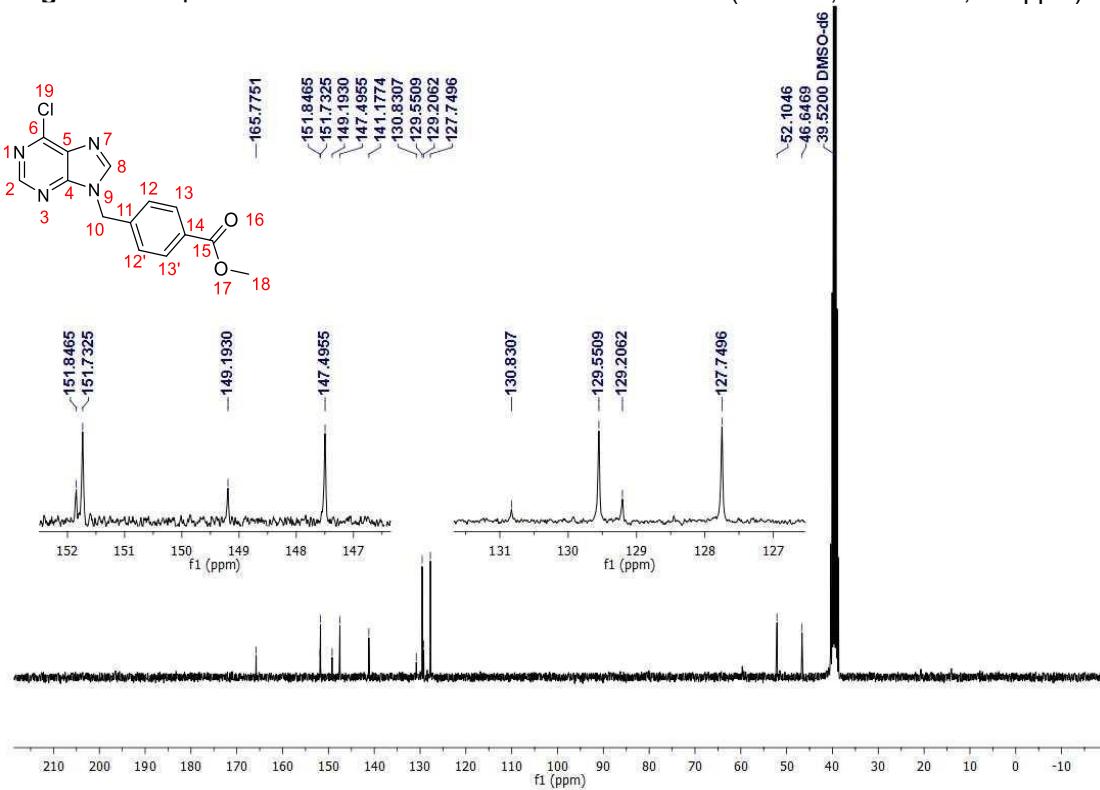
**Figura 70:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto final **4h** (75 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\delta$  = ppm).



**Figura 71:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário-chave **10** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



**Figura 72:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário-chave **10** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$  = ppm).



### 7.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

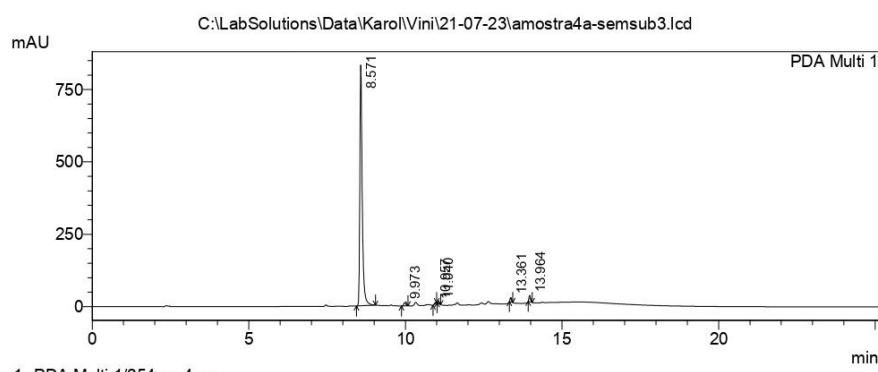
**Figura 73:** Corrida de HPLC do composto **4a**, página 1.

24/7/2023 13:55:58 1 / 3

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

C:\LabSolutions\Data\Karol\Vinil\21-07-23\amostra4a-semsub3.lcd  
 Acquired by : Admin  
 Sample Name : amostra4a-semsub3  
 Sample ID : amostra4a-semsub3  
 Vial # : 50  
 Injection Volume : 10 uL  
 Data File Name : amostra4a-semsub3.lcd  
 Method File Name : ACN-H2O-0.1TFA-25min.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : relat-Denise.lcr  
 Data Acquired : 21/7/2023 13:10:21  
 Data Processed : 21/7/2023 15:32:08

#### <Chromatogram>

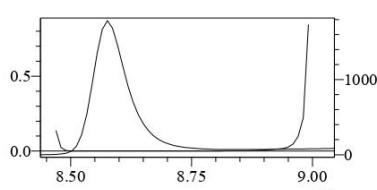


#### PeakTable

PDA Ch1 254nm 4nm		Name	Ret. Time	Area	Area %
Peak#					
1	RT8.571		8.571	4405029	95.185
2	RT9.973		9.973	51291	1.108
3	RT10.957		10.957	16879	0.365
4	RT11.040		11.040	18226	0.394
5	RT13.361		13.361	53174	1.149
6	RT13.964		13.964	83284	1.800
Total				4627884	100.000

#### Purity

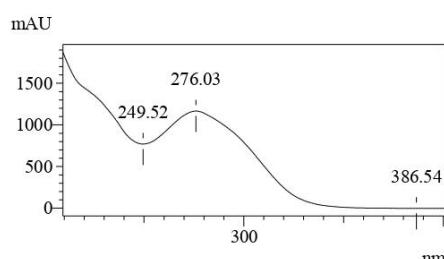
ID# : 1  
 Retention Time : 8.571  
 Compound Name : RT8.571



Impurity : Not Detected  
 Peak purity index : 1.000000  
 Single point threshold : 0.999978  
 Minimum peak purity index : 21

#### Spectrum

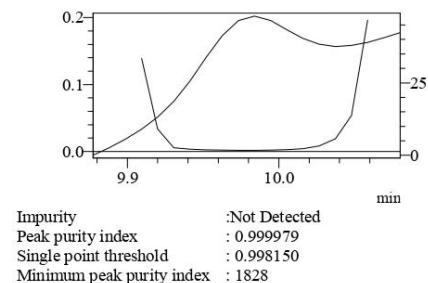
ID# : 1  
 Retention Time : 8.571  
 Compound Name : RT8.571  
 Spectrum Operation : None



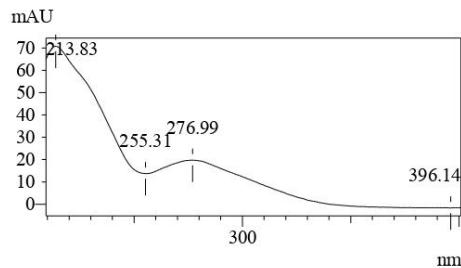
**Figura 74:** Corrida de HPLC do composto **4a**, página 2.

24/7/2023 13:55:58 2 / 3

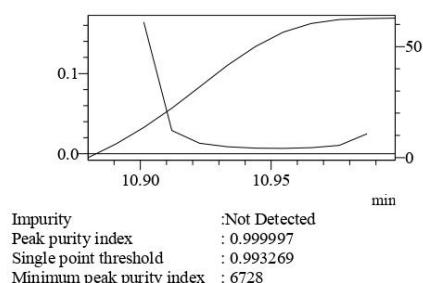
ID# : 2  
 Retention Time : 9.973  
 Compound Name : RT9.973



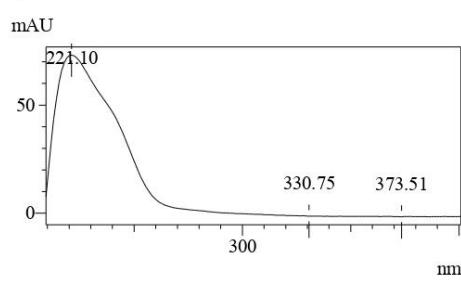
ID# : 2  
 Retention Time : 9.973  
 Compound Name : RT9.973  
 Spectrum Operation : None



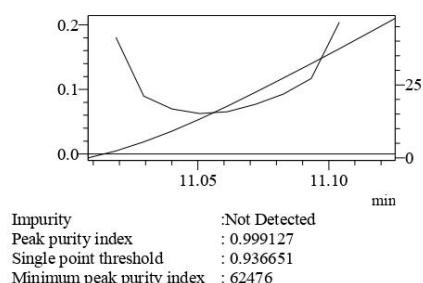
ID# : 3  
 Retention Time : 10.957  
 Compound Name : RT10.957



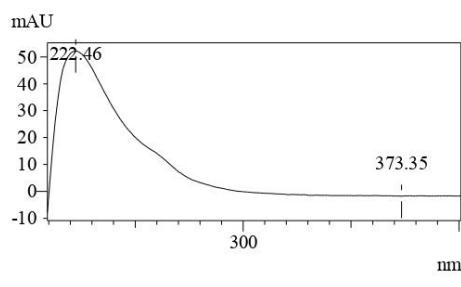
ID# : 3  
 Retention Time : 10.957  
 Compound Name : RT10.957  
 Spectrum Operation : None



