

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DANIELLA ÂNGELA BENETTI

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE NOVOS INIBIDORES
DE HISTONA DESACETILASES PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL

BRASÍLIA

2018

DANIELLA ÂNGELA BENETTI

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE NOVOS INIBIDORES
DE HISTONA DESACETILASES PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro

BRASÍLIA

2018

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

Catálogo da Publicação

Bs Benetti, Daniella Angela
Síntese e Avaliação da Atividade Antimalárica de Novos Inibidores de Histona Desacetilases Planejados a partir do Cardanol / Daniella Angela Benetti; orientador Luiz Antonio Soares Romeiro. -- Brasília, 2018.
166 p.

Tese (Doutorado - Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2018.

1. Química Medicinal. 2. Medicina Tropical. 3. Malaria.
I. Romeiro, Luiz Antonio Soares, orient. II. Título.

DANIELLA ÂNGELA BENETTI

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE NOVOS INIBIDORES DE HISTONA DESACETILASES PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Ricardo Menegatti

Universidade Federal de Goiás – UFG

Prof^a. Dr^a. Fabiana Brandão Alves Silva

Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero

Universidade de Brasília – UnB

Brasília

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Senhor da minha vida, por ter me guiado nesses anos de pesquisa, ter sido minha luz e inspiração, além de força nos momentos difíceis.

Ao meu noivo Guto, por toda paciência e parceria, por me acompanhar e estar ao meu lado todos os dias. À minha família, meus pais, Ernani e Ângela, e irmãos, Leonardo e Gabriella, por me apoiarem, por serem minha força, exemplo, minha razão de continuar até o fim e incentivo a conquistar as coisas.

Ao meu orientador, professor Luiz Romeiro, por toda confiança depositada neste tempo e paciência, por mesmo sabendo que haveria muito trabalho a se fazer e muito a ser aprendido, ter confiado a mim esta pesquisa. Por todo conhecimento transmitido durante esses anos e pela oportunidade de conquistar esse título pela sua orientação.

Às colegas de trabalho e laboratório, Brenda Lucena, que entrou comigo neste mestrado e foi companheira de bancada até o fim, compartilhando angústias e alegrias, Andressa Oliveira, Thaís Ferreira, Giselle Ramos, e Gabriella Roth, por terem contribuído com seus conhecimentos e pela paciência ao ensinar e acompanhar este projeto.

Universidade Católica de Brasília, pelo espaço cedido para pesquisa, por meio do laboratório LADETER, pelos espectros de infravermelho e todo auxílio prestado.

Aos professores que colaboraram e participaram deste projeto, Edilberto Silveira e Herbert Magalhães da CENAUREM na Universidade Federal do Ceará, pela concessão dos espectros de RMN. Pelos ensaios biológicos realizados pela doutora Julia Coutinho, da Fundação Oswaldo Cruz, coordenado pela Prof^a Doutora Antoniana Krettli.

À CAPES pela bolsa de estudo. À banca examinadora, previamente pelas contribuições.

RESUMO

BENETTI, Daniella Angela. **Síntese e Avaliação Da Atividade Antimalárica De Novos Inibidores De Histona Desacetilases Planejados a Partir Do Cardanol.** Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Núcleo de Medicina Tropical. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

A malária, doença que acomete cerca de 200 milhões de pessoas no mundo, é causada pelo parasito *Plasmodium*. O ciclo biológico do parasito dentro do hospedeiro envolve a transcrição de genes importantes para sua virulência e sobrevivência via processos epigenéticos, dentre os quais a acetilação e a desacetilação de histonas. Desta forma, o desenvolvimento de inibidores histona desacetilase (iHDACs) tem sido explorado visando interromper o ciclo de vida do parasito. A mistura de cardanois – principal componente do líquido da casca da castanha do caju industrial – tem sido utilizada em diversos segmentos e no planejamento racional de agentes terapêuticos como novos iHDACs. Descrevemos neste trabalho a síntese e avaliação de novos hidroxamatos planejados a partir do cardanol. Neste sentido, oito intermediários e cinco derivados-alvo foram sintetizados em rendimentos que variaram de 31 % a 83 % e caracterizados por RMN. A avaliação preliminar frente a onze HDACs humanas revelou perfil de inibição para HDAC6 (50 % a 92 %) e HDAC11 (53 % a 81%) com destaque para o derivado LDT705 (**38**) que também mostrou inibição moderada para HDAC8 (58 %). Os derivados-alvo apresentaram atividade antimalárica com CI_{50} variando de $3,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$ a $20,2 \pm 4,6 \mu\text{M}$ em cultura de *Plasmodium falciparum*. A determinação dos valores de DLM_{50} em linhagem celular BMG ($18,1 \mu\text{M}$ e $57,8\mu\text{M}$) permitiu o cálculo dos índices de seletividade (IS), com destaque para o derivado LDT706 (**39**) como único considerado atóxico. Este estudo compreendeu a síntese e caracterização de novas entidades químicas planejadas a partir da mistura de cardanois – fonte biodegradável, renovável e de baixo custo – e avaliação preliminar dos percentuais de inibição enzimática de HDACs humanas bem como das atividades antimalárica em cultura de *Plasmodium falciparum* e dos perfis de citotoxicidade e seletividade.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium falciparum*, epigenética, iHDACs, cardanol, LCC

ABSTRACT

Malaria, a disease that affects about 200 million people worldwide, is caused by the parasite *Plasmodium*. The biological cycle of the parasite inside the host involves the transcription of important genes for its virulence and survival through epigenetic processes, among which acetylation and histone deacetylation. Thus, the development of histone deacetylase inhibitors (HDACi) has been explored in order to interrupt the life cycle of the parasite. The mixture of cardanols – the main component of the cashew nutshell liquid – has been used in several segments and in the rational design of therapeutic agents as novel HDACi. We describe in this work the synthesis and evaluation of novel hydroxamates planned from the cardanol. In this sense, eight intermediates and five target-derivatives were synthesized in yields ranging from 31 % to 83 % and characterized by NMR. Preliminary evaluation against eleven human HDACs revealed inhibition profiles for HDAC6 (50% to 92%) and HDAC11 (53% to 81%) with emphasis on the derivative LDT705 (**38**), which also showed moderate inhibition for HDAC8 (58%). The target-derivatives presented antimalarial activity with IC₅₀ ranging from 3.6 ± 1.0 µM to 20.2 ± 4.6 µM in *Plasmodium falciparum* culture. The determination of MLD₅₀ values in BMG cell line (18.1 µM and 57.8 µM) allowed the calculation of selectivity indexes (IS), with LDT706 (**39**) being the only one considered to be non-toxic. This study comprised the synthesis and characterization of new chemical entities planned from the mixture of cardanols – a biodegradable, renewable and of low cost source – and preliminary evaluation of the percentages of enzymatic inhibition of human HDACs as well as the antimalarial activities in culture of *Plasmodium falciparum* and cytotoxicity and selectivity profiles.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, epigenetics, HDACi, cardanol, CNSL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	3
Figura 2: Aderência e formação de rosetas	5
Figura 3: Antimaláricos disponíveis para tratamento	8
Figura 4: Estrutura do cromossomo	10
Figura 5: Processo de acetilação e desacetilação de histonas	15
Figura 6: Exemplos de inibidores HDAC	18
Figura 7: Estrutura de inibidores HDACS classe I e II e exemplos de ZBG	19
Figura 8: Principais componentes do LCC	21
Figura 9: Numeração e legendas empregadas no assinalamento de sinais em RMN de ^1H e de ^{13}C	32
Figura 10: Derivados-alvo planejados a partir da mistura de cardanois	44
Figura 11: RMN de ^1H do composto LDT71 (29)	53
Figura 12: Espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C do derivado LDT296 (31)	54
Figura 13: Espectro de RMN de ^1H dos derivados LDT701 (34) e LDT704 (37)	56
Figura 14: Perfil inibitório dos derivados 38-42 frente as HDACS 1 a 11	60
Figura 15: Estrutura da HDAC1 humana	63
Figura 16: Domínios catalíticos CD1 e CD2 da enzima HDAC6	64
Figura 17: Formas de reconhecimento da subunidade ZBG de iHDACS	65
Figura 18: Arcabouço molecular do derivado LDT705 (38)	66
Figura 19: Aspectos estruturais entre o SAHA (15) e os derivados LDT536 (23)	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Genes Identificados e Envolvidos na Variação Antigênica por Mecanismos Epigenéticos	12
Quadro 2: Metiltransferases Caracterizadas em <i>Plasmodium falciparum</i>	14
Quadro 3: HDACS em <i>Plasmodium</i> : Expressão e Homologia em Humanos.....	16

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Planejamento Estrutural de iHDACS	27
Esquema 2: Estratégia Sintética para Obtenção dos Derivados-Alvo	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil Inibitório de LDT536 (23) e LDT537 (24) Frente a HDAC Humana.	20
Tabela 2: Composições Químicas dos LCC Natural e Técnico.	22
Tabela 3: Deslocamentos Químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C: LDT71 (29), LDT296 (31) e LDT298 (32).....	55
Tabela 4: Deslocamentos Químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C (ppm, CDCl ₃) para os Intermediários LDT700 (33), LDT701 (34), LDT702 (35), LDT703 (36) e LDT704 (37).....	57
Tabela 5: Deslocamentos Químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C (ppm, CDCl ₃ * ou DMSO**) dos Derivados Hidroxâmicos LDT705 (38), LDT706 (39), LDT707 (40), LDT708 (41) e LDT709 (42).....	58
Tabela 6: Atividade Anti- <i>Plasmodiumfalciparum</i> <i>in vitro</i> Avaliada pelo Ensaio SYBR Dos Derivados-Alvo.	67
Tabela 7: Atividade citotóxica contra linhagem celular BGM e índice de seletividade.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGM – Buffalo green monkey

CAP – Grupo Cap de reconhecimento molecular

CCD – Cromatografia em camada delgada

CI₅₀ – Concentração requerida para adquirir 50% do efeito inibitório

CQ – Cloroquina

DCM – Diclorometano

DLM₅₀ – Concentração letal para 50 % das células

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNMTs – DNA Metiltransferases

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

ESP – Grupo espaçador

HAT – Histona Acetiltransferase

HDAC – Histona Desacetilase

HIB_{AI} – Contribuição hidrofóbica alifática

HIB_{AR} – Contribuição hidrofóbica aromática

HIF_{ALH} – Contribuição Hidrofílica por Aceptor de ligação de hidrogênio

HIF_{DLH} – Contribuição Hidrofílica por doador de ligação de hidrogênio

HSP₉₀ – Proteína de choque térmico 90

IL-10 – Interleucina-10

IL-17 – Interleucina-1

IS – Índice de seletividade

LCC – Líquido da casca da castanha do caju

MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazola

PBS – phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)

PfEMP1 – Proteína de membrana eritrocítica 1 do *P. falciparum*

PfHRP – Proteína Rica em histidina do *P. falciparum*

REA – Relação estrutura atividade

Rf – Fator de retenção

RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SAHA – Ácido suberoilanilidahidroxâmico

SAM – S-adenilmetionina

SFB – Soro Fetal Bovino

TEA – Trietilamina

THF – Tetraidrofurano

TNF α – Fator de necrose tumoral

TSA – Tricostatina

WHO/OMS – World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

ZBG/GLZ – Zinc binding ligant / Grupo Ligante de Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dados epidemiológicos	2
1.2. Ciclo de vida parasitário	2
1.3. Fisiopatologia da malária.....	4
1.4. A terapêutica para o tratamento da doença	6
1.5. Resistência antimalárica.....	8
1.6. Regulação gênica na malária	9
1.6.1. O genoma do plasmodium.....	9
1.7. Epigenética e malária	10
1.7.1. Modificações da cromatina	10
1.7.2. A epigenética no Plasmodium.....	11
1.7.3. Metilação do DNA.....	13
1.7.4. Acetilação e desacetilação de histonas	15
1.8. Inibidores HDAC (iHDAC)	17
1.8.1. A estrutura química de inibidores de HDAC e alvo farmacológico.....	18
1.9. Derivados do ácido hidroxâmico	19
1.10. Derivados do líquido da casca da castanha de caju (LCC).....	21
Justificativa e Objetivos	23
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3.OBJETIVO GERAL	25
3.1. Objetivos Específicos	25
Planejamento Estrutural	26
4.PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	27
Estratégia Sintética.....	28
5.ESTRATÉGIA SINTÉTICA.....	29
Parte Experimental	30
6.PARTE EXPERIMENTAL.....	31
6.1. Materiais e Métodos	31
Metodologia Sintética e Caracterização dos Compostos	33
6.1.1. Obtenção da Mistura de Cardanois a Partir do LCC Técnico (26A-C)..	33
6.1.2. Obtenção da Mistura Acetilada de Cardanois (30A-C).....	33
6.1.3. Obtenção do Derivado 3-(8-Hidróxiocetil)fenol (LDT71, 29).....	34

6.1.4.	Obtenção do Derivado β -oxaéster LDT296 (31)	35
6.1.5.	Obtenção do Derivado Ácido LDT298 (32)	36
6.1.6.	Procedimento Geral para Obtenção dos Derivados Amídicos (33-37)	37
6.1.7.	Procedimento Geral para Obtenção dos Derivados Hidroxâmicos (38-42)	41
6.2.	Avaliação Biológica <i>in vitro</i>	44
6.2.1.	Perfil de atividade frente a histona desacetilase humanas	44
6.2.2.	Perfil de atividade em culturas de <i>Plasmodium falciparum</i>	45
6.2.3.	Solubilização dos compostos	45
6.2.4.	Testes <i>in vitro</i> com formas sanguíneas do <i>P. falciparum</i>	45
6.2.4.1.	Cultivo contínuo das fases intraeritrocitárias de <i>P. falciparum</i>	45
6.2.4.2.	Ensaio da atividade cistostática	46
6.2.5.	Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	47
6.2.5.1.	Cultivo de células	47
6.2.5.2.	Ensaio de citotoxicidade	48
6.2.6.	Índice de seletividade	48
6.2.7.	Análise Estatística	49
	Resultados e Discussão	50
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
7.1.	Síntese e Caracterização dos Compostos	51
7.1.1.	Obtenção da Mistura Acetilada de Cardanois (30A-C)	51
7.1.2.	Obtenção do Derivado 8-(3-Hidróxifenil)octan-1-ol (LDT71) (29)	52
7.1.3.	Obtenção do Derivado β -oxaéster (LDT296, 31)	53
7.1.4.	Obtenção do Derivado Ácido LDT298 (32)	54
7.1.5.	Obtenção dos derivados amídicos (33-37)	55
7.1.6.	Obtenção dos Derivados Hidroxâmicos (38-42)	58
7.2.	Avaliação Biológica <i>in vitro</i>	60
7.3.	Relações Estrutura-Atividade a Partir dos Dados da atividade anti-HDAC	61
7.4.	Características estruturais dos derivados-alvos e a relação estrutura-atividade	61
7.5.	CAP como subunidade auxofórica	63
7.6.	Aspectos estruturais das HDACs	63
7.7.	O arcabouço molecular dos derivados-alvo e os perfis de atividade	65
7.8.	Ensaio fenotípico em culturas de <i>Plasmodium falciparum</i>	66
7.9.	Relação estrutura-atividade frente a culturas de <i>Plasmodium falciparum</i>	67
7.10.	Determinação da citotoxicidade e índice de seletividade	68
	Conclusões e Perspectivas	69

8.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	70
8.1. Perspectivas.....	71
<i>Referências Bibliográficas</i>	72
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
Anexos	79

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A malária, uma das doenças parasitárias de maior emergência em países tropicais, tem como agentes etiológicos protozoários do gênero *Plasmodium* e é transmitida ao homem pela picada de mosquito do gênero *Anopheles*. Há atualmente seis espécies de parasitos que causam a malária em seres humanos, e duas destas espécies – *P. falciparum* e *P. vivax* – representam maior ameaça à saúde mundial (BRABB et al., 2012). Outras espécies conhecidas por infectarem macacos, *P. knowlesi* no Sudoeste da África (AHMED, 2015) e *P. simium* (BRASIL et al., 2017) na região da Mata Atlântica no Rio de Janeiro, têm sido identificadas em humanos e relacionadas a casos mais severos da doença.

Fatores como a ausência de vacinas eficazes, a diminuição da efetividade de mosquiteiros tratados com inseticidas e o aumento da resistência, principalmente entre os mosquitos na África (RANSON et al., 2011), vem tonando o controle da malária dependente de tratamentos farmacológicos (SANTOS; TORRES, 2013). Entre os agentes antimaláricos – classificados de acordo com classe química, pelo mecanismo de ação ou estágio do ciclo de vida do parasito – estão disponíveis as quinolinas, os antifolatos e derivados de artemisininas, administrados sozinhos ou em combinação (STAINES; KRISHNA, 2012).

Uma vez que a resistência aos medicamentos existentes – preocupação para pesquisadores e autoridades de saúde – tem sido observado para espécies como *P. falciparum*, o desenvolvimento de novos compostos que combatam a doença tem se intensificado (BUENO et al., 2014). Estudos têm utilizado da epigenética para explicar o desenvolvimento do parasito no hospedeiro bem como no desenvolvimento de novas moléculas como os inibidores de histonas desacetilases (COLEMAN; DURAISINGH, 2008; CUI; MIAO, 2010).

Os lipídeos fenólicos encontrados no líquido da casca da castanha de caju (LCC) apresentam requisitos estruturais relevantes ao reconhecimento molecular por diferentes alvos terapêuticos sendo, portanto, explorado no planejamento racional de candidatos a agentes terapêuticos em nosso grupo (LEMES et al., 2016)

Este trabalho consiste na obtenção de novas moléculas planejadas a partir do cardanol, um dos principais componentes do LCC, por meio do planejamento, síntese e avaliação *in vitro* frente a HDACs humanas bem como correlação a seu perfil antimalárico em culturas de *Plasmodium falciparum*.

1.1. Dados epidemiológicos

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2016, um número estimado em 216 milhões de casos de malária ocorreu em 91 países; 5 milhões a mais comparado ao ano anterior. A maioria destes casos ocorreu na Região Africana (90 %), seguido do sudeste Asiático (7 %) e do Mediterrâneo Oriental (2 %). Ainda no mesmo ano foram estimadas cerca de 445 mil mortes pela doença com 91 % dos óbitos concentrados na região Subsaariana Africana, com exceção da Índia (WHO, 2017).

A OMS tem buscado a eliminação da doença em diversos países em colaboração a programas governamentais e estratégias mundiais de erradicação. A Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030, adotada pela Assembleia Mundial da Saúde em maio de 2015, fornece um quadro abrangente para orientação aos países em seus esforços para acelerar o progresso da erradicação da malária, com redução da incidência global da doença e das taxas de mortalidade em pelo menos 90 % até 2030. Em 2016 foram identificados 21 países com o potencial de eliminação da malária para o ano de 2020 – conhecidos por países E-2020 – entretanto, 11 destes relataram aumento de casos comparado ao ano de 2015 (WHO, 2017).

Na região das Américas, o Brasil representa cerca de 18 % dos casos estimados, com 124.180 confirmados e redução de 72 % dos relatos para *Plasmodium falciparum* entre os anos de 2010 e 2016. Territorialmente, aproximadamente 45 % dos casos de malária vêm de municípios do Acre e Amazonas (WHO, 2017).

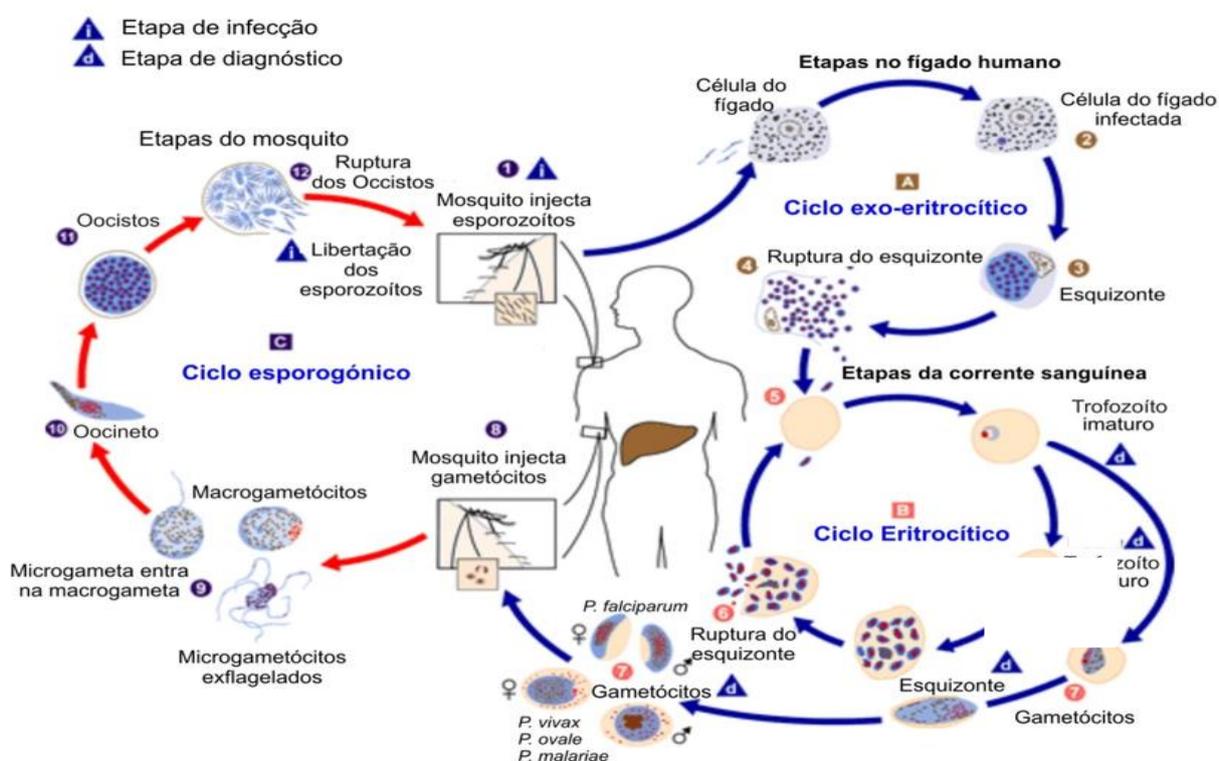
A espécie *Plasmodium falciparum* é a mais prevalente na África Subsariana, representando 99% dos casos de malária, enquanto a espécie *P. vivax* é predominante na região das Américas (64 %), no sudeste da Ásia (acima de 30 %) e nas regiões do Mediterrâneo Oriental (40 %).

1.2. Ciclo de vida parasitário

O ciclo de vida do *Plasmodium* no ser humano tem início com a picada do mosquito *Anopheles* fêmea que, ao se alimentar do sangue do hospedeiro, injeta a forma infectante do parasito presente em sua saliva, os esporozoítos. Estes, por sua vez, invadem e se replicam primeiramente em hepatócitos antes de se diferenciarem

em merozoítos, capazes de entrar no ciclo intra-eritrocitário. A fase hepática do ciclo dura de 8 a 25 dias, correspondente ao período de incubação da doença, e após este período os merozoítos passam para a corrente sanguínea e invadem as hemácias. Dentro dos eritrócitos eles se desenvolvem em trofozoítos (imaturos na forma de anel e maduros) e depois esquizontes em 48 horas (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*) ou 72 horas (*P. malariae*). Depois de fragmentar a membrana da célula hospedeira por digestão enzimática, um número de 24 a 32 merozoítos são capazes de infectar novos eritrócitos. Este ciclo de invasão e crescimento em eritrócitos produz uma biomassa parasitária que aumenta rapidamente, causando febre e levando a processos patológicos como a perda de eritrócitos (anemia) e sequestro de eritrócitos infectados em leitos microvasculares (malária cerebral) (Figura 1) (BRABB et al., 2012).

Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium*. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention – site (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – site)



1.3. Fisiopatologia da malária

Uma vez inseridos na corrente sanguínea do hospedeiro na forma de esporozoítos parte dos parasitos é destruída por macrófagos locais, enquanto outros migram pelos vasos linfáticos e grande parte atinge o fígado por meio dos vasos sanguíneos. No fígado, os esporozoítos transitam pelas células e invadem os hepatócitos via formação de vacúolos parasitóforos até estabilização em célula para replicação em esquizonte seguida da liberação de milhares de merozoítos. Esta fase hepatocítica é silenciosa e não apresenta sintomas (VAUGHAN; ALY; KAPPE, 2009).

Desta forma, os merozoítos presentes na corrente sanguínea reconhecem, atacam e invadem os eritrócitos em processo de cerca de 60 segundos. O reconhecimento ocorre por meio de diversos processos bioquímicos que envolve proteínas presentes na superfície do parasito e na membrana celular dos eritrócitos. Uma vez reconhecido, há a reorientação do merozoíto para que a extremidade apical do parasito interaja com a célula, facilitando sua invasão por meio de mecanismos como o motor actina-miosina e a formação do vacúolo parasitóforo. Após a invasão, os merozoítos iniciam a esquizogonia eritrocítica, gerando mais merozoítos além de suas formas reprodutivas (COWMAN; CRABB, 2006).

A saída do parasito envolve aumento súbito na pressão intracelular no final do ciclo do estágio sanguíneo, em conjunto com alterações bioquímicas que desestabilizam o citoesqueleto da célula infectada, e estes combinam-se para promover um evento explosivo lisando a célula e liberando milhares de merozoítos. Este processo de lise dos eritrócitos é responsável pelos principais sintomas da doença (febre e anemia) (GLUSHAKOVA et al., 2005).

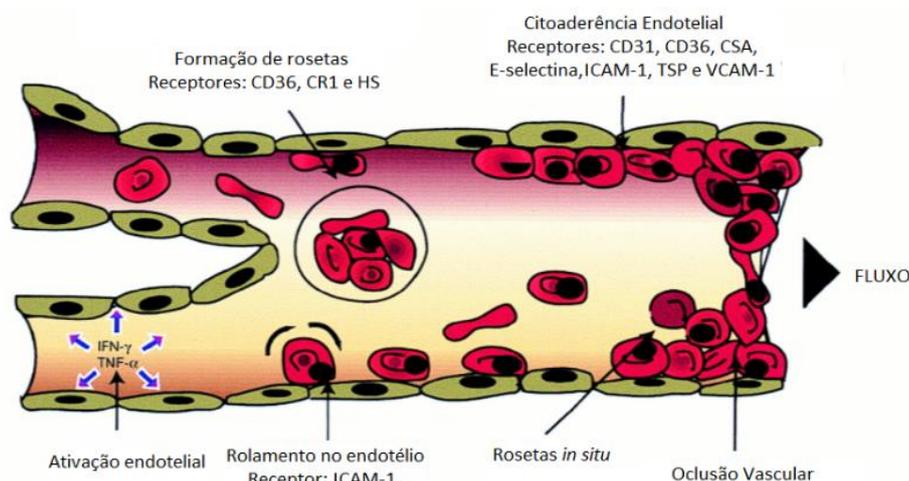
Na infecção por *Plasmodium falciparum*, os eritrócitos infectados não permanecem na circulação por todo o ciclo de vida. Após cerca de 24 horas, quando os parasitos jovens se maturam da forma de anel para forma trofozoíta madura, as células vermelhas infectadas aderem às células endoteliais na microcirculação de diversos órgãos. A este processo dá-se o nome de sequestro ou citoaderência – principal fenômeno relacionado à fisiopatologia da doença – que causa obstrução da circulação, diminuição da perfusão tecidual e debilitação da ativação do sistema imune (AUTINO et al., 2012).

Diversas moléculas provenientes do parasito e ligantes nas células eritrocitárias estão associados à citoaderência das células infectadas ao endotélio. Entre eles, a proteína rica em histidina de *P. falciparum* (PfHRP) e a proteína de membrana

eritrocitária 1 (PfEMP1) possuem importantes funções. PfHRP está relacionado com a criação de *knobs*, pequenas protuberâncias que aparecem na superfície de células vermelhas infectadas; enquanto PfEMP1, proteína multimérica codificada pelo gene *var* (variante), sobressai dos *knobs* e desempenha papel importante no sequestro das células infectadas para outros órgãos de importância vital para o hospedeiro (WATERMEYER et al., 2016).

Algumas moléculas presentes na superfície das células endoteliais – ICAM-1, CD36, VACM-1 e ELAM-1 – funcionam como receptoras para as hemácias parasitadas realizarem a adesão. Desta forma facilitam o acúmulo de eritrócitos, que bloqueiam a passagem de luz dos capilares; aumentam a permeabilidade, com perda de fluidos e proteínas; e promovem anóxia com consequente edema dos tecidos (CHAKRAVORTY; HUGHES; CRAIG, 2008; PAL et al., 2016). Outro importante fenômeno é a formação de rosetas, em que hemácias não parasitadas aderem às células infectadas criando estruturas rígidas presentes tanto na malária severa quanto nas formas não complicadas (HORATA et al., 2009). A citoaderência leva ao sequestro dos parasitos em vários órgãos tais como o coração, pulmão, cérebro, fígado, rins, intestino, tecido adiposo, tecido subcutâneo e da placenta. O sequestro crescente do parasito nestes tecidos fornece ambiente venoso mais adequado para a maturação enquanto que a adesão ao endotélio permite escapar da eliminação pelo baço e se ocultar do sistema imunológico (FONAGER et al., 2012). Estes fatores levam ao aumento da carga parasitária em que apenas trofozoítos em estágio de anel são detectados em circulação no sangue periférico, mas não os maduros e esquizontes ligados à microvasculatura (Figura 2) (FONAGER et al., 2012; HORATA et al., 2009).

Figura 2: Aderência e formação de rosetas. Fonte: Adaptado de Qijun Chen et al., 2000.



A fisiopatologia da malária também está relacionada à resposta imune do hospedeiro e à produção de citocinas. Substâncias tóxicas como produtos residuais da membrana das células vermelhas e o pigmento malárico produzido pelas formas esquizontes do parasito, chamado de hemozoína e glicosilfosfatidilinositol (GPI) são liberados na corrente sanguínea e ativam a produção de citocinas e mediadores como o TNF- α , INF- γ e interleucinas por macrófagos, além da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (PAL et al., 2016). Apesar de possuir funções protetoras contra o *Plasmodium* e a resposta inicial de citocinas pró-inflamatórias auxiliar na limitação da infecção, o aumento exarcebado de mediadores está relacionado às formas graves da doença, como a malária cerebral. Desta forma, são capazes de produzir febre, hipoglicemia, sequestro de leucócitos nos vasos pulmonares e aumentar a citoaderência. Estudos têm demonstrado também o aumento das citocinas IL-17, IP-10, e IL-10 na disfunção de múltiplos órgãos e falência renal (HERBERT et al., 2015). Além da liberação de citocinas pró-inflamatórias, a hemozoína também está relacionada à apoptose no desenvolvimento de células eritróides na medula óssea causando anemia (LAMIKANRA et al., 2009).

Importantes estudos têm demonstrado a importância de proteínas virais na patogenicidade do parasito. Por natureza, a patogenicidade é o resultado dos efeitos de muitos genes. Mu e colaboradores (2003) sugeriram que as diferenças na resistência a fármacos para *P. falciparum* nos continentes afetados são devidas a conjuntos de genes, dentre eles os de proteínas de codificação desconhecida que são sobrepostos, mas não idênticos (MU et al., 2003). Estudos de Cai e colaboradores (2015) identificaram componentes de vinte e quatro proteínas relacionadas com a patogênese de *P. falciparum*. As proteínas desempenham papéis no processamento das informações do parasito como sinalização, regulamento epigenético e entrada para o hospedeiro. Todos os processos relacionados à patogenia e virulência (CAI et al., 2015).

