UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

Planejamento, síntese, modelagem molecular e avaliação biológica de novos potenciais inibidores duais HDAC/ MMP não-hidroxamatos

Nuno Albuquerque Tavares Ferreira da Silva

Dissertação para a obtenção do título de mestre
Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

Planejamento, síntese, modelagem molecular e avaliação biológica de novos potenciais inibidores duais HDAC/ MMP não-hidroxamatos

Nuno Albuquerque Tavares Ferreira da Silva

Versão Corrigida

Dissertação para a obtenção do título de mestre

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2020

Nuno Albuquerque Tavares Ferreira da Silva

Planejamento, síntese, modelagem molecular e avaliação biológica de novos potenciais inibidores duais HDAC/ MMP não-hidroxamatos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
orientador/ presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

_____
4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de _____

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586p

SILVA, NUNO ALBUQUERQUE TAVARES FERREIRA
Planejamento, síntese, modelagem molecular e avaliação biológica de novos potenciais inibidores duais HDAC/ MMP não-hidroxamatos / NUNO ALBUQUERQUE TAVARES FERREIRA SILVA. - São Paulo, 2020.
127 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Parise-Filho, Roberto

1. Planejamento de fármacos. 2. Química farmacêutica. 3. Neoplasias. I. T. II. Parise-Filho, Roberto, orientador.

SILVA, N.A.T.F. **Planejamento, síntese, modelagem molecular e avaliação biológica de novos potenciais inibidores duais HDAC/ MMP não-hidroxamatos.** 2020. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

RESUMO

A inibição de alvos específicos como metaloproteinase de matriz (MMP) e histona desacetilase (HDAC) é amplamente estudada para impedir o progresso do câncer. Foi estabelecido que a inibição concomitante de MMP e HDAC é eficaz no combate de tumores sólidos e hematológicos. Ambos os alvos possuem um íon Zn^{2+} em seu sítio ativo, fundamental para a atividade destas enzimas. A alta afinidade dos inibidores conhecidos de MMP e de HDAC é conferida, principalmente, por um potente grupo ligante de zinco (ZBG). O ácido hidroxâmico é o ZBG mais potente conhecido atualmente, entretanto, este apresenta instabilidade farmacocinética, levando a ineficácia e genotoxicidade em testes clínicos. Frente a este contexto, o presente trabalho teve como objetivo o planejamento, síntese, modelagem molecular e avaliação biológica de novos inibidores duais MMP/HDAC não-hidroxamatos. Os compostos foram planejados utilizando estratégias de hibridação molecular, a partir de arcabouços provenientes inibidores de HDAC e MMP, gerando compostos arilsulfonamídicos com variações no tipo de ZBG inserido e na sua respectiva posição relativa na estrutura geral. Foram sintetizados sete análogos, em duas a três etapas reacionais, utilizando métodos de sulfonilação e acoplamento com agentes condensantes, partindo dos ésteres *para* e *meta* aminobenzoicos. Os rendimentos globais variaram de 25% a 55% e os produtos obtidos foram caracterizados por RMN ^{1}H e ^{13}C, LC/MS, CLAE e ponto de fusão. Os compostos tiveram sua atividade citotóxica avaliada em células HOG (oligodendroma) e T98G (glioblastoma), dentre os quais o **6a**, que possui o ZBG 2-amino anilida, foi o mais promissor, apresentando atividade nas duas linhagens na casa de nM. Ensaios de coordenação com Fe^{2+} comprovaram a capacidade quelante dos análogos contendo ácido hidroxâmico e dos demais compostos citotóxicos, **4a** e **4b** (ZBG-2, salicilal-hidrazona), o que não foi observado para o composto **6a**. Os estudos de ancoramento molecular permitiram sugerir um modo de interação para todos os ZBG propostos frente aos respectivos alvos (HDAC e MMP), sendo observado que o ZBG 4 (2-amino anilida) faria a interação de modo monodentado com a HDAC, enquanto não seria possível o encaixe no sítio catalítico da MMP. Conclui-se, portanto, que o planejamento proposto permitiu a obtenção de compostos promissores como antitumorais, e que a substituição do ácido hidroxâmico por outros ZBG fornece moléculas ativas frente a células tumorais. Entretanto, a avaliação biológica frente à MMP e HDAC é necessária para confirmar o mecanismo de ação proposto.

Palavras-chave: Câncer; inibidores de metaloproteinases; não-hidroxamatos; grupo ligante de zinco; ancoramento molecular; Inibidores de histona desacetilase; inibidores duais; arilsulfonamidas.

SILVA, N.A.T.F. **Design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation of novel potential non-hydroxamate dual HDAC/ MMP inhibitors**. 2020. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

ABSTRACT

Inhibition of specific targets such as matrix metalloproteinase (MMP) and histone deacetylase (HDAC) is extensively studied regarding arrest cancer growth. Particularly, concomitant inhibition of MMP and HDAC is effective against solid and hematologic tumors. Both targets have an ion Zn^{2+} at their catalytic site, which is essential for respective enzymatic activity. High affinity of known MMP and HDAC inhibitors is mainly provided by a potent zinc binding group (ZBG). Hydroxamic acid is the most potent ZBG currently known; however, it presents low pharmacokinetics stability, which results in its ineffectiveness and genotoxicity along clinical trial. So, the aim of this work comprised the design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation of novel potential non-hydroxamate dual HDAC/ MMP inhibitors. Compounds were designed by molecular hybridation, employing scaffolds from HDAC and MMP inhibitors, which provided arylsulfonamides with variation about the ZBG type and its respective relative position in the general structure. Seven compounds were synthesized, in two to three reaction steps, through methods that comprise sulfonilation and coupling with condensing agents, using *para* and *meta*-aminobenzoic esters as starting material. Compounds showed global yields around 25-55 % and were characterized by ^{1}H and ^{13}C NMR, LC/MS, HPLC and melting point. Compounds were evaluated about their cytotoxicity against HOG (oligodendroma) and T98G (glioblastoma) cells, which **6a**, with ZBG 2-aminobenzamide, was the most promising molecules, presenting activity against both cell lines at nM range. Coordination assays with Fe^{2+} proved the chelating capacity of hydroxamate analogues as well as the cytotoxic compounds, **4a** and **4b** (ZBG-2, salicylal-hydrazone), which was not observed about **6a.** Molecular *docking* allowed to suggest an interaction model for all proposed ZBG with the respective targets (MMP and HDAC), showing that (ZBG-4) 2-aminobenzamide interacts with HDAC by monodentate way, but does not docks at MMP catalytic site. We conclude that the proposed design allowed obtaining promising compounds as antitumors agents, and the replacement of hydroxamic acid by other ZBG provide active molecules against tumor cells. However, biological evaluation against MMP and HDAC is necessary to confirm the proposed action mechanism.

Key words: cancer; metalloproteinase inhibitors; non-hydroxamates; zing binding group; molecular docking; histone deacetylase inhibitors; dual inhibitors; arylsulfonamides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação simplificada da transcrição gênica nos eucariotos. **19**

Figura 2. Representação do mecanismo de hidrólise efetuado pelas HDAC Zn^{2+}-dependentes. **21**

Figura 3. Estrutura dos principais iHDAC. **23**

Figura 4. Representação bidimensional das principais interações do SAHA (vorinostate) com sítio catalítico da HDAC2. **24**

Figura 5. Representação da estrutura e mecanismo catalítico das MMP **28**

Figura 6. Estrutura dos principais iMMP levados à testes clínicos. **30**

Figura 7. Representação bidimensional das principais interações do inibidor SC-74020 com a MMP-2 **32**

Figura 8. Fluxograma do desenvolvimento de novos fármacos, sob a lógica do planejamento racional **33**

Figura 9. Exemplos de bioisosterismo e hibridação molecular aplicados ao desenvolvimento de novos fármacos. **35**

Figura 10. Planejamento dos análogos arilsulfonamídicos, destacando a concepção do arcabouço híbrido para potenciais inibidores duais HDAC/MMP. **39**

Figura 11. Estruturas dos análogos propostos. **41**

Figura 12. Espectros de ^{1}H e ^{13}C RMN do composto *m*-ABME **45**

Figura 13. Espectro de ^{1}H RMN obtido para o composto *p*-BME (1a), representando o arcabouço arilsulfonamídico *para* substituído. **47**

Figura 14. Espectro de ^{1}H RMN obtido para o compostos 2b, representando o arcabouço arilsulfonamídico *meta* substituído **48**

Figura 15. Espectros de ^{1}H RMN obtidos para os compostos 4a e 4b, representando o ZBG-2 (salicilal-acil-hidrazona). 4a **53**

Figura 16. Discussão sobre a acilação 3-amino 1,2,4- triazol.. **56**

Figura 17. Espectros de ^{1}H RMN obtidos para os compostos 6a e 6b. **57**

Figura 18. Poses obtidas nos estudos de ancoramento dos compostos planejados com a MMP2, revelando o modo de coordenação dos respectivos ZBG, além das respectivas distâncias interatômicas. **65**

Figura 19. Poses obtidas nos estudos de ancoramento dos compostos planejados com a HDAC8 revelando o modo de coordenação dos respectivos ZBG, além das respectivas distâncias interatômicas. **65**

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Planejamento sintético proposto para a obtenção dos análogos. **42**

Esquema 2. Representação do mecanismo reacional proposto para a esterificação de Fischer. **44**

Esquema 3. Representação do mecanismo reacional proposto para a reação de sulfonilação. **46**

Esquema 4. Representação do mecanismo de adição e eliminação da hidrólise alcalina do metil-ester. **47**

Esquema 5. Representação do mecanismo reacional de adição e eliminação proposto para a hidróxiaminólise do éster metílico **49**

Esquema 6. Representação das estruturas canônicas de ressonância para os compostos 3a e 3b. **50**

Esquema 7. Representação do mecanismo reacional proposto, em duas etapas, para a formação das acil-hidrazonas planejadas. **51**

Esquema 8. Representação do mecanismo reacional proposto para a condensação dos compostos 2a e 2b com o 3-ATR. **54**

Esquema 9. Representação da última etapa do mecanismo reacional proposto para a formação dos compostos 6a e 6b **57**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráficos de avaliação da inibição do crescimento das linhagens indicadas, obtidos para os compostos que foram bem-sucedidos na triagem preliminar. **60**

Gráfico 2. Resultados obtidos com o estudo de competição com a calceína. **66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos na síntese e caracterização dos compostos planejados. **43**

Tabela 2. Resultados obtidos nos ensaios de redução de viabilidade celular para os compostos selecionados. **60**

Tabela 3. Interações observadas com o Zn^{2+} dos ensaios de ancoramento molecular para os compostos planejados. **63**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3D	*Tridimensional*
3-ATR	*3-amino 1,2,4 triazol*
1,2-DAB	*1,2-diamino benzeno*
ADAM	*A Desintegrin And Metaloproteinase complex (Complexo de metaloproneinase e desintegrina)*
Bcl2	*B-Cell Lymphoma 2 protein (proteína de linfoma 2 de células B)*
CADD	*Computer-aided drug design (planejamento de fármacos auxiliado por computador)*
CAS	*Chemical abstracts service (serviço de resumos químicos)*
CC	*Cromatografia em coluna*
CCD	*Cromatografia em Camada Delgada*
DCM	*Diclorometano*
DFO	*Desferóxiamina*
DMAP	*Dimetil amino piridina*
DNA	*Ácido desoxirribonucléico*
DOX	*Doxiciclina*
EDC	*Etil NN-dimetil aminopropil carbodiimida*
EGF	*Endotelian growth fator (fator de crescimento endotelial)*
FDA	*Food & drug administration (administração de medicamentos e alimentos)*
FGFR1	*Fibroblast Growth Receptor 1 (receptor de crescimento de fibroblasto)*
FOXP3	*Forkhead box p3*
GI_{50}	*Growth Inhibition 50 (inibição da metade do crescimento)*
HAT	*Histona acetiltransferase*
HDA1	*Histona desacetilase 1 (Sacharomyces cerevisae)*
HDAC	*Histona desacetilase*
Hetcorr	*Heteronuclear correlation (correlação heteronuclear)*
Hex	*Hexano*
HMBC	*Heteronuclear multiple bond correlation (correlação heteronuclear em multiplas ligações*
IC_{50}	*Concentração inibitória 50%*

iHDAC *Inibidor de Histona Desacetilase*

iMMP *Inibidor de Metaloproteinase de Matriz*

IL-1β *Interleucina 1β*

INCA *Instituto Nacional do Câncer*

LBDD *Ligand-Based Drug Design (desenvolvimento de fármacos baseados na estrutura do ligante)*

MEC *Matriz extracelular*

MMFF *Merck molecular force field (campo de força molecular da Merck)*

MMP *Matrix Metalloprotease (metaloproteinase de matriz)*

NAD^+ *Dinucleótido de nicotinamida e adenina*

NCOR1/2 *Nuclear receptor corepressor 1 e 2 (co-repressor do receptor nuclear 1 e 2)*

N.D. *Não determinado*

N.O *Não observado*

NF-κB *Fator Nuclear kappa-B*

NuRD *Nucleosome remodeling deacetylase (desacetilase remodeladora de nucleossomo)*

OMS *Organização mundial da saúde*

p53 *Proteína de 53 kda*

p.a. *Pureza analítica*

P.F. *Ponto de Fusão*

PM6 *Parametrization method 6 (Método de parametrização 6)*

R^2 *Coeficiente de linearidade*

rf *Refluxo*

Rf *Migração relativa*

RMN *Ressonância magnética nuclear*

(sat.) *saturado*

SBDD *Structure-based drug design (Planejamento de fármacos baseados na estrutura do alvo)*

SIRT *Sirtuína*

SRB *Sulforodamina B*

STAT3 *Signal transducers and activators of transcription 3 (transdutores de sinal e ativadores de transcirção 3)*

t	*Tempo*
t.a.	*Temperatura Ambiente*
TCA	*Ácido tricloroacético*
TFA	*Ácido trifluoroacético*
TGF-β	*Tissue growth fator β (fator de crescimento tecidual β)*
TGI	*Total growth inhibition (inibição total do crescimento)*
THF	*Tetraidrofurano*
TNF-α	*Fator de necrose tumoral α*
TIMP	*Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz)*
VEGF	*Vascular-endotelian growth factor (fator de crescimento vascular e endotelial)*
ZBG	*Zinc Binding Group (Grupo Ligante de Zinco)*
η	*rendimento*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 CÂNCER 16
1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS 18
1.2.1 Histonas desacetilases (HDAC) 19
1.2.1.1 Inibidores de histona desacetilase (iHDAC) 22
1.2.2 Metaloproteinases de matriz (MMP) 27
1.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS 33
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA 37
3 PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS 39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
4.1. Síntese, purificação e caracterização dos análogos 42
4.1.1. o, m-Amino benzoato de metila (ABME) 43
4.1.2. m, p- (Benzeno-sulfonamido) benzoato de metila (m, p- BME ou compostos 1a e 1b) 45
4.1.3. Ácido (m, p-benzeno sulfonamido) benzóico (m, p-BA ou compostos 2a e 2b) 47
4.1.4 N-Hidróxi (benzeno sulfonamido) benzamida (m, p-NT01, compostos 3a e 3b) 49
4.1.5. Salicilal (benzeno sulfonamido)-benzoil hidrazona (NT02, 4.) 50
4.1.6. 3-Amino (N2 (m, p-benzeno sulfonamido)-benzamida)-1,2,4-triazol (NT03, 5.) 53
4.1.7. 2-Amino ((benzeno sulfonamido)-benzoil) benzamida (NT04, 6.) 56
4.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS 58
4.2.1. Triagem de inibição no crescimento celular 59
4.2.2. Curva de redução no crescimento celular 60
4.3. ESTUDOS IN SILICO 62
4.3.1. Ancoramento molecular 62
4.4. ENSAIOS DE COORDENAÇÃO 66
4.4.1. Estudo de competição com a calceína 66
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS 68
6. PARTE EXPERIMENTAL 69
6.1. Síntese, purificação e caracterização dos análogos 69
6.1.1. MATERIAIS E REAGENTES 69
6.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS 69
6.1.3. MATERIAIS E MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL 70
6.1.4. Procedimentos sintéticos, purificação e produtos obtidos 70

6.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS 77
6.2.1 Triagem de redução da viabilidade celular 77
6.2.2. Cálculo do GI50, TGI e LC50 dos compostos 77
6.3. MATERIAIS E MÉTODOS IN SILICO 79
6.3.1. Estudos de ancoramento molecular 79
6.3.2. Cálculo das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas 79
6.4. ESTUDO DE COMPETIÇÃO COM A CALCEÍNA 80
6.4.1. Preparo de solução estoque de calceína (5 mM) 80
6.4.2. Preparo e leitura das microplacas 80
7. REFERÊNCIAS 81
8. ANEXOS 93
8.1. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS. 93
8.1.1. 3-Amino benzoato de metila (m-ABME) 93
8.1.2. 4-Fenilsulfonamido benzoato de metila (p-BME, 1a) 94
8.1.3. 3-Fenilsulfonamido benzoato de metila (m-BME, 1b) 95
8.1.4. Ácido 4-fenilsulfonamido benzóico (p-BA, 2a) 96
8.1.5. Ácido 3-fenilsulfonamido benzóico (m-BA, 2b) 97
8.1.6. N-hidróxi-(4-fenilsulfonamido) benzamida (p-NT01, 3a) 98
8.1.7. (E)-N-(4-(1-(2-hidróxifenil)acilhidrazona)fenil)benzenosulfonamida (p-NT02, 4a) 99
8.1.8. (E)-N-(3-(1-(2-hidróxifenil)acilhidrazona)fenil)benzenosulfonamida (m-NT02,4b) 100
8.1.9. N-(4-(1-acil (3-amino-1H-1,2,4 triazol))fenil) benzenosulfonamida (p-NT03, 5a) 1013
8.1.11. N-(2-aminofenil)-4-(fenilsulfonamido) benzamida (p-NT04, 6a) 104
8.1.12. N-(2-aminofenil)-3-(fenilsulfonamido) benzamida (m-NT04, 6b) 105
8.2. RELATÓRIOS DE PUREZA CROMATOGRÁFICA 106
8.2.1. p-BME (1a) 106
8.2.2. m-BME (1b) 107
8.2.3. p-BA (2a) 108
8.2.4. m-BA (2b) 109
8.2.5. p-NT01 (3a) 110
8.2.6. p-NT02 (4a) 111
8.2.7. m-NT02 (4b) 112
8.2.8. p-NT03 (5a) 113
8.2.9. m-NT03 (5b) 114
8.2.10. p-NT04 (6a) 115

8.2.11. m-NT04 (6b).....116
8.3. ANÁLISE DE LC/MS (P-NT03, 5A).....117
8.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....118
8.4.1. Triagem das amostras nas células T98G.....118
8.4.2. Triagem das amostras nas células HOG.....119
8.5. TABELA DE RANQUEAMENTO DOS COMPOSTOS MODELADOS.....120
8.6. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCÍNETICAS.....121

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é um conjunto complexo de doenças, cuja origem está relacionada com mutações e alterações em mecanismos de replicação, sobrevivência e reconhecimento celular (CELL et al., 2017). A doença pode afetar praticamente todos os tecidos e órgãos, levando a uma sintomatologia muito ampla e tornando o diagnóstico correto um desafio em muitos casos (KAMANGAR et al., 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) coloca o câncer como segunda principal causa de morte no mundo, depois das doenças cardiovasculares (STEWART et al., 2014). Em 2018 foram registradas, aproximadamente, 9,5 milhões de mortes relacionadas com a doença em todo mundo. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) reportou para 2018, aproximadamente, 600 mil novos casos, com 257 mil deles resultando em mortes (INCA et al., 2018). Estima-se que em 2010 foram gastos US$ 1,6 trilhões em despesas médicas pelo mundo todo decorrentes do câncer (PLUMMER et al., 2016; FEARLAY et al., 2013). As estimativas indicam que as taxas de incidência tendem a aumentar em 70% nas próximas décadas, seguindo uma tendência histórica (YAP et al.,2017), o que está relacionado ao envelhecimento geral da população e a urbanização crescente (GBD 2015).

Apesar dos avanços sociais e tecnológicos para redução da mortalidade, o acesso da população a tratamentos avançados e ferramentas de diagnóstico preventivo ainda é muito restrito, principalmente em países em desenvolvimento, tornando o câncer um problema social em muitos casos (GBD 2015). Este cenário é verificado no Brasil, onde os principais desafios para a redução da mortalidade estão no diagnóstico precoce e acesso ao tratamento adequado, especialmente nas regiões mais afastadas dos centros urbanos (INCA et al., 2018).

O tratamento envolve, principalmente, remoção cirúrgica dos tumores quando possível, radioterapia e quimioterapia com agentes citotóxicos para impedir a replicação das células remanescentes. A quimioterapia clássica é consideravelmente tóxica ao organismo e acarreta danos colaterais muitas vezes irreversíveis aos pacientes (MALHOTRA et al., 2003).

Com o avanço no conhecimento dos mecanismos celulares que a biologia molecular trouxe, novas opções farmacológicas têm emergido visando evitar efeitos colaterais inerentes da terapia clássica. A nova terapia alvo-dirigida compreende a

inibição de proteínas específicas, como proteínas quinase, metaloproteinases de matriz e histonas desacetilase, que intermedeiam a interação entre as células neoplásicas e os estímulos do organismo para replicação e crescimento do tumor. Estes alvos controlam mecanismos celulares considerados como exacerbados ou silenciados em diversos modelos de câncer (URRUTICOECHEA et al., 2010).

Utilizados em conjunto com as opções clássicas de tratamento, estas novas opções farmacológicas trouxeram aumento de sobrevida e até remissão completa de muitos casos considerados terminais. Entretanto, devido à alta complexidade e plasticidade da doença, a terapia dirigida disponível atualmente nem sempre é eficaz, devido à resistência intrínseca ou adquirida ao tratamento (WU et al., 2017). Ademais, o custo deste tipo de terapia é muito elevado, principalmente se tratando dos medicamentos de origem biotecnológica (CELL et al., 2017).

A resistência e toxicidade persistentes, aliadas ao acesso restrito aos tratamentos alvo-dirigidos, tornam necessário o desenvolvimento de novas opções terapêuticas eficazes, de baixo custo e seguras para o combate do câncer (CELL et al., 2017). Neste sentido, compreender a fisiopatologia da doença e explorar diferentes alvos torna-se fundamental na busca por novos tratamentos.

1.2 Aspectos fisiopatológicos

As mutações e alterações relacionadas ao câncer podem ocorrer em nível genético e/ou epigenético, onde o estímulo de crescimento e replicação celular ficam aumentados, tornando a célula mutante e sua linhagem uma massa de células aberrantes (tumor) que compromete a função do tecido em que se encontra (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Quando um tumor se espalha de um órgão para o outro e passa a coexistir em múltiplos sítios no organismo, em um processo conhecido como metástase, a qualidade de vida e a chance de sobrevivência do paciente diminuem drasticamente. Este processo ocorre em uma sequência de eventos, iniciando-se pela invasão do tumor ao tecido periférico, levando ao desprendimento de células neoplásicas nos vasos sanguíneos e linfáticos, que às carregam por todo o corpo. Em seguida, algumas destas células irão sair da circulação e aderir em tecidos distantes do sítio primário, formando os tumores metastáticos secundários. Além de comprometer gravemente a saúde do indivíduo afetado, a metástase provoca redução na eficácia dos tratamentos cirúrgicos, radiológicos e farmacológicos (LAMBERT et al., 2017).

A interação das células cancerosas com os elementos celulares e moleculares do organismo criam o microambiente tumoral, que favorece o crescimento e proliferação do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Diversos alvos estabelecidos para a terapia dirigida estão intimamente relacionados com o desenvolvimento deste ambiente tecidual, entre eles, estão as histonas desacetilases (HDAC) e metaloproteinases de matriz (MMP), que serão discutidas nos itens a seguir.

1.2.1 Histonas desacetilases (HDAC)

As histonas desacetilase (HDAC) são enzimas envolvidas na regulação epigenética da expressão gênica, entre eles, genes promotores de tumor (oncogenes). O DNA das células eucarióticas está localizado dentro do núcleo, firmemente enovelado em proteínas de agregação conhecidas como histonas, em um complexo chamado nucleossomo (figura 1A). Nessa forma condensada, o DNA está inacessível à maquinaria de transcrição e, portanto, os genes contidos na porção compactada não serão expressos pela célula (LEE et al., 2019). O controle do grau de compactação da cromatina é mediado, entre outras formas, por complexos enzimáticos remodeladores de cromatina, como NuRD, Sin3 e NCOR1/2, entre outros. Estes complexos são formados por enzimas que, através de pequenas alterações (acetilação/desacetilação, metilação/desmetilação) na estrutura do DNA e das histonas, modulam as interações intramoleculares do nucleossomo, ativando ou silenciando indiretamente os genes da região modificada. Algumas destas alterações epigenéticas (fosforilação, helicase, bromo-domínio ATPase) servem como pontos de reconhecimento para a aproximação da maquinaria de transcrição, sendo uma etapa fundamental da expressão gênica nos eucariotos (YADAV et al., 2016).

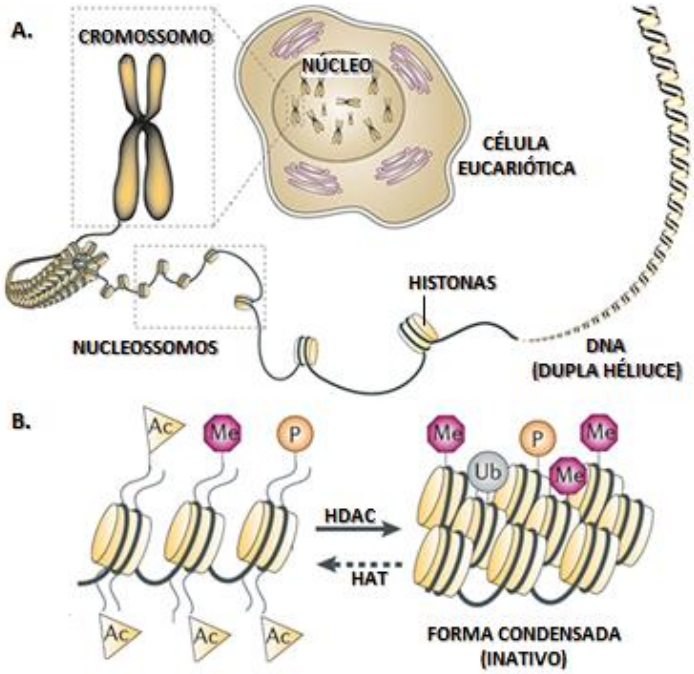


Figura 1. Representação simplificada da transcrição gênica nos eucariotos. (**A**) Representação da organização do DNA nas células eucarióticas. (**B**) A desacetilação das histonas promove a condensação dos nucleossomos, silenciando os genes da região. As siglas representam as modificações pós-translacionais a seguir: acetilação (Ac); metilação (Me); fosforilação (P); ubquitinação (Ub) (SPARMANN et al., 2006. Adaptado).

As histonas desacetilases compõem estes complexos remodeladores de cromatina, sendo responsáveis pela remoção do grupo acetil ligado ao nitrogênio ***ε*** de resíduos de lisina das histonas. Esta reação promove a formação da amina primária correspondente, que é prontamente protonada pelo meio intracelular gerando uma carga positiva. Essa carga positiva permite a atração eletrostática com os fosfatos que compõem a estrutura do DNA, além de causar mudanças conformacionais na estrutura terciária das histonas, promovendo assim a condensação do nucleossomo (figura 1B). Dessa forma as HDAC são consideradas enzimas "silenciadoras" epigenéticas e sua contrapartida, as histonas acetiltransferases (HAT), realizam o processo inverso e são enzimas "ativadoras" epigenéticas (SAHA et al., 2006).

Além do importante papel na transcrição gênica, algumas HDAC (HDAC1 e HDAC6, por exemplo) têm diversos substratos alternativos às histonas. A acetilação de resíduos de lisina é uma importante modificação pós-translacional, que possivelmente modula a ativação ou degradação de inúmeras proteínas além das histonas. É estabelecido que a acetilação dos resíduos de lisina das α-tubulinas está relacionado com sua estabilização como polímero fundamental do citoesqueleto. Sua desacetillação via HDAC6 está relacionada com maior mobilidade e migração celular. A forma acetilada de diversos fatores de transcrição como NF-κB, p53 e STAT3 é importante para manutenção de sua atividade. Estas proteínas são substratos de desacetilação pela HDAC1, promovendo sua posterior ubquitinação e degradação, em consequência (GLOZAK et al., 2005).

As HDAC, com exceção da classe III, utilizam Zn^{2+} como cofator para exercer sua atividade. O domínio desacetilase destas enzimas é altamente conservado, possuindo um arcabouço característico homólogo a outras metaloenzimas, à exemplo das arginases (DOWLING et al., 2008). O metal é coordenado de maneira monodentada por 4 substituintes, formando um complexo tetraédrico (figura 2A). Este complexo resultante é acessível ao substrato e compõe a forma ativa destas metaloenzimas. A interação do Zn^{2+} com a ligação amida do substrato promove a força motriz para a sua hidrólise (figura 2B), auxiliado pela presença de resíduos de histidina (His) e tirosina (Tyr) adjacentes que estabilizam as interações do estado de transição (figura 2C). O fim do processo leva a formação de um intermediário bipiramidal (figura 2D) que precisa ser deslocado por uma molécula de água para que a enzima volte a ser ativa (LOPEZ et al., 2016).

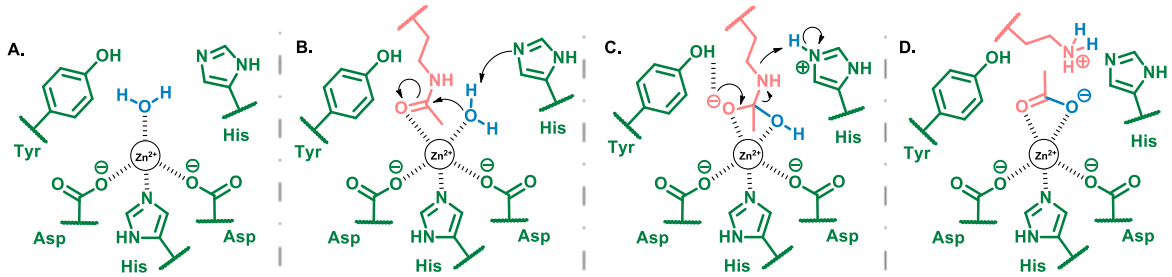


Figura 2. Representação do mecanismo de hidrólise efetuado pelas HDAC Zn^{2+}-dependentes. (**A**) Complexo tetraédrico constituído pela enzima, água e o metal, compondo a forma ativa do domínio catalítico. (**B**) Aproximação do substrato e ataque nucleofílico da molécula de água adjacente. (**C**) rearranjo eletrônico culminando em eliminação de amina primária. (**D**) Forma Inativa (quiescente) do domínio catalítico (LOPEZ et al., 2016; DOWLING et al., 2008).

A família das HDAC nos eucariotos complexos compreende dezoito enzimas, divididas em cinco classes (I, IIa, IIb, III e IV) de acordo com sua homologia genética relacionada aos fatores de transcrição correspondentes encontrados em *S. cerevisae* (SAHA et al., 2006). As enzimas da classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8) são homólogas ao fator Rpd3. Localizadas preferencialmente no núcleo, são consideradas as HDAC clássicas por conterem domínios em seu genoma que são comuns a todas as outras classes. São associadas à diminuição da atividade de proteínas como p53 e STAT3, além dos receptores androgênico e glicorticóide, intimamente relacionados com a progressão de diversos tipos de câncer (HASSEL et al, 2019).

As enzimas da classe II são homólogas ao fator Hda1 e foram divididas em duas subclasses de acordo com a localização preferencial intracelular. A classe IIa (HDAC 2, 5, 7 e 9) está amplamente distribuída no meio intracelular, normalmente associadas com proteínas de sinalização como Bcl2, FOXP3, e também com os receptores de estrogênio e de endotelina. A classe IIb (HDAC 6 e 10) localiza-se preferencialmente fora do núcleo e sua principal representante, a HDAC6, tem a α-tubulina acetilada como substrato preferencial. Sua desacetilação promove a despolimerização dos microtúbulos, processo que está intimamente relacionado com a divisão e crescimento celular (LIU et al., 2017).

As enzimas da classe III, conhecidas como sirtuínas (SIRT de 1 a 7), são homólogas ao fator Sir2. Essas enzimas possuem uma arquitetura característica em seu domínio desacetilase, que as tornam dependentes de NAD^+ como cofator para exercer seu mecanismo de hidrólise. Distribuídas inclusive nas mitocôndrias, as sirtuínas participam ativamente de modificações pós translacionais que regulam o metabolismo energético e o controle do estresse oxidativo (SANDERS et al., 2010).

A classe IV é composta apenas pela HDAC11, apesar de seu domínio desacetilase exercer atividade semelhante aos correspondentes nas classes I e II, essa enzima não possui homologia com nenhum dos fatores de transcrição acima citados, e, portanto, foi separada em sua própria classe. Está envolvida no desenvolvimento dos oligodendrócitos e em alguns tipos de resposta imune, além de agir em conjunto com as HDAC clássicas (LOPEZ et al., 2016).

As HDAC estão ampla e intimamente relacionadas com processos de inflamação, crescimento e replicação celular, além de mecanismos de reparo genético e apoptose (GLOZAK et al., 2005). Estes processos se encontram alterados em doenças crônicas degenerativas como fibrose cística, doença de Alzheimer, doença de Huntington e principalmente câncer. As HDAC se encontram super-expressas e ativas em diversos tipos de câncer como pulmão, mama, ovário, próstata, fígado, pâncreas, estômago, leucemia, linfoma, mieloma, entre outros (BANERJEE et al., 2019). De maneira geral, estas enzimas contribuem para a progressão do tumor, diminuindo a função de proteínas ligadas ao estímulo apoptótico (como p53 e Bcl2), enquanto promovem a atividade de proteínas ligadas a sobrevivência e proliferação celular (como STAT3 e FOXP3). As HDAC 6 e 10 são responsáveis por regular a estabilidade do citoesqueleto (formado por α-tubulina polimerizada), dessa forma promovendo o crescimento e migração celular (LOPEZ et al., 2016). Mais recentemente, foi estabelecida a relação do aumento da atividade das HDAC (principalmente 6 e 8) com a inflamação e o desenvolvimento da resposta imune no microambiente tumoral, inclusive aumentando a expressão e ativação de MMP2 e MMP10, e promovendo os processos de angiogênese e metástase em consequência (HULL et al., 2016).

A descoberta de substâncias capazes de inibir a atividade das HDAC foi fundamental para entender a importância fisiológica dessas enzimas e sua relação com doenças como o câncer (HULL et al., 2016).

1.2.1.1 Inibidores de histona desacetilase

A inibição *in vitro* das HDAC está associada com redução da viabilidade celular em neoplasias de diversas linhagens, através da indução de apoptose e parada do ciclo celular. Estes efeitos citotóxicos e citostáticos têm como marcador o aumento da concentração de histona acetilada, além da alteração na expressão e atividade de outros substratos de modificações pós-translacionais das HDAC (DRUMMOND et al.,

2005). Em estudos pré-clínicos, a inibição destas enzimas mostrou-se eficaz em reduzir a progressão tumoral, principalmente, em tumores hematológicos e linfáticos (HASSEL et al., 2019).

Os inibidores de HDAC (iHDAC) apresentam pronunciada atividade biológica, com valores de IC_{50} na faixa de nM, o que está frequentemente relacionado à pan-inibição de HDAC das classes I, II e IV (KHAN et al., 2008). Com exceção do derivado natural tricostatina A (TSA) e o derivado aminobenzamídico entinostate (MS275), todos os compostos representados a seguir (figura 3), passaram por testes clínicos e são fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento monoterápico de linfoma cutâneo e mieloma múltiplo, ou em associação com outros tratamentos para diferentes tipos linhagens resistentes (HASSEL et al., 2019). O primeiro iHDAC a ser aprovado para uso terapêutico foi o vorinostate (SAHA), pela Merck & Co. sob o nome de Zolinza®. Sua estrutura serviu como base para o desenvolvimento de inúmeros análogos, inclusive os fármacos belinostate (Beleodaq®, Onxeo) e panobinostate (Farydak®, Novartis) (BANERJEE et al., 2019). De maneira geral, todos os iHDAC apresentam 3 porções características: um grupo ligante de zinco (ZBG); um espaçante; e um grupo volumoso hidrofóbico ligado a um conector polar, denominado *cap* (“tampa”)(DRUMMOND et al., 2005). O depsipeptídeo romidepsina (Istodax®, Celgene) é um pró-fármaco de origem natural, cuja ativação está relacionada com a redução mitocondrial da ligação dissulfeto em sua estrutura, formando a função tiol (FURUMAI et al., 2002).

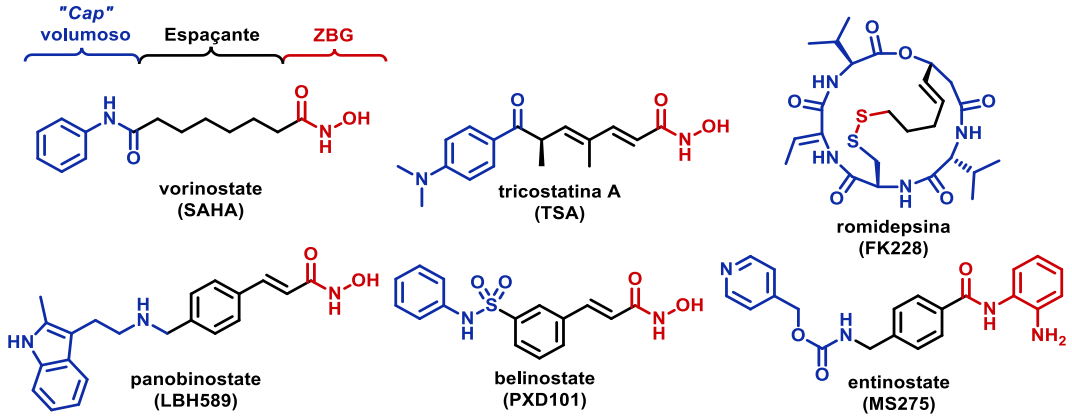


Figura 3. Estrutura dos principais iHDAC. Acima do vorinostate está representada a divisão geral da estrutura destes inibidores. O ZBG mais comum e potente entre os iHDAC conhecidos é o ácido hidroxâmico, presente na estrutura do SAHA, TSA, PXD101 e LBH589. O entinostate (MS275) possui um grupo 2-amino-benzamídico como ZBG. A romidepsina (FK228) compreende um pró-fármaco, onde a redução da ponte dissulfeto culmina na obtenção do respectivo ZBG, um tiol. (FURUMAI et al., 2002).

De modo geral, a maneira mais usual e eficaz de inibir a atividade das HDAC é explorar o íon Zn^{2+} do centro catalítico como ponto chave de interação, tornando a presença de um ZBG essencial para a atividade de inibidores. A interação metal-ligante normalmente é de natureza íon-dipolar, com o modo de coordenação variando entre monodentado e bidentado. Este tipo de interação, por ser significativamente mais intensa do que interações de hidrogênio, funciona como ponto de ancoramento do ligante na enzima, orientando seu ajuste conformacional e, consequentemente, promovendo demais interações com o alvo (RICCARDI et al.; 2018). O complexo metálico catalítico das HDAC se encontra no fundo de um "túnel" relativamente curto e estreito, formado por aminoácidos hidrofóbicos do domínio desacetilase (Figura 4). Os resíduos de lisina acetilada se encaixam nessa cavidade com certa complementaridade estrutural, de forma que a presença de um grupo espaçante análogo ao substrato original é importante para o acesso dos iHDAC ao fundo deste domínio. Tanto o comprimento quanto o grau de rigidez desta porção do arcabouço exercem influência sobre o modo de interação do ZBG (LAUFFER et al., 2013). O grupo ligado à outra extremidade da porção espaçante dos iHDAC, normalmente serve como "tampa" ("*cap"*, do inglês) para a cavidade catalítica do alvo, interagindo com os resíduos hidrofóbicos de aminoácidos presentes na periferia da cavidade, assim como o esqueleto principal da proteína. De maneira geral, grupos volumosos aromáticos ou heteroaromáticos adjacentes a funções polares são bons exemplos de "*cap's"* para os iHDAC (DRUMMOND et al., 2005).

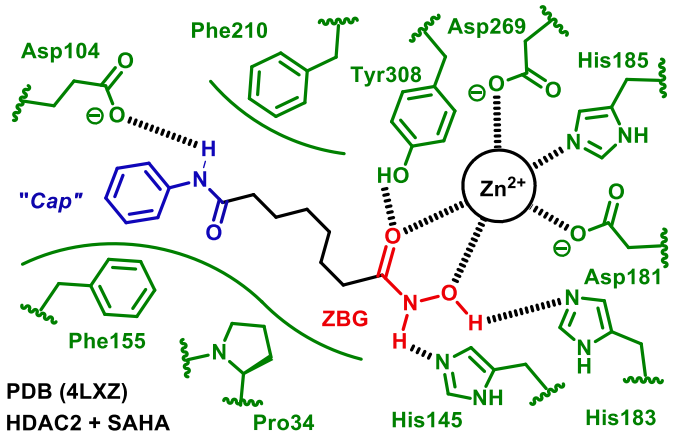


Figura 4. Representação bidimensional das principais interações do SAHA (vorinostate) com sítio catalítico da HDAC2. Em verde é apresentado o "túnel" estreito formado pelos aminoácidos hidrofóbicos, assim como o complexo organometálico que sustenta o íon Zn^{2+}. Em vermelho está representado o ácido hidroxâmico atuando como ZBG, mantendo um complexo bi piramidal que mimetiza o estado inativo da enzima. Em azul está destacado o papel do *"cap"* encaixado na periferia da cavidade, realizando não apenas interações hidrofóbicas, mas também polares via a função amídica adjacente (LAUFFER et al., 2013).

A coordenação do ZBG com o íon Zn^{2+} é o ponto crucial de interação entre os iHDAC e seu alvo. O ácido hidroxâmico é o ZBG mais potente conhecido não apenas entre os iHDAC, mas também em inibidores de outras metaloenzimas (ZHANG et al., 2018). É estabelecido, de maneira geral, que esta função aumenta cerca de 10^3 vezes a afinidade com o alvo, quando comparados aos respectivos análogos derivados de ácido carboxílico. Sua eficácia deve-se principalmente à intensa densidade eletrônica sobre os oxigênios que estão distribuídos espacialmente de forma a propiciar a interação bidentada com o metal em um ciclo de 5 membros termodinamicamente favorável (CODD, 2008).

A maior parte e os mais potentes iHDAC desenvolvidos e descobertos até hoje possuem o ácido hidroxâmico como ZBG, entretanto, sua intensa capacidade de quelação está associada com a falta de seletividade frente as isoformas de HDAC Zn^{2+}-dependentes. Embora esta pan-inibição se reflita em uma alta potência do composto frente às células tumorais, pode implicar na maior ocorrência de efeitos adversos *in vivo* (KHAN et al., 2008). Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram ainda que a biotransformação do ácido hidroxâmico ocorre de maneira intensa, acarretando no reduzido tempo de meia-vida inerente destes compostos. Adicionalmente, existe a formação de metabólitos genotóxicos indesejados como hidroxilamina e isocianatos (BAHHAJ et al 2016). Parte da toxicidade *in vivo* relacionada a estes inibidores, assim como a reduzida meia-vida e baixa distribuição tecidual, estão diretamente relacionados com a presença deste grupo funcional (HOW et al., 2015).

Buscando alternativas terapêuticas, diversos grupos de pesquisa concentram esforços em desenvolver e estudar a atividade de iHDAC não-hidroxamatos (SUZUKI et al, 2005). O entinostate (MS275, figura 3) é um exemplo de alternativa ao ácido hidroxâmico, possuindo o grupo 2-amino anilida como ZBG. Sua capacidade de inibição é equiparável aos iHDAC hidroxamatos, apresentando certa seletividade para as HDAC da classe I. Recentemente, o MS275 foi aprovado para estudos clínicos como potencial tratamento para tumores sólidos e hematológicos (JUERGUENS et al., 2016). Outro exemplo de iHDAC não-hidroxamato é a romidepsina (FK228, figura 3), que em sua forma ativa apresenta a função tiol como ZBG. Este grupo coordena com o Zn^{2+} catalítico com intensidade moderada e de forma monodentada. A estrutura macrocíclica da romidepsina funciona literalmente como tampa da cavidade catalítica, sendo capaz de promover diversas interações com o alvo que de certa forma

“compensam” a menor afinidade do ZBG (FURUMAI et al., 2002). Existem diversas outras possibilidades estruturais promissoras para substituir o ácido hidroxâmico que estão sendo implementadas na concepção de inibidores de HDAC e outras metaloenzimas (SUZUKI et al., 2005)

Embora os iHDAC apresentem grande potencial terapêutico, alguns tipos de tumores sólidos, quando tratados em monoterapia com inibidor de HDAC, demonstraram se beneficiar das alterações causadas pelo alto grau de acetilação intracelular, tornando-se mais invasivos e com maior taxa de crescimento (HASSEL et al., 2019). Estudos relatam que este efeito pró-oncogênico está potencialmente relacionado com a falta de seletividade destes inibidores frente às diferentes HDAC. Por este motivo, esforços estão sendo concentrados em desenvolver arcabouços de iHDAC mais seletivos, focando na inibição de isoformas que se encontram super-expressas nestes tipos de tumores (HDAC6 e HDAC8 principalmente; MARKS et al., 2007).

