

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

**Planejamento e síntese de híbrido molecular benzo-hidroxamato
aminoquinolínico com potencial ação antitumoral**

Matheus Ribeiro Rodrigues

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

Orientador: Roberto Parise Filho

São Paulo

2021

Agradecimentos

À minha família, em especial meus pais, por todo apoio durante os seis anos de curso e neste último semestre bastante atarefado. Não conseguiria chegar aonde cheguei sem todos os momentos de ajuda, de conselhos e de empatia. Essa conquista também é de vocês!

Ao Prof. Dr. Roberto Parise, pela orientação e incentivo durante esses anos. Todos os conhecimentos transmitidos em aulas, orientações e conselhos de amigo foram essenciais para concretizar esta etapa, e só demonstram o profissional extraordinário que você é.

À Dra. Mônica Zanini, consultora científica, professora e amiga que ensinou muito sobre química e sobre a vida. Sem seus conselhos e ensinamentos, nada disso seria possível.

Aos colegas de laboratório e pesquisadores, Vitor Navrauskas e Karinne Esteves, que tiveram tanta paciência em me ensinar sobre as técnicas e truques no dia a dia do laboratório.

Aos professores Dr. João Agostinho, Dra. Neuza Mariko e Dr. Hélio Alexandre por disponibilizarem seus equipamentos e conhecimentos para a realização de testes demonstrados neste trabalho.

Aos amigos que cultivei no âmbito acadêmico, em especial Allouett Sayuri, Victor Fushimi, Matheus Kenzo, Lucas Saori, Marcio Hideo e Vitor Marques. A faculdade ficou mais leve com vocês e com certeza levarei para a vida toda.

Aos amigos que cultivei no âmbito profissional, que permitiram o meu crescimento e facilitaram a difícil tarefa de conciliar trabalho e estudos.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e não foram citados.

Muito obrigado!

RODRIGUES, M. R. **Planejamento e síntese de híbrido molecular benzo-hidroxamato aminoquinolínico com potencial ação antitumoral.** 2021. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

RESUMO

A busca por moléculas antineoplásicas ainda faz parte de pesquisas acadêmicas e desenvolvimentos de indústrias farmacêuticas, seja identificando novos alvos moleculares ou aplicando técnicas de planejamento de fármacos que favoreça a descoberta de compostos mais potentes. Para aprofundar os conhecimentos nessa área e encontrar compostos mais eficazes, a estratégia de hibridação molecular foi proposta entre o grupo farmacofórico dos inibidores de histonas desacetilases e o núcleo quinolínico. O composto final MR11 foi sintetizado em duas etapas, em que a primeira envolveu a reação da 4,7-dicloroquinolina e o 4-aminobenzoato de metila em uma substituição nucleofílica aromática (rendimento de 66,0%), e a segunda envolveu a obtenção do fenil-hidroxamato a partir do éster intermediário (rendimento de 77,0%) e, ao final, o rendimento global foi de 51,0%. O composto MR11 foi caracterizado por RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, espectroscopia de infravermelho (IV), faixa de fusão e espectrometria de massas (MS), enquanto sua citotoxicidade foi avaliada, pelo método do MTT, em duas linhagens de tumores sólidos (MCF7 e HCT116) e quatro linhagens de leucemias (NB4, K562, Jurkat e Namalwa). Os valores de IC₅₀ que variaram de 2,7 a 14,8 μM . Os resultados obtidos demonstram atividade citotóxica do composto MR11, indicando sua maior especificidade para tumores leucêmicos em detrimento de tumores sólidos. Apesar de não apresentar potência superior aos fármacos vorinostate e doxorrubicina, utilizados como padrões, os resultados abrem novas possibilidades de estudos visando compreender a relação entre a estrutura e atividade do composto, bem como novas modificações moleculares para aumentar sua potência e seletividade em linhagens tumorais.

Palavras-chave: Neoplasias Hematológicas; Hibridação Molecular; Inibidor de HDAC; Benzo-hidroxamato.

RODRIGUES, M. R. **Design and Synthesis of Molecular Hybrid Benzo-Hydroxamate Aminoquinoline with Potential Antitumor Effect.** 2021. no. f. Undergraduate Thesis from Pharmacy-Biochemistry – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

ABSTRACT

The search for antineoplastics molecules still be a part of academic research and pharmaceutical industries developments, whether identifying new molecular targets or applying molecular design techniques to discover more potent compounds. To deepen the knowledge in this area and find more effective compounds, the molecular hybridization strategy was proposed between the pharmacophoric group of histones deacetylases inhibitors and the quinoline core. The final compound MR11 was synthetized in two steps, in which the first one involved the reaction of 4,7-dichloroquinoline and methyl-4-aminobenzoate in a nucleophilic aromatic substitution (yield of 66,0%), and the second one involved the obtainment of phenyl-hydroxamate from the intermediate ester (yield of 77,0%) and, at the end, the global yield was 51,0%. The compound MR11 was characterized by RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, infrared spectroscopy (IR), melting range and mass spectrometry, whilst their cytotoxicity was measured, by the MTT method, in two solid tumors lineages (MCF7 and HCT116) and four leukemias lineages (NB4, K562, Jurkat and Namalwa). The IC₅₀ values fluctuate from 2,7 to 14,8 μM . The obtained results show the cytotoxic activity of MR11 compound, indicating more specificity to leukemic tumors over solid tumors. Despite not having higher potency than the drugs vorinostat and doxorubicin, used as positive standards, the results open new possibilities of studies aiming to understand the structure-activity relationship of the compound as well as new molecular modifications to increase their potency and selectivity in tumoral lineages.

Palavras-chave: Hematologic Tumors, Molecular Hybridization, HDAC Inhibitor, Benzo-hydroxamate.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Farmacóforo dos inibidores de HDAC	4
Figura 2. Fármacos da classe dos Inibidores de HDAC e os respectivos farmacóforos.	4
Figura 3. Fármacos que possuem núcleo quinolínico em sua composição.	5
Figura 4. Planejamento da hibridação do composto MR11.	7
Figura 5. Ampliação do espectro RMN de H1 do composto MR10 (DMSO, 300 Hz)	16
Figura 6. Ampliação do espectro RMN de H1 do composto MR11 (DMSO, 300 Hz)	18
Figura 7. Atividade biológica do composto MR11 em comparação aos padrões doxorrubicina e vorinostate nas linhagens celulares previamente mencionadas.	19
Figura 8. Representação das moléculas MR11 e vorinostate.	21

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EtOH	Álcool Etílico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HDAC	Histona Deacetilase
HDACi	Inibidor de Histona Deacetilase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol--2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
SAHA	Vorinostate
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
ZBG	<i>Zinc Binding Group</i>

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
3. PLANEJAMENTO	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1. MATERIAIS	8
4.2. MÉTODOS SINTÉTICOS	8
4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	10
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	14
5.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS	14
5.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA	19
6. CONCLUSÕES	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
8. ANEXOS	27

1. INTRODUÇÃO

Caracterizado como uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo, o câncer é uma doença de caráter genético de difícil detecção e tratamento, ganhando protagonismo na busca por soluções deste problema. Segundo os dados de 2020 da Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (IARC), cerca de 19,3 milhões de casos foram notificados, enquanto cerca de 9,9 milhões de óbitos foram registrados no mesmo ano. Os tipos mais frequentes da doença são os cânceres de mama, pulmão e colorretal. O câncer de pele não melanoma não é citado nos tipos mais prevalentes por ser extremamente mais comum do que os outros tipos, diferindo do segundo mais incidente por um número bastante elevado de casos.^[1]

No Brasil, o panorama é bastante similar. Em números gerais, a IARC relatou a incidência de cerca de 592 mil casos novos, enquanto cerca de 260 mil óbitos foram relatados no ano de 2020. Os cânceres de próstata, mama e colorretal (excluindo-se o câncer de pele não melanoma) são os tipos mais frequentes da doença no país.^[2] Ao analisar esses números, fica clara a urgência de pesquisar e encontrar um tratamento para esta doença e suas variantes.

Diante desse cenário, diversos estudos tentam compreender quais são as causas e as bases moleculares da doença, permitindo avanços na busca por soluções. As literaturas mais recentes descrevem o câncer como uma desordem genética e epigenética, em que células do corpo humano passam por um acúmulo de mutações, ocasionando crescimento desordenado e excessivo. De maneira geral, as mutações genéticas inativam genes supressores de tumor, alteram genes que regulam o ciclo celular e ativam oncogenes, enquanto as alterações epigenéticas regulam a expressão de proteínas importantes para a homeostase celular.^[3]

Segundo Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg (2011)^[4], os processos de desenvolvimento de tumores malignos apresentam semelhanças entre si (independentemente do sítio anatômico em que foi desenvolvido), configurando as dez características marcantes (*Hallmarks*) de sua fisiopatologia:

1. Autossuficiência nos sinais de crescimento;
2. Insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento;
3. Evasão do sistema imune;
4. Potencial de crescimento ilimitado;
5. Inflamação promovida pelo tumor;
6. Angiogênese mantida;
7. Capacidade de invadir e metastatizar;
8. Instabilidade genômica e mutações;
9. Resistência à morte celular;
10. Desregulação energética das células.

Durante a formação de um tumor maligno, essas características marcantes podem ser geradas através de diversos caminhos, indicando que diferentes mutações e/ou alterações epigenéticas podem levar ao mesmo resultado. Justamente por isso, encontrar as vias envolvidas em cada tumor e propor um tratamento eficaz com poucos efeitos adversos é uma missão quase impossível.^[4]

Alterações genéticas e epigenéticas são bastante próximas, mas atuam em momentos diferentes do processo transcricional e traducional. Se um indivíduo sofre uma mutação diretamente no DNA, por exemplo, a transcrição em um RNA mensageiro e a produção da proteína codificada por aquele gene podem estar comprometidas. Se por outro lado a regulação da expressão gênica for alterada (processos como metilação e acetilação de DNA e modificações da cromatina), temos uma alteração epigenética que afeta a produção de determinadas proteínas, mas não necessariamente sua função.^[5,6]

Dentre as enzimas envolvidas na epigenética e relacionadas com a progressão do câncer, as Histonas Desacetilases (HDACs) tornaram-se alvos moleculares para o tratamento da doença desde 2006, quando o órgão *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro fármaco inibidor dessas proteínas, vorinostate. Até o momento, 18 proteínas HDACs foram caracterizadas, subdivididas em quatro famílias, e tendo como função basal realizar a reação de desacetilação das histonas nucleares e de outras proteínas disponíveis após o processo transcrecional.^[7]

As histonas são proteínas responsáveis pela condensação e afrouxamento do DNA, permitindo que determinadas informações sejam transcritas posteriormente em moléculas de RNA mensageiro, culminando na produção de uma proteína necessária ao funcionamento celular. Ao sofrer acetilação e desacetilação, as histonas levam à menor ou maior condensação do DNA, respectivamente, permitindo a exposição de regiões promotoras de transcrição.^[8,9]

Embora ainda seja um assunto amplamente estudado e discutido, as publicações até o momento verificaram que a superexpressão de HDACs faz com que certas regiões do DNA sejam desacetiladas e, com isso, determinados genes são menos expressos. Em outras palavras, a ação das HDACs dificulta a expressão de genes supressores de tumor, desacetilando sua região promotora para evitar sua transcrição e posterior tradução.^[10]

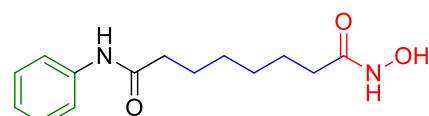
Ao confirmar os achados científicos, uma nova busca por moléculas inibidoras de HDACs tomou lugar na academia e na indústria, originando diversos fármacos disponíveis no mercado, como o anteriormente citado vorinostate, belinostate, panobinostate, givinostate e outros.^[11] Durante o desenvolvimento desses fármacos, a relação estrutura-atividade da classe foi estabelecida com a identificação de três regiões importantes, conforme figura 1:^[12]

- “Cap”, que possui a função de reconhecer a superfície e interagir com aminoácidos próximos ao sítio ativo;
- “Linker Domain”, que ocupa o canal da enzima e faz a ligação entre os dois outros grupos;
- “Zinc Binding Group” (ZBG), que interage com o sítio ativo e atua como quelante do íon zinco (Zn^{+2}), importante para a ação catalítica.