1.4. A terapêutica para o tratamento da doença

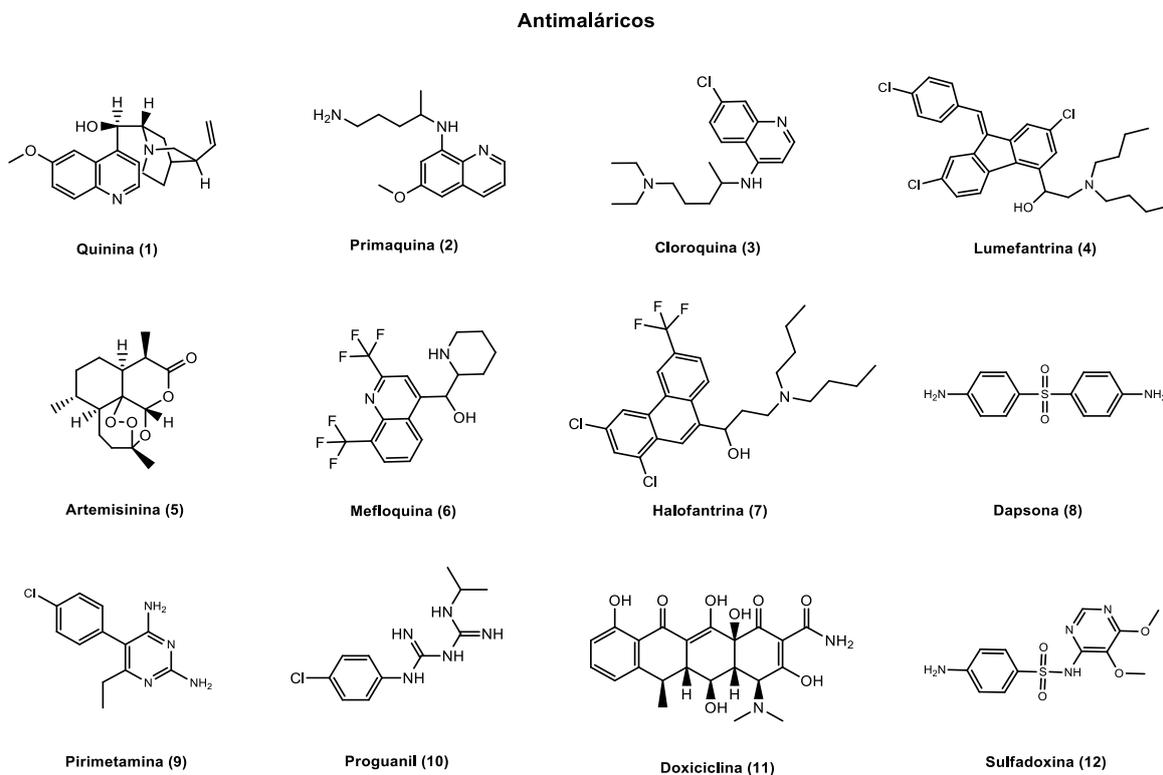
Os plasmódios passam por fases distintas que alteram sua forma, função, localização, consequência clínica e suscetibilidade a agentes antimaláricos. Deste modo, as atividades dos antimaláricos variam de estreita, como a atividade da quinina (1) contra a fase eritrocitária sanguínea, a ampla, vista na atividade de primaquina (2)

contra formas sexuadas e assexuadas no sangue e no fígado. Além disso, a gama de susceptibilidade a estágios específicos difere entre espécies de plasmódios como no caso da cloroquina (3) que mata os gametócitos de *P. vivax*, mas não exerce nenhum efeito contra aqueles de *P. falciparum*. Estas propriedades intrínsecas definem os usos recomendados das terapias antimaláricas (BAIRD; J.K., 2005).

Os fármacos antimaláricos disponíveis podem ser classificados pela classe química, pelo mecanismo de ação ou estágio do ciclo de vida do parasito. Estas substâncias incluem quinolinas, antifolatos e derivados de artemisininas, administrados sozinhos ou em combinação. As quinolinas atuam inibindo a polimerização de hemozoína e permitindo o acúmulo de heme, substância tóxica para o parasito. Os antifolatos inibem a síntese de ácido fólico, bloqueando as enzimas diidropteroato sintase e diidrofolato redutase do parasito. Embora o mecanismo de ação da artemisinina (5) não seja bem definido tem sido aceita sua interferência na ação da enzima cálcio-ATPase no retículo sarcoplasmático/endoplasmático do plasmódio e na ligação com o grupo heme, gerando toxicidade para o parasito (STAINES; KRISHNA, 2012).

Desta forma, os fármacos antimaláricos são representados principalmente por esquizonticidas sanguíneos quinolinometanólicos como quinina (1) e mefloquina (6); 4-aminoquinolínicos como a cloroquina (3); derivados do fenantreno halofantrina (7) e lumefantrina (4); os que interferem na síntese ou ação do ácido fólico como sulfadoxina (12), dapsona (8) e pirimetamina (9); derivados endoperóximos como a artemisinina (5) e derivados; e esquizonticidas teciduais a exemplo dos beta-aminoquinolínicos como a primaquina (2). Adicionalmente temos os agentes profiláticos que bloqueiam a passagem do estágio exo-eritrocítico para o estágio eritrocítico como a cloroquina (3), a mefloquina (6), a dapsona (8), a pirimetamina (9), o proguanil (10), e a doxiciclina (11); bem como gametotocidas como a primaquina (2), pirimetamina (9) e proguanil (10) (CDC, 2013; OMS, 2015) (Figura 3).

Figura 3: Antimaláricos disponíveis para tratamento. Fonte: Próprio autor.



As combinações medicamentosas oferecem vantagens potencialmente importantes sobre monoterapias e, se apropriadamente escolhidas, podem apresentar atividade sinérgica. No entanto, há limitação na proteção contra a seleção da resistência conforme o esperado, podendo levar à perda de eficácia (FIDOCK et al., 2004). Neste contexto, a OMS tem recomendado o uso da Terapia Combinada baseada em artemisinina para a espécie *P. falciparum*. Estas são combinações de derivado da artemisinina e outro antimalárico estruturalmente independente e mais lentamente eliminado (NOSTEN; WHITE, 2007).

1.5. Resistência antimalárica

A resistência resulta em depuração tardia ou incompleta do parasito do sangue periférico do paciente quando em tratamento com antimaláricos. No cenário mundial atual, a resistência já foi descrita para a maioria dos medicamentos utilizados e vários são os fatores relacionados à sua ocorrência (HALDAR; BHATTACHARJEE; SAFEUKUI, 2018). As mutações gênicas são um dos principais fatores que conferem ao parasito a capacidade de escapar da ação dos medicamentos, principalmente por

meio de mecanismos de efluxo ou pela diminuição da afinidade dos fármacos aos seus biorreceptores. Neste contexto, a resistência pode estar associada à mutação em apenas um ou múltiplos sítios (SINHA; MEDHI; SEHGAL, 2014).

O genoma do *Plasmodium falciparum* codifica múltiplos transportadores proteicos e a ocorrência de polimorfismos pode configurar resistência aos antimaláricos mais utilizados. Neste sentido, o polimorfismo já foi identificado e caracterizado em genes *pfmdr1*, *pfprt*, *pfmrp1* e *kelch13* (CUI et al., 2015; KIRCHNER; POWER; WATERS, 2016). O estudo da maquinaria genética do parasito pode auxiliar tanto na descoberta de novos mecanismos de defesa do *Plasmodium* que configuram resistência, como também no desenvolvimento de novos antimaláricos, uma vez que a regulação gênica é essencial para a sobrevivência do parasito no hospedeiro.

1.6. Regulação gênica na malária

1.6.1. O genoma do plasmodium

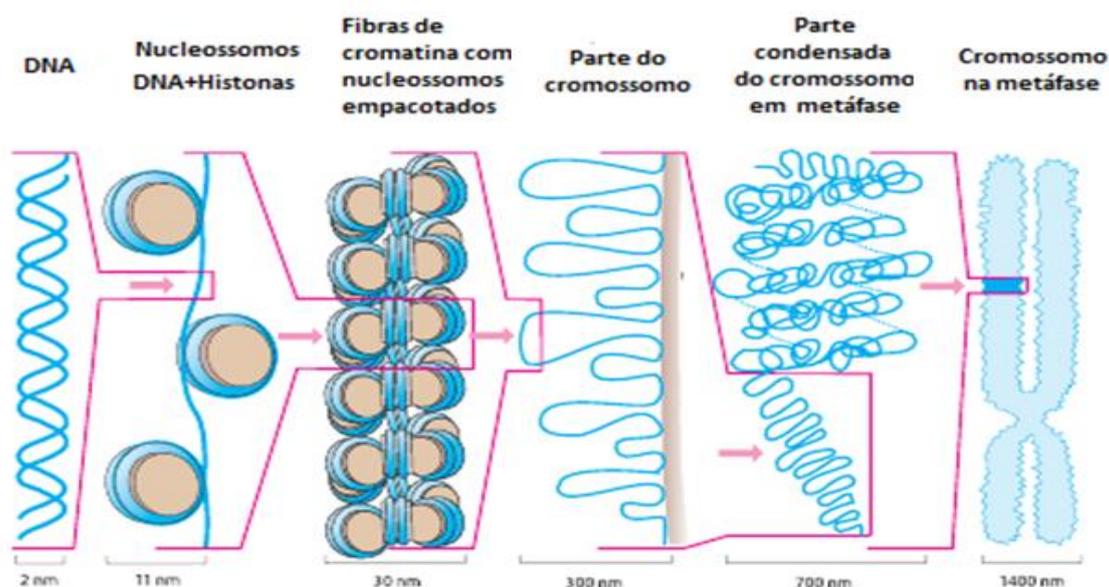
O genoma do *Plasmodium* está constituído por 14 cromossomos lineares com 23 milhões de pares de bases que codificam mais de 5000 genes de proteínas essenciais para o ciclo de vida do parasito. O núcleo compõe cerca de 4800 destes genes em regiões centrais, enquanto que famílias mutagênicas (algumas associadas à variação antigênica) estão amplamente distribuídas em regiões subteloméricas. Seu genoma é rico em sequências AT que compõe mais de 90% das regiões intergênicas (GARDNER et al., 2002). Atualmente as espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. knowlesi* já possuem sequência genética disponível (KIRCHNER; POWER; WATERS, 2016). Em eucariotos, a expressão gênica é, em parte, controlada por diversos fatores de transcrição que se ligam a promotores celulares. No parasito, poucos fatores de transcrição foram identificados em seu genoma, o que leva a acreditar que a regulação das cascatas de transcrição observadas nos diversos estágios do ciclo de vida do *Plasmodium* só seria possível com o auxílio de outros componentes e mecanismos, como alterações pós-translacionais/traducionais e mudanças na estrutura da cromatina (BATUGEDARA et al., 2017).

1.7. Epigenética e malária

1.7.1. Modificações da cromatina

Nas células eucarióticas, o DNA encontra-se envolto ao redor de proteínas conhecidas por histonas, onde duas cópias de suas classes H2A, H2B, H3 e H4 e uma histona da classe H1 formam o complexo denominado nucleossomo. Os nucleossomos, por sua vez, são agrupados e empacotados constituindo fibras de cromatina de 30 nanômetros de comprimento. Estas fibras unidas formam laços de aproximadamente 300 nm. Quando comprimidos e enrolados, os laços produzem uma fibra mais larga de 700 nm que constitui a cromátide de um cromossomo, a qual possui cerca de 1400 nm (PASSARGE, 2001) (Figura 4).

Figura 4: Estrutura do cromossomo. Adaptado de Passarge et al, 2001



A forma mais compacta e condensada da cromatina (heterocromatina) é inacessível para a transcrição gênica. Para que haja expressão gênica é necessária a descompactação da estrutura (eucromatina) para que os fatores de transcrição possam atuar em seus sítios-alvo (FELSENFELD; GROUDINE, 2003). Deste modo, alguns mecanismos epigenéticos estão diretamente ligados às modificações da estrutura da cromatina, facilitando ou reprimindo a transcrição gênica e gerando respostas a inúmeros processos biológicos.

A epigenética refere-se às alterações na expressão gênica herdadas, relacionadas a processos que não envolvem diretamente a mudança no sequenciamento do DNA (DEANS; MAGGERT, 2015). A cromatina é a principal plataforma onde os processos epigenéticos ocorrem e seus componentes estão sujeitos a ampla gama de modificações correlacionadas à atividade gênica. Tais modificações provavelmente ocorrem em todos os níveis de organização, mas a maior parte está concentrada no próprio nucleossomo. Algumas delas afetam diretamente a estrutura ou estabilidade, enquanto outras introduzem grupos químicos que são reconhecidos por proteínas reguladoras ou estruturas adicionais (FELSENFELD; GROUDINE, 2003). A metilação do DNA e a acetilação/desacetilação de aminoácidos presentes nas caudas de histonas são exemplos clássicos destes processos estudados em diversos segmentos como comportamento, câncer e doenças parasitárias.

1.7.2. A epigenética no *Plasmodium*

Assim como em eucariotos, o *Plasmodium* também apresenta processos epigenéticos como mecanismos vitais que podem ser observados durante todo o ciclo celular. Por muito tempo os estudos se concentraram na regulação epigenética do gene *var*, principal gene de transcrição, pois transcreve um dos fatores de virulência de maior importância para o parasito, o PfEMP1; entretanto, alguns estudos revelaram funções gerais da epigenética na biologia do parasito como na invasão eritrocítica, na gametogênese e no transporte de soluto, entre outros. Famílias genéticas do parasito que codificam antígenos de superfície dispõem de expressões exclusivas que são controladas epigeneticamente. Genes como *rifin*, *stevor*, *pfmc-2tm*, *eba*, *Pfkh*, *clag 3.1*, *clag 3.2* e *Pfap2-g* são alguns exemplos envolvidos na variação antigênica por mecanismos epigenéticos (Quadro 1) (CORTÉS; DEITSCH, 2017).

Quadro 1: Genes identificados e envolvidos na variação antigênica por mecanismos epigenéticos. Fonte: CORTES et al, 2017 (Adaptado)

Gene (Família)	Proteína Codificada	Função
<i>Var genes</i> (~60 membros)	PfEMP1	Proteína de citoaderência de superfície em eritrócitos infectados
<i>Rif</i> (~160 membros)	RIFIN	Relacionados à superfície de eritrócitos infectados e formação de rosetas
<i>Stevor</i> (~31 membros)	STEVOR	Presente na superfície e relacionado a propriedades mecânicas de eritrócitos infectados
<i>Pfmc-2tm</i> (~12 membros)	PFMC-2TM	Presente na superfície em eritrócitos infectados
<i>Surfin</i> (~10 membros)	SURFIN	Função desconhecida
<i>Clag</i> (5 membros)	CLAG	Relacionados à formação do canal PSAC encontrado na membrana de eritrócitos infectados
<i>Phist</i> (~79 membros)	Proteínas de domínio PHIST	Citoaderencia/ Remodelação dos eritrócitos
<i>Exported dnaj III</i> (~9 membros)	DnaJ III/HSP40	Remodelação dos eritrócitos
<i>Hyp</i> (~55 membros)	HYP	Função desconhecida
<i>Fikk</i> (~23 membros)	FIKK	Remodelação dos eritrócitos
<i>Gbp</i> (3 membros)	GBP	Função desconhecida
<i>Acs</i> (~13 membros)	Acyl-CoA sintase (ACS)	Metabolismo lipídico (síntese ou transporte)
<i>Acbp</i> (4 membros)	Proteína de ligação a Acyl-coA (ACBP)	Metabolismo lipídico (síntese ou transporte)

Considerando a variedade de genes *var* (cerca de 60 membros) e outros genes que transcrevem fatores de virulência para o parasito, é importante ressaltar o funcionamento da maquinaria epigenética envolvida no processo biológico. Para que a ativação de um gene ocorra efetivamente há necessidade do silenciamento simultâneo de outros membros previamente ativados, exigindo assim o mecanismo coordenado dentro da família (CORTÉS; DEITSCH, 2017). Interferir no delicado

balanço entre os estados epigenéticos naturais destes genes pode comprometer a sobrevivência do parasito de diversas maneiras. O estudo epigenético do parasito da espécie *Plasmodium falciparum* revelou que a forma de eucromatina – diferentemente dos organismos eucarióticos – é mantida durante todo seu ciclo, com algumas regiões de heterocromatina, principalmente nas regiões subteloméricas controladas pela metilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me3) ou por desacetilação de histonas (DUFFY et al., 2014).

1.7.3. Metilação do DNA

A metilação do DNA é catalisada por enzimas DNA metiltransferases (Dnmts) que transferem o grupo metila da S-adenilmetionina (SAM) ao quinto carbono de um resíduo de citosina para formar 5mC. Este processo implica no silenciamento da transcrição gênica, uma vez que esta ligação impede o acesso de fatores de transcrição em regiões promotoras (TATIANA; ARRUDA, 2015). A maioria das metilações do DNA ocorre em citosinas que precedem o nucleotídeo guanina conhecidas por sítios CpG. Já as ilhas de CpG – trechos de DNA maiores que 200 pares de bases longas com maior quantidade de sequências CpG que o resto do genoma – muitas vezes não são metiladas (FRANCIS et al., 2010). A metilação do DNA é essencial para silenciar elementos retrovirais; regular a expressão de genes específicos de tecidos; para o *imprinting* genômico; e inativação do cromossomo X (MOORE; LE; FAN, 2013).

As enzimas que estabelecem, removem e reconhecem a metilação do DNA são divididas em escritoras (*writers*), apagadoras (*erasers*) e leitoras (*readers*). As escritoras são as enzimas que catalisam a adição de grupos metila em resíduos de citosina (DNMT2, DNMT3A e DNMT3B1), enquanto as apagadoras modificam e removem os grupos metila (desmetilases). Por sua vez, as enzimas leitoras reconhecem e vinculam grupos metila em última análise a sequências hemimetiladas (fitas de DNA em processo de replicação), mantendo a metilação (DNMT1) (FRANCIS et al., 2010; MOORE; LE; FAN, 2013).

Considerando que o genoma do *Plasmodium* é em sua maioria composto por sequências AT, poucas são as metilações CpG identificadas e pouco se tem descoberto sobre. Apesar disto, estudo feito por Ponts e colaboradores (2013) demonstrou a presença de metilação em *Plasmodium* via única metiltransferase responsável por esta atividade: PfDNMT2 (PONTS et al., 2013). Acredita-se, então, que o padrão de ativação e silenciamento genético observado nestes parasitos seja

principalmente controlado por metilações não-CpG, como exemplo, metilações em histonas.

Mais do que DNA metiltransferases, Histonas metiltransferases e suas funções já foram identificadas em *Plasmodium falciparum* (Quadro 2). Diferentemente da metilação do DNA, a metilação de histonas pode consequentemente ativar ou silenciar genes, a depender da localização da metilação. Um dos principais marcadores do silenciamento dos genes para o *Plasmodium* é a metilação da lisina 9 da histona 3 em regiões subteloméricas que codificam fatores de virulência para a maioria dos genes. Já a metilação na lisina 4 da histona 3 é identificada em promotores de genes *var* como ativadoras da transcrição (LOPEZ-RUBIO et al., 2007). Este padrão e outros atuam em conjunto com a acetilação e desacetilação de histonas para que o processo de transcrição e silenciamento de genes ocorra de forma ordenada durante todo o ciclo de vida do parasito (CORTÉS; DEITSCH, 2017).

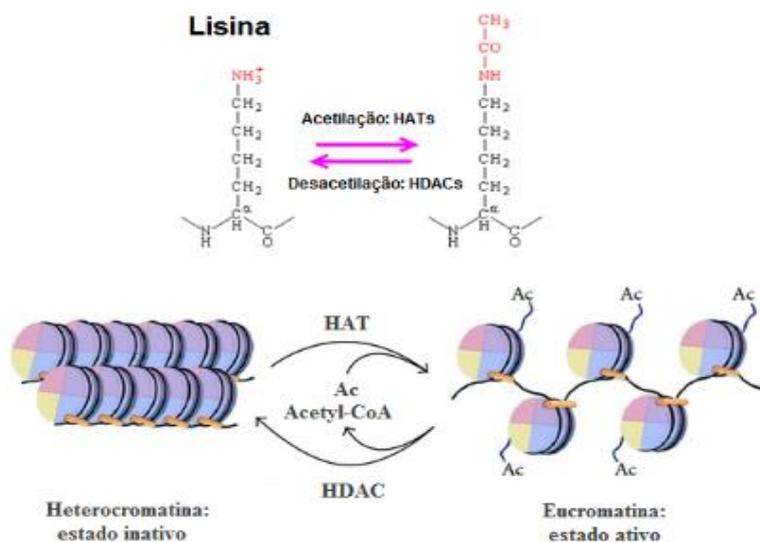
Quadro 2: Metiltransferases caracterizadas em *Plasmodium falciparum*. Fonte: Cortes, 2017 (Adaptado)

Histona Metiltransferase	ID do Gene	Função	Referência
PfSET1	PF3D7_0629700 (PFF1440w)	Trimetilação em H3K4	Cui et al. 2008a
PfSET2 (PfSETvs)	PF3D7_1322100 (MAL13P1.122)	Metilação em H3K36, participa da regulação de genes <i>var</i>	Cui et al. 2008a; Kishore et al. 2013; Jiang et al. 2013; Ukaegbu et al. 2014
PfSET3 (PfKMT1)	PF3D7_0827800 (PF08_0012)	Metilação em H3K9	Cui et al. 2008a; Lopez-Rubio et al. 2009; Volzet et al. 2010
PfSET4	PF3D7_0910000 (PFI0485c)	Metilação em H3K4	Cui et al. 2008a; Volz et al. 2010; Jiang et al. 2013
PfSET5	PF3D7_1214200 (PFL0690c)	Marcadores desconhecidos	Cui et al. 2008a; Volz et al. 2010; Jiang et al. 2013
PfSET6	PF3D7_1355300 (PF13_0293)	Metilação em H3K4	Cui et al. 2008a; Volz et al. 2010
PfSET7	PF3D7_111520 (PF11_0160)	Metilação em H3K4 e H3K9	Cui et al. 2008a; Chen et al. 2016
PfSET8	PF3D7_0403900 (PFD0190w)	Metilação em H4K20	Cui et al. 2008a; Kishore et al. 2013; Jiang et al. 2013
PfSET9	PF3D7_0508100 (PFE0400w)	Marcadores desconhecidos	Cui et al. 2008
PfSET10	PF3D7_1221000 (PFL1010c)	Metilação em H3K4	Volz et al. 2012

1.7.4. Acetilação e desacetilação de histonas

A acetilação e desacetilação de histonas possuem papel crucial para a sobrevivência do parasito em suas diversas alterações morfológicas durante o ciclo de vida, principalmente para os determinantes de fatores de virulência. Este processo consiste na adição de grupo acetila em resíduos de aminoácidos nas caudas das histonas. Devido ao caráter negativo do DNA e positivo das lisinas quando desacetiladas, as histonas tendem a ficar mais atraídas e compactas pela força eletrostática, caracterizando estado de silenciamento genético. A adição de grupo acetila neutraliza a carga positiva das histonas reduzindo as forças de interação, resultando na conformação descondensada e ativa (Figura 5) (SHAHBAZIAN; GRUNSTEIN, 2007).

Figura 5: Processo de acetilação e desacetilação de Histonas. Fonte: Ververis et al, 2013 (Adaptado)



As Histonas Acetiltransferases (HATs) são as enzimas responsáveis pelo processo de adição do grupo acetila aos resíduos de lisina, enquanto que as Histonas Desacetilases (HDACs) pelo processo inverso (SHEN; WEI; ZHOU, 2015). Até o momento, 18 enzimas HDAC foram identificadas e caracterizadas em seres humanos e são divididas em quatro classes: a classe I que são proteínas Rpd3-like (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8); a classe II representada por proteínas Hda1-like (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10); as proteínas Sir2-like como classe III

(SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7); e a proteína de classe IV (HDAC11) (SETO; YOSHIDA, 2014). As HDACs não somente alteram a transcrição de genes como também promovem o estabelecimento ou apagam outras modificações pós-traducionais alternativas como a metilação (SETO; YOSHIDA, 2014). Ambas HATs e HDACs trabalham de forma coordenada, mas não específica. Adicionalmente, não parecem serem recrutadas por promotores específicos, mas sim, atuam de forma contínua por todo genoma juntamente a outras enzimas e complexos enzimático (SHAHBAZIAN; GRUNSTEIN, 2007).

Em *Plasmodium falciparum*, as acetiltransferases *PfGNC5*, *PfHAT1* e *PfMYST* demonstraram importante papel na regulação epigenética pela acetilação de histonas, com processos similares em eucariotos e humanos (CUI et al., 2007; CUI; MIAO, 2010; FAN; AN; CUI, 2004). A acetilação de H3 pela *PfGNC5*, por exemplo, demonstrou ser essencial para a ativação genética de promotores, atuando juntamente com a metilação desta mesma histona em diferentes regiões (CUI et al., 2007). Por sua vez, as histonas desacetilase *PfSIR2A*, *PfSIR2B*, *PfHDAC1*, *PfHDAC2* e *PfHDAC3* demonstraram semelhança com as respectivas classes de HDACs presentes em eucariotos (Quadro 3), com funções específicas na ativação do gene *var* por *PfSIR2A*, *PfSIR2B* e *PfHDAC3* (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012b; ANDREWS et al., 2009; MERRICK et al., 2015). Alguns estudos demonstraram que a ausência destas HDACs implica na desorganização dos processos epigenéticos e resultam na morte do parasito, tornando-as, desta forma, alvos moleculares para possíveis tratamentos como no caso do desenvolvimento de inibidores de HDACs (COLEMAN et al., 2014; MUKHERJEE; PRADHAN; SHAH, 2008).

Quadro 3: HDACs em *Plasmodium*: expressão e homologia em humanos. Fonte: Andrews, 2008 (Adaptado)

HDAC	ID do gene	Expressão	Homólogo em Humano
<i>PfHDAC-1</i>	PF11260c.	Trofozoítos, Esquizontes, Merozoítos, Membranas de Eritrócitos infectados	Classe 1 de HDACs
<i>PfHDAC-2</i>	PF14_0690	Gametócitos, Trofozoítos	HDAC Putativa
<i>PfHDAC-3</i>	PF10_0078	Gametócitos	Classe 2 de HDACs
<i>PfSir2</i>	PF13_0152	Dados indisponíveis	Sir2
<i>PfSir2-like</i>	PF14_0489	Esporozoítos	Sir2-like

1.8. Inibidores HDAC (iHDAC)

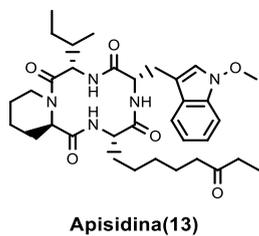
É importante ressaltar que inibidores de HDAC têm sido investigados visando o tratamento de doenças como o câncer e parasitárias (ENGEL et al., 2015; KIM; BAE, 2011). Um dos primeiros estudos observados quanto à atividade antiparasitária de inibidores de HDACs foi realizado com a apicidina (**13**) contra parasitos apicomplexos. **13** demonstrou inibir a proliferação dos parasitos pela hiperacetilação de histonas (DARKIN-RATTRAY et al., 1996), apesar do nível de toxicidade para células de mamíferos (MUKHERJEE; PRADHAN; SHAH, 2008).

Atualmente, diferentes classes de inibidores de HDAC têm demonstrado resultados promissores para a atividade antimalárica (ANDREWS et al., 2008; ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012b; ENGEL et al., 2015), relacionada à desregulação dos processos epigenéticos no *Plasmodium falciparum* – atuando em diferentes estágios e por meio da ativação massiva de genes vitais para o seu ciclo de vida – gerando certa toxicidade para o parasito. Uma vez que para a transcrição correta de *PfEMP-1* é necessário o silenciamento de genes *var* em diferentes regiões – processo controlado por HDACs – a inibição resulta na transcrição de múltiplos *PfEMP-1*, podendo gerar potentes respostas imunes que eliminam o parasito e conferem proteção a futuras infecções. O processo de inibição de HDACs pode, a exemplo do gene *pfap-2* relacionado à conversão de formas eritrocíticas a gametocíticas, alterar o balanço dos estados de silenciamento e ativação, resultando na conversão massiva para gametócitos, com consequências vitais para o parasito (CORTÉS et al., 2007).

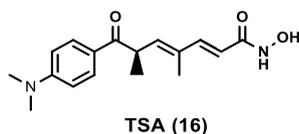
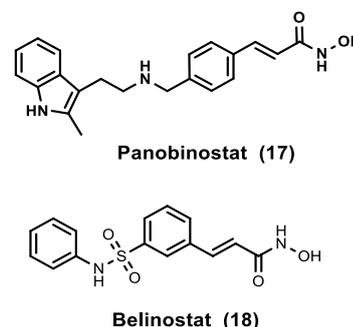
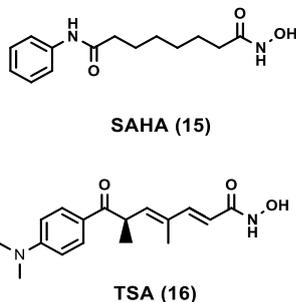
Os inibidores HDACs podem ser classificados por sua estrutura química como tetrapeptídeos cíclicos, ácidos alifáticos, benzamidas e ácidos hidroxâmicos (Figura 6). Para o estabelecimento de relações estrutura-atividade, os hidroxamatos têm sido mais estudados por possuírem atividade nas principais classes: HDAC I e HDAC II.

Figura 6: Exemplos de inibidores HDAC. Fonte: Próprio Autor

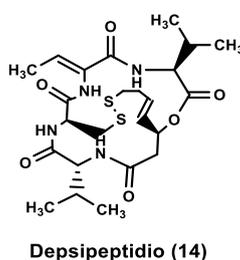
PEPTÍDEOS CÍCLICOS



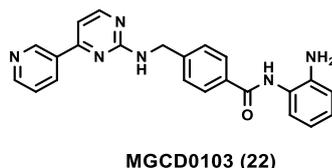
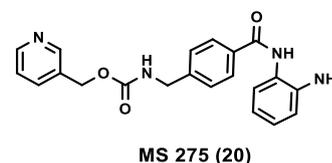
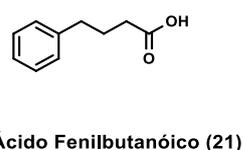
ÁCIDOS HIDROXÂMICOS



ÁCIDOS ALIFÁTICOS



BENZAMIDAS



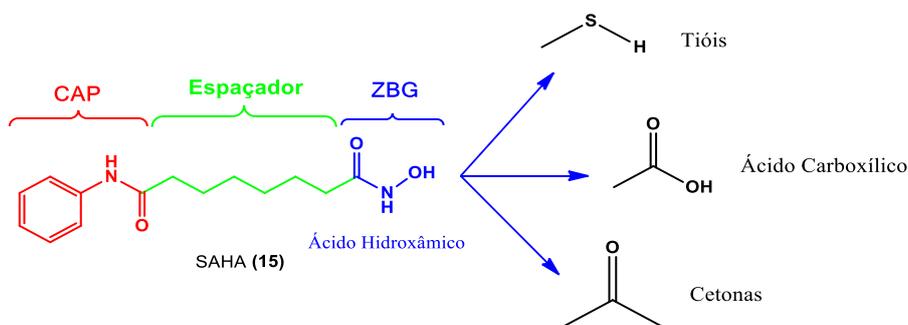
1.8.1. A estrutura química de inibidores de HDAC e alvo farmacológico

As HDACs das classes I e II apresentam o cátion bivalente de Zinco (Zn^{2+}) em seu sítio catalítico demonstrando dependência deste metal para seu mecanismo; enquanto as Sirtuinas (classe III), aparecem como NAD^+ dependentes (MUKHERJEE; PRADHAN; SHAH, 2008). Desta forma, alguns inibidores das classes I e II são caracterizados pela presença de grupos funcionais que interagem com zinco como tióis, ácidos carboxílicos, cetonas e ácidos hidroxâmicos, entre outros (VICKERS et al., 2012) (Figura 7). É importante ressaltar que esses grupos funcionais podem também atuar em outras metaloenzimas levando a perfis de toxicidade que devem ser monitorados desde o desenvolvimento dos compostos, bem como na utilização dos fármacos desta classe aprovados para terapias.