As controvérsias nos estudos biológicos em relação à eficácia dos iHDAC são associadas à limitação dos estudos *in vitro* em simular a alta complexidade e plasticidade dos mecanismos envolvidos na progressão do tumor, e à íntima relação do tumor com o sistema imune e o microambiente tumoral (SHAKED et al., 2019).

Apesar destas controvérsias, a terapia combinada de iHDAC com tratamentos clássicos e/ou alvo-dirigidos (ex.: antiandrogênicos e inibidores de quinase), que atuam em alvos com função regulatória sobre o crescimento do tumor e seu microambiente, mostrou ser altamente eficaz ao combater de maneira sinérgica tumores sólidos, hematológicos e linfáticos multirresistentes (BOUMAHDI, DE SAUVAGE, 2019; HASSEL et al., 2019; HESHAM et al., 2018)

O efeito sinérgico observado na terapia combinada de iHDAC com outros tratamentos alvo-dirigidos se deve ao fato de que boa parte da adaptação fenotípica das células neoplásicas, associada com a multirresistência, está intimamente relacionada com modificações pós-translacionais de fatores de transcrição e alterações epigenéticas (BOUMAHDI et al., 2019). Dessa forma, a associação terapêutica de iHDAC aos tratamentos convencionais foi estabelecida como opção em linhagens multirresistentes. Neste contexto, a concepção de inibidores duais iHDAC representa uma alternativa promissora de monoterapia efetiva para o tratamento de tumores multirresistentes (HESHAM et al., 2018).

1.2.2 Metaloproteinases de matriz (MMP)

As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma família de endopeptidases dependentes de zinco (metzincinas) identificadas pela primeira vez em 1962 no tecido conjuntivo da cauda de girinos, participando ativamente do remodelamento tecidual decorrente do processo de metamorfose (GROSS et al., 1962). Atualmente, são conhecidas 26 isoformas no genoma dos vertebrados, das quais 23 são expressas por seres humanos. As MMP são produzidas principalmente através de fibroblastos, células endoteliais, neutrófilos e macrófagos e participam de diversos processos fisiológicos como embriogênese, cicatrização e crescimento do organismo (KESSENBROCK et al., 2015).

O arquétipo estrutural das MMP (figura 5A) consiste em uma porção *N*-terminal sinalizadora, inserida em um domínio PRO (em vermelho) que ao ser clivado torna a enzima ativa; o sítio catalítico (em amarelo) contendo o íon Zn^{2+} coordenado à enzima via a sequência-motivo HEXXHXXGXXH; e um domínio carboxi-terminal regulatório de hemopexina (em verde). A porção sinalizadora *N*-terminal tem função de orientar a secreção do zimogênio pelo retículo endoplasmático das células que produzem MMP. O domínio PRO contém um resíduo de cisteína, que quando intacto, se coordena ao zinco catalítico, impedindo a aproximação do substrato. Este domínio pode ser clivado endogenamente por serina-proteases, furina-proteases ou outras MMP, tornando ativa a enzima (NGUYEN et al., 2016). O sítio catalítico desta família é altamente conservado e composto fundamentalmente por um motivo de aminoácidos conhecido como HEXXHXXGXXH (figura 5B.1), nomeada a partir da sequência geral de aminoácidos da estrutura (H é histidina, E é glutamato, G é glicina, e X é variavel). Nessa estrutura, três resíduos de histidina são responsáveis por coordenar o íon Zn^{2+}, junto com um resíduo de glutamato coordenando à uma molécula de água, formando a tríade catalítica necessária para a hidrólise da ligação peptídica dos substratos proteicos da enzima (figura 5B) (FELICIANO et al., 2015). O domínio carbóxi-terminal de hemopexina tem função regulatória, mediando o reconhecimento entre a enzima e o ambiente em que se encontra, direcionando sua ativação/inativação e localização tecidual (STRONGIN et al., 1995).

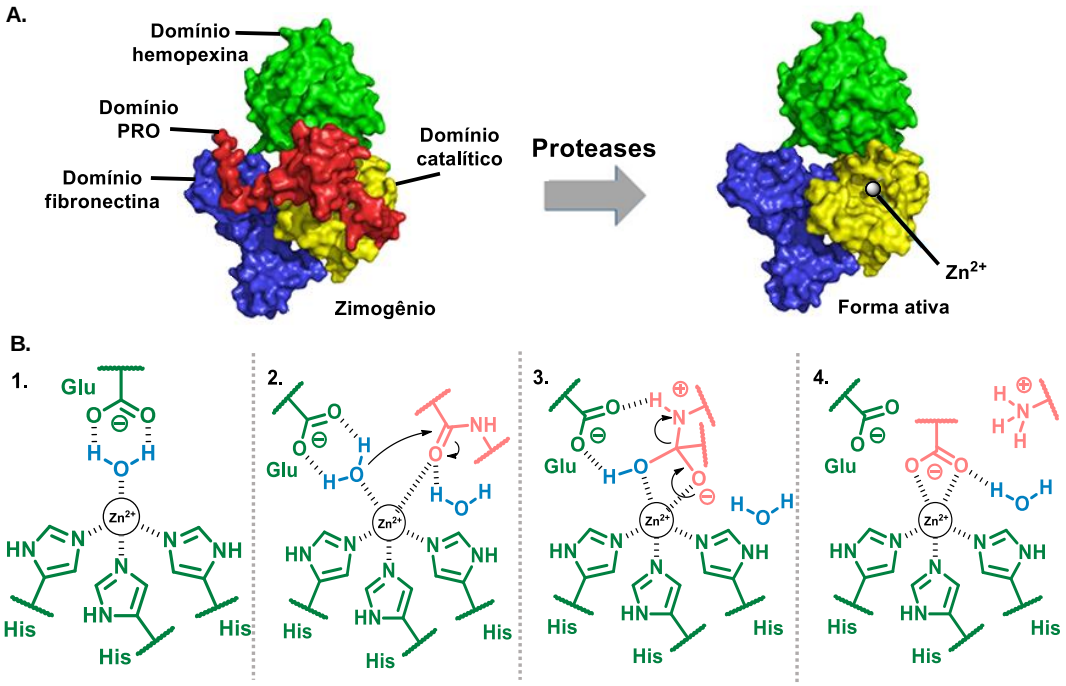


Figura 5. Representação da estrutura e mecanismo catalítico das MMP.**(A**) Estrutura de uma pró-MMP2 e sua correspondente forma ativa, com os domínios característicos em destaque. A clivagem do domínio PRO (em vermelho) torna o zinco catalítico acessível para interação com o substrato (NGUYEN et al., 2016). (**B**) Representação do mecanismo geral de hidrólise dos substratos pelas MMP. O íon zinco coordenado aos resíduos de histidina, junto à carboxila desprotonada do glutamato adjacente, formam o complexo catalítico da enzima, que favorece o ataque nucleofílico da molécula de àgua adjacente à ligação peptídica dos substratos. **1**: Forma ativa do domínio catalítico; **2**: Aproximação do substrato e ataque nucleofílico da água; **3:** Rearranjo eletrônico do substrato e formação dos produtos de hidrólise. **4**: Estado quiescente do domínio catalítico; posteriormente a estrutura se ajusta para sua forma ativa (FELICIANO et al., 2015).

A variabilidade estrutural das estruturas quaternárias das MMP propicia um conjunto de proteínas que os membros desta família podem degradar. As principais MMP estão divididas em subgrupos de acordo com o substrato a ser hidrolisado e a localização de cada enzima no tecido. As colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13) possuem o arquétipo da família intacto e são capazes de hidrolisar a tripla-hélice formada por fibras de colágeno. As estromelisinas (MMP3 e MMP10) também são capazes de degradar colágeno, entretanto sua função principal é a ativação de outras MMP. As gelatinases (MMP2 e MMP9) possuem domínios de fibronectina inseridos em seu bolsão catalítico, permitindo degradar formas desnaturadas e inespecíficas de colágeno (STERCHI et al., 2008; VANDENBROUCKE et al., 2014).

Outros subgrupos de MMP possuem diferentes domínios ligados ao arquétipo principal, levando a diferentes funções biológicas. MMP são reguladores da atividade celular e sua capacidade de degradar a matriz extracelular (MEC) influencia diversos processos fisiológicos como replicação, embriogênese, angiogênese, cicatrização, e crescimento ósseo. Além disso, a degradação de alguns componentes da MEC

promove a liberação de fatores quimiotácticos e de crescimento, que promovem mudanças no ambiente tecidual e regulam mecanismos pró/anti-inflamatórios. Dada a importância do papel fisiológico das MMP, é importante ressaltar que a regulação de sua atividade é exercida em nível transcricional/epigenético, na ativação do zimogênio, na compartimentalização de sua atividade, na expressão de inibidores endógenos (TIMP) e na degradação por estresse oxidativo (STERCHI et al., 2008; VANDENBROUCKE et al., 2014). Alterações em sua expressão e atividade estão associadas a diversas doenças crônicas inflamatórias como câncer, artrite, cardiopatias e obesidade (AZEVEDO et al., 2014).

No contexto do câncer, as metaloproteinases de matriz são importantes no desenvolvimento do microambiente tumoral. O remodelamento tecidual promovido pela ação das MMP é muito importante também para processos fisiopatológicos, especialmente na proliferação tumorigênica, invasão tecidual e metástase. No microambiente tumoral, as células neoplásicas são estimuladas a se proliferar e invadir tecidos periféricos em resposta a estímulos de fatores de crescimento, como EGF, VEGF, TGF-β e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e TNF-α (KESSENBROCK et al., 2010). Estes fatores do microambiente junto às células imunes atraídas, como macrófagos e neutrófilos, exacerbam a inflamação e estimulam angiogênese local promovendo crescimento tumoral e facilitando sua disseminação metastática. Sabe-se que a ação proteolítica de algumas MMP (MMP2, MMP9, MMP13) é responsável pela degradação de componentes estruturais da matriz extracelular (MEC), criando espaço para o crescimento do tumor. Além disso, precursores dos fatores de crescimento e citocinas acima citados também estão presentes no microambiente tumoral e são ativados pelas MMP da mesma maneira, estimulando direta e indiretamente o aumento da massa do tumor. A atividade desta família de enzimas encontra-se exacerbada em vários modelos da doença devido a um descontrole da expressão da enzima e seus moduladores em nível genético e/ou epigenético por parte das células tumorais, células imunes e estromais (KESSENBROCK et al., 2015).

Desde o princípio dos anos 2000 as MMP foram validadas como potencial alvo terapêutico e são estudadas para o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente para o tratamento do câncer. Neste sentido, compostos capazes de

inibir MMP são alvo de pesquisas, na tentativa de se obter novos agentes antitumorais (VANDENBROUCKE et al., 2014).

1.2.2.1 Inibidores de metaloproteinases de matriz (iMMP)

O mecanismo de hidrólise das MMP funciona de forma análoga ao das HDAC. Dessa forma, a coordenação do íon Zn^{2+} catalítico por um ligante simula o estado quiescente da enzima (figura 5B.4), mantendo-a inativa. Os primeiros inibidores de metaloproteinases de matriz (iMMP) levados a testes clínicos para o tratamento do câncer, foram os derivados hidroxâmicos ilomastate, batimastate e marimastate (figura 6). Todos eles apresentam em sua estrutura um arcabouço peptídico, com certa similaridade estrutural com o substrato natural das enzimas. Além disso, o ácido hidroxâmico presente nas estruturas tem a função de coordenar o zinco catalítico (VANDENBROUCKE et al., 2014).

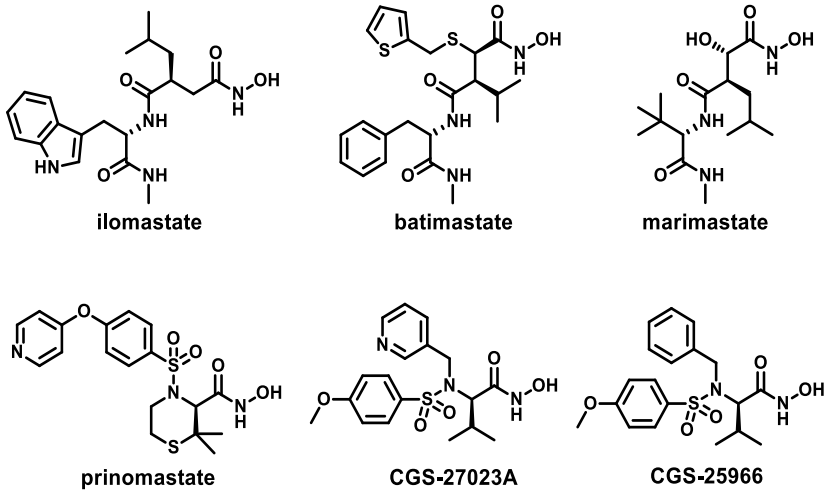


Figura 6. Estrutura dos principais iMMP levados à testes clínicos. A primeira geração (ilomastate, batimastate e marimastate) compreende inibidores de amplo espectro frente as MMP. A segunda geração (prinomastate, CGS-27023Ae CSG-25996) é formada por arcabouços aril-sulfonamídicos que auxiliam na maior seletividade destes compostos (VANDENBROUCKE et al., 2014).

Apesar da alta afinidade por MMP *in vitro* (todos com IC_{50} na faixa nM; VANDENBROUCKE et al., 2014), estes inibidores foram rejeitados para uso terapêutico devido à baixa biodisponibilidade oral e a ocorrência de efeitos adversos graves, como enrijecimento muscular, dor nas articulações e, em alguns casos, piora do quadro clínico (KESSENBROCK et al., 2015). Estas reações adversas foram atribuídas à falta de seletividade destes compostos frente às diferentes MMP. A pan-

inibição de MMP acarreta em uma inibição inespecífica de metzincinas importantes fisiologicamente, como as ADAM e outras MMP sem relação com o desenvolvimento do câncer (YANG et al., 2016). Além disso, estudos mostraram que a inibição de determinadas MMP, como MMP1, MMP3, MMP8 e MMP10, diminui a taxa de sobrevivência dos pacientes em diversos modelos de câncer, tornando-as anti-alvos (DUFOUR et al., 2013).

Buscando maior biodisponibilidade oral e seletividade para as MMP validadas como alvo para tratamento do câncer (MMP2, MMP9, MMP13), uma segunda geração de inibidores (prinomastate, CGS-27023A e CGS-25966) foi desenvolvida e submetida a testes clínicos (figura 6). Estes compostos mantêm o ácido hidroxâmico como ZBG, mas não apresentam o arcabouço peptídico característico da primeira geração, tornando-os mais disponíveis por via oral e com alguma seletividade frente às classes de MMP e outros tipos de metzincinas (PAVLAKI et al., 2003; BISSET et al., 2005).

Apesar de maior biodisponibilidade oral, os compostos de segunda geração apresentam problemas farmacocinéticos, decorrentes da presença do ácido hidroxâmico (MULDER et al., 1983), como baixa distribuição tecidual e alta taxa de biotransformação/eliminação, tornando necessário o aumento de dose para manutenção da eficácia (PAVLAKI et al., 2003; BISSET et al., 2005). O aumento de dose requerida provocou a inibição de outras MMP, incluindo aquelas denomindas anti-alvo, levando ao aparecimento dos efeitos adversos musculoesqueléticos e diminuição da eficácia terapêutica. Estes efeitos comprometeram a segurança dos estudos, levando os compostos da segunda geração de iMMP também à rejeição como tratamento para o câncer (PAVLAKI et al., 2003; BISSET et al., 2005).

Atualmente existem inibidores que apresentam alta seletividade e afinidade para determinadas MMP. Essa diferença de seletividade se deve principalmente à exploração da cavidade S1’ do domínio catalítico (figura 7), que apresenta pouca homologia entre as isoformas da enzima (SERRA, et al., 2012; ZAPICO et al., 2015). A utilização do ácido hidroxâmico como ZBG promove a alta afinidade destes inibidores frente à parte conservada do bolsão catalítico das MMP, enquanto os arcabouços aril-sulfonamídicos são conhecidos por proporcionar a melhor orientação espacial entre o ZBG e o grupo que ocupa a cavidade S1’ (região P1’). A complementaridade estrutural da região P1’ do ligante com a cavidade S1’ de cada isoforma da enzima determina a diferença de atividade entre as MMP e, portanto,

determina o índice de seletividade do inibidor. A coordenação do zinco catalítico com o ácido hidroxâmico do ligante é a interação mais forte e, de certa maneira, explica a afinidade dos inibidores conhecidos (ADHIKARI et al., 2017). Apesar de ser o ZBG mais eficaz, procura-se desenvolver iMMP que não possuam o ácido hidroxâmico em sua estrutura, a fim de evitar os problemas farmacocinéticos atrelados à sua utilização e evitar o ajuste de dose que foi a causa dos efeitos adversos que suspenderam os estudos clínicos (SELIVANOVA et al., 2013; NARA et al., 2017).

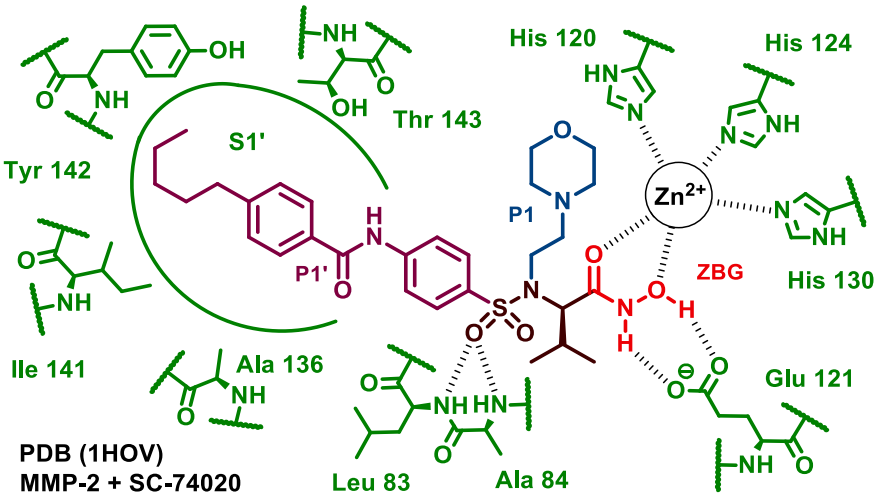


Figura 7. Representação bidimensional das principais interações do inibidor SC-74020 com a MMP-2 (FENG et al., 2002). O motivo catalítico HEXXHXXGXXH está representado pelos aminoácidos His120, Glu121, His124 e His130. Estes aminoácidos estabilizam o íon Zn^{2+}, bem como o complexo formado entre o metal e o ZGB (em vermelho). A porção aril-sulfonamídica do ligante (região P1', em roxo) é direcionada para o bolso S1' da enzima, encontrando aminoácidos hidrofóbicos como Ile141, Ala 36 e Tyr142. O grupo etil-morfolina (região P1, em azul) ligado ao nitrogênio sulfonamídico fica exposto ao solvente, promovendo maior hidrosolubilidade do ligante (ZAPICO et al., 2011).

Existem relatos que outras moléculas, com capacidade quelante, estão sendo testadas como potencias iMMP, incluindo fármacos exitentes como o antibiótico doxiciclina (periostate), que recentemente foi aprovado como tratamento da periodontite (SHAEHWARO et al., 2014). Apesar dos estudos persistirem, ainda não existe um iMMP produto de inovação total aprovado para tratamento do câncer, tornando o desenvolvimento de novos iMMP uma necessidade e um desafio (ADHIKARI et al., 2017).

1.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

O avanço no entendimento da progressão de diversas doenças, assim como o conhecimento da atividade biológica de ligantes naturais ou sintéticos, motiva e inspira o desenvolvimento de moléculas seguras e eficazes, capazes de serem implementadas como tratamento. Na busca por novos fármacos, é possível o desenvolvimento de uma entidade molecular totalmente inovadora ou a otimização de uma estrutura já existente com atividade conhecida. O planejamento racional é a diretriz que orienta de maneira sistemática este processo (figura 8) (SCHNEIDER et al., 2016).

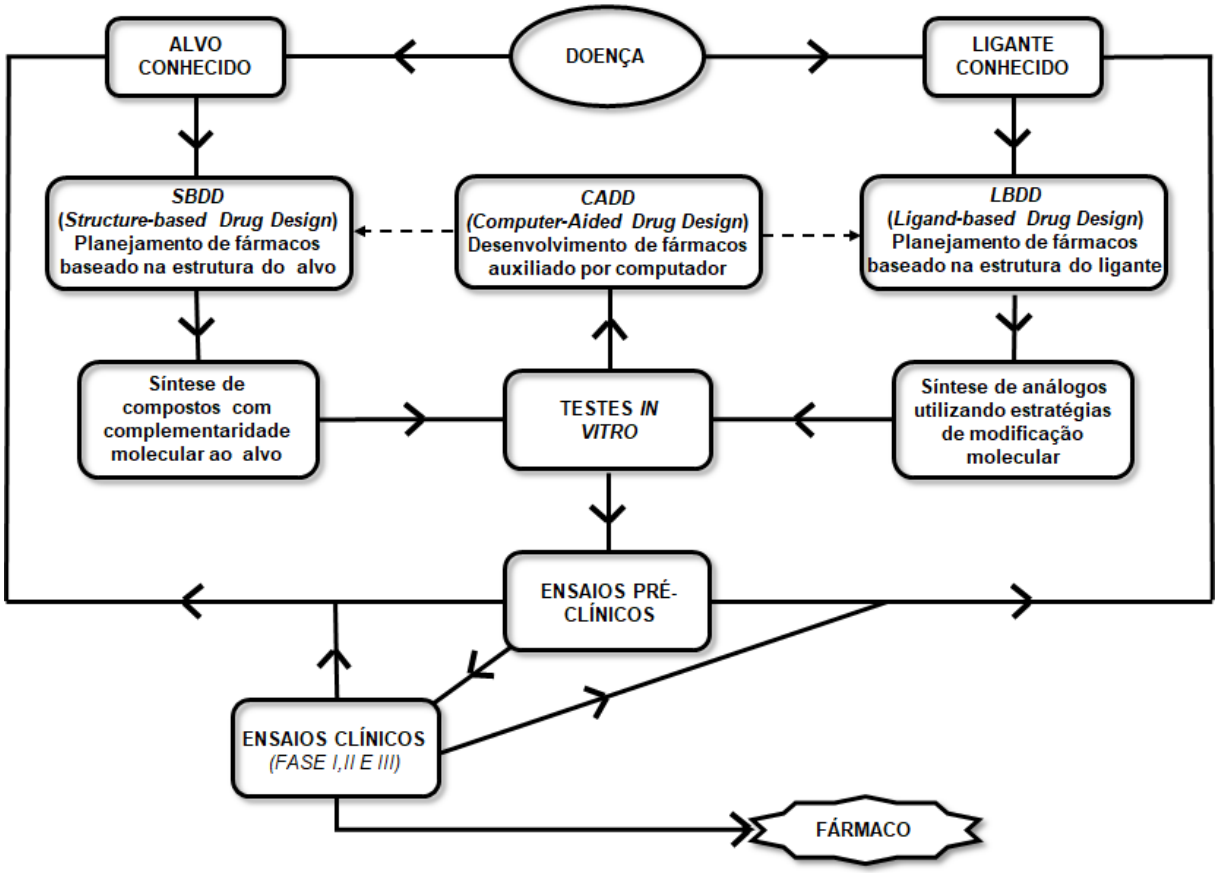


Figura 8. Fluxograma do desenvolvimento de novos fármacos, sob a lógica do planejamento racional (SCHNEIDER et al., 2016; LEELANDA et al., 2016).

O conhecimento da estrutura tridimensional de um alvo farmacológico, associado ao uso de ferramentas computacionais, permite que moléculas complementares ao alvo sejam idealizadas. Esta abordagem leva em consideração parâmetros estruturais e físico-químicos do alvo para orientar a complementaridade farmacodinâmica do ligante, e por isso é denominado planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo (em inglês, s*tructure-based drug design*, SBDD) (SCHNEIDER et al., 2016; LEELANDA et al., 2016).

Dados teóricos e experimentais sobre a estrutura química e a atividade biológica de ligantes conhecidos podem ser relacionados de maneira estatística, gerando modelos experimentais para orientar modificações nessas estruturas. Este tipo de abordagem é conhecido como planejamento de fármacos baseados no ligante (em inglês, *ligand-based drug design*, LBDD). Ambas abordagens são possibilitadas através do uso de ferramentas computacionais (em inglês, *computer-aided drug design*, CADD), que processam grandes volumes de dados, permitindo a construção de modelos para embasar e orientar as modificações e proposições estruturais, que podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos (SCHNEIDER et al., 2016; LEELANDA et al., 2016).

Modelos *in silico* orientam a síntese dos melhores candidatos e auxiliam no entendimento dos resultados experimentais de afinidade com o alvo e de eficácia terapêutica com modelos da doença. Estes estudos computacionais são de grande relevância, inspirando boa parte das modificações moleculares aplicadas na concepção de novos análogos. Os ensaios de atividade biológica recriam, de maneira aproximada e reprodutível, modelos *in vitro* e *in vivo* da doença estudada, sendo utilizados para comprovar e entender a atividade dos candidatos sintetizados. Uma vez comprovadas eficácia e segurança em testes pré-clínicos, finalmente o candidato a fármaco pode ser avaliado como opção terapêutica em estudos clínicos, sendo aplicado como tratamento em seres humanos (SCHNEIDER et al., 2016; LEELANDA et al., 2016; BARREIRO et al., 2002).

Se o planejamento racional é a diretriz que orienta o processo de desenvolvimento de novos fármacos, as modificações moleculares aliadas a diferentes estratégias sintéticas são as ferramentas com o qual esse processo é efetivamente executado. A diversidade estrutural necessária para que se estabeleçam arcabouços farmacofóricos e seus substituintes é gerada através de modificações como, adição de grupo volumoso, simplificação molecular, fechamento de anel, homologia de cadeia, bioisosterísmo, hibridação molecular, entre outras. Estas modificações são aplicadas na estrutura de moléculas ou fragmentos cuja atividade é conhecida previamente (PEDREIRA et al., 2019).

Conforme mencionado, a finalidade destas alterações depende da abordagem racional em que está sendo aplicada (SBDD ou LBDD), além da etapa de desenvolvimento do estudo. Em etapas avançadas, as modificações moleculares normalmente têm a finalidade de otimizar propriedades farmacocinéticas e

toxicocinéticas dos compostos líderes previamente desenvolvidos e testados (DUGGER et al., 2018).

Entre as estratégias de modificação, destaca-se o bioisosterismo e a hibridação molecular. O primeiro tem como estratégia principal a substituição de porções da estrutura do protótipo, por grupos estericamente ou eletronicamente semelhantes, porém com pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas que se refletem em alterações nas propriedades biológicas destes compostos (figura 9A; GAIKWAD et al., 2012). A hibridação molecular, por sua vez, consiste na união de dois ou mais arcabouços bioativos em uma estrutura comum, de forma que o híbrido resultante manterá, idealmente, a atividade correspondente aos arcabouços protótipos (figura 9B); VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

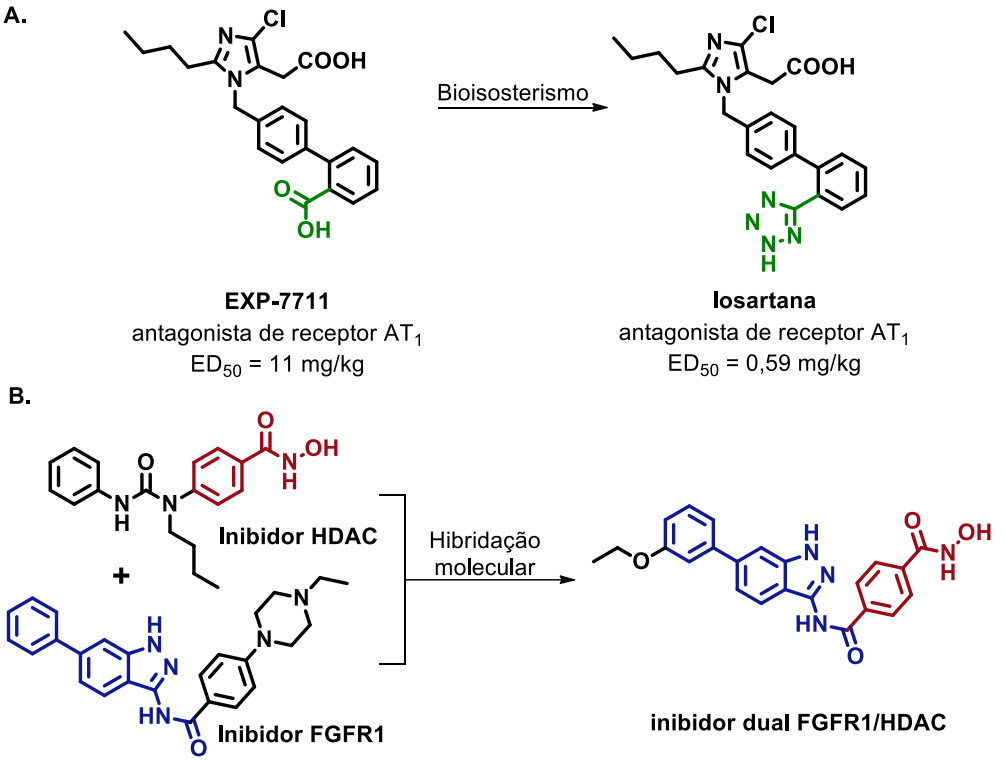


Figura 9. Exemplos de bioisosterismo e hibridação molecular aplicados ao desenvolvimento de novos fármacos. (**A**) Substituição bioisostérica (verde) do ácido carboxílico pelo anel tetrazol que resultou na descoberta da losartana, substância quase vinte vezes mais potente que o protótipo EXP-7711. (**B**) Exemplo de hibridação molecular aplicado no desenvolvimento de um inibidor dual FGFR1/HDAC. As porções fundamentais para a atividade dos protótipos estão destacadas em azul e vermelho (HESHAM et al., 2017; GAIKWAD et al., 2012).

Durante muito tempo, o foco das indústrias farmacêuticas e grupos de pesquisa no mundo inteiro estava em desenvolver a “bala mágica” (*magic bullet*, do inglês). Este termo se refere ao fármaco ideal, que age seletivamente em seu alvo de ação único, de forma a minimizar efeitos adversos inespecíficos frequentes na farmacologia

(DUNCAN et al., 1996). Entretanto, para algumas doenças extremamente complexas, como o câncer, a ação sobre um único alvo normalmente não é o suficiente para se alcançar eficácia, sendo necessário muitas vezes a associação de tratamentos para se obter algum sucesso terapêutico. Esta terapia combinada é potencialmente mais arriscada para o paciente, uma vez que são acumulados efeitos adversos característicos e inespecíficos de cada componente do tratamento, além da potencial interação farmacocinética entre eles (SAENZ-MENDEZ et al., 2018).

A fim de minimizar estes problemas, o conceito de ação dual ou em múltiplos alvos passou a ser uma alternativa no desenvolvimento de novos fármacos. A concepção de uma molécula que consiga agir seletivamente sobre mais de um alvo de interesse, através da união de arcabouços de diferentes classes de inibidores é um desafio complexo. A hibridação molecular e o bioisosterismo desempenham um papel fundamental neste processo, através dos quais são propostas e embasadas as adaptações estruturais necessárias para a união destes arcabouços (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; HESHAM et al., 2017).

No contexto do câncer, a concepção de inibidores duais é uma alternativa promissora, sendo o potencial antitumoral de compostos multialvo extensamente relatado na literatura. A atividade biológica de substâncias com ação dual em HDAC e MMP também foi descrita e mostra-se uma estratégia que deve ser explorada (HESHAM et al., 2017).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A multirresistência aos tratamentos quimioterápicos, inclusive tratamentos alvo-dirigidos, ainda é um desafio no tratamento do câncer (BOUMAHDI et al., 2019). Isso serve de motivação para a comunidade científica e indústria farmacêutica em desenvolver novas opções terapêuticas mais eficazes e seguras. O uso monoterápico de iHDAC se mostrou eficaz em combater a progressão de tumores hematológicos e linfáticos, mas com eficácia questionável no combate de tumores sólidos. A associação medicamentosa de iHDAC com outros tratamentos alvo-dirigidos demonstrou eficácia em combater linhagens tumorigênicas multirresistentes (HASSEL et al., 2019). Os iMMP são promissores candidatos a tratamento alvo-dirigidos para o câncer, reduzindo a migração celular e metástase. Entretanto, nenhum iMMP foi aprovado para o tratamento do câncer devido à falta de segurança e eficácia em testes clínicos (ADHIKARI et al., 2017). A concepção de um inibidor dual HDAC/MMP mostra potencialidade no combate de linhagens altamente invasivas em ensaios *in vitro*, consistindo em uma alternativa terapêutica possível (HESHAM et al., 2017; WANG et al., 2019; AMIN et al., 2017; HALDER et al., 2015). Ambas as classes de inibidores, iMMP e iHDAC, possuem em sua estrutura geral um ZBG comum, o qual representado pelo ácido hidroxâmico (ZHANG et al., 2018; CODD et al., 2008; ZAPICO et al., 2015). Parte dos problemas farmacocinéticos e toxicocinéticos relacionados ao uso clínico de destes inibidores é devido a problemas metabólicos decorrentes daquela função orgânica (BAHHAJ et al 2016; ADHIKARI et al., 2017). Assim, o desenvolvimento de iHDAC e iMMP não-hidroxamatos é item particularmente interessante para inovação no tratamento do câncer (SHAEHWARO et al., 2014; SUZUKI et al., 2005).

Frente ao contexto apresentado, o objetivo do presente trabalho foi o planejamento, síntese, modelagem molecular e avaliação biológica de novos potenciais inibidores duais HDAC/MMP não-hidroxamatos para o tratamento do câncer.

2.1 Objetivos específicos

- Planejar compostos híbridos não-hidroxamatos com potencial atividade inibitória dual HDAC/MMP;
- Realizar a síntese e caracterização dos análogos propostos, planejados por hibridação molecular e bioisosterismo;
- Ensaiar os compostos obtidos quanto a capacidade de redução da viabilidade e migração celular em linhagens neoplásicas T98G e HOG;
- Desenhar as estruturas dos compostos propostos e otimizar a geometria molecular com vistas à determinação de parâmetros físico-químicos relevantes para atividade biológica;
- Realizar estudos de *docking* molecular dos compostos nas enzimas HDAC e MMP e avaliar os perfis de interação com vistas ao estabelecimento REA;
- Avaliar experimentalmente a capacidade de coordenação de metais destes análogos.

3 Planejamento dos compostos

Os análogos propostos neste trabalho consistiram em derivados arilsulfonamídicos, planejados por hibridação molecular, a partir de arcabouços químicos com atividade conhecida frente às enzimas HDAC e MMP, almejando-se compostos com ação dual. Paralelamente, diferentes bioisósteros foram propostos como ZBG, e incorporados ao arcabouço arilsulfonamídico em diferentes posições de substituição, conforme ilustrado na figura 10.

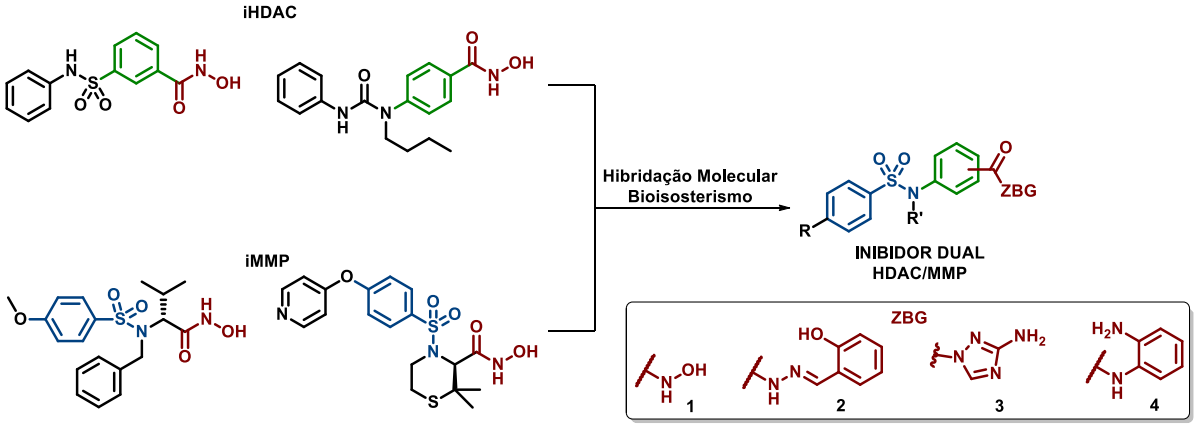


Figura 10. Planejamento dos análogos arilsulfonamídicos, destacando a concepção do arcabouço híbrido para potenciais inibidores duais HDAC/MMP. Grupos bioisostéricos 1, 2, 3 e 4, *orto, meta* ou *para* substituídos, foram planejados como alternativas estruturais ao ZBG ácido hidroxâmico. O grupo arilsulfonamídico (destacado em azul) promove maior afinidade para as MMP2 e MMP9 (ADHIKARI et al., 2017). A estrutura *N*-hidroxi benzamida dissubstituída em *para* e *meta* (destacado em verde) está presente em iHDAC seletivos para as HDAC6 e HDAC8 respectivamente (BANERJEE et al., 2019).

Conforme estabelecido, os iHDAC têm a sua estrutura dividida em três porções: O *"cap"*; o espaçante; e o ZBG (DRUMMOND et al., 2005). Estudos recentes demonstram que o grupo espaçante exerce influência sobre a seletividade destes inibidores frente às diferentes isoformas do alvo. Derivados do ácido benzo-hidroxâmico 1,3 e 1,4 dissubstituídos apresentam certa seletividade para as HDAC6 e HDAC8 respectivamente (BANERJEE et al., 2019; ZHAO et al., 2018).

Os iMMP por sua vez não possuem uma divisão formal em sua estrutura, sendo normalmente constituídos por derivados hidrôxamicos de α-aminoácidos, conectados a porções aromáticas e volumosas. Estudos comprovaram que grupos aril-sulfonamídicos promovem seletividade para a MMP2 e MMP9 (ADHIKARI et al., 2017). A *N*-substituição desta função por grupos alquílicos e volumosos é possível, de maneira que, apesar do papel inespecífico no modo de interação com a enzima, esta

porção da molécula é frequentemente usada como ponto para balanceamento das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (ZAPICO et al., 2015).

Ambos os arcabouços possuem o ácido hidroxâmico como ZBG, sendo este o ponto de partida para a concepção da estrutura híbrida. Derivados do ácido amino benzoico com diferentes padrões de substituição (*orto*, *meta* ou *para*) foram propostos como grupo espaçante, de forma a potencialmente direcionar a atividade em favor da inibição de HDAC (LI et al., 2015). A conexão do espaçante com grupos arilsulfonamídicos já foi reportado em iHDAC (ZHAO et al., 2018), representando uma possibilidade para a estrutura da região do *"cap"*. Conforme estabelecido, este arcabouço é utilizado em iMMP seletivos para MMP2 e MMP9. O derivado benzeno-sulfonamida foi proposto para esta porção, potencialmente direcionando a atividade inibitória dos análogos para as respectivas MMP. É possível também a substituição do nitrogênio sulfonamídico (R') por grupos alquílicos ou aromáticos, apesar de não ser essencial para atividade em nenhuma das isoformas em questão (ADHIKARI et al., 2017; BANERJEE et al., 2019). Entretanto, substituições em R e R´ (figura 10) foram evitadas para diminuir o número de compostos a serem sintetizados e melhor correlacionar estrutura química e atividade biológica. Em projeto futuro, estas modificações serão propostas.

A partir desta estrutura geral concebida, foi possível propor alterações na porção do ZBG, a fim de substituir o ácido hidroxâmico (ZBG-1). Inúmeros compostos com capacidade de coordenação do Zn^{2+} são reportadas em inibidores de metaloenzimas (VANDENBROUCKE et al., 2014; ZHANG et al., 2018). Tentando conciliar potência relativa, inovação estrutural e acessibilidade sintética, foram selecionadas alternativas estruturais ao ácido hidroxâmico (figura 10.). O grupo sacilcil acil-hidrazona (ZBG-2) é um potente ZBG encontrado no inibidor de caspase PAC-1 (PETERSON et al., 2009; SADHUKHAN et al., 2011). Esta estrutura apresenta diversas possibilidades de coordenação com metais, devido a abundância de heteroátomos em seu volumoso arcabouço. Grupos 1,2,4-triazóis têm capacidade de coordenação com metais estabelecida na literatura (MATHEW et al., 2008). Um derivado amínico desta estrutura já foi reportada como ZBG em um iMMP seletivo para MMP13, apresentando modo de interação monodentado (NARA et al., 2017). A conjugação deste grupo com uma carbonila adjacente adiciona um ponto a mais de interação na estrutura (ZBG-3). O grupo 2-amino anilida (ZBG-4) é um ZBG presente na estrutura do MS275 (figura 3), embora sua utilização em iMMP seja pouco

estudada. Seu modo de interação bidentado foi recentemente proposto, apresentando influência na seletividade entre as isoformas de HDAC (LAUFFER et al., 2013).

A combinação das três possibilidades de substituição do sistema amino-benzoico, com as quatro possibilidades de ZBG levam aos doze análogos propostos apresentados na figura 11. Estas estruturas foram divididas em três séries, de acordo com o padrão de substituição do espaçante (*orto, meta* ou *para*). A maioria dos compostos propostos nunca teve sua atividade antineoplásica avaliada, com exceção do hidroxamato 1,4 dissubstítuído (*p*-NT01; **3a**) que é inibidor conhecido e seletivo para HDAC da classe I (LAVOIE et al., 2001; BANERJEE et al., 2019). Sua inclusão na série planejada funciona como controle, uma vez que existem dados sobre a sua atividade que podem ser extrapolados e comparados com os outros análogos. Em relação à inovação estrutural dos demais, os compostos **4a** e **6b** foram sintetizados previamente (WANG et al., 2004; EL-KERDAWY et al., 1969).

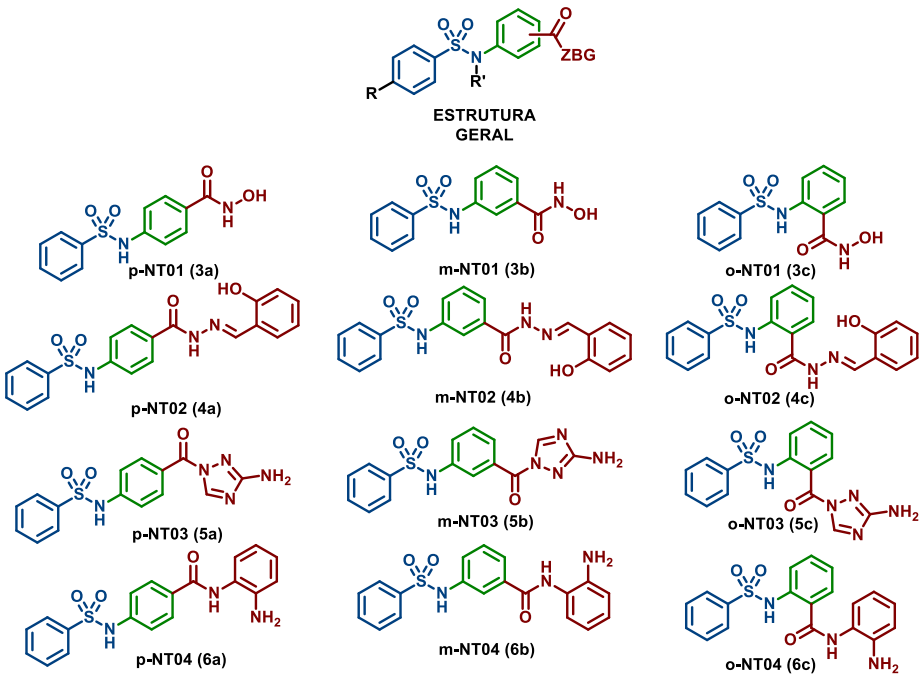
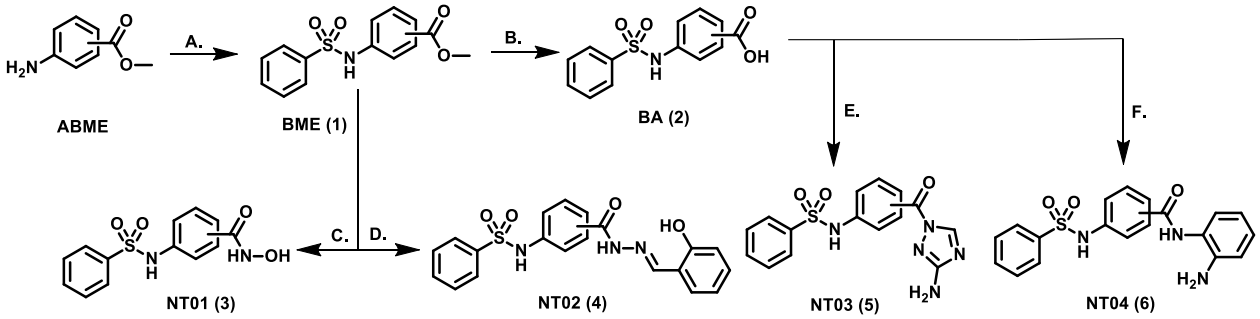


Figura 11. Estruturas dos análogos propostos. Foram divididos em três séries, de acordo com o padrão de substituição. A numeração ao lado do código se refere ao planejamento sintético.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANÁLOGOS

A síntese das moléculas propostas foi planejada de acordo com reações pré-estabelecidas na literatura e aplicadas na ordem específica utilizando os reagentes apropriados, como demonstrado a seguir (esquema 1). O ponto de partida para a síntese é o ácido amino-benzóico (*orto*, *meta* e *para* substituídos). Utilizando os respectivos ésteres metílicos destes derivados (ABME) é possível realizar a *N*-sulfonilação, formando o arcabouço principal dos análogos. Para construir os respectivos ZBG, o metil éster do intermediário 1 (BME) é funcionalizado de maneira apropriada, levando a formação dos diferentes compostos planejados.