ID# : 4  
 Retention Time : 11.040  
 Compound Name : RT11.040

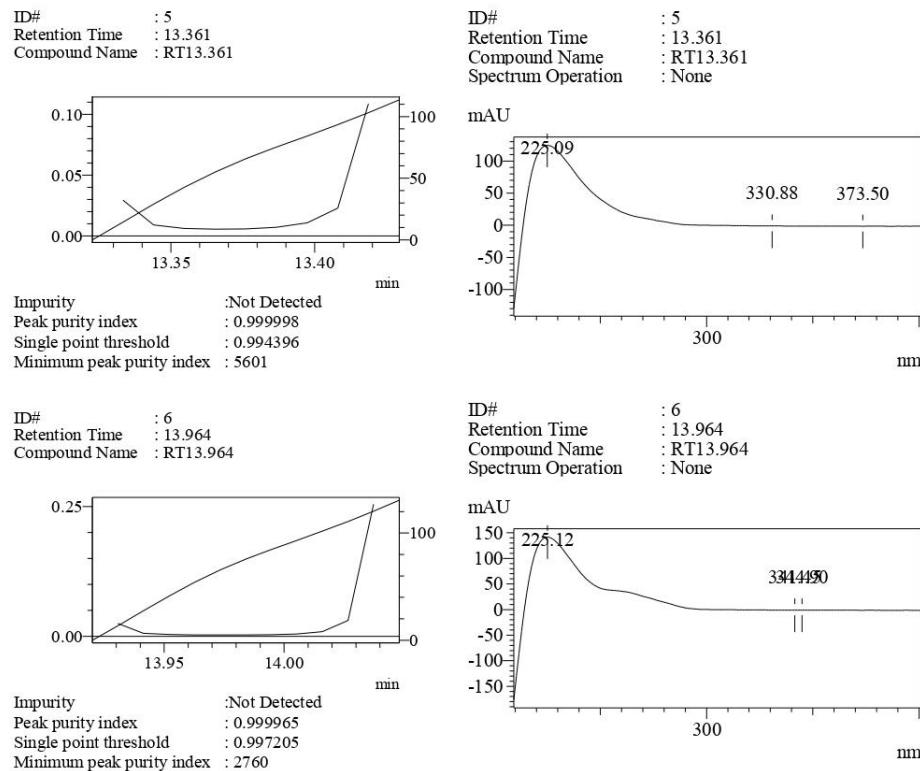


ID# : 4  
 Retention Time : 11.040  
 Compound Name : RT11.040  
 Spectrum Operation : None



**Figura 75:** Corrida de HPLC do composto **4a**, página 3.

24/7/2023 13:55:58 3 / 3



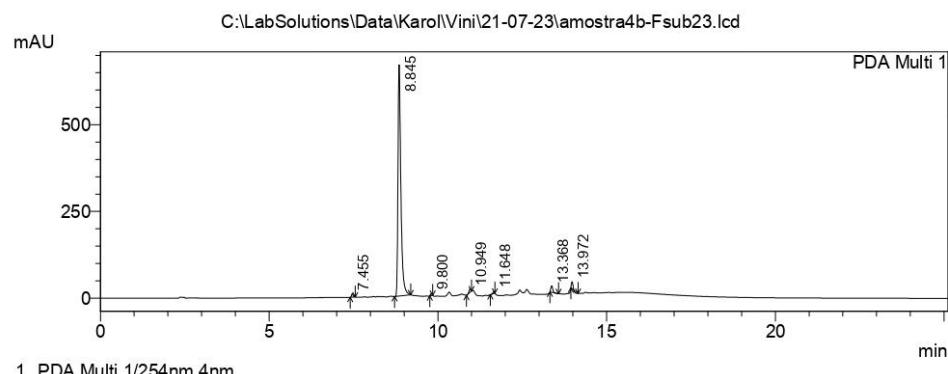
**Figura 76:** Corrida de HPLC do composto **4b**, página 1.

24/7/2023 14:03:00 1 / 3

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

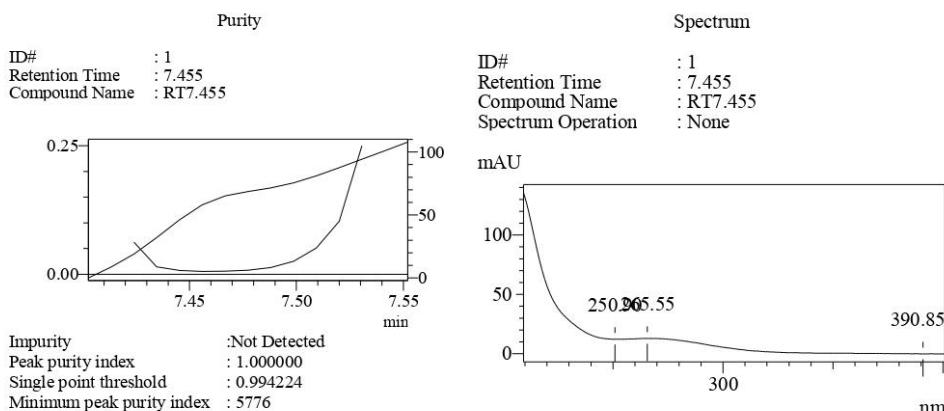
C:\LabSolutions\Data\Karol\Vini\21-07-23\amostra4b-Fsub23.lcd

Acquired by : Admin  
 Sample Name : amostra4b-Fsub2  
 Sample ID : amostra4b-Fsub2  
 Vail # : 51  
 Injection Volume : 10 uL  
 Data File Name : amostra4b-Fsub23.lcd  
 Method File Name : ACN-H2O-0.1TFA-25min.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : relat-Denise.lcr  
 Data Acquired : 21/7/2023 13:53:15  
 Data Processed : 21/7/2023 15:53:30

**<Chromatogram>**

PeakTable

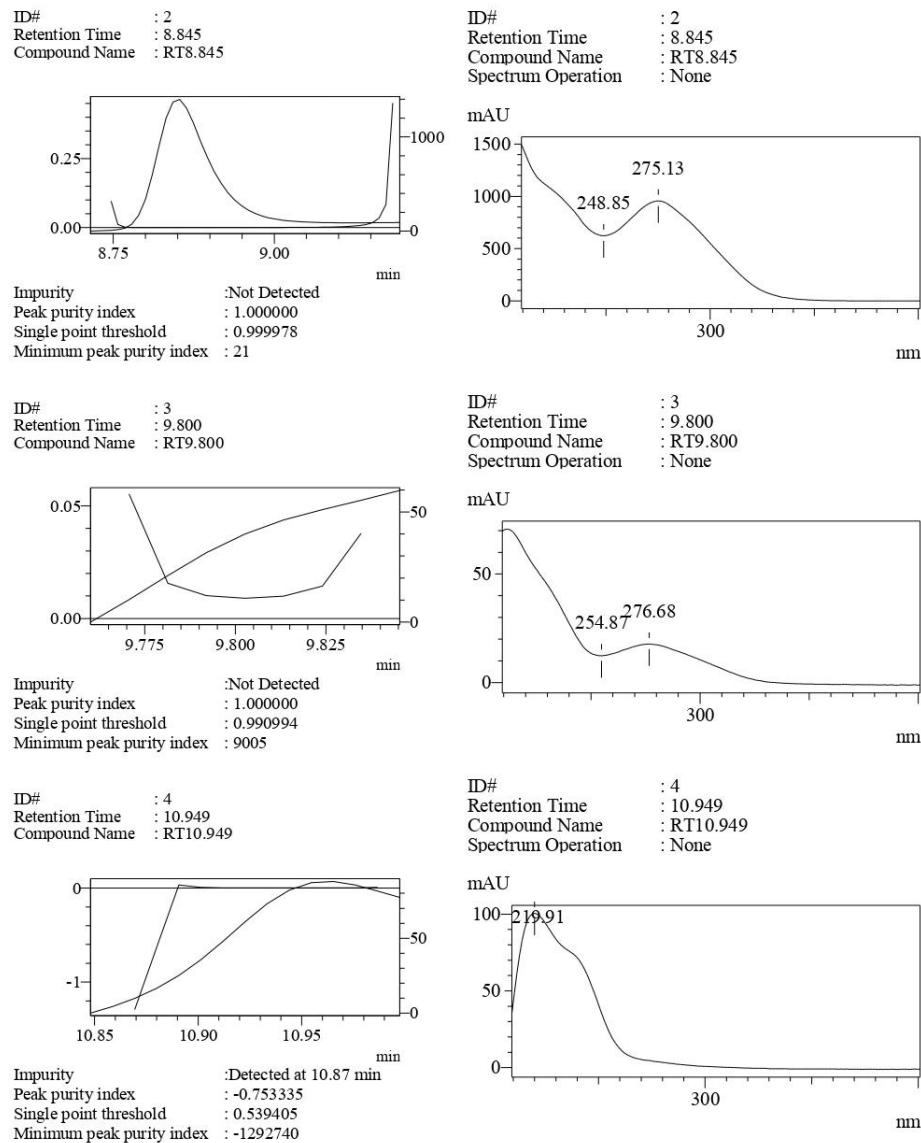
Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT7.455	7.455	34738	0.836
2	RT8.845	8.845	3949530	95.024
3	RT9.800	9.800	15978	0.384
4	RT10.949	10.949	38122	0.917
5	RT11.648	11.648	17942	0.432
6	RT13.368	13.368	67675	1.628
7	RT13.972	13.972	32360	0.779
Total			4156345	100.000



C:\LabSolutions\Data\Karol\Vini\21-07-23\amostra4b-Fsub23.lcd

**Figura 77:** Corrida de HPLC do composto **4b**, página 2.

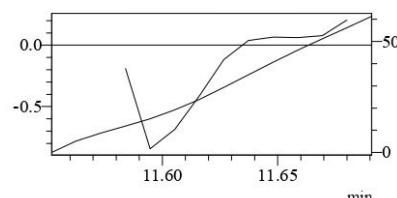
24/7/2023 14:03:00 2 / 3



**Figura 78:** Corrida de HPLC do composto **4b**, página 3.

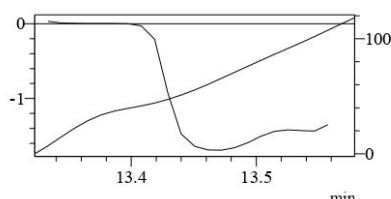
24/7/2023 14:03:00 3 / 3

ID# : 5  
 Retention Time : 11.648  
 Compound Name : RT11.648



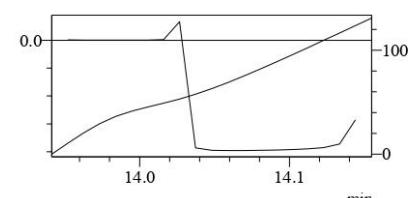
Impurity : Detected at 11.59 min  
 Peak purity index : 0.063206  
 Single point threshold : 0.906826  
 Minimum peak purity index : -843619