Estruturalmente os inibidores HDAC das classes I e II possuem três subunidades: o grupo de ligação ao átomo de zinco (GBZ); o espaçador que acomoda o acesso tubular do sítio ativo formado por grupos alquílicos (ESP) e o grupo de reconhecimento molecular (CAP) (Figura 7). Visando minimizar a toxicidade celular

tem-se buscado o desenvolvimento de inibidores enzimáticos seletivos por meio da variação do grupo CAP em compostos homólogos, explorando a variabilidade na superfície de cada HDAC que envolve o sítio ativo (CHEN et al., 2008). Neste sentido, Patil e colaboradores (2010) realizaram estudo de relação estrutura-atividade de inibidores HDAC derivados de ariltriazolilhidroxamatos por meio da substituição dos grupos CAP e espaçador por diferentes padrões a fim de aumentar sua atividade antiparasitária (PATIL et al., 2010). De maneira geral, compostos que contém o ácido hidroxâmico – presente na suberoilânilida (SAHA, **15**) – ou derivados como grupo ligante ao zinco demonstraram ser potentes inibidores HDAC e candidatos promissores ao tratamento antimalárico, ainda que apresentem certa toxicidade a células humanas (CHEN et al., 2008; DOW et al., 2008).

Figura 7: Estrutura de inibidores HDACs classe I e II e exemplos de ZBG. Fonte: Próprio Autor



1.9. Derivados do ácido hidroxâmico

O ácido hidroxâmico tem sido o grupo ligante de zinco mais estudado nos inibidores HDACs das classes I e II, cuja seletividade é modulada pelas outras subunidades – ESP e CAP. Na natureza, os derivados do ácido hidroxâmico são biossintetizados por micro-organismos (sideróforos) e plantas (benzoxazinoides). Sua ação terapêutica é explicada pela habilidade quelante conferida pela presença de dois átomos de oxigênio que lhe permite inibir metaloenzimas. Desta forma, estes derivados atuam como antimicrobianos, anti-inflamatórios e antitumorais. Apesar de suas características terapêuticas promissoras, os ácidos hidroxâmicos possuem baixa estabilidade *in vivo*, o que deve ser observado no desenvolvimento de novos compostos (BERTRAND et al., 2013).

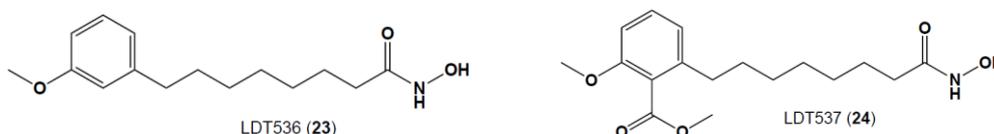
A tricostatina (TSA - **16**) – primeira substância natural a ser reconhecida como inibidor de HDAC – e o SAHA (**15**) apresentaram perfil inibitório em concentração

nanomolar, este último aprovado para o tratamento de linfoma pela FDA em 2006 (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012).

Estudos iniciais com SAHA (15) mostraram baixa seletividade *in vitro* em células infectadas por *P. falciparum* em comparação com células de mamíferos (*P. falciparum* CI_{50} 1,8 μ M). No entanto, trabalhos mais recentes evidenciaram atividade antimalárica com IC_{50} 100 nM, reiterando a relevância deste derivado (DOW et al., 2008) e levando ao desenvolvimento de novos inibidores de HDAC baseados na sua estrutura (ANDREWS et al., 2008; DOW et al., 2008). Nos novos planejamentos o papel do grupo CAP, responsável por interagir com a superfície da proteína na região imediatamente fora do sítio catalítico, tem sido explorado para diferenciar o reconhecimento pelas isoformas HDAC, dando maior seletividade à ação destes inibidores (BIELIAUSKAS; PFLUM, 2008).

Sob esta perspectiva, uma das linhas de pesquisa que envolve a utilização de compostos provenientes de fontes de baixo custo, biodegradáveis e disponíveis na natureza, como o caso do líquido da casca da castanha de caju tem sido explorada para no planejamento de novos inibidores HDAC. Neste sentido, derivados LDT536 (23) e LDT537 (24) – respectivamente obtidos a partir da mistura de cardanóis (26A-C) e de ácidos anacárdicos (25A-C) – apresentaram perfil inibitório Pan-HDAC como o SAHA (15) (Tabela 1) e valores de CI_{50} na faixa submicromolar para HDAC1 (LDT536 CI_{50} 0,32 μ M; LDT537 CI_{50} 0,77 μ M) e HDAC6 (LDT536 CI_{50} 0,19 μ M; LDT537 CI_{50} 0,22 μ M).

Tabela 1: Perfil inibitório de LDT536 (21) e LDT537 (22) frente a HDAC humanas

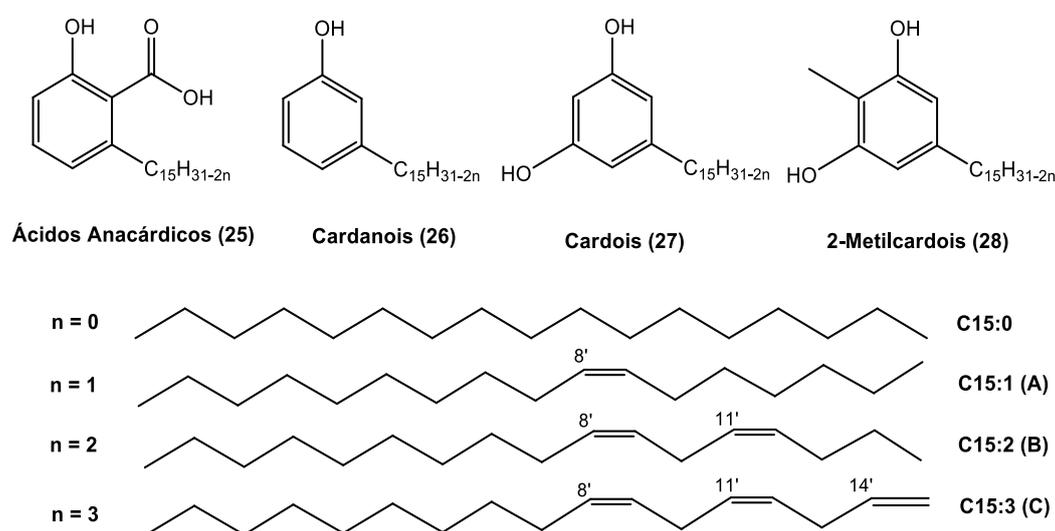


Derivado	Percentual de inibição (%) da atividade HDAC										
	HDAC 1	HDAC 2	HDAC 3	HDAC 4	HDAC 5	HDAC 6	HDAC 7	HDAC 8	HDAC 9	HDAC 10	HDAC 11
LDT536 (23)	90	85	89	6	37	99	9	83	9	80	42
LDT537 (24)	83	74	82	0	30	98	5	84	9	70	56

1.10. Derivados do líquido da casca da castanha de caju (LCC)

A casca da castanha de caju, fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L), possui em seu interior um líquido escuro, cáustico e inflamável chamado de líquido da casca da castanha do caju (LCC). O LCC é rico em lipídeos fenólicos não-isoprenoides como misturas de ácidos anacárdicos (**25**), cardanois (**26**), cardois (**27**) e 2-metilcardois (**28**) (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009) (Figura 8). Estes derivados têm sido utilizados em diferentes segmentos industriais. Biologicamente, os derivados do LCC têm apresentado atividade bactericida, fungicida, inseticidas bem como anticâncer, antioxidante e anti-inflamatória (LEMES et al., 2016).

Figura 8: Principais componentes do LCC



O LCC pode ser caracterizado como natural ou técnico a depender da técnica de extração utilizada. De acordo com Mazzetto e colaboradores (2009), diferentes processos podem ser empregados para a obtenção do LCC natural: extração a frio (prensas), extração por solvente, enquanto o processo térmico-mecânico (*hot oil process*), que é submetido a altas temperaturas (180°C), leva à descarboxilação da mistura de ácidos anacárdicos convertendo-as na mistura de cardanois, sendo denominado de LCC técnico (MAZZETTO et al, 2009). As porcentagens dos componentes fenólicos contidos nos LCC Natural e Técnico encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Composições químicas dos LCC Natural e Técnico. Fonte: Mazzetto e Lomonaco, 2009

Constituinte	LCC Natural	LCC Técnico
Ácidos Anacárdicos	71,70 – 82,00 %	1,09 – 1,75 %
Cardanois	1,60 – 9,20 %	67,82 – 94,60 %
Cardois	13,80 – 20,10 %	3,80 – 18,86 %
2-Metilcardois	1,65 – 3,90 %	1,20 – 4,10 %
Componentes Minoritários	2,20 %	3,05 – 3,98 %
Material Polimérico	----	0,34 – 21,63 %

A mistura de cardanois (**26A-C**), renovável e de baixo custo, possui características que a tornam fonte para o desenvolvimento de novos compostos que podem ser utilizados em diversos segmentos terapêuticos. Estruturalmente, os lipídeos fenólicos do cardanol apresentam, na posição *meta* ao grupo fenólico, cadeia lateral com quinze átomos de carbono e diferentes graus de instauração que confere características importantes quanto ao reconhecimento hidrofóbico por resíduos complementares em sítios ativos bem como a facilidade de transformações químicas (BALACHANDRAN et al., 2013; VASAPOLLO; MELE; DEL SOLE, 2011).

Em continuidade aos estudos preliminares de novos inibidores de HDAC planejados a partir dos lipídeos fenólicos do LCC – LDT536 (**23**) e LDT537 (**24**) – uma nova série de derivados foi delineada a partir da mistura de cardanois (**26A-C**) no âmbito da linha de pesquisa visa o planejamento, síntese e avaliação de novos inibidores de histona desacetilase a partir dos derivados do LCC.

Justificativa e Objetivos

2. JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença infecciosa que mata em média de 1 a 2 milhões de pessoas por ano onde a maioria são crianças com idade inferior a cinco anos. Não há atualmente nenhuma vacina eficaz que combata a doença e, apesar de alguns estudos terem mostrado resultados preliminares promissores, nenhuma solução para este problema é esperada para os próximos anos. Para além deste fato, a resistência tem sido documentada tanto para inseticidas quanto para os principais tratamentos disponíveis, sendo crescente a preocupação em desenvolver novas terapias que evitem o aumento da letalidade da doença no mundo.

Enzimas histonas desacetilases podem representar potenciais novos alvos para o desenvolvimento de medicamentos contra a malária. Estudos têm demonstrado que inibidores de HDAC possuem atividade anti-parasitária contra *P. falciparum* (CI₅₀ 10-200 nM), diminuindo a progressão do ciclo celular do parasito no hospedeiro e atuando na modulação da resposta imune do hospedeiro. De maneira geral, compostos que contém o ácido hidroxâmico – presente na suberoilanilida (SAHA) – ou derivados como grupo ligante ao zinco demonstraram ser potentes inibidores HDAC e candidatos promissores ao tratamento antimalárico, ainda que apresentem certa toxicidade a células humanas

Considerando que a mistura de cardanois pode ser funcionalizada com a mesma subunidade farmacofórica do SAHA, esta proposta visa o uso do componente majoritário do LCC técnico no planejamento racional de novos inibidores HDAC.

3. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo o uso da mistura de cardanois (**26A-C**) na obtenção de novos inibidores de histonas desacetilases candidatos ao tratamento da malária.

3.1. Objetivos Específicos

Compreenderam os objetivos específicos:

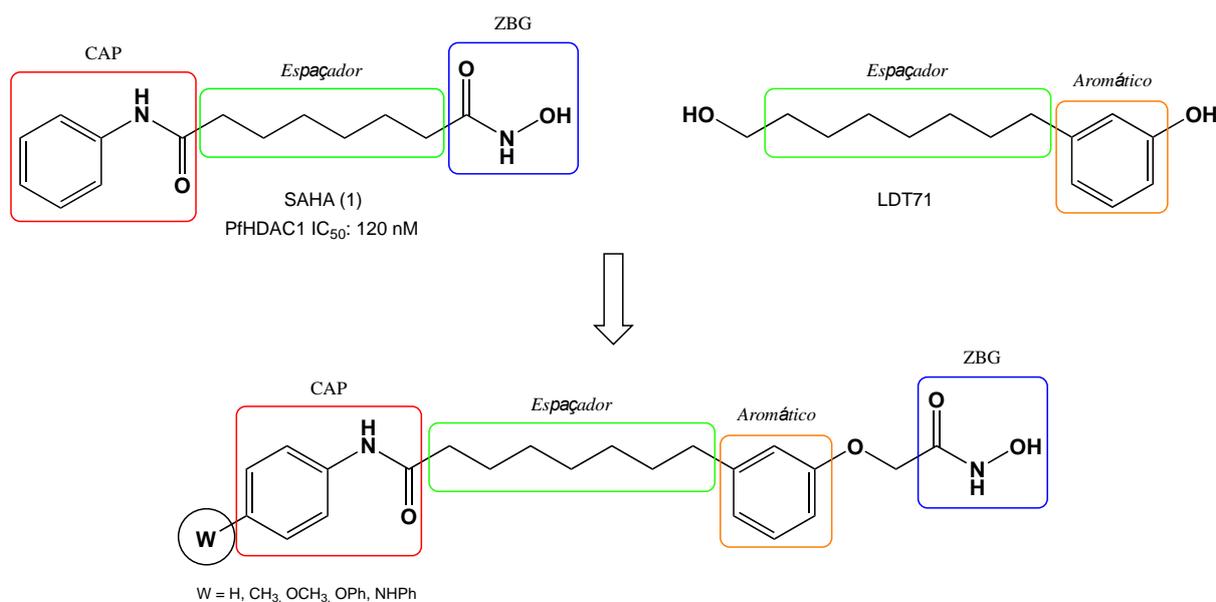
- Sintetizar e caracterizar intermediários e produtos finais a partir da mistura de cardanois;
- Avaliar o perfil de atividade frente a HDACs humanas
- Avaliar o perfil de atividade em cultivos de *Plasmodium falciparum*
- Determinar a citotoxicidade frente à linhagem celular BGM
- Estabelecer relações estruturas-atividade

Planejamento Estrutural

4. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Os novos compostos foram planejados a partir da estratégia de hibridação molecular entre o SAHA (**15**) e o LDT71 (**29**). Amidas aromáticas substituídas representam a subunidade CAP – variação que visa o estabelecimento de relações estrutura-atividade (REA) – enquanto que o grupo ZBG é composto pelo ácido hidroxâmico. O espaçador entre as subunidades CAP e ZBG, encontrado no SAHA, é composto por 8 unidades metilênicas característica dos derivados do LCC após clivagem oxidativa (Esquema 1). Os novos padrões moleculares visam a identificação de características estruturais relevantes para o perfil de atividade desta classe de compostos como uma nova alternativa terapêutica.

Esquema 1: Planejamento Estrutural de iHDACs



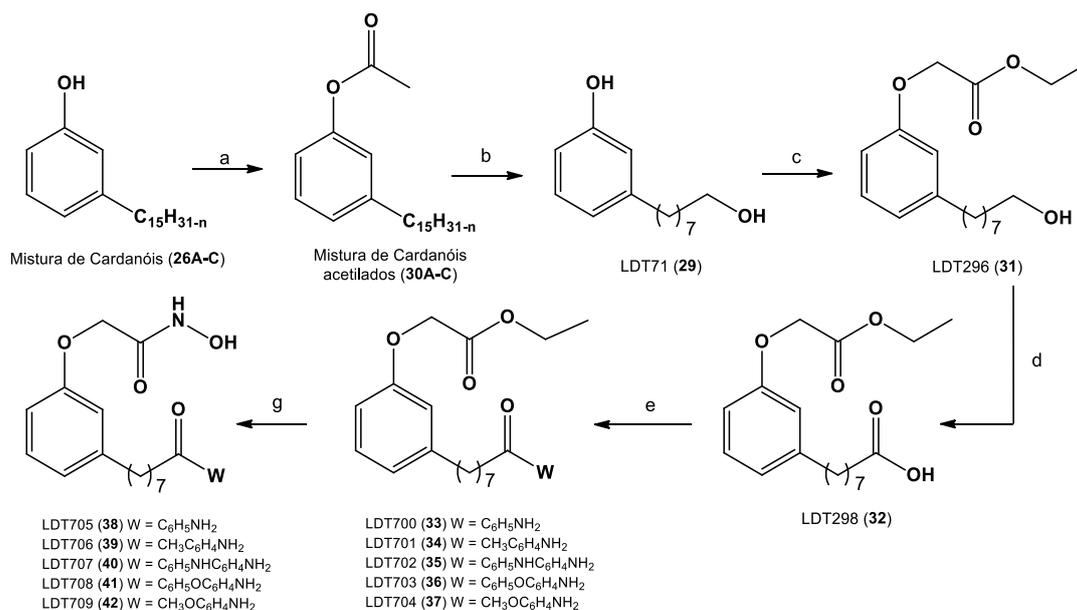
Estratégia Sintética

5. ESTRATÉGIA SINTÉTICA

A estratégia sintética para obtenção de intermediários e derivados-alvo foi concebida a partir da exploração de procedimentos clássicos como proteção de grupos funcionais, ozonólise seguida da redução com hidretos metálicos, conversão de grupos funcionais e reações de condensação.

Neste sentido, a mistura de cardanois (**26A-C**) foi acetilada a partir da mistura de anidrido acético e ácido fosfórico sob radiação micro-ondas. Em seguida, a mistura de cardanois acetilados (**30A-C**) foi submetida à reação ozonólise seguida de tratamento redutivo com borohidreto de sódio levando ao álcool intermediário LDT71 (**29**), o qual foi submetido à O-alkilação com bromoacetato de etila e carbonato de potássio gerando o intermediário LDT296 (**31**). **31** foi oxidado ao respectivo ácido carboxílico LDT298 (**32**), com reagente de Jones em acetona. O ácido **32** foi convertido em amidas pela reação com cloreto de tionila em hexano sob refluxo seguida da adição do cloreto de ácido formado a anilinas substituídas na presença de TEA em diclorometano seco. As amidas formadas (**33-37**) foram submetidas à reação com hidroxilamina em que os ésteres foram convertidos nos derivados-alvo (**38-42**) pela reação com hidroxilamina em metanol à temperatura ambiente por 24 horas seguida de refluxo por 10 horas. A estratégia sintética para obtenção dos derivados-alvo encontra-se no Esquema 2.

Esquema 2: Estratégia sintética para obtenção dos derivados-alvo



a: AC₂O/H₃PO₄, MO, 450W, 3 min; b: i. O₃/O₂, DCM/MeOH, -78°C, 80 minutos, ii. NaBH₄, MeOH/EtOH t.a., 16h; c: i. Acetona, K₂CO₃ t.a., 20 minutos ii. BrCH₂CO₂Et, t.a., 24h; d: Acetona, CrO₃/H₂SO₄, t.a. 30 minutos; e: i. SOCl₂, DMF, Hex, refluxo, 2hrs, ii. DCM, Amina, TEA, refluxo (35°C), 2hrs; g: i. NH₂OH HCl, KOH, MeOH, t.a., 48h, ii. refluxo 70°C, 10h.

Parte Experimental

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. *Materiais e Métodos*

Os procedimentos experimentais em Síntese Orgânica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER) da Universidade Católica de Brasília (UCB), e no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêutica (LDT) da Universidade de Brasília (UnB), no período entre janeiro de 2017 e janeiro de 2018.

Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA), Tedia® (EUA) e PanReac (Espanha). Trietilamina (TEA), tetraidrofurano (THF) e diclorometano (DCM) e anilina foram previamente secos com hidreto de cálcio e destilados antes do uso.

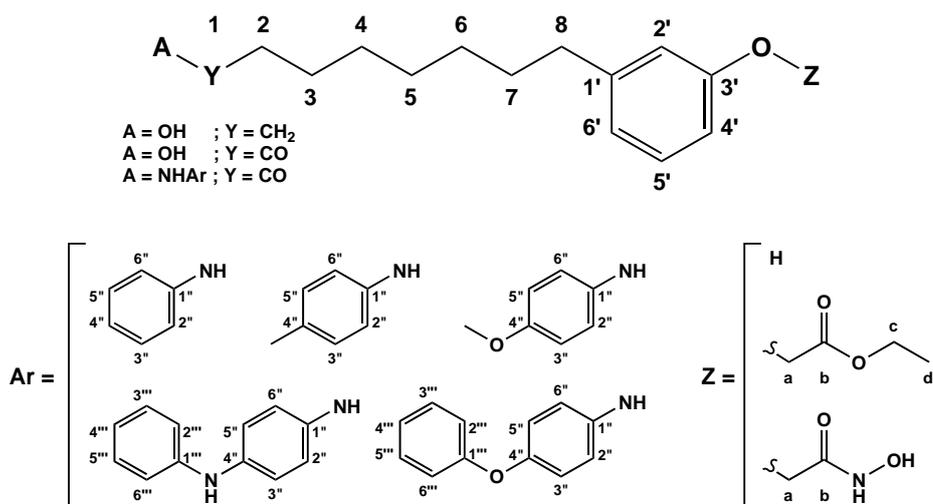
As reações foram realizadas sob agitação magnética, à temperatura ambiente ou em aquecimento em banho de óleo. Para as reações assistidas por radiação micro-ondas foi utilizado forno de micro-ondas doméstico Brastemp®, modelo BMK38ABHNA JetDeFrost com capacidade de 38 L e potência de 900 W, sem agitação magnética.

As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) por meio de cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de alumínio de Kieselgel 60 F254 com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) e visualizadas em lâmpada ultravioleta UV (254 nm) e reveladores – solução hidroalcoólica de cloreto férrico a 5% e iodo – o que permitiu o cálculo do fator de retenção (Rf) de cada substância. Para a purificação dos compostos foi utilizada cromatografia em coluna tendo como fase fixa gel de sílica G60 (70-230 mesh ou 230-400 mesh, SILICYCLE®) bem como por meio do sistema de cromatografia flash em equipamento Isolera Spektra Systems with ACI™ (Biotage®) em cartucho de sílica SNAP 10 g.

Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório Tecnal® TE-211, conectado a um sistema de alto-vácuo com pressão variando entre 10 e 0,1 mmHg. Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em aparelho digital de fusão MQAPF302.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H – 300 MHz ou 500 MHz) e de carbono 13 (RMN de ^{13}C – 75 MHz ou 125 MHz) foram obtidos em aparelho Bruker Avance DRX300 e DRX500 do Centro Nordestino de Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), utilizando CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de deslocamento químico (δ) são referidos em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: simpleto (s); sinal largo (sl); duplete (d); tripleto (t); quarteto (q) e multiplete (m). A **Figura 9** apresenta a estrutura Markush e numerações padronizadas visando facilitar a análise dos espectros.

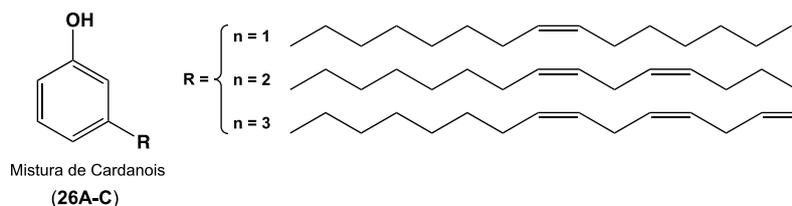
Figura 9: Numeração e legendas empregadas no assinalamento de sinais em RMN de ^1H e de ^{13}C . Fonte: Próprio autor.



6.1 Metodologia Sintética e Caracterização dos Compostos

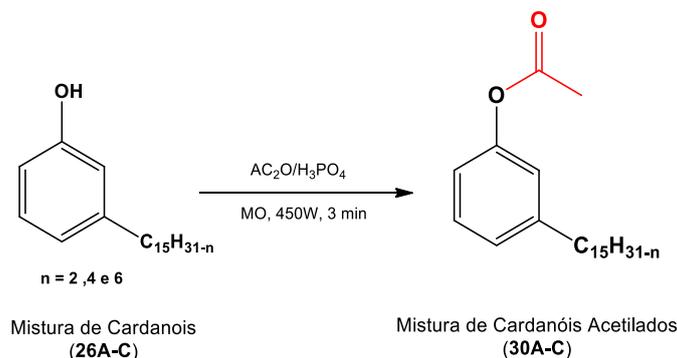
Os derivados e intermediários foram sintetizados a partir da mistura de cardanois (**26A-C**) fornecida pela Resibras Indústria de Castanhas.

6.1.1. Obtenção da Mistura de Cardanois a Partir do LCC Técnico (**26A-C**)



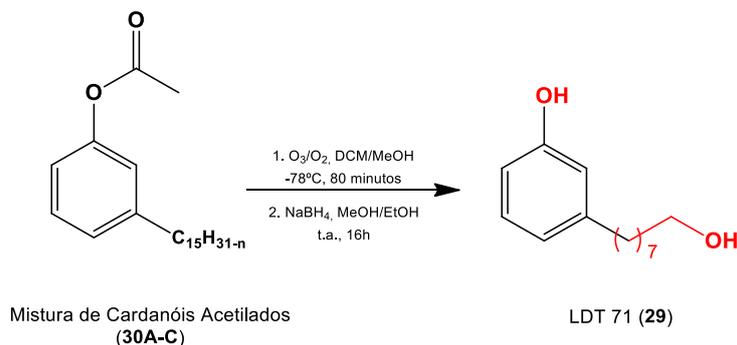
O LCC técnico foi purificado por coluna cromatográfica em gel de sílica eluída com mistura de hexanos fornecendo a misturas de cardanois em rendimento de 90% em relação à massa total aplicada.

6.1.2. Obtenção da Mistura Acetilada de Cardanois (**30A-C**)



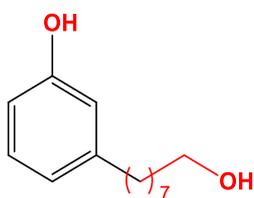
A um Erlenmeyer (125 mL) foram adicionados 2,00 g da mistura de cardanois (6,57 mmol), 1,25 mL de anidrido acético destilado (13,14 mmol) e ácido fosfórico (4 gotas). A mistura foi submetida a aquecimento em forno de micro-ondas convencional, durante 3 minutos (3 x 1') à potência de 450 W (50 %). Em seguida, a mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 10,0 mL) e as frações orgânicas reunidas lavadas com solução de bicarbonato de sódio a 5 % (10,0 mL), solução de ácido clorídrico a 10 % (10,0 mL), solução salina saturada (10,0 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida, a mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com diclorometano, fornecendo a mistura acetilada em rendimento de 90 %, a qual não foi caracterizada por RMN e utilizada para a próxima etapa.

6.1.3. Obtenção do Derivado 3-(8-Hidróxiocetil)fenol (LDT71, **29**)



A um balão para ozonólise (250 mL) foram adicionados 10,00 g (33,06 mmol) da mistura de cardanois acetilados, diclorometano (35,0 mL) e metanol (35,0 mL). O sistema reacional foi resfriado em banho de gelo seco/ acetona à temperatura de aproximadamente -70 °C e submetido a fluxo contínuo de ozônio (5 g/mL) em oxigênio por uma hora e vinte minutos (2 x 40'). Após o término do tempo estabelecido, o excesso de ozônio foi purgado com fluxo de nitrogênio, a solução transferida para Erlenmeyer de 1000 mL e, sob banho acetona/gelo seco, foram adicionados metanol (30,0 mL), etanol (30,0 mL) e 10 g de borohidreto de sódio (268,99 mmol), permanecendo a reação sob agitação magnética por 16 horas com evolução à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi acidificada com solução de ácido clorídrico concentrado a pH 3,0, o resíduo extraído com acetato de etila (3 x 20,0 mL) e as frações orgânicas reunidas lavadas com solução saturada de cloreto de sódio saturada (30,0 mL) e seca sob sulfato de sódio. Após a evaporação do solvente, o produto foi purificado em coluna com gel de sílica, eluída com diclorometano, clorofórmio e clorofórmio e etanol, levando ao derivado diidroxilado **29**.

8-(3-Hidróxifenil)octan-1-ol (LDT71, **29**)



Óleo Amarelado

Rendimento: 67 %

Rf: 0,2 (CHCl₃)

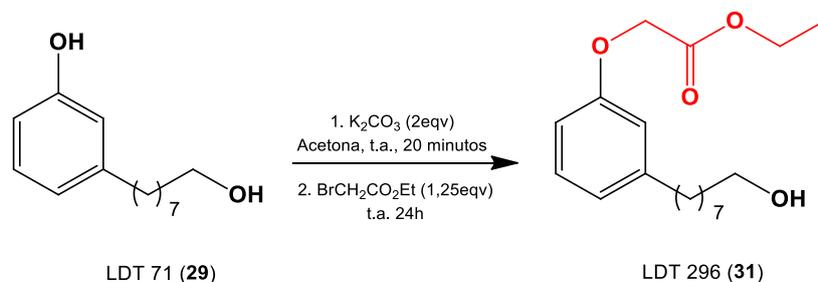
Fórmula Molecular: C₁₄H₂₂O₂

Massa Molar: 222,323 g/mol

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (sl, 8H, 3-6); 1,56-1,58 (m, 4H, 2 e 7); 2,53 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 8); 3,65 (t, J = 6,5 Hz, 2H, 1); 4,11 (sl, 2H, ArOH e CH₂OH); 6,66 (d, J = 8,3 Hz, 1H, 4'); 6,67 (s, 1H, 2'); 6,72 (d, J = 7,4 Hz, 1H, 6'); 7,12 (t, J = 7,6 Hz, 1H, 5').

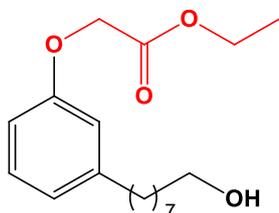
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 25,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,4⁵ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 6); 31,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 32,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 35,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 63,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1); 112,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 120,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 144,9 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 156,0 ($\underline{\text{C}}$, 3').

6.1.4. Obtenção do Derivado β -oxaéster LDT296 (**31**)



A um balão (50 mL) foram adicionados 1,25 g do derivado **29** (5,62 mmol), 1,55 g de carbonato de potássio (11,24 mmol) e acetona (25 mL) permanecendo a mistura sob agitação magnética por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, foram acrescentados 0,8 mL de bromoacetato de etila (7,03 mmol) e a reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente por mais 24 horas. Após certificação da formação do produto por CCD, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e o resíduo extraído com acetato de etila (3 x 10,0 mL). As frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução de HCl a 10 % (10,0 mL), solução de cloreto de sódio saturada (20,0 mL) e seca sob sulfato de sódio. Após a evaporação do solvente à pressão reduzida, o produto foi purificado em coluna com gel de sílica, eluída com mistura diclorometano-clorofórmio, levando ao derivado β -oxaéster **31**.

2-(3-(8-Hidróxiocetil)fenóxi) acetato de etila (LDT296, **31**)



Óleo Incolor

Rendimento: 70 %

Rf: 0,55 (CHCl_3 60 %: EtOH 40 %)

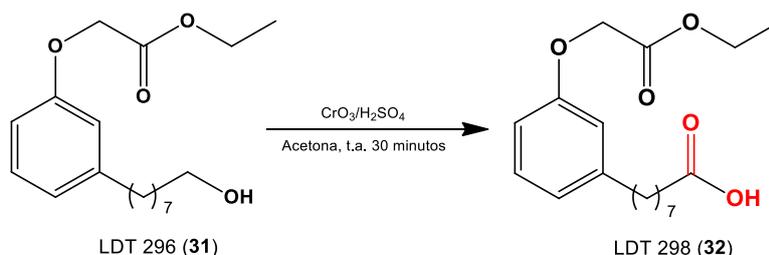
Fórmula Molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_4$

Massa Molar: 306,402 g/mol

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 1,30 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, **d**); 1,31 (sl, 8H, 3-6); 1,54-1,59 (m, 4H, 2 e 7); 2,57 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, 8); 3,61 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, 1); 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, **c**); 4,60 (s, 2H, **a**); 6,70 (dd, $J = 7,3$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 1H, 4'); 6,76 (sl, 1H, 2'); 6,81 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, 6'); 7,19 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, 5').

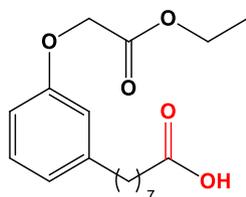
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 14,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, **d**); 25,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 6); 29,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4); 31,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 32,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 36,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 61,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **c**); 63,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1); 65,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 111,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 122,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 144,9 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 158,0 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 169,3 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, **b**).