Esquema 1 – A.) ABME (1,2 eq.), $PhSO_2Cl$ (1 eq.), Na_2CO_3 aq. (sat.), THF, H_2O, t.a. 6 h; B.) BME (1 eq.), KOH aq. (sat.), H_2O, rf. 4 h; C.) BME (1 eq.), NH_2OH (aq.; 8 eq.), NaOH (50% aq.), THF, MeOH, t.a. 2 h; D.) *i.* BME (1 eq.), NH_2NH_2 (80% aq.), MeOH, rf. 4 h ; *ii.* 2-OH PhCHO (1,2 eq.), AcOH (cat.), EtOH, t.a. 6 h; E.) BA (1 eq.), 3-ATR (1.1 eq.), EDC (1,2 eq.), DMAP (cat.), DCM, t.a. 4 h; F.) BA (1 eq.), 1,2-DAB (1.1 eq.), EDC (1,2 eq.), DMAP (cat.), DCM, t.a. 4 h. (UGWU et al., 2017; FENG et al., 2002; SADHUKHAN et al., 2011; TAVARES et al., 2017; LI et al., 2015; MANOS-TURVEY et al., 2015; CUNHA et al., 2016).

Os materiais e procedimentos utilizados, bem como os dados de caracterização dos compostos obtidos estão descritos em detalhes no tópico 6.1 da parte experimental e nos anexos 8.1, 8.2 e 8.3. Os resultados de síntese e pureza das moléculas estão resumidos a seguir:

Tabela 1. Resultados obtidos na síntese e caracterização dos compostos planejados.

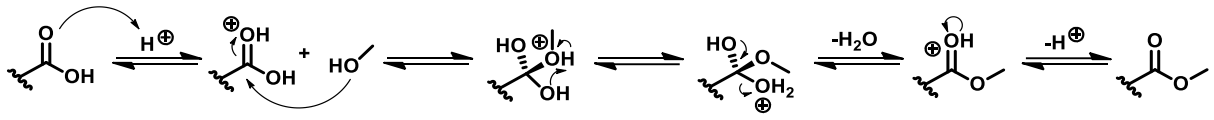
#	Compostos	Aspecto Físico	CLAE	Faixa de Fusão (ºC)		η (%)	
				Experimental	Literatura	Etapa	Global
1	*m*-ABME	Líquido púrpura	N.D.	N.D.	31-32[1]	81	-
2	*p*-BME (1a)	Sólido branco	t = 10,29 min, pureza > 99 %	N.D.	150-160[2]	79	-
3	*m*-BME (1b)	Sólido bege	t = 10,39 min, pureza > 97 %	N.D.	158-160[2]	94	76
4	*p*-BA (2a)	Cristais brancos	t = 9,17 min, pureza > 99 %	N.D.	186-188[3]	85	67
5	*m*-BA (2b)	Cristais brancos	t = 9,33 min, pureza > 97 %	N.D.	203-204[3]	95	72
6	*p*-NT01 (3a)	Cristais brancos	t = 8,17 min, pureza > 99 %	167-168	-[4]	47	37
7	*p*-NT02 (4a)	Cristais brancos	t = 10,45 min, pureza > 95 %	189–192	> 142[5]	67	53
8	*m*-NT02 (4b)	Cristais brancos	t = 10,50 min, pureza > 96 %	213–217	N.D.	56	43
9	*p*-NT03 (5a)	Sólido branco	t = 9,23 min, pureza > 97 %	N.D.	N.D.	42	28
10	*m*-NT03 (5b)	Sólido bege	t = 9,33 min, pureza > 95 %	N.D.	N.D.	40	29
11	*p*-NT04 (6a)	Sólido branco	t = 8,75 min, pureza > 95 %	210–212	N.D.	64	43
12	*m*-NT04 (6b)	Sólido bege	t = 8,82 min, pureza > 96 %	148–154	-[6]	45	32

[1] ROELL et al., 2019; [2] WYDYSH et al., 2009; [3] HEACOCK et al., 1960; [4] dado não obtido (LAVOIE et al., 2001) [5] EL-KERDAWY et al., 1969; [6] dado não obtido (WANG et al., 2004).

4.1.1. *o*, *m*-Amino benzoato de metila (ABME)

Conforme estabelecido anteriormente, o planejamento sintético dos compostos partiu dos metil-esteres amino benzóicos *orto*, *meta* e *para* substituídos. Apenas o derivado *para* substituído (*p*-ABME) estava prontamente disponível, sendo necessária a preparação prévia dos outros dois isômeros a partir dos correspondentes ácidos amino-benzóicos. A reação utilizada para este fim foi a esterificação de Fischer, promovendo a condensação do metanol com os ácidos carboxílicos, dessa maneira formando os materiais de partida necessários (FENG et al., 2002). Essa reação utiliza o metanol em refluxo como solvente/nucleófilo da reação, e normalmente ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador. O mecanismo de adição e eliminação desta reação (esquema 2) começa com um processo de catálise ácida: O H^+ proveniente do H_2SO_4 interage com o par de elétrons do oxigênio carbonílico, consequentemente

diminuindo a densidade eletrônica sobre o carbono adjacente. Este aumento do caráter eletrofílico é suficiente para promover o ataque do oxigênio do metanol ao carbono polarizado. A adição do metanol à carboxila ativada leva a formação de um intermediário tetraédrico que sofre rearranjo eletrônico subsequente, resultando na eliminação de H_2O, H^+ e formando o éster metílico desejado (VOLLHARDT et al., 2013).

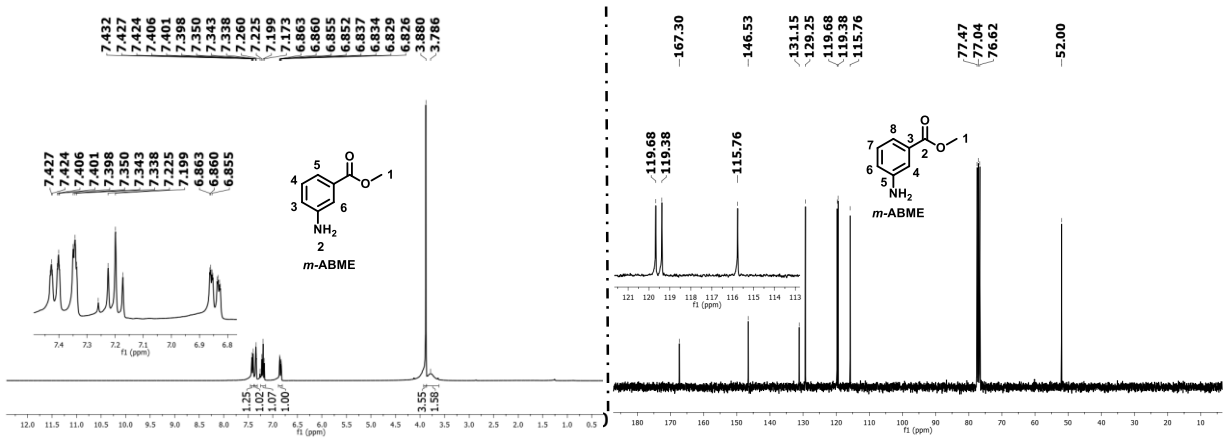


Esquema 2 – Representação do mecanismo reacional proposto para a esterificação de Fischer (VOLLHARDT et al., 2013)

Adaptação em relação à condição clássica foi necessária, uma vez que a função amino tem propriedades básicas e a quantidade catalítica de H^+ seria "sequestrada" do meio reacional dessa maneira. Aumentando a quantidade do H_2SO_4 para 1,1 equivalentes (eq.) em relação ao ácido carboxílico é uma forma de garantir que esta função amino esteja totalmente protonada e não interfira no processo (PIETRZAK et al., 2017). Os resultados gerados com esta reação tiveram caráter opostos: Enquanto o *m*-ABME foi obtido com rendimento (η = 81 %) um pouco abaixo do reportado pela literatura (FENG et al., 2002); não foi possível obter e purificar o composto *o*-ABME. Isto está possivelmente relacionado à qualidade do reagente, o qual não pode ser adquirido um novo em tempo hábil para finalização do trabalho. Devido ao tempo reduzido para a execução do projeto, não foi possível dar continuidade na série derivada do *o*-ABME. Sua obtenção deve continuar a ser estudada de forma a possibilitar a síntese dos análogos *orto* substituídos. O derivado *meta* substituído por sua vez foi obtido com na forma de um óleo viscoso púrpura. Foi purificado apenas utilizando neutralização e lavagem com $NaHCO_3$ (sat.), para remover o H_2SO_4 e o remanescente do material de partida. A literatura reporta que o ponto de fusão do *m*-ABME é em torno de 31 °C, esta informação é consistente com o aspecto físico observado no produto obtido (ROELL et al., 2019).

Os dados de RMN gerados para o *m*-ABME (anexo 8.1.1.), quando analisados e comparados aos da literatura (ROELL et al., 2019), confirmam sua obtenção. No espectro de ^1H RMN (figura 12) é possível observar os hidrogênios do anel aromático *meta* substituído, através do padrão de multiplicidade aparente dos sinais (dois dubletos, um tripleto e um singleto, distorcidos pelos acoplamentos a distância do

sistema) na região entre 7,41 e 6,85 ppm. Os sinais em 3,88 e 3,78 são referentes aos hidrogênios da metila e os ligados ao nitrogênio sulfonamídico respectivamente. No espectro de ^{13}C RMN, o sinal em 167,3 ppm é referente ao carbono carboxílico do éster metílico. Os sinais entre 146,5 e 115,8 ppm são referentes aos carbonos do anel aromático e o sinal em 52,0 ppm é referente ao carbono metílico.

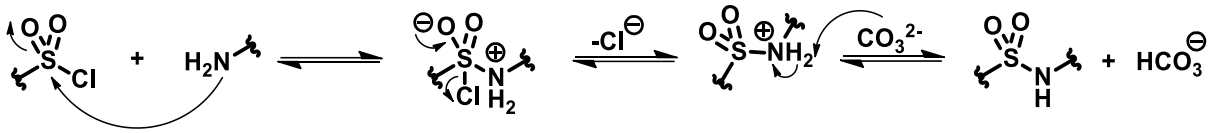


7,41 [ddd, *J* = 7,7; 2,4; 1,0 Hz 1H (H5)]; 7,34 [dd, *J* = 2,0, 1,6 Hz, 1H (H6)]; 7,20 [t, *J* = 7,8 Hz, 1H (H4)]; 6,84 [ddd, *J* = 8,0; 2,4; 0,9 Hz, 1H (H3)]; 3,88 [s, 3H (H1)]; 3,78 [sl, 2H (H2)]. RMN ^{13}C [75 MHz, $CDCl_3$] δ (ppm): 167,3 (C2); 146,53 (C5); 131,1 (C3); 129,2 (C8); 119,7 (C7); 119,4 (C4); 115,8 (C6); 52,0 (C1).

4.1.2. *m, p-* (Benzeno-sulfonamido) benzoato de metila (*m*, *p-* BME ou compostos 1a e 1b)

Foi iniciada a construção do arcabouço aril-sulfonamídico dos análogos planejados com a reação de *N*-sulfonilação dos *para* e *meta*-aminobenzoatos de metila. A reação utilizada para este fim foi uma adaptação das condições de Schotten-Baumann, utilizando cloreto de benzeno-sulfonila ($PhSO_2Cl$) como eletrófilo e carbonato de sódio (Na_2CO_3) como base (UGWU et al., 2017). A reação se processa em um sistema bifásico formado por THF e H_2O, de forma que todos os reagentes estejam solubilizados. O mecanismo da reação (esquema 3) se processa através do processo de adição e eliminação. O ataque nucleofílico do grupo amino do material de partida (*p*-ABME ou *m*-ABME) ao átomo de enxofre do $PhSO_2Cl$, leva a formação de um intermediário zwiteriônico que em seguida sofre rearranjo eletrônico, promovendo a eliminação de cloreto (Cl^-) e formação de um novo intermediário sulfonamídico com o nitrogênio ainda protonado. Este intermediário tem o seu próton acídico removido pelo íon carbonato (CO_3^{2-}), promovendo a formação de HCO_3^- e

CO_2, dessa maneira formando a função arilsulfonamida pretendida (VOLLHARDT et al., 2013).



Esquema 3 – Representação do mecanismo reacional proposto para a reação de sulfonilação (VOLLHARDT et al., 2013).

Os resultados e rendimentos obtidos com essa reação foram consistentes com o descrito para este tipo de procedimento (UGWU et al., 2017). O *p*-BME (1a) foi purificado apenas por precipitação com HCl 5 % e lavagem com H_2O, para remover o remanescente dos materiais de partida e produtos inorgânicos. O *m*-BME (1b) foi purificado adicionalmente por cromatografia em coluna (CC), devido a impurezas significantes em sua composição após o procedimento preliminar. Essa diferença pode ser explicada pela origem divergente dos materiais de partida, levando a discrepância no grau de pureza relativo: Enquanto o *p*-ABME foi obtido comercialmente, o *m*-ABME foi previamente preparado "*in house*", conforme reportado.

Os dados de RMN gerados para os compostos 1a e 1b (anexos 8.1.2 e 8.1.3 respectivamente), quando analisados e comparados aos da literatura (ROELL et al., 2019), confirmam a formação dos produtos planejados. Nos espectros de ^{1}H RMN é possível verificar os sinais em aproximadamente 10,65 ppm correspondentes ao hidrogênio ligado diretamente a função sulfonamida. Os hidrogênios do grupo fenil estão contribuindo para as integrais e desdobrando a forma dos multipletos na região dos hidrogênios aromáticos. No resultado referente ao composto 1a, os hidrogênios do arcabouço aromático *para* substituído pode ser evidenciado pelo padrão de multiplicidade dos sinais (dois dupletos) em 7,84 e 7.21 ppm (figura 13). No resultado referente ao composto 1b, é possível observar o padrão de multiplicidade característico do arcabouço aromático *meta* substituído (entre 7,78 e 7,37 ppm), distorcidos em multipletos devido a presença do grupo arilsulfonamídico. Nos espectros de ^{13}C RMN está evidente o sinal correspondente ao carbono carboxílico em aproximadamente 165,8 ppm, assim como os sinais referentes aos carbonos aromáticos na região entre 142,3 ppm e 118,2 ppm. O sinal em aproximadamente 52,3 ppm, em ambos os espectros, é referente ao carbono metílico.

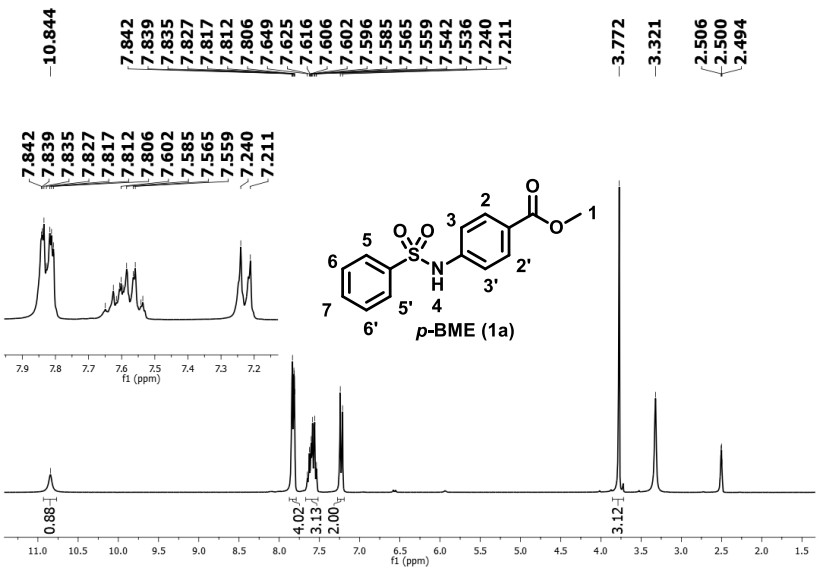
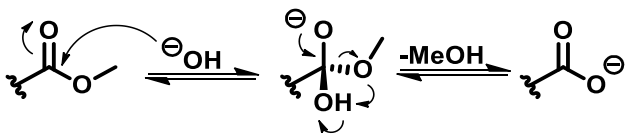


Figura 13. Espectro de ^{1}H RMN obtido para o composto *p*-BME (1a), representando o arcabouço arilsulfonamídico *para* substituído. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-d6] δ (ppm): 10,84 [sl,1H (H4)]; 7,84-7,80 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,60-7,55 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,23 [d, *J* = 8,7 Hz, 2H (H3, H3')]; 3,77 [s, 3H (H1)].

4.1.3. Ácido (*m*, *p*-benzeno sulfonamido) benzóico (*m*, *p*-BA ou compostos 2a e 2b)

Conforme estabelecido no planejamento sintético, a construção dos ZBG-3 e -4 é realizada a partir dos respectivos ácidos carboxílicos arilsulfonamídicos (*p*-BA e *m*-BA). A obtenção destes intermediários foi feita partindo dos ésteres metílicos (1a e 1b) sintetizados na etapa anterior. A hidrólise alcalina de ésteres geralmente ocorre em meio aquoso sob refluxo, utilizando uma base inorgânica forte (NaOH ou KOH). O mecanismo reacional (esquema 4) de adição e eliminação se inicia com ataque nucleofílico do hidróxido ao carbono carboxílico do material de partida, formando um intermediário tetraédrico aniônico que sofre rearranjo eletrônico, levando a eliminação de metanol e a formação do carboxilato correspondente (VOLLHARDT et al., 2013).



Esquema 4 – Representação do mecanismo de adição e eliminação da hidrólise alcalina do metil-ester (VOLLHARDT et al., 2013).

Os resultados obtidos com essa reação se processaram conforme o esperado e descrito pela literatura (MANOS-TURVEY et al., 2015), com rendimentos altos e sem

formação de coprodutos indesejados. Foi possível realizar a purificação adequada dos produtos formados, sem a necessidade extrações posteriores ou até mesmo mudança de balão. A neutralização do carboxilato formado junto ao excesso de KOH é feita a frio utilizando HCl p.a., a fim de minimizar a quantidade de H_2O adicionada. Após a dissolução à quente do precipitado formado, os produtos foram obtidos na forma de cristais com alto grau de pureza. O processo de recristalização aplicado é de alto interesse para produção industrial destes compostos, representando uma inovação em relação a obtenção das mesmas moléculas (WYDYSH et al., 2009), ou para este tipo de reação em geral (MANOS-TURVEY et al., 2015).

Os dados de RMN gerados para os análogos sintetizados 2a e 2b (anexos 8.1.4 e 8.1.5), quando comparados aos da literatura (WYDYSH et al., 2009) confirmam a obtenção dos mesmos. A comparação dos espectros com os obtidos para os respectivos ésteres 1a e 1b mostra a clara semelhança estrutural entre os mesmos. Nas análises de ^{1}H RMN (figura 14) o singleto largo referente ao ácido carboxílico em aproximadamente 12,8 ppm está presente nos espectros dos compostos 2a e 2b. Nos espectros de ^{13}C RMN, além do arcabouço arilsulfonamídico é possível evidenciar a hidrólise do material de partida através do desaparecimento do sinal referente ao carbono metílico em aproximadamente 52,7 ppm (compostos 1a e 1b). A desblindagem relativa esperada para o sinal correspondente ao carbono carboxílico não foi evidente.

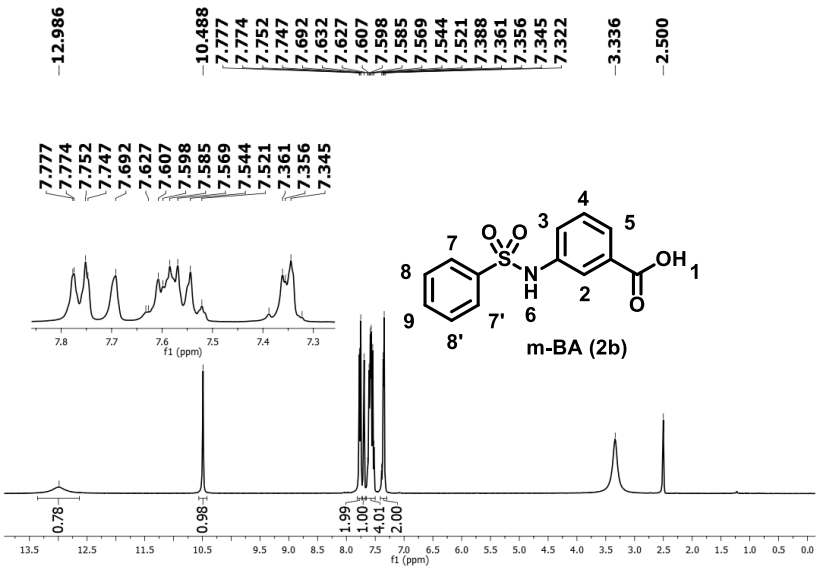
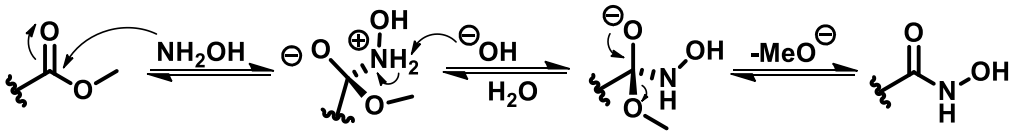


Figura 14 – Espectro de ^{1}H RMN obtido para o compostos 2b, representando o arcabouço arilsulfonamídico *meta* substituído: ^{1}H RMN [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,99 [sl, 1H (H1)]; 10,49 [sl, 1H (H6)]; 7,76 [dt, *J* = 7,9; 1,1 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,70 [s, 1H (H2)]; 7,63-7,52 [m, 4H (H5, H8, H8', H9)]; 7,36-7,34 [m, 2H (H3, H4)].

4.1.4 *N*-Hidróxi (benzeno sulfonamido) benzamida (*m, p*-NT01, compostos 3a e 3b)

Para a construção do ácido hidroxâmico (ZBG-1) foi realizada a hidróxiaminólise do éster metílico, presente na estrutura dos compostos 1a (*p*-BME) e 1b (*m*-BME), utilizando solução aquosa de hidroxilamina (NH_2OH) 50 % p/v como fonte do nucleófilo e NaOH como base. A mistura de THF e metanol utilizada como solvente promove a dissolução adequada dos reagentes, favorecendo a reação. O mecanismo reacional de adição e eliminação (esquema 5) se inicia com o ataque nucleofílico do nitrogênio hidroxilamínico ao carbono carboxílico dos materiais de partida, levando a formação de um intermediário tetraédrico zwiteriônico que sofre neutralização e rearranjo eletrônico, culminando na eliminação do íon metóxido (MeO-) e formação do hidroxamato correspondente.

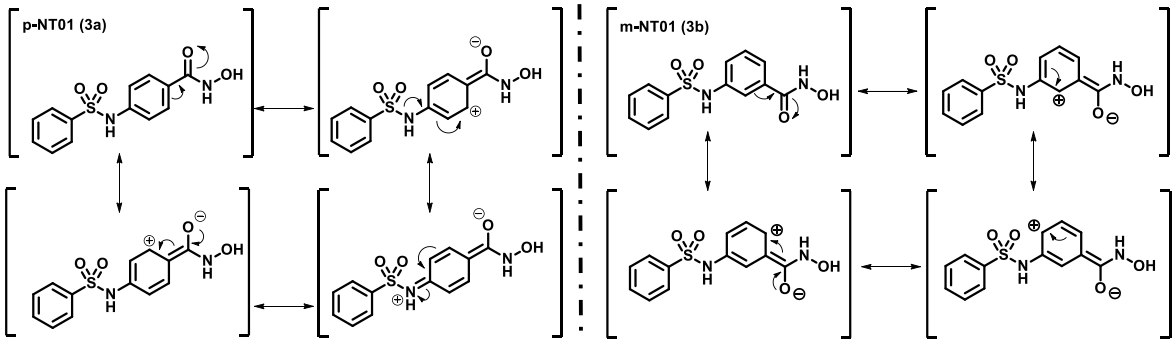


Esquema 5 – Representação do mecanismo reacional de adição e eliminação proposto para a hidróxiaminólise do éster metílico (VOLLHARDT et al., 2013).

Os resultados obtidos com esta reação apresentaram algumas inconsistências em comparação ao reportado na literatura (TAVARES et al., 2017): O *p*-NT01 (3a) foi obtido com o rendimento abaixo do esperado, purificado por recristalização em DCM e metanol. Este resultado pode ser explicado pelo procedimento de purificação utilizado. Apesar de ter provido cristais de alta pureza, boa parte do produto obtido se manteve dissolvido na solução-mãe. Entretanto a eficiência, praticidade e sustentabilidade deste tipo de purificação, em relação a cromatografia tradicional, o torna extremamente relevante e bem-vindo para a obtenção do produto correspondente. Não foi possível a obtenção do *m*-NT01 (3b), mesmo utilizando cromatografia em coluna de fase reversa como alternativa para o método de purificação. Entretanto, aparentemente o composto se mostrou sensível aos materiais utilizados na fase móvel, de forma que a estrutura do produto isolado ao final da cromatografia correspondia ao ácido carboxílico 2b. A hipótese criada para este fato é que a mistura da fase móvel (H_2O e 1 % de TFA) foi capaz de hidrolisar o hidroxamato formado durante o processo de purificação. Uma análise comparativa (esquema 6) das estruturas canônicas de ressonância dos compostos 3a e 3b

evidenciam o caráter eletrofílico acentuado do derivado *meta* substituído em relação ao *para*, corroborando a hipótese da hidrólise do produto formado.

Os dados de RMN gerados para o composto 3a (anexo 8.1.6), quando comparados aos reportados na literatura (LAVOIE et al., 2001) confirmam a sua obtenção. No espectro de ^{1}H RMN além dos sinais referentes aos hidrogênios do arcabouço arilsulfonamídico, igualmente presentes no espectro do material de partida (1a), é possível observar os sinais correspondentes aos hidrogênios do ácido hidroxâmico em 11,02 e 10,63 ppm. No espectro de ^{13}C RMN é possível observar todos os sinais referentes ao arcabouço aril-sulfonamídico, sem a presença do sinal pertencente ao éster metílico (51,82 ppm, *p*-BME) do material de partida, de modo que este espectro é praticamente igual ao correspondente ácido carboxílico (*p*-BA, 2a). Apesar do sucesso na obtenção do composto 3a, ainda é necessário o desenvolvimento de um método de purificação eficiente para a obtenção do análogo inédito 3b.

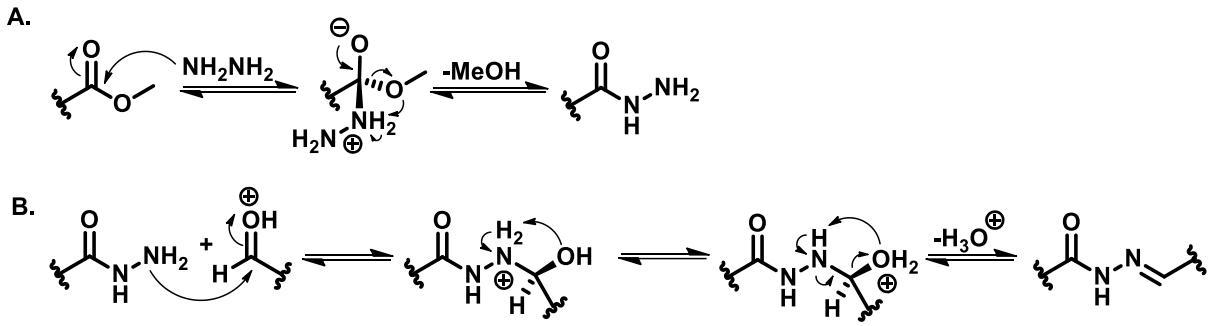


Esquema 6 – Representação das estruturas canônicas de ressonância para os compostos 3a e 3b. A participação do nitrogênio sulfonamídico na estabilização do hibrido, torna a carbonila do composto *para* substituído menos eletrofílica, dessa forma, diminuindo a reatividade da mesma em ralação à do análogo 3b (VOLLHARDT et al., 2013).

4.1.5. Salicilal (benzeno sulfonamido)-benzoil hidrazona (NT02, 4.)

A formação da salicil acil-hidrazona (ZBG-2) foi realizada em duas etapas, em um protocolo concebido através da adaptação de procedimentos semelhantes reportados na literatura (SADHUKHAN et al., 2011; CUNHA et al., 2016). A primeira etapa consiste na hidrazinólise do metil-éster dos compóstos 1a (*p*-BME) e 1b (*m*-BME), utilizando hidrazina (NH_2NH_2) aquosa em refluxo, levando a formação dos respectivos intermediários hidrazídicos. O mecanismo reacional (esquema 7.A.) de adição e eliminação da hidrazinólise começa com o ataque nucleofílico no nitrogênio

hidrazínico ao carbono carboxílico dos materiais de partida, levando a formação de um intermediário zwiteriônico que sofre rearranjo subsequente, culminando na eliminação de metanol e formação das hidrazidas correspondentes. Na segunda etapa é promovida a condensação dos intermediários formados com o salicilaldeído (2-OH PhCHO), utilizando ácido acético como catalizador, levando a obtenção das respectivas salicil-hidrazonas *p*-NT04 (4a) e *m*-NT04 (4b). O mecanismo reacional da etapa de condensação (esquema 7.B.) se inicia com a catalise ácida. O H^+ proveniente do ácido acético interage com o par de elétrons do oxigênio aldoxílico do salicilaldeído, diminuindo a densidade eletrônica sobre o carbono vizinho. O ataque nucleofílico do nitrogênio terminal dos intermediários ao carbono polarizado do salicilaldeído, leva a formação de um intermediário hemiaminal catiônico que sofre tautomerismo e rearranjo subsequente, culminando na eliminação de H_2O e formação da ligação imina dos compostos desejados (VOLLHARDT et al., 2013).



Esquema 7 – Representação do mecanismo reacional proposto, em duas etapas, para a formação das acil-hidrazonas planejadas (compostos 4a e 4b). (VOLLHARDT et al., 2013).

Os resultados observados com este procedimento adaptado se processaram conforme o esperado, com rendimentos um pouco abaixo (4a: η= 67 %; 4b: η= 56 %) do reportado na literatura para este tipo de reação (SADHUKHAN et al., 2011; CUNHA et al., 2016). A intensa reatividade do núcleófilo, utilizado na primeira etapa, frente ao salicilaldeído justifica a necessidade de realizar este procedimento em duas etapas (SILVA et al., 2016). A lavagem do intermediário com H_2O tem a finalidade de remover qualquer excesso de hidrazina proveniente da etapa anterior. Foi possível realizar a purificação dos compostos obtidos ao final da segunda etapa sem a necessidade de cromatografia, por meio da lavagem do excesso do salicilaldeído com $NaHSO_3$ (sat.) e recristalização subsequente utilizando DCM e metanol. Conforme mencionado anteriormente, o rendimento um pouco abaixo do esperado pode estar relacionado com o procedimento de recristalização. Os compostos 4a e 4b foram obtidos com

rendimento aceitável, na forma de cristais com alto grau de pureza, de forma que o procedimento aplicado se mostrou eficiente.

Não existem dados experimentais de RMN reportados na literatura para os análogos obtidos. Dessa forma, a comprovação da formação do ZBG-2 foi realizada através da comparação dos dados gerados (anexo 8.1.7 e 8.1.8) com os reportados para outras salicil-hidrazonas (SADHUKHAN et al., 2011). A estrutura formada possui uma ligação imina que está sujeita ao efeito de isomeria geométrica, de forma que é possível a obtenção de moléculas diferentes apesar da mesma estrutura química. A literatura descreve que apenas o isômero (*E*) apresenta propriedades quelantes, sendo esta a configuração pretendida para esta ligação dos compostos planejados (SADHUKHAN et al., 2011). Os dados da literatura, utilizados para conceber o método reacional desta etapa, se mostraram eficientes em produzir o isômero de interesse de maneira seletiva (CUNHA et al., 2016). Na análise de ^{1}H RMN dos compostos obtidos o sinal referente ao hidrogênio hidrazônico pode ser utilizado como ponto de referência para a verificação da estereosseletividade da reação, uma vez que o deslocamento químico deste sinal entre os isômeros é comprovadamente diferente (CUNHA et al., 2016; SADHUKHAN et al., 2011). Nos dados de ^{1}H RMN gerados para os compostos *p*-NT02 (4a) e *m*-NT02 (4b) (figura 15) é possível observar o sinal correspondente ao hidrogênio em questão (8,58 e 8,61 ppm, respectivamente). A forma como ele se apresenta e a ausência de pares com deslocamento próximo, é uma forte evidência da obtenção esterosseletiva de apenas um destes isômeros. Entretanto, sem a análise comparativa com um espectro gerado utilizando um padrão com de configuração geométrica definida, apenas o valor de deslocamento não é o suficiente para determinar qual dos isômeros foi obtido preferencialmente. Em relação ao resto do arcabouço é possível observar o sinal referente ao hidrogênio fenólico em 11,95 e 12,04 ppm, próximo aos sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos nitrogênios das funções amida (11,28 e 11,22 ppm) e sulfonamida (10,76 e 10,52 ppm). Na região dos hidrogênios aromáticos não foi possível observar o padrão de multiplicidade característico dos hidrogênios do arcabouço salicílico, uma vez que os mesmos coalesceram com os sinais do arcabouço aril sulfonamídico gerando multipletos. Nos espectros de ^{13}C RMN é possível observar o sinal referente ao carbono imínico em 157,4 ppm, próximo dos sinais referentes ao carbono carbonílico (162,2 e 162,3 ppm) e ao carbono fenólico (148,6 e 148,1 ppm). Os demais sinais são

correspondentes aos carbonos pertencentes aos anéis aromáticos dos compostos planejados.

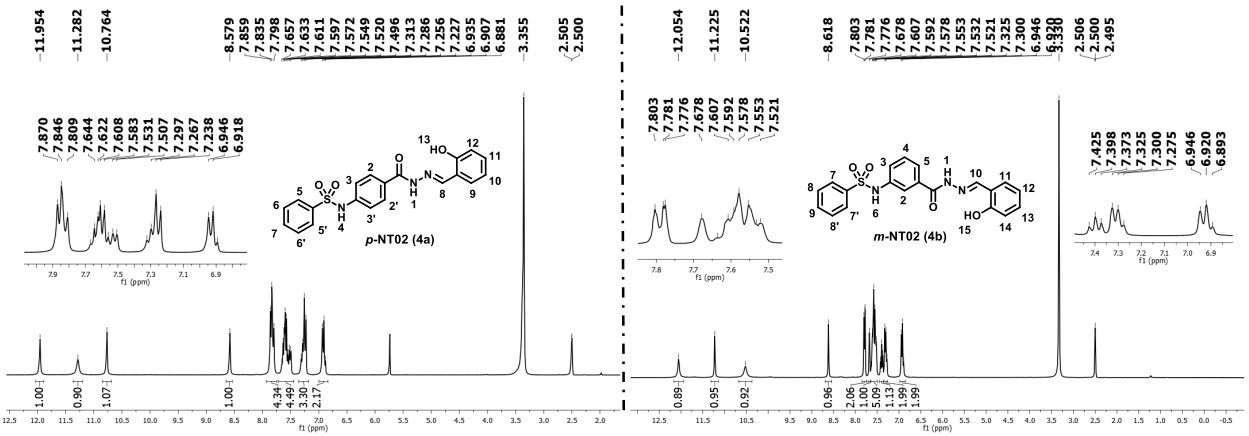
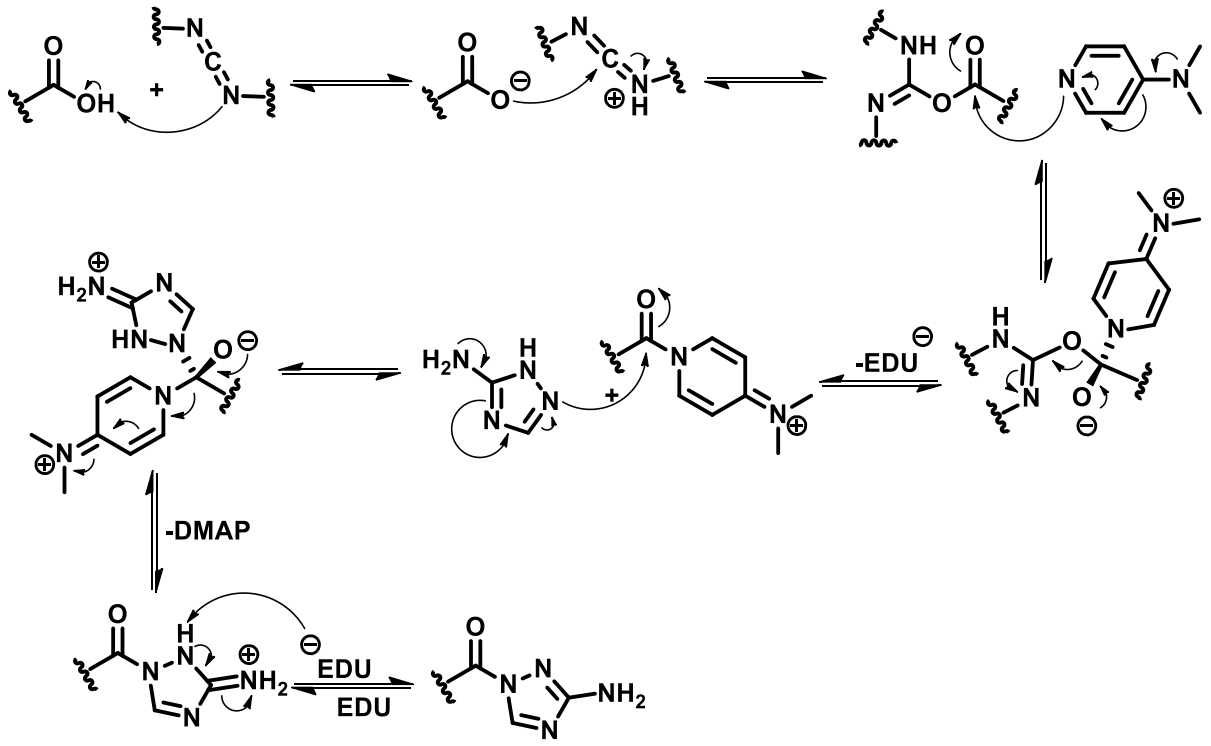


Figura 15 – Espectros de ^{1}H RMN obtidos para os compostos 4a e 4b, representando o ZBG-2 (salicilal-acil-hidrazona). 4a: RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 11,95 [sl, 1H (H13)]; 11,28 [sl, 1H, (H1)] 10,76 [sl, 1H (H4)]; 8,58 [s, 1H (H8)]; 7,87-7,81 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,64-7,50 [m, 3H (H6, H6', H7, H12)]; 7,30-7,23 [m, 3H (H3, H3', H9)]; 6,94-6,91 [m, 2H (H10, H11)]. 4b: RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,04 [sl, 1H (H15)]; 11,22 [sl, 1H (H1)]; 10,52 [sl, 1H (H6)]; 8,61 [s, 1H (H10)]; 7,80-7,78 [m, 2H (H7, H7')]; 7,67 [s, 1H (H2)]; 7,60-7,55 [m, 5H (H5, H8, H8', H9, H14)]; 7,42-7,37 [t, *J*= 7,8 Hz, 1H (H4)]; 7,32-7,27 [m, 2H (H11, H13)]; 6,95-6,89 [m, 2H (H3, H12)].

4.1.6. 3-Amino (*N*2 (*m, p*-benzeno sulfonamido)-benzamida)-1,2,4-triazol (NT03, 5.)

A formação do *N*-acil (3-amino) 1,2,4 triazol (ZBG-3) foi realizada através da condesação do ácido carboxílico, presente na estrutura dos compostos 2a (*p*-BA) e 2b (*m*-BA), utilizando EDC e DMAP como agentes condensantes e o 3-amino 1,2,4 triazol (3-ATR) como nucleófilo (LI et al., 2015). Diferente das reações apresentados anteriormente, a condensação de Steglich envolve um mecanismo reacional complexo, com formação de diversos intermediários mais reativos que proporcionam a condensação do ácido carboxílico com um nucleófilo pertinente (SHEHAN et al., 1955). O mecanismo proposto para a reação (esquema 8) se inicia com a abstração do próton carboxílico dos materiais de partida (2a e 2b) por um dos nitrogênios carbodiímidicos do EDC. As cargas geradas polarizam a ligação carbodiimida levando ao ataque nucleofílico do oxigênio carboxilato ao carbono central do agente condensante. Em seguida o carbono carboxílico (agora pertencente ao intermediário O-acil ureato) sofre um ataque nucleofílico do nitrogênio heterocíclico do DMAP, formando um intermediário tetraédrico zwiteriônico que sofre eliminação subsequente, levando a eliminação de ureato e a formação d um novo intermediário *N*-acil piridínio. Esta espécie altamente eletrofílica tem o carbono carbolixico atacado

nucleofílicamente pelo nitrogênio heterociclico (*N*1; figura 16.A.) do amino-triazol, levando à um novo intermediário tetraédrico zwitteriônico que após rearranjo e regeneração do catalizador (DMAP), leva a formação do último intermediário (*N*-acil 1,2,4 triazólio). A neutralização da carga da estrutura formada é feita pelo ureato gerado no início do mecanismo (VOLLHARDT et al., 2013).



Esquema 8 – Representação do mecanismo reacional proposto para a condensação dos compostos 2a e 2b com o 3-ATR (SHEHAN et al., 1955; VOLLHARDT et al., 2013).

Os resultados obtidos com essa reação se processaram conforme o descrito na literatura (LI et al., 2015), de forma que foi possível obter os compostos *p*-NT03 (5a) e *m*-NT03 (5b) com rendimentos moderados (η= 42 e 40 % respectivamente). A utilização do EDC como agente condensante (entre outras opções de carbodiímidas) foi feita devido a suas propriedades básicas, similares ao DMAP, dessa forma uma partição com solução aquosa tamponada em pH apropriado teoricamente é capaz de separar os coprodutos do composto desejado. Uma rápida análise dos pKa (anexo 8.5) das espécies envolvidas mostrou que em pH 5,4 é possível extrair para a fase aquosa os sais de amina correspondentes aos subprodutos, enquanto a maior parte do produto desejado permanece na fase orgânica na forma de base-livre. Mesmo com a utilização deste procedimento para a purificação dos compostos 5a e 5b, o material resultante ainda apresentava impurezas significativas. Dessa forma, foi necessária a

utilização de cromatografia em coluna de fase reversa para efetivamente purificar os compostos desejados.

Os dados iniciais de ^{1}H RMN obtidos para os compostos 5a e 5b (anexos 8.1.9 e 8.1.10) foram controversos, uma vez q boa parte dos sinais coalesceu em um multipleto na região dos hidrogênios aromáticos, impossibilitando a atribuição correta da estrutura formada. Os resultados de ^{13}C RMN por sua vez, corresponderam ao que seria esperado para as respectivas estruturas dos produtos. Essa inconsistência nos resultados motivou a busca por outras análises que poderiam auxiliar na elucidação estrutural dos compostos formados. Uma análise de LC/MS (anexo 8.3) correspondeu com a massa teórica dos análogos pretendidos (NT03: 343,36 g/mol; m/z $[M+H]^{+}$=344,08) comprovando a obtenção dos mesmos. Mapas de contorno Hetcorr e HMBC foram gerados para o composto 5a (figura 16.B.) o como forma de possibilitar a atribuição dos sinais observados nos espectros de ^{1}H e ^{13}C RMN. Uma discussão estrutural que ainda estava em aberto, era sobre as diferentes possibilidades de ataque nucleofílico do 3-ATR, possibilitando diferentes alternativas de isômeros de substituição no produto. Estudos mecanísticos sobre a reação reportada (CHERNYSHEV et al., 2015) mostram que a adição do 3-ATR é realizada via ataque nucleofílico do *N*1 (figura 16A.). Uma evidência deste processo pôde ser observada nos resultados obtidos experimentalmente: ao se comparar os deslocamentos químicos dos carbonos do 3-ATR, com os correspondentes calculados para as estruturas dos possíveis produtos formados (figura 16.A.). Entretanto, dado o caráter inédito das possíveis moléculas obtidas, os resultados ainda não provam de maneira definitiva que as estruturas correspondentes foram efetivamente formadas, sendo necessário mais investigações nesse sentido. Apesar da controvérsia sobre a elucidação estrutural dos compostos em questão, os mesmos foram obtidos em quantidade e pureza adequados para serem avaliados em ensaios biológicos.