ID# : 6  
 Retention Time : 13.368  
 Compound Name : RT13.368



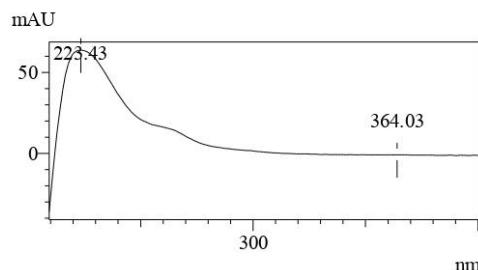
Impurity : Detected at 13.47 min  
 Peak purity index : -0.720302  
 Single point threshold : 0.970694  
 Minimum peak purity index : -1690995

ID# : 7  
 Retention Time : 13.972  
 Compound Name : RT13.972

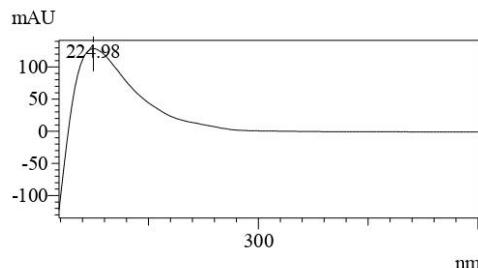


Impurity : Detected at 14.06 min  
 Peak purity index : -0.996061  
 Single point threshold : 0.982689  
 Minimum peak purity index : -1978750

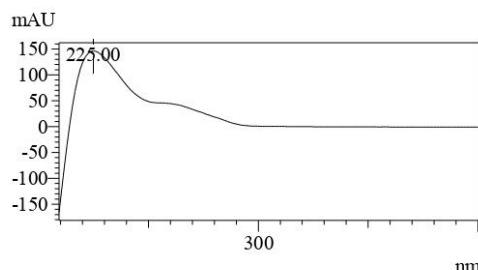
ID# : 5  
 Retention Time : 11.648  
 Compound Name : RT11.648  
 Spectrum Operation : None



ID# : 6  
 Retention Time : 13.368  
 Compound Name : RT13.368  
 Spectrum Operation : None

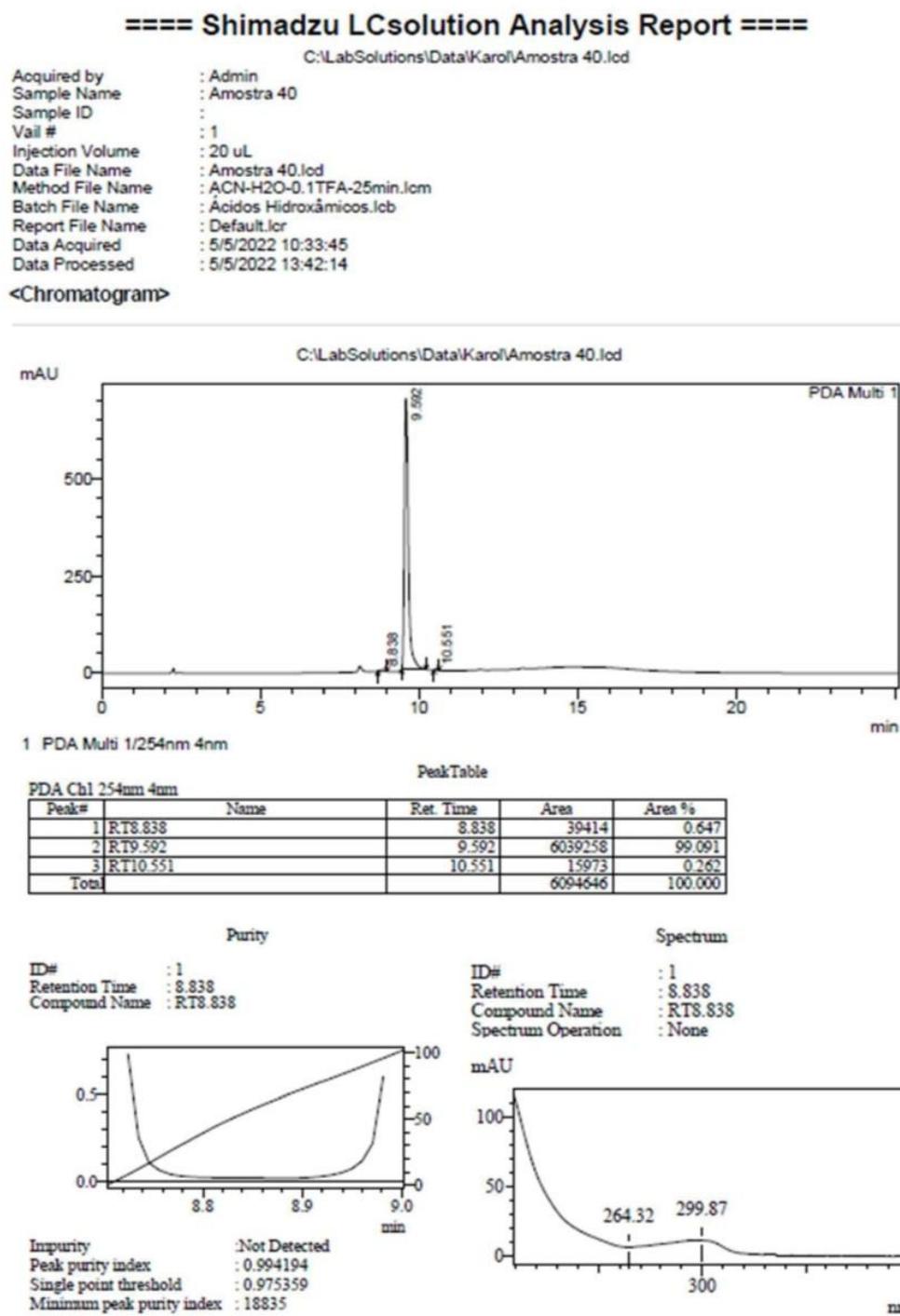


ID# : 7  
 Retention Time : 13.972  
 Compound Name : RT13.972  
 Spectrum Operation : None



**Figura 79:** Corrida de HPLC do composto **4c**, página 1.

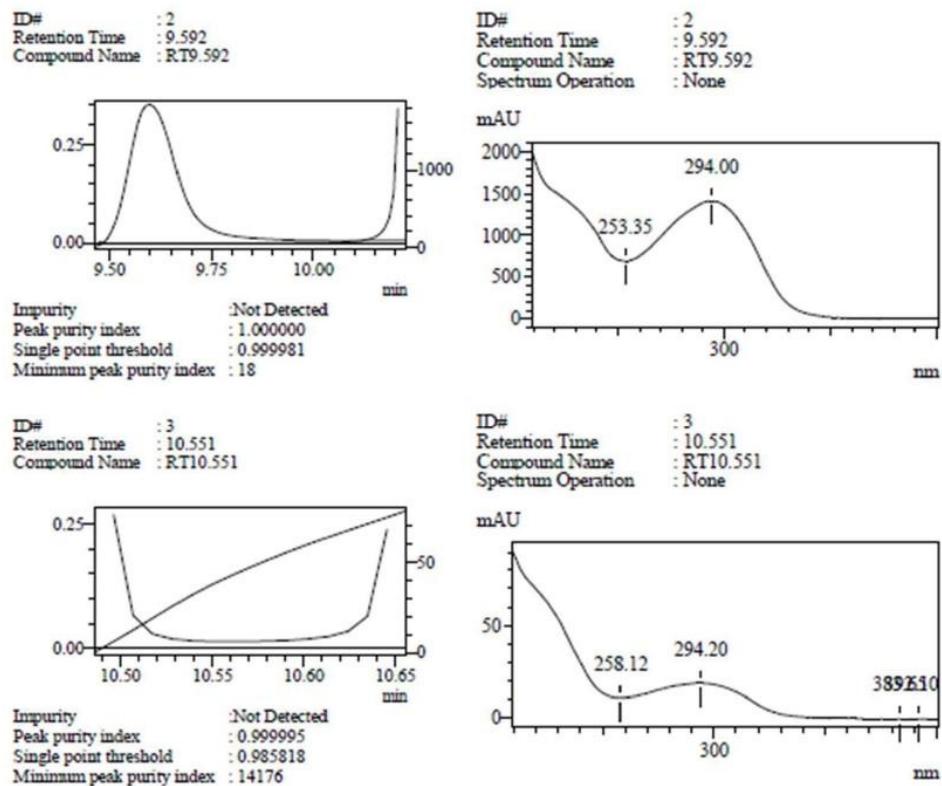
5/5/2022 13:46:08 1 / 2



C:\LabSolutions\Data\Karol\Amostra 40.lcd

**Figura 80:** Corrida de HPLC do composto **4c**, página 2.

5/5/2022 13:46:08 2 / 2



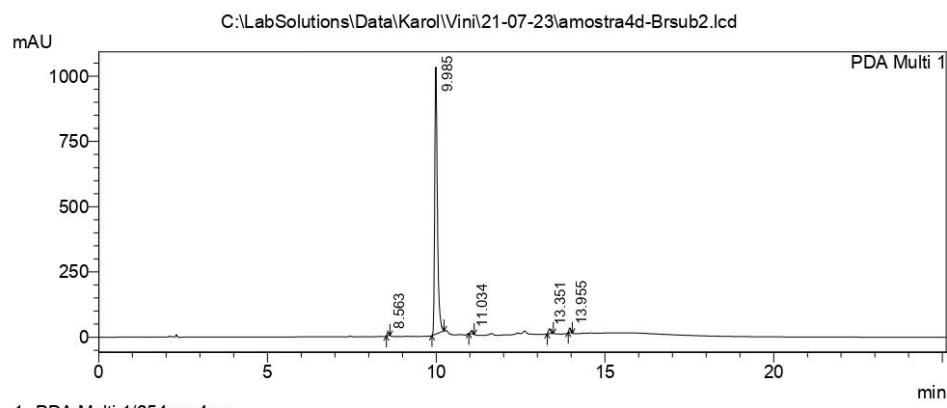
**Figura 81:** Corrida de HPLC do composto **4d**, página 1.