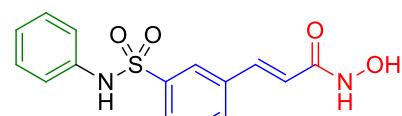


Figura 1. Farmacóforo dos inibidores de HDAC.

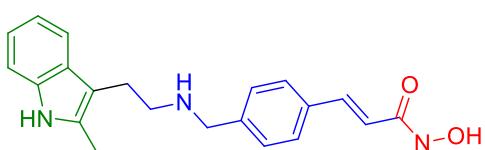
As moléculas que possuem os três grupos indicados e atuam como inibidores de HDAC são agrupadas de acordo com a região ZBG utilizada. Desta forma, existem os inibidores derivados de ácidos graxos de cadeia curta, baseados em amino-benzamida, depsipeptídeos, derivados de ácido hidroxâmico (popularmente conhecidos como hidroxamatos e constitui a maioria dos compostos, conforme figura 2) e outros grupos quelantes.^[13]



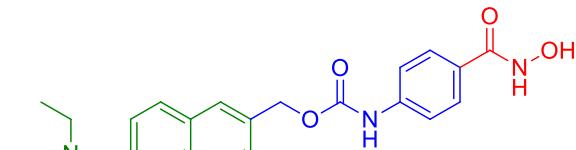
vorinostate



belinostate



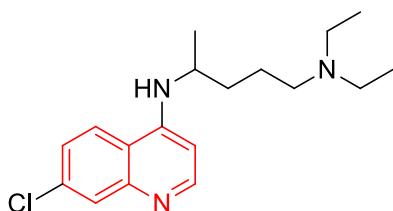
panobinostate



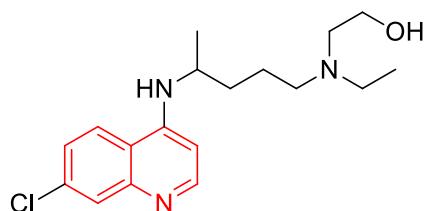
givinostate

Figura 2. Fármacos da classe dos Inibidores de HDAC e os respectivos farmacóforos.

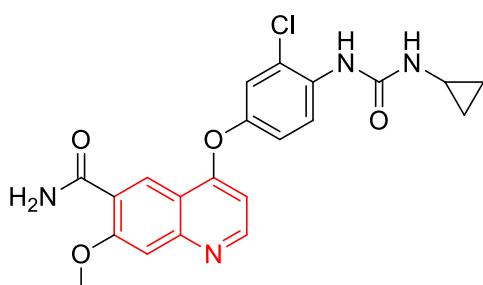
Além dos grupos químicos citados anteriormente, os compostos e fármacos utilizados como anticancerígenos possuem uma diversidade estrutural bastante rica. Outro exemplo é o grupo químico das quinolinas, que está presente na estrutura de fármacos como o lenvatinibe (inibidor de receptores de VEGF no combate ao câncer de tireoide) e topotecano (análogo de camptotecina e atuante em câncer cervical, de ovário e de pulmão).^[14]



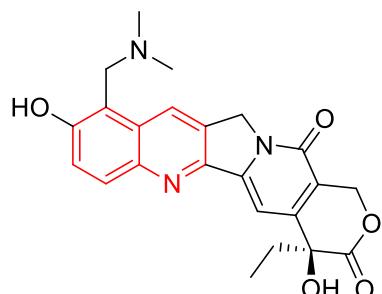
cloroquina



hidroxicloroquina



lenvatinib



topotecano

Figura 3. Fármacos que possuem núcleo quinolínico em sua composição.

Apesar de ser mais conhecido pelos fármacos antimarialários, a versatilidade do grupo quinolínico é bastante evidente, conforme figura 3. Até mesmo fármacos que estão presentes no mercado há muito tempo, como é o caso da cloroquina e seu derivado hidroxilado, hidroxicloroquina, continuam sob constante investigação e possível reposicionamento, inclusive como tratamento para o SARS-COV-2 (considerado ineficaz pela comunidade científica) ou como anticancerígenos.^[15,16]

A busca de novos fármacos, no entanto, não é dependente apenas da pesquisa biológica e da descoberta de alvos moleculares. A química farmacêutica e suas técnicas também evoluíram com o tempo, permitindo o desenvolvimento de

moléculas ainda mais complexas e específicas, possivelmente mais potentes para a questão abordada.

Uma dessas técnicas presente em diversas pesquisas é a de hibridação molecular, que consiste na união de dois fármacos ou grupos farmacofóricos em uma única molécula, buscando maior eficácia e afinidade do que os compostos de origem.^[16] O novo composto é chamado de híbrido e espera-se que apresente um dos efeitos positivos abaixo:^[17]

1. Sinergismo de ação farmacológica;
2. Dupla ação farmacológica;
3. Alteração de parâmetros secundários indesejados dos fármacos de origem.

Alguns fármacos utilizados na terapêutica foram planejados de acordo com a técnica de hibridação, como é o caso do fármaco ondansetron, em que os grupos farmacofóricos da cocaína e da serotonina foram utilizados como base para a formação de sua estrutura inicial.^[19] Além dos fármacos aprovados, as pesquisas de novas estruturas planejadas pela técnica de hibridação crescem cada vez mais, a exemplo de compostos originados da hibridação entre os grupos farmacofóricos da donezepila e dos inibidores de acetilcolinesterase para o tratamento de doenças neurodegenerativas.^[20] Os benefícios físico-químicos e biológicos de um planejamento por hibridação molecular atraem estudos para variadas patologias, objetivando a criação de um híbrido que tenha os efeitos positivos supracitados.

Em face do exposto até o momento, apesar do grande avanço nas pesquisas envolvendo compostos antineoplásicos, este ainda requer planejamento e síntese de novas moléculas eficazes nas bases moleculares que são descobertas com o avanço da ciência. Deste modo, o alvo deste trabalho foi o planejamento e síntese e avaliação biológica de um novo híbrido molecular com potencial antineoplásico.

2. OBJETIVOS

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo encontrar um composto passível de ser utilizado como quimioterápico. O composto foi planejado por hibridação molecular, objetivando o aumento de sua potência. Como objetivos específicos, temos:

- A. Planejar, por hibridação molecular, um composto que reúna informações químicas sobre inibidores de HDAC e núcleos quinolínicos;
- B. Sintetizar e caracterizar o híbrido proposto;
- C. Avaliar a citotoxicidade do composto sintetizado em linhagens de cânceres sólidos e hematológicos.

3. PLANEJAMENTO

A molécula final do presente trabalho foi planejada por hibridação molecular, unindo dois grupos farmacofóricos que já estão presentes em fármacos empregados atualmente na terapêutica desta patologia. O núcleo quinolínico, por exemplo, está presente em fármacos como lenvatinibe e topotecano, enquanto o grupo benzo-hidroxamato é amplamente utilizado nos inibidores de HDACs. A estrutura final pode ser vista mais detalhadamente na figura 4.

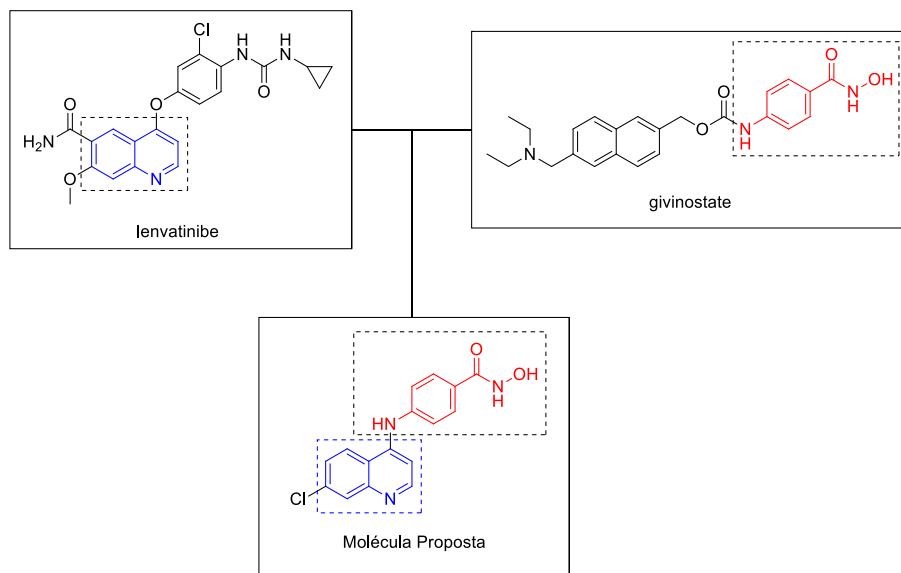


Figura 4. Planejamento da hibridação do composto MR11.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Além dos equipamentos, vidrarias e outros utensílios comuns de qualquer laboratório de síntese, os reagentes, solventes e outros químicos utilizados estão listados a seguir.

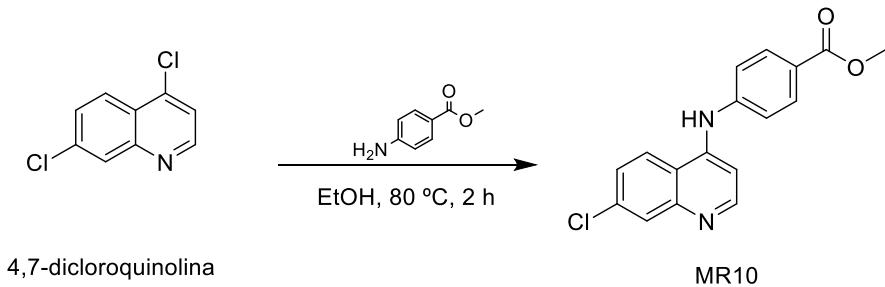
Reagentes:

- 4,7-dicloroquinolina (Oakwood Chemical);
- 4-aminobenzoato de metila (Sigma-Aldrich);
- Hidroxilamina (Solução de 50% em H₂O) (Sigma-Aldrich);
- Hidróxido de sódio (Synth);
- Ácido clorídrico (Synth).