6.1.5. Obtenção do Derivado Ácido LDT298 (**32**)



A um balão (50 mL) foram adicionados 1,50 g do derivado **31** (4,90 mmol), e acetona (20,0 mL). Sob banho de gelo, foi adicionado, gota a gota, o reagente de Jones (preparado através da solubilização de 10 g de cromo com 10 mL de ácido sulfúrico adicionados aos poucos sob agitação, vertidos posteriormente em água em outro béquer, também em agitação) até a reação permanecer na coloração castanha por cinco minutos, indicando o fim da reação. O excesso do reagente de Jones foi desativado pela adição de álcool isopropílico (1,0 mL) e a mistura extraída com clorofórmio (3 x 10,0 mL). As frações reunidas foram lavadas com solução de cloreto de sódio saturada (10,0 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida, os resíduos foram purificados em coluna de gel sílica eluída com diclorometano e mistura de diclorometano e clorofórmio, levando ao derivado-alvo ácido correspondente.

Ácido 8-(3-(carbetóximetóxi)fenil)octanóico (LDT298, **32**)



Óleo Amarelado

Rendimento: 83 %

Rf: 0,55 (CHCl_3 60 %: EtOH 40 %)

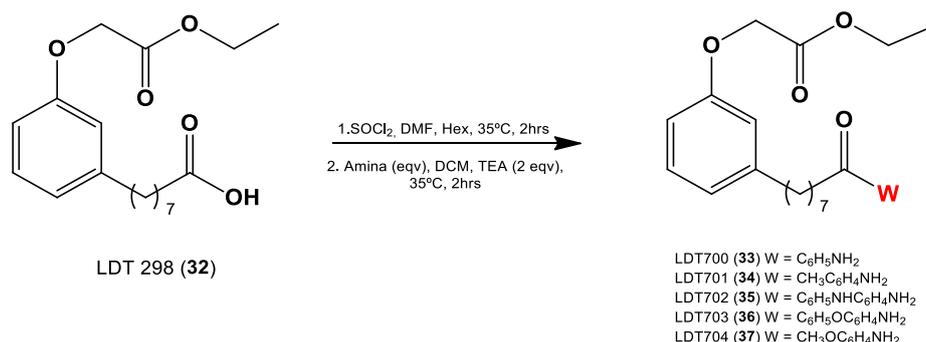
Fórmula Molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_5$

Massa Molar: 322,401 g/mol

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,30 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, **d**); 1,33 (m, 6H, 4-6); 1,61-1,63 (m, 4H, 3 e 7); 2,34 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 2); 2,58 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 8); 4,28 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, **c**); 4,61 (s, 2H, **a**); 6,72 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, 4'); 6,76 (s, 1H, 2'); 6,82 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 6'); 7,19 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5').

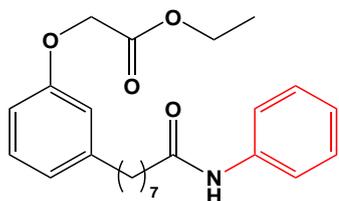
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 14,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, **d**); 24,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4); 29,2³ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 6); 31,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 34,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 36,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 61,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **c**); 65,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 111,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 122,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 144,8 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 158,1 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 169,3 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, **b**); 179,8 ($\underline{\text{C}}$, 1).

6.1.6. Procedimento Geral para Obtenção dos Derivados Amídicos (**33-37**)



Em um balão (10 mL) foram adicionados 0,40 g do derivado **32** (1,24 mmol), 3,7 mL de cloreto de tionila (51,00 mmol), 1 gota de DMF e hexano (5,0 mL), permanecendo a reação em agitação e sob refluxo em banho de óleo à temperatura de 35 °C por 2 horas. Em seguida, o excesso de cloreto de tionila e hexano foi destilado e o cloreto de ácido resultante foi diluído com diclorometano anidro (3,0 mL) e transferido, sob banho de gelo, a um balão (10 mL) contendo 2,48 mmol da respectiva amina (2 eqv), trietilamina (2 eqv) e diclorometano anidro (3,0 mL). A mistura foi então submetida a refluxo em banho de óleo a 35 °C por mais 2 horas. Após término do tempo previsto para reação, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e a mistura extraída com acetato de etila (3 x 5,0 mL). As frações orgânicas reunidas foram lavadas com bicarbonato de sódio 5% (5,0 mL), solução de HCl a 10 % (5,0 mL) e solução de cloreto de sódio saturada (10,0 mL). Após secagem sob sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, e o resíduo foi purificado em coluna de gel sílica eluída com clorofórmio e mistura de clorofórmio e etanol, levando aos derivado-avlos LDT700 (**33**), LDT701 (**34**), LDT702 (**35**), LDT703 (**36**) e LDT704 (**37**).

2-(3-(7-(Fenilcarbamoileptil)fenóxi)etanoato de etila (LDT700, **33**)



Sólido alaranjado

Rendimento: 52 %

Rf: 0,22 (CHCl₃ 99 %:EtOH 1 %)

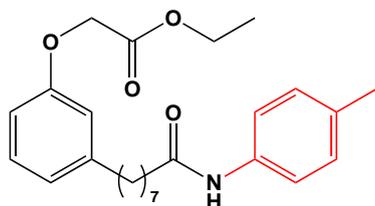
Fórmula Molecular: C₂₄H₃₁NO₄

Massa Molar: 397,455 g/mol

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (t, J = 7,1 Hz, 3H, **d**); 1,31 (m, 9H, 4-6); 1,59 (t, J = 6,5 Hz, 2H, 3); 1,68 (t, J = 6,5 Hz, 2H, 7); 2,31 (t, J = 7,4 Hz, 2H, 2); 2,55 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 8); 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 2H, **c**); 4,60 (s, 2H, **a**); 6,70 (d, J = 8,2 Hz, 1H, 4'); 6,74 (s, 1H, 2'); 6,80 (d, J = 7,5 Hz, 1H, 6'); 7,07 (t, J = 7,3 Hz, 1H, 4''); 7,18 (t, J = 7,8 Hz, 1H, 5'); 7,29 (t, J = 7,6 Hz, 2H, 3'' e 5''); 7,52 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2'' e 6'').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,3 (CH₃, **d**); 25,7 (CH₂, 3); 29,1 (CH₂, 5); 29,2⁸ (CH₂, 4); 29,3 (CH₂, 6); 31,3 (CH₂, 7); 36,0 (CH₂, 8); 37,8 (CH₂, 2); 61,5 (CH₂, **c**); 65,6 (CH₂, **a**); 111,6 (CH, 4'); 115,3 (CH, 2'); 120,0 (CH, 6'); 122,2 (2CH, 2'' e 6''); 124,2 (CH, 4''); 129,1 (2CH, 3'' e 5''); 129,4 (CH, 5'); 138,3 (C, 1''); 144,8 (C, 1'); 158,0 (C, 3'); 169,3 (CO₂CH₂CH₃, **b**); 171,8 (CONH, 1).

2-(3-(7-(4-Metilfenilcarbamoil)heptil)fenóxi)etanoato de etila (LDT701, **34**)



Sólido marrom

Rendimento: 31 %

Rf: 0,26 (CHCl₃ 99 %:EtOH 1 %)

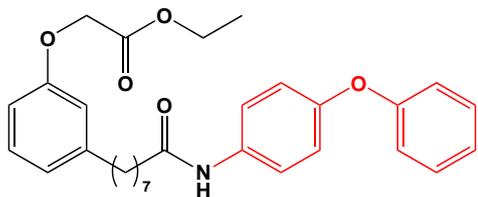
Fórmula Molecular: C₂₅H₃₃NO₄

Massa Molar: 412,544 g/mol

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (t, J = 7,2 Hz, 3H, **d**); 1,34 (sl, 2H, 4-6); 1,60 (sl, 2H, 3); 1,70-1,74 (m, 2H, 7); 2,31-2,33 (m, 5H, 2 e ArCH₃); 2,57 (t, J = 7,4 Hz, 2H, 8); 4,28 (q, J = 7,1 Hz, 2H, **c**); 4,61 (s, 2H, **a**); 6,71 (d, J = 8,0 Hz, 1H, 4'); 6,75 (s, 1H, 2'); 6,81 (d, J = 7,4 Hz, 1H, 6'); 7,11 (t, J = 7,8 Hz, 1H, 3'' e 5''); 7,18 (t, J = 7,8 Hz, 1H, 5'); 7,40 (d, J = 7,9 Hz, 2H, 2'' e 6'')

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,4 (CH₃, **d**); 21,0 (CH₃, ArCH₃); 25,8 (CH₂, 3); 29,2 (CH₂, 5); 29,3 (CH₂, 4); 29,3⁴ (CH₂, 6); 31,3 (CH₂, 7); 36,0 (CH₂, 8); 37,9 (CH₂, 2); 61,5 (CH₂, **c**); 65,7 (CH₂, **a**); 111,7 (CH, 4'); 115,3 (CH, 2'); 120,1 (CH, 6'); 122,2 (2CH, 2'' e 6''); 129,4 (CH, 5'); 129,6 (2CH, 3'' e 5''); 133,7 (C, 4''); 135,5 (C, 1''); 144,7 (C, 1'); 157,9 (C, 3'); 169,2 (CO₂CH₂CH₃, **b**); 171,3 (CONH, 1).

2-(3-(7-(4-Fenilaminofenilcarbamoil)heptil)fenóxi)etanoato de etila (LDT702, **35**)



Sólido marrom

Rendimento: 30 %

Rf: 0,24 (CHCl₃ 99 %:EtOH 1 %)

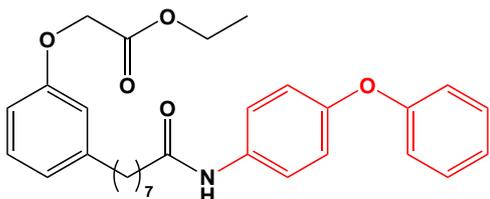
Fórmula Molecular: C₃₀H₃₆N₂O₄

Massa Molar: 489,634 g/mol

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,30 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, **d**); 1,34 (sl, 2H, 4-6); 1,60 (sl, 2H, 3); 1,71 (sl, 2H, 7); 2,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, 2); 2,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, 8); 4,28 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, **c**); 4,61 (s, 2H, **a**); 6,71 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, 4'); 6,76 (s, 1H, 2'); 6,82 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 6'); 6,91 (sl, 1H, 4'''); 7,03 (sl, 4H, 3'', 5'', 2''' e 6'''); 7,19 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, 5'); 7,25 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, 3''' e 5'''); 7,40 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, 2'' e 6'')

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,4 (CH₃, **d**); 25,8 (CH₂, 3); 29,2 (CH₂, 5); 29,3 (2CH₂, 4 e 6); 31,3 (CH₂, 7); 36,0 (CH₂, 2); 37,8 (CH₂, 8); 61,5 (CH₂, **c**); 65,7 (CH₂, **a**); 111,7 (CH, 4'); 115,3 (CH, 2'); 117,5 (2CH, 3'' e 5''); 119,4 (2CH, 2''' e 6'''); 121,1 (CH, 4'''); 121,7 (2CH, 2'' e 6''); 122,2 (CH, 6'); 129,5 (CH, 5'); 129,6 (2CH, 3''' e 5'''); 132,2 (C, 4''); 139,0 (C, 1''); 143,0 (C, 1'''); 144,8 (C, 1'); 158,1 (C, 3'); 169,4 (CO₂CH₂CH₃, **b**); 171,5 (CONH, 1).

2-(3-(7-(4-Fenóxifenilcarbamoil)heptil)fenóxi)etanoato de etila (LDT703, **36**)



Sólido marrom

Rendimento: 41 %

Rf: 0,2 (CHCl₃ 99 %:EtOH 1 %)

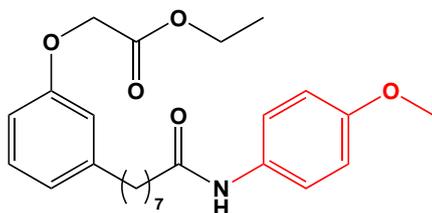
Fórmula Molecular: C₃₀H₃₅NO₅

Massa Molar: 490,614 g/mol

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,31 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, **d**); 1,35 (sl, 2H, 4-6); 1,60 (sl, 2H, 3); 1,71 (sl, 2H, 7); 1,85 (sl, 1H, NH); 2,34 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 2); 2,56 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, 8); 4,28 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, **c**); 4,61 (s, 2H, **a**); 6,71 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, 4'); 6,76 (s, 1H, 2'); 6,82 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, 6'); 6,98 (d, *J* = 8,3 Hz, 4H, 3'', 5'', 2''' e 6'''); 7,08 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, 4'''); 7,19 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, 5'); 7,32 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H, 3''' e 5'''); 7,49 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, 2'' e 6'')

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 14,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, **d**); 25,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,3 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4 e 6); 31,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 36,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 37,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 61,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **c**); 65,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 111,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 118,6 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 3'' e 5''); 119,8 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 2''' e 6'''); 121,8 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'' e 6''); 122,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 123,2 (CH , 4'''); 129,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 129,9 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 3''' e 5'''); 133,8 ($\underline{\text{C}}$, 1''); 144,8 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 153,5 ($\underline{\text{C}}$, 4''); 157,8 ($\underline{\text{C}}$, 1'''); 158,0 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 169,3 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, **b**); 171,8 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, 1).

2-(3-(7-(4-Metóxiifenilcarbamoil)heptil)fenóxi)etanoato de etila (LDT704, **37**)



Sólido marrom

Rendimento: 62 %

Rf: 0,26 (CHCl_3 99 %:EtOH 1 %)

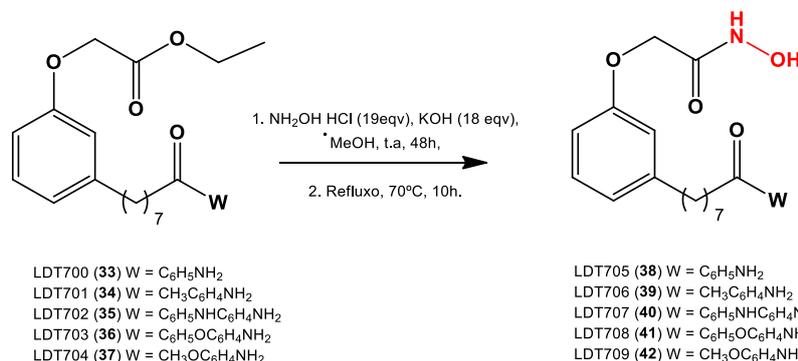
Fórmula Molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NO}_5$

Massa Molar: 428,544 g/mol

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,30 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, **d**); 1,34 (sl, 2H, 4-6); 1,58 (sl, 2H, 3); 1,69 (sl, 2H, 7); 2,30 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 2); 2,56 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, 8); 3,77 (s, 3H, OCH_3); 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, **c**); 4,60 (s, 2H, **a**); 6,70 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, 4'); 6,74 (s, 1H, 2'); 6,81 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, 6'); 6,83 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, 3'' e 5''); 7,18 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5'); 7,41 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, 2'' e 6'')

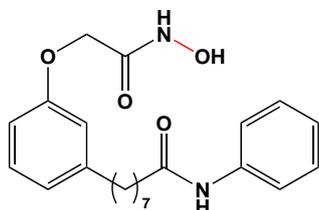
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 14,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, **d**); 25,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,3 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4 e 6); 31,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 36,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 37,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 55,6 (OCH_3); 61,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **c**); 65,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 111,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 114,3 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 3'' e 5''); 115,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 121,9 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'' e 6''); 122,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 131,4 ($\underline{\text{C}}$, 1''); 144,7 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 156,5 ($\underline{\text{C}}$, 4''); 158,0 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 169,3 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, **b**); 171,6 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, 1).

6.1.7. Procedimento Geral para Obtenção dos Derivados Hidroxâmicos (38-42)



A um balão de 10 mL em banho de gelo foram adicionados 1,00 g (17,82 mmol) de hidróxido de potássio e metanol (3,0 mL) que permaneceu sob agitação magnética até completa solubilização. Em seguida foram adicionados 1,25 g (17,99 mmol) de cloridrato de hidroxilamina e a reação de neutralização permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente a mistura foi filtrada para outro balão de 10 mL que continha 0,20 g do respectivo éster (~0,41 a 0,50 mmol), 0,07 g de cloridrato de hidroxilamina (1,00 mmol) e metanol (1,0 mL). A mistura foi submetida à agitação magnética vigorosa à temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, as reações incompletas identificadas por placa CCD foram submetidas a refluxo por 10 horas. Em seguida o solvente foi evaporado à pressão reduzida, o resíduo extraído com acetato de etila (3 x 5,0 mL) e a fase orgânica lavada com soluções de HCl a 10 % (5,0 mL), saturada de cloreto de sódio (4,0 mL) e seca em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e o produto purificado em coluna de gel de sílica, eluída em clorofórmio e gradiente de mistura de clorofórmio e etanol (1 % a 3 %).

N-Hidróxi-2-(3-(7-(fenilcarbamioleptil)fenóxi)etanamida (LDT705, 38)

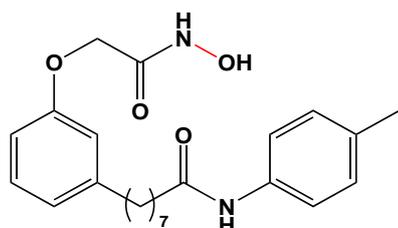


Rendimento: 43 %
Rf: 0,9 (CHCl_3 97 %:EtOH 3 %)
Fórmula Molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$
Massa Molar: 385,485 g/mol

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,30 (sl, 7H, 4-6); 1,56 (t, $J = 6,2$ Hz, 4H, 3 e 7); 2,28 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 2); 2,52 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 8); 4,43 (s, 2H, a); 6,74 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, 4'); 6,78 (sl, 2H, 2' e 6'); 7,00 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 4''); 7,17 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, 5'); 7,27 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, 3'' e 5''); 7,58 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, 2'' e 6''); 8,98 (s, 1H, CONHOH); 9,86 (s, 1H, CONH); 10,79 (s, 1H, CONHOH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 25,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$,5); 29,1 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4 e 6); 31,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 35,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 36,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 66,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 112,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 119,5 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'' e 6''); 121,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 123,4 (CH , 4''); 129,1 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 3'' e 5''); 129,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 139,8 ($\underline{\text{C}}$, 1''); 144,4 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 158,3 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 164,8 (CONHOH, **b**); 171,7 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, 1).

N-Hidr3xi-2-(3-(7-(4-metilfenilcarbamoil)heptil)fen3xi)etanamida (LDT706, 39)



Rendimento: 40 %

Rf: 0,9(CHCl_3 97 %:EtOH 3 %)

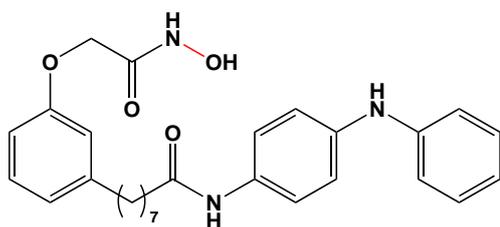
F3rmula Molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$

Massa Molar: 399,505g/mol

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,23-1,30 (sl, 7H, 4-6); 1,55-1,56 (m, 4H, 3 e 7); 2,23 (s, 3H, Ar CH_3); 2,25 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 2); 2,52 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 8); 4,42 (s, 2H, **a**); 6,74 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, 4'); 6,78 (sl, 2H, 2' e 6''); 7,07 (d, $J = 8,0$ Hz, , 2H, 3'' e 5''); 7,17 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5'); 7,46 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, 2'' e 6''); 8,96 (s, 1H, CONHOH); 9,74 (s, 1H, CONH); 10,79 (s, 1H, CONHOH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 20,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, Ar CH_3); 25,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$,5); 29,1 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4 e 6); 31,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 35,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 36,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 66,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 112,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 119,5 (2 $\underline{\text{C}}\text{H}$, 3'' e 5''); 121,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 123,4 (CH , 4''); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'' e 6''); 129,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 132,2 ($\underline{\text{C}}$, 4''); 137,3 ($\underline{\text{C}}$, 1''); 144,4 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 158,3 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 164,8 (CONHOH, **b**); 171,5 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, 1).

N-Hidr3xi-2-(3-(7-(4-fenilaminofenilcarbamoil)heptil)fen3xi)etanamida (LDT707, 40)



Rendimento: 52 %

Rf: 0,8 (CHCl_3 97 %:EtOH 3 %)

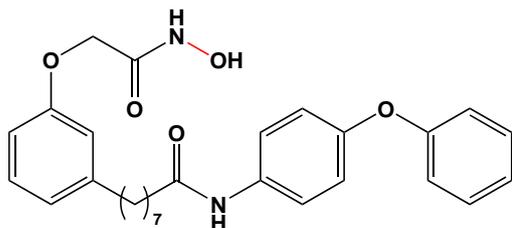
F3rmula Molecular: $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$

Massa Molar: 476,596 g/mol

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,22-1,30 (sl, 7H, 4-6); 1,55 (sl, 4H, 3 e 7); 2,25 (s, 2H, 2); 2,50 (s, 2H, 8); 4,42 (s, 2H, **a**); 6,73 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H, 4'); 6,78 (sl, 2H, 2' e 6''); 6,97-7,01 (m, 5H, 3'', 5'', 2''', 4''' e 6'''); 7,17 (sl, 3H, 5', 3''' e 5'''); 7,46 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, 2'' e 6''); 8,02 (s, 1H, CONHOH); 9,75 (s, 1H, CONH); 10,84 (s, 1H, CONHOH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 25,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,1 ($3\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4, 5 e 6); 31,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 35,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 36,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 66,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 112,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 115,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 116,1 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 3'' e 5''); 118,4 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 2''' e 6'''); 119,3 (CH , 4'''); 120,8 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'' e 6''); 121,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,6 ($3\underline{\text{C}}\text{H}$, 5', 3''' e 5'''); 132,2 ($\underline{\text{C}}$, 4''); 138,9 ($\underline{\text{C}}$, 1''); 144,4 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 158,3 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 164,8 (CONHOH , **b**); 171,1 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, 1).

N-Hidróxi-2-(3-(7-(4-fenóxi)fenilcarbamoil)heptil)fenóxi)etanamida (LDT708, **41**)



Rendimento: 47 %

Rf: 0,9 (CHCl_3 97 %:EtOH 3 %)

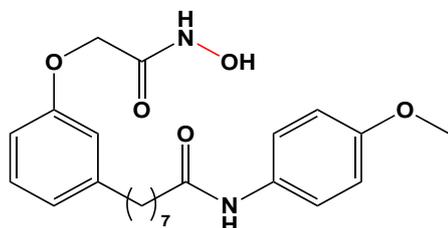
Fórmula Molecular: $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$

Massa Molar: 477,575 g/mol

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,23-1,30 (sl, 7H, 4-6); 1,56-1,58 (m, 4H, 3 e 7); 2,28 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, 2); 2,53 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, 8); 4,43 (s, 2H, **a**); 6,75 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H, 4'); 6,79 (s, 1H, 2'); 6,94 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H, 6'); 6,97 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, 3'', 5'', 2''' e 6'''); 7,08 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 4'''); 7,17 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, 5'); 7,35 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H, 3''' e 5'''); 7,61 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, 2'' e 6''); 8,98 (s, 1H, CONHOH); 9,90 (s, 1H, CONH); 10,81 (s, 1H, CONHOH).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 25,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 28,5⁷ ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,6 ($2\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4 e 6); 30,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 35,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 36,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 65,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, **a**); 111,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 114,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 117,8 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 3'' e 5''); 119,4 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 2''' e 6'''); 120,7 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'' e 6''); 121,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 122,9 (CH , 4'''); 129,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 129,9 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 3''' e 5'''); 135,3 ($\underline{\text{C}}$, 1''); 143,9 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 151,4 ($\underline{\text{C}}$, 4''); 157,5 ($\underline{\text{C}}$, 1'''); 157,8 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 164,4 (CONHOH , **b**); 171,0 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, 1).

N-Hidróxi-2-(3-(7-(4-metóxi)fenilcarbamoil)heptil)fenóxi)etanamida (LDT709, **42**)



Rendimento: 52 %

Rf: 0,7 (CHCl_3 97 %:EtOH 3 %)

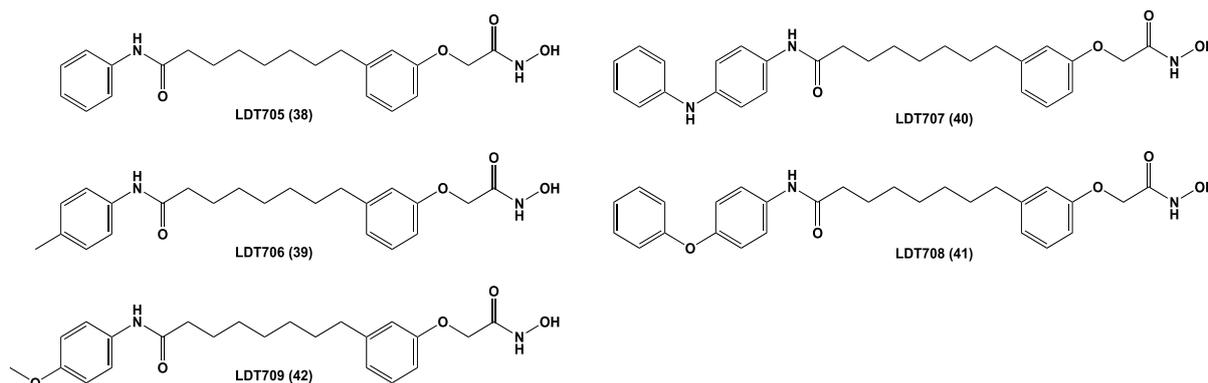
Fórmula Molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$

Massa Molar: 415,505 g/mol

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 1,30 (sl, 7H, 4-6); 1,55-1,56 (m, 4H, 3 e 7); 2,24 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, 2); 2,52 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, 8); 3,70 (s, 3H, OCH_3); 4,42 (s, 2H, **a**); 6,74 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, 4'); 6,78 (s, 1H, 2'); 6,81 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, 6'); 6,85 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 3'' e 5''); 7,17 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 5'); 7,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2'' e 6''); 9,70 (s, 1H, CONH);

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 25,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3); 29,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 5); 29,1 ($2\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 4 e 6); 31,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7); 35,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 8); 36,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2); 55,6 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 66,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, a); 112,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4'); 114,2 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 3'' e 5''); 115,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'); 121,0 ($2\underline{\text{C}}\text{H}$, 2'' e 6''); 121,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6'); 129,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5'); 133,0 ($\underline{\text{C}}$, 1''); 144,4 ($\underline{\text{C}}$, 1'); 155,4 ($\underline{\text{C}}$, 4''); 158,3 ($\underline{\text{C}}$, 3'); 164,8 (CONHOH , b); 171,2 ($\underline{\text{C}}\text{ONH}$, 1).

Figura 10: Derivados-alvo planejados a partir da mistura de cardanois. Fonte: Próprio autor.



6.2. Avaliação Biológica *in vitro*

6.2.1. Perfil de atividade frente a histona desacetilase humanas

Os testes para determinação da atividade inibitória frente a HDACs humanas das classes I (1, 2, 3 e 8), II (4, 5, 6, 7, 9 e 10) e IV (11) foram realizados pela Reaction Biology Corporation (RBC).

Os derivados-alvo foram previamente diluídos em DMSO para concentração de 10 mM e testados a 10 μM em duplicata contra 11 HDACs (1 -11). Para HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6 e HDAC10 foram utilizados o substrato peptídico fluorogênico dos resíduos 379 a 382 (RHKK(Ac)AMC) de células p53 e o mesmo resíduo diacetilado (RHK(Ac)K(Ac)AMC) para HDAC8. Para HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 e HDAC11 foi utilizada Lisina trifluoroacetilada. A Tricostatina A (TSA) foi utilizada como composto de referência em dose de 10 vezes o CI_{50} calculado por meio do programa GraphPad Prism 4 com diluição seriada em três vezes começando a 10 μM .

6.2.2. Perfil de atividade em culturas de *Plasmodium falciparum*

Os estudos do perfil antimalárico em culturas de *Plasmodium falciparum* bem como atividade citotóxica frente a linhagem celular BGM e índice de seletividade foram realizados pela Dra. Júlia Penna Coutinho do Laboratório de Malária Experimental e Humana do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) sob supervisão da Dra. Antoniana Ursine Krettli. Infelizmente os protocolos desenvolvidos não foram encaminhados pelas pesquisadoras que recomendaram a utilização dos publicados nas teses de Coutinho (2015) e Souza (2015) descritos a seguir.

6.2.3. Solubilização dos compostos

Os derivados-alvos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) na concentração final de até 0,02%. O antimalárico controle, CQ, bem como os compostos utilizados no teste de citotoxicidade *in vitro*, foram diluídos em meio de cultura RPMI (Sigma- Aldrich) incompleto [RPMI 1640 suplementado com 25 mM de Hepes (Sigma-Aldrich), 21 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 11mM de glicose (Sigma-Aldrich) e 40 µg/mL de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, EUA)]. As soluções-teste foram preparadas no dia da realização dos experimentos.

6.2.4. Testes *in vitro* com formas sanguíneas do *P. falciparum*

6.2.4.1. Cultivo contínuo das fases intraeritrocitárias de *P. falciparum*

Os parasitos da cepa 3D7 (sensível à CQ), originalmente recebidos da New York University Medical School e do clone W2 (resistente à CQ) (ODUOLA et al., 1988) foram cultivados em hemácias humanas A+ sob condições estabelecidas por Trager & Jensen (1976), com pequenas modificações, utilizando protocolo previamente padronizado no Laboratório de Malária do CPqRR (ANDRADE-NETO et al., 2004). Os parasitos foram cultivados em placas de petri (Corning, Santa Clara, CA, EUA), com hematócrito a 5 %, em meio de cultura RPMI suplementado com 10 % (v/v) de soro humano A+ inativado. As placas foram mantidas em dessecadores a 37 °C, nos quais a concentração adequada de oxigênio foi obtida pela combustão de uma vela. Diariamente, foram realizadas trocas do meio de cultura e a parasitemia monitorada

em esfregaços, fixados com metanol, corados com Giemsa e visualizados em microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x).

Os cultivos com predomínio de anéis, utilizados nos ensaios de quimioterapia, foram sincronizados conforme descrito por Lambros & Vanderberg (1979). Resumidamente, o meio de cultura foi retirado da placa de Petri e 10 mL de uma solução de sorbitol 5 % e glicose 0,5 % foram adicionados ao sedimento contendo o sangue parasitado. O conteúdo foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL, incubado a 37 °C por 10 min e centrifugado por 5 min, 70 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspendido com meio RPMI completo, ajustando o hematócrito para 5 %. Essa solução foi novamente transferida para uma placa de Petri, e deixada em repouso por aproximadamente 10 min para que as hemácias sedimentassem, quando foi realizado esfregaço para determinação da parasitemia. O hematócrito e a parasitemia foram ajustados com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas para o teste.

Esfregaços sanguíneos de cultivos de *P. falciparum*, secos ao ar e fixados com metanol, foram corados com solução de Giemsa na proporção de quatro gotas por mL de solução salina tamponada pH 6,8. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x). A parasitemia foi determinada pela estimativa do número total de hemácias por campo microscópico sendo contados os parasitos em 50 a 100 campos; e expressa em porcentagem de hemácias parasitadas.