24/7/2023 14:06:15 1 / 3

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

C:\LabSolutions\Data\Karol\Vini\21-07-23\amostra4d-Brsub2.lcd

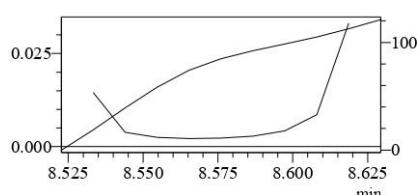
Acquired by : Admin  
 Sample Name : amostra4d-Brsub2  
 Sample ID : amostra4d-Brsub2  
 Vail # : 53  
 Injection Volume : 10 uL  
 Data File Name : amostra4d-Brsub2.lcd  
 Method File Name : ACN-H2O-0.1TFA-25min.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : relat-Denise.lcr  
 Data Acquired : 21/7/2023 15:00:59  
 Data Processed : 21/7/2023 15:31:14

**<Chromatogram>****PDA Ch1 254nm 4nm**

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.563	8.563	42336	0.721
2	RT9.985	9.985	5618172	95.744
3	RT11.034	11.034	53819	0.917
4	RT13.351	13.351	82069	1.399
5	RT13.955	13.955	71520	1.219
Total			5867915	100.000

**Purity**

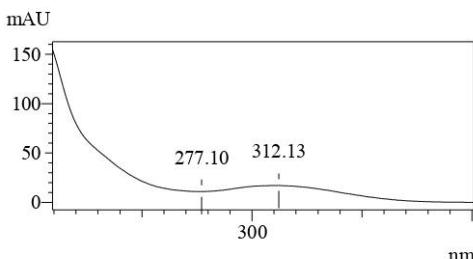
ID# : 1  
 Retention Time : 8.563  
 Compound Name : RT8.563



Impurity : Not Detected  
 Peak purity index : 1.000000  
 Single point threshold : 0.997867  
 Minimum peak purity index : 2132

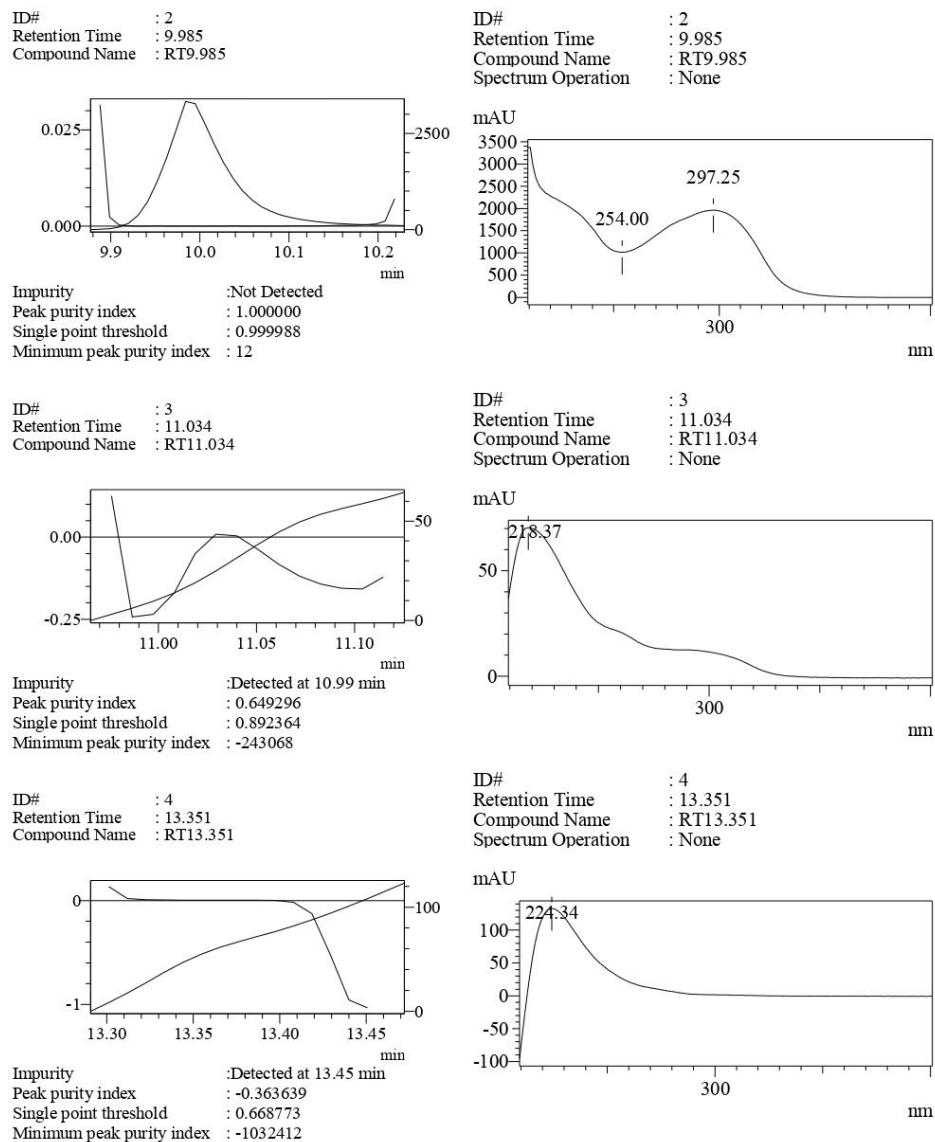
**Spectrum**

ID# : 1  
 Retention Time : 8.563  
 Compound Name : RT8.563  
 Spectrum Operation : None



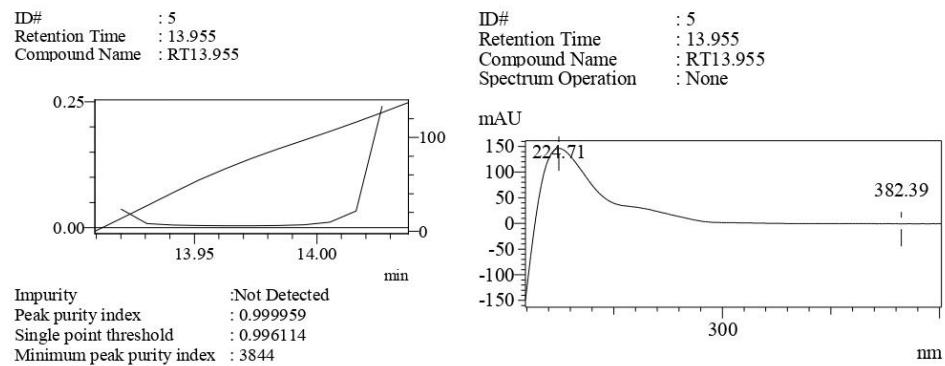
**Figura 82:** Corrida de HPLC do composto **4d**, página 2.

24/7/2023 14:06:15 2 / 3



**Figura 83:** Corrida de HPLC do composto **4d**, página 3.

24/7/2023 14:06:15 3 / 3



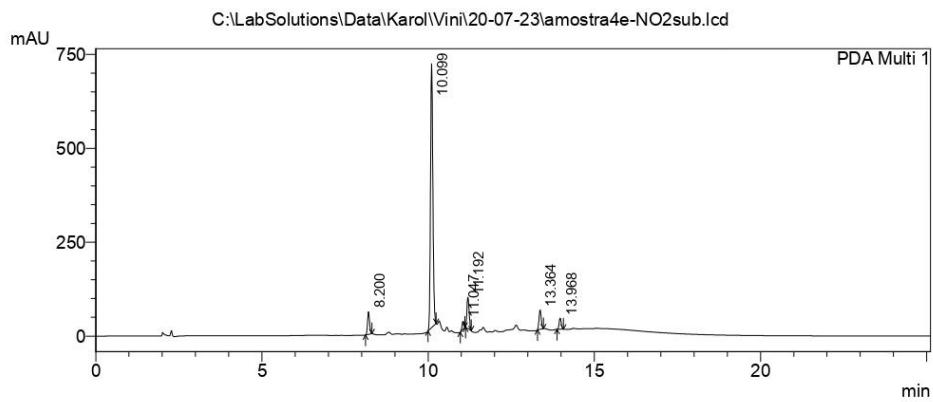
**Figura 84:** Corrida de HPLC do composto **4e**, página 1.

20/7/2023 14:37:29 1 / 3

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

C:\LabSolutions\Data\Karol\Vinil\20-07-23\amostra4e-NO2sub.lcd

Acquired by : Admin  
 Sample Name : amostra4e-NO2sub  
 Sample ID : amostra4e-NO2sub  
 Vial # : 45  
 Injection Volume : 20 uL  
 Data File Name : amostra4e-NO2sub.lcd  
 Method File Name : ACN-H2O-0.1TFA-25min.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : relat-Denise.lcr  
 Data Acquired : 20/7/2023 11:41:16  
 Data Processed : 20/7/2023 12:06:26