Solventes:

- Etanol (Synth);
- Metanol (Synth);
- THF (Synth);
- Acetato de etila (Synth).

4.2. MÉTODOS SINTÉTICOS

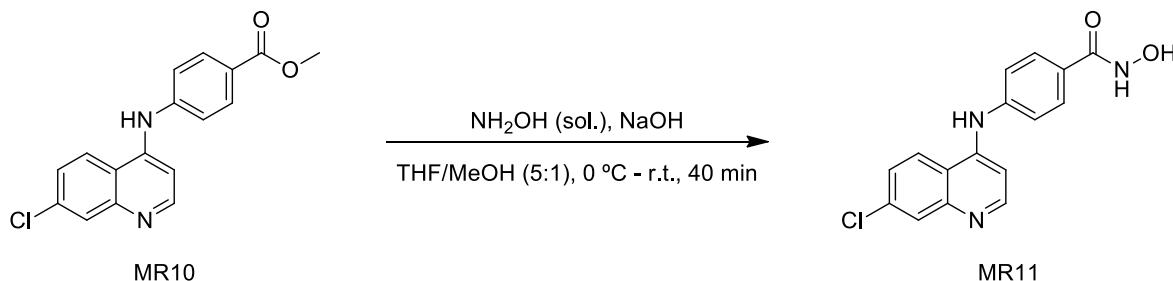


Esquema 1. Síntese do intermediário MR10

Em um balão de fundo redondo de 25 mL munido de agitação magnética e condensador de refluxo, adicionou-se EtOH (5 mL), 4,7-dicloroquinolina (1 mmol; 197 mg) e 4-aminobenzoato de metila (1 mmol; 93 mg). Após 2 horas sob refluxo a 80 °C, o sólido formado foi filtrado sob pressão reduzida.^[21] O sólido foi ressuspendido em acetato de etila e, subsequentemente, adicionou-se solução de carbonato de potássio até que o pH da solução estivesse entre 8 e 9. Posteriormente, foram feitas três extrações líquido-líquido entre a fase orgânica com a molécula solubilizada e água, finalizando com uma extração entre a fase orgânica e uma solução saturada de cloreto de sódio. Por fim, a fase orgânica foi rotaevaporada para a obtenção do produto intermediário MR10 como um sólido amarelo, em 66% (206,25 mg) de rendimento.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO-*d*6, δ = ppm): 3,83 (s, 3H), 7,23 (d, J = 5,28 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,28 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 9,03 Hz, 1H), 7,94 (d, J = 6,48 Hz, 3H), 8,37 (d, J = 9,03 Hz, 1H), 8,58 (d, J = 5,28 Hz, 1H), 9,39 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-*d*6, δ = ppm): 51,7, 104,8, 119,2 (2C), 119,2, 123,0, 124,6, 125,4, 127,7, 130,7 (2C), 134,1, 145,7 146,0, 149,5, 151,9, 165,7.



Para a segunda etapa da reação, a hidroxilamina (50 mmol; 1,40 mL) e o hidróxido de sódio (1 mmol; 40 mg), foram adicionados em um balão de fundo redondo de 25 mL e mantidos sob agitação em temperatura ambiente. Subsequentemente, adicionou-se gota a gota o intermediário MR10 previamente dissolvido em THF e metanol (5:1; 15 mL). Após 40 minutos, o sólido formado foi filtrado sob pressão reduzida e seco em bomba de vácuo, obtendo o composto final como um sólido amarelo, em 77% (242,18 mg) de rendimento.^[22]

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ = ppm): 7,12 (d, J = 5,22 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,10 Hz, 2H), 7,58 (d, J = 8,88 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 8,10 Hz, 2H), 7,93 (s, 1H), 8,40 (d, J = 9,06 Hz, 1H), 8,54 (d, J = 5,25 Hz, 1H), 9,06 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 11,13 (s, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ = ppm): 103,4, 118,8, 120,3 (2C), 124,5, 125,2, 127,0, 127,7, 128,2 (2C), 134,0, 143,3, 146,8, 149,6, 151,9, 163,8.

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3180, 2820, 2710, 2050, 1585, 1560, 1520, 1475, 1460, 1382, 1331, 1285, 1216, 1153, 1119, 1048, 974, 866, 836, 788, 735.

EMAR-ESI-TOF: m/z calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{Cl} + \text{H}^+$ 314,0698; encontrado 314,0690.

HPLC: tempo de retenção (8,46 minutos); pureza: 96,44%

Faixa de fusão: 172,5 °C a 173,5 °C

4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O acompanhamento das reações foi realizado por CCD, utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica GF254 (Merck). A revelação das placas foi feita por lâmpadas de ultravioleta (UV), iodo e solução de vanilina.

4.3.2. FAIXA DE FUSÃO

A faixa de fusão do produto final MR11 foi obtido em aparelho para determinação de faixa de fusão capilar, modelo M565, da marca Büchi, disponível no Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos Contra Doenças Negligenciadas (LAPEN) da FCF-USP.

4.3.3. ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C foram realizadas em espetrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, disponível na FCF-USP. Os deslocamentos químicos (δ) serão expressos em partes por milhão (ppm). Abreviações para denotar a multiplicidade de um sinal em particular são: s (singleto); d (dubleto); q (quarteto); quint (quinteto), sx (sexteto) e m (multipletos).

4.3.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

A determinação da pureza do composto sintetizado foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se o cromatógrafo Shimadzu Proeminence com coluna analítica Zorbax SB-Phenyl® (5μ , 150x4,6 mm), disponível na Central Analítica do Departamento de Farmácia da FCF-USP.

A amostra foi diluída em DMSO à concentração de 0,25 mg/mL e filtrada em filtro PVDF de 25 mm. O volume de injeção no cromatógrafo foi de 7 μL , utilizando-se como sistema eluente água deionizada e acetonitrila (ACN), ambos com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA), com fluxo de 1 mL por minuto. A corrida cromatográfica foi iniciada com 5% de ACN/TFA, elevando para 100% aos 10 minutos de corrida. Após 15 minutos, a concentração da mistura de ACN/TFA foi reduzida a 50%, decaindo pela metade aos 20 minutos e finalizando a corrida aos 25 minutos, com 0% da mistura referida.

4.3.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A determinação da estrutura do composto final também foi confirmada por espectrometria de massas, empregando-se um MicrOTOF QII/ESI-TOF da marca Bruker Daltonics®, e o cromatógrafo Prominence Liquid Chromatography da marca Shimadzu® acoplado a um espetrômetro de massa Q-TOF, modelo compacto da marca Bruker Daltonics GmbH® com interface de ionização por eletrospray, ambos disponíveis no laboratório da Prof.^a Dra. Neuza Mariko Aymoto.

O composto final foi dissolvido em DMSO e separado por CLAE utilizando a coluna Luna C18 (3 µm, 100 Å, 150×3 mm da marca Phenomenex®) e sistema eluente composto por 0,1% de ácido fórmico em água deionizada e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila, com fluxo determinado em 0,4 mL por minuto. O gradiente da corrida cromatográfica iniciou-se com 30% da solução de ácido fórmico em acetonitrila, aumentando para 100% entre os minutos 3 e 6 da corrida, retornando a 30% após os 6 minutos, finalizando-a aos 11 minutos. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL e a temperatura da coluna manteve-se em 40 °C durante todo o procedimento.

O equipamento Q-TOF/MS foi operado em modo positivo, utilizando a fonte de gás iônico (N2) a 200 °C, pressão de nebulizador a 45 psi e 2.800 Volts aplicados no capilar. O espectrômetro de massas foi operado no modo de Varredura MS, utilizando o formato de sódio como calibração de massa interna.

4.3.6. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A estrutura também foi confirmada por espectroscopia de infravermelho, empregando-se o infravermelho modelo Cary 630 FTIR da marca Agilent Technologies, disponível no laboratório do Prof.º Dr. Hélio Alexandre Stefani.

4.3.7. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade do composto sintetizado foi avaliada por meio de ensaio *in vitro* de MTT, em sextuplicata, a fim de se aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos. Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo e Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto, lotados no Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP).

As linhagens celulares de tumores sólidos (HCT116 e MCF7) foram plaqueadas com concentrações de 3×10^3 e 5×10^3 células por poço respectivamente, enquanto as linhagens de tumores leucêmicos (NB4, K562, Jurkat e Namalwa) foram plaqueadas com concentrações de 10^4 células por poço, todos em placas de 96 poços. Após 24 horas, o composto final e o vorinostate

(SAHA) foram adicionados em concentrações de 50 μM a 0,0032 μM , enquanto a doxorrubicina foi adicionada em concentrações de 10 μM a 0,00064 μM , todos incubados por 72 horas. Cada condição foi testada em três replicatas técnicas.

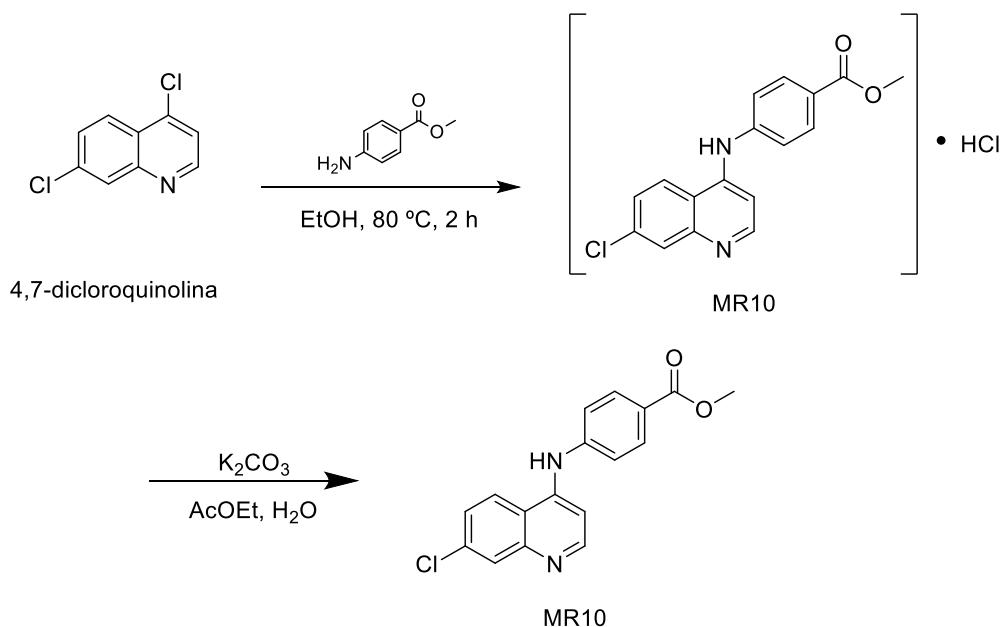
A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) diluído (1:200) como controle negativo. Ao final do tempo de incubação, 10 μL de MTT (5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e incubado por 3 horas. Subsequentemente, 100 μL de 0,1 N HCL Isopropanol foi adicionado e a absorbância foi mensurada à 570 nm conforme preconizado por Mosmann (1983).^[23] Os valores de concentração inibitória 50% (IC50) foram calculados por regressão não linear usando programa GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização do presente trabalho. Para melhor compreensão do texto e a título de facilitar a busca pelo leitor, esta seção encontra-se subdividida em: “Síntese dos Compostos” e “Atividade Biológica”.