6.2.4.2. *Ensaio da atividade cistostática*

Os experimentos para a avaliação da atividade citostática frente a *P. falciparum* dos derivados **38-42** foram realizados de acordo com Paguio et al (2011). As diluições seriadas foram realizadas em meio completo e alíquotas de 100 µL foram transferidas para placas de 96 poços com fundo em U. Após adição dos parasitos (2% de parasitemia e 2% de hematócrito, 100 µL), as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % O₂/5 % CO₂/90 % N₂. Para o teste citocida, após 6 h de incubação, as placas foram lavadas três vezes (700 x g por 3 min) para remover o meio contendo os derivados-alvo. O sedimento foi ressuspendido em 200 µL de meio completo e a placa foi reincubada por pelo menos 48 h. O teste citostático foi realizado em paralelo, no qual os parasitos foram mantidos em contato contínuo com **38-42** em concentração

pelo menos 20 vezes menor que as utilizadas no teste citocida. Esta placa também foi incubada por 48 h a 50 h. Finalizado o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 700 x g por 5 min a temperatura ambiente para remoção do meio, lavadas com PBS 1X e incubadas por 30 min com solução de tampão de lise [2,4228 g de TRIS ultra puro (para solução de 20 mM), pH 7.5; 1,8612 g de EDTA 5 mM ultra puro (para solução de 5 mM); 80 µg de Saponina (0,008% p/v); 800 µL de Triton X-100 (0,08% v/v); água Tipo I] e SYBR Safe DNA stain (1:5000). A fluorescência de hemácias não infectadas foi considerada como background. A fluorescência foi medida em fluorímetro (Synergy H4, Biotek) a 485/535 nm.

As CI_{50} – concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitos – foram determinadas pela comparação entre o crescimento dos parasitos na ausência dos compostos-teste, considerado representativo de 100% de crescimento, com o crescimento na presença dos compostos-teste. Curvas dose-resposta foram geradas utilizando o programa Microcal Origin Software 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), possibilitando a determinação do valor de CI_{50} para cada composto-teste. A cloroquina foi utilizada como controle em ambos os testes.

6.2.5 Ensaios in vitro de citotoxicidade

6.2.5.1 Cultivo de células

A linhagem celular BGM, células de rim de macaco, foram doada pela Universidade Federal de Minas Gerais. As células foram cultivadas como recomendado (CALVO-CALLE et al., 1994). As células congeladas (-70 °C) foram descongeladas a 37 °C e seu conteúdo transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL contendo RPMI incompleto e então centrifugadas à temperatura ambiente a 80 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado com 5 % de Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough). As células foram transferidas para garrafas de cultura de 75 cm² (Corning) e mantidas em estufa com 5 % de CO₂, 95 % de umidade e 37 °C. O meio das garrafas foi substituído a cada dois dias. Após confluência de 80 %, a cultura de células foi repicada, ou utilizada na realização de ensaios de citotoxicidade. Quando necessário, o congelamento foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo 95 % de SBF e 5% de DMSO.

6.2.5.2 *Ensaio de citotoxicidade*

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicatas, conforme descrito por Madureira e colaboradores, (2002). Anteriormente à tripsinização, a garrafa de cultura de células foi lavada com meio sem SBF, tripsinizadas utilizando-se 1 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25 % (Gibco/Invitrogen) e incubadas a 37 °C por 3 min para que as células se descolassem da garrafa. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 10 mL de meio completo, que foi centrifugado a 80 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em meio completo com 5 % SBF. Após contagem, as células foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4x10⁵ células/100 µL/poço) e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 24 h para que as células se aderissem à placa. Em seguida, 100 µL de meio completo contendo diferentes concentrações dos compostos foram adicionados aos poços e as placas incubadas por 24 h a 37 °C, 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. Ao final deste período, 20 µL de uma solução de brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma- Aldrich), sal tetrazólico, na concentração de 5 mg/mL e ressuspensionado em RPMI sem vermelho de fenol, foram adicionados aos poços da placa (Denizot & Lang, 1986). Após 4 h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan, presentes no fundo da placa, na coloração púrpura, foram diluídos em uma solução de DMSO (100 µL/poço). As microplacas foram lidas em um leitor de ELISA, utilizando-se filtro de 570 nm e filtro diferencial de 630 nm. A concentração letal para 50 % das células (DLM₅₀), na presença dos compostos-testes e do antimalárico controle, foi determinada quando comparada à célula cultivada sem a presença de compostos (considerada 100 % de viabilidade).

6.2.6 *Índice de seletividade*

O índice de seletividade (IS) foi obtido calculando-se a razão entre o valor de DLM₅₀ pelo valor de CI₅₀ (BÉZIVIN et al., 2003), sendo considerado não tóxico valores maiores que 10.

6.2.7 *Análise Estatística*

O Programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para a comparação estatística dos valores de CI_{50} gerados nos ensaios *in vitro* e das porcentagens de redução da parasitemia nos ensaios *in vivo*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

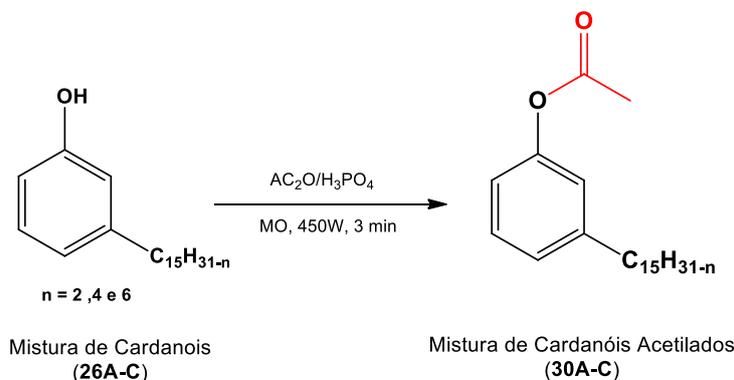
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Síntese e Caracterização dos Compostos

O planejamento sintético propôs a obtenção de novas moléculas candidatas a inibidores de histona desacetilases (HDAC) a partir da mistura de cardanois (**26A-C**). As metodologias empregadas compreenderam procedimentos clássicos de conversão de grupos funcionais, tais como a acetilação em aquecimento assistido por radiação micro-ondas, ozonólise seguida de redução com borohidreto de sódio, O-alkilação com bromoacetato de etila, oxidação de álcoois com reagente de Jones, amidação via cloreto de ácido, e obtenção dos derivados hidroxâmicos via aminólise com hidroxilamina em condições experimentais à temperatura ambiente ou sob aquecimento brando em banho de óleo.

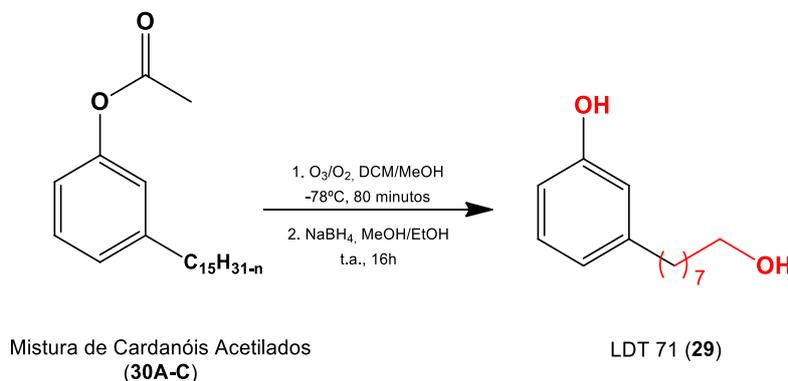
Os compostos foram caracterizados por métodos espectroscópicos de análise de RMN de ^1H e de ^{13}C .

7.1.1. Obtenção da Mistura Acetilada de Cardanois (**30A-C**)



A mistura **30A-C** foi obtida como óleo amarelo via acetilação da mistura de cardanois com anidrido acético e ácido fosfórico sob aquecimento em forno de micro-ondas doméstico, em rendimento de 90 %. A mistura não foi caracterizada por métodos espectroscópicos e submetida à próxima etapa.

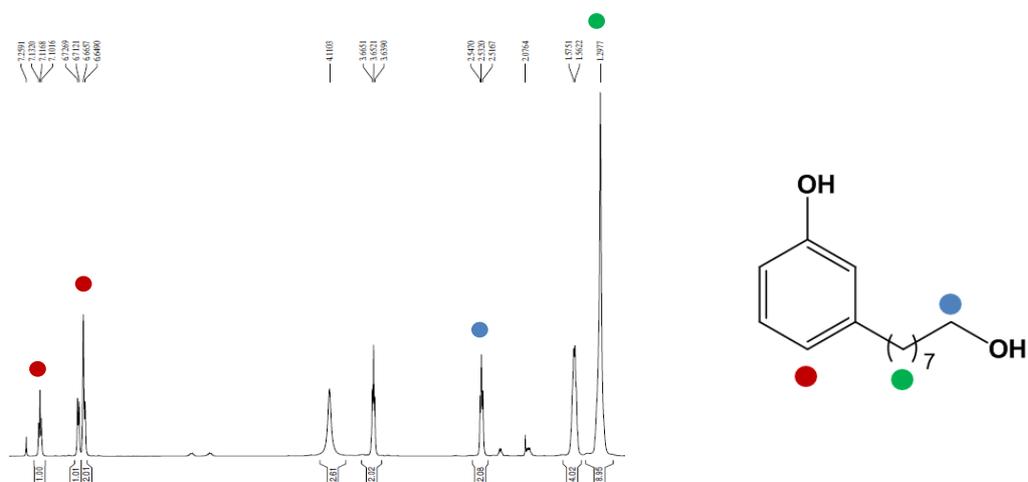
7.1.2. Obtenção do Derivado 8-(3-Hidróxifenil)octan-1-ol (LDT71) (**29**)



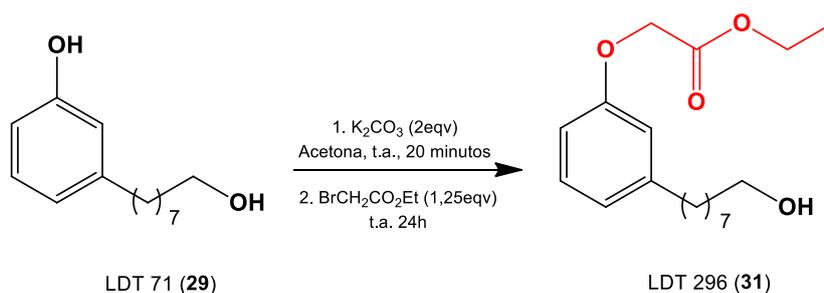
A mistura **30A-C** foi submetida à ozonólise em aparelho gerador de ozônio com fluxo contínuo de 5 g/mL por período de 80 minutos, utilizando banho de gelo seco/acetona (~ -78 °C), visando evitar a formação de produtos laterais devido ao poder oxidante do ozônio. Após este processo e avaliação do consumo do material de partida por CCD, o produto intermediário foi submetido a redução com borohidreto de sódio por 16 horas. Após purificação em coluna com gel de sílica eluída com diclorometano, clorofórmio e clorofórmio e etanol, o derivado dihidroxilado **29** foi obtido em rendimento de 67 %, caracterizado com única mancha em CCD (Rf 0,33 – CHCl₃ 70%:EtOH 30%).

Na análise espectroscópica por RMN, o metileno C₁ – ligado à hidroxila alcoólica – foi caracterizado em 3,65 ppm em RMN de hidrogênio (Anexo 1, Pág.80), corroborado pelo sinal em 63,3 ppm RMN de carbono 13 (Anexo 3, Pág. 82). Os hidrogênios metilênicos da cadeia alifática foram assinalados como simpleto em 1,30 ppm (C₃-C₆); multiplete entre 1,53 ppm a 1,59 ppm (C₂ e C₇) e tripleto em 2,54 ppm (C₈) em RMN de ¹H confirmados pelos deslocamentos químicos de 25,8 ppm a 35,9 ppm em RMN de ¹³C. Os sinais na região de aromáticos entre 6,65 ppm e 7,19 ppm em RMN de ¹H (Anexo 2, Pág.81) bem como entre 112,8 ppm e 156,0 ppm em RMN de ¹³C reforçam a presença do anel aromático e a caracterização do derivado dihidroxilado LDT71 (**29**).

Figura 11: RMN de ^1H do composto LDT71 (29)



7.1.3. Obtenção do Derivado β -oxaéster (LDT296, 31)

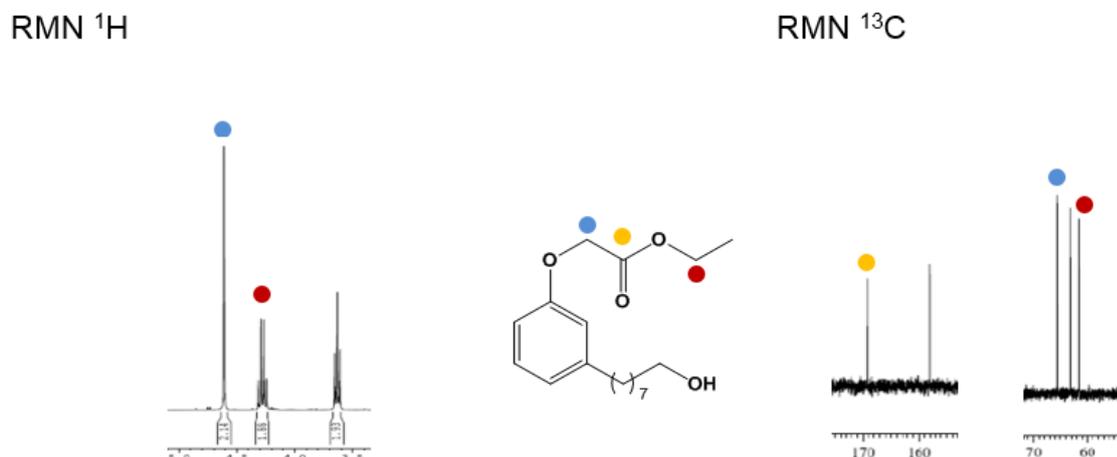


O composto **31** foi submetido à reação de *O*-substituição quimioespecífica, uma vez que o ataque preferencial ocorre na hidroxila ativada pelo anel, com 2-bromacetato de etila na presença de carbonato de potássio em acetona, à temperatura ambiente, levando ao derivado beta-oxaéster LDT296 (**31**). Após purificação o composto **31** foi obtido como líquido incolor em rendimento de 70 %, caracterizado em CCD com única mancha com $R_f = 0,55$ (CHCl_3 60 %: EtOH 40 %).

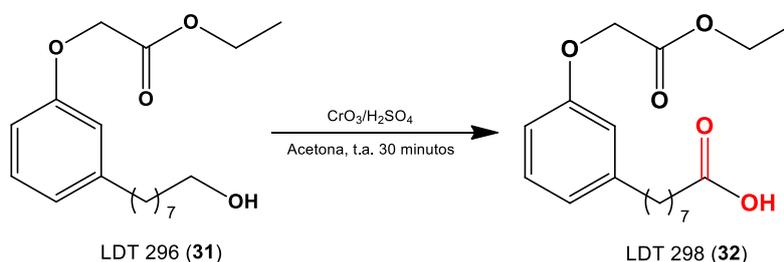
Na análise espectroscópica por RMN, os hidrogênios da unidade metilênica alfa-carbonila foram caracterizados como simpleto em 4,60 ppm (RMN de ^1H , Anexo 5, Pág. 84) corroborado pelo sinal em 65,6 ppm (RMN de ^{13}C , Anexo 7, Pág. 86). Por sua vez, o carbono carbonílico do éster foi evidenciado em 169,3 ppm em RMN de carbono 13. O grupo etoxila foi evidenciado pelos assinalamentos como tripleto a 1,32 ppm (CH_3) e quarteto em 4,27 ppm (CH_2) no espectro de RMN de ^1H e confirmados pelos deslocamentos químicos em 14,3 ppm e 61,5 ppm no de RMN de

^{13}C respectivamente, caracterizando a O-carbetoximetilação do derivado **29** ao éster **31**.

Figura 12: Espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C do derivado LDT296 (**31**)

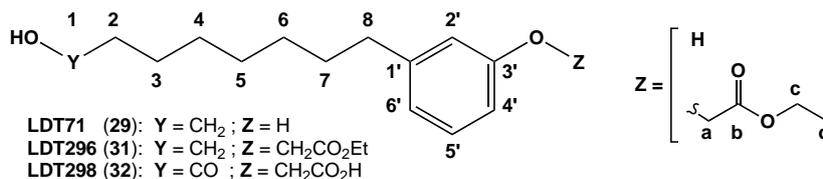


7.1.4. Obtenção do Derivado Ácido LDT298 (**32**)



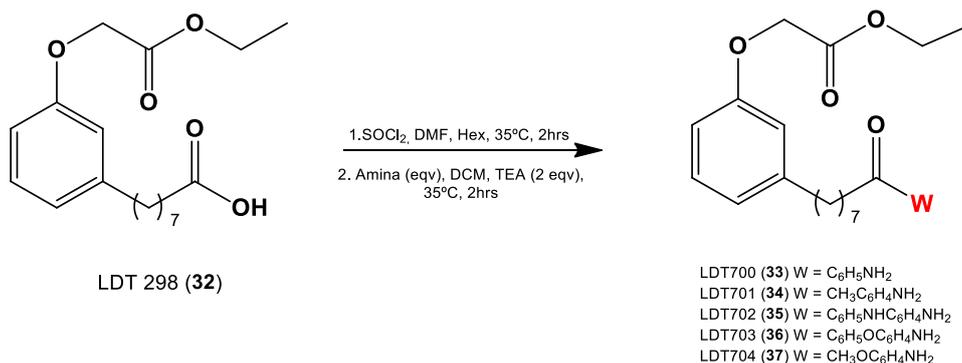
O grupo álcool do éster-derivado LDT296 (**31**) foi oxidado ao ácido carboxílico com reagente de Jones em acetona, sob banho de gelo, levando ao carbetóxiácido LDT298 (**32**) em rendimento de 83 %. **32** foi obtido como líquido incolor e caracterizado em CCD como uma única mancha (R_f 0,55 CHCl_3 60 %:EtOH 40 %).

Na análise espectroscópica por RMN, os sinais característicos do grupo metileno no carbono 8 presentes no LDT296 em 3,63 ppm em RMN de ^1H (Anexo 9, Pág. 88) e em 36,1 ppm em RMN de ^{13}C (Anexo 12, Pág. 91) mostraram-se ausentes e identificou-se o sinal em 179,8 ppm relativo ao carbono carboxílico no espectro de RMN de ^{13}C . Os principais deslocamentos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C para os intermediários **29** a **32** estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H ^{13}C : LDT71 (29), LDT296 (31) e LDT298 (32)

RMN	Grupos	RMN de ^1H / RMN de ^{13}C (ppm, CDCl ₃)		
		LDT71 (29)	LDT296 (31)	LDT298 (32)
^1H	C ₂ -C ₈	1,30 - 3,66	1,27 - 3,63	1,28 - 2,60
^{13}C		25,8 - 35,9	25,9 - 36,1	24,8 - 36,0
^1H	C ₁	3,65	3,61	--
^{13}C		63,3	63,1	179,8
^1H	a	--	4,60	4,61
^{13}C		--	65,7	65,6
^{13}C	b	--	169,3	169,3
		--		
^1H	c	--	4,28	4,26
^{13}C		--	61,5	61,5
^1H	d	--	1,30	1,30
^{13}C		--	14,3	14,4
^1H	Ar'	6,66 - 7,12	6,70 - 7,19	6,72 - 7,19
^{13}C		112,8 - 156,0	111,6 - 158,0	111,7 - 158,1

7.1.5. Obtenção dos derivados amídicos (33-37)



O derivado ácido **32** foi submetido à reação de amidação em duas etapas. Na primeira etapa foi obtido o cloreto de ácido a partir da reação com cloreto de tionila na presença de DMF em hexano sob refluxo por 2 horas. Em seguida o intermediário cloreto de ácido foi adicionado a balões contendo as respectivas aminas – anilina, *p*-toluidina, *N*-fenil-*p*-fenilenodiamina, *p*-fenóxi-anilina e *p*-anisidina – em diclorometano anidro, na presença de TEA, sob refluxo por mais 2 horas. Após purificação as

respectivas amidas-alvo – LDT700 (**33**), LDT701 (**34**), LDT702 (**35**), LDT703 (**36**) e LDT704 (**37**) – foram obtidas em rendimentos que variaram de 30 % a 62 %. A análise dos espectros de RMN de hidrogênio e carbono 13 está descrita na Tabela 2.

Para os compostos **34** e **37** os *para*-substituintes metila e metoxila foram caracterizados como multipletos em 2,31-2,33 ppm e simpleto em 3,77 ppm em RMN de ^1H (Figura 13) (Anexo 13, pág.93; Anexo 17, pág. 97; Anexo 24, pág. 104; Anexo 31, pág. 111; Anexo 36, pag.116) e confirmados pelos deslocamentos químicos em 21,0 ppm e 55,6 ppm em RMN de ^{13}C (Anexo 16, pág.96; Anexo 21, pág. 101; Anexo 27, pág. 107; Anexo 34, pág. 114; Anexo 43, pág.124).

Figura 12: Espectro de RMN de ^1H dos derivados LDT701 (**34**) e LDT704 (**37**)

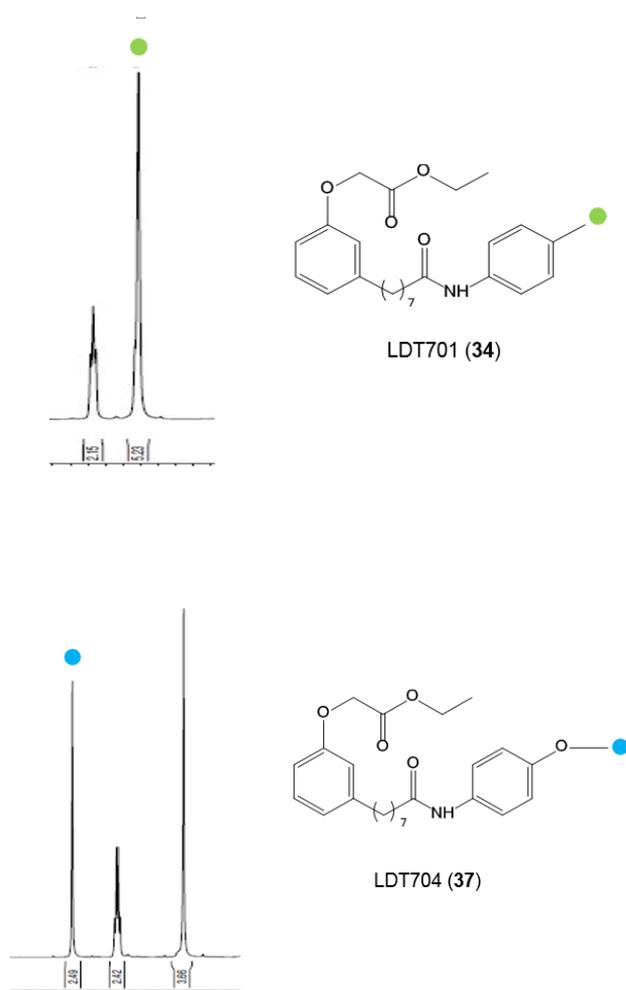
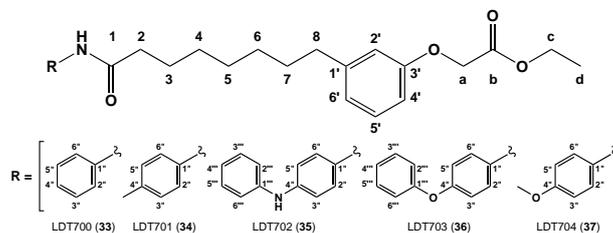
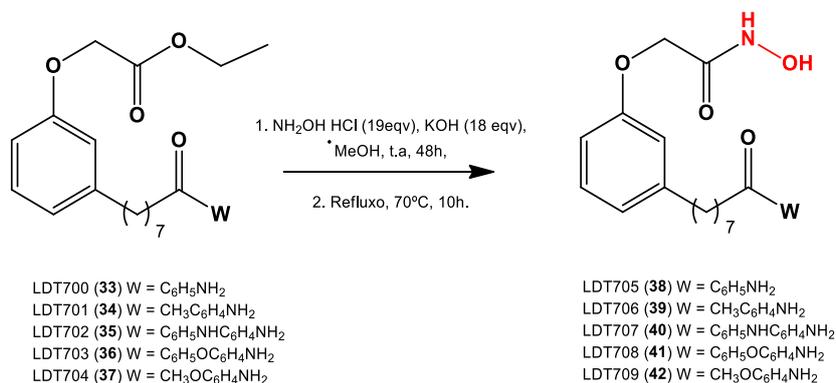


Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C (ppm, CDCl_3) para os intermediários LDT700 (33), LDT701 (34), LDT702 (35), LDT703 (36) e LDT704 (37)



RMN	Grupos	RMN de ^1H / RMN de ^{13}C (ppm, CDCl_3)				
		LDT700 (33)	LDT701 (34)	LDT702 (35)	LDT703 (36)	LDT704 (37)
^1H	$\text{C}_2\text{-C}_8$	1,31 - 2,55	1,34 - 2,57	1,34 - 2,57	1,35 - 2,56	1,34 - 2,56
^{13}C		25,7 - 37,8	25,8 - 37,9	25,8 - 37,8	25,8 - 37,9	25,8 - 37,6
^{13}C	C_1	171,8	171,3	171,5	171,8	171,6
^1H	a	4,60	4,61	4,61	4,61	4,60
^{13}C		65,6	65,7	65,7	65,7	65,6
^{13}C	b	169,3	169,2	169,4	169,3	169,3
^1H	c	4,26	4,28	4,28	4,28	4,27
^{13}C		61,5	61,5	61,5	61,5	61,5
^1H	d	1,30	1,30	1,30	1,31	1,30
^{13}C		14,3	14,4	14,4	14,4	14,3
^1H	$4'$	6,70	6,71	6,71	6,71	6,70
^{13}C		111,6	111,7	111,7	111,7	111,6
^1H	$2'$	6,74	6,75	6,76	6,76	6,74
^{13}C		115,3	115,3	115,3	115,3	115,3
^1H	$6'$	6,80	6,81	6,82	6,82	6,81
^{13}C		120,0	120,1	122,2	122,2	122,1
^1H	$5'$	7,18	7,18	7,19	7,19	7,18
^{13}C		129,4	129,4	129,5	129,4	129,4
^{13}C	$1'$	144,8	144,8	144,8	144,8	144,8
^{13}C	$3'$	158,0	158,1	158,1	158,1	158,0
^{13}C	$1''$	138,3	135,7	139,0	133,8	131,4
^1H	C_2'' e C_6''	7,52	7,40	7,40	7,49	7,41
^{13}C		122,2	122,2	121,7	121,8	121,9
^1H	C_3'' e C_5''	7,29	7,11	7,03	6,98	6,83
^{13}C		129,1	129,6	117,5	118,6	114,3
^1H	$4''$	7,07	--	--	--	--
^{13}C		124,2	133,7	132,2	153,5	156,5
^{13}C	$1'''$	--	--	143,0	157,8	--
^1H	C_2''' e C_6'''	--	--	7,03	6,98	--
^{13}C		--	--	119,4	119,8	--
^1H	C_3''' e C_5'''	--	--	7,25	7,32	--
^{13}C		--	--	129,6	129,9	--
^1H	$4'''$	--	--	6,91	7,08	--
^{13}C		--	--	121,1	123,2	--

7.1.6. Obtenção dos Derivados Hidroxâmicos (38-42)



Os derivados hidroâmicos – **33**, **34**, **35**, **36** e **37** - foram submetidos a reação de aminólise com cloridrato de hidroxilamina na presença de hidróxido de potássio em metanol, sob agitação magnética vigorosa à temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, aquelas reações cujo produto de partida ainda estava presente – LDT700 e LDT702 - identificado por placa CCD, foram colocadas em refluxo por mais 10 horas. O resíduo foi então extraído e purificado em coluna de gel de sílica, eluída em clorofórmio e gradiente de mistura de clorofórmio e etanol de 1 % a 3 %, levando aos respectivos derivados LDT705 (**38**), LDT706 (**39**), LDT707 (**40**), LDT708 (**41**) e LDT709 (**42**), em rendimentos que variaram de 40 a 52 % e R_f que variaram de 0,7 a 1,0 (CHCl_3 : EtOH 3 %).

Na análise espectroscópica por RMN (Anexo 40, pág.119; Anexo 46, pág. 127; Anexo 52, pág.133; Anexo 57, pág. 138; Anexo 63, pág.144), os sinais característicos do grupo etoxila presentes nos derivados amídicos em $\sim 2,3$ ppm e 4,2 em RMN de ^1H e em ~ 61 ppm em RMN de ^{13}C (Anexo 43, pág.124; Anexo 49, pág. 130; Anexo 57, pág.134; Anexo 62, pág. 139; Anexo 67, pág.145) mostraram-se ausentes e identificou-se o sinal em $\sim 8,0$ - $8,9$ ppm e 10,7 ppm, relativo a presença do grupo hidroxila e do grupo NH em RMN de ^1H (Figura 14) e sinais ausentes para ^{13}C , exceto para o derivado LDT709, que não apresentou os sinais em RMN de ^1H nem para etoxila e nem para os sinais característicos do grupo hidroxamato, sem sinais também em ^{13}C .