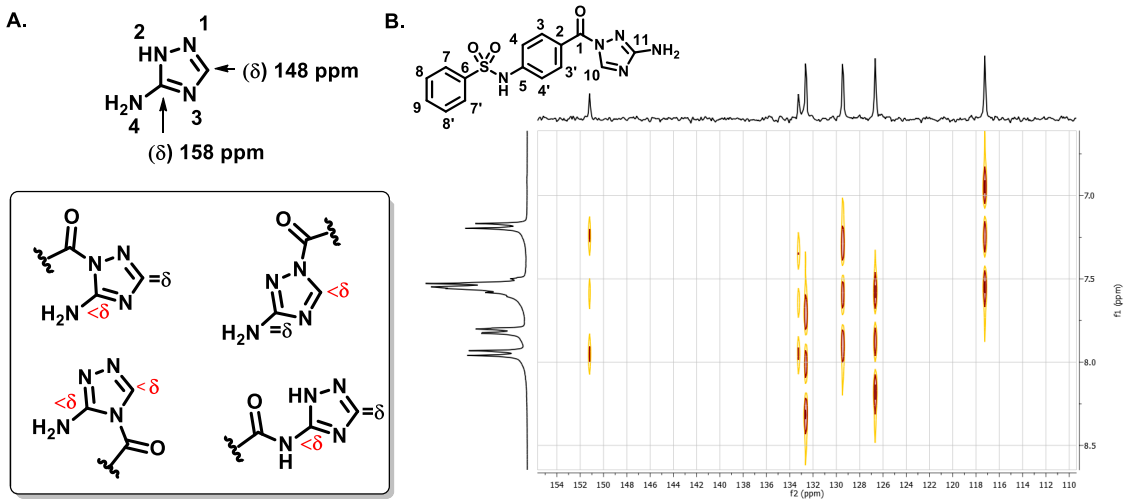
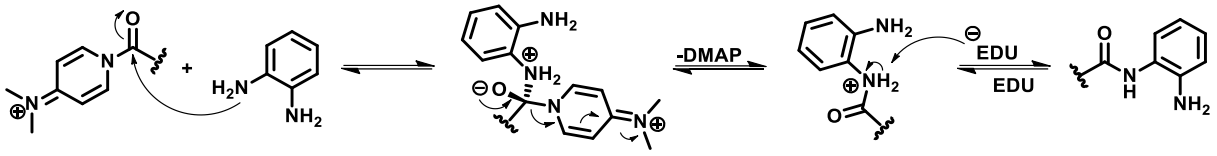


Figura 16 – Discussão sobre a acilação 3-amino 1,2,4- triazol. A.). Os deslocamentos (δ) apresentados são referentes aos dados obtidos experimentalmente para os carbonos do 3-ATR. Abaixo estão representadas as possibilidades de produtos formados, e os respectivos efeitos esperados nos deslocamentos químicos dos carbonos correspondentes (CHERNYSHEV et al., 2015). B.) Mapa de contorno Hetcorr^{13}C/ ^{1}H RMN [75/ 300 MHz] para o produto obtido. O efeito observado sobre os deslocamentos químicos dos carbonos correspondentes é condizente com a estrutura indicada. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,6 (C1); 158,3 (C11); 151,2 (C10); 142,2 (C2); 139,3 (C6); 133,2 (C9); 132,6 (C3, C3'); 129,5 (C7, C7'); 126,7 (C8, C8'); 126,3 (C5); 117,2 (C4, C4').

4.1.7. 2-Amino ((benzeno sulfonamido)-benzoil) benzamida (NT04, 6.)

A formação da 2-amino anilida (ZBG-4) foi realizada de forma semelhante aos amino-triazóis (ZBG-3), partindo-se dos compostos *p*-BA (2a) e *m*-BA (2b) previamente obtidos. O mesmo procedimento de condensação foi utilizado, apenas adaptando a fonte de amina para o 2-diamino benzeno (1,2-DAB). O mecanismo reacional proposto (esquema 9) é similar ao previamente discutido, diferindo apenas na estrutura do nucleófilo adicionado bem como na estrutura do produto formado (VOLLHARDT et al., 2013). Os resultados obtidos com esta reação se processaram de maneira similar ao reportado para os compostos *p*-NT03 (5a) e *m*-NT03 (5b) (LI et al., 2015). O mesmo procedimento de purificação preliminar foi aplicado, utilizando uma solução tampão em pH 5,4, obtendo-se os mesmos problemas em relação a persistência dos subprodutos no material resultante. A subsequente cromatografia em coluna de fase reversa foi eficiente em remover as impurezas indesejadas, levando a obtenção dos produtos planejados *p*-NT04 (6a) e *m*-NT04 (6b) com pureza adequada.



Esquema 9 – Representação da última etapa do mecanismo reacional proposto para a formação dos compostos 6a e 6b (SHEHAN et al., 1955; VOLLHARDT et al., 2013).

Os dados de RMN dos compostos 6a e 6b (anexos 8.1.11 e 8.1.12) são consistentes com os encontrados na literatura (WANG et al., 2004), de forma que a obtenção dos mesmos pôde ser confirmada. Nos espectros de ^{1}H RMN gerados para os análogos obtidos (figura 17), foi possível observar na faixa de 7,19 a 6,59 ppm o padrão de multiplicidade (dois dubletos e dois tripletos) característico do *orto* substituído correspondente aos hidrogênios aromáticos do ZBG-4. Em ambos os espectros os sinais referentes aos hidrogênios amídicos (10,68 e 10,50 ppm) se apresentaram como um singleto largo, evidenciando a acidez da função química formada. Os sinais correspondentes aos hidrogênios ligados ao nitrogênio anilínico estão em 4,83 e 4,85 ppm, também se apresentando na forma de singleto largo. Nos espectros de ^{13}C RMN é observado o sinal correspondente ao carbono amídico em aproximadamente 164,8 e 164,5 ppm, os demais sinais referentes aos carbonos aromáticos estão concentrados na faixa de 143,0 a 116,1 ppm de maneira consistente com o esperado.

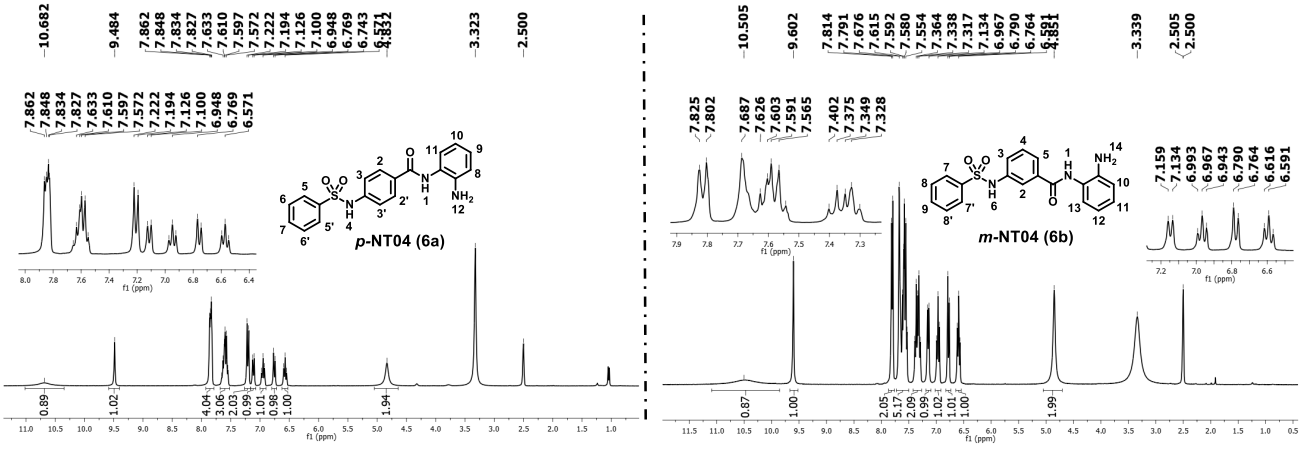


Figura 17 – Espectros de ^{1}H RMN obtidos para os compostos 6a e 6b. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,68 [sl, 1H (H4)]; 9,48 [sl, 1H (H1)]; 7,86-7,82 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,63-7,57 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,21 [d, *J* = 8,5 Hz, 2H (H3, H3')]; 7,11 [d, *J* = 7,6 Hz, 1H (H11)]; 6,95 [t, *J* = 7,4 Hz, 1H (H9)]; 6,76 [d, *J* = 7,8 Hz, 1H (H8); 6,57 [t, *J* = 7,4 Hz, 1H (H10)], 4,83 [s, 2H (H12)]. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,50 [sl, 1H (H6)]; 9,60 [sl, 1H (H1)]; 7,76 [d, *J* = 6,8 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,70 [s, 1H (H2)]; 7,63-7,59 [m, 4H (H5, H8, H8', H9)]; 7,37-7,33 [m, 2H (H3, H4)]; 7,16 [d, *J* = 7,6 Hz, 1H (H13)]; 6,98 [t, *J* = 7,6 Hz, 1H (H11)]; 6,80 [d, *J* = 7,9 Hz, 1H (H10)]; 6,60 [t, *J* = 7,5 Hz, 1H (H12)], 4,85 [s, 2H (H14)].

4.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Informações adicionais sobre os materiais e procedimentos utilizados na execução dos ensaios biológicos estão descritos em detalhes na parte experimental (item 6.2). Os compostos sintetizados, que apresentaram pureza cromatográfica acima de 95 %, foram encaminhados para os ensaios de avaliação da redução do crescimento celular. As linhagens celulares utilizadas nos ensaios, T98G (glioblastoma) e HOG (oligodendroglioma), foram escolhidas considerando estudos prévios que relatam a eficácia de inibidores duais HDAC/MMP nestes modelos celulares (HESHAM et al., 2017; WANG et al., 2019; AMIN et al., 2017; HALDER et al., 2015). Adicionalmente, a literatura descreve que estas linhagens têm seu mecanismo de diferenciação e proliferação associados com a atividade de MMP e HDAC (LI et al., 2017; SANTOS-BARRIOPEDRO et al.,2019; LONG et al., 2013; HEIMBERGER et al., 2005).

O método da sulforrodamina B foi utilizado para análise da viabilidade celular de acordo com a metodologia estabelecida na literatura (VICHAY et al., 2006) e no grupo de pesquisa em os ensaios foram realizados. Este método avalia a proliferação celular por meio do corante aminoxantina, cor rosa brilhante, que possui dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético. Quanto maior a densidade de células, maior a captação do corante e, consequentemente, maior o valor da absorbância medida. Dessa forma, os compostos que apresentarem atividade em reduzir o crescimento célular (citotóxica) fornecerão valores baixos de absorbância (SKEHAN et al., 1990). São calculados parâmetros de avaliação através da relação entre as aproximações logarítmicas das absorbâncias medidas durante o experimento com as correspondentes em t = 0. O GI_{50} representa a concentração do composto que promoveu a redução do crescimento celular em 50 % em relação ao controle. O TGI por sua vez, representa a concentração de amostra que promoveu 100 % de inibição do crescimento (VICHAY et al., 2006).

4.2.1. Triagem de inibição no crescimento celular

Todos os compostos obtidos os compostos, nas concentrações 5 e 50 uM, foram encaminhados para uma avaliação preliminar da inibição no crescimento celular (anexos 8.4.1 e 8.4.2). O composto *p*-NT01 (3a), que já é um inibidor de HDAC conhecido (LAVOIE et al., 2001), foi ativo frente as células de glioblastoma T98G (72% de redução do crescimento em 5 µM), corroborando com os dados da literatura que relacionam a atividade de HDAC com o crescimento da linhagem em questão (SANTOS-BARRIOPEDRO et al., 2019; LI et al., 2017). Entretanto o mesmo composto, quando colocado frente a linhagem de oligodendroma HOG, não foi capaz de reduzir o crescimento celular com a mesma intensidade (42 % de redução em 5 µM). Este dado é inconsistente com informações da literatura a respeito da atividade de iHDAC na linhagem em questão (LONG et al., 2013). Os análogos *p*-NT02 (4a) e *m*-NT02 (4b), derivados dos ZBG-2 (salicilal-acil-hidrazona) foram ativos frente a linhagem HOG (78 e 68 % de redução em 5 µM), entretanto não apresentaram atividade significativa na linhagem T98G (37 e 32 % de redução em 5 µM). Os compostos *p*-NT03 (5a) e *m*-NT03 (5b) derivados do ZBG-3 (*N2*-acil 3-amino1,2,4-triazol) não mostraram atividade significante nas condições avaliadas (abaixo de 27 % de redução em 5 µM). Dos derivados do ZBG-4 (2-amino anilida), apenas o composto *p*-NT04 (6a) apresentou atividade significante (64 e 69 % de redução em 5 µM) frente as duas linhagens, indicando uma possível relação com o padrão de substituição (*para* ou *meta*) do sistema arilsulfonamídico destes compostos. Os intermediários *p, m*-BME (1a e 1b) e *p, m*-BA (2a e 2b) não apresentaram inibição significante (abaixo de 20 % de redução em 5 µM), atestando a importância dos ZBG avaliados para a atividade citotóxica observada. Estes resultados serviram como triagem para a construção da curva completa de atividade frente as respectivas linhagens, utilizando os compostos que apresentaram mais de 60 % da redução na viabilidade celular em 5 µM.

4.2.2. Curva de redução no crescimento celular

Conforme o critério previamente discutido, foi construída a curva de redução da viabilidade celular (gráfico 1) para os compostos *p*-NT01 (3a), *p*-NT02 (4a), *m*-NT02 (4b) e *p*- NT04 (6a). Os resultados de GI_{50} e TGI obtidos estão resumidos na tabela - 2 a seguir:

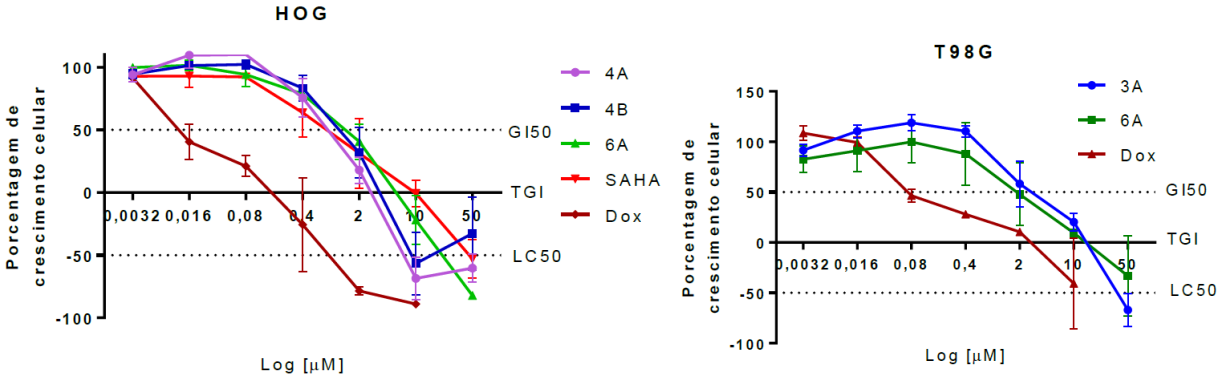
Tabela 2 – Resultados obtidos nos ensaios de redução de viabilidade celular para os compostos selecionados.

#	AMOSTRAS	T98G			HOG		
		GI_{50}[1] [µM]	TGI[2] [µM]	R^2	GI_{50}[1] [µM]	TGI[2] [µM]	R^2
1	3A	0,923	21,442	0,665	> 5	> 50	N.D.
2	4A	> 5	> 50	N.D.	0,241	2,852	0,799
3	4B	> 5	> 50	N.D.	0,321	6,033	0,741
5	6A	0,603	32,927	0,612	0,295	4,228	0,826
6	SAHA	N.D.	N.D.	N.D.	0,299	8,016	0,830
7	DOX	0,116	1,780	0,902	0,016	0,134	0,945

[1] inibição de 50 % do crescimento celular; [2] inibição total do crescimento.

Como forma de controle positivo, os compostos foram investigados comparativamente com o iHDAC vorinostate (SAHA) e a doxorrubicina (DOX). Este fármaco é um potente agente intercalante de DNA, exercendo característico efeito citotóxico sobre as células replicantes (SHAEHWARO et al., 2014).

Gráfico 1 – Gráficos de avaliação da inibição do crescimento das linhagens indicadas, obtidos para os compostos que foram bem-sucedidos na triagem preliminar.



Os resultados gerados para os controles (HASSEL et al., 2019), além dos observados para o composto 3a (LAVOIE et al., 2001), são coerentes com os reportados na literatura (SANTOS-BARRIOPEDRO et al., 2019; LI et al., 2017). Os

parâmetros calculados junto ao perfil de decaimento das curvas dos compostos inéditos planejados em questão apresentam similaridade com os observados para os inibidores SAHA e 3a (comprovadamente inibidores de HDAC), sugerindo uma possível relação com o mecanismo da citotoxicidade observada. Frente a linhagem T98G o derivado 2-amino benzamídico (ZBG-4) *p*-NT04 (6a) apresentou um valor de GI_{50} discretamente abaixo do observado para o hidroxamato (ZBG-1) *p*-NT01 (3a), entretanto o respectivo valor de TGI foi maior (32,9 µM). Esses resultados evidenciam potencial do arcabouço 2-amino benzamídico (ZBG-4) em gerar compostos com atividade citotóxica em células de glioblastoma em relação ao ácido hidroxâmico (ZBG-1) (SANTOS-BARRIOPEDRO et al., 2019; LI et al., 2017).

Frente a linhagem HOG, os compostos *p*-NT02 (4a), *m*-NT02 (4b) e *p*-NT04 (6a) apresentaram valores de GI_{50} (0,24 µM, 0,32 µM e 0,29 µM, respectivamente) semelhantes aos observados para o SAHA (0,30 µM). O valor de TGI observado para os mesmos compostos (2,8 µM, 6,0 µM e 4,2 µM, respectivamente) são inferiores ao observados para o SAHA (8,0 µM). Estes resultados são promissores, uma vez que foi comprovada a atividade citotóxica em células de oligodendroma dos 3 compostos inéditos em questão, além de evidenciar o potencial de atividade das estruturas referentes aos ZBG-2 (salicilal-acil hidrazona) e ZBG-3 (2-amino anilida) em relação ao ZBG-1 (ácido hidroxâmico) (LONG et al., 2013). Visto que o composto *p*-NT04 (6a) apresentou atividade semelhante nas duas linhagens analisadas, pode ser considerado o análogo mais promissor das moléculas avaliadas.

Devido a íntima relação das MMP com a MEC na progressão do câncer, a avaliação da capacidade citotóxica não é suficiente para se fazer inferências significativas sobre a capacidade de inibição de MMP. Para isso, são necessários ensaios alternativos como o de migração celular, ou zimografia em gel (ZAPICO et al., 2015). A falta de atividade citotóxica dos compostos analisados na triagem preliminar não exclui o potencial de inibição deste alvo, de forma que esta atividade deve ser avaliada em todos os análogos obtidos em ensaios futuros.

4.3. ESTUDOS *IN SILICO*

Foram construídos modelos 3D das estruturas planejadas com o objetivo de realizar estudos de ancoramento molecular com os potenciais alvos (HDAC e MMP). Estes estudos foram utilizados como base para inferências sobre o modo de ação das estruturas planejadas, bem como no entendimento dos resultados experimentais realizados (DE-RUYCK et al., 2016). A otimização conformacional preliminar das estruturas modeladas foi importante para reduzir a possibilidade da obtenção de poses não confiáveis nos respectivos estudos. A seleção das isoformas das enzimas em questão foi feita com base nas informações sobre afinidade dos arcabouços utilizados como protótipo (BANERJEE et al., 2019; ZHAO et al., 2018). Dessa forma, foram selecionados os co-cristais disponíveis no PDB para a HDAC8 e MMP2. O tratamento prévio dos cristais das respectivas enzimas (1HOV e 1W22) foi importante para corrigir eventuais erros ou artefatos que poderiam atrapalhar o processamento dos dados no momento dos cálculos. Informações adicionais sobre os métodos aplicados nos estudos *in silico* estão descritos detalhadamente na parte experimental, item 6.3 e nos anexos 8.5 e 8.6

4.3.1. Ancoramento molecular

Foram realizados os estudos de ancoramento molecular para os compostos planejados, após validação do método por *redocking*. A seleção das poses mais representativas foi realizada através dos valores de ranqueamento dos compostos (anexo 8.5) e da análise visual das interações efetuadas na região do ZBG. Os resultados de interação dos ZBG com o íon Zn^{2+} obtidos estão resumidos na tabela a seguir:

Tabela 3 – Interações observadas com o Zn^{2+} dos ensaios de ancoramento molecular para os compostos planejados.

#	Compostos	Interação Zn^{2+}(Å)[2]	
		MMP2[3]	**HDAC8[4]**
1	I52[3]	=O (2,045); OH (2,811)	OH (2,118)
2	*m*-BA (2b)	N.O.	=O (2,533)
3	*m*-BME (1b)	N.O.	N.O.
4	*m*-NT01 (3b)	=O (1,906)	=O (2,269); OH (2,565)
5	*m*-NT02 (4b)	=O (2,472); -N= (2,740)	N.O.
6	*m*-NT03 (5b)	N.O.	NH_2 (2,310)
7	*m*-NT04 (6b)	NH2 (3,650)	NH_2 (3,662)
8	NHB[4]	N.O.	=O (2,415); OH (2,897)
9	*p*-BA (2a)	N.O.	=O (1,946)
10	*P*-BME (1a)	N.O.	N.O.
11	*p*-NT01 (3a)	N.O.	=O (2,696); OH (3,193)
12	*p*-NT02 (4a)	=O (2,010); -N= (3,407)	OH (2,670)
13	*p*-NT03 (5a)	N.O.	NH_2 (2,709); -N(4)= (2,967)
14	*p*-NT04 (6a)	N.O.	NH_2 (3,549)

[1] Valor obtido em relação ao escore do ligante de origem do arquivo PDB da enzima; [2] Valor da distância de interação observada entre os ZBG ensaiados; [3] PDB 1HOV (FENG et al., 2002); [4] PDB 1W22 (VANINI et al., 2004)

Foi possível observar o modo de interação dos ZBG estudados, de forma que todos foram capazes de estabelecer algum tipo de interação com o íon Zn^{2+} (figuras 18 e 19). Em relação a afinidade relativa inferida pelos resultados expostos, o ácido hidroxâmico (ZBG-1, compostos *p*-NT01 [3a], *m*-NT01 [3b], I52 e NHB) foi o ZBG que gerou as menores distancias de interação, seguido pelas salicil acil-hidrazonas (ZBG-2, compostos *p*-NT02 [4a] e *m*-NT02 [4b]). O grupo 2-amino anilida (ZBG-4, compostos *p*-NT04 [6a] e *m*-NT04 [6b]) foi o que pior se ajustou ao encaixe com o Zn^{2+}, agindo de forma monodentada em todas as poses observadas. De maneira geral, os resultados de interação com o Zn^{2+} sugerem que o arcabouço arilsulfonamídico construído se ajustou com interações mais relevantes frente a HDAC8, sugerindo uma preferência de inibição em detrimento a MMP2. A análise visual das poses obtidas revelou que o anel aromático adjacente ao ZBG teve certa "dificuldade" em promover o acesso deste arcabouço no bolsão S1 da enzima. Essa

observação pode ser relacionada a estrutura do protótipo I52, que tem um arcabouço derivado do aminoácido *L*-valina adjacente ao ZBG, de forma que a distância separando este grupo da arilsulfonamida é de apenas um carbono (FENG et al., 2002). A hipótese sobre a importância da distância entre o ZBG e o grupo aril-sulfonamídico ainda precisa ser investigada com mais profundidade por outros estudos e experimentos.

Em contraste com o previamente discutido, os valores referentes a interação com o Zn^{2+} evidenciam que encaixe dos compostos com o grupo salicil acil-hidrazona (ZBG-2, *p*-NT02 [4a] e *m*-NT02 [4b]) foi mais bem ajustado na estrutura da MMP2, em detrimento do modo de interação observado com a HDAC8. Este resultado pode ser corroborado ao comparar o tamanho relativo da superfície polar destes análogos, em relação aos demais (anexo 8.6). Estes resultados sugerem que estes compostos podem ser melhores inibidores de MMP2 do que para HDAC8. Conforme estabelecido anteriormente (LAUFFER et al., 2013), a cavidade catalítica das HDAC é um túnel estreito, de forma que ligantes muito volumosos podem ter dificuldade em adentrar esta porção. Entretanto a estrutura cristalográfica da enzima utilizada está ajustada conformacionalmente para o encaixe com o ligante original, de forma que os modelos estáticos utilizados nos estudos podem gerar resultados imprecisos. Cálculos de dinâmica molecular, entre outras possibilidades, podem representar uma alternativa para gerar dados com maior confiabilidade sobre o encaixe induzido dos compostos estudados. Os resultados obtidos para os compostos *p*-NT03 (5a) e *m*-NT03 (5b) sugerem que a estrutura *N*2-acil 3-amino 1,2,4 triazol (ZBG-3) é capaz de atuar como ZBG, embasando a modificação bioisostérica realizada na sua concepção.

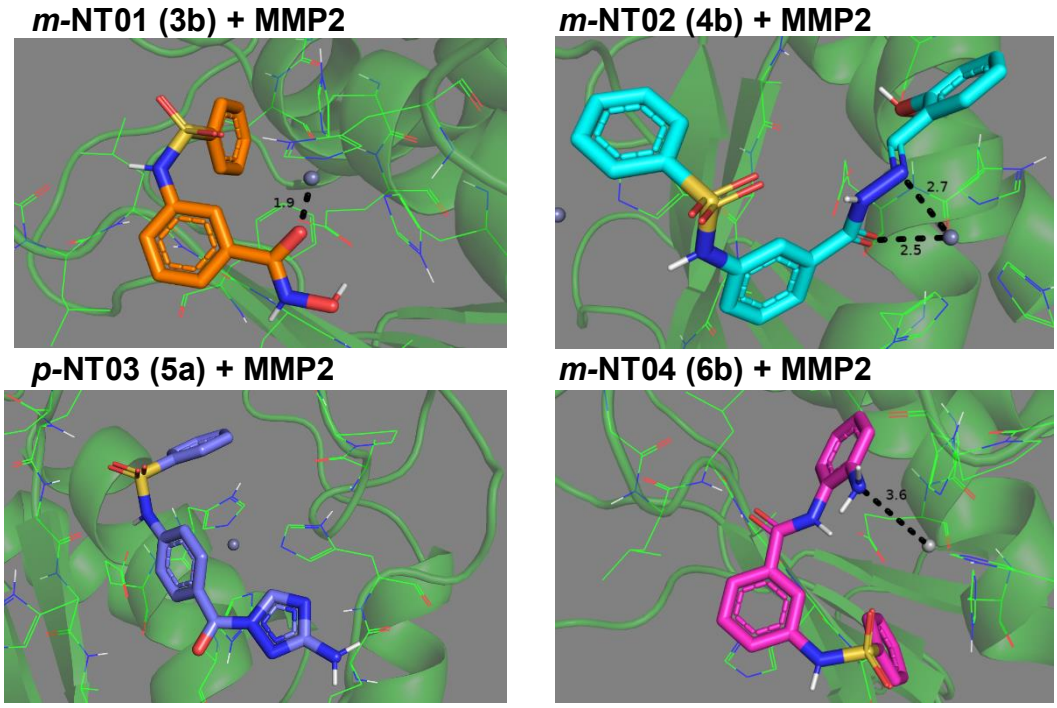


Figura 18 – Poses obtidas nos estudos de ancoramento dos compostos planejados com a MMP2, revelando o modo de coordenação dos respectivos ZBG, além das respectivas distâncias interatômicas.

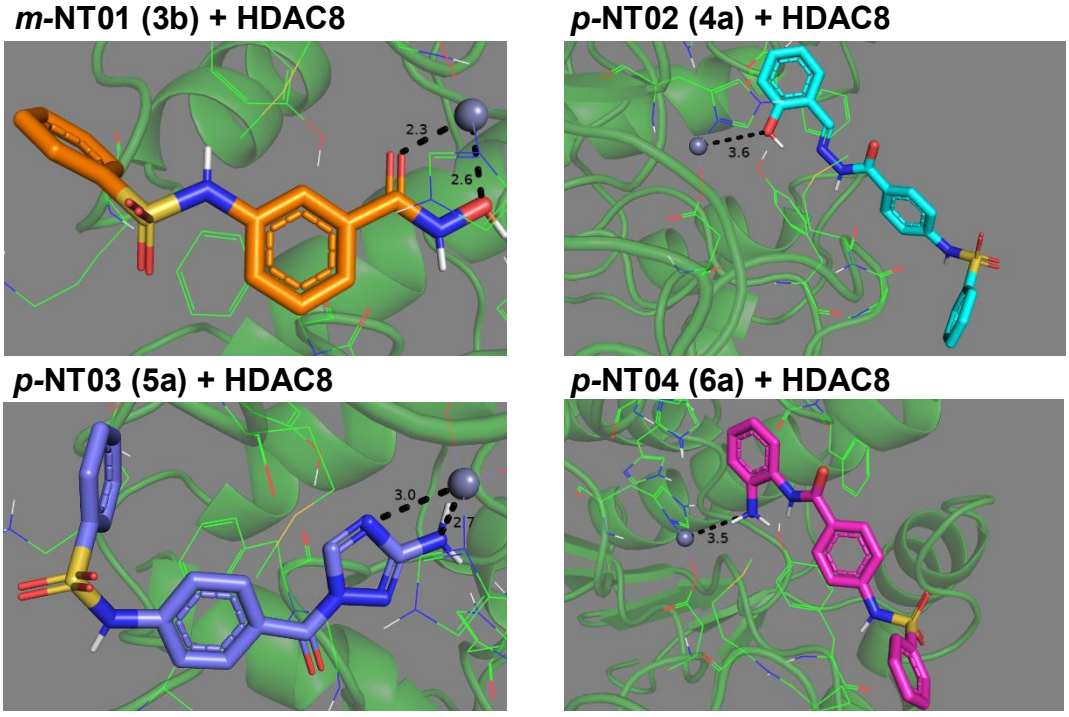


Figura 19 – Poses obtidas nos estudos de ancoramento dos compostos planejados com a HDAC8, revelando o modo de coordenação dos respectivos ZBG, além das respectivas distâncias interatômicas.

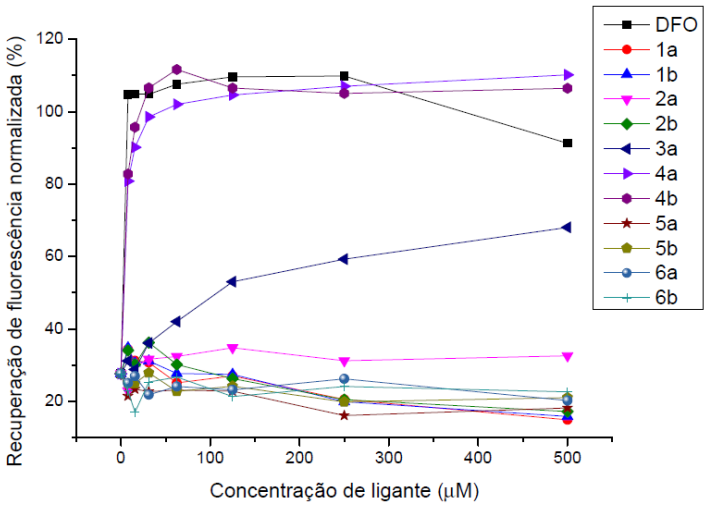
4.4. ENSAIOS DE COORDENAÇÃO COM FERRO

Os compostos obtidos foram enviados para avaliação da sua capacidade de coordenação com ferro, de forma a inferir o potencial de coordenação com o íon Zn^{2+} dos respectivos ZBG investigados. O grupo de pesquisa onde estes ensaios foram realizados tem experiência em protocolos de cinética de coordenação com o ferro (VITORINO et al., 2015), de forma que um procedimento utilizando o zinco necessitaria de desenvolvimento e validação adicional. Não foi possível desenvolver método adequado para o Zn^{2+} em tempo hábil para finalização da dissertação. Assim, o ensaio realizado e aqui apresentado utilizou os protocolos previamente estabelecidos com o íon Fe^{2+} como forma de inferência indireta razoável à capacidade quelante de Zn^{2+}.

4.4.1. Estudo de competição com a calceína

Informações adicionais sobre os materiais e métodos utilizados nestes ensaios estão descritos em detalhes na parte experimental, item 6.4. Todos os compostos foram submetidos ao ensaio de competição com a calceína, incluindo como controle positivo a deferioxiamina (DFO), um poli-hidroxamato de intensa capacidade de coordenação com íon ferro. A capacidade quelante dos compostos analisados está relacionada com a capacidade de deslocar o complexo de calceína e Fe^{2+} nas concentrações observadas, dessa forma gerando a recuperação da fluorescência relacionada a calceína livre. Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico a seguir:

Gráfico 2 – Resultados obtidos com o estudo de competição com a calceína.



Os resultados obtidos mostraram que apenas o composto *p*-NT01 (3a), derivado do ácido hidroxâmico (ZBG-1), e os compostos *p*-NT02 (4a) e *m*-NT02 (4b), derivados salicilal acil-hidrazônicos (ZBG-2), foram capazes de se coordenar ao Fe^{2+} com afinidade significativa. Apesar de possuir a função orgânica ácido hidroxâmico em sua estrutura, o composto *p*-NT01 (3a) apresentou a atividade quelante moderada quando comparado ao controle positivo (DFO). Entretanto, a capacidade de recuperação da fluorescência observada para os compostos *p*-NT02 (4a) e *m*-NT02 (4b) foi comparável ao controle positivo, evidenciando a pronunciada capacidade quelante do grupo salicilal acil–hidrazona (ZBG-2), conforme reporta a literatura (SADHUKHAN et al., 2011). Este resultado em conjunto com os observados nos ensaios biológicos sugere que a atividade citotóxica destes compostos pode estar relacionada com a capacidade quelante apresentada. Adicionalmente, os resultados observados para os compostos *p*-NT02 (4a) e *m*-NT02 (4b) podem servir como inferência adicional da configuração (*E*) para a ligação imina formada durante a síntese destes compostos (SADHUKHAN et al., 2011).

Os compostos *p*-NT03 (5a) e *m*-NT03 (5b) derivados do 3-amino 1,2,4 triazol (ZBG-3), em conjunto com os compostos *p*-NT04 (6a) e *m*-NT04 (6b) derivados 2-amino benzamídicos (ZBG-4) não apresentaram atividade neste ensaio, apesar do composto 6a ter apresentado atividade citotóxica. Os resultados de ancoramento para estes os compostos em questão, evidenciaram que estas estruturas utilizam os nitrogênios dos respectivos ZBG (ZBG-3 e ZBG-4) como ponto de interação. A ligação entre estes átomos com o metal tem maior caráter polarizável em relação a interação correspondente dos oxigênios dos outros ZBG (ZBG-1 e ZBG-2) (BONACCORSO et al., 2020). Este efeito de polarizabilidade pode representar uma limitação do experimento, quando feita a correlação com a potencial afinidade pelo zinco, potencialmente justificando os resultados inexpressivos obtidos com estes ZBG. Dessa maneira, a necessidade do desenvolvimento de um método similar utilizando o Zn^{2+} é mais uma vez evidenciada.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Em relação aos objetivos propostos, foi possível a concepção de um arcabouço molecular híbrido com alternativas de ZBG em relação ao ácido hidroxâmico, a partir de porções fundamentais da estrutura de protótipos com atividade citotóxica comprovada.

A partir dos resultados obtidos na síntese dos compostos planejados, foi comprovado a obtenção e a pureza dos mesmos, assim como as respectivas caracterizações estruturais.

Os ensaios biológicos aos quais estes compostos foram submetidos mostraram que os compostos inéditos *p*-NT02 (4a), *m*-NT02 (4b) e *p*-NT04 (6a) são promissores agentes antineoplásicos frente as linhagens HOG e T98G, com atividade citotóxica comparável ao controle e aos iHDAC SAHA e *p*-NT01 (3a).

Os estudos de ancoramento molecular realizados foram capazes de promover a interação dos ZBG propostos com o íon Zn^{2+} no centro catalítico presente nas estruturas dos alvos. Os análogos derivados dos ZBG-2 apresentaram interações mais significativas com a MMP2 em detrimento da HDAC8, sugerindo uma seletividade relacionada a estas estruturas.

Os ensaios de coordenação comprovaram as propriedades quelantes do ácido hidroxâmico (ZBG-1) e da salicilal acil-hidrazona (ZBG-2). A utilização do íon Fe^{2+} nos ensaios se demonstrou incapaz de evidenciar as propriedades quelantes dos ZBG que agem via nitrogênio (ZBG-3 e ZBG-4).

As perspectivas para o trabalho apresentado incluem: a síntese e obtenção dos análogos da série *orto* substituída, além do composto *m*-NT01 (3b); a realização de ensaios biológicos que possam fornecer inferências mais próximas sobre a capacidade de inibição de MMP; A utilização de técnicas mais robustas de modelagem, como dinâmica molecular, que proporcionam flexibilidade para a estrutura dos alvos analisados, levando a inferências mais precisas sobre o modo de interação dos ZBG mais volumosos; e o desenvolvimento de um método utilizando o íon Zn^{2+} para obter resultados mais precisos e confiáveis sobre a capacidade das estruturas propostas em atuar como ZBG.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANÁLOGOS

Esta etapa do trabalho foi executada no bloco 13 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, nas dependências do LAPESSB, sob a orientação do prof. Dr. Roberto Parise Filho.

6.1.1. Materiais e reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram obtidos comercialmente com grau analítico de pureza pelas empresas Sigma-Aldrich®, Merck®, Synth® e Oakwood®, ou são preparados e purificados a partir de reagentes puros disponíveis no laboratório, utilizando literatura apropriada como referência (PERRIN et al., 1997). Os equipamentos disponíveis para a realização da síntese e purificação compreendem: Vidrarias e utensílios diversos usualmente utilizados em um laboratório de síntese orgânica; agitadores magnéticos com aquecimento, modelo HS-7; Evaporador rotativo Büchi®, modelo R-250, acoplado a bomba de vácuo Büchi®, modelo V-710; Bomba de alto vácuo Edwards®, modelo E2-M5; Equipamento de ponto de fusão Büchi®, modelo M-565.

6.1.2. Materiais e métodos cromatográficos

O acompanhamento das reações foi efetuado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatofolhas de alumínio preparadas com sílica GF_{254}, Merck®. A revelação das amostras foi realizada com irradiação de luz ultravioleta UV, ou com soluções reveladoras de ninhidrina, verde de bromocresol, cloreto férrico ou molibidato. Quando necessário a purificação dos compostos sintetizados foi realizada por cromatografia em coluna, utilizando o cromatógrafo automático BIOTAGE®, modelo Isolera Prime. Para a fase estacionária foi utilizado sílica-gel 60 da Merck®, ou a coluna SNAP Ultra C18 BIOTAGE®, dependendo da necessidade de cada procedimento. A determinação da pureza dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com o cromatógrafo Shimadzu®, modelo PROMINENCE, utilizando a coluna analítica C-18 Gemini® (5µ, 150 x 4,6 mm). A detecção foi realizada em varredura (entre 200 e 300 nm). Como fase móvel utilizou-se água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos com 0,1 % de TFA. A corrida cromatográfica iniciou na concentração de 0 % de B, subindo em

10 minutos passando a 100 % mesmo. O tempo total de corrida foi de 25 minutos e o volume de injeção foi 5 µL.

6.1.3. Materiais e métodos de caracterização estrutural

No preparo das amostras para as análises de RMN foram utilizados tubos NORELL®, além de solventes deuterados como clorofórmio ($CDCl_3$) e dimetilsulfóxido (DMSO-*d*6) da marca Cambridge Isotope Laboratories®. As análises foram executadas em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Advanced®, modelo DPX-300 MHz, no laboratório de ressonância magnética nuclear da FCF-USP. Os espectros obtidos tiveram os deslocamentos químicos (δ) expressos em partes por milhão (ppm). Os sinais de ^{1}H RMN foram interpretados de acordo com as seguintes multiplicidades: s (singleto); sl (singleto largo); d (dubleto); dd (duplo dubleto); ddd (duplo-duplo dubleto); dt (duplo-tripleto); t (tripleto); e m (multipleto). As constantes de acoplamento (*J*) dos sinais com multiplicidade definida foram calculadas, quando pertinente, sendo expressas em Hz. A atribuição dos sinais foi feita utilizando como base a literatura disponível, bem como cálculos preditivos realizados nos softwares ChemDraw Ultra® v. 16 e MestReNova® v. 6.

6.1.4. Procedimentos sintéticos, purificação e produtos obtidos

6.1.4.1. Esterificação do ácido amino-benzóico (*o, m*-ABME)

Em um balão seco, equipado com agitação magnética, 0,68 g (5 mmol, 1 eq.) do ácido amino benzóico (137,1 g/mol) são dissolvidos em 12,5 mL de metanol seco (2,5 mL/mmol). A seguir são adicionados 0,3 mL (6 mmol, 1,2 eq.) de H_2SO_4 (98 g/mol; 1,84 g/mL). A reação é mantida sob agitação constante em refluxo (65 ºC) por cerca de 4 h, até o consumo total do material de partida (verificado por CCD). O solvente é então rota-evaporado, e o óleo resultante é dissolvido em acetato de etila (30 mL) e lavado três vezes com 10 mL de $NaHCO_3$ (sat.) em H_2O. As fases orgânicas são combinadas, secas em $MgSO_4$, filtradas e concentradas por rota-evaporação, o produto resultante é seco sob alto vácuo (FENG et al., 2002).

3-Amino benzoato de metila (*m*-ABME)

Óleo púrpura de alta viscosidade, purificado por cromatografia em coluna de fase normal, utilizando gradiente de AcOEt em Hexano como fase móvel. η = 81 %

(0,61 g). Rf= 0,7; AcOEt/ Hex 2:1. RMN ^{1}H [300 MHz, $CDCl_3$] δ (ppm): 7,41 [ddd, *J* = 7,7; 2,4; 1,0 Hz 1H (H5)]; 7,34 [dd, *J* = 2,0, 1,6 Hz, 1H (H6)]; 7,20 [t, *J* = 7,8 Hz, 1H (H4)]; 6,84 [ddd, *J* = 8,0; 2,4; 0,9 Hz, 1H (H3)]; 3,88 [s, 3H (H1)]; 3,78 [sl, 2H (H2)]. RMN ^{13}C [75 MHz, $CDCl_3$] δ (ppm): 167,3 (C2); 146,53 (C5); 131,1 (C3); 129,2 (C8); 119,7 (C7); 119,4 (C4); 115,8 (C6); 52,0 (C1). CAS: 4518-10-9.

6.1.4.2. N-Sulfonilação do metil-éster amino benzóico (procedimento A)

Em um balão equipado com agitação magnética, foram dissolvidos 0,91 g (6 mmol, 1,2 eq.) do metil-éster amino-benzóico (ABME; 151,2 g/mol) em 10 mL (2 mL/mmol) de THF. Após homogeneização do sistema, 5 mL (1 mL/mmol de H_2O deionizada são adicionados. Em seguida, aproximadamente 2 mL de Na_2CO_3 (sat.) em H2O são adicionados, até que o pH do meio se estabilize em aproximadamente 9 (verificado com fita indicadora de pH). O sistema é esfriado a 0 °C com banho de gelo, e então são gotejados 0,631 mL (5 mmol, 1 eq.) de cloreto de benzeno-sulfonila (176,6 g/mol, 1,384 g/mL). O banho de gelo é removido, e o sistema é agitado a temperatura ambiente. Periodicamente o pH do sistema deve ser verificado e corrigido com a solução de Na_2CO_3, até que o cloreto de sulfonila seja consumido totalmente (verificado por CCD). O sistema é concentrado no rotaevaporador, de modo que todo THF seja removido. Em um funil de separação, são adicionados 30 mL de AcOEt ao meio reacional. Utilizando HCl 5% em H_2O, o pH resultante é acidificado até aproximadamente 1 (verificado com fita indicadora de pH). A fase orgânica é então lavada três vezes com 10 mL de HCl (5%), seca com $MgSO_4$, filtrada e rotaevaporada. O sólido resultante é seco sob alto vácuo (UGWU et al., 2017).

4-Fenilsulfonamido benzoato de metila (*p*-BME, 1a)

Sólido branco; obtido sem necessidade de purificação adicional. η = 79 % (1,10 g). Rf= 0,5; AcOEt/ Hex 1:1. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,84 [sl,1H (H4)]; 7,84-7,80 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,60-7,55 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,23 [d, *J* = 8,7 Hz, 2H (H3, H3')]; 3,77 [s, 3H (H1)]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 165,6 (C2); 142,3 (C6); 139,2 (C7); 133,2 (C10); 130,6 (C4, C4'); 129,4 (C8, C8'); 126,6 (C9, C9'); 124,4 (C3); 118,2 (C5, C5'); 51,9 (C1). CAS: 107920-79-6.

3-Fenilsulfonamido benzoato de metila (*m*-BME, 1b)

Sólido bege; purificado por cromatografia em coluna de fase normal, utilizando gradiente de AcOEt em Hexano como fase móvel. η = 94 % (1,37 g). Rf= 0,5; AcOEt/ Hex 1:1. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,53 [sl, 1H (H6)]; 7,77 [d, *J* = 7,1 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,71 [s, 1H (H5)]; 7,61-7,54 [m, 4H (H2, H8, H8', H9)]; 7,38-7,37 [m, 2H (H3, H4)]; 3,81 [s, 3H (H1).]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,1 (C2); 139,7 (C9); 138,7 (C5); 133,5 (C12); 131,0 (C3); 130,2 (C8); 129,8 (C10, C10'); 127,1 (C11, C11'); 125,2 (C7); 124,9 (C4); 120,8 (C6); 52,7 (C1). CAS: 107922-46-3.