5.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS

O composto intermediário MR10 foi sintetizado por meio da reação entre 4,7-dicloroquinolina e 4-aminobenzoato, resultando em um composto quinolínico substituído na posição 4. As condições reacionais foram baseadas na patente WO 2019/173482 A1^[21] e estão explicitadas no esquema 3.

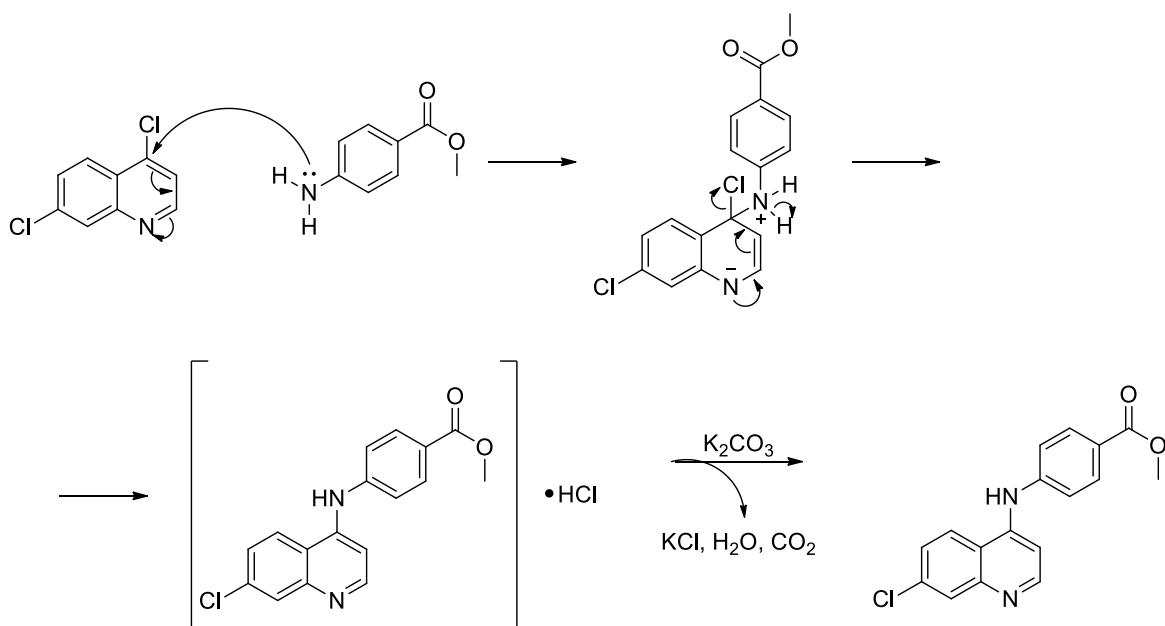


Esquema 3. Síntese do intermediário MR10.

O composto foi obtido na forma de sal (cloridrato), o que favoreceu sua precipitação como um sólido amarelo. Por ser pouco solúvel nos solventes orgânicos utilizados nas próximas etapas, o composto intermediário foi ressuspenso em acetato de etila e o meio alcalinizado, conforme descrito nos procedimentos sintéticos, permitindo a obtenção de sua forma molecular como um sólido amarelado. O rendimento obtido após a síntese e tratamento do composto foi de 66%, enquanto o rendimento indicado em literatura é de 79%.^[21] A diferença

de rendimentos pode ser explicada pelas extrações feitas com acetato de etila, água e carbonato de potássio, uma vez que esses procedimentos não são realizados na literatura referenciada.

Com relação ao mecanismo reacional desta primeira etapa, observa-se uma clássica substituição nucleofílica aromática, que só é possível nas posições 2 e 4 caso haja um grupo abandonador.^[24] Esse tipo de reação só é possível quando há um grupo retirador de elétrons e um grupo abandonador em *ortho* ou *para* em relação ao primeiro, representados pelo heteroátomo do anel quinolínico e pelo cloro, respectivamente (Esquema 4).^[25]



Esquema 4. Mecanismo proposto para a reação entre 4,7-dicloroquinolina e 4-aminobenzoato.

A obtenção do composto intermediário foi comprovada pelos espectros de RMN ¹H e ¹³C disponíveis nos anexos 1 e 2 deste trabalho. Ao analisar o espectro de RMN de ¹H, por exemplo, pode-se observar um singuleto em 3,83 ppm com área integrada de aproximadamente 3 hidrogênios, referentes aos hidrogênios da metila presente na função éster da molécula. Na região dos anéis aromáticos, é possível observar dois dupletos nas faixas de 7,41-7,44 ppm e 7,93-7,95 ppm com integração para dois e três hidrogênios, respectivamente, referentes aos hidrogênios aromáticos presentes no substituinte aminobenzoato, e com constantes de acoplamento de $J = 8,28$ Hz para o primeiro e $J = 6,48$ Hz para o

segundo. O dupletos que indica a presença de três hidrogênios (7,93-7,95 ppm) se sobreponem ao singleto correspondente ao hidrogênio do carbono 4 do anel quinolínico, conforme figura 5.

Ainda na região dos anéis aromáticos, é possível identificar os dupletos das faixas 7,22-7,24 ppm, 7,57-7,60 ppm, 8,35-8,38 ppm e 8,57-8,59 ppm, que correspondem aos carbonos das posições 8, 6, 1 e 9, com constante de acoplamento de $J = 5,28$ Hz, $J = 9,03$ Hz, $J = 9,03$ Hz e $J = 5,28$, respectivamente. Por fim, o singletido identificado em 9,39 ppm é referente ao hidrogênio da amina secundária presente na molécula.

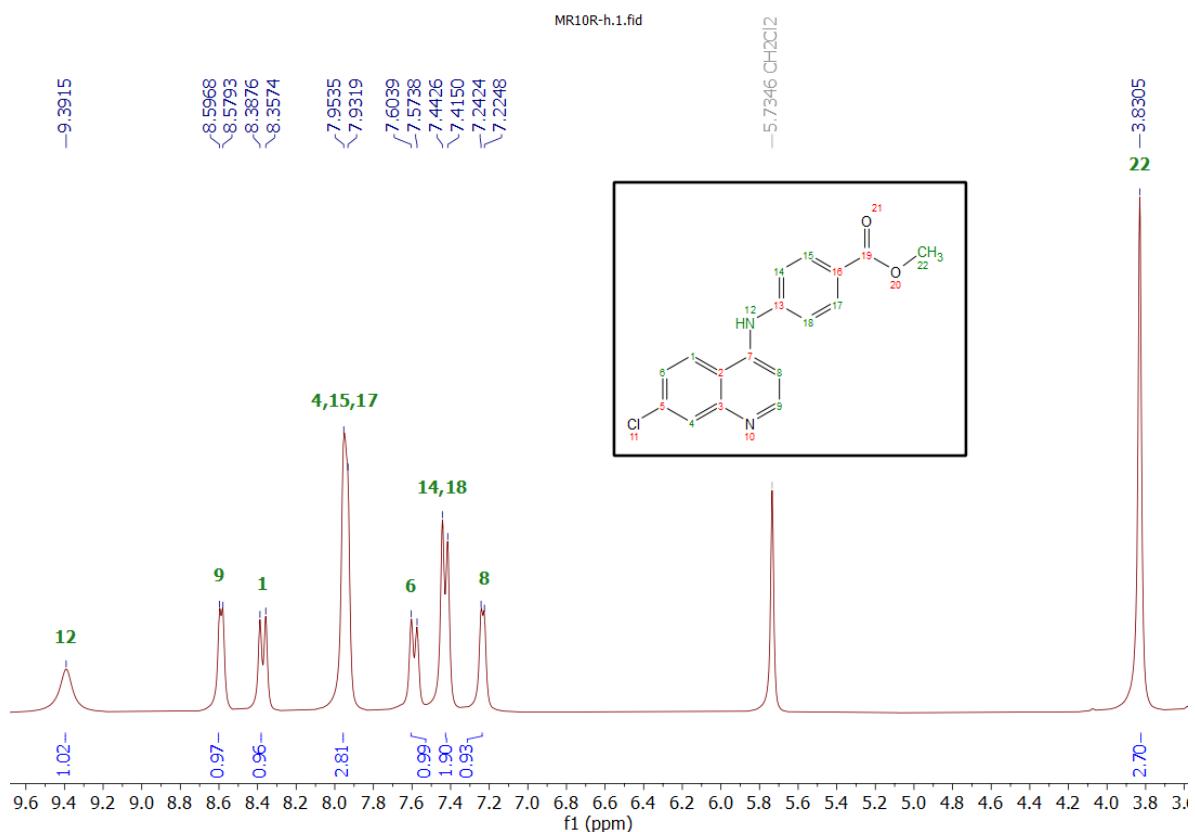
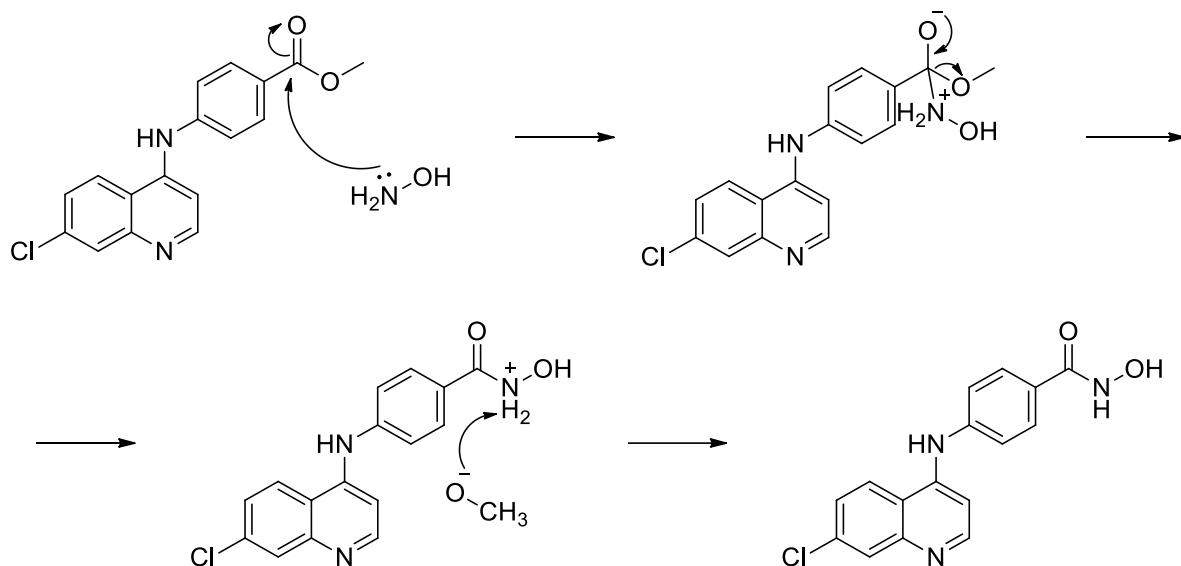


Figura 5. Ampliação do espectro RMN de ^1H do composto MR10 (DMSO- d_6 , 300 Hz)

Após confirmação da estrutura do MR10, iniciou-se a síntese do composto final MR11 empregando as condições reacionais propostas por Tavares e colaboradores.^[22] Desta forma, reagiu-se o intermediário MR10 com a hidroxilamina em meio básico, resultando na formação do ácido hidroxâmico correspondente. Ao final do processo, um sólido amarelado foi obtido com

rendimento de 77% e rendimento global de 51%. A literatura utilizada indica que os rendimentos desta etapa variaram de 70 a 95%, apresentando concordância com os resultados apresentados.^[22]

Na segunda etapa da reação, realizou-se uma aminólise do composto intermediário, formando o ácido hidroxâmico correspondente. A reação utiliza-se da reatividade de ésteres frente a aminas (Esquema 5).^[25]



Esquema 5. Mecanismo proposto para a obtenção do ácido hidroxâmico.