Figura 14: Espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C do derivado LDT705 (**38**)

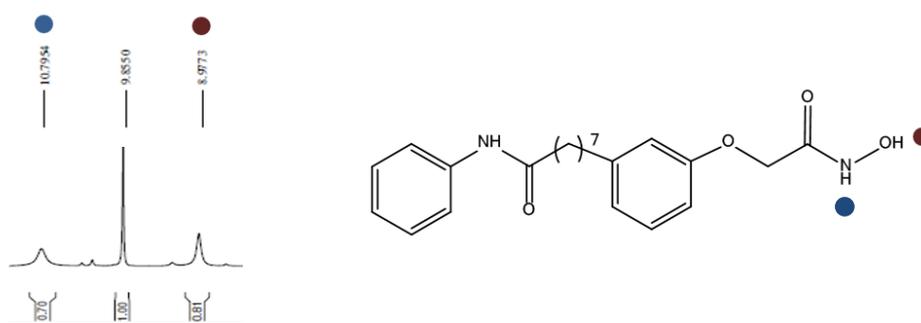
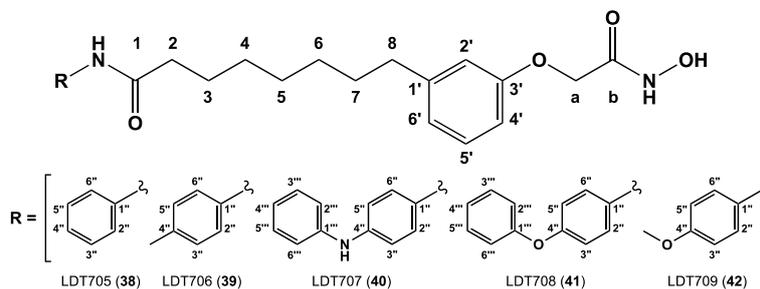


Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C (ppm, CDCl_3^* ou DMSO^{**}) dos derivados hidroxâmicos LDT705 (38), LDT706 (39), LDT707 (40), LDT708 (41) e LDT709 (42)

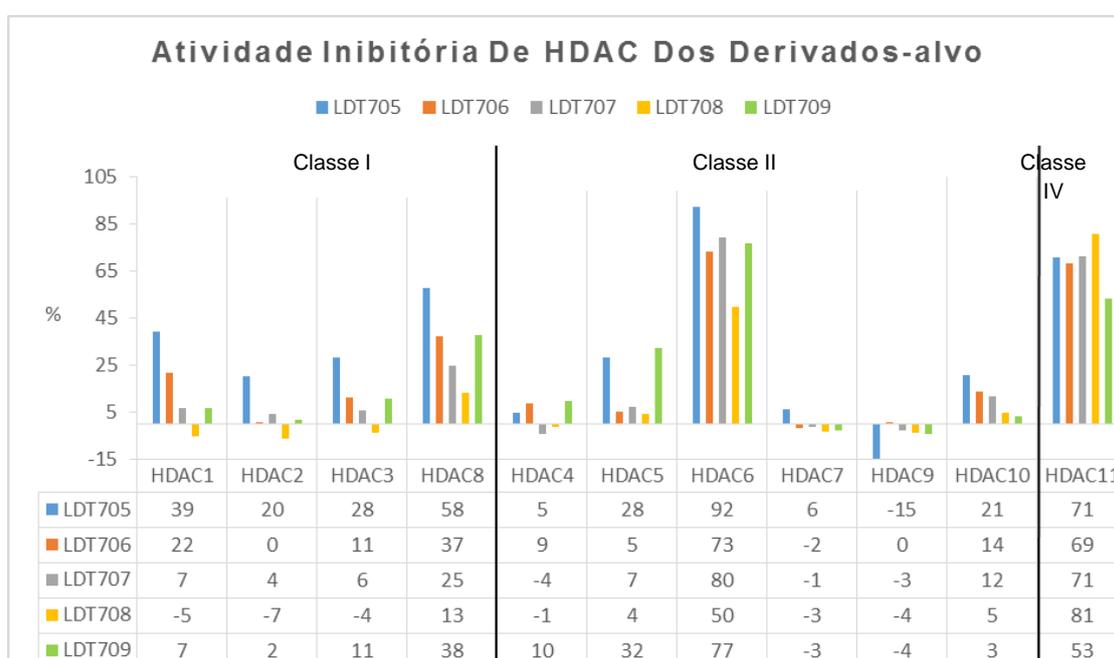


RMN	Grupos	RMN de ^1H / RMN de ^{13}C (ppm, CDCl_3)				
		LDT705 (38)	LDT706 (39)	LDT707 (40)	LDT708 (41)	LDT709 (42)
^1H	$\text{C}_2\text{-C}_8$	1,30 - 2,52	1,23 - 2,52	1,22 - 2,50	1,23 - 2,53	1,30 - 2,52
^{13}C		25,6 - 36,9	25,6 - 36,8	25,7 - 36,8	25,1 - 36,3	25,6 - 36,7
^{13}C	C_1	171,7	171,5	171,1	171,0	171,2
^1H	a	4,43	4,42	4,42	4,43	4,42
^{13}C		66,3	66,3	66,2	65,8	66,3
^{13}C	b	164,8	164,8	164,8	164,4	164,8
^1H	<u>NHOH</u>	8,98	8,96	8,02	8,98	--
^1H	<u>CONH</u>	9,86	9,74	9,75	9,90	9,70
^1H	<u>NHOH</u>	10,79	10,79	10,84	10,81	--
^1H	4'	6,74	6,74	6,73	6,75	6,74
^{13}C		112,1	112,1	112,1	111,6	112,1
^1H	2'	6,74	6,78	6,78	6,79	6,74
^{13}C		115,2	115,2	115,2	114,8	115,2
^1H	6'	6,78	6,78	6,78	6,94	6,78
^{13}C		121,7	121,7	121,7	121,2	121,7
^1H	5'	7,17	7,17	7,17	7,17	7,17
^{13}C		129,6	129,6	129,6	129,1	129,6
^{13}C	1'	144,4	144,4	144,4	143,9	144,4
^{13}C	3'	158,3	158,3	158,3	157,8	158,3
^{13}C	1''	139,8	137,3	138,9	135,3	133,0
^1H	C_2'' e C_6''	7,58	7,46	7,46	7,61	7,48
^{13}C		119,11	119,5	120,8	120,7	121,0
^1H	C_3'' e C_5''	7,29	7,07	6,97-7,01	6,97	6,83
^{13}C		129,1	129,4	116,1	117,8	114,3
^1H	4''	7,00	--	--	--	--
^{13}C		123,4	132,2	132,2	151,4	155,4
^{13}C	1'''	--	--	144,7	157,5	--
^1H	C_2''' e C_6'''	--	--	6,97-7,01	6,97	--
^{13}C		--	--	118,4	119,4	--
^1H	C_3''' e C_5'''	--	--	7,17	7,35	--
^{13}C		--	--	129,6	129,9	--
^1H	4'''	--	--	6,97-7,01	7,08	--
^{13}C		--	--	119,3	122,9	--

7.2. Avaliação Biológica *in vitro*

Os derivados-alvo 38-42 foram submetidos à avaliação *in vitro* do perfil de atividade frente a histonas desacetilases humanas da classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8), classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10) e classe IV (HDAC11) realizada por Reaction Biology Corporation (RBC). Os resultados da atividade inibitória dos compostos-alvos encontram-se na Figura 15.

Figura 13: Perfil inibitório dos derivados 38-42 frente as HDACs 1 a 11



Os derivados-alvo foram previamente diluídos em DMSO para concentração de 10 mM e testados a 10 μ M em duplicata contra 11 HDACs. A Tricostatina A (TSA) foi utilizada como composto de referência em dose de 10 vezes o CI_{50} calculado por meio do programa GraphPad Prism 4 com diluição seriada em três vezes começando a 10 μ M. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados.

Os derivados-alvo apresentaram diferentes perfis de atividade para cada classe de HDAC. Neste sentido, considerando a classe I – HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8 –, **38-42** mostraram maior percentual de inibição para a HDAC8 (13 % a 58 %) e menor para a HDAC 2 (0 % a 20 %). Entre os derivados avaliados, o derivado LDT705 (**38**) apresentou os melhores percentuais de inibição para todas as enzimas,

com destaque para a HDAC8 com 58 %, enquanto os demais foram inativos ou apresentaram percentual de inibição máximo de 38 %.

Já para a classe II – HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10 – os derivados-alvo mostraram seletividade para HDAC6 com perfil inibitório variando de 50 % a 92 %, em contraste com percentual máximo de 32 % para as demais isoenzimas. Por fim, **38-42** demonstraram capacidade de inibir a HDAC11 – representante da classe IV – com inibição da atividade enzimática variando de 53 % a 81 %.

Tomando o perfil de inibição a partir de 50 %, a maioria dos derivados-alvo tende a atuar como inibidor dual HDAC6/HDAC11. Por sua vez, **38** foi capaz de inibir uma HDAC de cada classe – HDAC8 (classe I), HDAC6 (classe II) e HDAC11 (classe IV) – sendo apontado como pan-inibidor. Destacamos, ainda, os derivados LDT707 (**40**) e LDT707 (**41**) com percentuais de inibição a partir de 80 % para HDAC6 e HDAC11, respectivamente. Nesta análise preliminar temos que os derivados LDT705 (**38**) e LDT708 (**41**) apresentaram os respectivos melhores percentuais de inibição as HDAC6 e HDAC11.

7.3. Relações Estrutura-Atividade a Partir dos Dados da atividade anti-HDAC

O estabelecimento de relações estrutura-atividade visa compreender a relevância de grupos funcionais no perfil de atividade dos compostos admitindo que moléculas com subunidades idênticas sejam reconhecidas da mesma forma pelo alvo de interação. Uma vez que os resultados preliminares frente a HDACs humanas revelaram melhores percentuais de inibição para HDAC6 e HDAC11, a análise das relações estrutura-atividade será realizada para estas isoenzimas.

7.4. Características estruturais dos derivados-alvos e a relação estrutura-atividade

A primeira análise está relacionada às particularidades estruturais dos derivados **38-42**, ou seja, a variação do CAP como subunidade auxofórica – responsável pela modulação do perfil de atividade observado. A subunidade CAP compreendeu grupos amidas planejados a partir da anilida (fenilamida) com variação de substituintes na posição *para*: metila, metoxila, fenoxila e fenilamino.

Para estabelecer as correlações entre o perfil de atividade e as contribuições dos substituintes na posição *para* das anilidas, em comparação ao derivado não substituído (LDT705, **38**) que apresentou melhor inibição (92 %), foram escolhidos o volume do grupo CAP (V) como atributo bem como as contribuições hidrofóbicas alifáticas (HIB_{Al}) e aromáticas (HIB_{Ar}) bem como hidrofílicas (HIF_{ALH}) por meio de aceptores de ligação de hidrogênio e doadores de ligação de hidrogênio (HIF_{DLH}).

O cálculo do volume da subunidade CAP dos derivados-alvo foi realizado no programa Spartan Student versão 7.2.6, utilizando o método semi-empírico PM3 tendo água como solvente, fornecendo os seguintes valores em ordem crescente: anilina (**38**, $V = 109,5 \text{ \AA}^3$); 4-metilanilina (**39**, $V = 127,7 \text{ \AA}^3$); 4-metóxi-anilina (**42**, $V = 136,6 \text{ \AA}^3$) 4-fenóxi-anilina (**41**, $V = 202,3 \text{ \AA}^3$) e 4-fenilaminoanilina (**40**, $V = 205,9 \text{ \AA}^3$). A correlação dos perfis de inibição para HDAC6 e HDAC11 com o volume do CAP sugere ausência de restrição para o reconhecimento molecular até $205,9 \text{ \AA}^3$ – maior volume encontrado dentre os substituintes – uma vez que **40** apresentou os segundos melhores perfis inibitórios para as isoenzimas (80 % e 71%).

No tocante às contribuições temos que a adição do grupo metila no derivado LDT706 (**39**) – HIB_{Al} – diminui a percentagem de inibição para ambas HDACs demonstrando que a presença de grupos hidrofóbicos é tolerada, mas com redução do perfil. Por sua vez, a adição de átomo de oxigênio presente no grupo metoxila no derivado LDT709 (**42**) – HIB_{Al}/HIF_{ALH} – agrega hidrofiliabilidade a esta região do CAP com manutenção do perfil para HDAC6 (77 %), mas diminuição frente à HDAC11 (53 %). Este dado sugere diferença no reconhecimento molecular pelas as enzimas e sugere região de interação com caráter mais hidrofóbico para a HDAC11, enquanto a HDAC6 apresenta característica mais biofórica. A adição do grupo fenoxila no derivado LDT708 (**41**) – HIB_{Ar}/HIF_{ALH} –, que mantém o grupo ALH e explora as interações aromáticas, levou a perfis de atividades antagônicos com a menor atividade para HDAC6 (50%) e maior para HDAC11 (81%). Estes resultados apontam para interações relevantes para anéis aromáticos como cátion- π e empilhamentos do tipo π ou T e corroboram a percepção de bolsões de reconhecimento molecular biofórico para HDAC6 e hidrofóbico para HDAC11. Por fim, os dados com o substituinte fenilamínico não protonável em pH 7,4 no derivado LDT707 (**40**) – HIB_{Ar}/HIF_{ALH} e HIF_{DLH} – reforçam a existência de região de interação aromática e destacam o grupo DLH (NH) na modulação positiva para a HDAC6, quando comparado a **41**, enquanto é tolerado pela HDAC11.

7.5. CAP como subunidade auxofórica

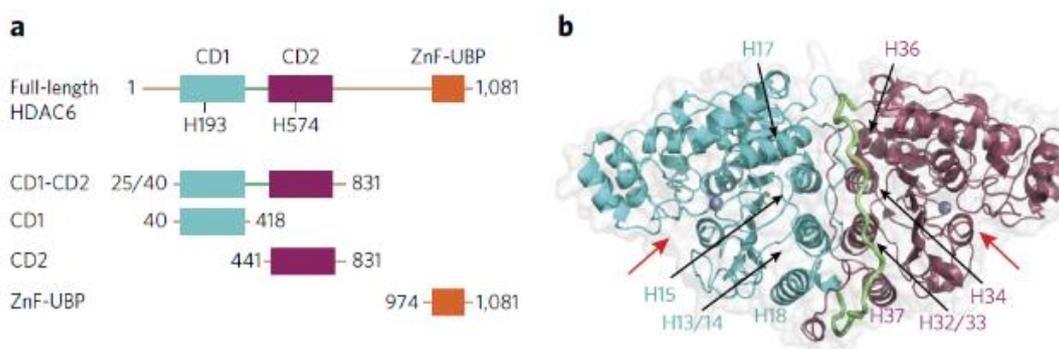
Na avaliação do CAP como subunidade auxofórica para a HDAC6 temos o melhor reconhecimento para o derivado não substituído LDT705 (**38**). Quando da substituição na posição *para*, grupos metila em **39** (HIB_{AI}; V = 127,7 Å³) ou metoxila em **42** (HIB_{AI}/HIF_{ALH}; V = 136,6 Å³) – são tolerados, mas diminuem o perfil de inibição em 26 % e 20 % respectivamente. A adição de novo anel aromático nos substituintes **40** (HIB_{AI}/HIF_{ALH} e HIF_{DLH}; V = 205,9 Å³) e **41** (HIB_{AI}/HIF_{ALH}; V = 202,3 Å³) sugere a ausência de restrição de substituintes mais volumosos até 205,9 Å³ e aponta para a existência de região de reconhecimento hidrofóbico aromático, na qual o grupo NH (ALH/DLH) da fenilamina permite melhor interação com resíduos complementares que o átomo de oxigênio (ALH) da fenoxila.

Considerando a HDAC11, os perfis inibitórios encontrados para os derivados contendo os grupos metoxila (**42**) e fenoxila (**41**) mostra a relevância das interações hidrofóbicas aromáticas comparadas às hidrofóbicas alifáticas na presença de ALH de oxigênio, o que reforça a existência de região hidrofóbica de ancoramento. Por sua vez, os derivados anilida (**38**), *p*-metilanilida (**39**) e *p*-fenilaminoanilida (**40**) apresentaram mesmo perfil de inibição mostrando a tolerância para estes substituintes no reconhecimento molecular pela enzima

7.6. Aspectos estruturais das HDACs

As histona desacetilases contêm domínio catalítico – exceto a HDAC6 que possui dois – conservado com aproximadamente 300 a 400 resíduos de aminoácidos. A conformação comum das HDACs consiste de 8 filamentos paralelos de folhas β entre um número de α-hélices. O bolso de ligação da proteína é formado por *loops* conectando esses elementos de estrutura secundária bem como do íon zinco no fundo do bolso da ligação (Figura 16).

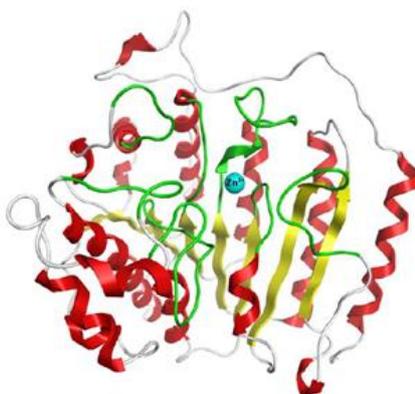
Figura 14: Estrutura da HDAC1 humana (PDB ID 5BKX). A HDAC está representada como fitas coloridas por elementos de estruturas secundárias: α helix – vermelho, folhas-β – amarelo, Loop- branco, loop que forma o bolso de ligação, verde - íon catalítico de zinco – azul.



Todas as HDACs compartilham algumas características e possuem a mesma arquitetura do bolso de ligação, com resíduos idênticos ou similares e a mesma conformação da cadeia de aminoácidos em todas as suas estruturas disponíveis, diferenciando em alguns pontos que determinam sua seletividade. Por exemplo, todas possuem três resíduos coordenando a ligação com o íon de Zinco (histidina, ácido aspártico, ácido aspártico), dois resíduos de histidina coordenando a ligação com o grupo ligante ao zinco dos ligantes, resíduos de cisteína e glicina no fundo do bolso de ligação e resíduos de glicina e de fenilalanina formando a parede do bolso. Todas essas considerações e o conhecimento das sequências de aminoácidos que pertencem a estas estruturas e estão envolvidos na atividade da enzima devem ser considerados no planejamento de inibidores seletivos (MELESINA et al., 2015).

Dentre todas as HDACs caracterizadas em seres humanos, a HDAC6, contendo 1250 aminoácidos, aparenta ser também a única a possuir dois sítios catalíticos para a sua atividade: CD1 e CD2 (**Figura 17**), onde alguns estudos tem demonstrado serem dependentes um do outro para obter uma melhor atividade (HAI; CHRISTIANSON, 2016a; ZHANG et al., 2006).

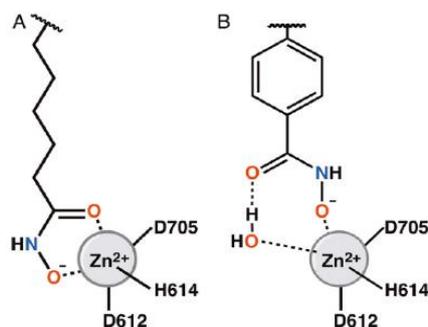
Figura 15: Domínios catalíticos CD1 e CD2 da enzima HDAC6, representados pelas cores azul e roxo, respectivamente. Em a, os limites estão indicados pelo número do aminoácido inicial e final. Para CD1 há duas possibilidades de início, pela posição 25 ou 41. Em b, o interdomínio de ligação está representado em verde, os íons metálicos em cinza e as fendas de ligação estão indicadas pelas setas. Fonte: Miyake,2016



Estudos de docking revelaram que a HDAC6 apresenta profundo e largo bolso de ligação, essencialmente hidrofóbico, formado pelos resíduos F679, F680, M682, L749 e G750, e que anéis aromáticos com pequenos substituintes são importantes

para a seletividade a esta enzima (YANG et al., 2018). (YANG et al., 2018). Considerando a interação com o cátion de zinco, alguns inibidores seletivos (ácidos fenilhidroxâmicos) demonstraram diferença energética devido a estruturas que favorecem ligação monodentada com adicional coordenação pela molécula de água – diferente da ligação bidentada como observada em pan-inibidores – podendo ainda fazer ligações de hidrogênio com os resíduos de tirosina e histidina próximas ao zinco (Figura 18) (HAI; CHRISTIANSON, 2016b; MIYAKE et al., 2016; PORTER et al., 2017).

Figura 16: Formas de reconhecimento da subunidade ZBG de HDACs. A: ligação bidentada, observada em pan-inibidores. B: Ligação monodentada, observada em fenilhidroxamatos e inibidores seletivos. Fonte: Porter, 2017



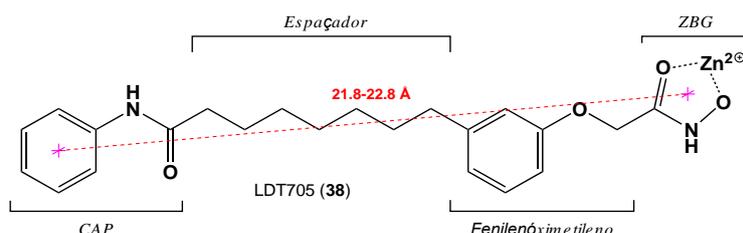
A HDAC 11 – a última a ser descoberta – é composta por 347 aminoácidos e caracterizada como o menor membro da família de HDACs, cujo domínio catalítico equivale praticamente a toda proteína. Poucos dos estudos realizados demonstraram que, apesar de bioquimicamente distinta das outras, esta enzima tem maior similaridade com a classe I de histonas do que a classe II, e que além de localizada no núcleo também é encontrada complexada à HDAC6 no citoplasma (GAO et al., 2002).

7.7. O arcabouço molecular dos derivados-alvo e os perfis de atividade

O planejamento dos novos derivados foi idealizado a partir da subunidade CAP do SAHA (**14**); do espaçador contendo sete unidades metilênicas – uma a mais que **14** –; e a inclusão do grupo fenileno ximetileno entre o espaçador e o grupo de ligação com o zinco (ZBG) (**Figura 18**). Com estas características os derivados-alvo apresentam estruturas lineares maiores que **14** – com distância do centroide do anel aromático do CAP ao centroide do ZBG quelado com zinco ($d_{CAP-ZBG}$) em torno de 22,3

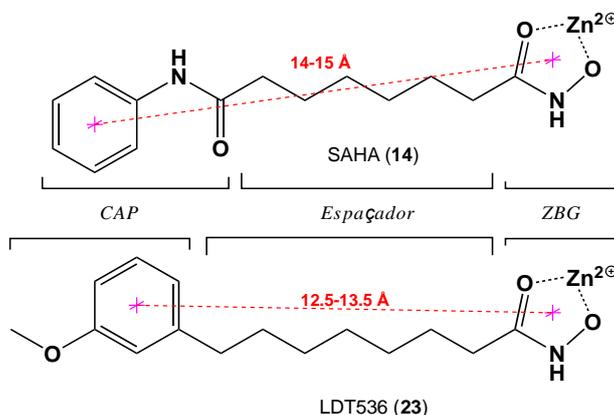
Å – que pode ter contribuído para o perfil de seletividade para a HDAC6 entre as HDACs da classe II. Adicionalmente, uma vez que HDAC6 e HDAC11 encontram-se complexadas no citoplasma, é possível que os compostos sejam reconhecidos por regiões de interação entre as enzimas, complementares às características estruturais dos derivados **38-42**.

Figura 17: Arcabouço molecular do derivado LDT705 (**38**).



Vale destacar que os derivados LDT536 (**23**, d_{CAP-ZBG} 13,0 Å) e LDT537 (**24**), que apresentam estrutura similar com o SAHA (**15**, 13,5 Å) – exceto pela ausência do grupo amida no CAP e um carbono a menos (**Figura 19**) – exibiram perfil inibitório pan-HDAC (Tabela 1, pág. 20), demonstrando a sensível modulação do perfil de atividade em função dos grupos auxóforicos e farmacofóricos para esta classe de compostos.

Figura 18: Aspectos estruturais entre o SAHA (**14**) e os derivados LDT536 (**23**).



7.8. Ensaio fenotípico em culturas de *Plasmodium falciparum*

Os estudos do perfil antimalárico em culturas de *Plasmodium falciparum* bem como atividade citotóxica frente a linhagem celular BGM e índice de seletividade foram realizados pela Dra. Júlia Penna Coutinho do Laboratório de Malária Experimental e Humana do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) sob supervisão da Dra. Antoniana Ursine Krettli.

7.9. Relação estrutura-atividade frente a culturas de *Plasmodium falciparum*

Os derivados-alvo foram submetidos ao ensaio SYBR (CI₅₀) contra culturas de *Plasmodium falciparum* para observação de sua atividade antimalárica. Nesta avaliação foram observadas as concentrações que reduziram à metade a população de parasitos.

Para o estabelecimento de relações estrutura-atividade vale destacar que os ensaios fenotípicos não permitem precisar o mecanismo de ação dos derivados-alvo avaliados, ainda que tenhamos dados de perfis biológicos associados a estes compostos. Desta forma, as análises sobre as relações estrutura-atividade citostática serão consideradas como exercício intelectual preliminar buscando correlacionar os perfis de atividade HDAC e antimalárica à luz do planejamento racional dos derivados-alvo.

Neste sentido, **38-42** mostraram atividade anti-*P. falciparum* com valores de CI₅₀ variando entre 1,7 µg/mL a 9,6 µg/mL (3,6 µM a 20,2 µM). Todos os compostos, exceto o derivado LDT707 (**40**) com menor perfil de atividade, foram equipotentes. Os valores de CI₅₀ dos derivados LDT705 (**38**), LDT706 (**39**), LDT707 (**40**), LDT708 (**41**) e LDT709 (**42**) encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Atividade anti-*Plasmodium falciparum* in vitro avaliada pelo ensaio SYBR dos derivados-alvo.

Derivados	CI ₅₀ ^a							
	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Média ± DP	
	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)
LDT705 (38)	4,5	11,7	2,4	6,2	1,0	2,6	2,6 ± 1,8	6,8 ± 4,7
LDT706 (39)	1,7	4,2	2,4	5,9	1,2	3,1	1,8 ± 0,6	4,5 ± 1,5
LDT707 (40)	10,	21,0	11,1	23,3	8,0	16,8	9,6 ± 2,2	20,2 ± 4,6
LDT708 (41)	2,2	4,6	1,6	3,3	1,3	2,7	1,7 ± 0,5	3,6 ± 1,0
LDT709 (42)	1,6	3,7	3,2	7,8	1,9	4,6	2,2 ± 0,9	5,3 ± 2,2
SAHA	0,3	1,3	0,3	1,2	0,07	4,4	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,8
Cloroquina	0,01	0,04	0,08	0,3	0,02	0,07	0,04 ± 0,04	0,1 ± 0,1

^aCI₅₀ = concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos;

Sabendo que o perfil de modulatório do SAHA (**14**, pan-HDAC) é diferente do encontrado para os derivados-alvo (**38-42**, dual HDAC6/8) – sendo **14** entre 4,5 a 25 vezes mais potente – os resultados apontam para a relevância da inibição das isoenzimas HDAC6 e HDAC11, uma vez que, excluindo o derivado **40**, a variação dos valores de CI₅₀ está na mesma faixa de atividade (< 10 vezes).

7.10. Determinação da citotoxicidade e índice de seletividade

Os derivados foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade *in vitro* utilizando linhagem celular de rim de macaco (BGM) para determinar a concentração letal para 50 % das células (DLM₅₀) quando comparada à célula cultivada sem a presença de compostos (considerada 100 % de viabilidade). Adicionalmente, foi obtido o índice de seletividade a partir da razão entre os valores da DLM₅₀ pelo valor da CI₅₀ de cada composto sendo considerado não tóxico os que apresentaram valores maiores que 10. Os valores de DLM₅₀ e IS dos compostos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade citotóxica contra linhagem celular BGM e índice de seletividade

Derivados	DLM ₅₀ ^b		IS ^c
	(µg/mL)	(µM)	
LDT705 (38)	12,6 ± 2,7	32,8 ± 7,0	4,8
LDT706 (39)	22,1 ± 22,8	55,5 ± 57,2	12,3
LDT707 (40)	27,5 ± 15,9	57,8 ± 33,4	2,9
LDT708 (41)	15,2 ± 16,1	31,9 ± 33,8	8,9
LDT709 (42)	7,5 ± 3,4	18,1 ± 8,2	3,4
SAHA (14)	0,4 ± 0,03	1,51 ± 0,1	10,0

^bMDL₅₀ = dose letal mínima para 50% das células. ^cIS = quando > 10, amostra atóxica.

Os derivados-alvo apresentaram valores de DLM₅₀ que variaram entre 18,1 µM para o derivado LDT709 (**42**) e 57,8µM para LDT707 (**40**). A partir destes dados foram calculados os índices de seletividade (IS) que variaram de 3,4 a 12,3, revelando que o derivado LDT706 (**39**) pode ser considerado atóxico; enquanto os demais compostos apresentaram-se tóxicos.

Vale destacar que os hidroxamatos podem atuar como quelante de metais divalentes como Zn²⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ livres carreando-os do meio para a célula bem como inibindo outras metaloenzimas como as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs). Neste sentido, novas investigações são necessárias para melhor compreensão do perfil de atividade/toxicidade no ensaio fenotípico bem como com células humanas.

Conclusões e Perspectivas

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As metodologias sintéticas mostraram-se eficazes para a obtenção dos derivados a partir da mistura de cardanois (**26A-C**), as quais compreenderam procedimentos clássicos de conversão de grupos funcionais, tais como a acetilação em aquecimento assistido por radiação micro-ondas, ozonólise seguida de redução com borohidreto de sódio, O-carbálcóxiálquilação com bromoacetato de etila, oxidação de álcool primário a ácido carboxílico com reagente de Jones, conversão ao cloreto de ácido com cloreto de tionila, condensação com aminas aromáticas para amidas e obtenção dos derivados hidroxâmicos via aminólise com hidroxilamina em condições experimentais à temperatura ambiente ou sob aquecimento brando em banho de óleo. Neste sentido foram sintetizados oito intermediários e cinco compostos-alvo com rendimentos que variaram de 31 % a 83 %, os quais foram caracterizados por análise de espectros de RMN de hidrogênio e de carbono 13.

Os derivados-alvo **38-42** foram avaliados quanto à atividade inibitória frente a onze HDACs humanas da classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8); classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10); e classe IV (HDAC 11). Para a classe I, apenas o derivado LDT705 (**38**) apresentou atividade moderada para HDAC8 (58 %). Considerando a classe II, os derivados apresentaram seletividade para a isoenzima HDAC6, e quatro dentre eles – LDT705 (**38**), LDT706 (**39**), LDT707 (**40**) e LDT709 (**42**) – apresentaram atividade superior a 70%, destacando o composto **38** com melhor perfil inibitório (92,2%). Para a única representante da classe IV (HDAC11), os compostos inibiram a atividade enzimática com percentual a partir de 53 %, ressaltando o derivado LDT708 (**41**) com perfil inibitório de 81,0 %. Ainda que de forma preliminar os compostos apresentaram tendência de inibição dual HDAC6/11.

Os compostos foram ainda avaliados quanto à atividade antimalárica em cultura de *Plasmodium falciparum*, em que apresentaram valores de CI_{50} que variaram de $3,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$ a $20,2 \pm 4,6 \mu\text{M}$ (compostos **41** e **40**, respectivamente), tendo o SAHA (**14**) como controle ($0,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$). O composto **38**, melhor percentual de inibição para HDAC6, apresentou CI_{50} de $6,76 \pm 4,7 \mu\text{M}$; enquanto o derivado **41**, que apresentou melhor perfil inibitório para HDAC 11, apresentou atividade anti-*P. falciparum* com CI_{50} de $3,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$.

A determinação do perfil de citotoxicidade em linhagem celular BGM permitiu calcular o índice de seletividade dos compostos que revelou o derivado LDT706 (**39**) como atóxico, enquanto os demais compostos apresentaram diferentes perfis de toxicidade.

Por fim, os estudos de relação estrutura-atividade para as isoenzimas HDAC6 e HDAC11 demonstraram não haver restrição para reconhecimento do CAP até restrição para o reconhecimento molecular até 205,9 Å³ bem como apontaram para a existência de bolsões de reconhecimento molecular biofórico para HDAC6 – hidrofóbico aromático e hidrofílico por meio de grupos DLH/ALH – e hidrofóbico aromático para HDAC11.

O perfil de seletividade dos compostos à HDAC6 e HDAC11 pode estar relacionado à maior distância entre as subunidades CAP e ZBG (~ 22,3 Å) bem como à natureza do grupo espaçador pelo aumento de um grupo metileno e presença da subunidade fenilenóximetileno.

Este trabalho apresentou os resultados referentes à síntese de novos inibidores HDAC planejamento racionalmente a partir da mistura de cardanois obtida do LCC técnico destilado – fonte biodegradável, renovável e de baixo custo – e avaliação dos percentuais de inibição enzimática de HDACs humanas bem como das atividades anti *Plasmodium falciparum*, citotoxicidade e índice de seletividade.

8.1. Perspectivas

Como perspectivas estão a determinação dos CI₅₀ para os derivados com melhores percentuais de inibição para as HDAC6 e HDAC11; a avaliação das propriedades quelantes bem como do perfil de atividade frente a metaloproteinases da matriz celular; e o desenvolvimento de estudos de ancoramento molecular *in silico* visando a racionalização dos resultados e planejamento de novas séries contendo os arcabouços moleculares desenvolvidos neste trabalho.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M. A. Plasmodium knowlesi – an emerging pathogen. **ISBT Sci Series**, v. 10, p. 134–140, 2015.
- ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 634–639, 2004.
- ANDREWS, K. T. et al. Potent Antimalarial Activity of Histone Deacetylase Inhibitor Analogues. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1454–1461, 2008.
- ANDREWS, K. T. et al. Comparative Gene Expression Profiling of *P. falciparum* Malaria Parasites Exposed to Three Different Histone Deacetylase Inhibitors. **Plos one**, v. 7, n. 2, 2012a.
- ANDREWS, K. T.; HAQUE, A.; JONES, M. K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 1, p. 66–77, 2012b.
- VAUGHAN, A. M.; ALY, A. S. I.; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and Hiding. **Cell Host Microbe**. v. 4, n. 3, p. 209–218, 2009.
- AUTINO, B. et al. Pathogenesis of Malaria in Tissues and Blood. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.4, 2012.
- BAIRD, J. K.; J.K., B. Drug therapy: effectiveness of antimalarial drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 15, p. 1565, 2005.
- BALACHANDRAN, V. S. et al. Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 2, p. 427–438, 2013.
- BATUGEDARA, G. et al. The Role of Chromatin Structure in Gene Regulation of the Human Malaria Parasite. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 5, p. 364–377, 2017.
- BERTRAND, S. et al. Hydroxamate, a Key Pharmacophore Exhibiting a Wide Range of Biological Activities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1311–1326, 2013.
- BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6–7, p. 499–503, 2003.
- BIELIAUSKAS, A. V.; PFLUM, M. K. H. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 7, p. 1402–1413, 2008.
- BRABB, T. et al. Chapter 23 - Infectious Diseases. **The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents**, American College of Laboratory Animal Medicine, p. 637-683, 2012.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2010.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, 2017.