6.1.4.3. Hidrólise do metil–éster aril sulfonamídico (procedimento B)

Em um balão equipado com agitação magnética, 0,88 g (3 mmol) do metil-éster aril sulfonamídico (BME; 291,32 g/mol) são adicionados em 10 mL (3,3 mL/mmol) de KOH (sat.) em H_2O. O sistema é levado a temperatura de refluxo (100 °C), e assim mantido sob agitação (se necessário, o pH do sistema é corrigido para 14 utilizando KOH [56,12 g/mol]) até o consumo total do material de partida (Verificado por CCD). Em seguida o sistema é esfriado a temperatura ambiente, em seguida colocado em banho de gelo. São adicionados aos poucos, sob agitação intensa, aproximadamente 10 mL de HCl (36,46 g/mol, 1,2 g/mL) são adicionados de forma a baixar o pH do meio para aproximadamente 1. No mesmo balão, a suspensão formada é então aquecida e agitada até que todo precipitado se dissolva. Se necessário, adicionar o mínimo possível de H_2O para garantir a solubilização completa. A solução é esfriada lentamente, sem agitação até a temperatura ambiente, em seguida é colocada no freezer por 1 h. Os cristais formados são filtrados a vácuo, lavados três vezes com 5 mL de H_2O gelada, e secos sob vácuo e P_2O_5 (MANOS-TURVEY et al., 2015).

Ácido 4-fenilsulfonamido benzóico (*p*-BA; 2a)

Cristais brancos ou translúcidos em forma de finas agulhas, obtidos sem necessidade de purificação adicional. η = 85 % (0,71 g). Rf= 0,3; AcOEt/ Hex 1:1. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,70 [sl, 1H (H1)]; 10,78 [sl, 1H (H4)]; 7,84-7,79 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,65-7,54 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,20 [d, *J* = 8,7 Hz, 2H (H3, H3')]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,7 (C1); 141,9 (C5); 139,3 (C6); 133,1 (C9); 130,7 (C3, C3'); 129,4 (C7, C7'); 126,6 (C8, C8'); 125,7 (C2); 118,2 (C4, C4'). CAS: 28547-16-2.

Ácido 3-fenilsulfonamido benzóico (*m*-BA; 2b)

Cristais brancos ou translúcidos em forma de lâminas, obtidos sem necessidade de purificação adicional. η = 95 % (0,79 g). Rf= 0,3; AcOEt/ Hex 1:1. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,99 [sl, 1H (H1)]; 10,49 [sl, 1H (H6)]; 7,76 [dt, *J* = 7,9; 1,1 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,70 [s, 1H (H2)]; 7,63-7,52 [m, 4H (H5, H8, H8', H9)]; 7,36-7,34 [m, 2H (H3, H4)]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,7 (C1); 139,3 (C4); 138,0 (C8); 133,0 (C11); 131,7 (C2); 129,5 (C7); 129,3 (C9, C9'); 126,6 (C10, C10'); 124,8 (C6); 124,1 (C3); 120,6 (C5). CAS: 28547-15-1.

6.1.4.4. Hidroxiaminólise do metil-ester aril sulfonamídico (procedimento C)

Em um balão provido de agitação magnética foram adicionados 3,23 mL (50 mmol, 50 eq.) de NH_2OH (aq.) 50% p/v (33,03 g/mol, 1,078 g/mL) e 0,32g (8 mmol, 8 eq.) de NaOH. Após homogeneização da mistura, o sistema é resfriado a 0 ºC com banho de gelo e 0,291 g (1 mmol, 1 eq.) do metil-ester sulfonamídico (291,32 g/mol), dissolvido em 6 mL (12 mL/ mmol) de THF/MeOH 1:1, são adicionados lentamente. O banho de gelo é removido, e o sistema é agitado a temperatura ambiente até o consumo total do material de partida (verificado por CCD). Em um funil de separação a mistura reacional é lavada três vezes com 15 mL de AcOEt. A fase orgânica resultante é posteriormente lavada três vezes com 10 mL de NaCl (sat.), e concentrada no rota-evaporador (TAVARES et al., 2017).

N-hidróxi-(4-fenilsulfonamido) benzamida (*p*-NT01, 3a)

Cristais brancos ou translúcidos em forma de lâminas, obtidos por recristalização com DCM e o mínimo de MeOH possível. η = 47 % (0,136 g). Rf= 0,5; AcOEt/ Hex 2:1. P.F. (°C): 167,5–168,5. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 11,02 [sl, 1H (H1)]; 10,63 [sl, 1H (H5)]; 8,91 (sl, 1H (H2)]; 7,81 [d, *J* = 6,9 Hz, 2H (H3, H3')]; 7,64-7,53 [m, 5H (H6, H6', H7, H7', H8)]; 7,14 [d, *J* = 6,9 Hz, 2H (H4, H4')]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 164,2 (C1); 140,8 (C5); 139,9 (C6); 133,6 (C9); 129,8 (C3, C3'); 128,6 (C7, C7'); 128,4 (C2);127,1 (C8, C8'); 119,0 (C4, C4'). CAS: 400078-78-6.

6.1.4.5. Hidrazinólise e condensação subsequente do metil-ester aril sulfonamídico (procedimento D)

Em um balão provido de agitação magnética foram adicionados 0,291 g (1 mmol, 1 eq.) do metil-ester aril sulfonamídico (291,32 g/mol) e 1 mL (1 ml/mmol) de MeOH. O sistema é esfriado a 0 °C com banho de gelo, e então são adicionados 2 mL (2 mL/mmol) de uma solução de NH_2NH_2 50 % (32,05 g/mol, 1,03 g/mL) em H_2O. Após homogeneização o sistema é levado a temperatura de refluxo (100 °C), e agitado até o consumo do material de partida (verificado por CCD). O sistema é deixado aberto por alguns minutos para concentrar parcialmente o meio reacional, em seguida esfriado naturalmente até temperatura ambiente. São adicionados 3 mL de H_2O e o sistema é colocado sob refrigeração (0 °C) por 2 h. O precipitado branco formado é filtrado a vácuo, lavado três vezes com 5 ml de H_2O e seco sob vácuo com P_2O_5 por aproximadamente 4 h. Em seguida, este precipitado é adicionado em um outro balão seco com agitação magnética, junto com 10 mL de EtOH anidro (10 mL/mmol). O sistema é esfriado a 0 °C com banho de gelo e então são adicionados lentamente 105 µL (1 mmol, 1eq.) de salicilaldeído (122,12 g/mol, 1,16 g/mL), seguido por uma gota de ácido acético glacial (60,05 g/mol; 1,05 g/mL). O sistema é levado a temperatura ambiente e agitado até o consumo total do salicilaldeído (verificado por CCD). O meio reacional é então concentrado sob rota-evaporação, e em seguida diluído em 20 mL de AcOEt. Em um funil de separação, a fase orgânica é lavada três vezes com 10 mL de $NaHSO_3$ (sat.) em H_2O, em seguida seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrada sob rota-evaporação (SADHUKHAN et al., 2011; CUNHA et al., 2016).

(E)-N-(4-(1-(2-hidróxifenil)acilhidrazona)fenil)benzenosulfonamida (*p*-NT02, 4a)

Cristais brancos em forma de lâminas, obtidos por recristalização com DCM e o mínimo de MeOH possível. η = 67 % (0,267 g). Rf= 0,5; AcOEt/ Hex 2:1. P.F. (°C): 189,2–192,7. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 11,95 [sl, 1H (H13)]; 11,28 [sl, 1H, (H1)] 10,76 [sl, 1H (H4)]; 8,58 [s, 1H (H8)]; 7,87-7,81 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,64-7,50 [m, 3H (H6, H6', H7, H12)]; 7,30-7,23 [m, 3H (H3, H3', H9)]; 6,94-6,91 [m, 2H (H10, H11)]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 162,2 (C1); 157,4 (C10); 148,1 (C12); 141,1 (C5); 139,3 (C6); 133,2 (C9); 131,3 (C11); 129,5 (C13); 129,4 (C7, C7');129,0 (C3, C3');127,7 (C2) 126,7 (C8, C8');119,3 (C16); 118,6, (C14); 118,4 (C4, C4'); 116,4 (C15). CAS: 29645-76-9.

(E)-*N*-(3-(1-(2-hidróxifenil)acilhidrazona)fenil)benzenosulfonamida (*m*-NT02, 4b)

Cristais brancos em forma de lâminas, obtidos por recristalização com DCM e o mínimo de MeOH possível. η = 56 % (0,221 g). Rf= 0,5; AcOEt/ Hex 2:1. P.F. (°C): 213,3–217,1. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,04 [sl, 1H (H15)]; 11,22 [sl, 1H (H1)]; 10,52 [sl, 1H (H6)]; 8,61 [s, 1H (H10)]; 7,80-7,78 [m, 2H (H7, H7')]; 7,67 [s, 1H (H2)]; 7,60-7,55 [m, 5H (H5, H8, H8', H9, H14)]; 7,42-7,37 [t, *J*= 7,8 Hz, 1H (H4)]; 7,32-7,27 [m, 2H (H11, H13)]; 6,95-6,89 [m, 2H (H3, H12)]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 162,3 (C1); 157,4 (C12); 148,6 (C14); 139,3 (C4); 138,2 (C8);133,9 (C15); 133,0 (C11); 131,4 (C2); 129,5 (C7); 129,3 (C9, C9'); 126,6 (C10, C10'); 123,1 (C6); 122,8 (C18); 119,6 (C16); 119,3 (C3, C13); 118,6 (C17); 116,4 (C5).

6.1.4.6 Condensação do ácido aril sulfonamídico (procedimentos E e F)

Em um balão seco, equipado com agitação magnética, são adicionados 0,277 g (1 mmol; 1 eq.) do ácido aril sulfonamídico (277,3 g/mol), 0,230 g (1,2 mmol, 1,2 eq.) de EDC (191,70 g/mol) e 10 mL de DCM seco. Após dissolução dos reagentes, é adicionado 61 mg (0,5 mmol, 0,5 eq.) de DMAP (122,17 g/mol) e 1 mmol (1 eq.) da amina correspondente (3-ATR: 84 mg, 84,04 g/mol; 1,2-DAB: 0,108 g, 108,1 g/mol). O meio reacional é agitado em temperatura ambiente até o consumo total do ácido aril sulfonamídico (verificado por CCD). O meio reacional é concentrado por rota evaporação, posteriormente diluído em 20 mL de AcOEt. Em um funil de separação a fase orgânica é lavada três vezes com 10 mL de uma solução tampão (AcONa/ AcOH) em pH 5,4, posteriormente seca com $MgSO_4$, filtrada e concentrada por rota evaporação (LI et al., 2015).

N-(4-(1-acil (3-amino-1*H*-1,2,4 triazol))fenil) benzenosulfonamida (*p*-NT03, 5a)

Sólido branco, obtido após cromatografia em fase reversa, utilizando um gradiente de MeOH em H_2O com 1 % de TFA como fase móvel. η = 42 % (0,141 g). Rf= 0,2; AcOEt/ Hex 2:1. m/z [M+H]= 344,081; RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-d6] δ (ppm): 10,94 [sl, 1H (H3)]; 8,00 [d, J = 8,8 Hz, 2H (H1, H1')]; 7,87 [d, J = 7,7 Hz, 2H (H5, H5')]; 7,66-7,56 [m, 5H (H4, H6, H7, H8)]; 7,24 [d, J = 8,8 Hz, 2H (H2, H2')]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-d6] δ (ppm): 166,6 (C1); 158,3 (C11); 151,2 (C10); 142,2 (C2); 139,3 (C6); 133,2 (C9); 132,6 (C3, C3'); 129,5 (C7, C7'); 126,7 (C8, C8'); 126,3 (C5); 117,2 (C4, C4').

N-(3-(1-acil (3-amino-1*H*-1,2,4 triazol))fenil) benzenosulfonamida (*m*-NT03, 5b)

Sólido branco, obtido após cromatografia em fase reversa, utilizando um gradiente de MeOH em H_2O com 1 % de TFA como fase móvel. η = 40 % (0,140 g). Rf= 0,2; AcOEt/ Hex 2:1. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,40 [sl, 1H (H6)]; 7,75 [d, *J* = 7,6 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,60-7,51 [m, 4H (H8, H8', H9, H10)]; 7,31-7,34 [m, 2H (H3, H4)]; 7,14 [d, *J* = 8,4 Hz, 1H (H5)]; 7,03 [s, 1H (H2)]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 169,3 (C1); 139,2 (C4); 137,6 (C8); 137,3 (C13); 135,4 (C12); 133,0 (C11); 129,3 (C9, C9'); 128,9 (C2); 126,6 (C10, C10'); 122,5 (C7); 120,1 (C6); 119,7 (C3);118,3 (C5).

N-(2-aminofenil)-4-(fenilsulfonamido) benzamida (*p*-NT04, 6a)

Sólido branco, obtido após cromatografia em fase reversa, utilizando um gradiente de MeOH em H_2O com 1 % de TFA como fase móvel. Rf= 0,2; AcOEt/ Hex 2:1. η = 64 % (0,235 g). P.F. (°C) 210,9–212,2. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,68 [sl, 1H (H4)]; 9,48 [sl, 1H (H1)]; 7,86-7,82 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,63-7,57 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,21 [d, *J* = 8,5 Hz, 2H (H3, H3')]; 7,11 [d, *J* = 7,6 Hz, 1H (H11)]; 6,95 [t, *J* = 7,4 Hz, 1H (H9)]; 6,76 [d, *J* = 7,8 Hz, 1H (H8); 6,57 [t, *J* = 7,4 Hz, 1H (H10)], 4,83 [s, 2H (H12)]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 164,5 (C1); 143,1 (C10); 140,6 (C5); 139,4 (C6); 133,1 (C9); 129,7 (C2); 129,4 (C3, C3'); 129,0 (C7, C7'); 126,64 (C8, C8'); 126,59 (C11); 126,4 (C15); 123,3 (C13), 118,3 (C4, C4'); 116,2 (C14); 116,0 (C12).

N-(2-aminofenil)-3-(fenilsulfonamido) benzamida (*m*-NT04, 6b)

Sólido amarelado, obtido após cromatografia em fase reversa, utilizando um gradiente de MeOH em H_2O com 1 % de TFA como fase móvel. Rf= 0,2; AcOEt/ Hex 2:1. η = 45 % (0,165 g). P.F. (°C) 148,9–154,8. RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,50 [sl, 1H (H6)]; 9,60 [sl, 1H (H1)]; 7,76 [d, *J* = 6,8 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,70 [s, 1H (H2)]; 7,63-7,59 [m, 4H (H5, H8, H8', H9)]; 7,37-7,33 [m, 2H (H3, H4)]; 7,16 [d, *J* = 7,6 Hz, 1H (H13)]; 6,98 [t, *J* = 7,6 Hz, 1H (H11)]; 6,80 [d, *J* = 7,9 Hz, 1H (H10)]; 6,60 [t, *J* = 7,5 Hz, 1H (H12)], 4,85 [s, 2H (H14)]. RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 164,8 (C1); 143,0 (C12); 139,5 (C4); 138,1 (C8); 135,7 (C13); 132,9 (C11); 129,3 (C9, C9'); 129,0 (C2); 126,6 (C10, C10'); 126,52 (C7); 126,48 (C6); 123,2 (C15); 122,9 (C16); 122,5 (C3); 119,7 (C5); 116,2 (C17); 116,1 (C14). CAS: 765922-86-9.

6.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Esta etapa do trabalho foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), no laboratório de farmacologia marinha, em colaboração com a Msc Luciana Costa Furtado, sob a orientação dos professores Dra. Letícia Veras Costa Lotufo e Dr. João Agostinho Machado Neto. As linhagens neoplásicas utilizadas nos testes são: HOG (oligodendroglioma), T98G (glioblastoma).

6.2.1 Triagem de redução da viabilidade celular

Todas as amostras dos compostos análisados foram diluídas em DMSO, ficando em concentrações de 1 e 10 mM. Foram semeadas 0,6 x 10^4 células por poço em placas de 96 poços (3 x 10^4 células/mL). Após 24 h, as amostras foram adicionadas e ficaram em concentrações de 5 µM e 50 µM nos poços - cada concentração em duplicata - e incubadas por 72 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e o dimetilsulfóxido (DMSO) com controle negativo. A placa tempo zero não recebeu tratamento com as amostras e seu sobrenadante foi substituído por TCA 10% após 24 h do plaqueamento e a placa incubada a 4 ºC. Após 72 h de incubação, nas placas tratadas, o sobrenadante foi substituído por TCA 10% (100 µL por poço) e a placa incubada por uma hora a 4 ºC. Posteriormente, os poços de todas as placas fixadas foram lavados três vezes com 200 µL de água deionizada. Após esse procedimento, foi adicionada a solução de SRB 0,4% (100 µL/poço) e as placas incubadas por 30 minutos em estufa a 37 ºC e 5% de CO2. Seguidamente, os poços foram lavados três vezes com a solução de ácido acético 1% (200 µL/poço) e o corante fixado diluído em 200 µL (por poço) de Tris base 10 mM. A absorbância foi medida a 570 nm. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism® v.7.0 e a porcentagem de inibição da proliferação celular medida em relação ao controle negativo. Foram realizados dois ensaios independentes (VICHAY et al., 2006).

6.2.2. Cálculo do GI_{50}, TGI e LC_{50} dos compostos 3a, 4a, 4b e 6a.

Foram semeadas 0,6 x 10^4 células por poço em placas de 96 poços (3 x 10^4 células/mL). Após 24 horas, as amostras foram adicionadas nos poços, ficando em concentrações que variaram de 0,0032 a 50 µM - cada concentração em duplicata - e incubadas por 72 h. A doxorrubicina e o SAHA foram utilizados como controle positivo e o dimetilsulfóxido (DMSO) com controle negativo. A placa tempo zero não recebeu tratamento com as amostras e seu sobrenadante foi substituído por TCA 10% após

24 h do plaqueamento para posterior incubação a 4 ºC. Após 72 h de incubação, nas placas tratadas, o sobrenadante foi substituído por TCA 10% (100 µL por poço) e a placa incubada por uma hora a 4 ºC. Posteriormente, os poços de todas as placas fixadas foram lavados três vezes com 200 µL de água deionizada. Após esse procedimento, foi adicionada a solução de SRB 0,4% (100 µL/poço) e as placas incubadas por 30 minutos em estufa a 37 ºC e 5% de CO2. Seguidamente, os poços foram lavados três vezes com a solução de ácido acético 1% (200 µL/poço) e o corante fixado diluído em 200 µL (por poço) de Tris base 10mM. A absorbância foi medida a 570 nm. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism® v.7.0 e a porcentagem de inibição da proliferação celular medida em relação ao controle negativo. Foram realizados dois ensaios independentes (VICHAY et al., 2006).

6.3. MATERIAIS E MÉTODOS *IN SILICO*

Todos os cálculos e procedimentos computacionais realizados foram executados em um notebook Lenovo® ideapad 310-15ISK, com processador intelcore® i5 e 8 Gb de memória RAM. Sob orientação prof. Dr. Roberto Parise Filho.

6.3.1. Estudos de ancoramento molecular

Para a criação do modelo tridimensional dos análogos planejados, assim como a otimização estrutural dos mesmos, foi utilizado o software Spartan® 14. A otimização conformacional foi feita utilizando procedimentos pré-estabelecidos na literatura (DE-RUYCK et al., 2016; ZAPICO et al., 2011), utilizando as seguintes funções na respectiva sequencia: MMFF, PM6 e Hartree-fock. Os modelos gerados foram salvos em formato. mol2 com as devidas cargas computadas. A obtenção dos co-cristais foi feita a partir do PDB, selecionando as opções com melhor resolução. O tratamento preliminar destes arquivos, foi feito utilizando o software pyMOL® 2.0. Os estudos de ancoramento molecular foram conduzidos utilizando o software GOLD® 5.6, com todos os cálculos sendo realizados em sextuplicata. O estabelecimento e validação do método utilizado foi feito por meio do processo de *redocking*, analisando o efeito sobre o RMSD ao se variar os seguintes parâmetros: tamanho da caixa, centroide e função de escore. O método estabelecido para o ensaio de ancoramento com a HDAC8 (PDB:1W22) utiliza o íon Zn^{2+} como centroide, a função de escore ASP e uma caixa de interação com raio de 10 Å. Por sua vez, método estabelecido para o ensaio de ancoramento com a MMP2 (PDB: 1HOV) também utiliza o íon Zn^{2+} como centroide, a função de escore ASP e uma caixa de interação com raio de 14 Å.

6.3.2. Cálculo das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas

Algumas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos sintetizados e testados foram calculadas utilizando a plataforma online gratuita SwissADME (https://www.swissadme.ch)

6.4. ESTUDO DE COMPETIÇÃO COM A CALCEÍNA

Os ensaios de coordenação foram realizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), no laboratório de química inorgânica e metalofármacos, em colaboração com o Msc Fredson Torres Silva, sob orientação do Prof. Dr. Breno Pannia Espósito.

6.4.1. Preparo de solução estoque de calceína (5 mM)

Em um tubo eppeedorf, foi pesado 0,0031 g de calceína e dissolvido em 900 µL de tampão HBS/Chelex pH 7,4. Posteriormente, foi adicionado de maneira alternada, 1 µL de uma solução de NaOH (2,5 mM) e 10 µL de tampão, com posterior agitação em vortex. O procedimento é repetido até que toda calceína seja dissolvida, em seguida utilizando o tampão o foi completado para 1 mL (VITORINO et al., 2015).

6.4.2. Preparo e leitura das microplacas

6.4.2.1 Microplaca de trabalho

Em um poço de uma microplaca foi adicionado 200 µL da solução das amostras testadas (500 µM). Nos poços restantes foram acrescentados 100 µL de tampão HBS/Chelex pH 7,4. Foi realizada 5 diluições seriais diluição serial, retirando 100 µL do primeiro poço e acrescentando ao segundo e assim sucessivamente (VITORINO et al., 2015).

6.4.2.1. Microplaca de leitura

A avaliação da recuperação de fluorescência de cada amostra é realizada em duplicata. Foi adicionado 180 µL da solução de calceína (2 µM) em cada poço. Foi ralizada uma leitura da microplca no espectrofluorimetro BMGFLUOSTAR® durante 5 minutos. Neste tempo, é preparado 1 mL de uma solução estoque de sulfato ferroso amoniacal - FAS (10 mM), junto com uma solução FAS (38 µM). Com o auxílio da placa de trabalho e uma pipeta multicanal, foi adicionado 10 µL de FAS em cada poço. A leitura foi pausada, e 10 µL da solução de FAS (38 µM) são adicionados nos poços em que a calceína se encontra presente. A leitura no aparelho é retomada e os valores de recuperação da florescência correspondentes são computados (VITORINO et al., 2015).

7. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, N.; MUKHERJEE, A.; SAHA, A.; JHA, T. Arylsulfonamides and selectivity of matrix metalloproteinase-2: An overview. *European journal of medicinal chemistry*, v.129, p.72-109, 2017.

AMIN, S. A.; ADHIKARI, N.; JHA, T. Is dual inhibition of metalloenzymes HDAC-8 and MMP-2 a potential pharmacological target to combat hematological malignancies? *Pharmacological Research*, v. 122, p. 8-19, 2017.

AZEVEDO, A.; PRADO, A. F.; ANTONIO, C. R.; ISSA, J. P.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v.115, p.301-314, 2014.

BAHHAJ, F.; DENIS, I.; PICHAVANT, L.; DELATOUCHE, R.; COLLETTE, F.; LINOT, C.; POULIQUEN, D.; GRÉGOIRE, M.; HÉROGUEZ, V.; BLANQUART, C.; BERTRAND, P. Histone deacetylase inhibitors delivery using nanoparticles with intrinsic passive tumor targeting properties for tumor therapy. *Theranostics*, v. 6(6), p. 795-807, 2016.

BANERJEE, S.; ADHIKARI, N.; AMIN, S. A.; JHA, T. Histone deacetylase 8 (HDAC8) and its inhibitors with selectivity to other isoforms: An overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 164, p. 214-240, 2019.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: A descoberta de novo agente cardioativo. *Quimica nova,* v.25(6b), p.172-1180, 2002.

BISSETT, D.; O'BYRNE, K. J.; PAWEL, J. V. Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology,* v.23(4), p.842-849, 2005.

BOUMAHDI, S.; DE SAUVAGE, F. J. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, p. 1-18, 2019.

CELL EDITORIAL TEAM. Cancer: The road ahead. *Cell,* v.168(4), p.545-546, 2017.

CHERNYSHEV, V. M.; VLASOVA, A. G.; ASTAKHOV, A. V.; SHISHKINA, S. V.; SHISHKIN O. V. Reactivity of C-amino-1,2,4-triazoles toward electrophiles: A combined computational and experimental study of alkylation by halogen alkanes. *Journal of Organic Chemistry*, v. 80, p. 375-385, 2015.

CODD, R. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 252, p. 1387-1408, 2008.

CUNHA, M. C. R.; TAVARES, M. T.; CARVALHO, C. F.; PEREIRA, G. J. V.; SOUZA, A. D.; SILVA, N. A. T. F.; FERREIRA, F. F.; PARISE-FILHO, R. An environmentally safe condition for the synthesis of aryl and alkyl sulphonyl hydrazones via one pot reaction. *ACS Susteinable Chemistry & Enginnering*, v. 4, p. 1899-1905, 2016.

DE-RUYCK, J.; BRYSBAERT, G.; BLOSSEY, R.; LENSINK, M. F. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, v. 9, p. 1-11, 2016.

DOWLING, D. P.; CONSTANZO, L. D.; GENNADIOS, H. A.; CHRISTIANSON, D. W. Evolution of the arginase fold and functional diversity. *Cell Molecular Life Sciences*, v. 65(13), p. 2039-2055, 2008.

DRUMMMOND, D. C.; NOBLE, C. O.; KIRPOTIN, D. B.; GUO, Z.; SCOTT, G. K.; BENZ, C.C. Clinical development of histone deacetilase inhibitors as anticancer agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 45, p. 495-528, 2005.*

DUFOUR, A.; OVERALL, C. M. Missing the target: Matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends in pharmacological sciences,* v.34(4), p.233-242, 2013.

DUGGER, S. A.; PLATT, A.; GOLDSTEIN, D. B. Drug development in the era of precision medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, p. 183-196, 2018.

DUNCAN, R.; CONNORS, T. A.; MEADA, H. Drug targeting in cancer therapy: the magic bullet, what next? *Journal of Drug Targeting*, v. 3, p. 317-319, 1996.

EL-KERDAWY et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences of the United Arab Republic*, v. 10, p. 1-23, 1969.

FELICIANO, G.T.; DA SILVA, A. J. R. Unravelling the reaction mechanism of matrix metalloproteinase 3 using QM/MM calculations. *Journal of molecular structure*, v.1091, p.125-132, 2015.

FENG, Y.; LIKOS, J. J.; ZHU, L.; WOODWARD, H.; MUNIE, G.; MCDONALD, J. J.; STEVENS, A. M.; HOWARD, C. P.; DE CRESCENZO, G. A.; WELSCH, D.; SHIEH, H. S.; STALLINGS, W. C. Solution structure and backbone dynamics of the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2 complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Biochimica et biophysica acta,* v.1598(1-2), p.10- 23, 2002.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012: Cancer incidence and mortality worldwide. *IARC publications*, v.1, 2013.

FURUMAI, R.; MATSUYAMA, A.; KOBASHI, N.; LEE, K. H.; NISHIYAMA, M.; NAKAJIMA, H.; TANAKA, A.; KOMATSU, Y.; NISHINO, N.; YOSHIDA, M.; HORINOUCHI, S. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Research*, v.62(17), p. 4916-4921, 2002.

GAIKWAD, P. L.; GANDHI, P. S.; JAGDALE, D. M.; KADAM, V. J. The use of bioisosterism in drug design and molecular modification. *American Journal of PharmTech Research*, v. 2(4), p. 1-23, 2012.

GBD 2015 RISK FACTORS COLLABORATORS. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, v.388(10053), p.1659-1724, 2016.

GLOZAK, M. A.; SENGUPTA, N.; ZHANG, X.; SETO, E. Acetylation an deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, v. 363, p.15-23, 2005.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proceedings of the national academy of sciences,* v.48(6), p.1014-1022, 1962.

HALDER, A. K.; MALLICK, S.; SHIKHA, D.; SAHA, A.; SAHA, K. D.; JHA, T. Design of dual MMP-2/HDAC-8 inhibitors by pharmacophore mapping, molecular docking,

synthesis and biological activity. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 5, p. 72373-72386, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A., Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell,* v.144(5), p.646-674, 2011.

HASSEL, K. N. Histone deacetylase and their inhibitors in cancer epigenetics. *Diseases*, v. 7, p. 57-70, 2019.

HEACOCK, J. F.; EDMILSON, M. T. Orientation and relative reaction rate factors in aromatic substitution by the benzenesulfonamido radical. *Journal of American Chemistry Society*, v. 82(13), 3460-3463, 1960.

HEIMBERGER, A. B.; WANG, E.; MCGARY, E. C.; HESS, K. R.; HENRY, V. K.; SHONO, T.; COHEN, Z.; GUMIN, J.; SAWAYA, R.; CONRAD, C. A.; LANG, F. F. Mechanisms of action of rapamycin in gliomas. *Neuro-Oncology*, v. 7(1), p. 1-11, 2005.

HESHAM, H. M.; LASHEEN, D. S.; ABOUZID, K. M. Chimeric HDAC inhibitors: Comprehensive review on the HDAC-based strategies developed to combat cancer. *Medicinal Research Reviews*, v. 38, p. 2058-2109, 2018.

HOW, J.; MINDEN, M. D.; LEBER, B.; CHEN, E. X.; BRANDWEIN, J.; SCHUH, A. C.; SCHIMMER, A. D.; GUPTA, V.; WEBSTER, S.; DEGELDER, T.; HAINES, P.; STAYNER, L.; MCGILL, S.; WNAG, L.; PIEKARZ, R.; WONG, T.; SIU, L. L.; ESPINOZA-DELGADO, I.; HOLLERAN, J. L.; EGORIN, M. J.; YEE, K. W. A phase I trial of two sequence-specific schedules of decitabine and vorinostat in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, v. 56(10), p. 2793-2802, 2015.

HULL, E. E.; MONTGOMERY, M. R.; LEYVA, K. J. HDAC inhibitors as epigenetic regulators of the immune system: Impacts on cancer therapy and inflammation diseases. *Biomed Research International*, v. 2016, p. 8794206, 2016.

INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. 2015.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. 2018.

JUERGENS, R. A.; VENDETTI, F.; COLEMAN, B.; SEBREE, R. S.; RUDEK, M. A.; BELINSKY, S. A.; BROCK, M. V.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B.; RUDIN, C. M. Phase

I trial of 5-azacitidine(5AC) and SNDX-275 in advanced lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*, v. 26(15). p. 19036-19036, 2016

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F., Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of clinical oncology,* v.24(14), p.2137-2150, 2006.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. v.141(1), p.52-67, 2010.

KESSENBROCK, K.; WANG, C. Y.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix biology*, v.44-46, p.184-190, 2015.

KHAN, N.; JEFFERS, M.; KUMAR, S.; HACKETT, C.; BOLDOG, F.; KHRAMTSOV N.; QIAN, X.; MILLS, E.; BERGHS, S. C.; CAREY, N.; FINN, P. W.; COLLINS, L. S.; TUMBER, A.; RITCHIE, J. W.; JENSEN, P. B.; LICHENSTEIN, H. S.; SEHESTED, M. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochemical Journal*, v. 409, p. 581-589, 2008.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D.R.; WEINBERG, R.A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell,* v.168(4), p.670-691, 2017.

LAUFFER, B. E. L.; MINTZER, R.; FONG, R.; MUKOND, S.; TAM, C.; ZILBERLEYB, I.; FLICKE, B.; RITSCHER, A.; FEDOROWICZ, G.; VALLERO, R.; ORTWINE, D. F.; GUNZNER, J.; MODRUSAN, Z.; NEUMANN, L.; KOTH, C. M.; LUPARDUS, P. J.; KAMINKER, J.S.; HEISE, C. E.; STEINER, P. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288(37), p. 26926-26943, 2013.

LAVOIE, R.; BOUCHAIN, G.; FRECHETTE, S.; WOO, S. H.; KHALIL, E. A.; LEIT, S.; FOURNEL, M.; YAN. P. T.; TRACHY-BOURGET, M. C.; BEAULIEU, C.; LI, Z.; BESTERMAN, J.; DELORME, D. Design and synthesis of a novel class of histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, p. 2847-2850, 2001.

LEE, J.; LEE, T, H. How protein binding sensitizes the nucleosome to histone H3K56 acetylation. *ACS Chemical Biology*, v. 14(3), p. 506-515, 2019.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery, *Beilstein journal of organic chemistry,* v.12, p.2694–2718, 2016.

LI, K.; TU, Y.; LIU, Q.; OUYANG, Y.; HE, M.; LUO, M.; CHEN, J.; PI, R.; LIU, A. PT93, a novel caffeic acid amide derivative, suppresses glioblastoma cells migration, proliferation and MMP-2/-9 expression. *Oncology Letters*, v. 13(3), p. 1990-1996, 2017.

LI, X.; WU, J.; LI, X.; MU, W.; LIU, X.; JIN, Y.; XU, W.; ZHANG, Y. Development of *N*-hydroxybenzamide derivatives with indole-containing cap group as histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 23, p. 6258-6270, 2015.

LI, Y.; WANG, Y.; XIE, N.; XU, M.; QIAN, P.; ZHAO, Y.; LI, S. Design, synthesis and antiproliferative activities of novel benzamides derivatives as HDAC inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 100, p. 270-276, 2015.

LIU, N.; LI, S.; WU, N.; CHO, K. S. Acetylation and deacetylation in cancer stem-like cells. *Oncotarget*, v. 8(51), p. 89315-89325. 2017.

LONG, P. M.; TIGHE, S. W.; DRISCOLL, H. E.; MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, ARYAN M. A. NAMBOODIRI, A. A.; VIAPIANO, M. S.; LAWLER, S. E.; JAWORSKY, D. M. Acetate supplementation induces growth arrest of NG2/PDGFRα-positive oligodendroglioma-derived tumor-initiating cells. *PLoS One*. V. 8(11), e80714, 2013.

LOPEZ, J. E.; SULLIVAN, E. D.; FIERKE, C A. Metal-dependent deacetylases: Cancer and epigenetic regulators. *ACS Chemical Biology*, v. 11, p. 706-716, 2016.

MALHOTRA, V.; PERRY, M. C.; Classical chemotherapy: Mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer biology & therapy*, v.2(4), p. S2-S4, 2003.

MANOS-TURVEY, A.; WATSON, E. E.; SYKES, M. L.; JONES, A. J.; BAELL, J. B.; KAISER, AVERY, V. M.; PAYNE, R. J. Synthesis and evaluation of phenoxymethylbenzamide analogues as anti-trypanosomal agents. *Medicinal Chemistry Communications*, v. 6(3), p. 403-406, 2015.

MARKS, P. A.; BRESLOW, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature Biotechnology*, v. 25(1), p.84-90, 2007.

MATHEW, V.; KESHAVAYA, J.; VAIDYA, V. P.; KHAN, M. H. M. Triazoles as complexing agents: Synthesis, characterization and pharmacological activities of copper complexes of 4-amino-3-mercapto-5-substituted aryl 1,2,4 triazoles. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 61(16), p. 2629-2638, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de informação sobre mortalidade. <disponível on line em: http://www2.datasus.gov.br >.

MULDER, G. J.; MEERMAN, J. H. N. Sulfation and glucuronidation as competing pathways in the metabolism of hydroxamic acids: The role of N, O sulfonation in chemical carcinogenesis of aromatic amines. *Environmental health perspectives*, v.49, p.27-32, 1983.

NARA, H.; KAIEDA, A.; SATO, K.; NAITO, T.; MOTOTANI, H.; OKI, H.; YAMAMOTO, Y.; KUNO, H.; SANTOU, T.; KANZAKI, N.; TERAUCHI, J.; UCHIKAWA, O.; KORI, M. Discovery of novel, highly potent, and selective matrix metalloproteinase (MMP)-13 inhibitors with a 1,2,4-triazol-3-yl moiety as a zinc binding group using a structure-based design approach. *Journal of medicinal chemistry*, v.60(2), p.608-626, 2017.

NGUYEN, T.T.; MOBASHERY, S.; CHANG, M. Chapter 3: Roles of matrix metalloproteinases in cutaneous wound healing. *Wound healing: New insights into ancient challenges*, 2016.

PAVLAKI, M.; ZUCKER, S. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPIs): The beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer and metastasis reviews,* v.22(2-3), p.177-203, 2003.

PEDREIRA, J. G. B.; FRANCO, L. S.; BARREIRO, E. J. Chemical intuition in drug design and discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 1679-1693, 2019.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. Purification of laboratory chemicals. *Butterworth-Heinemann*, 4ª ed., 1997.

PETERSON, Q. P.; GOODE, D. R.; WEST, D. C.; RAMSEY, K. N.; Joy J. Y. LEE, J. J. Y.; HERGENROTHER, P. J. PAC-1 Activates procaspase-3 in vitro through relief of zinc-mediated inhibition. *Journal of Molecular Biology*, v.388(1), p.144-158, 2009.

PIETRZAK, M.; JEDRZEJEWSKA, B.; MADRZEJEWSKA, D.; BAJOREK, A. Convenient synthesis of *p*-aminobenzoic acids and their methyl esters. *Organic Preparations and Procedures International*, v.49, p. 45-52, 2017.

PLUMMER, M.; DE MARTEL, C.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; FRANCESCHI, S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The lancet global health*, v.4(9), p.609-616, 2016.

RICCARDI, L.; GENNA, V.; DE VIVO, M. Metal-ligand interactions in drug design. *Nature Reviews Chemistry*, v. 2, p.100-112, 2018.

ROELL, D.; RÖSLER, W. T.; HESSENKEMPER, W.; FLORIAN, K.; HAUSCHILD, M.; BARTCSH, S.; ABRAHAM, T. E.; HOUTSMULLER, A. B.; MATUSCH, R.; VAN-ROYEN, M. E.; BANIAHMAD, A. Halogen –substituted anthranilic acid derivatives provide a novel chemical platform for androgen receptor antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 188, p. 59-70, 2019.

SADHUKHAN, D.; RAY A.; PILET, G.; RIZZOLI, C.; ROSAIR, G.M.; GÓMEZ-GARCÍA, C.J.; SIGNORELLA, S.; BELLÚ, S.; MITRA, S. Weak interactions modulating the dimensionality in supramolecular architectures in three new nickel(II)-hydrazone complexes, magnetostructural correlation, and catalytic potential for epoxidation of alkenes under phase transfer conditions. *Inorganic Chemistry*, v.50(17), p.8326-8339, 2011.

SAENZ-MENDEZ, P.; ERIKSSON, L. A. Exploring polypharmacology in drug design. *Rational Drug Design*, p. 229-243. 2018.

SAHA, A.; WITTMEYER, J.; CAIRNS, B. R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7(6); p. 437–447, 2006.

SANDERS, B. D.; JACKSON, B.; MARMORSTEIN, R. Structural basis for sirtuin function: What we know and what we don't. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1804(8), p. 1604-1616, 2009.

SANTOS-BARRIOPEDRO, I.; LI, Y.; BAHL, S.; SETO, E. HDAC8 affects MGMT levels in glioblastoma cell lines via interaction with the proteasome receptor ADRM1. *Genes Cancer*, v. 10(5-6), p. 119-133, 2019.

SCHNEIDER, P.; SCHNEIDER, G. De novo design at the edge of chaos. *Journal of medicinal chemistry*, v.59(9), p.4077-4086, 2016.

SELIVANOVA, S. V.; STELLFELD, T.; HEINRICH, T. K.; MULLER, A.; KRAMER, S. D.; SCHUBIGER, P. A.; SCHIBLI, R.; AMETAMEY, S. M.; VOS, B.; MEDING, J.; BAUSER, M.; HUTTER, J.; DINKELBORG, L. M. Design, synthesis, and initial evaluation of a high affinity positron emission tomography probe for Imaging matrix metalloproteinases 2 and 9. *Journal of medicinal chemistry*, v.56(12), p.4912-4920, 2013.

SERRA, P.; BRUCZKO, M.; ZAPICO, J. M. MMP-2 selectivity in hydroxamate-type inhibitors. *Current medicinal chemistry,* v.19(7)*,* p.1036-1064, 2012.

SHAKED, Y. The pro-tumorigenic host response to cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, p. 667-685, 2019.

SHEEHAN, J. C.; HESS, G. P. A new method of forming peptide bonds. *Journal of American Chemistry Society*, v.77(4), p. 1067-1068, 1955.

SHEHWARO, N.; LANGLOIS, A. L.; GUEUTIN, V. Doxycycline, or how to create new with the old? *Therapie*, v.69(2), p.129-141, 2014.

SKEHAN, P.; SCUDIERO, S. R.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82(13), p. 1107-1112, 1990.

SILVA, N.A.T.F.; PARISE-FILHO, R., Antineoplásicos potenciais: Síntese de novos inibidores seletivos de metaloproteinases. 2016. no. 431-16. *Trabalho de Conclusão*

de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPARMANN, A.; VAN LOHUIZEN, M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews: Cancer*, v. 6, p. 846-856, 2006.

STERCHI, E. E. Special issue: Metzincin metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine, v.*29, p.255-257, 2008.

STEWART, B.W.; WILD, C.P. World cancer report. *IARC publications,* 2014.

STRONGIN, A.Y.; COLLIER, I.; BANNIKOV, G.; MARMER, B.L.; GRANT, G.A.; GOLDBERG, G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *Journal of biological chemistry*, v.270(10), p.5331-5338, 1995.

SUZUKI, T.; MIYATA, N. Non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 2867-2880, 2005.

TAVARES, M. T.; SHEN, S.; KNOX, T.; HADLEY, M.; KUTIL, Z.; BARINKA, C.; VILLAGRA, A.; KOSIKOWSKI, A. P. Synthesis and pharmacological evaluation of selective histone deacetylase 6 inhibitors in melanoma models. *ACS Medicinal chemistry letters*, v. 8(10), p. 1031-1036, 2017.

UGWU, D. I.; OKORO, U. C.; UKOHA, P. O.; OKAFOR, S.; IBEZIM, A.; KUMAR, N. M. Synthesis, characterization, molecular docking, and *in vitro* antimalarial properties of new carboxamides bearing sulfonamide. *European journal of medicinal chemistry*, v. 135, p. 349-369, 2017.

URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VIÑALS, F.; CAPELLÁ, G., Recent advances in cancer therapy: An overview. *Current pharmaceutical design*, v.16, p.3-10, 2010.

VANDENBROUCKE, R. E.; LIBERT, C.; Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature reviews drug discovery*, v.13, p.904-927, 2014.

VANINI, A.; VOLPARI, C.; FILOCARMO, G.; CASAVOLA, E. C.; BRUNETI, M.; RENZONI, D.; CHACKRAVARTY, P.; PAOLINI, C.; DE FRANCESCO, R.;

GALLINARI, P.; STEINKÜHLER, C.; DI MARCO, S. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101(42), p. 15064-15069, 2004.

VICHAY, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, v. 1(3), p. 1112-1116, 2006.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

VITORINO, H. A.; MANTOVANELLI, L.; ZANOTTO, F. P.; ESPÓSITO, B. P.; Iron metallodrugs: Stability, redox activity and tocixity against *Artemia salina*. *PLoS ONE*, v. 10(4), e0121997, 2017.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E.; SILVA, F. M.; JUNIOR, J. J.; ÉSTEVES, P. M.; ALENCASTRO, R. B. Química orgânica: Estrutura e função. *Bookman*, 6 ed., 2013.

WANG, Y.; JIN, J.; MOORE, M. L.; GRAYBILL, T. L.; WANG, F.; WANG, M. A.; WANG, B.; JIN, Q.; RIVERO, R. A. Monoacylation of unprotected symmetrical diamines with resin-bound benzoic acids. *Tetrahedron Letters*, v. 45, p. 6645-6648, 2004.

WANG, Y.; YANG, L.; HOU, J.; ZOU, Q.; GAO, Q.; YAO, W.; YAO, Q.; ZHANG, J. Hierarchical virtual screening of the dual MMP-2/HDAC 6 inhibitors from natural products based on pharmacophore models and molecular docking. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 37(3), p. 649-670, 2019.

WU, G.; WILSON, G.; GEORGE, J.; LIDDLE, C.; HEBBARD, L.; QIAO, L. Overcoming treatment resistance in cancer: Current understanding and tactics. *Cancer letters, v.*387, p.69-76, 2017.

WYDYSH, E. A.; MEDGHALCHI, S. M.; VADLAMUDI, A.; TOWNSEND, C. Design and synthesis of small molecule glycerol 3-phosphate acyltransferase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 3317-3327, 2009.

YADAV, T.; WHITEHOUSE, I. Replication-coupled nucleosome assembly and positioning by ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell Reports*, v. 15(4), p. 715–723, 2016.

YANG, J. S.; LIN, C. W.; SU, S. C.; YANG, S. F. Pharmacodynamic considerations in the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v.12(2), p.191–200, 2016.

YAP, M.L.; HANNA, T.P.; SHAFIQ, J.; FEARLEY, J.; BRAY, F.; DELANEY, G.P.; BARTON, M. The benefits of providing external beam radiotherapy in low- and middle-income countries. *Clinical oncology*, v.29(2), p.72-83, 2017.

ZAPICO, J. M.; SERRA, P.; GARCIA-SANMARTIN, J.; FILIPIAK, K.; CARBAJO, R. J.; SCHOTT, A. K.; PINEDA-LUCENA, A.; MARTINEZ, A.; MARTÍN-SANTAMARIA, S.; PASCUAL-TERESA, B.; RAMOS, A. Potent “clicked” MMP-2 inhibitors: Synthesis, molecular modeling and biological exploration. *Organic & biomolecular chemistry*, v.9(12), p.4587-4599, 2011.