A obtenção do composto final também foi comprovada pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , disponíveis nos anexos 3 e 4 deste trabalho. Em comparação ao espectro do composto intermediário, espera-se que o espectro revele os sinais dos hidrogênios presentes no ácido hidroxâmico (hidroxila e amida), bem como não tenha nenhum sinal da metila do éster presente no composto intermediário.

Os dupletos identificados na região de 7,39-7,42 ppm e 7,79-7,82 ppm possuem área integrada equivalente a dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios presentes no anel benzênico da molécula, com constantes de acoplamento iguais a $J = 8,10$ Hz. Na região dos aromáticos, é possível identificar os dupletos nas regiões de 7,11-7,13 ppm, 7,56-7,59 ppm, 8,38-8,42 ppm e 8,53-8,55 ppm com constantes de acoplamento de $J = 5,22$ Hz, $J = 8,88$ Hz, $J = 9,06$ Hz e $J = 5,25$ Hz, que correspondem aos hidrogênios das posições 8, 6, 1 e 9,

respectivamente. Ainda nesta região, há um singlet em 7,93 ppm que corresponde ao hidrogênio da posição 4 da molécula demonstrada.

Por fim, os singletos identificados nas regiões de 9,06 ppm e 9,26 ppm correspondem aos hidrogênios das aminas presentes na molécula, enquanto o singleto identificado em 11,13 ppm corresponde ao hidrogênio da hidroxila.

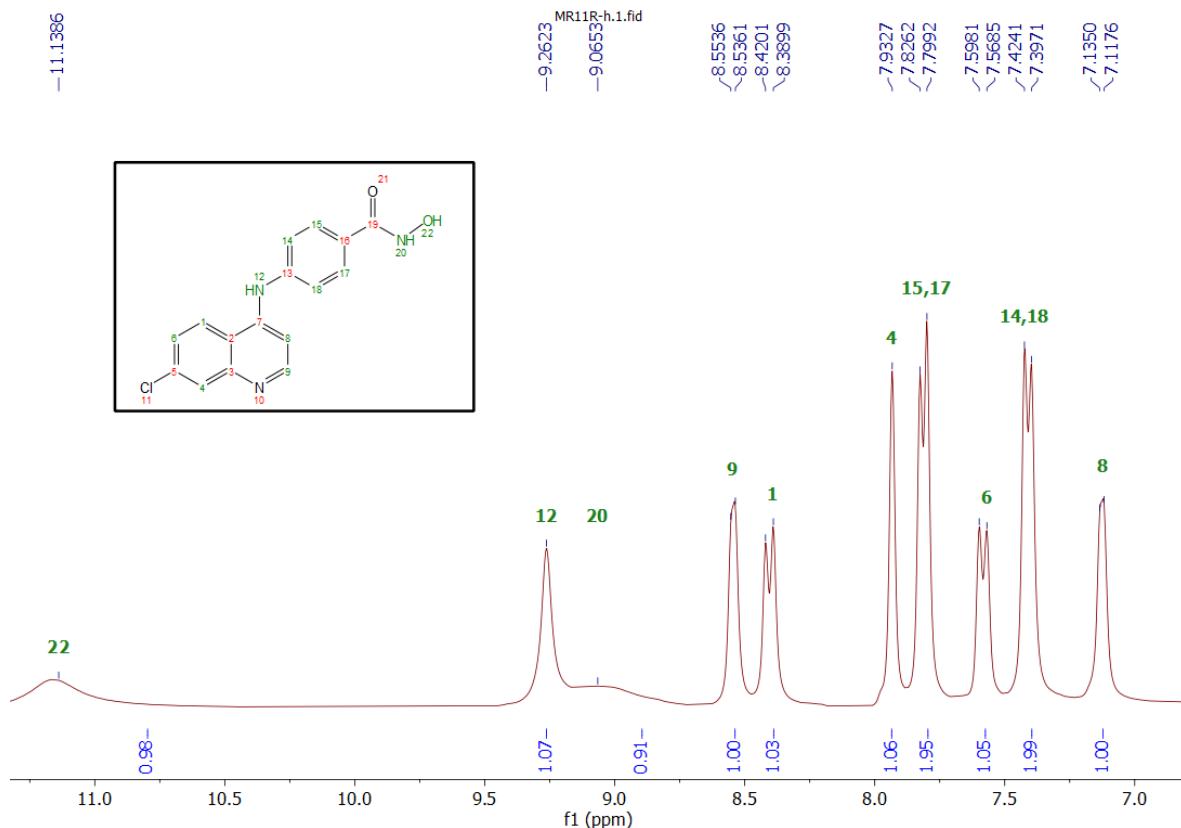


Figura 6. Ampliação do espectro RMN de ^1H do composto MR11 (DMSO- d_6 , 300 Hz)

A pureza do composto foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em que o composto de interesse foi identificado após 8,46 minutos de corrida, com área integrada que corresponde a 96,44% de todos os picos identificados. Outros cinco picos foram identificados nos minutos seguintes, com área integrada que corresponde a 3,56%. Esses dados são corroborados pela faixa de fusão estreita ($172,5\text{ }^\circ\text{C}$ a $173,5\text{ }^\circ\text{C}$), indicando sua provável pureza.

5.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DO COMPOSTO FINAL MR11

Após confirmação do sucesso obtido na síntese do composto e de sua pureza, a avaliação de atividade biológica pôde ser realizada. Conforme previamente descrito, o composto foi avaliado pelo método do MTT e comparado aos padrões vorinostate e doxorrubicina. A tabela e os gráficos a seguir demonstram os resultados obtidos:

Compostos	IC ₅₀ (μM)					
	MCF7	HCT116	NB4	K562	Jurkat	Namalwa
MR11	11,9	14,7	2,7	14,8	2,7	3,9
Vorinostate	5,9	3,5	0,6	1,5	0,6	0,7
Doxorrubicina	0,31	0,35	0,05	0,22	0,05	0,03

Tabela 1. Atividade biológica do composto MR11 e dos padrões vorinostate e doxorrubicina.

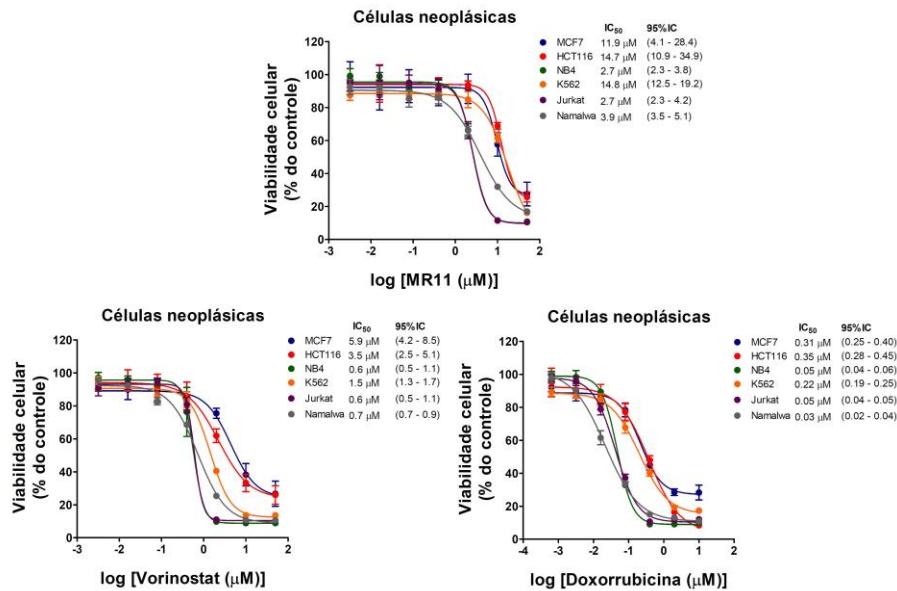


Figura 7. Atividade biológica (citotoxicidade) do composto MR11 em comparação aos padrões doxorrubicina e vorinostate.

O objetivo da avaliação pelo método do MTT é avaliar a viabilidade de células neoplásicas após tratamento com os compostos indicados, mensurando os valores de IC₅₀ para cada linhagem. Neste cenário, os valores obtidos pelo composto MR11 foram bastante promissores e confirmam sua ação citotóxica.

As linhagens testadas são específicas de determinados tipos de tumor, conforme informações obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC):

- MCF7 – Câncer de mama;
- HCT116 – Câncer de cólon;
- NB4 – Leucemia promielocítica aguda;
- K562 – Leucemia mieloide crônica;
- Jurkat – Linfoma agudo (Linfoblastos T);
- Namalwa – Linfoma de Burkitt (Linfócitos B).

Os menores valores de IC_{50} encontrados para o composto MR11 foram observados nas linhagens NB4, Jurkat e Namalwa, que correspondem a 2,7 μM , 2,7 μM e 3,9 μM , respectivamente. Essas linhagens podem ser classificadas em uma categoria mais abrangente de “Leucemias” que, segundo os dados do IARC de 2020, correspondem a cerca de 5% dos casos diagnosticados de câncer.^[2]

Os valores de IC_{50} observados nas linhagens MCF7, HCT116 e K562, por outro lado, mostraram-se ligeiramente superiores, com concentrações de 11,9 μM , 14,7 μM e 14,8 μM , respectivamente. Com isso, o composto MR11 revela-se ligeiramente menos potente nestas três linhagens, mas ainda pode ser considerado como um composto promissor para futuras investigações dada sua ação citotóxica eficaz.