**<Chromatogram>****PDA Ch1 254nm 4nm****PeakTable**

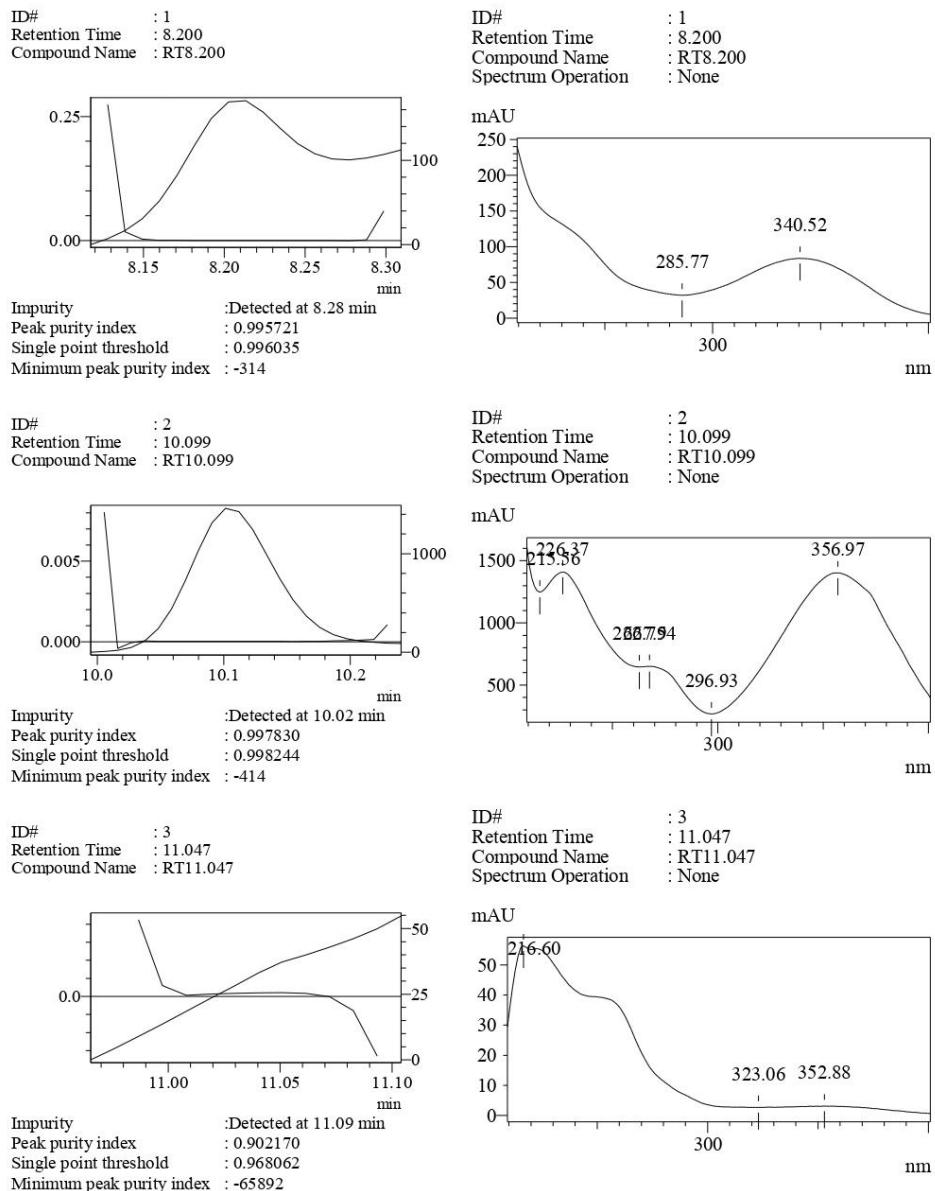
Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.200	8.200	255168	5.630
2	RT10.099	10.099	3426552	75.610
3	RT11.047	11.047	87281	1.926
4	RT11.192	11.192	391520	8.639
5	RT13.364	13.364	236921	5.228
6	RT13.968	13.968	134459	2.967
Total			4531901	100.000

Purity

Spectrum

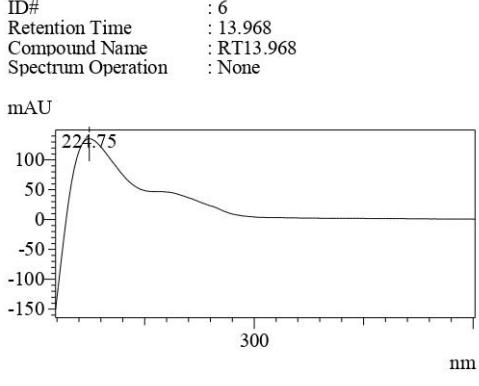
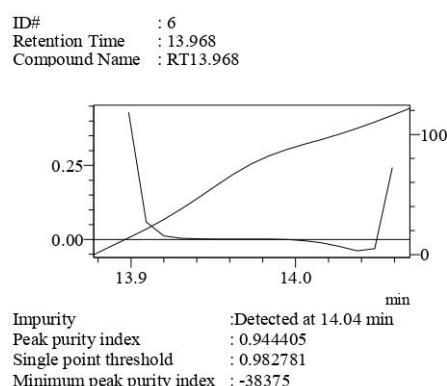
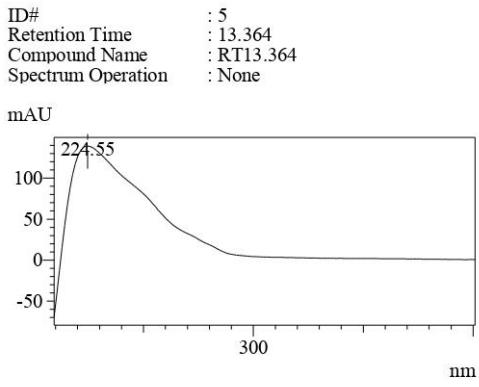
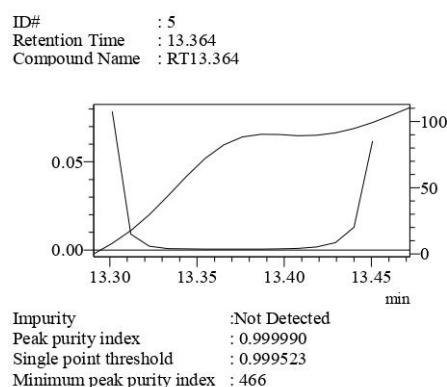
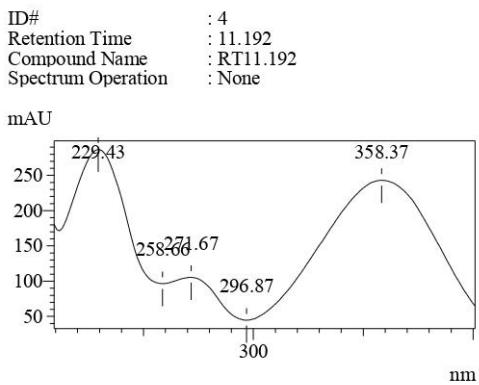
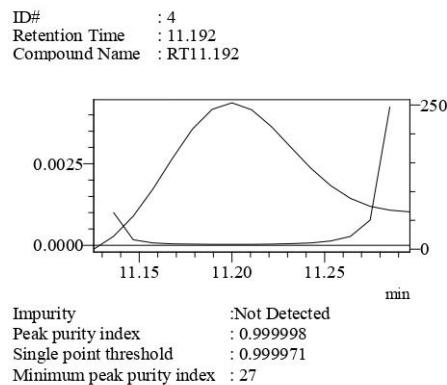
**Figura 85:** Corrida de HPLC do composto **4e**, página 2.

20/7/2023 14:37:29 2 / 3



**Figura 86:** Corrida de HPLC do composto **4e**, página 3.

20/7/2023 14:37:29 3 / 3



**Figura 87:** Corrida de HPLC do composto **4g**, página 1.

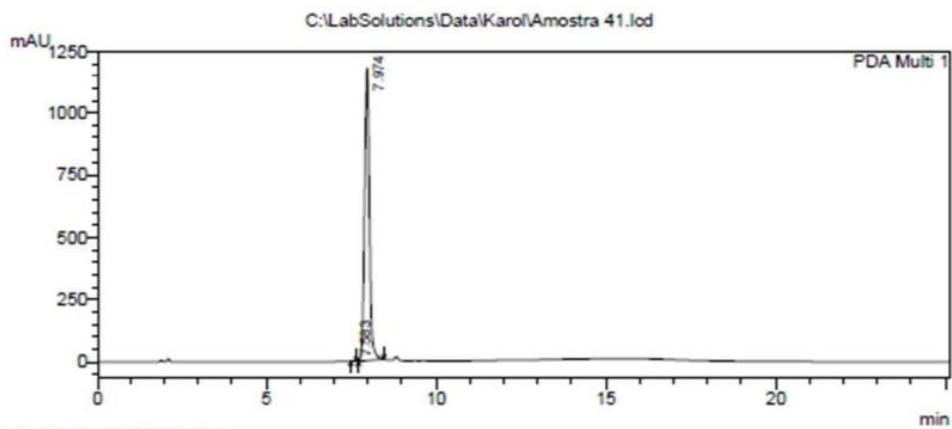
5/5/2022 14:32:54 1 / 1

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

C:\LabSolutions\Data\Karol\Amostra 41.lcd

Acquired by : Admin  
 Sample Name : Amostra 41  
 Sample ID :  
 Vial # : 2  
 Injection Volume : 20 uL  
 Data File Name : Amostra 41.lcd  
 Method File Name : ACN-H2O-0.1TFA-25min.lcm  
 Batch File Name : Acidos Hidroxâmicos\_2.lcb  
 Report File Name : Default.lcr  
 Data Acquired : 5/5/2022 12:01:35  
 Data Processed : 5/5/2022 14:32:29

## &lt;Chromatogram&gt;



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

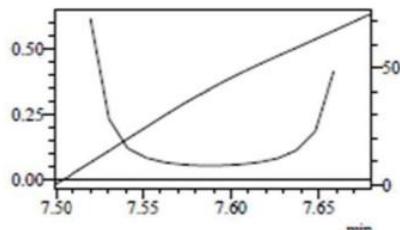
## PeakTable

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT7.583	7.583	14597	0.127
2	RT7.974	7.974	11515624	99.873
Total			11530221	100.000

## Purity

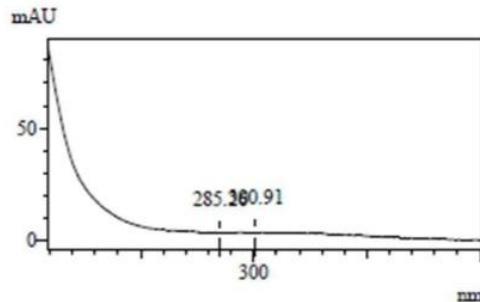
ID# : 1  
 Retention Time : 7.583  
 Compound Name : RT7.583