ZAPICO, J.M.; PUCKOWSKA, A.; FILIPIAK, K. Design and synthesis of potent hydroxamate inhibitors with increased selectivity within the gelatinase Family. *Organic & biomolecular chemistry*, v.13(1), p.142-156, 2015.

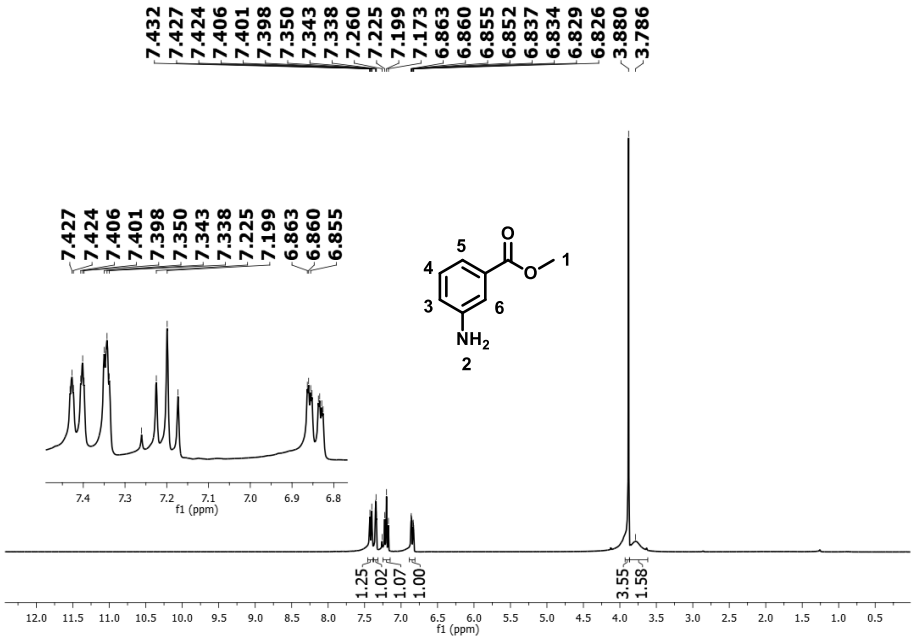
ZHANG, L.; ZHANG, J.; JIANG, Q.; ZHANG, L.; SONG, W. Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 33(1), p. 714-721, 2018.

ZHAO, C.; ZANG, J.; DING, Q.; INKS, E. S.; XU, W.; CHOU, C. J.; ZHANG, Y. Discovery of *meta*-sulfamoyl *N*-hydroxybenzamides as HDAC8 selective inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 150, p. 282-291, 2018.

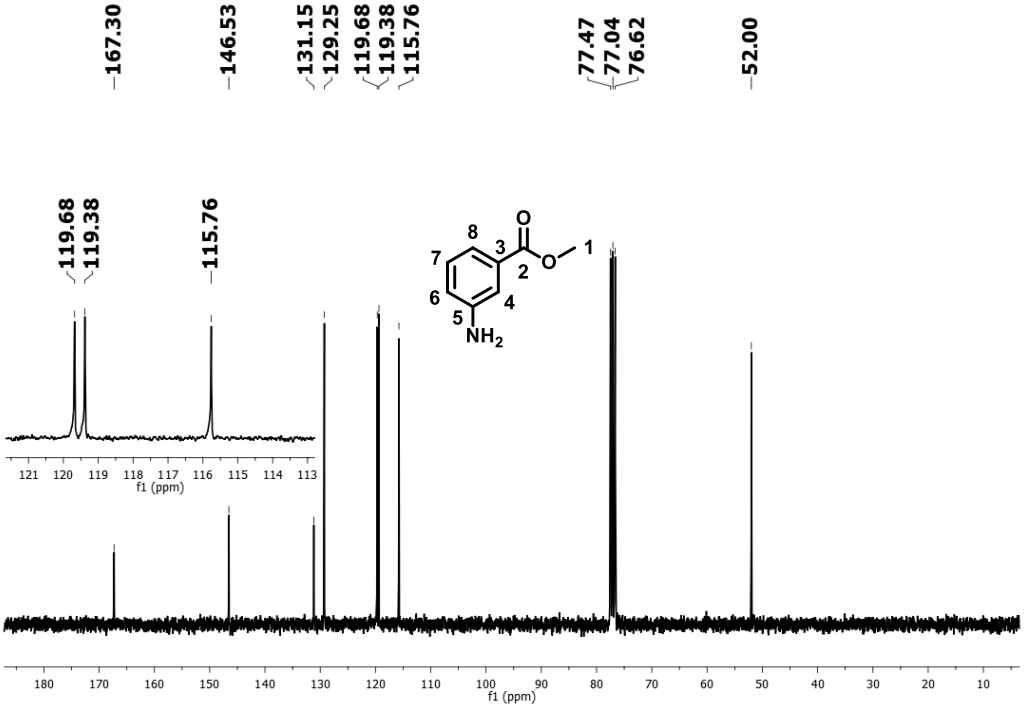
8. ANEXOS

8.1. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS.

8.1.1. 3-Amino benzoato de metila (*m*-ABME)

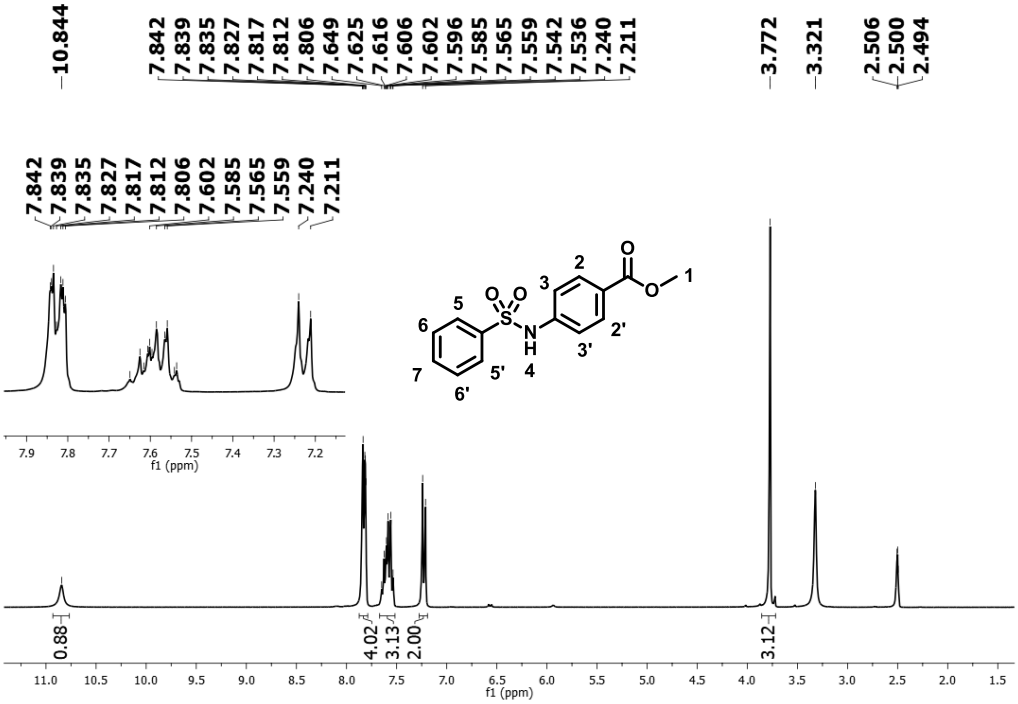


RMN ^{1}H [300 MHz, $CDCl_3$] δ (ppm): 7,41 [ddd, *J* = 7,7; 2,4; 1,0 Hz 1H (H5)]; 7,34 [dd, *J* = 2,0, 1,6 Hz, 1H (H6)]; 7,20 [t, *J* = 7,8 Hz, 1H (H4)]; 6,84 [ddd, *J* = 8,0; 2,4; 0,9 Hz, 1H (H3)]; 3,88 [s, 3H (H1)]; 3,78 [sl, 2H (H2)].

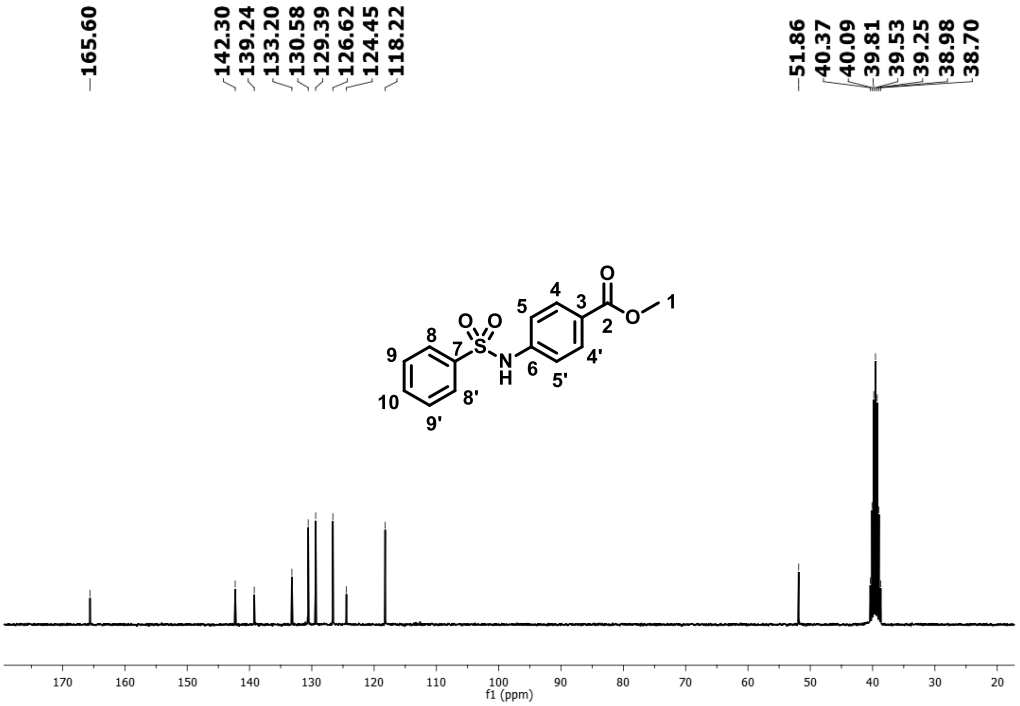


RMN ^{13}C [75 MHz,$CDCl_3$] δ (ppm): 167,3 (C2); 146,53 (C5); 131,1 (C3); 129,2 (C8); 119,7 (C7); 119,4 (C4); 115,8 (C6); 52,0 (C1).

8.1.2. 4-Fenilsulfonamido benzoato de metila (*p*-BME, 1a)

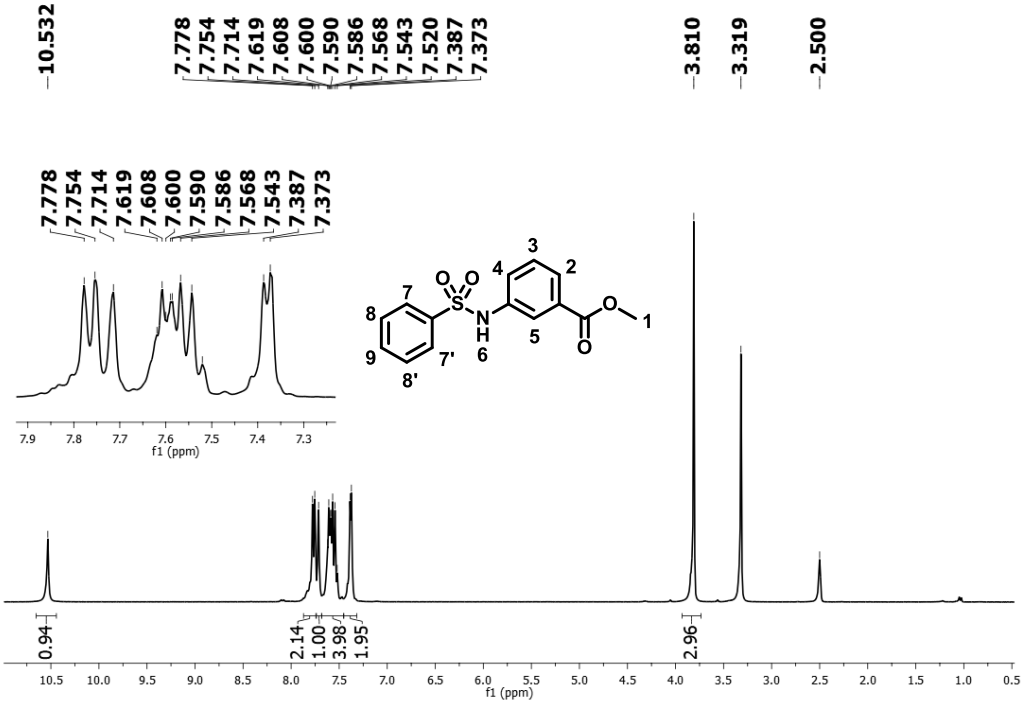


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,84 [sl,1H (H4)]; 7,84-7,80 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,60-7,55 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,23 [d, *J* = 8,7 Hz, 2H (H3, H3')]; 3,77 [s, 3H (H1)].

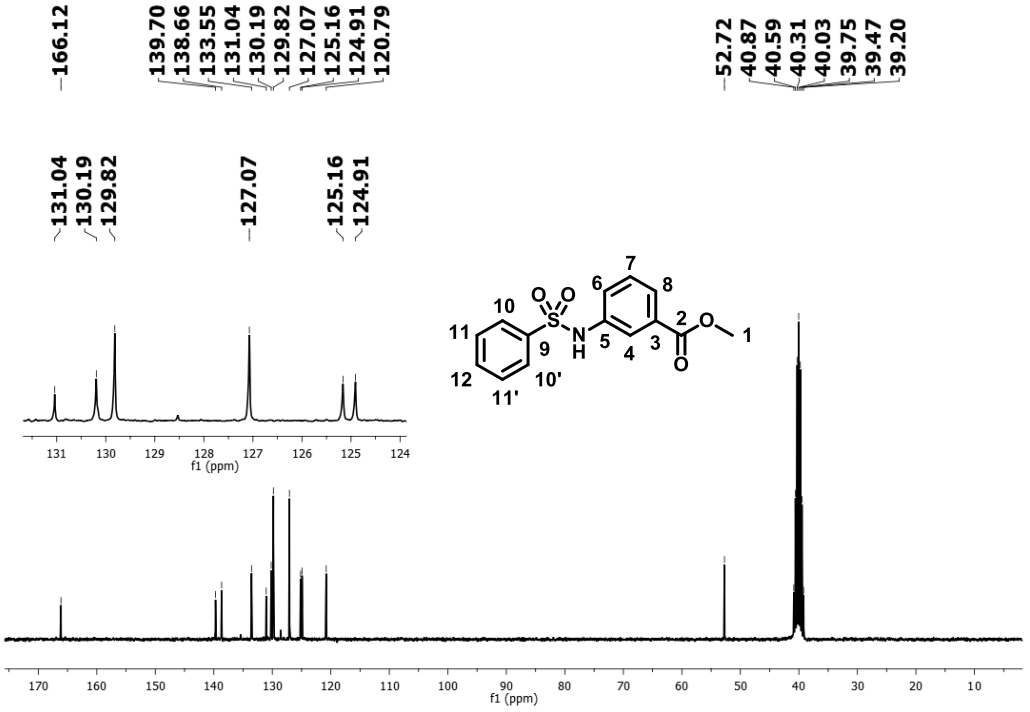


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 165,6 (C2); 142,3 (C6); 139,2 (C7); 133,2 (C10); 130,6 (C4, C4'); 129,4 (C8, C8'); 126,6 (C9, C9'); 124,4 (C3); 118,2 (C5, C5'); 51,9 (C1).

8.1.3. 3-Fenilsulfonamido benzoato de metila (*m*-BME, 1b)

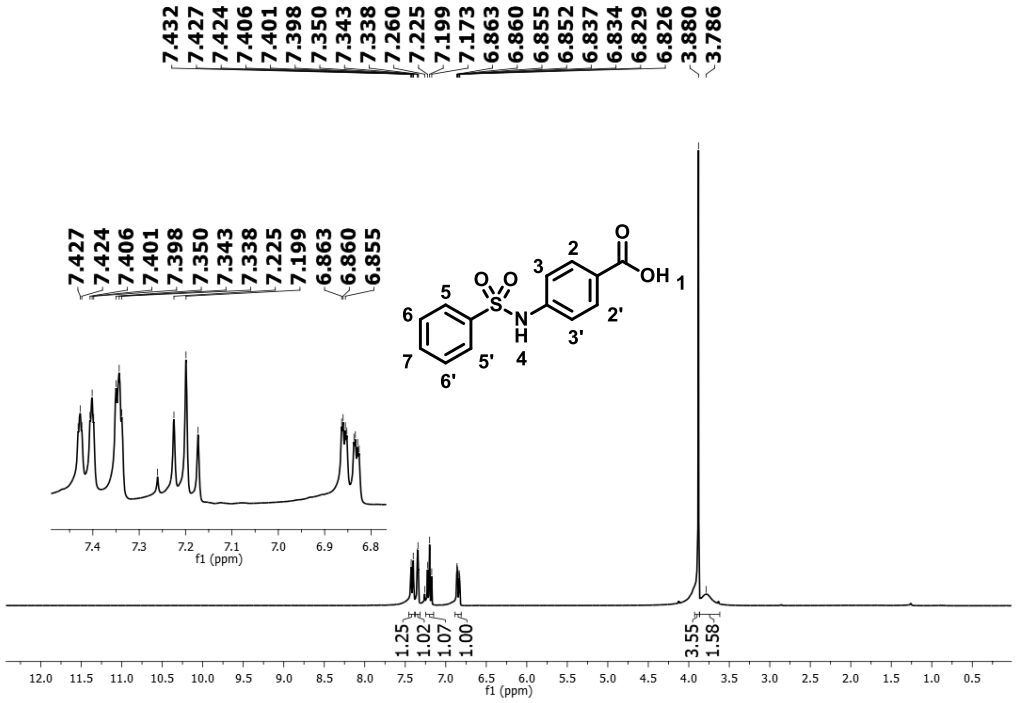


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,53 [sl, 1H (H6)]; 7,77 [d, *J* = 7,1 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,71 [s, 1H (H5)]; 7,61-7,54 [m, 4H (H2, H8, H8', H9)]; 7,38-7,37 [m, 2H (H3, H4)]; 3,81 [s, 3H (H1).].

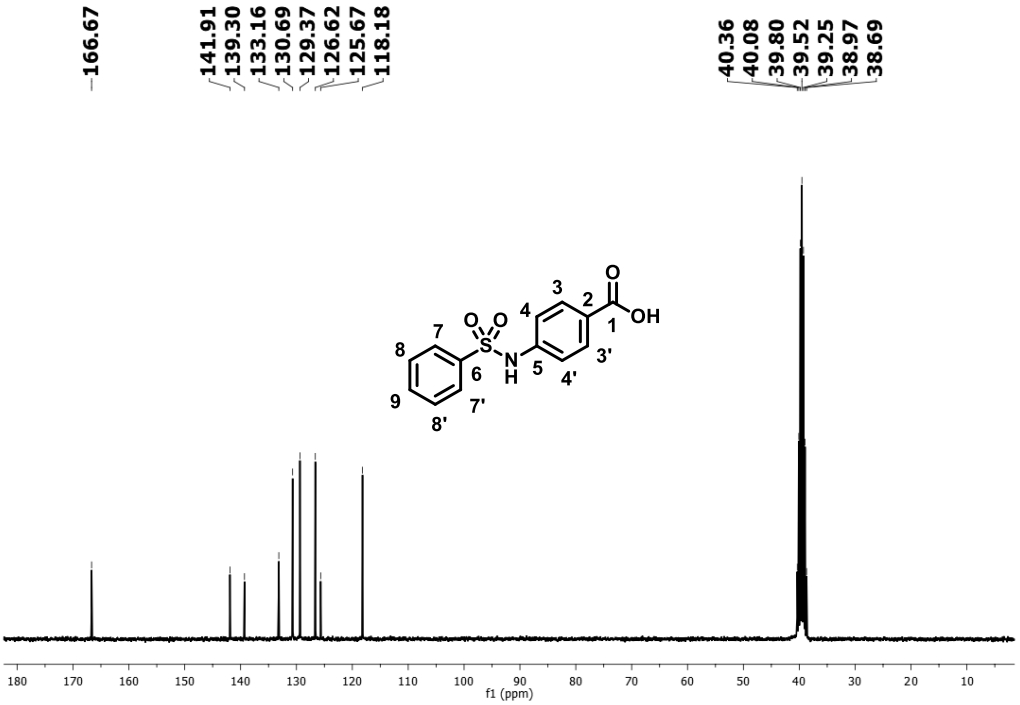


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,1 (C2); 139,7 (C9); 138,7 (C5); 133,5 (C12); 131,0 (C3); 130,2 (C8); 129,8 (C10, C10'); 127,1 (C11, C11'); 125,2 (C7); 124,9 (C4); 120,8 (C6); 52,7 (C1).

8.1.4. Ácido 4-fenilsulfonamido benzóico (*p*-BA, 2a)

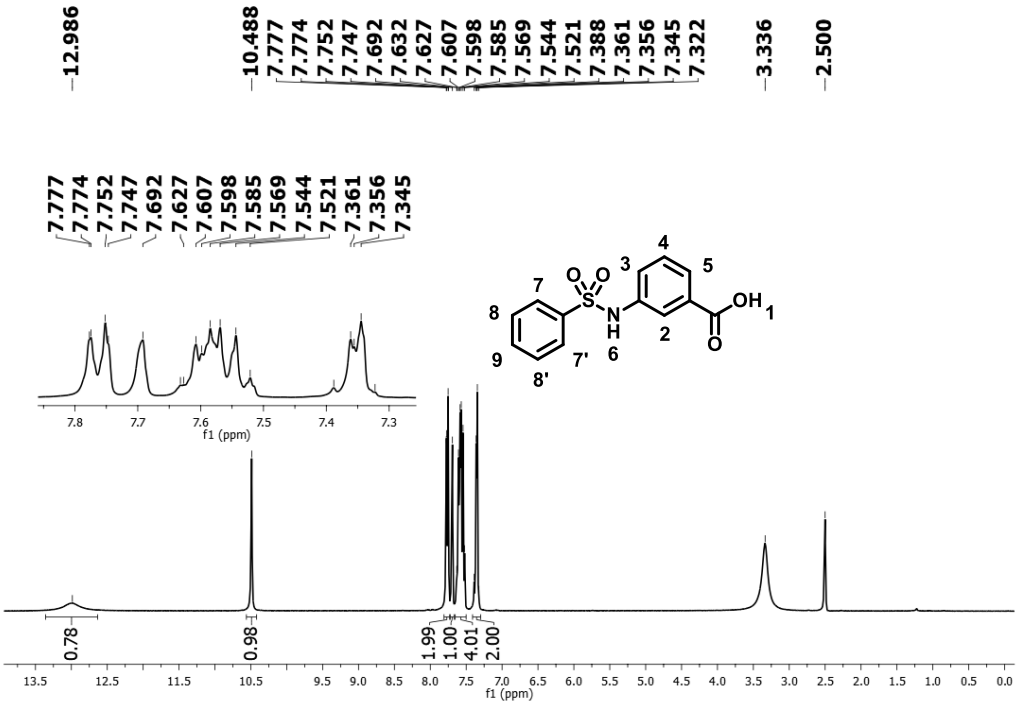


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,70 [sl, 1H (H1)]; 10,78 [sl, 1H (H4)]; 7,84-7,79 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,65-7,54 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,20 [d, *J* = 8,7 Hz, 2H (H3, H3')].

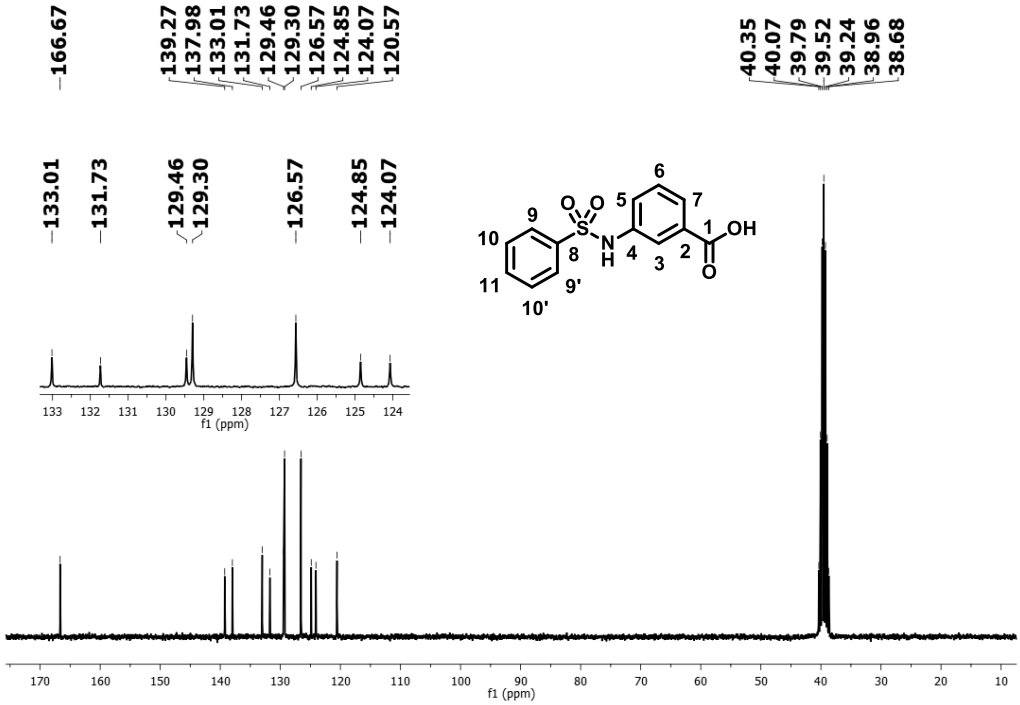


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,7 (C1); 141,9 (C5); 139,3 (C6); 133,1 (C9); 130,7 (C3, C3'); 129,4 (C7, C7'); 126,6 (C8, C8'); 125,7 (C2); 118,2 (C4, C4').

8.1.5. Ácido 3-fenilsulfonamido benzóico (*m*-BA, 2b)

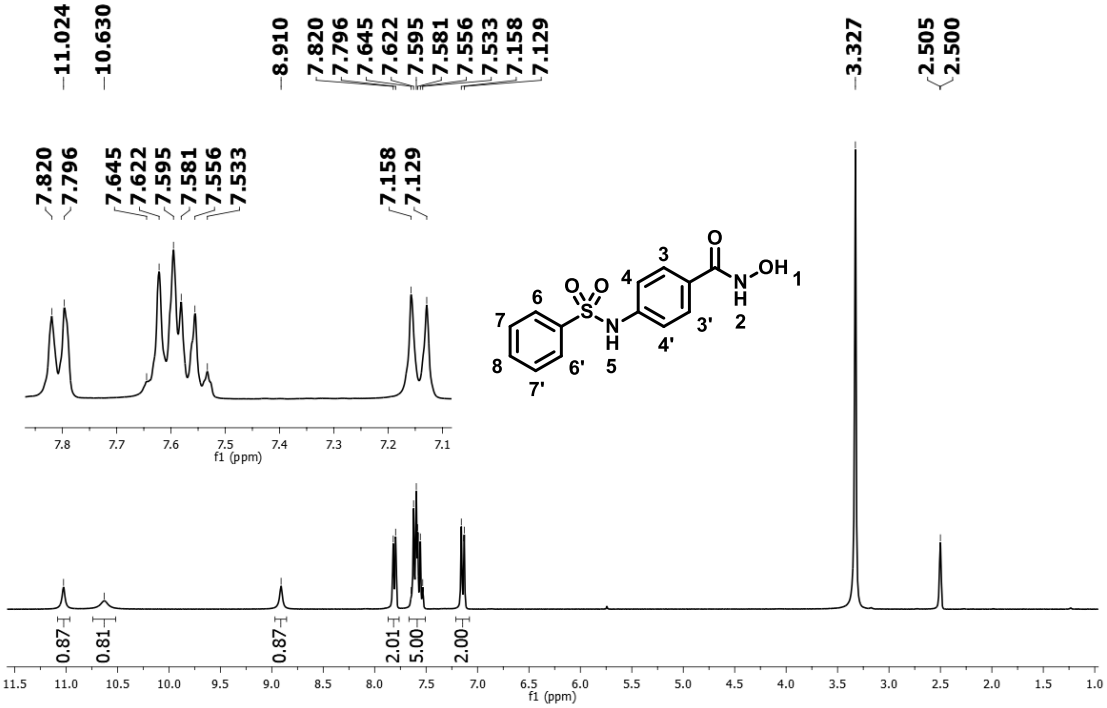


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,99 [sl, 1H (H1)]; 10,49 [sl, 1H (H6)]; 7,76 [dt, *J* = 7,9; 1,1 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,70 [s, 1H (H2)]; 7,63-7,52 [m, 4H (H5, H8, H8', H9)]; 7,36-7,34 [m, 2H (H3, H4)].

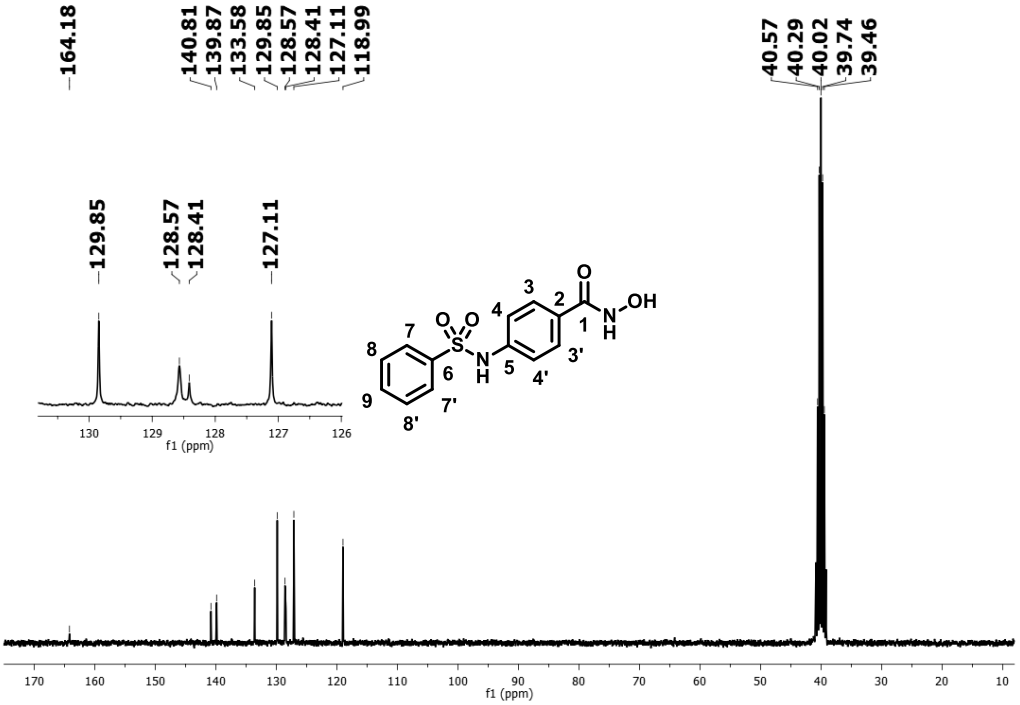


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,7 (C1); 139,3 (C4); 138,0 (C8); 133,0 (C11); 131,7 (C2); 129,5 (C7); 129,3 (C9, C9'); 126,6 (C10, C10'); 124,8 (C6); 124,1 (C3); 120,6 (C5).

8.1.6. N-hidróxi-(4-fenilsulfonamido) benzamida (*p*-NT01, 3a)

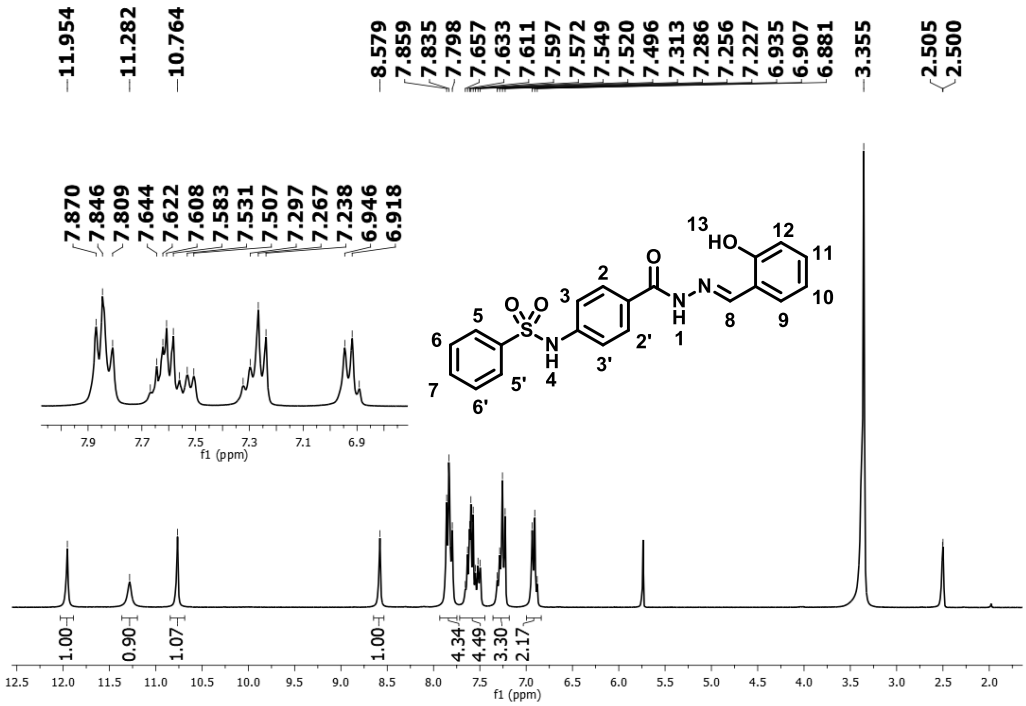


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 11,02 [sl, 1H (H1)]; 10,63 [sl, 1H (H5)]; 8,91 (sl, 1H (H2)]; 7,81 [d, *J* = 6,9 Hz, 2H (H3, H3')]; 7,64-7,53 [m, 5H (H6, H6', H7, H7', H8)]; 7,14 [d, *J* = 6,9 Hz, 2H (H4, H4')].

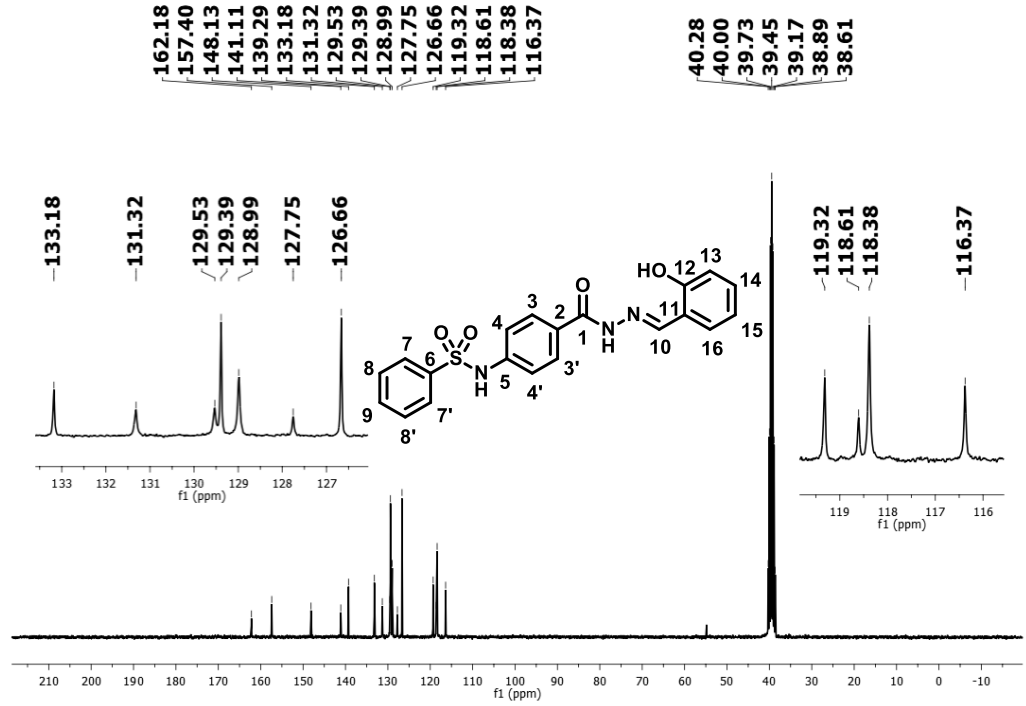


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 164,2 (C1); 140,8 (C5); 139,9 (C6); 133,6 (C9); 129,8 (C3, C3'); 128,6 (C7, C7'); 128,4 (C2);127,1 (C8, C8'); 119,0 (C4, C4').

8.1.7. (E)-N-(4-(1-(2-hidróxifenil)acilhidrazona)fenil)benzenosulfonamida (*p*-NT02, 4a)

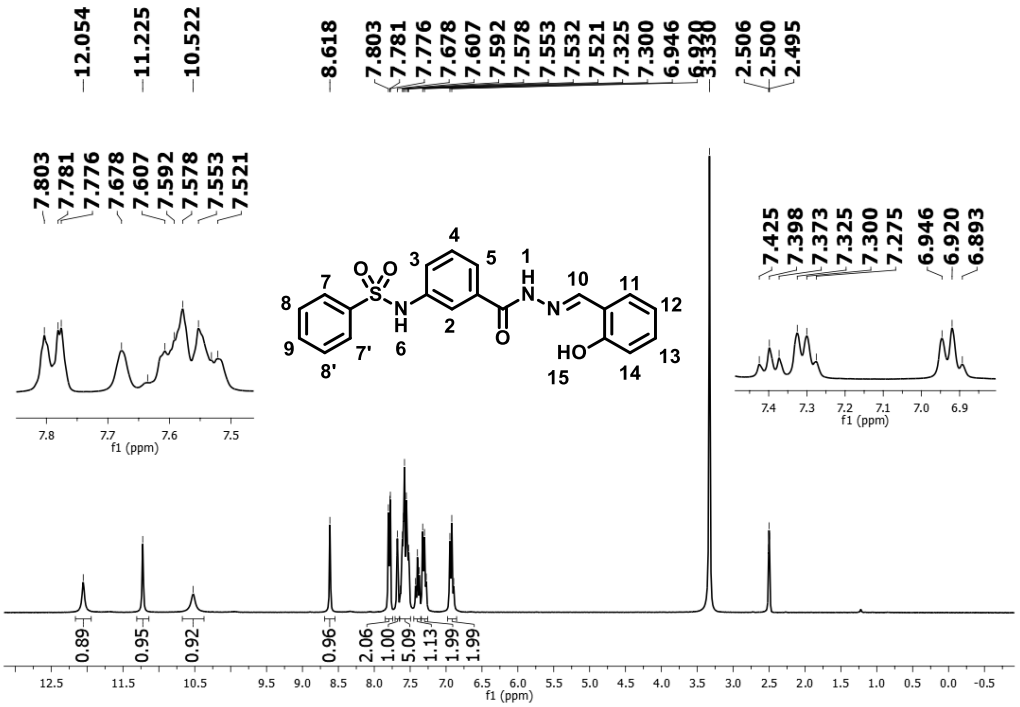


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 11,95 [sl, 1H (H13)]; 11,28 [sl, 1H, (H1)] 10,76 [sl, 1H (H4)]; 8,58 [s, 1H (H8)]; 7,87-7,81 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,64-7,50 [m, 3H (H6, H6', H7, H12)]; 7,30-7,23 [m, 3H (H3, H3', H9)]; 6,94-6,91 [m, 2H (H10, H11)].

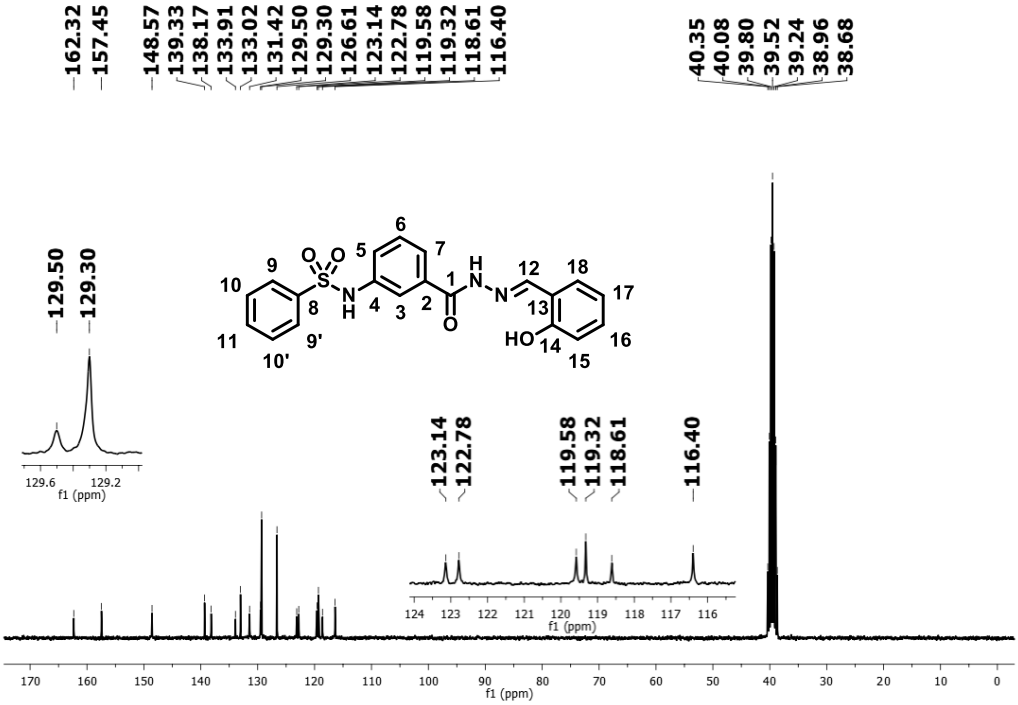


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 162,2 (C1); 157,4 (C10); 148,1 (C12); 141,1 (C5); 139,3 (C6); 133,2 (C9); 131,3 (C11); 129,5 (C13); 129,4 (C7, C7');129,0 (C3, C3');127,7 (C2) 126,7 (C8, C8');119,3 (C16); 118,6, (C14); 118,4 (C4, C4'); 116,4 (C15).

8.1.8. (E)-N-(3-(1-(2-hidróxifenil)acilhidrazona)fenil)benzenosulfonamida (*m*-NT02,4b)

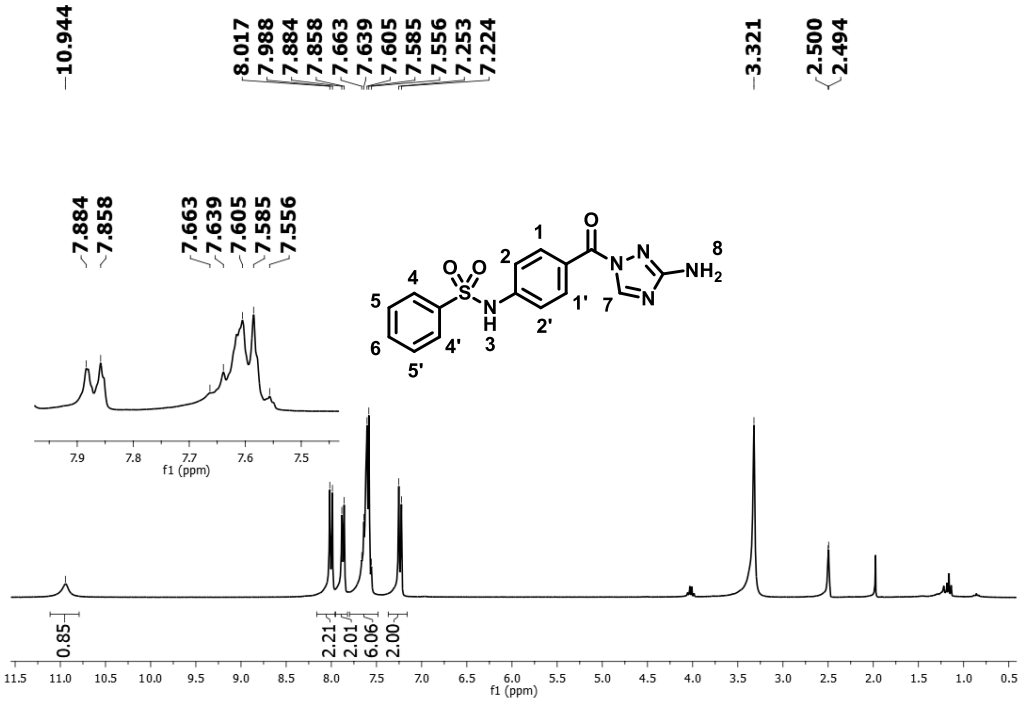


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 12,04 [sl, 1H (H15)]; 11,22 [sl, 1H (H1)]; 10,52 [sl, 1H (H6)]; 8,61 [s, 1H (H10)]; 7,80-7,78 [m, 2H (H7, H7')]; 7,67 [s, 1H (H2)]; 7,60-7,55 [m, 5H (H5, H8, H8', H9, H14)]; 7,42-7,37 [t, *J*= 7,8 Hz, 1H (H4)]; 7,32-7,27 [m, 2H (H11, H13)]; 6,95-6,89 [m, 2H (H3, H12)].