Diante do exposto, o composto MR11 mostra-se mais seletivo a tumores leucêmicos em relação a tumores sólidos, explicitados através da razão entre os valores de IC_{50} de duas linhagens diferentes, conceito definido como especificidade tumoral (ES). A tabela 2 a seguir mostra os valores de especificidade de cada linhagem leucêmica frente a linhagens sólidas.

Linhagens	Especificidade Tumoral		
	NB4	Jurkat	Namalwa
MCF7	4,41	4,41	3,05
HCT116	5,44	5,44	3,77

Tabela 2. Especificidade tumoral do composto MR11 entre linhagens leucêmicas e sólidas.

Um dos fármacos utilizados como padrão positivo, a doxorrubicina, apresentou valores de IC₅₀ menores do que o composto MR11, indicando maior potência nas linhagens testadas. Essa diferença pode ser justificada pelas diferenças encontradas no mecanismo de ação dos compostos, uma vez que a doxorrubicina atua ao ligar-se diretamente às fitas de DNA e, consequente, impedir a divisão celular, enquanto o composto MR11 foi planejado para que atue como um inibidor de histona deacetilases (HDACi).^[26]

Os valores de IC₅₀ do fármaco doxorrubicina obtidos neste trabalho também condizem em ordem de grandeza com outros trabalhos similares. Os procedimentos aplicados não foram exatamente os mesmos e, por isso, variações podem ser observadas.^[22]

Em comparação ao fármaco vorinostate, também utilizado como padrão positivo no teste de citotoxicidade, os valores de IC₅₀ apresentam-se maiores do que os observados no padrão. O composto MR11 foi planejado para que tenha um mecanismo de ação de inibição das histonas deacetilases, mesmo mecanismo apresentado pelo fármaco vorinostate. Os fármacos desta classe possuem uma estrutura farmacofórica bem definida, conforme abordado em tópicos anteriores, dividida em três regiões e que permitem sua atuação como quelante do íon zinco no sítio catalítico das enzimas HDAC. Neste sentido, as regiões *Cap* e *Linker* dessas moléculas permitem mudanças estruturais para alterar suas propriedades físico-químicas e farmacodinâmicas.^[12] A imagem a seguir mostra uma comparação entre as duas moléculas.

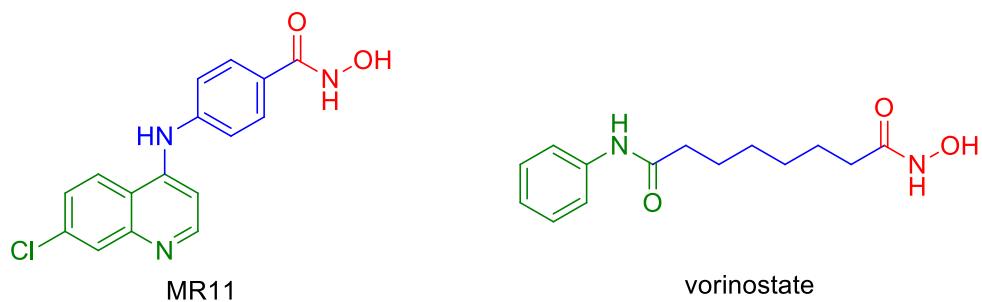


Figura 8. Representação das moléculas MR11 e vorinostate.

Ao analisar ambas as estruturas, conforme figura 8, é possível ver que tanto o fármaco vorinostate quanto o composto MR11 compartilham da mesma região ZBG, indicando possível similaridade em seu mecanismo de ação.

Por outro lado, a região *Cap* de compostos inibidores de HDACs possui caráter hidrofóbico bastante característico, comumente representada por grupos aromáticos ou poliaromáticos.^[27] Neste contexto, o fármaco vorinostate e o composto MR11 possuem grupos funcionais diferentes nesta região, representados por um anel benzênico e um anel quinolínico substituído nas posições 4 e 7, respectivamente. As diferenças estruturais observadas podem resultar em diferentes interações nas regiões próximas ao sítio catalítico, o que pode levar a diferentes potências frente às linhagens tumorais estudadas.

Por fim, a região *Linker* desta classe de compostos é bastante diversa, com moléculas que apresentam cadeias carbônicas alifáticas ou anéis aromáticos como responsáveis por esta função. É conhecido, no entanto, que essas cadeias devem apresentar um tamanho que permita o alcance da região ZBG ao sítio catalítico (aproximadamente 10 angstrons) e possua característica hidrofóbica.^[28]

O composto MR11 e o fármaco vorinostate também apresentam diferenças estruturais claras na região *Linker*, representadas por uma anilina e uma cadeia alifática, respectivamente. Apesar de ambos possuírem características hidrofóbicas, o comprimento e a flexibilidade dessas regiões são distintos para cada molécula, gerando possíveis diferenças na interação com o túnel hidrofóbico anterior ao sítio catalítico e, consequentemente, diferentes potências de inibição nas proteínas de interesse.

De maneira geral, os resultados obtidos no teste citotóxico são excelentes para o primeiro composto planejado nestes moldes. Futuras investigações podem ser aplicadas para entender o mecanismo de ação da molécula e os pontos estruturais que podem ser melhorados para aumentar sua seletividade e potência na inibição de proliferação tumoral.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou os passos para o planejamento, síntese e avaliação citotóxica de um híbrido molecular com potencial atividade antitumoral. O composto final MR11 foi obtido após uma reação de duas etapas, com a formação do intermediário MR10.

As reações aplicadas foram simples de serem executadas e com reagentes disponíveis para compra, o que permite sua execução em maiores escalas de produção, por exemplo. A purificação dos compostos também se mostrou relativamente simples, uma vez que tanto o intermediário quanto o composto final foram obtidos por precipitação e posterior filtração, dispensando o uso de técnicas mais complexas e custosas, como a cromatografia de coluna.

Os rendimentos obtidos nas reações foram de moderado a bom, sendo de 66% para a primeira etapa e de 77% para a segunda etapa, resultando em um rendimento global de 51%. Este aspecto, no entanto, pode ser melhorado com a mudança de algumas características das reações em futuros estudos com os mesmos compostos.

O composto final MR11 apresentou resultados bastante promissores em seus testes de atividade citotóxica, alcançando valores de IC₅₀ que variam de 2,7 a 14,8 µM. Por ser o primeiro composto obtido por meio da hibridação proposta, ainda há a possibilidade de realizar modificações moleculares para torná-lo mais potente e seletivo conforme as descobertas explicitadas neste trabalho.

Por fim, os resultados deste trabalho permitem a busca por mais respostas com relação ao composto e sua atividade, como:

- Entender a relação entre sua estrutura e atividade;
- Avaliar sua seletividade entre células tumorais e não-tumorais;
- Melhorar sua seletividade e potência através de modificações moleculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

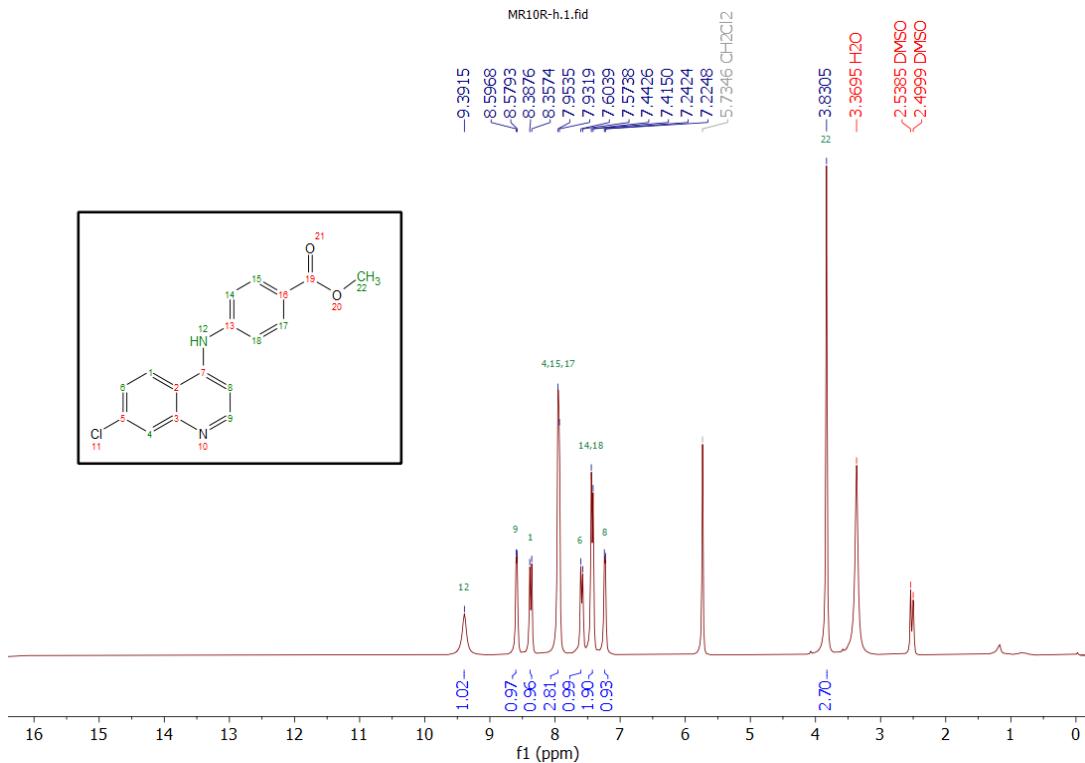
- [1] International Agency for Research on Cancer. ***The Global Cancer Observatory - Cancer Today***. Ficha Informativa - Mundo. Disponível em: encurtador.com.br/xyzES. Acesso em Março de 2021.
- [2] International Agency for Research on Cancer. ***The Global Cancer Observatory - Cancer Today***. Ficha Informativa - Brasil. Disponível em: encurtador.com.br/mxN12. Acesso em Março de 2021.
- [3] KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. ***Robbins & Cotran - Bases Patológicas das Doenças***. 8^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Capítulo 7 - p. 259 - 330.
- [4] HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. ***Cell***. Vol. 144, p. 646 - 674. Mar, 2011.
- [5] KANWAL, R.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Cancer Epigenetics: An Introduction. ***Methods in Molecular Biology***. Vol. 1238. 2015.
- [6] DAWSON, M.A.; KOUZARIDES, T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. ***Cell***. Vol. 150, p. 12 - 27. Jul, 2012.
- [7] WITT, O.; DEUBZER, E.; MILDE, T.; OEHME, I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? ***Cancer Letters***. Vol. 277, p. 8 - 21. Ago, 2008.
- [8] STRAHL, B.D.; ALLIS, C.D. The language of covalent histone modifications. ***Nature***. Vol. 403, p. 41 - 45. Jan, 2000.
- [9] WILLIAMSON, W.D.; PINTO, I. Histones and genome integrity. ***Frontiers in Bioscience***. Vol. 17, p. 984 - 995. Jan, 2012.
- [10] ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. ***Molecular Oncology***. Vol. 1, p. 19 - 25. Mar, 2007.
- [11] MCCLURE, J.J.; LI, X.; CHOU, J. Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. ***Advances in Cancer Research***. Vol. 138, p. 183 - 211. 2018.
- [12] PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Histone Deacetylase Inhibitors (HDACIs). Structure-Activity Relationships: History and New QSAR Perspectives. ***Medicinal Research Reviews***. Vol. 32, n. 1, p. 1 - 165. 2012.
- [13] OLZSCHA, H.; BEKHEET, M.E.; SHEIKH, S.; THANGUE, N.B.L. HDAC Inhibitors. ***Methods in Molecular Biology***. Vol. 1436, p. 281 - 303. Maio, 2018.