Impurity : Not Detected  
 Peak purity index : 1.000000  
 Single point threshold : 0.943574  
 Minimum peak purity index : 56425

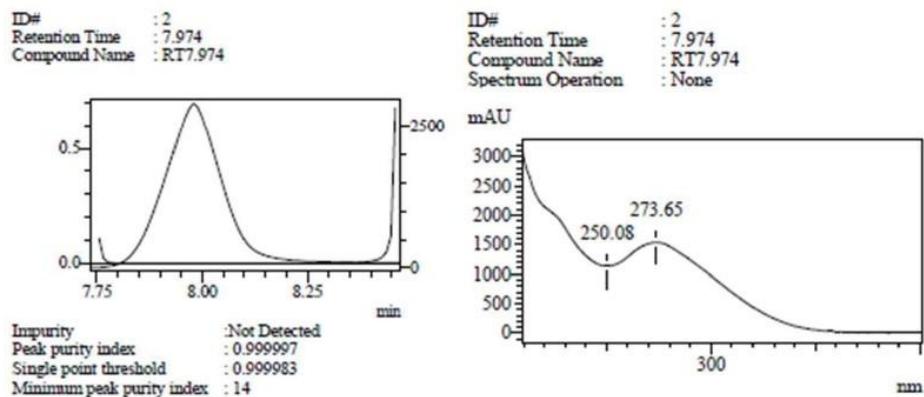
## Spectrum

ID# : 1  
 Retention Time : 7.583  
 Compound Name : RT7.583  
 Spectrum Operation : None



**Figura 88:** Corrida de HPLC do composto **4g**, página 2.

5/5/2022 14:32:54 2 / 2

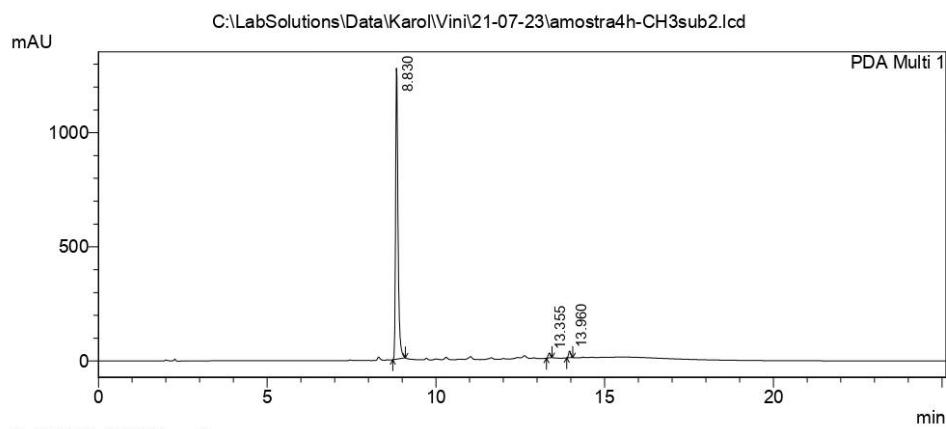


**Figura 89:** Corrida de HPLC do composto **4h**, página 1.

21/7/2023 15:57:13 1 / 2

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

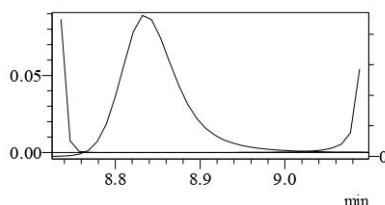
Acquired by : Admin  
 Sample Name : amostra4h-CH3sub2  
 Sample ID : amostra4h-CH3sub2  
 Vial # : 54  
 Injection Volume : 10 uL  
 Data File Name : amostra4h-CH3sub2.lcd  
 Method File Name : ACN-H2O-0.1TFA-25min.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : relat-Denise.lcr  
 Data Acquired : 21/7/2023 15:28:08  
 Data Processed : 21/7/2023 15:56:19

**<Chromatogram>****PeakTable**

PDA Ch1 254nm 4nm				
Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.830	8.830	6314208	96.483
2	RT13.355	13.355	91916	1.405
3	RT13.960	13.960	138245	2.112
Total			6544370	100.000

**Purity**

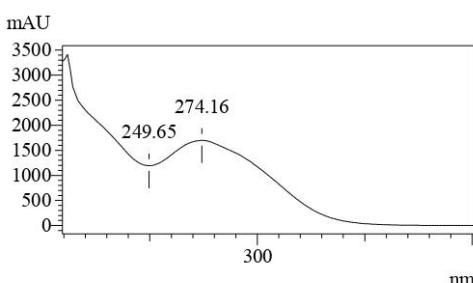
ID# : 1  
 Retention Time : 8.830  
 Compound Name : RT8.830



Impurity :Not Detected  
 Peak purity index : 0.999990  
 Single point threshold : 0.999984  
 Minimum peak purity index : 6

**Spectrum**

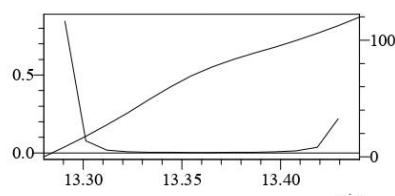
ID# : 1  
 Retention Time : 8.830  
 Compound Name : RT8.830  
 Spectrum Operation : None



**Figura 90:** Corrida de HPLC do composto **4h**, página 2.

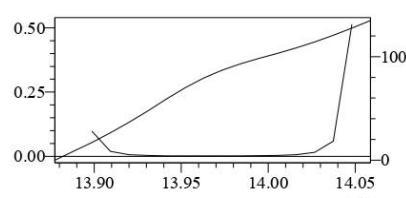
21/7/2023 15:57:13 2 / 2

ID# : 2  
 Retention Time : 13.355  
 Compound Name : RT13.355



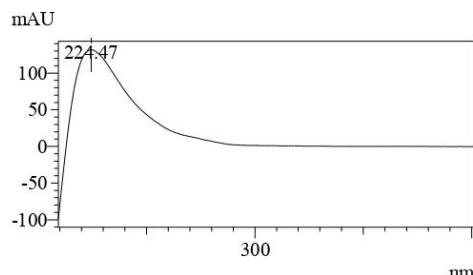
Impurity : Not Detected  
 Peak purity index : 1.000000  
 Single point threshold : 0.996778  
 Minimum peak purity index : 3222

ID# : 3  
 Retention Time : 13.960  
 Compound Name : RT13.960

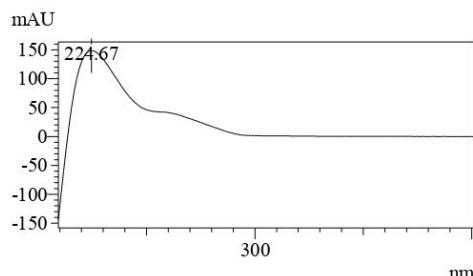


Impurity : Not Detected  
 Peak purity index : 0.999999  
 Single point threshold : 0.998437  
 Minimum peak purity index : 1562

ID# : 2  
 Retention Time : 13.355  
 Compound Name : RT13.355  
 Spectrum Operation : None

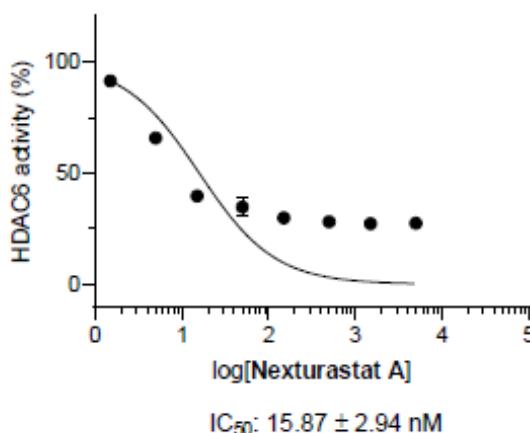
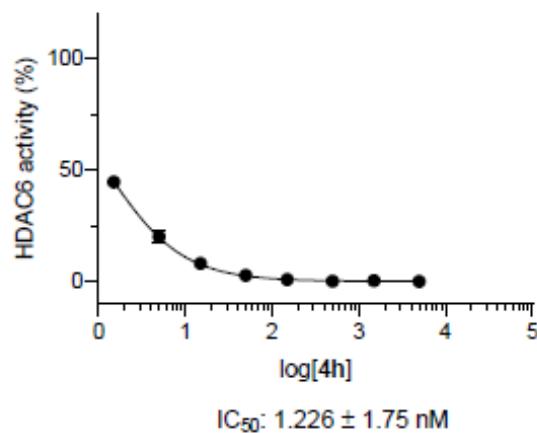
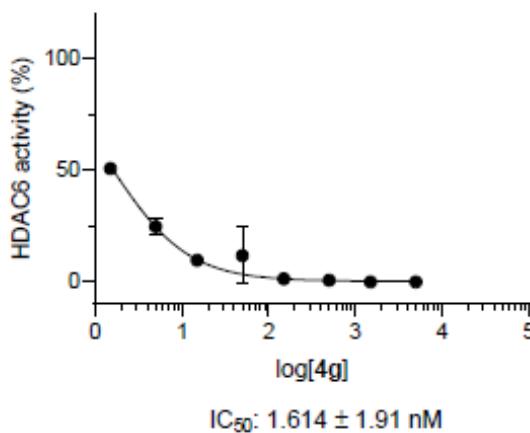
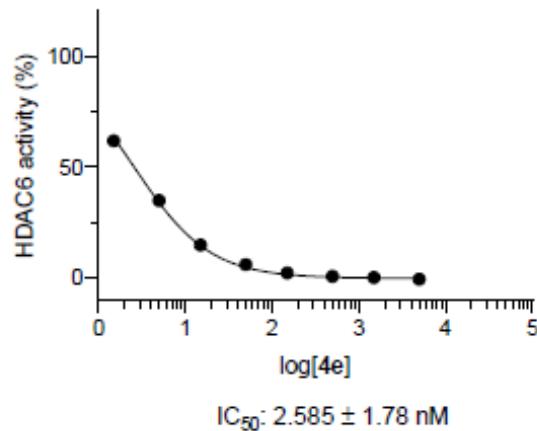
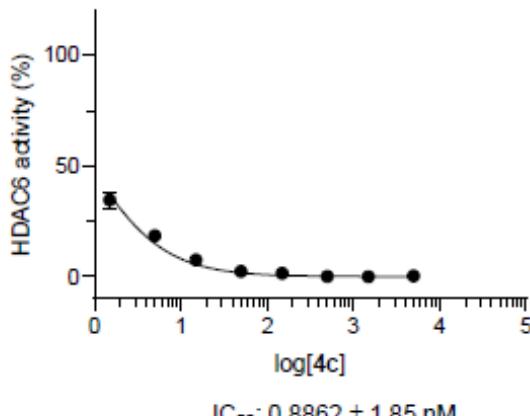