- BUENO, J. M. et al. Case Study of Small Molecules As Antimalarials: 2 - Amino-1-phenylethanol (APE) Derivatives. **ACS Medicinal Chemistry Letters**. 2014, 5, 657–661p. 1–5, 2014.
- CAI, H. et al. Predicting and exploring network components involved in pathogenesis in the malaria parasite via novel subnetwork alignments. **BMC systems biology**, v. 9 Suppl 4, n. Suppl 4, p. S1, 2015.
- CALVO-CALLE, J. M. et al. In vitro development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. **Experimental parasitology**, v. 79, n. 3, p. 362–73, nov. 1994.
- CDC. Guidelines for treatment of malaria in the United States. **Treatment Table Update, May**, n. 770, p. 855–857, 2013.
- CHAKRAVORTY, S. J.; HUGHES, K. R.; CRAIG, A. G. Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 2, p. 221–228, 2008.
- Chen PB, et al. *Plasmodium falciparum* PfSET7: Enzymatic characterization and cellular localization of a novel pro-tein methyltransferase in sporozoite, liver and erythro- cytic stage parasites. **Sci Rep**. v. 6, 2016.
- CHEN, Y. et al. A series of potent and selective, triazolylphenyl-based histone deacetylases inhibitors with activity against pancreatic cancer cells and *Plasmodium falciparum*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3437–3448, 2008.
- COLEMAN, B. I. et al. A *Plasmodium falciparum* Histone Deacetylase regulates antigenic variation and gametocyte conversion. **Cell Host and Microbe**, v. 16, n. 2, p. 177–186, 2014.
- COLEMAN, B. I.; DURAISINGH, M. T. Transcriptional control and gene silencing in *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 1935–1946, 2008.
- CORTÉS, A. et al. Epigenetic Silencing of *Plasmodium falciparum* Genes Linked to Erythrocyte Invasion. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 8, p. 107, 2007.
- CORTÉS, A.; DEITSCH, K. W. Malaria epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 7, p. 1–23, 2017.
- COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.
- CUI, L. et al. PfGCN5-mediated histone H3 acetylation plays a key role in gene expression in *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 7, p. 1219–1227, 2007.
- CUI, L. et al. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 3 Suppl, p. 57–68, 2015.
- CUI, L.; MIAO, J. Chromatin-Mediated epigenetic regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1138–1149, 2010.
- CUI, L.; MIAO, J.; FURUYA, T; LI, X; SU XZ. PfGCN5- mediated histone H3 acetylation plays a key role in gene expression in *Plasmodium falciparum*. **Eukaryot Cell**.v. 6: p. 1219–1227, 2007.

DARKIN-RATTRAY, S. J. et al. Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase (cyclic tetrapeptide Apicomplexa antiparasitic malaria coccidiosis). **Medical Sciences**, v. 93, p. 13143–13147, 1996.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, “Epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887–896, 2015.

DOW, G. S. et al. Antimalarial activity of phenylthiazolyl-bearing hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3467–3477, 2008.

DUFFY, M. F. et al. Epigenetic regulation of the plasmodium falciparum genome. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 3, p. 203–216, 2014.

ENGEL, J. A. et al. Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against Plasmodium and Trypanosoma parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 117–126, 2015.

FAN, Q.; AN, L.; CUI, L. Plasmodium falciparum. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 2, p. 264–276, 2004.

FELSENFELD, G.; GROUDINE, M. Controlling the double helix. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 448–453, 2003.

FIDOCK, D. A. et al. Antimalarial drug discovery: Efficacy models for compound screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 509–520, 2004.

FONAGER, J. et al. Reduced CD36-dependent tissue sequestration of Plasmodium-infected erythrocytes is detrimental to malaria parasite growth in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 1, p. 93–107, 2012.

FRANCIS, N. et al. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493–499, 2010.

GAO, L. et al. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25748–25755, 2002.

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498–511, 2002.

GLUSHAKOVA, S. et al. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. **Current Biology**, v. 15, n. 18, p. 1645–1650, 20 set. 2005.

HAI, Y.; CHRISTIANSON, D. W. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 9, p. 741–747, 2016a.

HAI, Y.; CHRISTIANSON, D. W. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 9, p. 741–747, 2016b.

HALDAR, K.; BHATTACHARJEE, S.; SAFEUKUI, I. Drug resistance in Plasmodium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 156–170, 2018.

HERBERT, F. et al. Evidence of IL-17, IP-10, and IL-10 involvement in multiple-organ dysfunction and IL-17 pathway in acute renal failure associated to Plasmodium falciparum malaria. **Journal of translational medicine**, v. 13, p. 369, 2015.

HO, M.; WHITE, N. J. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 6, p. C1231–C1242, 1999.

HORATA, N. et al. Sequence variation of PfEMP1-DBLalpha in association with rosette formation in Plasmodium falciparum isolates causing severe and uncomplicated malaria. **Malaria journal**, v. 8, n. 1, p. 184, 2009.

JIANG L. et al. Epigenetic control of the variable expression of a *Plasmodium falciparum* receptor protein for erythrocyte invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v 107: p. 2224–2229, 2010.

KIM, H. J.; BAE, S. C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. **American Journal of Translational Research**, v. 3, n. 2, p. 166–179, 2011.

KIRCHNER, S.; POWER, B. J.; WATERS, A. P. Recent advances in malaria genomics and epigenomics. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2016.

KISHORE S.P.; STILLER J.W.; DEITSCH K.W. Horizontal gene transfer of epigenetic machinery and evolution of parasitism in the malaria parasite Plasmodium falciparum and other apicomplexans. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13: p.37, 2013.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. **The Journal of parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418–20, jun. 1979.

LAMIKANRA, A. A. et al. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. **PLoS one**, v. 4, n. 12, p. e8446, 2009.

LEMES, L. F. N. et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687–700, 27 jan. 2016.

LOPEZ-RUBIO, J. J. et al. 5' Flanking Region of Var Genes Nucleate Histone Modification Patterns Linked To Phenotypic Inheritance of Virulence Traits in Malaria Parasites. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1296–1305, 2007.

LOPEZ-RUBIO J.J.; MANCIO-SILVA L.; SCHERF A. Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. **Cell Host Microbe**, v. 5: p. 179–190, 2009.

MADUREIRA M. C, et al. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S Tomé and Príncipe islands. **J. Ethnopharmacol.** v. 8: p. 23–29, 2002.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Oleo da castanha de caju: Oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 732–741, 2009.

MELESINA, J. et al. Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 62, p. 342–361, 2015.

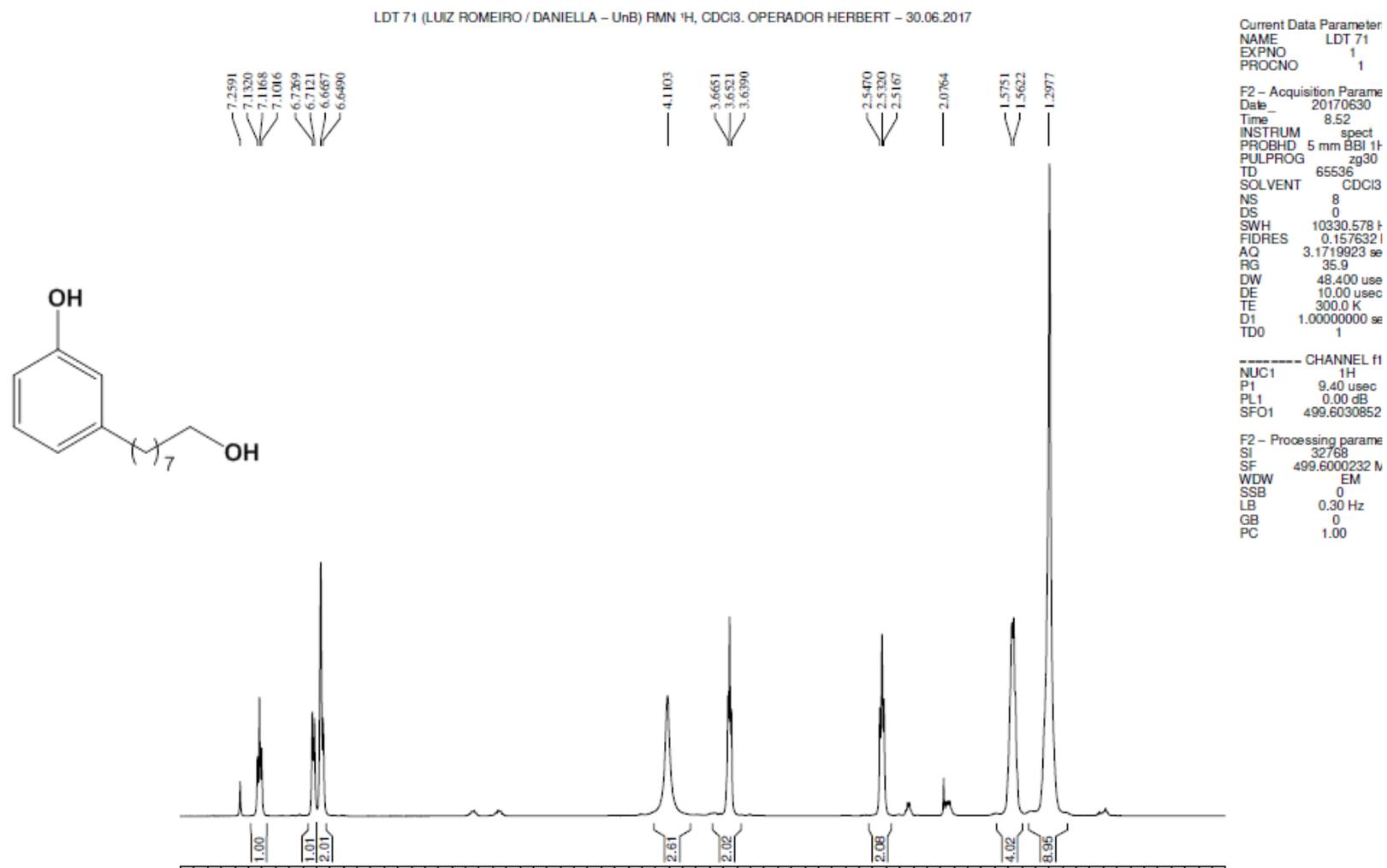
MERRICK, C. J. et al. Functional analysis of sirtuin genes in multiple Plasmodium falciparum strains. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–19, 2015.

- MIYAKE, Y. et al. Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 9, p. 748–754, 2016.
- MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013.
- MU, J. et al. Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 977–989, 2003.
- MUKHERJEE, P.; PRADHAN, A.; SHAH, F. Structural insights into the Plasmodium falciparum histone deacetylase 1 (Pf HDAC-1): A novel target for the development of antimalarial therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5254–5265, 2008.
- NOSTEN, F. F. F.; WHITE, N. J. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. SUPPL. 6, p. 181–192, 2007.
- ODUOLA, A. M. et al. Plasmodium falciparum: cloning by single-erythrocyte micromanipulation and heterogeneity in vitro. **Experimental parasitology**, v. 66, n. 1, p. 86–95, 1988.
- PAGUIO, M. F.; BOGLE, K. L.; ROEPE, P. D. Plasmodium falciparum resistance to cytotoxic versus cytostatic effects of chloroquine. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 178, n. 1–2, p. 1–6, 2011.
- PAL, P. et al. Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein II Compromises Brain Endothelial Barriers and May Promote Cerebral Malaria Pathogenesis. **mBio**, v. 7, n. 3, p. 1-11, 2016.
- PASSARGE, E.; WIRTH, J. Color atlas of genetics. **Stuttgart, Georg Thieme Verlag**, 2013.
- PATIL, V. et al. Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 415–425, 2010.
- PONTS, N. et al. Genome-wide mapping of DNA methylation in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 6, p. 696–706, 2013.
- PORTER, N. J. et al. Unusual zinc-binding mode of HDAC6-selective hydroxamate inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1215, n. 37, p. 201718823, 2017.
- RANSON, H. et al. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? **Trends in parasitology**, v. 27, n. 2, p. 91–8, 2011.
- SANTOS, G.; TORRES, N. V. New Targets for Drug Discovery against Malaria. **PLoS ONE**, v. 8, p 1-14, 2013.
- SETO, E.; YOSHIDA, M. Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. p. 1–26, 2014.
- SHAHBAZIAN, M. D.; GRUNSTEIN, M. Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 75–100, 2007.
- SHEN, Y.; WEI, W.; ZHOU, D. X. Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 10, p. 614–621, 2015.
- SINHA, S.; MEDHI, B.; SEHGAL, R. Challenges of drug-resistant malaria. **Parasite**, v. 21, p. 61, 2014.

- STAINES, H. M.; KRISHNA, S. Treatment and Prevention of Malaria. **Springer**, 2012.
- TATIANA, I.; ARRUDA, S. DE. Epigenética : uma nova compreensão sobre a expressão do genoma. **Genética na Escola**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2015.
- TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science (New York, N.Y.)**, v. 193, n. 4254, p. 673–5, 20 ago. 1976.
- UKAEGBU UE, et al. Recruitment of PfSET2 by RNA polymerase II to variant antigen encoding loci contributes to antigenic variation in *P. falciparum*. **PLOS Pathogens** v. 10, 2014.
- VASAPOLLO, G.; MELE, G.; DEL SOLE, R. Cardanol-Based Materials as Natural Precursors for Olefin Metathesis. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 6871–6882, 2011.
- VICKERS, C. J. et al. Discovery of HDAC Inhibitors That Lack an Active Site Zn(2+)-Binding Functional Group. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 6, p. 505–8, 2012.
- Volz J, et al. Potential epigenetic regulatory proteins localise to distinct nuclear sub-compartments in *Plasmodium falciparum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40: p. 109–121, 2010.
- WATERMEYER, J. M. et al. A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Blood**, v. 127, n. 3, p. 343–51, 21, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2017**, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Treatment of Severe Malaria. **Guidelines For The Treatment of Malaria**, p. 71–88, 2015.
- YANG, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel hydroxamic acid based histone deacetylase 6 selective inhibitors bearing phenylpyrazol scaffold as surface recognition motif. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1418–1425, 2018.
- ZHANG, Y. et al. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 5, p. 2401–2404, 2006.

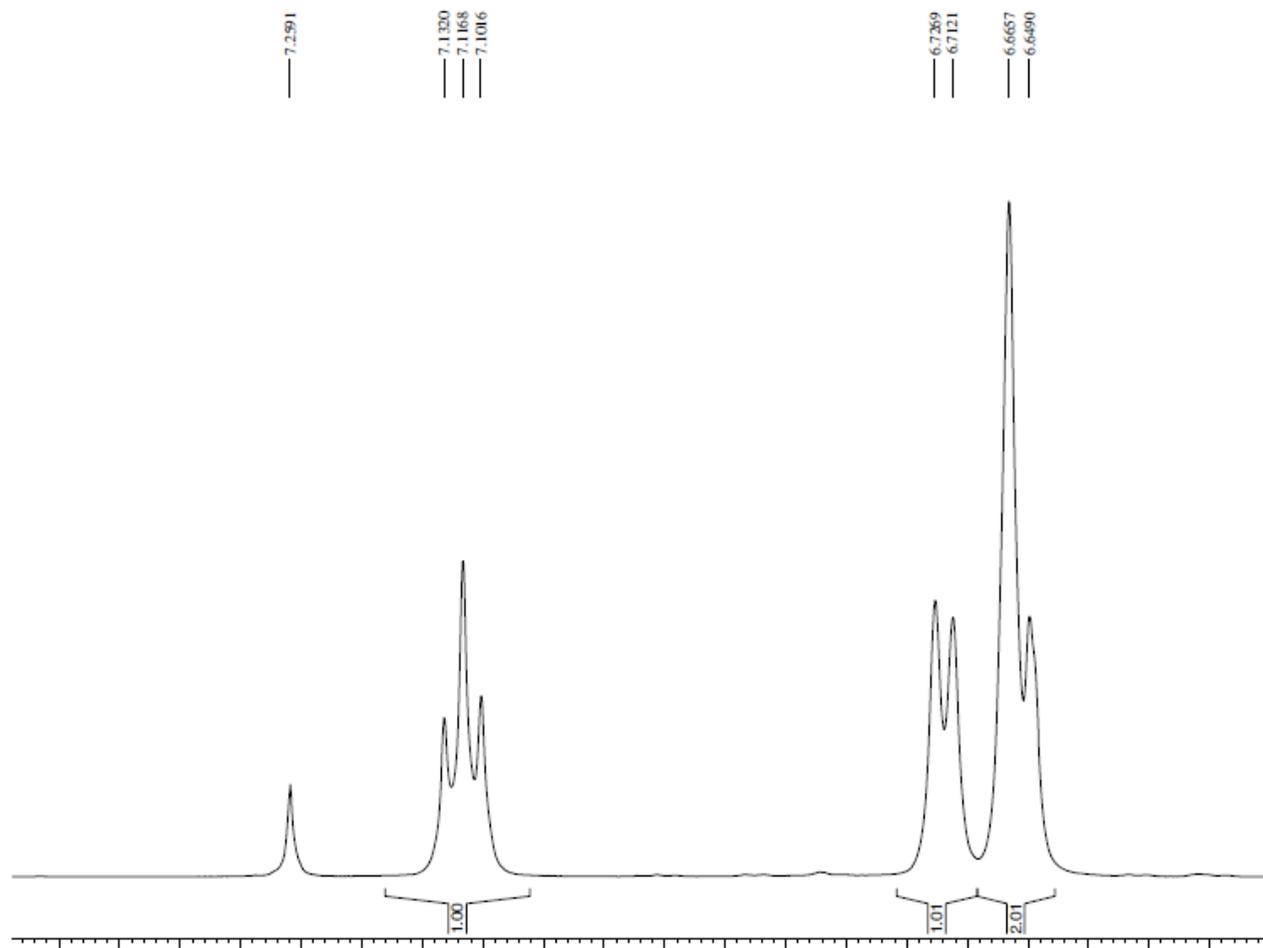
ANEXO 1– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):

3-(8-Hidróxiocetil)fenol (LDT71, 29)



ANEXO 2– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão)
 3-(8-Hidróxiocetil)fenol (LDT71, 29)

LDT 71 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT – 30.06.2017



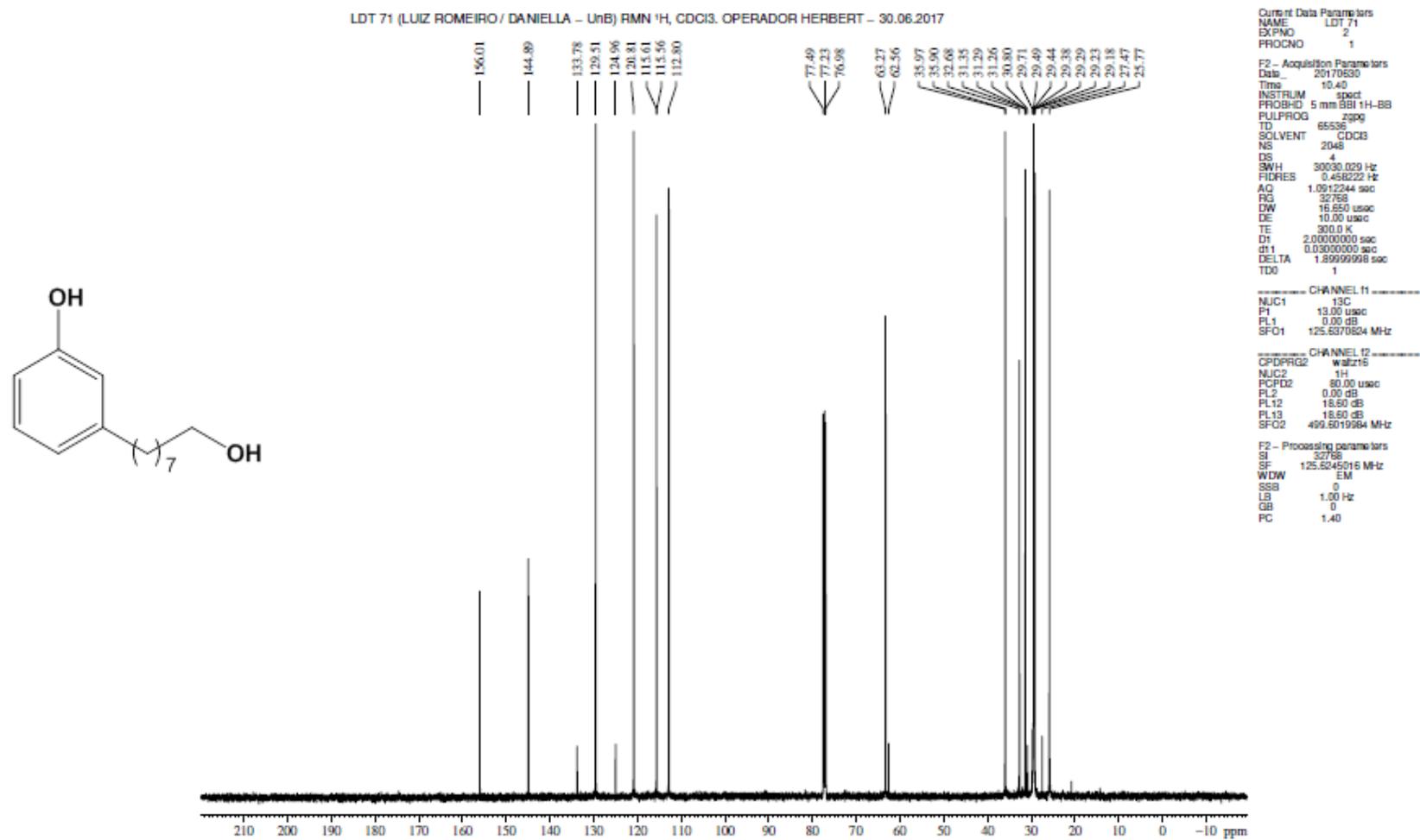
Current Data Parameter
 NAME LDT 71
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parame
 Date 20170630
 Time 8.52
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 8
 DS 0
 SWH 10330.578 Hz
 FIDRES 0.157632 Hz
 AQ 3.1719923 sec
 RG 35.9
 DW 48.400 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TD0 1

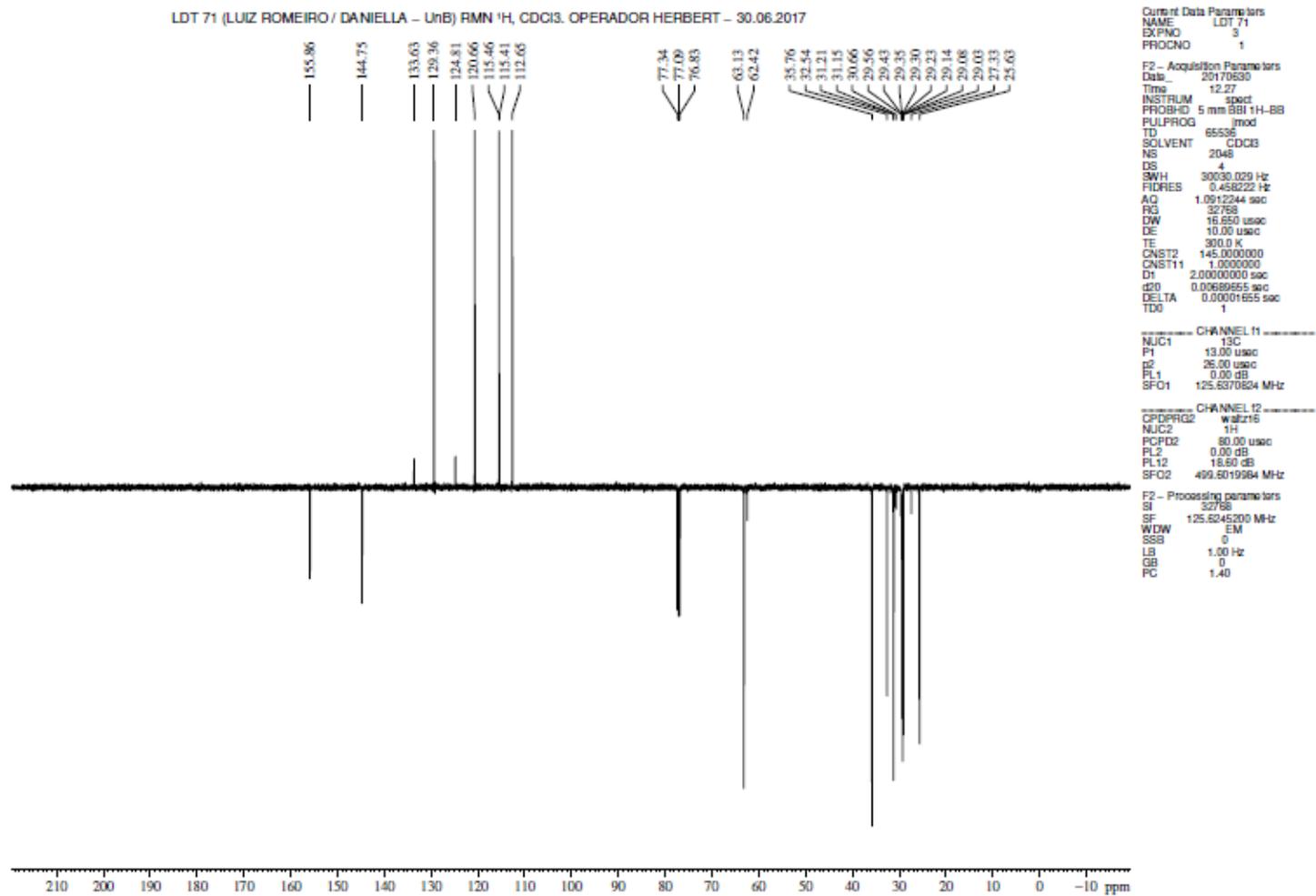
----- CHANNEL f1
 NUC1 ^1H
 P1 9.40 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 499.6030852

F2 - Processing parame
 SI 32768
 SF 499.600232 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

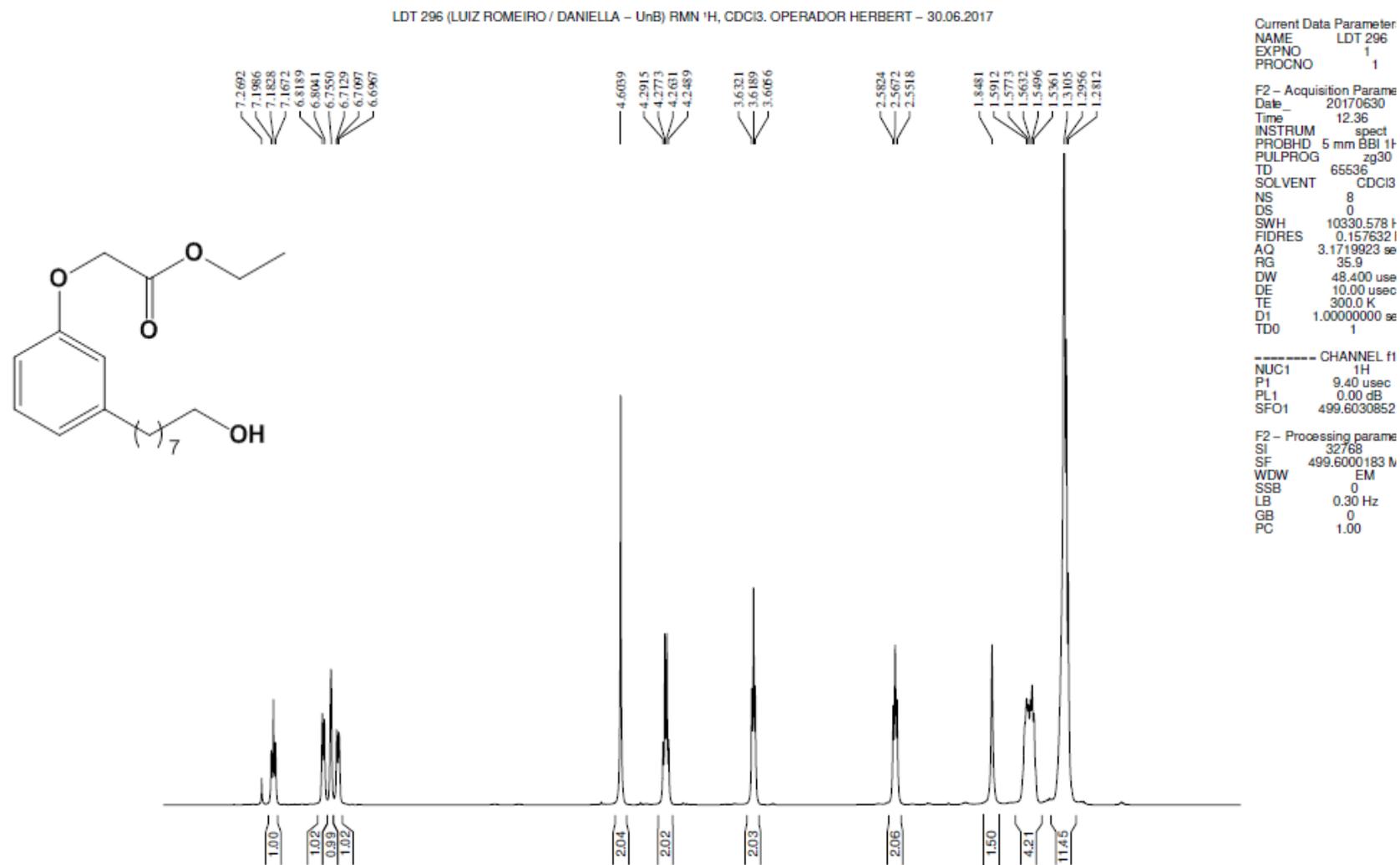
ANEXO 3– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3):
3-(8-Hidróxiocetil)fenol (LDT71, **29**)



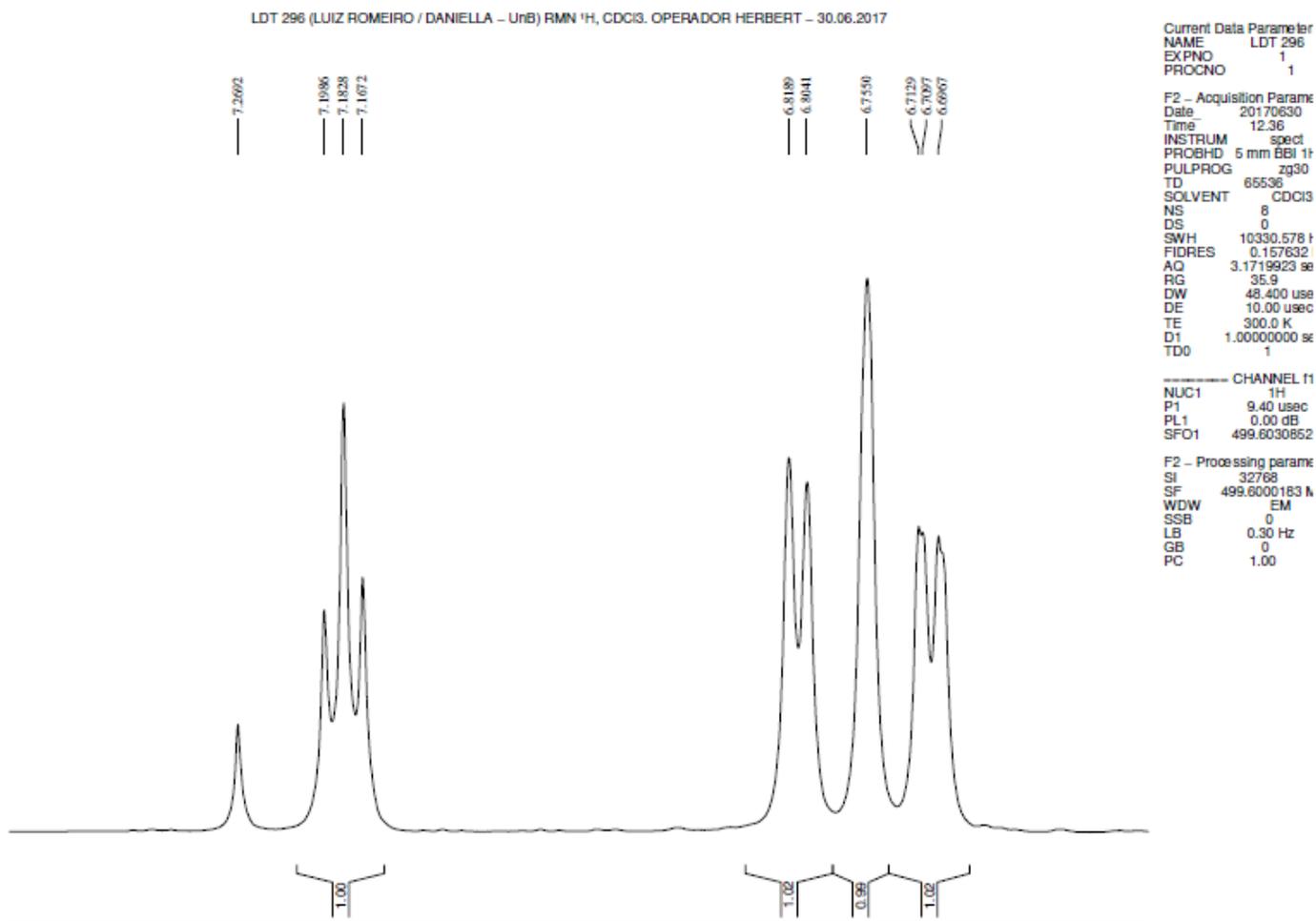
ANEXO 4– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
3-(8-Hidróxiocetil)fenol (LDT71, 29)