- [14] SYED, M. A. H. Therapeutic significance of quinolines: a patent review (2013-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Jul, 2016.
- [15] SOLOMON, V.R.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 625, p. 220 - 233. Out, 2009.
- [16] KASHOUR, Z.; RIAZ, M.; GARBATI, M. A.; ALDOSARY, O.; TLAYJEH, H.; GERBERI, D.; MURAD, M. H.; SOHIAL, M. R.; KASHOUR, T.; TLEYJEH, I. M. Efficacy of chloroquine or hydroxychloroquine in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 76, p. 30 – 42. Jan, 2021.
- [17] ARAÚJO, C.R.M.; FILHO, C.A.L.; SANTOS, V.L.A.; MARIA, G.L.A.; GONSALVES, A.A. Desenvolvimento de fármacos por Hibridação Molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. *Química Nova*. Vol. 38, No. 6, p. 868-873. Mar, 2015.
- [18] NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P.M.S.; DHAR, K.L. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 277, p. 422 - 487. Mar, 2014.
- [19] BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*. 2^a Edição. Porto Alegre: Artmed, 2008. Cap. 7, p. 344 – 387.
- [20] GONTIJO, V. S.; VIEGAS, F. P. D.; ORTIZ, C. J. C.; SILVA, M. F.; DAMASIO, C. M.; ROSA, M. C.; CAMPOS, T. G.; COUTO, D. S.; DIAS, K. S. T.; VIEGAS, C. Molecular Hybridization as a Tool in the Design of Multi-target Directed Drug Candidates for Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*. Vol. 18, p. 348 – 407. 2020.
- [21] SMITH, L. H.; MALONEY, P.; MCANALLY, D.; HERSHBERGER, P.; SESSIONS, H.; PEDDIBHOTLA, S. **4-Aminoquinoline Compounds for the Treatment of Angiogenesis**. Depositante: Snford Burnhem Prebys Medical Discovery Institute. US n° WO 2019/173482 A1. Depósito: 06 de Março de 2019. Concessão: 12 de Setembro de 2019.
- [22] TAVARES, M.T.; ALMEIDA, L.C.; KRONENBERGER, T.; FERREIRA, G.M.; DIVITIIS, T.F.; TOLEDO, M.F.Z.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; MACHADO-NETO, J.A.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PARISE-FILHO, R. Structure-activity relationship and mechanistic studies for a series of cinnamyl hydroxamate histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 35. Fev, 2021.

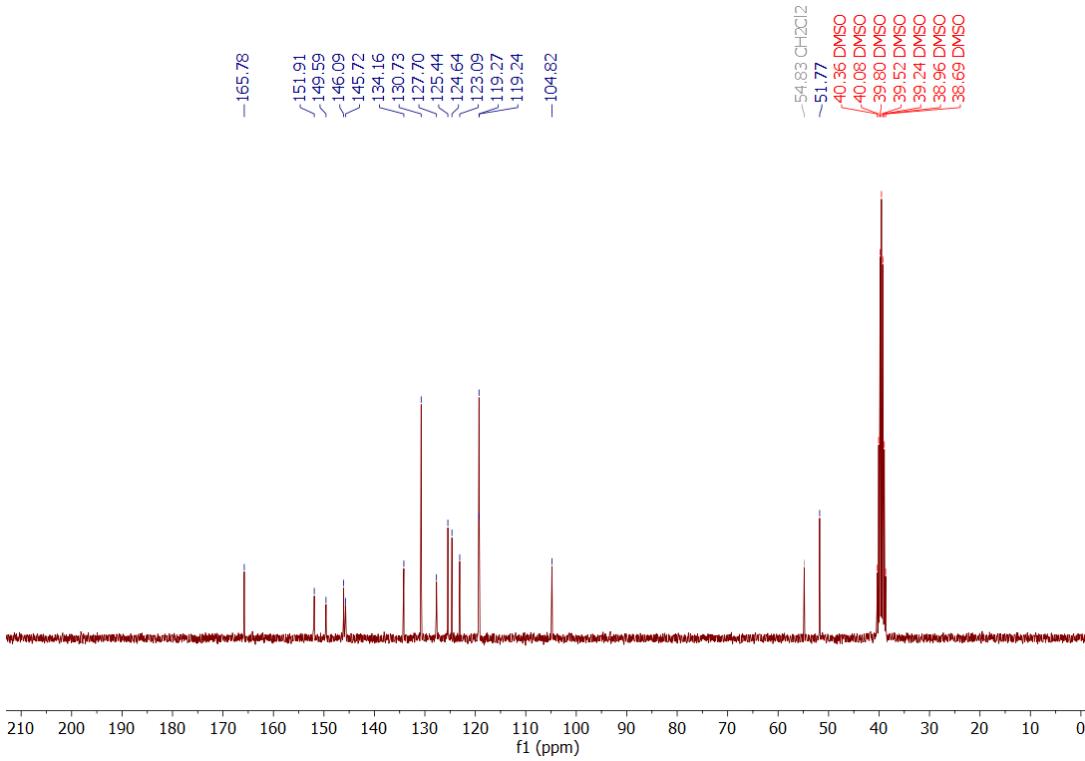
- [23] MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Method*. Vol. 65, p. 55 - 63. 1983.
- [24] ALAJARÍN, R.; BURGOS, C. Six-Membered Heterocycles: Quinoline and Isoquinoline. *Modern Heterocyclic Chemistry*. Cap. 17, p. 1527 – 1629.
- [25] BRUICE, P. Y. *Química Orgânica – Volume 2*. 4^a Edição. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. Cap. 16 - 17, p. 31 – 143.
- [26] CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P. J.; SANTOS, M. S.; MOREIRA, P. I. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 16, p. 3267 – 3285. 2009.
- [27] BERTRAND, P. Inside HDAC with HDAC inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 45, p. 2095 – 2116. 2010.
- [28] ATADJA, P.W. HDAC Inhibitors and Cancer Therapy. *Epigenetics and Disease – Pharmaceutical Opportunities*. Cap. 9, p. 175 – 196.

8. ANEXOS

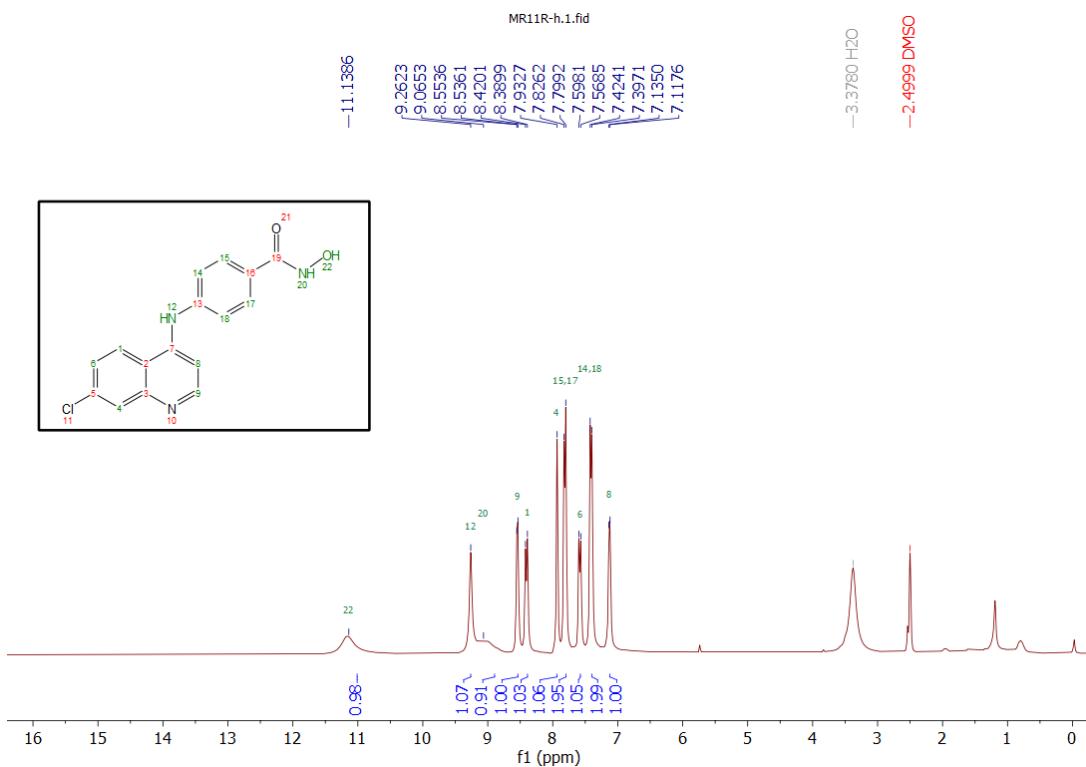
Anexo 1 – Espectro RMN ^1H do composto intermediário



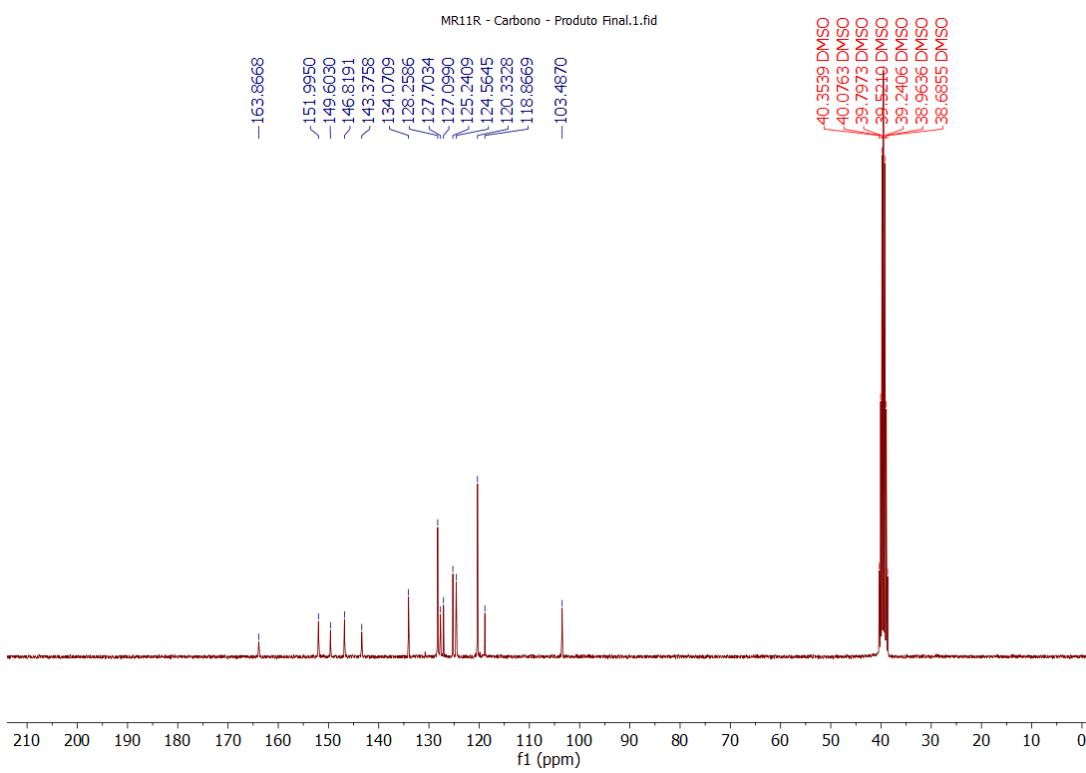
Anexo 2 – Espectro RMN ^{13}C do composto intermediário