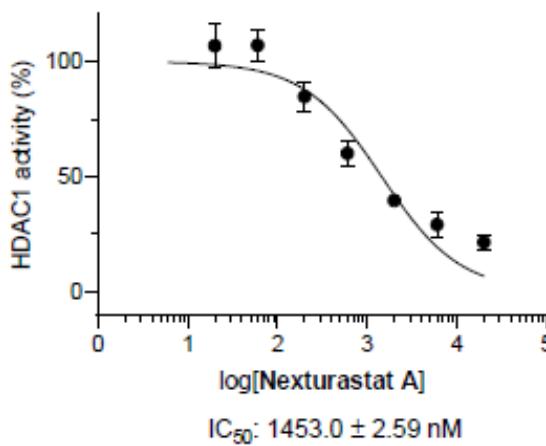
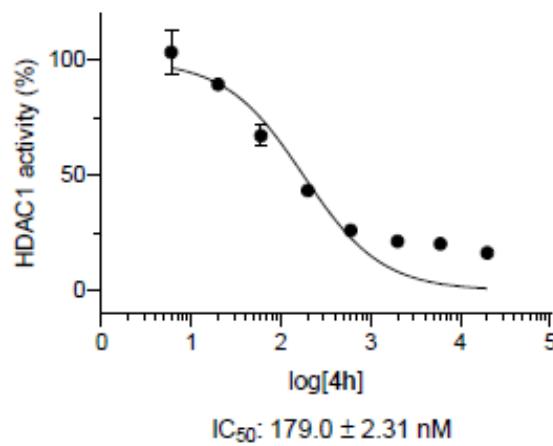
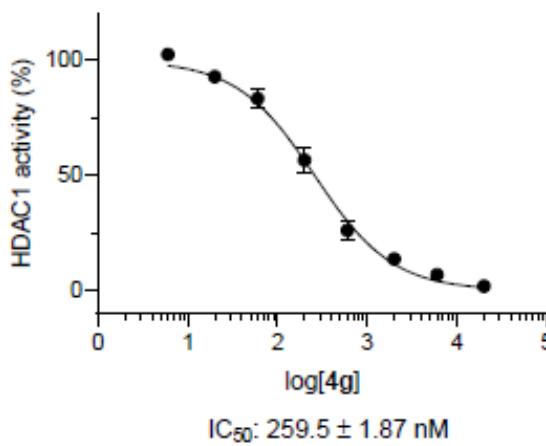
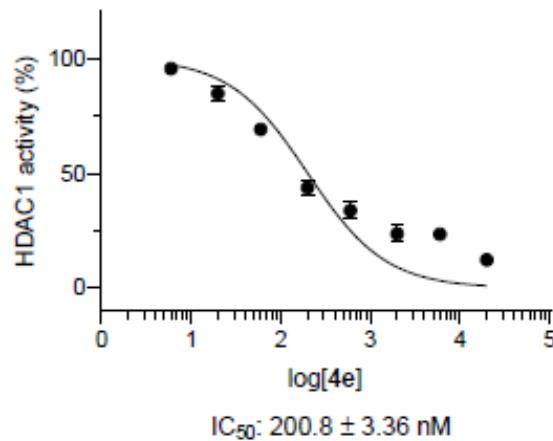
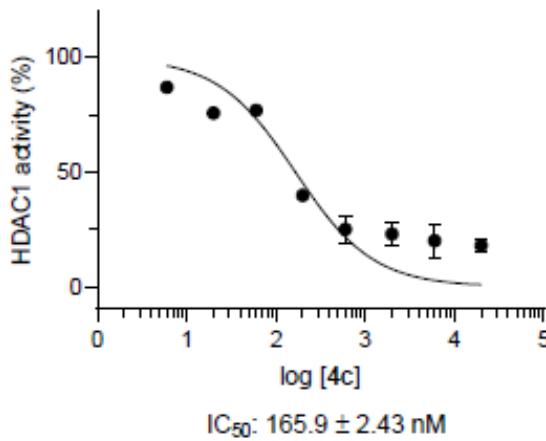
ID# : 3  
 Retention Time : 13.960  
 Compound Name : RT13.960  
 Spectrum Operation : None

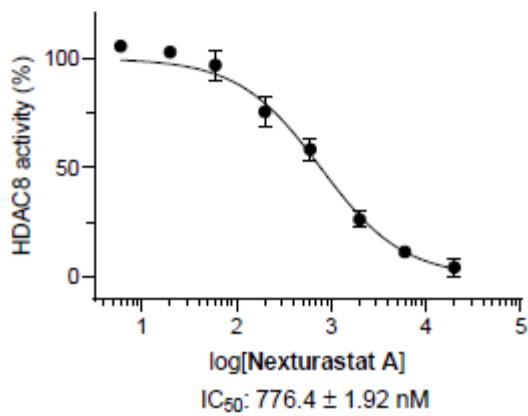
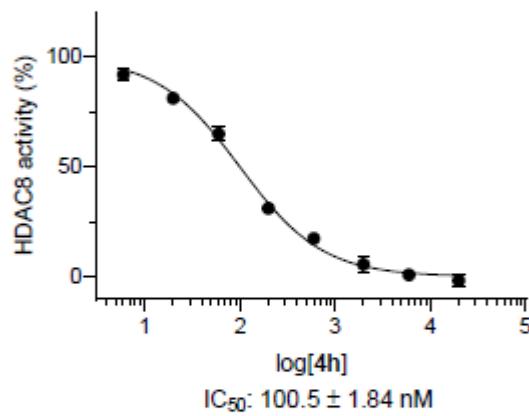
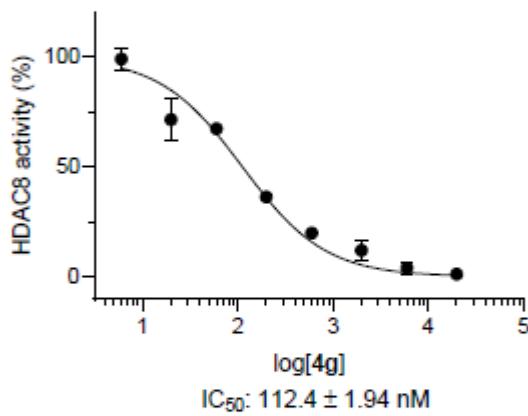
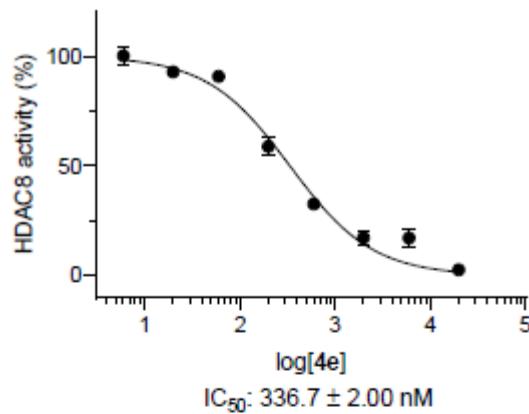
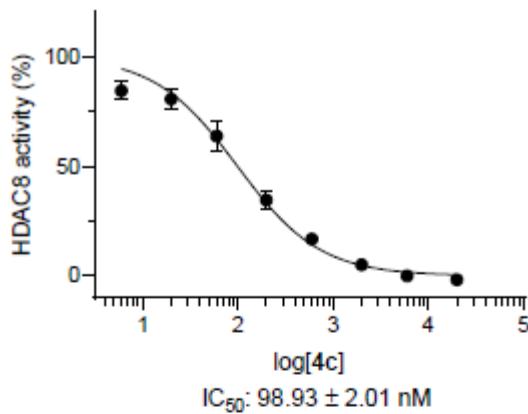


### 7.3 Resultados de inibição enzimática

**Figura 91 – Inibição da enzima HDAC 6.**



**Figura 92 – Inibição da enzima HDAC 1.**

**Figura 93 – Inibição da enzima HDAC 8.**

## 7.4 Participação em congressos

**Figura 94:** Certificado de apresentação de poster na 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.



**Figura 95:** Certificado de apresentação de poster na XXV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia



### XXV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

### CERTIFICADO

Certificamos que **VINÍCIUS ALBUQUERQUE MOREIRA DE SOUZA** apresentou o trabalho "**SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF HYBRID INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES**", de autoria de Vinícius Albuquerque Moreira de Souza, Karoline B. Waitman, Mônica F. Z. J. Toledo, Maurício T. Tavares e Roberto Parise Filho, em forma de Pôster, durante a XXV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 16 a 20 de outubro de 2023, com carga horária de 2 horas.

São Paulo, 20 de outubro de 2023.

Prof. Dr. Jarlei Fiamoncini  
Presidente da Comissão de Resumos e Trabalho Científicos

Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo  
Presidente da Comissão Organizadora

**Figura 96:** Apresentação do trabalho no 31º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo (SIICUSP)



**Declaração de Participação nº 1878**

Declaro para os devidos fins que **Vinicius Albuquerque Moreira de Souza** apresentou o trabalho **Síntese e avaliação biológica de inibidores híbridos com vistas ao tratamento de neoplasias hematológicas** na área de **Ciências da Saúde** no 31º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, sob a orientação de **Roberto Parise Filho**, com a colaboração de **Sandra Valeria Vassiliades e Karoline de Barros Waitman**, em 2023.



Documento emitido às 09:47:47 horas do dia 05/12/2023 (hora e data de Brasília).