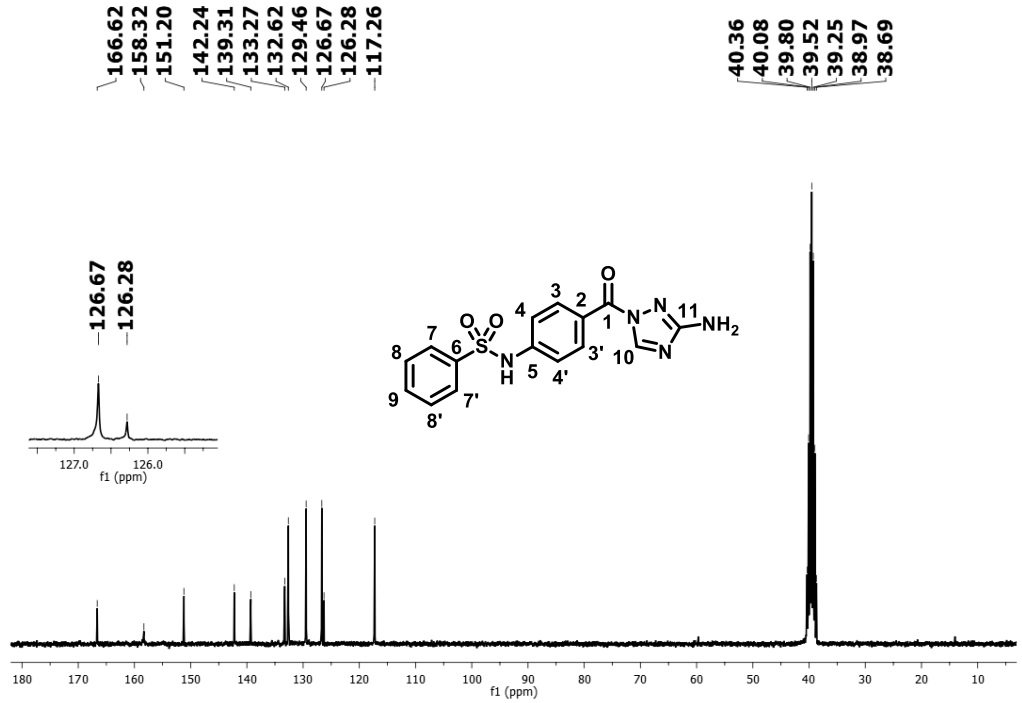


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 162,3 (C1); 157,4 (C12); 148,6 (C14); 139,3 (C4); 138,2 (C8);133,9 (C15); 133,0 (C11); 131,4 (C2); 129,5 (C7); 129,3 (C9, C9'); 126,6 (C10, C10'); 123,1 (C6); 122,8 (C18); 119,6 (C16); 119,3 (C3, C13); 118,6 (C17); 116,4 (C5).

8.1.9. N-(4-(1-acil (3-amino-1H-1,2,4 triazol))fenil) benzenosulfonamida (*p*-NT03, 5a)



RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,94 [sl, 1H (H3)]; 8,00 [d, *J* = 8,8 Hz, 2H (H1, H1')]; 7,87 [d, *J* = 7,7 Hz, 2H (H5, H5')]; 7,66-7,56 [m, 5H (H4, H6, H7, H8)]; 7,24 [d, *J* = 8,8 Hz, 2H (H2, H2')].

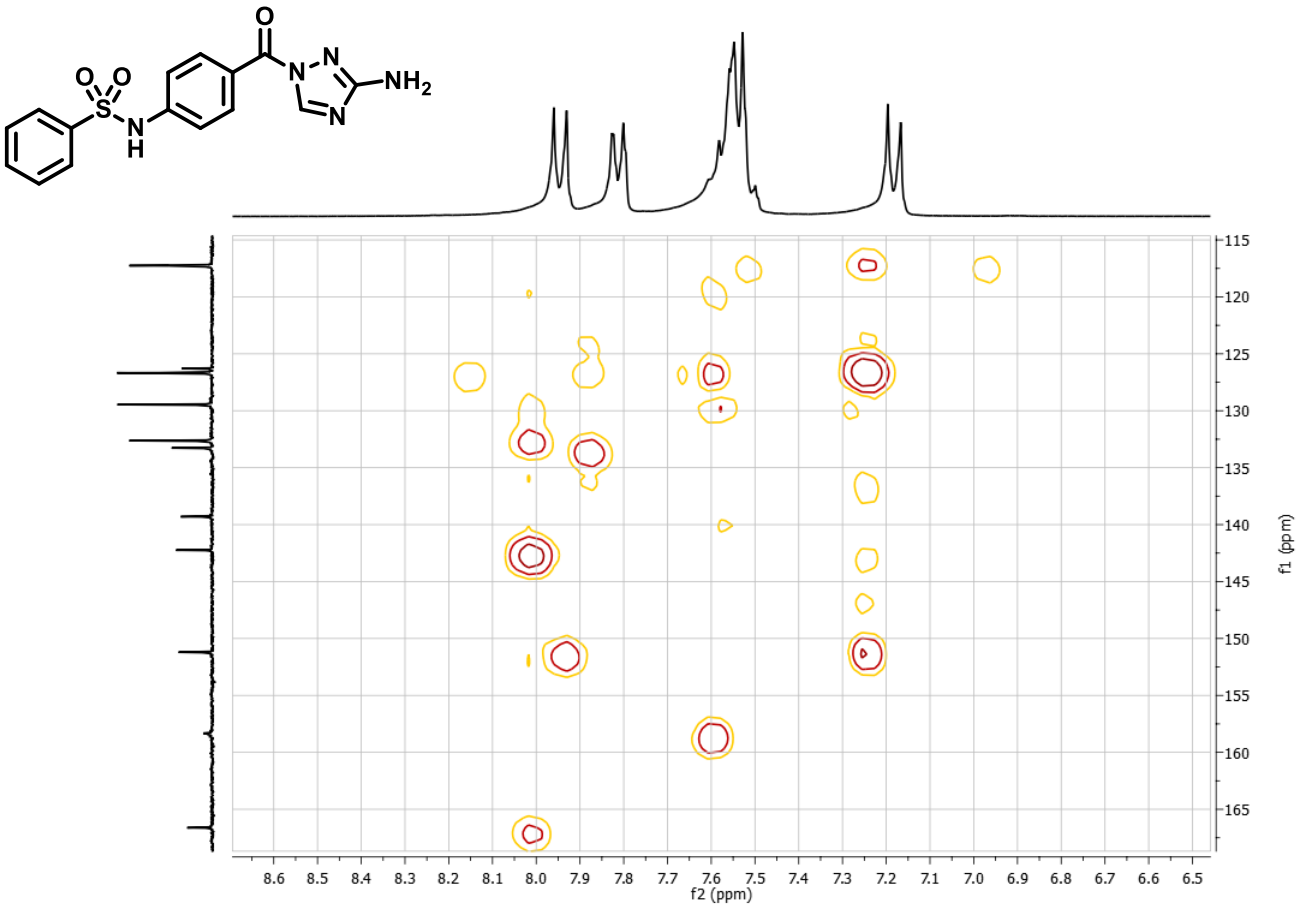


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 166,6 (C1); 158,3 (C11); 151,2 (C10); 142,2 (C2); 139,3 (C6); 133,2 (C9); 132,6 (C3, C3'); 129,5 (C7, C7'); 126,7 (C8, C8'); 126,3 (C5); 117,2 (C4, C4').

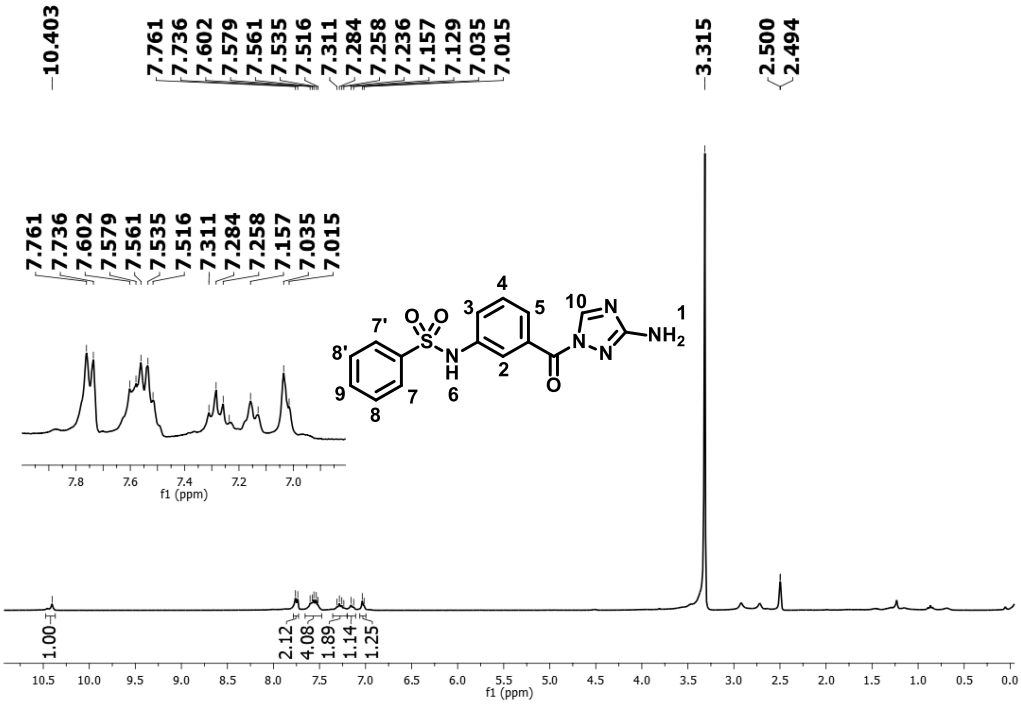
Mapa de contorno Hetcorr $^{13}C/ ^{1}H$ RMN [75/ 300 MHz]



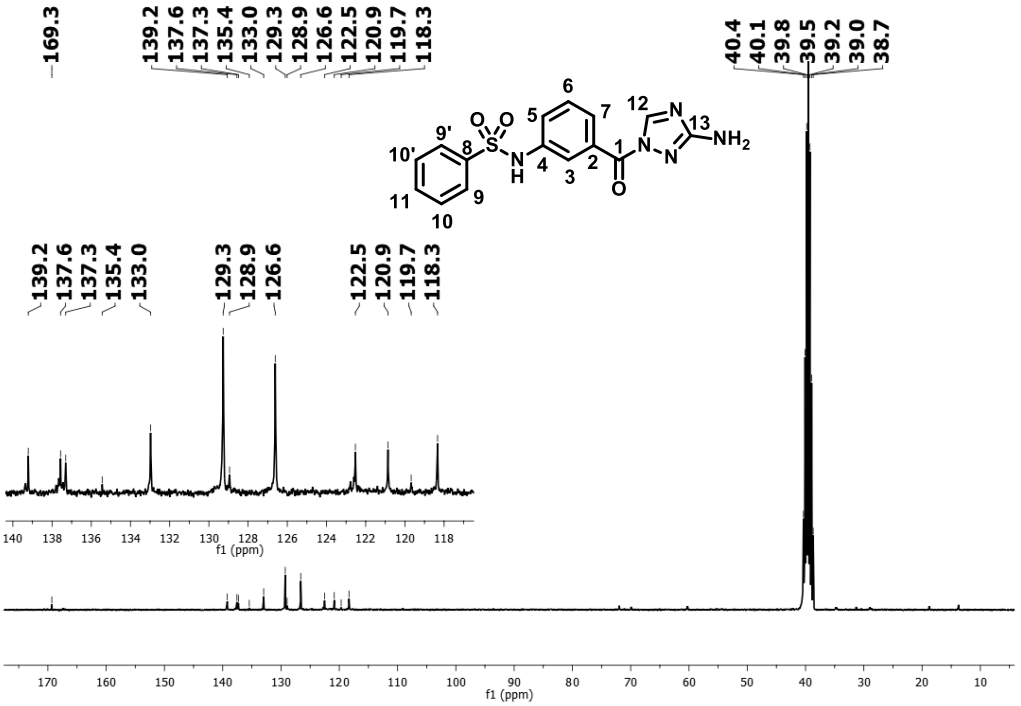
Mapa de contorno HMBC $^{1}H/ ^{13}C$RMN [300/ 75 MHz]:



8.1.10. N-(3-(1-acil (3-amino-1H-1,2,4 triazol))fenil) benzenosulfonamida (*m*-NT03,5b)

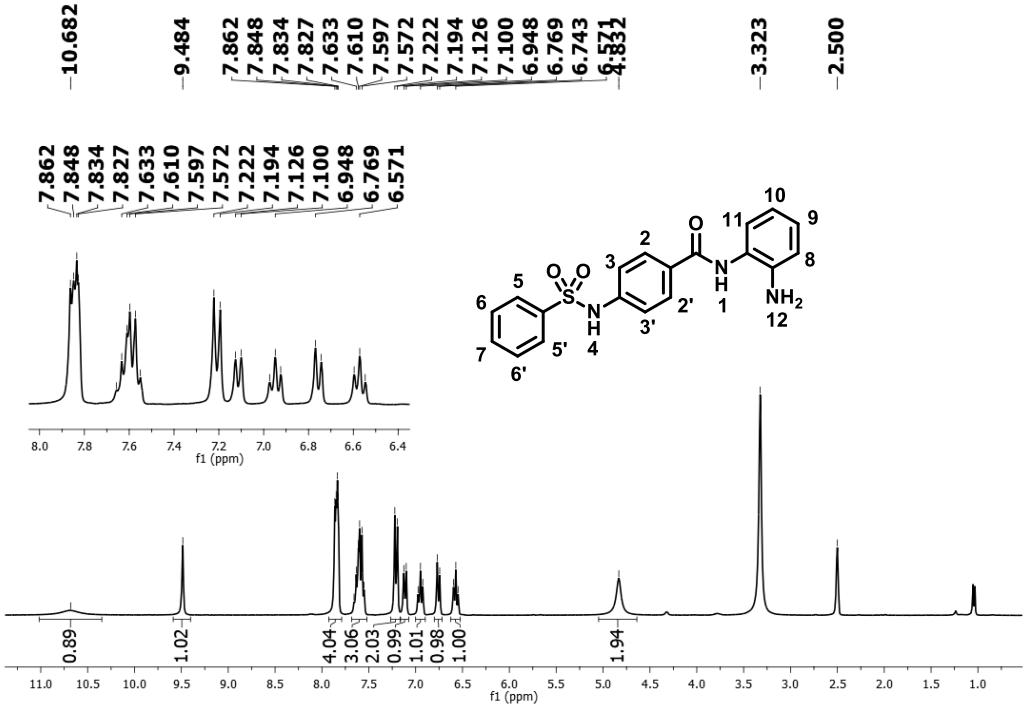


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,40 [sl, 1H (H6)]; 7,75 [d, *J* = 7,6 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,60-7,51 [m, 4H (H8, H8', H9, H10)]; 7,31-7,34 [m, 2H (H3, H4)]; 7,14 [d, *J* = 8,4 Hz, 1H (H5)]; 7,03 [s, 1H (H2)].

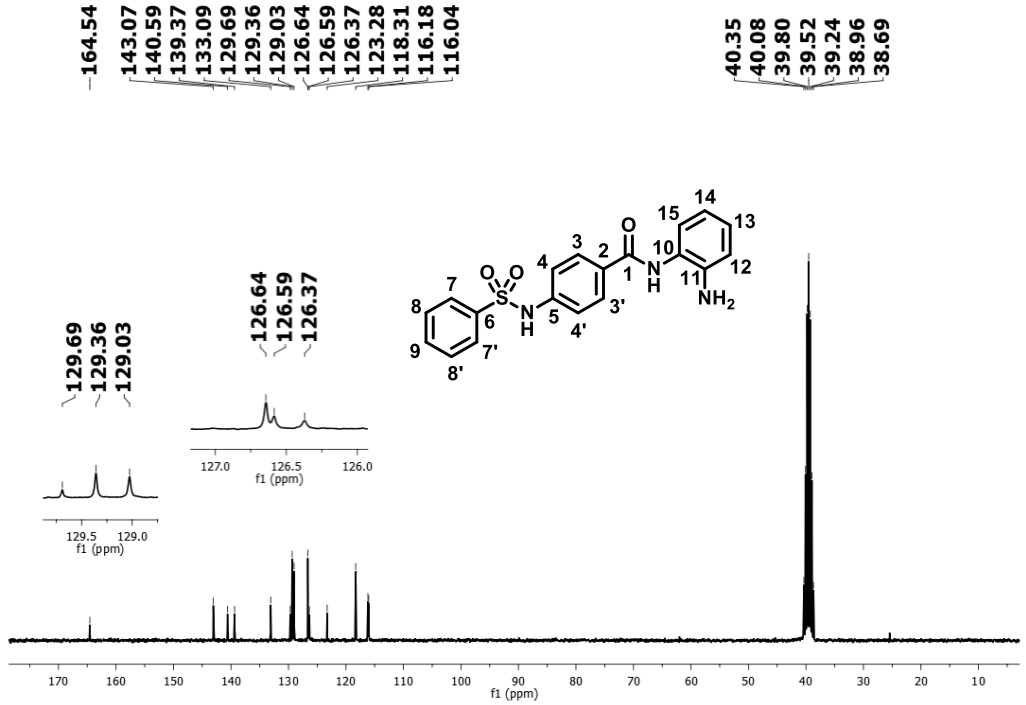


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 169,3 (C1); 139,2 (C4); 137,6 (C8); 137,3 (C13); 135,4 (C12); 133,0 (C11); 129,3 (C9, C9'); 128,9 (C2); 126,6 (C10, C10'); 122,5 (C7); 120,1 (C6); 119,7 (C3);118,3 (C5).

8.1.11. N-(2-aminofenil)-4-(fenilsulfonamido) benzamida (*p*-NT04, 6a)

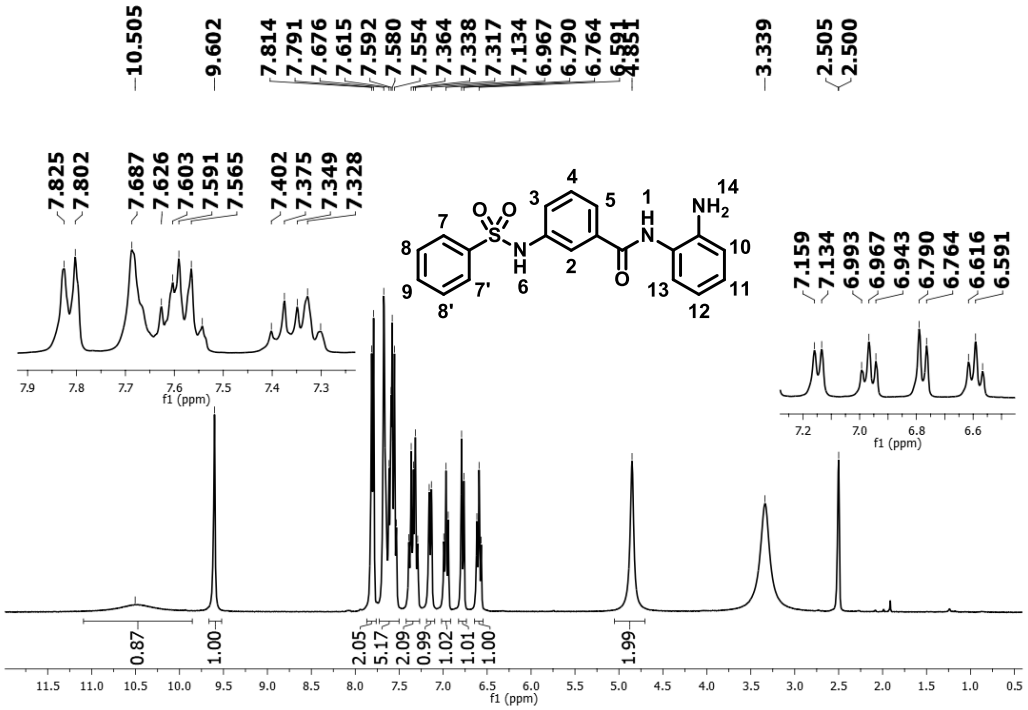


RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,68 [sl, 1H (H4)]; 9,48 [sl, 1H (H1)]; 7,86-7,82 [m, 4H (H2, H2', H5, H5')]; 7,63-7,57 [m, 3H (H6, H6', H7)]; 7,21 [d, *J* = 8,5 Hz, 2H (H3, H3')]; 7,11 [d, *J* = 7,6 Hz, 1H (H11)]; 6,95 [t, *J* = 7,4 Hz, 1H (H9)]; 6,76 [d, *J* = 7,8 Hz, 1H (H8); 6,57 [t, *J* = 7,4 Hz, 1H (H10)], 4,83 [s, 2H (H12)].

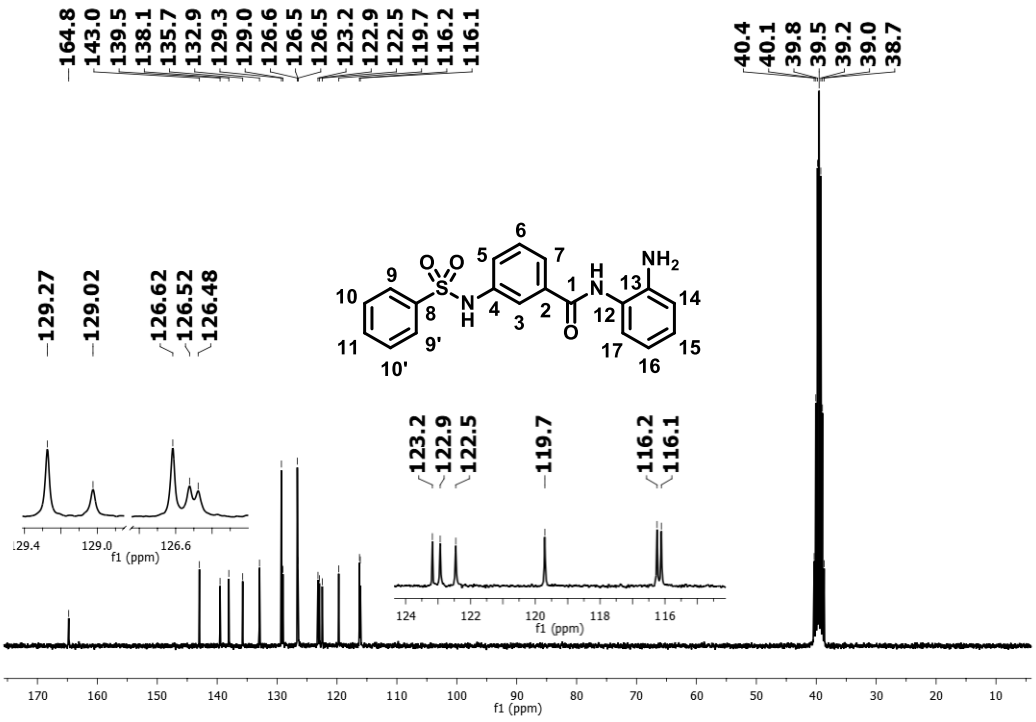


RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 164,5 (C1); 143,1 (C10); 140,6 (C5); 139,4 (C6); 133,1 (C9); 129,7 (C2); 129,4 (C3, C3'); 129,0 (C7, C7'); 126,64 (C8, C8'); 126,59 (C11); 126,4 (C15); 123,3 (C13), 118,3 (C4, C4'); 116,2 (C14); 116,0 (C12).

8.1.12. N-(2-aminofenil)-3-(fenilsulfonamido) benzamida (*m*-NT04, 6b)



RMN ^{1}H [300 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 10,50 [sl, 1H (H6)]; 9,60 [sl, 1H (H1)]; 7,76 [d, *J* = 6,8 Hz, 2H (H7, H7')]; 7,70 [s, 1H (H2)]; 7,63-7,59 [m, 4H (H5, H8, H8', H9)]; 7,37-7,33 [m, 2H (H3, H4)]; 7,16 [d, *J* = 7,6 Hz, 1H (H13)]; 6,98 [t, *J* = 7,6 Hz, 1H (H11)]; 6,80 [d, *J* = 7,9 Hz, 1H (H10)]; 6,60 [t, *J* = 7,5 Hz, 1H (H12)], 4,85 [s, 2H (H14)].



RMN ^{13}C [75 MHz, DMSO-*d*6] δ (ppm): 164,8 (C1); 143,0 (C12); 139,5 (C4); 138,1 (C8); 135,7 (C13); 132,9 (C11); 129,3 (C9, C9'); 129,0 (C2); 126,6 (C10, C10'); 126,52 (C7); 126,48 (C6); 123,2 (C15); 122,9 (C16); 122,5 (C3); 119,7 (C5); 116,2 (C17); 116,1 (C14).

8.2. RELATÓRIOS DE PUREZA CROMATOGRÁFICA

8.2.1. *p*-BME (1a)

1/10/2019 22:08:36 1 / 1

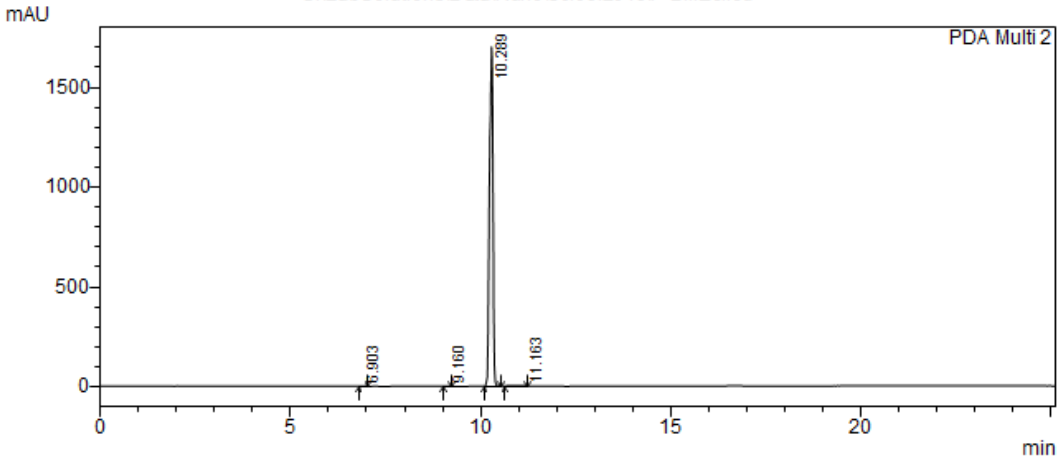
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\30.09.2019\P-BMEc.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: P-BMEc
Sample ID	:
Vail #	: 16
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: P-BMEc.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: 30.09.2019.lcb
Report File Name	: Default.lcr
Data Acquired	: 30/9/2019 21:52:07
Data Processed	: 1/10/2019 22:06:53

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\30.09.2019\P-BMEc.lcd



1 PDA Multi 2/261nm 4nm

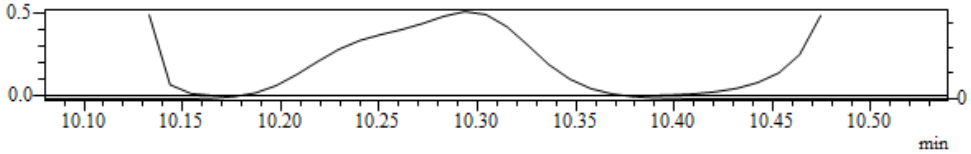
PeakTable

PDA Ch2 261nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT6.903	6.903	3438	0.032
2	RT9.160	9.160	4454	0.041
3	RT10.289	10.289	10740102	99.614
4	RT11.163	11.163	33673	0.312
Total			10781667	100.000

Purity

Peak# : 3
Retention Time : 10.289
Compound Name : RT10.289



Impurity	:Not Detected
Peak purity index	: 1.000000
Single point threshold	: 0.999978
Minimum peak purity index	: 22

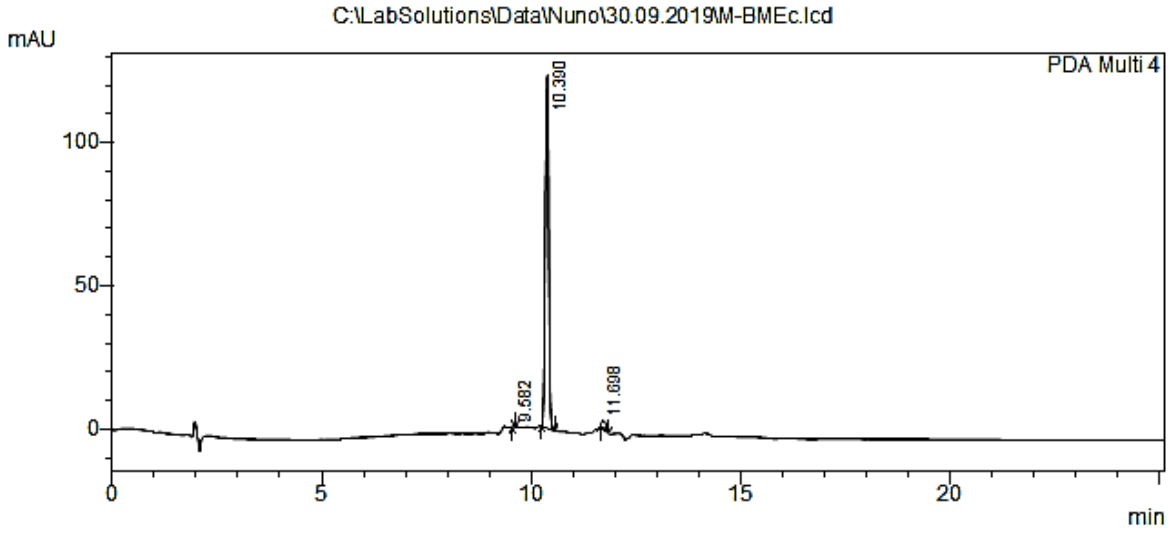
8.2.2. *m*-BME (1b)

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

C:\LabSolutions\Data\Nuno\30.09.2019\M-BMEc.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: M-BMEc
Sample ID	:
Vail #	: 10
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: M-BMEc.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: 30.09.2019.lcb
Report File Name	: Default.lcr
Data Acquired	: 30/9/2019 19:13:53
Data Processed	: 1/10/2019 22:42:46

<Chromatogram>



1 PDA Multi 4/290nm4nm

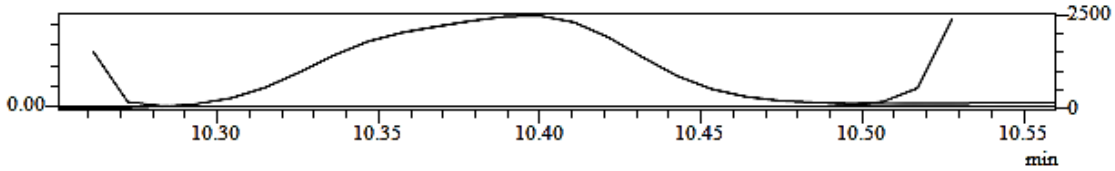
PeakTable

PDA Ch4 290nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT9.582	9.582	416	0.057
2	RT10.390	10.390	715509	97.369
3	RT11.698	11.698	18915	2.574
Total			734841	100.000

Purity

Peak#	: 2
Retention Time	: 10.390
Compound Name	: RT10.390



Impurity	:Not Detected
Peak purity index	: 1.000000
Single point threshold	: 0.999977
Minimum peak purity index	: 22

8.2.3. *p*-BA (2a)

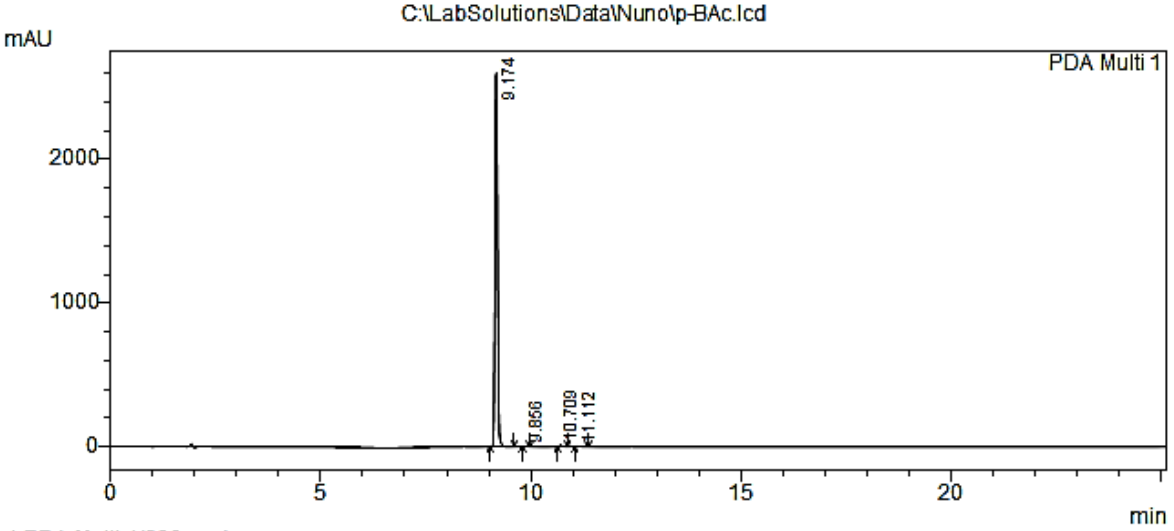
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-BAc.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: p-BAc
Sample ID	: p-BAc
Vail #	: 11
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: p-BAc.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: BatchThais03-12-17.lcb
Report File Name	: Report model LAPESSB.lcr
Data Acquired	: 10/9/2019 13:36:18
Data Processed	: 1/10/2019 18:09:09

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-BAc.lcd



1 PDA Multi 1/239nm 4nm

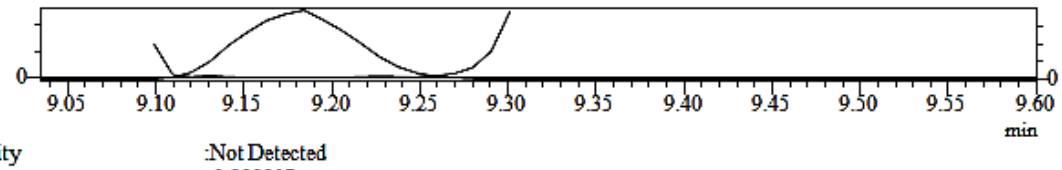
PeakTable

PDA Ch1 239nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT9.174	9.174	11307061	99.188
2	RT9.856	9.856	17713	0.155
3	RT10.709	10.709	52038	0.456
4	RT11.112	11.112	22854	0.200
Total			11399665	100.000

Purity

Peak#	: 1
Retention Time	: 9.174
Compound Name	: RT9.174



Impurity	:Not Detected
Peak purity index	: 0.999907
Single point threshold	: 0.998486
Minimum peak purity index	: 1420

8.2.4. *m*-BA (2b)

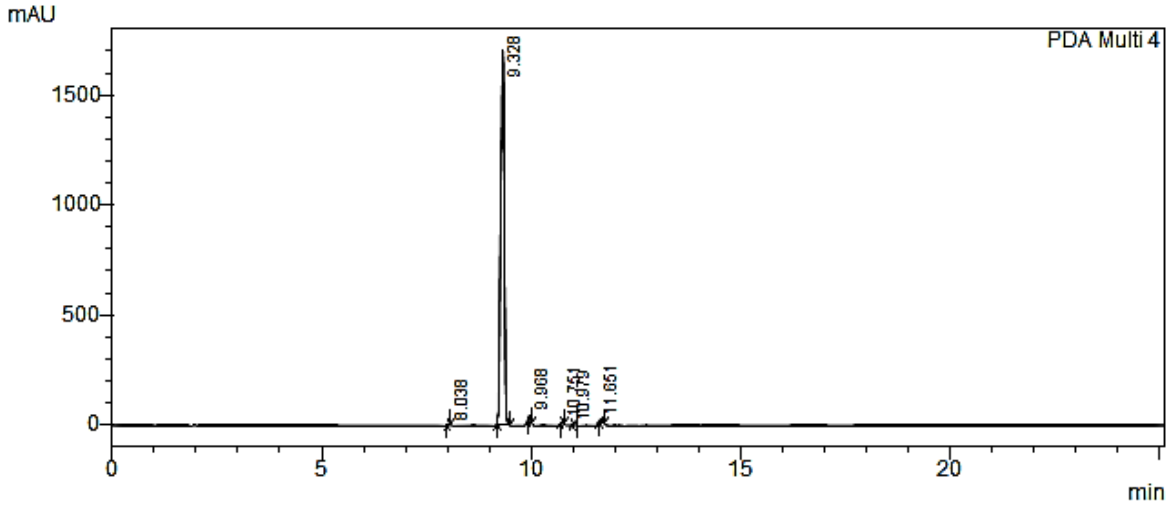
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\30.09.2019\M-BAc.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: M-BAc
Sample ID	:
Vail #	: 14
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: M-BAc.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: 30.09.2019.lcb
Report File Name	: Default.lcr
Data Acquired	: 30/9/2019 20:59:24
Data Processed	: 1/10/2019 22:32:39

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\30.09.2019\M-BAc.lcd



1 PDA Multi 4/240nm 4nm

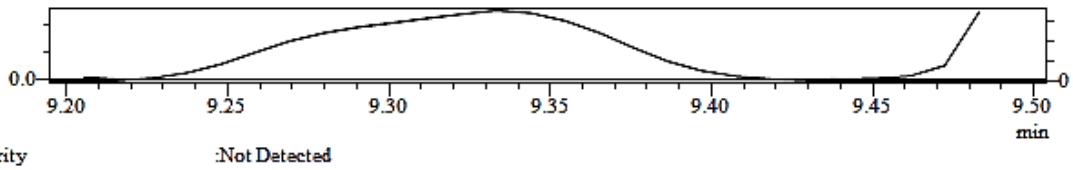
PeakTable

PDA Ch4 240nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.038	8.038	3163	0.030
2	RT9.328	9.328	10190677	97.532
3	RT9.968	9.968	134367	1.286
4	RT10.751	10.751	16376	0.157
5	RT10.979	10.979	154	0.001
6	RT11.651	11.651	103842	0.994
Total			10448580	100.000

Purity

Peak#	: 2
Retention Time	: 9.328
Compound Name	: RT9.328



Impurity	:Not Detected
Peak purity index	: 0.999989
Single point threshold	: 0.999989
Minimum peak purity index	: 0

8.2.5. *p*-NT01 (3a)

1/10/2019 17:34:47 1 / 1

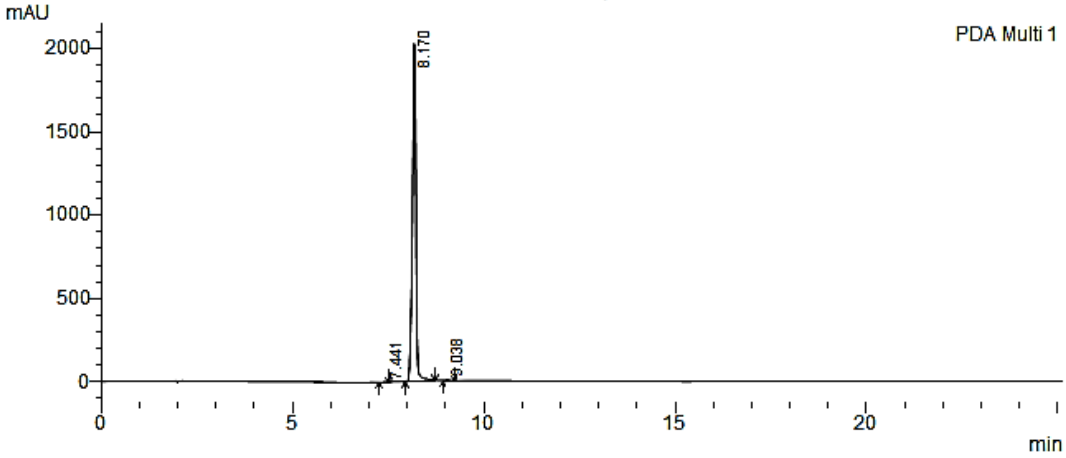
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT01c.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: p-NT01c
Sample ID	: p-NT01c
Vail #	: 12
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: p-NT01c.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: BatchThais03-12-17.lcb
Report File Name	: Report model LAPESSB.lcr
Data Acquired	: 10/9/2019 14:02:40
Data Processed	: 1/10/2019 17:18:07

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT01c.lcd



1 PDA Multi 1/256nm 4nm

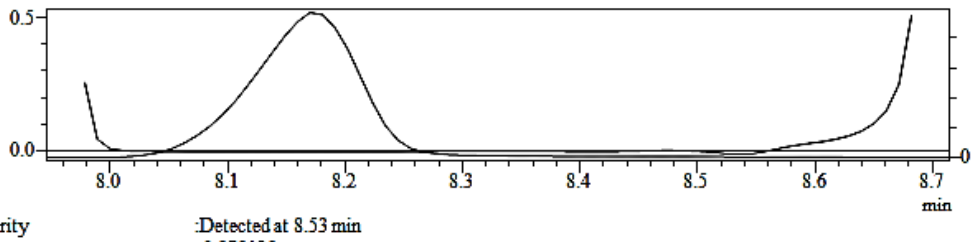
PeakTable

PDA Ch1 256nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT7.441	7.441	5980	0.046
2	RT8.170	8.170	13113511	99.874
3	RT9.038	9.038	10535	0.080
Total			13130026	100.000

Purity

Peak# : 2
Retention Time : 8.170
Compound Name : RT8.170



Impurity :Detected at 8.53 min
Peak purity index : 0.979129
Single point threshold : 0.989765
Minimum peak purity index : -10636

8.2.6. *p*-NT02 (4a)

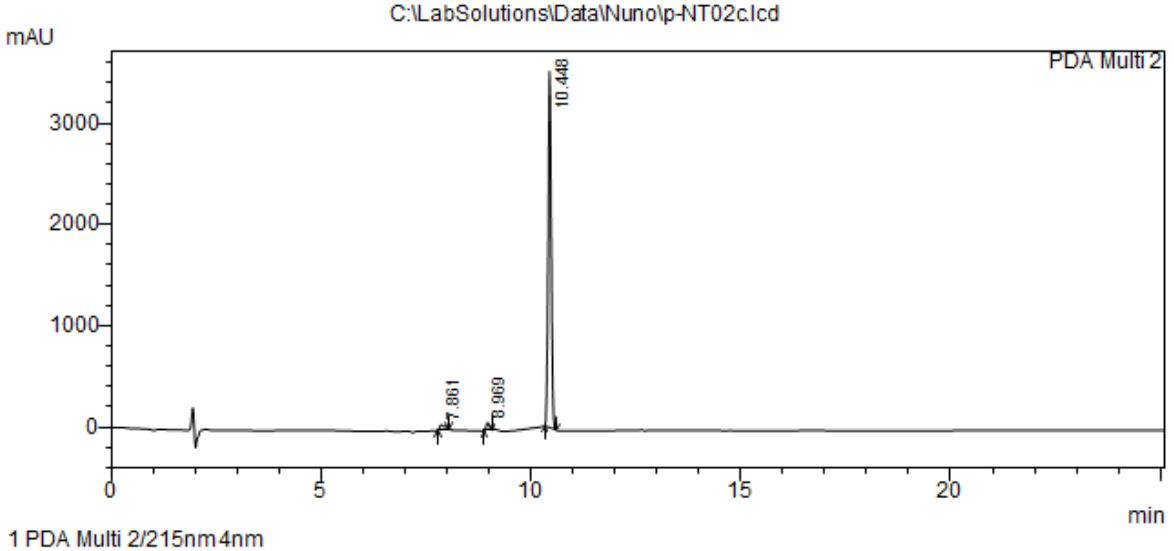
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT02c.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: p-NT02c
Sample ID	: p-NT02c
Vail #	: 13
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: p-NT02c.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: BatchThais03-12-17.lcb
Report File Name	: Report model LAPESSB.lcr
Data Acquired	: 10/9/2019 14:29:03
Data Processed	: 1/10/2019 21:15:25

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT02c.lcd



1 PDA Multi 2/215nm 4nm

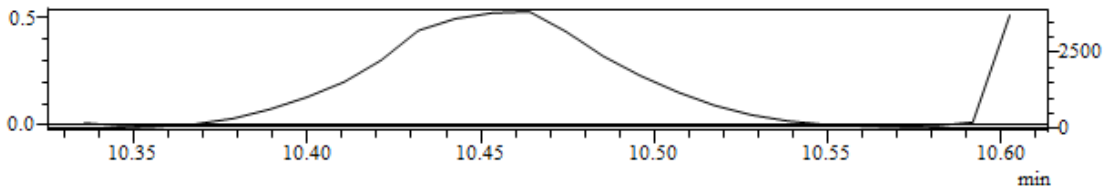
PeakTable

PDA Ch2 215nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT7.861	7.861	424968	2.334
2	RT8.969	8.969	383713	2.107
3	RT10.448	10.448	17400036	95.559
Total			18208717	100.000

Purity

Peak# : 3
Retention Time : 10.448
Compound Name : RT10.448



Impurity	:Detected at 10.46 min
Peak purity index	: 0.999639
Single point threshold	: 0.999990
Minimum peak purity index	: -351

8.2.7. *m*-NT02 (4b)