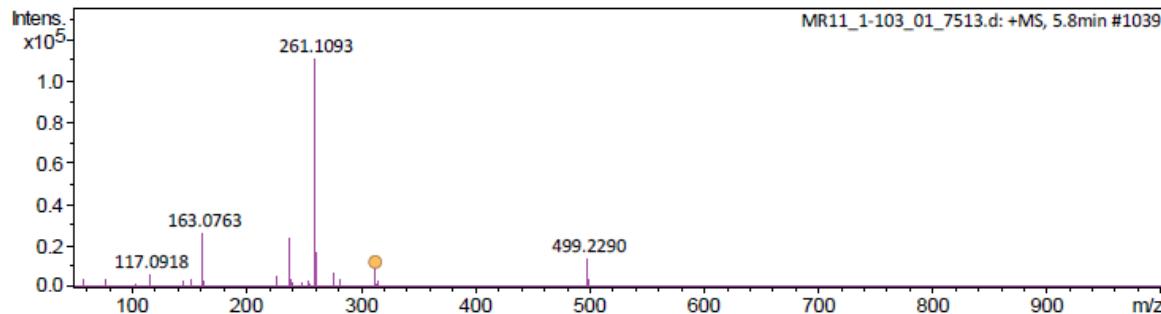
Anexo 3 – Espectro RMN ^1H do composto final



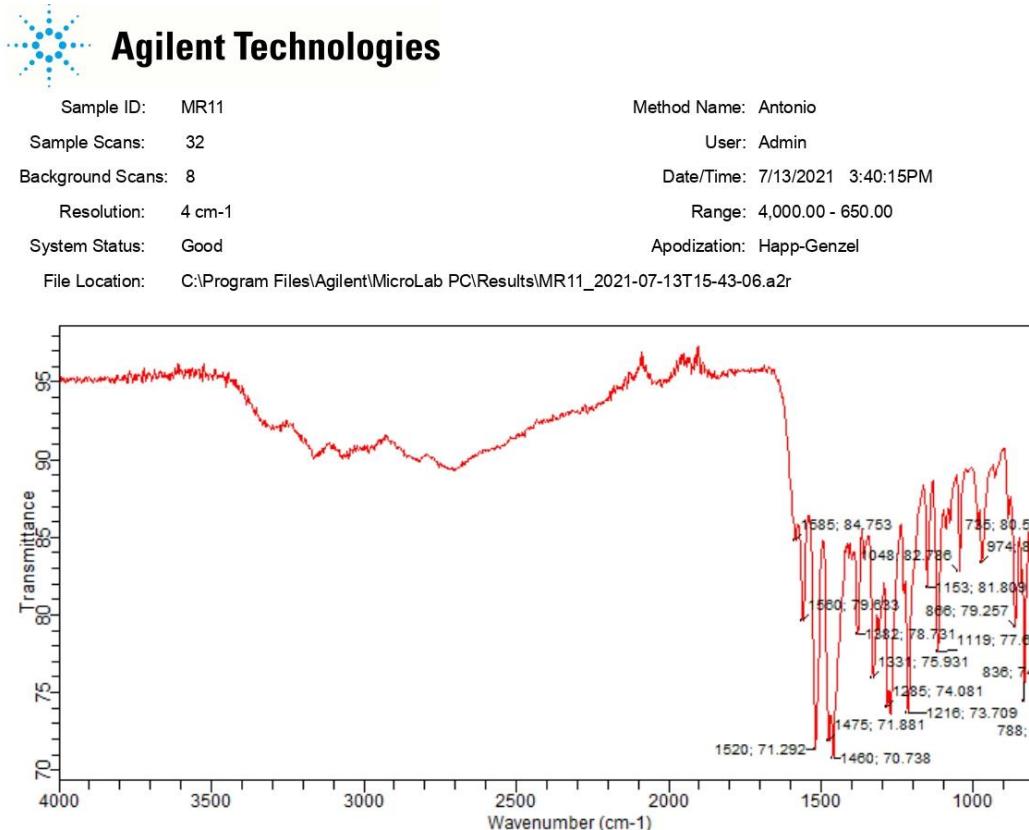
Anexo 4 – Espectro RMN ^{13}C do composto final



Anexo 5 – Espectrometria de Massas do Composto Final



Anexo 6 – Espectroscopia de Infravermelho



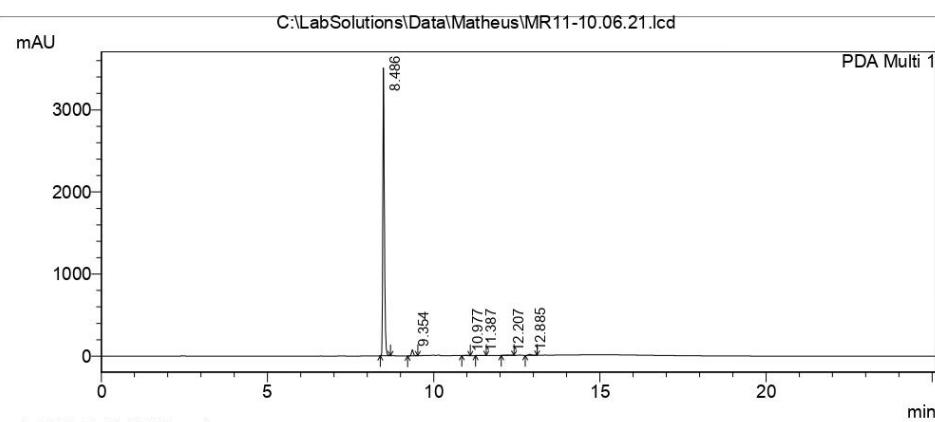
Anexo 7 – Análise por HPLC do composto MR11

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

C:\LabSolutions\Data\Matheus\MR11-10.06.21.lcd

Acquired by : Admin
 Sample Name : MR11-10.06.21
 Sample ID : MR11-10.06.21
 Vial # : 50
 Injection Volume : 10 μ L
 Data File Name : MR11-10.06.21.lcd
 Method File Name : Agua+TFA 0,1_ACN+TFA 0,1-25min.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 10/6/2021 09:21:24
 Data Processed : 10/6/2021 09:46:36

<Chromatogram>



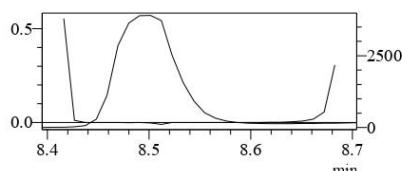
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

PeakTable

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.486	8.486	11410939	96.440
2	RT9.354	9.354	267088	2.257
3	RT10.977	10.977	31910	0.270
4	RT11.387	11.387	22306	0.189
5	RT12.207	12.207	26800	0.227
6	RT12.885	12.885	73136	0.618
Total			11832179	100.000

Purity

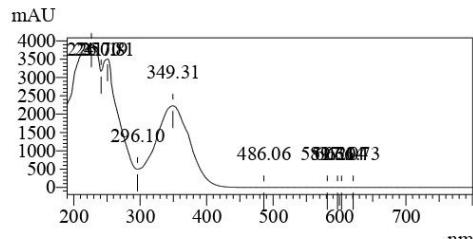
ID# : 1
 Retention Time : 8.486
 Compound Name : RT8.486



Impurity : Detected at 8.51 min
 Peak purity index : 0.989910
 Single point threshold : 0.999994
 Minimum peak purity index : -10083

Spectrum

ID# : 1
 Retention Time : 8.486
 Compound Name : RT8.486
 Spectrum Operation : None



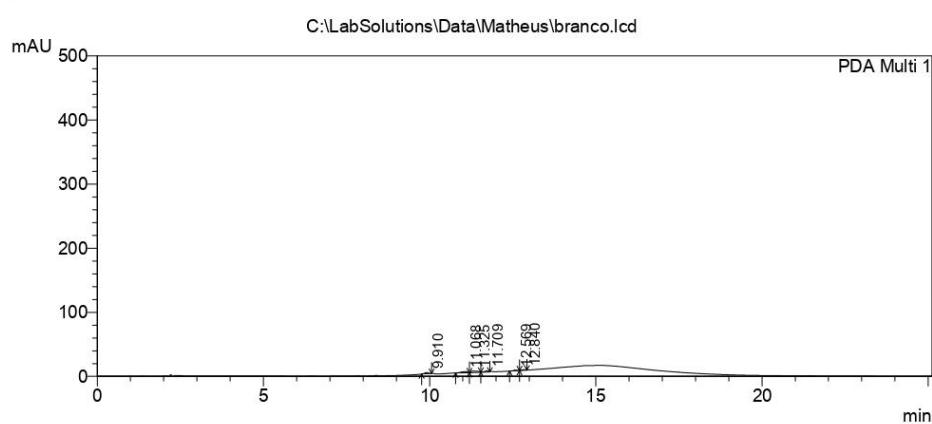
Anexo 8 – Análise por HPLC dos solventes utilizados na corrida

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

C:\LabSolutions\Data\Matheus\branco.lcd

Acquired by : Admin
 Sample Name : branco-10.06.21
 Sample ID : branco-10.06.21
 Vial # : 40
 Injection Volume : 10 uL
 Data File Name : branco.lcd
 Method File Name : Agua+TFA 0,1_ACN+TFA 0,1-25min.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 10/6/2021 09:48:51
 Data Processed : 10/6/2021 10:14:02

<Chromatogram>



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 254nm 4nm

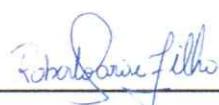
Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT9.910	9.910	12644	11.996
2	RT11.068	11.068	26202	24.860
3	RT11.325	11.325	33864	32.129
4	RT11.709	11.709	16763	15.904
5	RT12.569	12.569	9366	8.886
6	RT12.840	12.840	6562	6.226
Total			105399	100.000

23/10/2021 – Matheus Ribeiro Rodrigues

23/10/2021 – Prof. Dr. Roberto Parise Filho



09/12/2021 – Matheus Ribeiro Rodrigues



09/12/2021 – Prof. Dr. Roberto Parise Filho