Código de controle: **WXSE-KQYJ-54RW-MCWJ**

A autenticidade deste documento pode ser verificada na página da Universidade de São Paulo

<http://uspdigital.usp.br/webdoc>

## 7.5 Artigos publicados

**Figura 97** - Artigo publicado com parte dos dados obtidos por este projeto, página 1-102.  
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115935>

European Journal of Medicinal Chemistry 263 (2024) 115935



Contents lists available at ScienceDirect  
**European Journal of Medicinal Chemistry**  
 journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejmech](http://www.elsevier.com/locate/ejmech)

Research paper

**HDAC specificity and kinase off-targeting by purine-benzohydroxamate anti-hematological tumor agents**

Karoline B. Waitman <sup>a,1</sup>, Larissa C. de Almeida <sup>b,1</sup>, Marina C. Primi <sup>c,d</sup>, Jorge A.E.G. Carlos <sup>b</sup>, Claudia Ruiz <sup>e</sup>, Thales Kronenberger <sup>f,g,h,i</sup>, Stefan Laufer <sup>f,g</sup>, Marcia Ines Goettert <sup>f,g</sup>, Antti Poso <sup>f,g,h,i</sup>, Sandra V. Vassiliades <sup>a</sup>, Vinícius A.M. de Souza <sup>a</sup>, Mônica F.Z. J. Toledo <sup>a</sup>, Neuza M.A. Hassimotto <sup>j</sup>, Michael D. Cameron <sup>e</sup>, Thomas D. Bannister <sup>e</sup>, Letícia V. Costa-Lotufo <sup>b</sup>, João A. Machado-Neto <sup>b</sup>, Maurício T. Tavares <sup>c,d,\*,1</sup>, Roberto Parise-Filho <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil  
<sup>c</sup> Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, 02115, United States  
<sup>d</sup> Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA, 02115, United States  
<sup>e</sup> Department of Molecular Medicine, Herbert Wertheim UF Scripps Institute for Biomedical Innovation & Technology, Jupiter, FL, 33458, United States  
<sup>f</sup> Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Eberhard Karls Universität, Tuebingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076, Tuebingen, Germany  
<sup>g</sup> Tübingen Center for Academic Drug Discovery & Development (TüCAD<sub>D</sub>), 72076, Tübingen, Germany  
<sup>h</sup> School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland, P.O. Box 1627, FI-70211, Kuopio, Finland  
<sup>i</sup> Excellence Cluster "Controlling Microbes to Fight Infections" (CMFI), 72076, Tübingen, Germany  
<sup>j</sup> Food Research Center (FoRC-CEPID) and Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

---

**ARTICLE INFO**

Handling Editor: Dr. Z Liu

**Keywords:**  
 Anticancer compounds  
 HDAC inhibitors  
 Kinase inhibitors  
 Hematological tumors  
 Molecular dynamics  
 Hybrid inhibitors

**ABSTRACT**

A series of hybrid inhibitors, combining pharmacophores of known kinase inhibitors bearing anilino-purines (ruxolitinib, ibrutinib) and benzohydroxamate HDAC inhibitors (nexiturastat A), were generated in the present study. The compounds have been synthesized and tested against solid and hematological tumor cell lines. Compounds **4d-f** were the most promising in cytotoxicity assays ( $IC_{50} \leq 50$  nM) vs. hematological cells and displayed moderate activity in solid tumor models ( $EC_{50} = 9.3-21.7$   $\mu$ M). Compound **4d** potently inhibited multiple kinase targets of interest for anticancer effects, including JAK2, JAK3, HDAC1, and HDAC6. Molecular dynamics simulations showed that **4d** has stable interactions with HDAC and members of the JAK family, with differences in the hinge binding energy conferring selectivity for JAK3 and JAK2 over JAK1. The kinase inhibition profile of compounds **4d-f** allows selective cytotoxicity, with minimal effects on non-tumorigenic cells. Moreover, these compounds have favorable pharmacokinetic profiles, with high stability in human liver microsomes (e.g., see  $t_{1/2}$ : > 120 min for **4f**), low intrinsic clearance, and lack of significant inhibition of four major CYP450 isoforms.

### 1. Introduction

Cancer is the second leading death cause worldwide [1]. Further, studies project a steady growth in both incidence and patient mortality, with a projected cost of 25 trillion US dollars to world health care systems over the next thirty years [2]. In recent years oncology therapeutics

development, driven in part by the ease of tumor genetic profiling, has focused on identifying targeted inhibitors for tumorigenic proteins, which is reflected in such drugs often gaining FDA-approval [3]. An especially effective strategy for oncology therapy has been the development of selective inhibitors of kinases that promote tumor growth and that are selectively upregulated in cancer cells, proteins that drive

\* Corresponding author. Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

\*\* Corresponding author. Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, 02115, United States.

E-mail addresses: [mauricio\\_tavares@dfci.harvard.edu](mailto:mauricio_tavares@dfci.harvard.edu) (M.T. Tavares), [roberto.parise@usp.br](mailto:roberto.parise@usp.br) (R. Parise-Filho).

<sup>1</sup> K.W.; L.C.A.; and M.T.T. contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115935>

Received 19 September 2023; Received in revised form 25 October 2023; Accepted 3 November 2023

Available online 10 November 2023  
 0223-5234/© 2023 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Figura 98 - Artigo publicado com parte dos dados obtidos por este projeto.**DOI: <https://doi.org/10.1101/2024.11.30.626092>

**Dona Flor and her two husbands: Discovery of novel HDAC6/AKT2 inhibitors for myeloid cancer treatment**

Posted December 05, 2024.

Karoline B. Waitman, Holli-Joi Martin, Jorge A. E. G. Carlos, Rodolpho C. Braga, Vinícius A. M. Souza, Cleber C. Melo-Filho, Sebastian Hilscher, Mônica F. Z. J. Toledo, Mauricio T. Tavares, Letícia V. Costa-Lotufo, João A. Machado-Neto, Mike Schutkowski, Wolfgang Sippel, Thales Kronenberger, Vinícius M. Alves, Roberto Parise-Filho, Eugene N. Muratov

doi: <https://doi.org/10.1101/2024.11.30.626092>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?].

**Abstract**

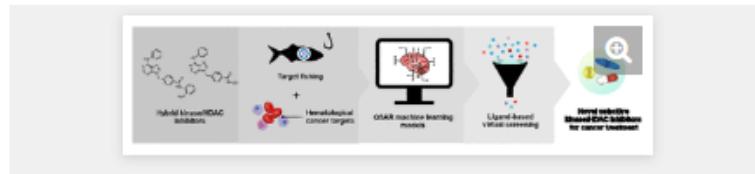
Full Text Info/History Metrics

[Preview PDF](#)

[Download PDF](#) [Email](#)  
[Print/Save Options](#) [Share](#)  
[Supplementary Material](#) [Citation Tools](#)  
[Data/Code](#) [Get QR code](#)

**Subject Area****Cancer Biology****Abstract**

Hematological cancer treatment with hybrid kinase/HDAC inhibitors is a novel strategy to overcome the challenge of acquired resistance to drugs. We collected IC<sub>50</sub> datasets from the ChEMBL database for 13 cancer cell lines (72 h cytotoxicity, measured by MTT), known inhibitors for 38 kinases, and 10 HDACs isoforms, that we identified by target fishing and literature review. The data was subjected to rigorous biological and chemical curation leaving the final datasets ranging from 76 to 8173 compounds depending on the target. We generated Random Forest classification models, whereby 14 showed greater than 80% predictability after 5-fold external cross-validation. We screened 30 hybrid kinase/HDAC inhibitor analogs through each of these models. Fragment-contribution maps were constructed to aid the understanding of SARs and the optimization of these compounds as selective kinase/HDAC inhibitors for cancer treatment. Among the predicted compounds, 9 representative hybrids were synthesized and subjected to biological evaluation to validate the models. We observed high hit rates after biological testing for the following models: K562 (62.5%), MV4-11 (75.0%), MM1S (100%), NB-4 (62.5%), U937 (75.0), and HDAC6 (86.0%). This aided the identification of **6b** and **6k** as potent anticancer inhibitors with IC<sub>50</sub> of 0.2–0.8 μM in three cancer cell lines, linked to HDAC6 inhibition below 2 nM, and blockade of AKT2 phosphorylation at 2 μM, validating the ability of our models to predict novel drug candidates.

**Highlights**

- Novel kinase/HDAC inhibitors for cancer treatment were found using machine learning
- 61 QSAR models for hematological cancers and its targets were built and validated
- K562, MV4-11, MM1S, NB-4, U937, and HDAC6 models had hit rates above 62.5% in tests
- **6b** and **6k** presented potent IC<sub>50</sub> of 0.2–0.8 μM in three cancer cell lines
- **6b** and **6k** inhibited HDAC6 below 2 nM, and blockade of AKT2 phosphorylation at 2 μM

**Competing Interest Statement**

E.N.M. is co-founder of Predictive, LLC., which develops novel alternative methodologies and software for toxicity prediction. All the other authors declare no conflicts.

**Reviews and Context**

- |                     |                      |
|---------------------|----------------------|
| 0 Comment           | 0 TRIP Peer Reviews  |
| 0 Community Reviews | 0 Automated Services |
| 0 Blogs/Media       | 0 Author Videos      |

**Subject Areas****All Articles**

- Animal Behavior and Cognition
- Biochemistry
- Biochemistry
- Bioengineering
- Bioinformatics
- Biophysics
- Cancer Biology
- Cell Biology
- Clinical Trials\*
- Developmental Biology
- Ecology
- Epidemiology\*
- Evolutionary Biology
- Genetics
- Genomics
- Immunology
- Microbiology
- Molecular Biology
- Neuroscience
- Paleontology
- Pathology
- Pharmacology and Toxicology
- Physiology
- Plant Biology

Documento assinado digitalmente



VINICIUS ALBUQUERQUE MOREIRA DE SOUZA  
Data: 05/05/2025 16:23:59-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Data e assinatura do aluno(a)

Documento assinado digitalmente



ROBERTO PARISE FILHO  
Data: 05/05/2025 19:45:40-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Data e assinatura do orientador(a)