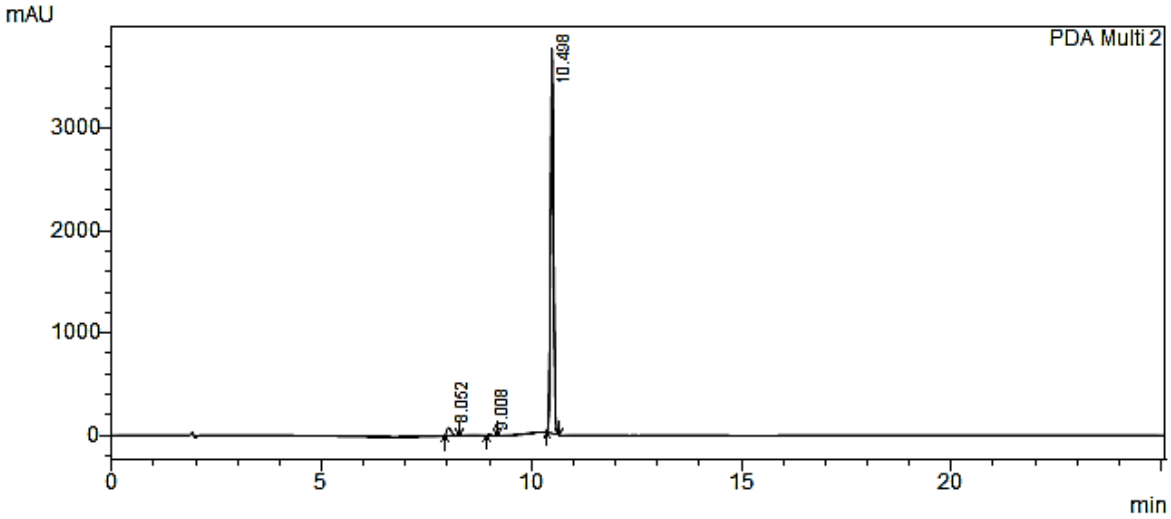
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\m-NT02c.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: m-NT02c
Sample ID	: m-NT02c
Vail #	: 14
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: m-NT02c.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: BatchThais03-12-17.lcb
Report File Name	: Report model LAPESSB.lcr
Data Acquired	: 10/9/2019 14:55:24
Data Processed	: 1/10/2019 15:15:23

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\m-NT02c.lcd



1 PDA Multi 2/235nm4nm

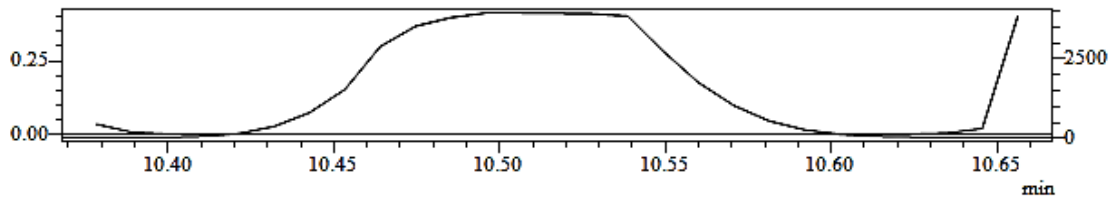
PeakTable

PDA Ch2 235nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.052	8.052	606724	3.162
2	RT9.008	9.008	90988	0.474
3	RT10.498	10.498	18488355	96.363
Total			19186068	100.000

Purity

Peak#	: 3
Retention Time	: 10.498
Compound Name	: RT10.498



Impurity	:Detected at 10.52 min
Peak purity index	: 0.999745
Single point threshold	: 0.999995
Minimum peak purity index	: -249

8.2.8. *p*-NT03 (5a)

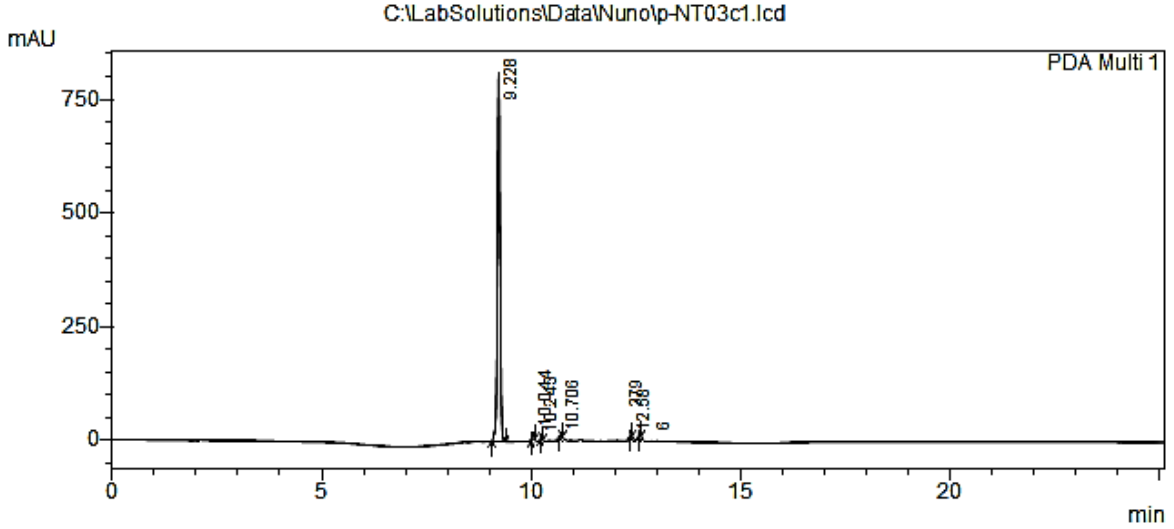
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT03c1.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: p-NT03c
Sample ID	: Amostra
Vail #	: 1
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: p-NT03c1.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	:
Report File Name	: relat-Denise.lcr
Data Acquired	: 10/9/2019 17:02:50
Data Processed	: 1/10/2019 21:39:09

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT03c1.lcd



1 PDA Multi 1/240nm 4nm

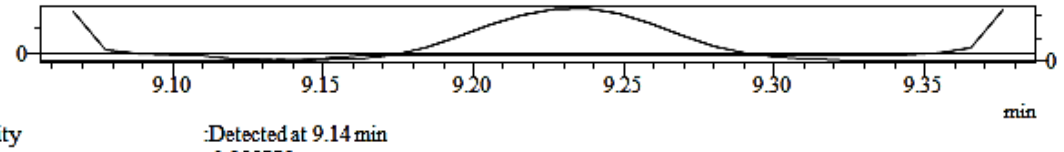
PeakTable

PDA Ch1 240nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT9.228	9.228	3672459	97.113
2	RT10.044	10.044	50201	1.327
3	RT10.243	10.243	26624	0.704
4	RT10.706	10.706	12289	0.325
5	RT12.379	12.379	9479	0.251
6	RT12.586	12.586	10595	0.280
Total			3781646	100.000

Purity

Peak#	: 1
Retention Time	: 9.228
Compound Name	: RT9.228



Impurity	:Detected at 9.14 min
Peak purity index	: 0.955779
Single point threshold	: 0.999710
Minimum peak purity index	: -43931

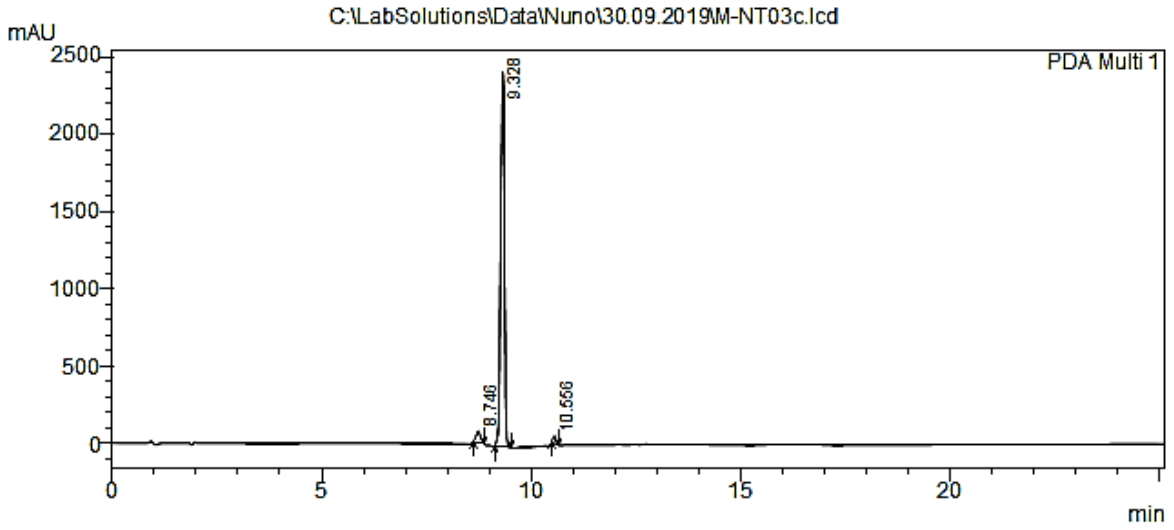
8.2.9. *m*-NT03 (5b)

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

C:\LabSolutions\Data\Nuno\30.09.2019\M-NT03c.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: M-NT03c
Sample ID	:
Vail #	: 13
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: M-NT03c.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: 30.09.2019.lcb
Report File Name	: Default.lcr
Data Acquired	: 30/9/2019 20:33:03
Data Processed	: 1/10/2019 22:59:06

<Chromatogram>



1 PDA Multi 1/210nm 4nm

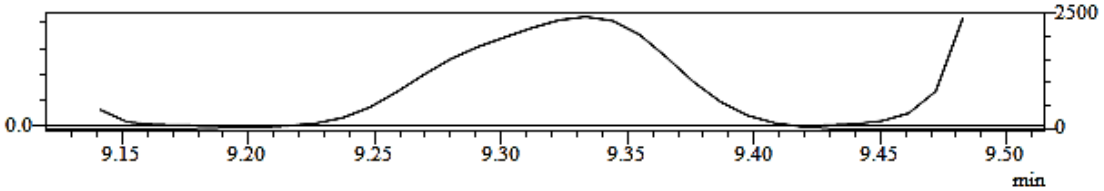
PeakTable

PDA Ch1 210nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.746	8.746	510528	3.199
2	RT9.328	9.328	15194130	95.197
3	RT10.556	10.556	256066	1.604
Total			15960723	100.000

Purity

Peak# : 2
Retention Time : 9.328
Compound Name : RT9.328



Impurity	:Not Detected
Peak purity index	: 0.999997
Single point threshold	: 0.999978
Minimum peak purity index	: 18

8.2.10. *p*-NT04 (6a)

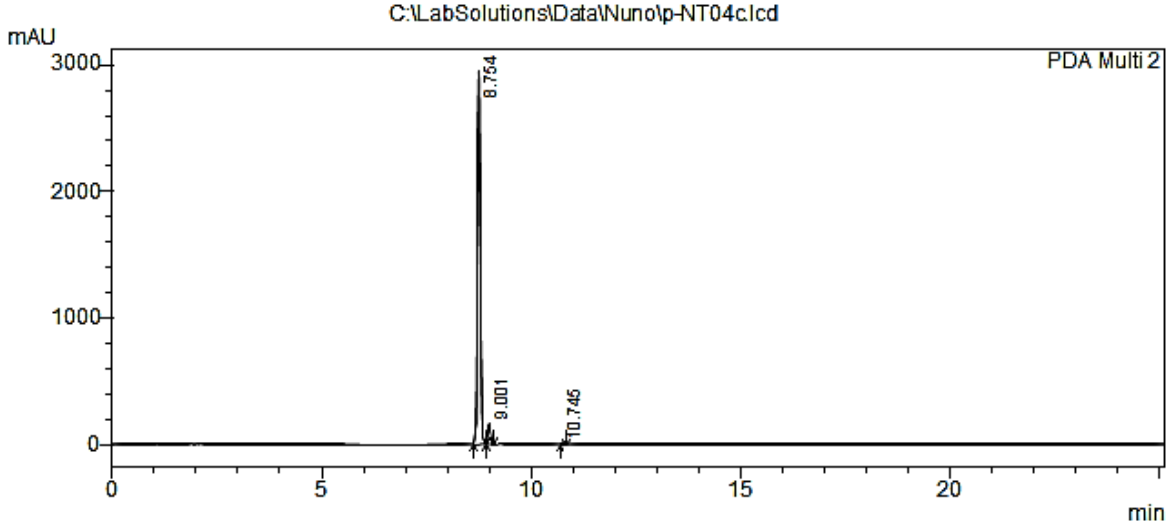
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT04c.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: p-NT04c
Sample ID	: p-NT04c
Vail #	: 15
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: p-NT04c.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: BatchThais03-12-17.lcb
Report File Name	: Report model LAPESSB.lcr
Data Acquired	: 10/9/2019 15:21:45
Data Processed	: 1/10/2019 21:50:12

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\p-NT04c.lcd



1 PDA Multi 2/261nm 4nm

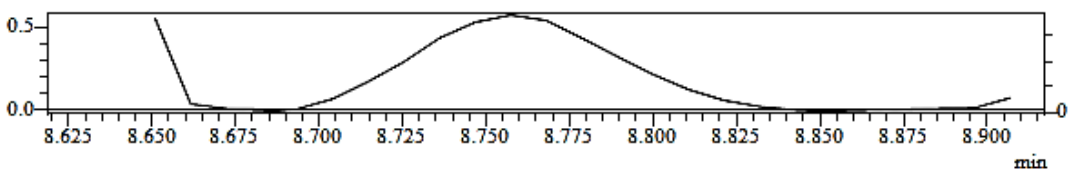
PeakTable

PDA Ch2 261nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1	RT8.754	8.754	14420022	95.307
2	RT9.001	9.001	667822	4.414
3	RT10.745	10.745	42167	0.279
Total			15130011	100.000

Purity

Peak#	: 1
Retention Time	: 8.754
Compound Name	: RT8.754



Impurity	:Detected at 8.77 min
Peak purity index	: 0.999732
Single point threshold	: 0.999992
Minimum peak purity index	: -260

8.2.11. *m*-NT04 (6b)

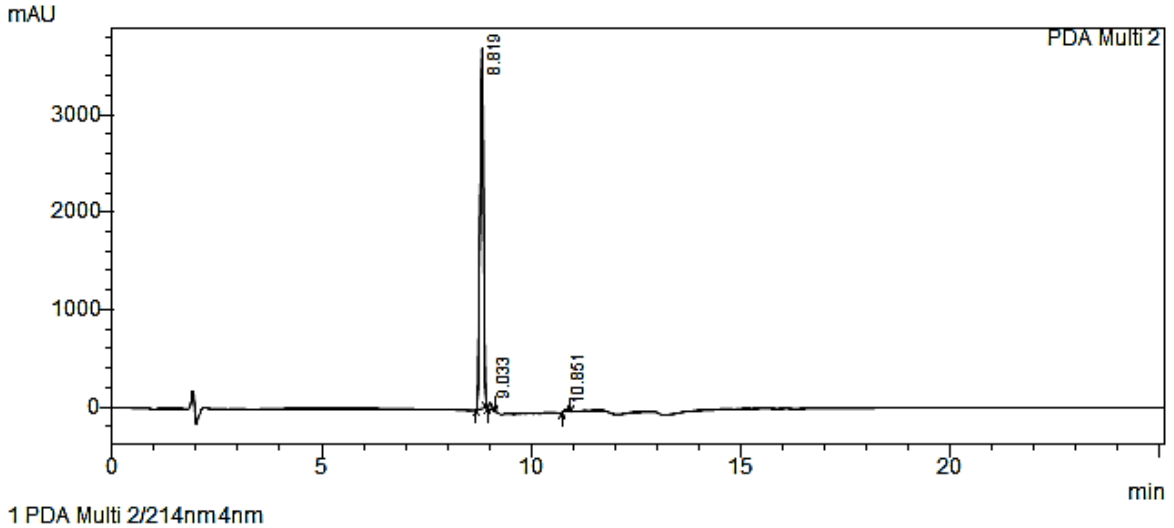
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Nuno\3.10.2019\M-NT04c.lcd

Acquired by	: Admin
Sample Name	: M-NT04c
Sample ID	:
Vail #	: 11
Injection Volume	: 5 uL
Data File Name	: M-NT04c.lcd
Method File Name	: ACN+0,1TFA-H2O+0,1TFA.lcm
Batch File Name	: Batch_3.10.2019.lcb
Report File Name	: Default.lcr
Data Acquired	: 3/10/2019 12:54:33
Data Processed	: 3/10/2019 16:12:05

<Chromatogram>

C:\LabSolutions\Data\Nuno\3.10.2019\M-NT04c.lcd



1 PDA Multi 2/214nm4nm

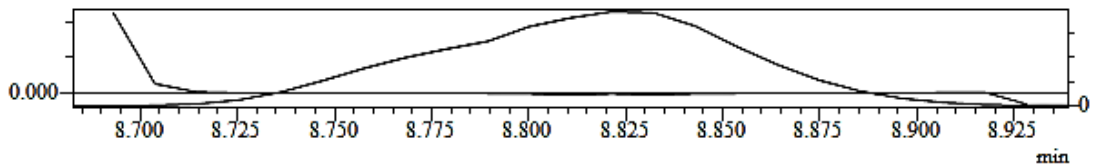
PeakTable

PDA Ch1 239nm 4nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Area %
1		8.818	11907830	96.621
2		9.034	303903	2.466
3		10.853	112470	0.913
Total			12324204	100.000

Purity

Peak# : 1
Retention Time : 8.819
Compound Name : RT8.819



Impurity :Detected at 8.93 min
Peak purity index : 0.995360
Single point threshold : 0.996858
Minimum peak purity index : -1497

8.3. ANÁLISE DE LC/MS (*P*-NT03, 5A)

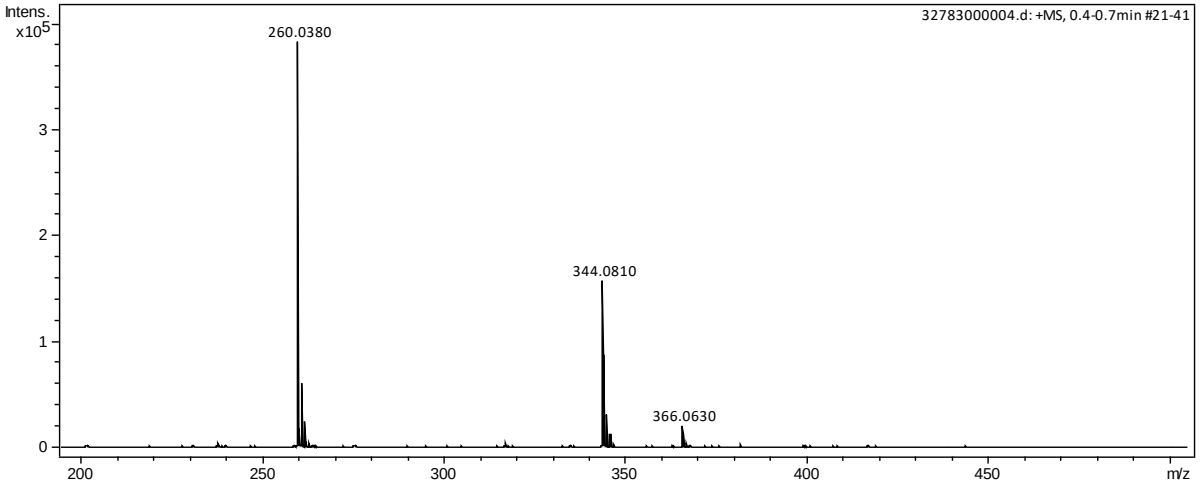
Central Analítica
Instituto de Química
Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo

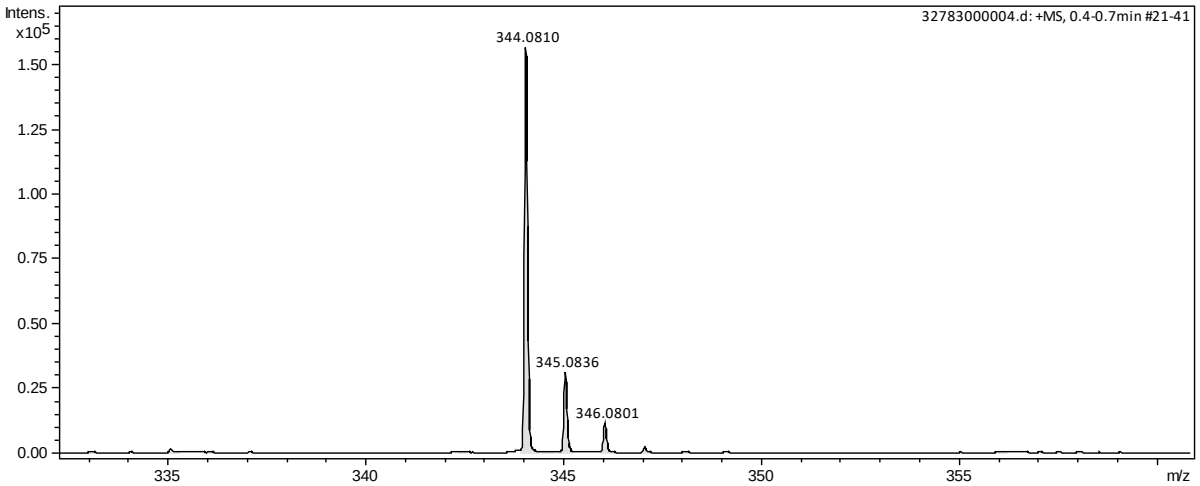
Laboratório de Espectrometria de Massas

Equipamento: MICROTOF – Bruker Daltonics
Nebulizer: 0.4 Bar
Dry gas: 4 L/min
Temp: 180°C
HV: 4500V

Solicitação: 32793
Amostra: pNT03 **Água:Metanol 1:1 + 0,1% ácido fórmico**

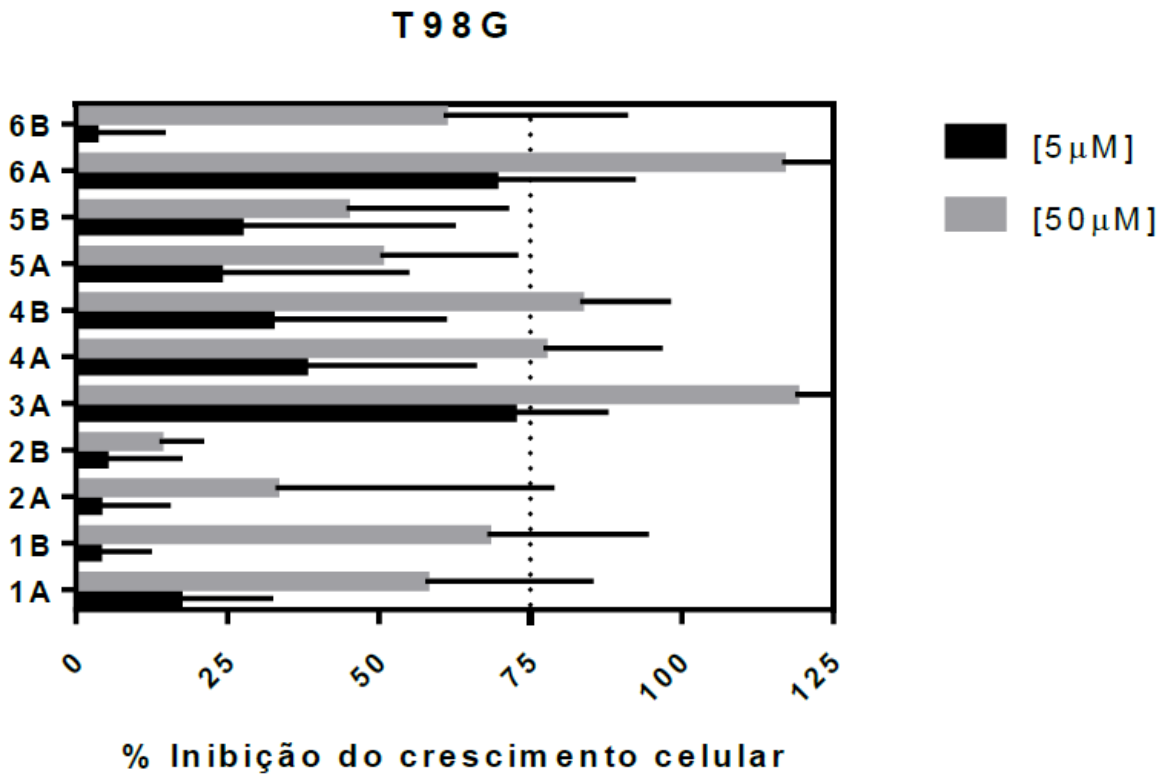
ESI+





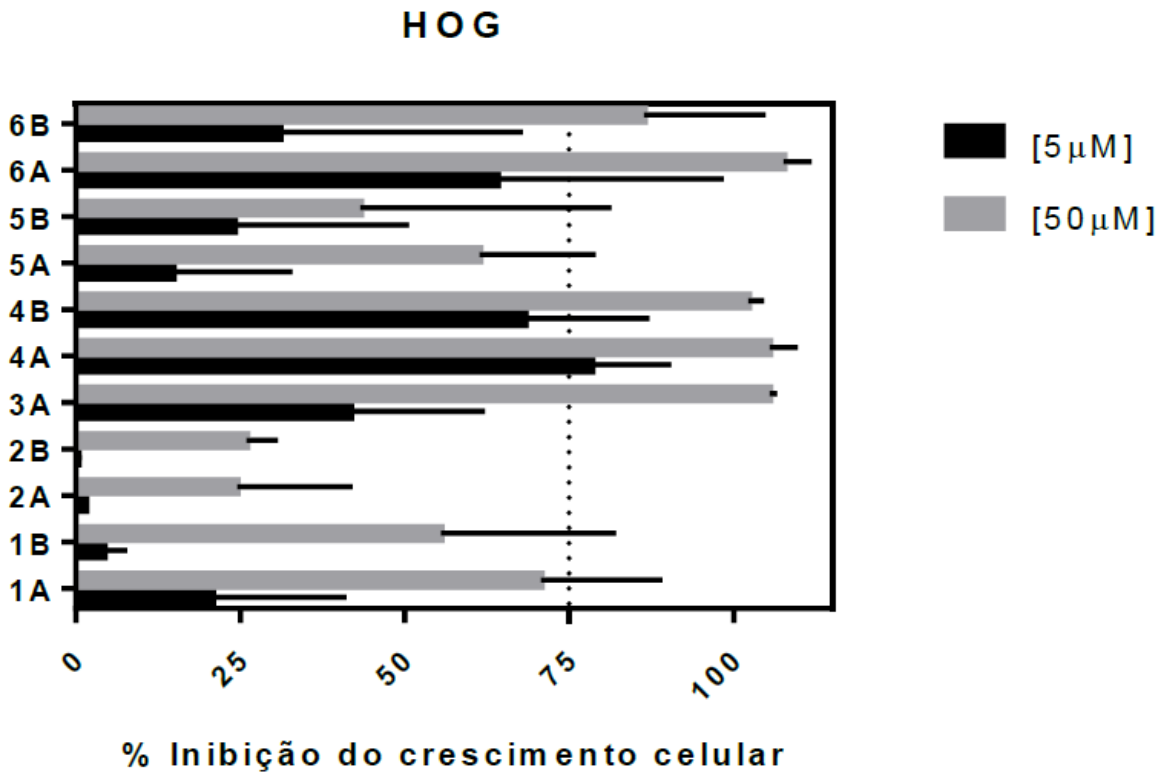
8.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

8.4.1. Triagem das amostras nas células T98G



#	Amostras	[5 µM]		[50 µM]	
		% de inibição	EPM	% de inibição	EPM
1	1a	17,01	10,67	57,67	19,33
2	1b	3,68	5,97	67,91	18,52
3	2a	3,74	8,15	32,93	32,26
4	2b	4,78	8,76	13,81	4,89
5	3a	72,13	10,84	118,78	9,75
6	4a	37,64	19,92	77,17	13,63
7	4b	32,19	20,22	83,23	10,29
8	5a	23,61	21,95	50,27	15,78
9	5b	27,04	21,90	44,64	18,69
10	6a	69,14,	16,12	116,57	7,84
11	6b	3,08	8,02	60,72	21,21

8.4.2. Triagem das amostras nas células HOG



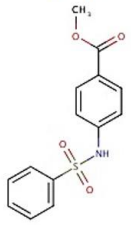
#	Amostras	[5 µM]		[50 µM]	
		% de inibição	EPM	% de inibição	EPM
1	1a	20,76	14,11	70,70	12,78
2	1b	4,22	2,29	55,49	18,54
3	2a	1,41	1,74	24,51	12,15
4	2b	0,27	0,15	25,90	3,10
5	3a	41,77	14,19	105,47	0,52
6	4a	78,37	8,32	105,47	2,74
7	4b	68,24	13,13	102,2	1,42
8	5a	14,73	12,62	61,35	12,20
9	5b	24,07	18,50	43,22	26,75
10	6a	64,08	24,07	107,56	2,74
11	6b	31,04	25,81	86,34	12,79

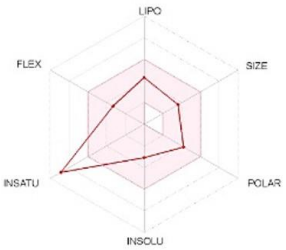
8.5. TABELA DE RANQUEAMENTO DOS COMPOSTOS MODELADOS

#	Compostos	ASP fitness (%)[1]	
		MMP2[3]	HDAC8[4]
1	I52[3]	100,00	80,76
2	*m*-BA (2b)	62,55	81,20
3	*m*-BME (1b)	65,09	79,68
4	*m*-NT01 (3b)	68,85	84,94
5	*m*-NT02 (4b)	70,58	82,18
6	*m*-NT03 (5b)	68,85	88,33
7	*m*-NT04 (6b)	63,76	74,70
8	NHB[4]	74,26	100,00
9	*p*-BA (2a)	60,81	83,85
10	*P*-BME (1a)	60,94	79,45
11	*p*-NT01 (3a)	68,96	89,80
12	*p*-NT02 (4a)	68,66	88,03
13	*p*-NT03 (5a)	71,25	88,17
14	*p*-NT04 (6a)	70,87	76,89

8.6. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOCÍNETICAS

P-BMEc (1a)



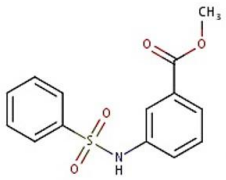


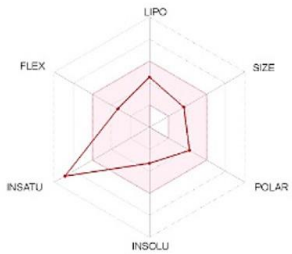
SMILES COC(=O)c1ccc(cc1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C14H13NO4S
Molecular weight	291.32 g/mol
Num. heavy atoms	20
Num. arom. heavy atoms	12
Fraction Csp3	0.07
Num. rotatable bonds	5
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	1
Molar Refractivity	74.84
TPSA	80.85 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	2.29
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	2.08
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	3.16
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2.05
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	1.44
Consensus Log $P_{o/w}$	2.20

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-3.07
Solubility	2.48e-01 mg/ml ; 8.50e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-3.41
Solubility	1.14e-01 mg/ml ; 3.91e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.96
Solubility	3.19e-03 mg/ml ; 1.09e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	Yes
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-6.60 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.19

M-BMEc (1b)



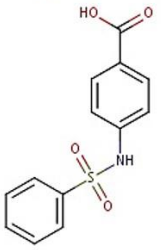


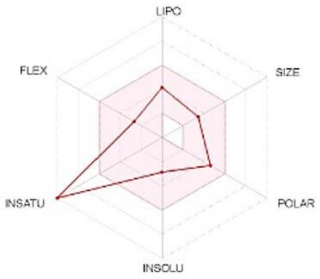
SMILES COC(=O)c1cccc(c1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C14H13NO4S
Molecular weight	291.32 g/mol
Num. heavy atoms	20
Num. arom. heavy atoms	12
Fraction Csp3	0.07
Num. rotatable bonds	5
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	1
Molar Refractivity	74.84
TPSA	80.85 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	2.23
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	2.43
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	3.16
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2.05
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	1.44
Consensus Log $P_{o/w}$	2.26

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-3.29
Solubility	1.49e-01 mg/ml ; 5.12e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-3.77
Solubility	4.94e-02 mg/ml ; 1.70e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.96
Solubility	3.19e-03 mg/ml ; 1.09e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	Yes
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-6.35 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.29

P-BAc (2a)



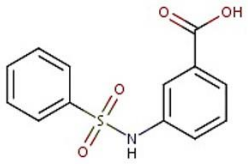


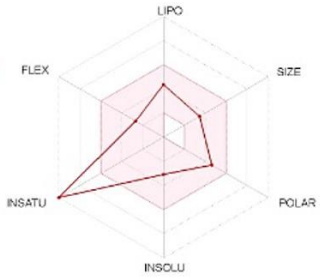
SMILES OC(=O)c1ccc(cc1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C13H11NO4S
Molecular weight	277.30 g/mol
Num. heavy atoms	19
Num. arom. heavy atoms	12
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	4
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	70.52
TPSA	91.85 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	1.42
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	1.76
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	3.08
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	0.68
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	0.92
Consensus Log $P_{o/w}$	1.57

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-2.87
Solubility	3.73e-01 mg/ml ; 1.34e-03 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-3.31
Solubility	1.37e-01 mg/ml ; 4.94e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.26
Solubility	1.51e-02 mg/ml ; 5.46e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-6.74 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.56
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.04

M-BAc (2b)



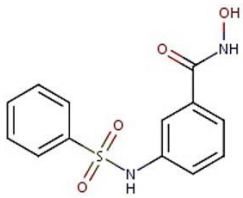


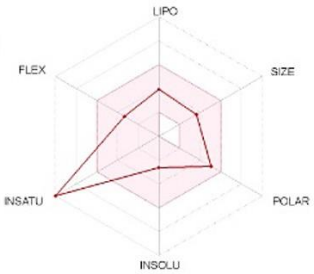
SMILES OC(=O)c1cccc(c1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C13H11NO4S
Molecular weight	277.30 g/mol
Num. heavy atoms	19
Num. arom. heavy atoms	12
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	4
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	70.52
TPSA	91.85 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	1.21
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	2.11
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	3.08
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	0.68
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	0.92
Consensus Log $P_{o/w}$	1.60

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-3.09
Solubility	2.24e-01 mg/ml ; 8.09e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-3.67
Solubility	5.93e-02 mg/ml ; 2.14e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.26
Solubility	1.51e-02 mg/ml ; 5.46e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-6.49 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.56
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.14

M-NT01c (3b)





SMILES ONC(=O)c1cccc(c1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C13H12N2O4S
Molecular weight	292.31 g/mol
Num. heavy atoms	20
Num. arom. heavy atoms	12
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	5
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	3
Molar Refractivity	72.47
TPSA	103.88 Å²

Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	0.55
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	1.37
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	2.50
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	1.38
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	0.14
Consensus Log $P_{o/w}$	1.19

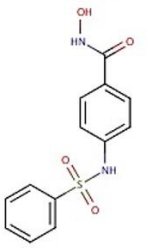
Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-2.63
Solubility	6.86e-01 mg/ml ; 2.35e-03 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-3.15
Solubility	2.05e-01 mg/ml ; 7.01e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.31
Solubility	1.43e-02 mg/ml ; 4.91e-05 mol/l
Class	Moderately soluble

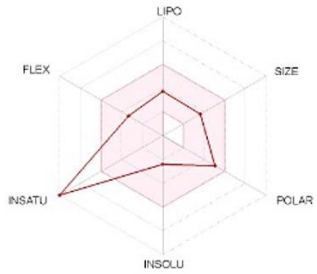
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-7.11 cm/s

Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	2 alerts: hydroxamic_acid, oxygen-nitrogen_single_bond
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.34

P-NT01c (3a)





SMILES ONC(=O)c1ccc(cc1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C13H12N2O4S
Molecular weight	292.31 g/mol
Num. heavy atoms	20
Num. arom. heavy atoms	12
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	5
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	3
Molar Refractivity	72.47
TPSA	103.88 Å²

Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	1.53
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	1.02
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	2.50
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	1.38
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	0.14
Consensus Log $P_{o/w}$	1.31

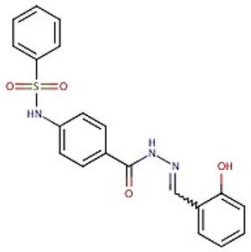
Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-2.41
Solubility	1.14e+00 mg/ml ; 3.90e-03 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-2.79
Solubility	4.73e-01 mg/ml ; 1.62e-03 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.31
Solubility	1.43e-02 mg/ml ; 4.91e-05 mol/l
Class	Moderately soluble

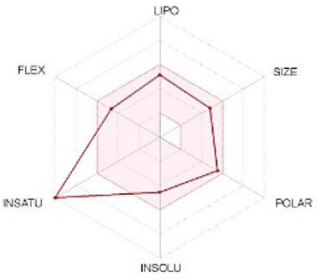
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-7.36 cm/s

Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	2 alerts: hydroxamic_acid, oxygen-nitrogen_single_bond
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.20

P-NT02c (4a)



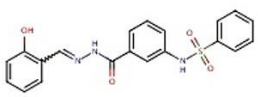


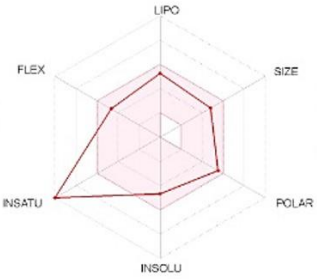
SMILES O=C(c1ccc(cc1)NS(=O)(=O)c1ccccc1)N/N=C/c1ccccc1O

Physicochemical Properties	
Formula	C20H17N3O4S
Molecular weight	395.43 g/mol
Num. heavy atoms	28
Num. arom. heavy atoms	18
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	7
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	3
Molar Refractivity	106.75
TPSA	116.24 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	2.11
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	3.53
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	3.85
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2.27
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	2.13
Consensus Log $P_{o/w}$	2.78

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-4.53
Solubility	1.17e-02 mg/ml ; 2.96e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (Ali)	-5.66
Solubility	8.74e-04 mg/ml ; 2.21e-06 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-6.85
Solubility	5.55e-05 mg/ml ; 1.40e-07 mol/l
Class	Poorly soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-6.21 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	1 alert: hzone_phenol_A
Brenk	1 alert: imine_1
Leadlikeness	No; 2 violations: MW>350, XLOGP3>3.5
Synthetic accessibility	2.96

M-NT04c (4b)



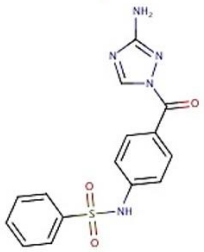


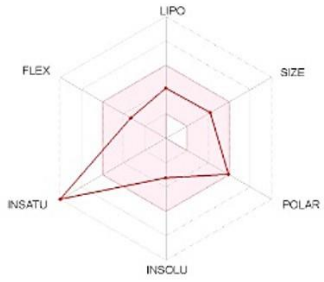
SMILES O=C(c1cccc(c1)NS(=O)(=O)c1ccccc1)N/N=C/c1ccccc1O

Physicochemical Properties	
Formula	C20H17N3O4S
Molecular weight	395.43 g/mol
Num. heavy atoms	28
Num. arom. heavy atoms	18
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	7
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	3
Molar Refractivity	106.75
TPSA	116.24 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	1.91
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	3.73
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	3.85
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2.27
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	2.13
Consensus Log $P_{o/w}$	2.78

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-4.66
Solubility	8.75e-03 mg/ml ; 2.21e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (Ali)	-5.86
Solubility	5.42e-04 mg/ml ; 1.37e-06 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-6.85
Solubility	5.55e-05 mg/ml ; 1.40e-07 mol/l
Class	Poorly soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-6.06 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	1 alert: hzone_phenol_A
Brenk	1 alert: imine_1
Leadlikeness	No; 2 violations: MW>350, XLOGP3>3.5
Synthetic accessibility	3.04

P-NT03c (5a)



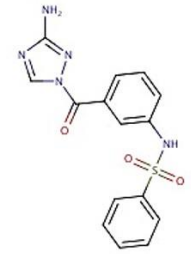


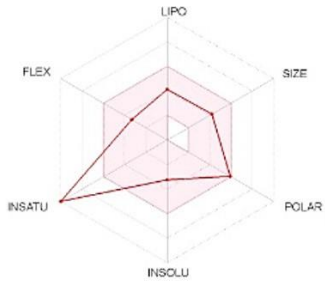
SMILES Nc1ncn(n1)C(=O)c1ccc(cc1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C15H13N5O3S
Molecular weight	343.36 g/mol
Num. heavy atoms	24
Num. arom. heavy atoms	17
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	5
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	87.71
TPSA	128.35 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	1.96
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	1.72
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	2.25
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	1.22
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	-0.34
Consensus Log $P_{o/w}$	1.36

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-3.25
Solubility	1.95e-01 mg/ml ; 5.67e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-4.03
Solubility	3.19e-02 mg/ml ; 9.30e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.60
Solubility	8.57e-03 mg/ml ; 2.49e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-7.17 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.54

M-NT03c (5b)



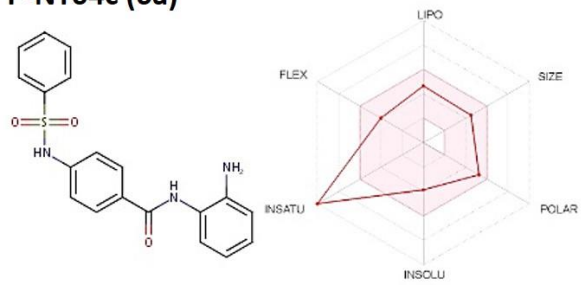


SMILES Nc1ncn(n1)C(=O)c1cccc(c1)NS(=O)(=O)c1ccccc1

Physicochemical Properties	
Formula	C15H13N5O3S
Molecular weight	343.36 g/mol
Num. heavy atoms	24
Num. arom. heavy atoms	17
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	5
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	2
Molar Refractivity	87.71
TPSA	128.35 Å²
Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	1.57
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	1.72
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	2.25
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	1.22
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	-0.34
Consensus Log $P_{o/w}$	1.28

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-3.25
Solubility	1.95e-01 mg/ml ; 5.67e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-4.03
Solubility	3.19e-02 mg/ml ; 9.30e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-4.60
Solubility	8.57e-03 mg/ml ; 2.49e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log K_p (skin permeation)	-7.17 cm/s
Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55
Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	0 alert
Leadlikeness	Yes
Synthetic accessibility	2.63

P-NT04c (6a)



SMILES O=C(c1ccc(cc1)NS(=O)(=O)c1ccccc1)Nc1ccccc1N

Physicochemical Properties	
Formula	C19H17N3O3S
Molecular weight	367.42 g/mol
Num. heavy atoms	26
Num. arom. heavy atoms	18
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	6
Num. H-bond acceptors	3
Num. H-bond donors	3
Molar Refractivity	102.17
TPSA	109.67 Å²

Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	2.02
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	2.60
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	4.03
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2.37
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	1.50
Consensus Log $P_{o/w}$	2.50

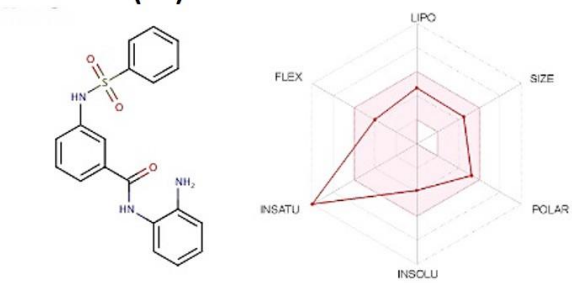
Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-3.87
Solubility	4.93e-02 mg/ml ; 1.34e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-4.55
Solubility	1.03e-02 mg/ml ; 2.80e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-7.00
Solubility	3.69e-05 mg/ml ; 1.00e-07 mol/l
Class	Poorly soluble

Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log K_p (skin permeation)	-6.70 cm/s

Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	1 alert: aniline
Leadlikeness	No; 1 violation: MW>350
Synthetic accessibility	2.48

M-NT04c (6b)



SMILES O=C(c1cccc(c1)NS(=O)(=O)c1ccccc1)Nc1ccccc1N

Physicochemical Properties	
Formula	C19H17N3O3S
Molecular weight	367.42 g/mol
Num. heavy atoms	26
Num. arom. heavy atoms	18
Fraction Csp3	0.00
Num. rotatable bonds	6
Num. H-bond acceptors	3
Num. H-bond donors	3
Molar Refractivity	102.17
TPSA	109.67 Å²

Lipophilicity	
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	1.97
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	2.60
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	4.03
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2.37
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	1.50
Consensus Log $P_{o/w}$	2.49

Water Solubility	
Log *S* (ESOL)	-3.87
Solubility	4.93e-02 mg/ml ; 1.34e-04 mol/l
Class	Soluble
Log *S* (Ali)	-4.55
Solubility	1.03e-02 mg/ml ; 2.80e-05 mol/l
Class	Moderately soluble
Log *S* (SILICOS-IT)	-7.00
Solubility	3.69e-05 mg/ml ; 1.00e-07 mol/l
Class	Poorly soluble

Pharmacokinetics	
GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	Yes
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	Yes
CYP2D6 inhibitor	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log K_p (skin permeation)	-6.70 cm/s

Druglikeness	
Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	Yes
Bioavailability Score	0.55

Medicinal Chemistry	
PAINS	0 alert
Brenk	1 alert: aniline
Leadlikeness	No; 1 violation: MW>350
Synthetic accessibility	2.61