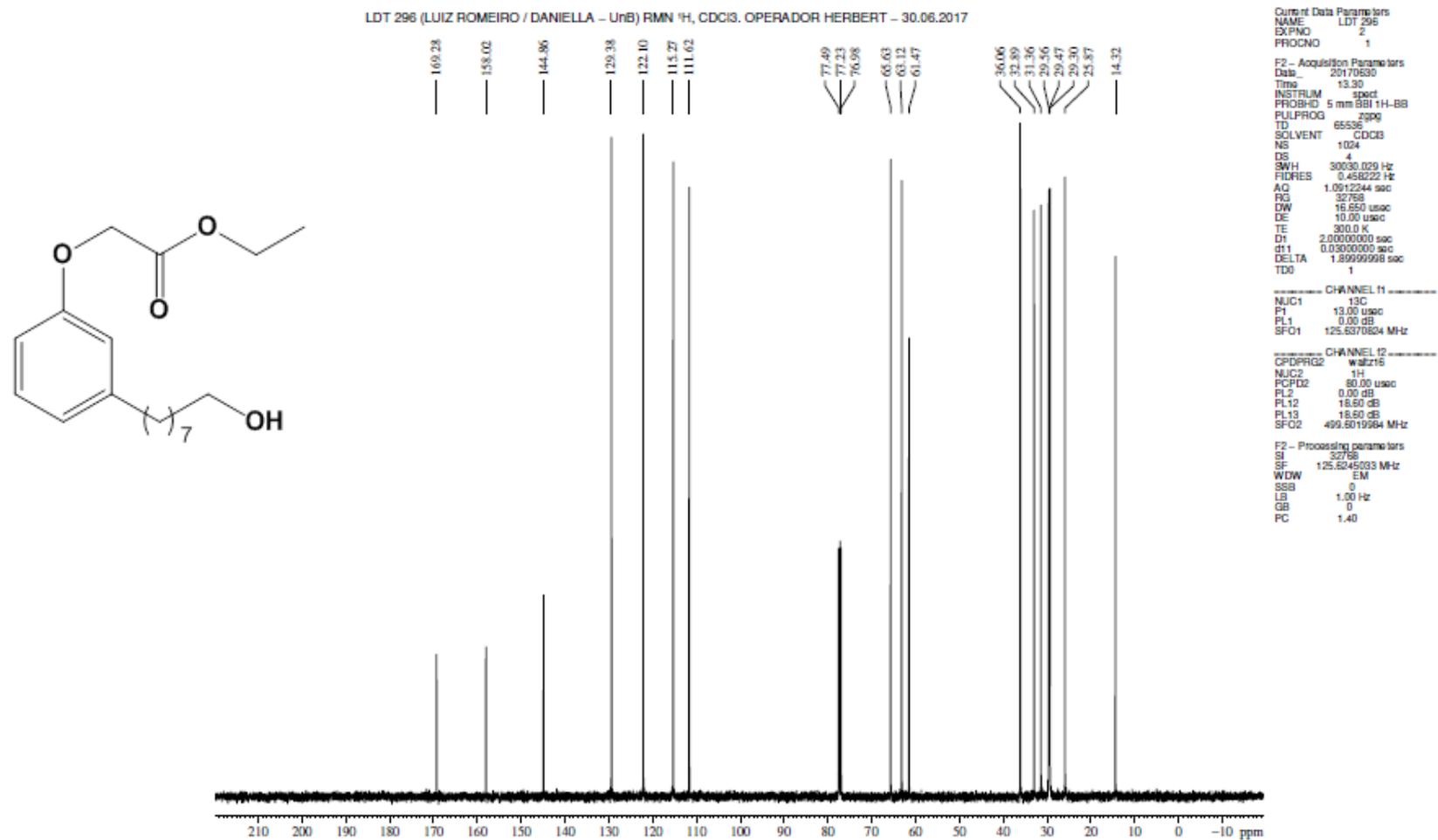
ANEXO 5– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
 2-(3-(8-Hidróxiocetil)fenóxi)acetato de etila (LDT296,**31**)



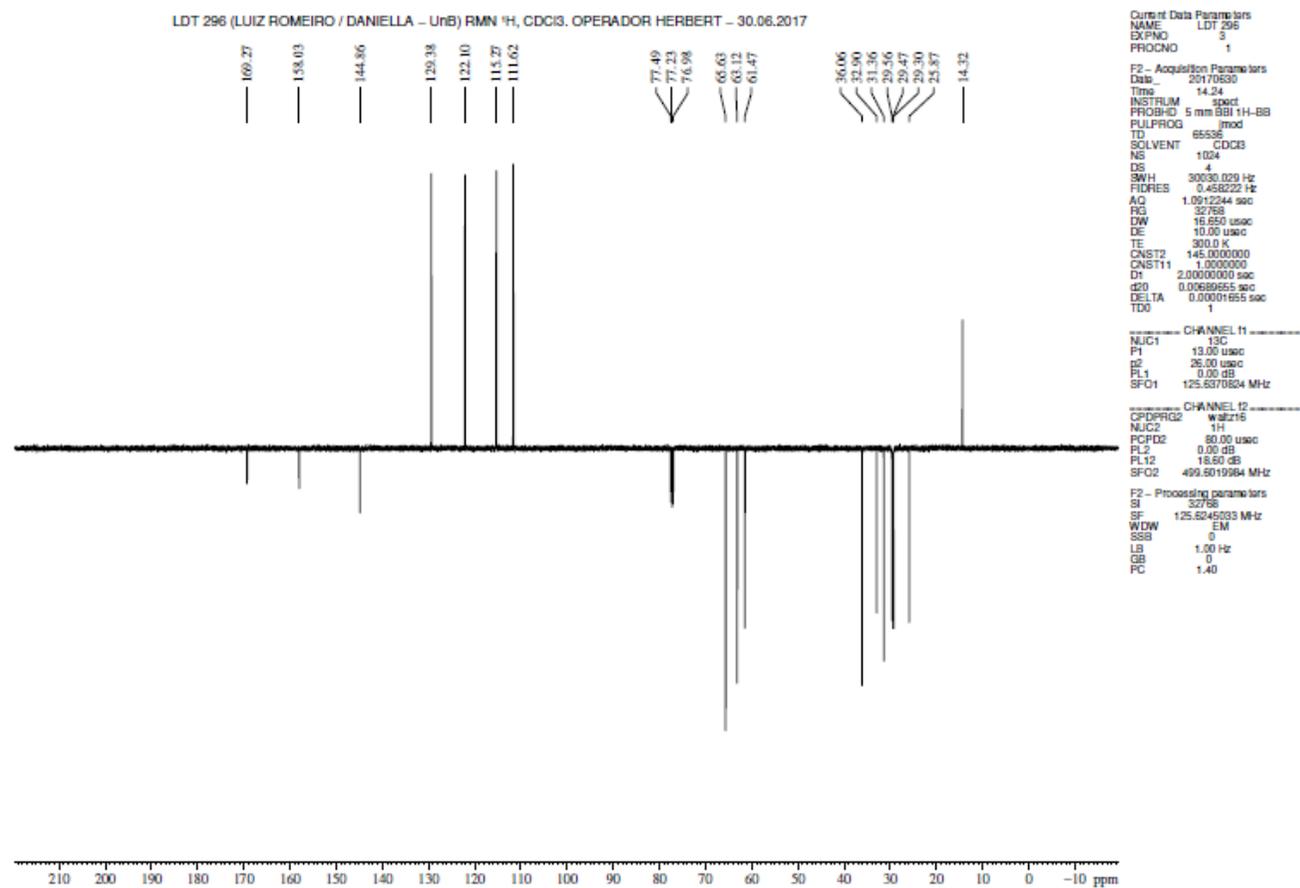
ANEXO 6– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): (Expansão)
 2-(3-(8-Hidróxiocetil)fenóxi)acetato de etila (LDT296,**31**)



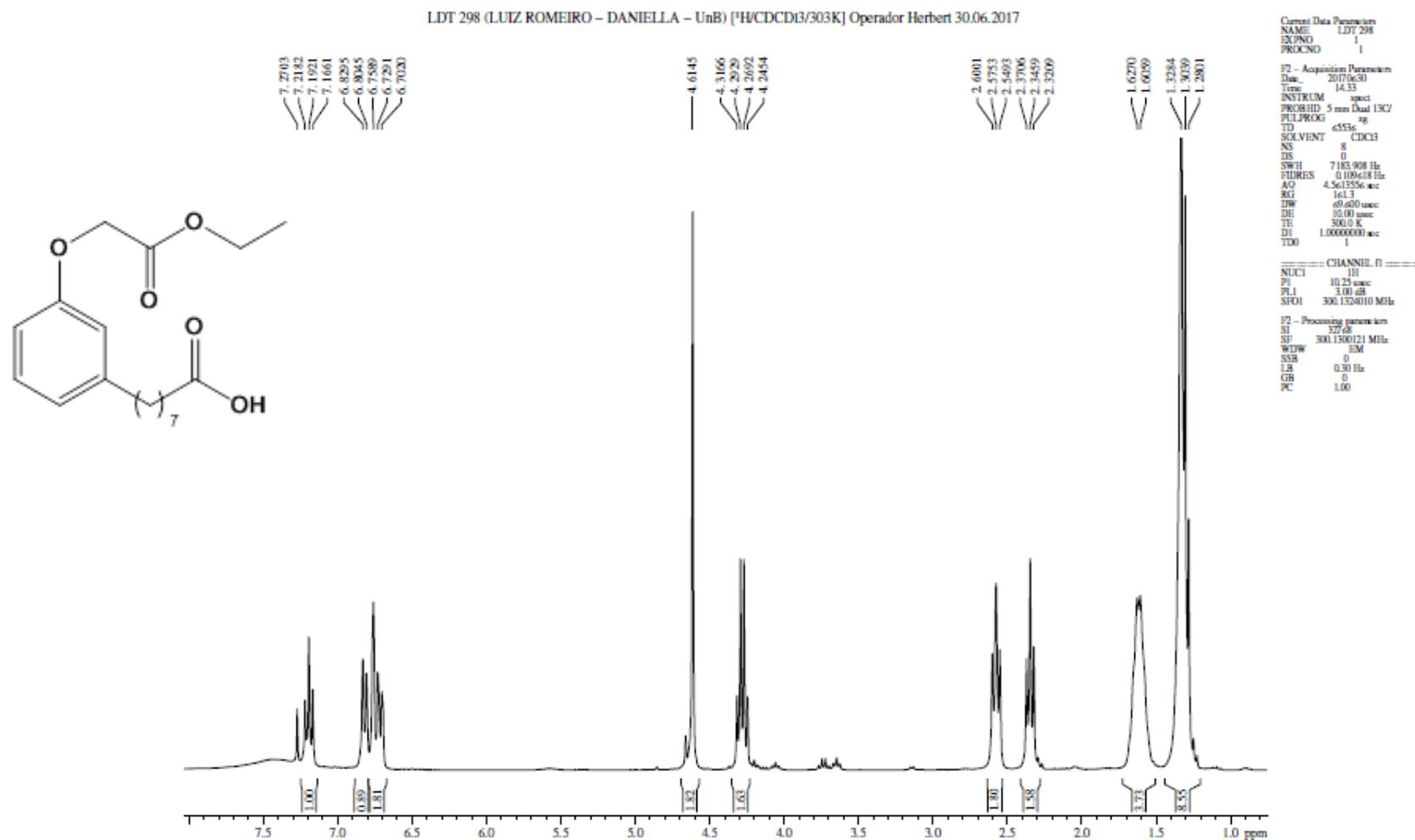
**ANEXO 7– Espectro de RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃):
2-(3-(8-Hidróxiocil)fenóxi)acetato de etila (LDT296, **31**)**



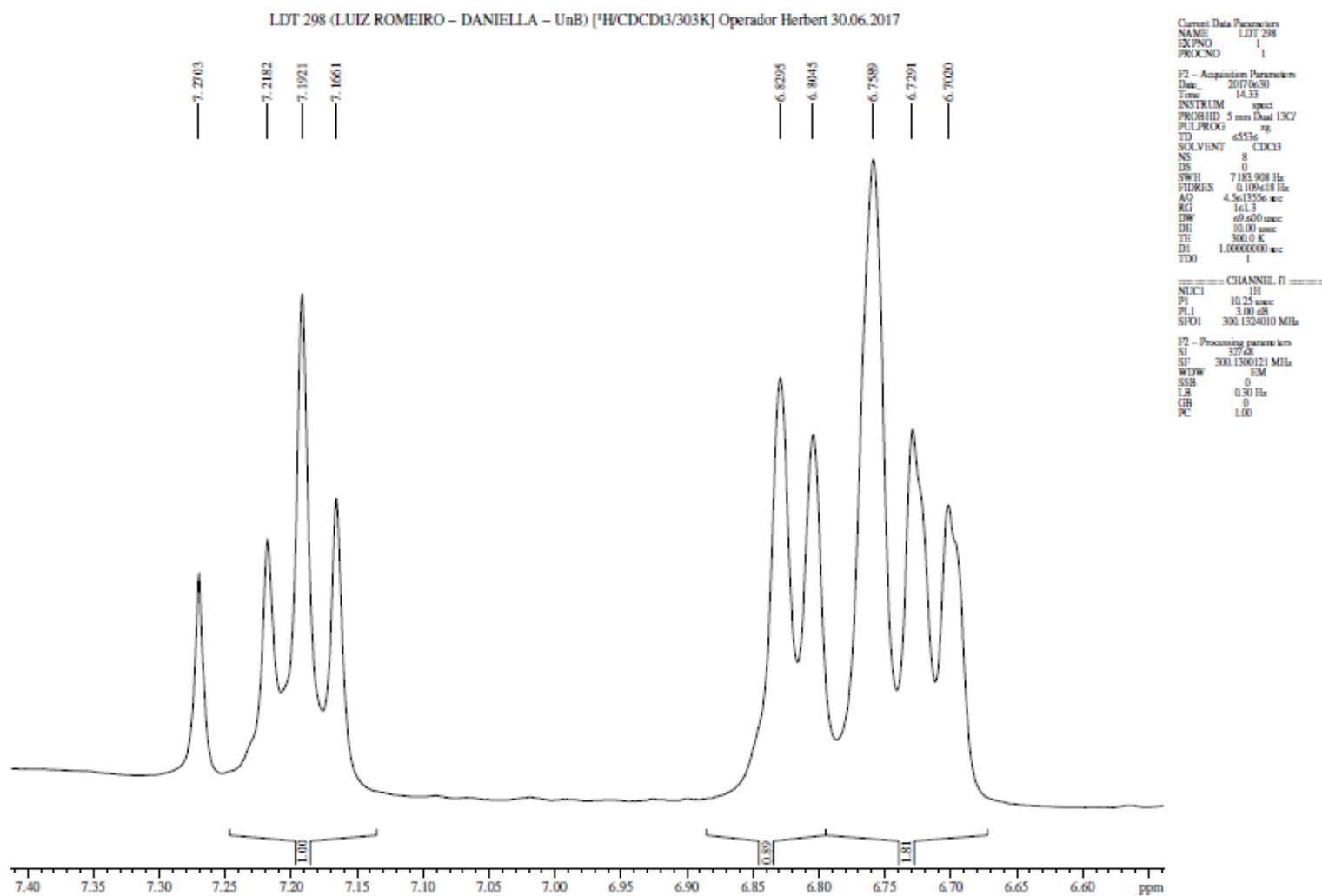
ANEXO 8– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
2-(3-(8-Hidróxiocetil)fenóxi)acetato de etila (LDT296, 31)



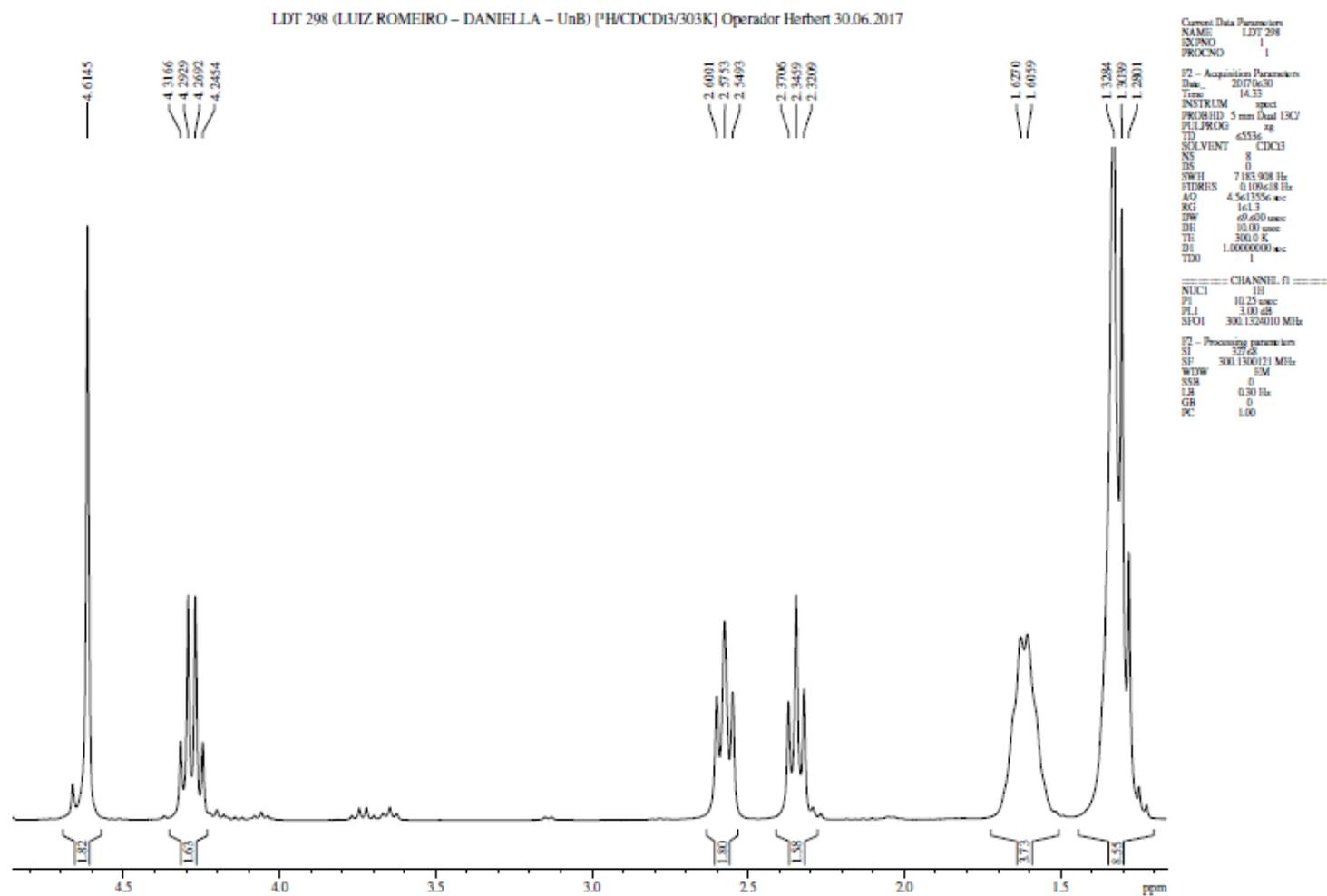
ANEXO 9– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
 Ácido 8-(3-Carboetoximetóxfenil)octanóico (LDT298, **32**)



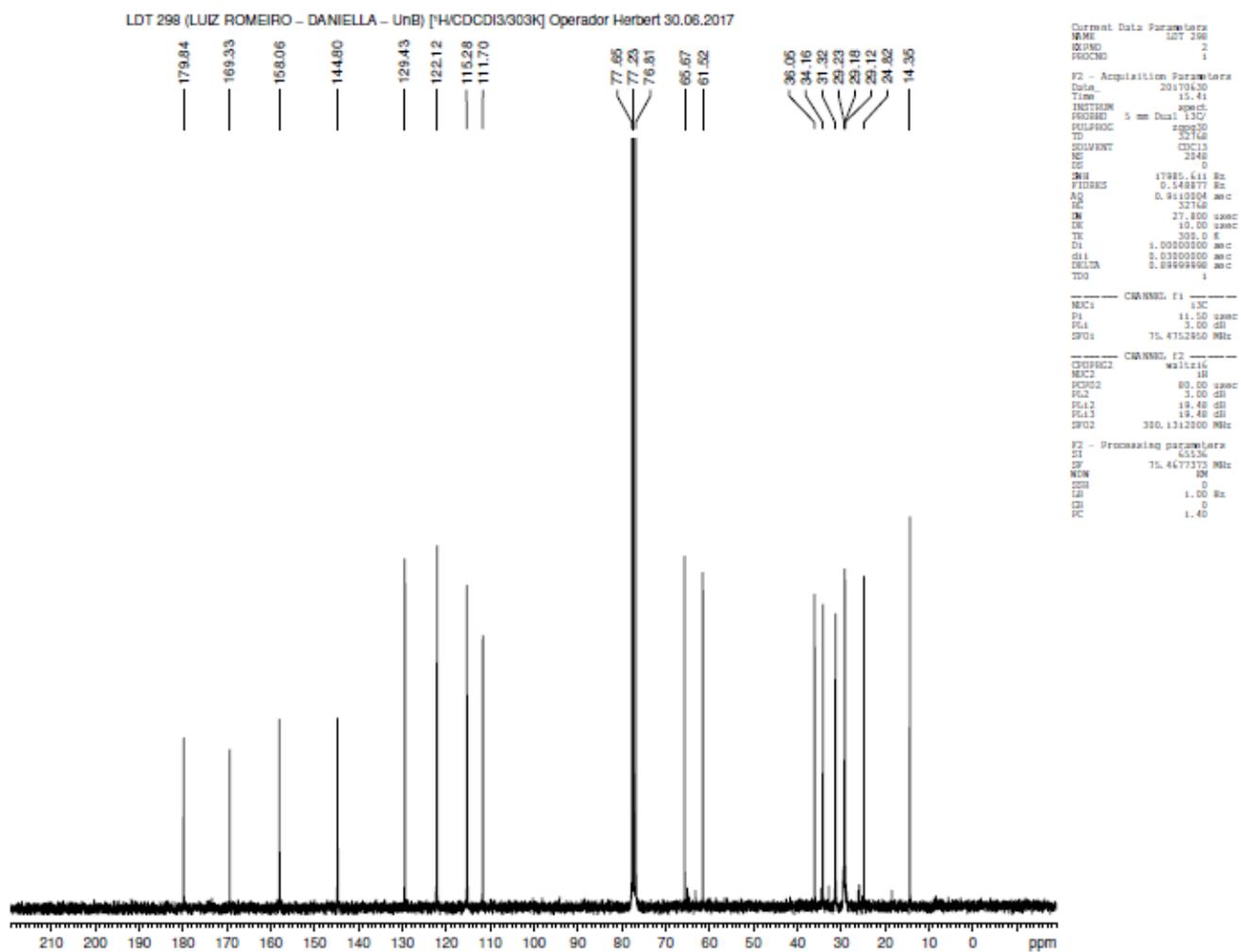
ANEXO 10– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Expansão);
 Ácido 8-(3-Carboetoximetóxilfenil)octanóico (**LDT298**, **32**)



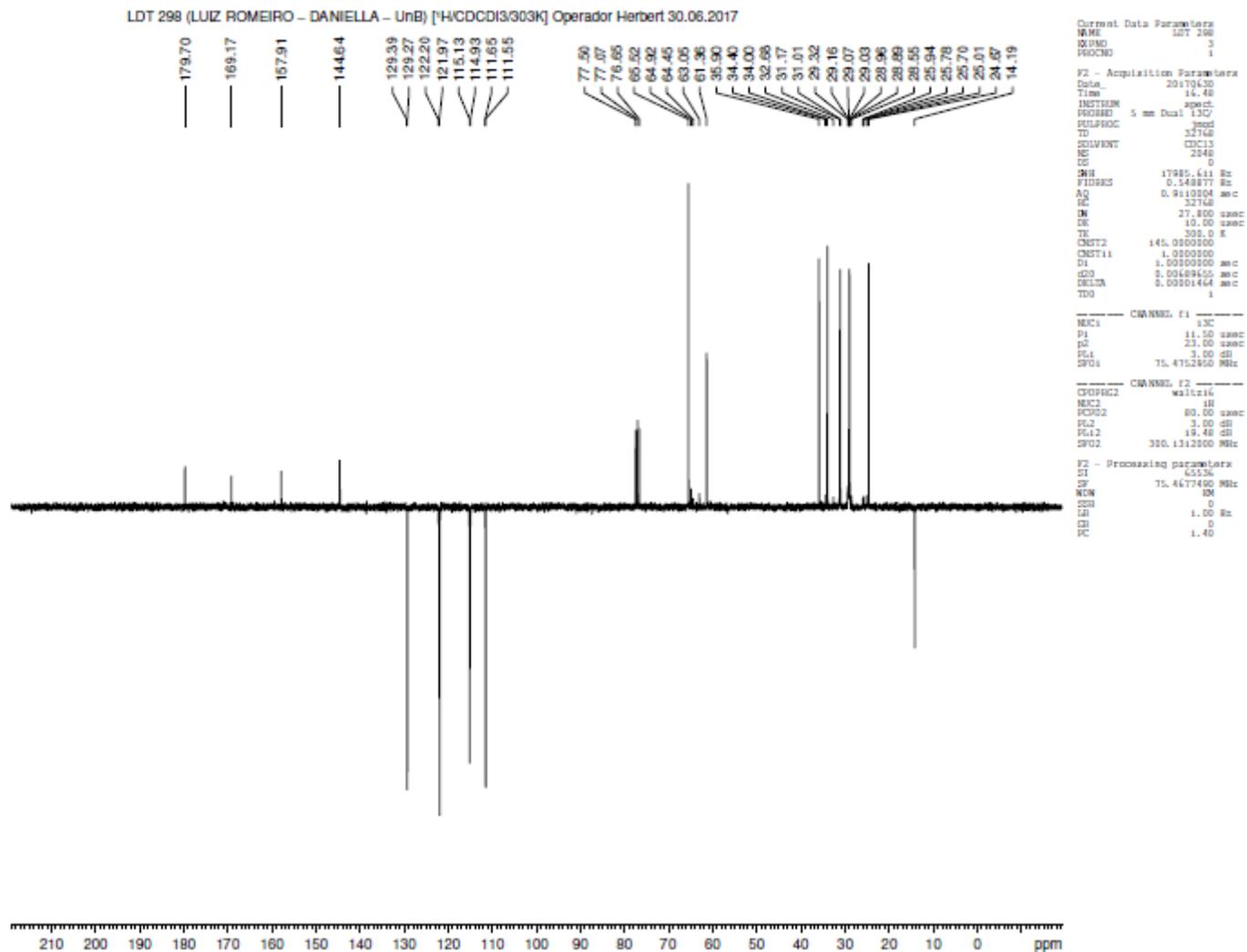
ANEXO 11– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Expansão);
 Ácido 8-(3-Carboetoximetóxilfenil)octanóico (**LDT298**, **32**)



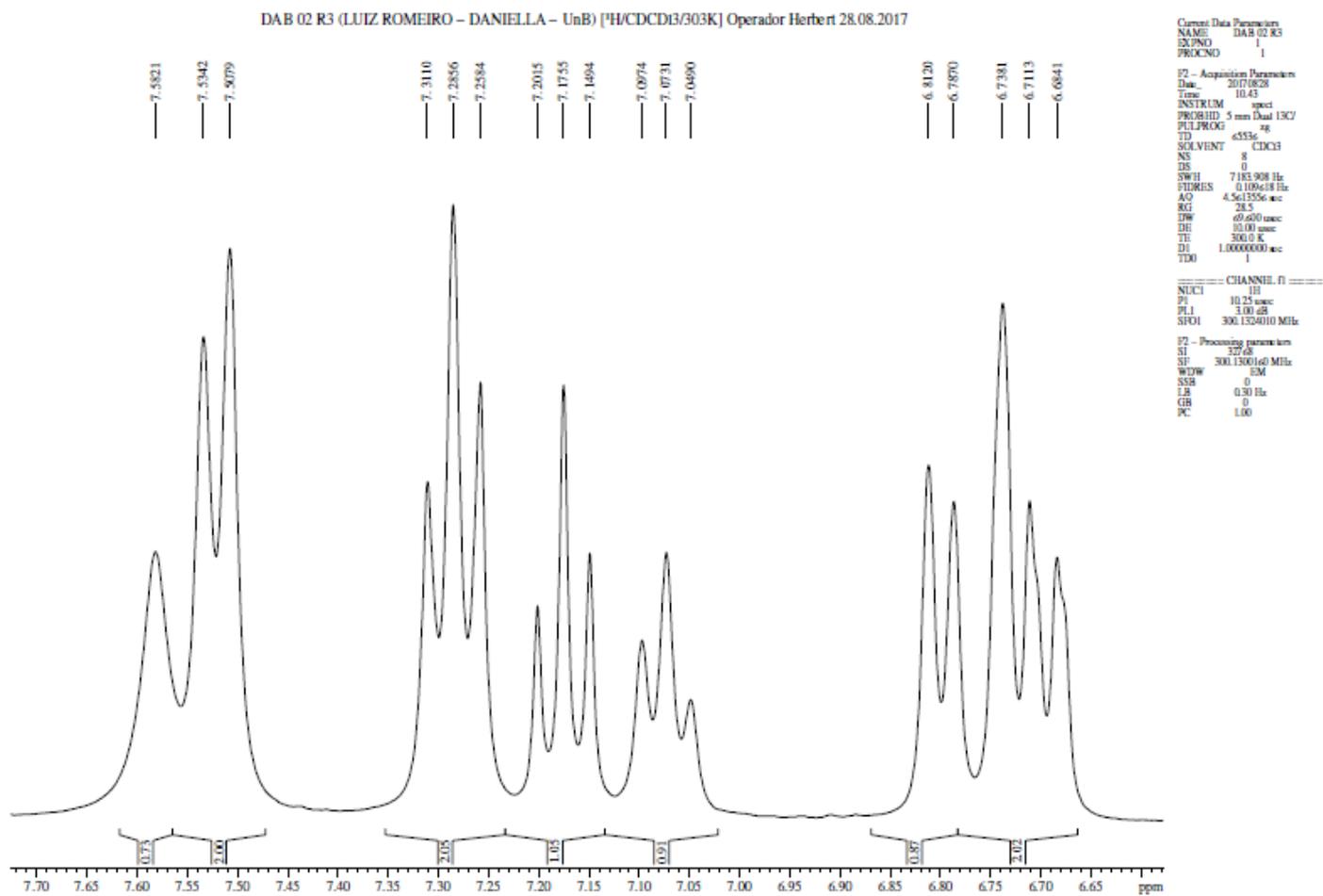
ANEXO 12– Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3);
 Ácido 8-(3-Carboetoximetóxilfenil)octanóico (**LDT298**, **32**)



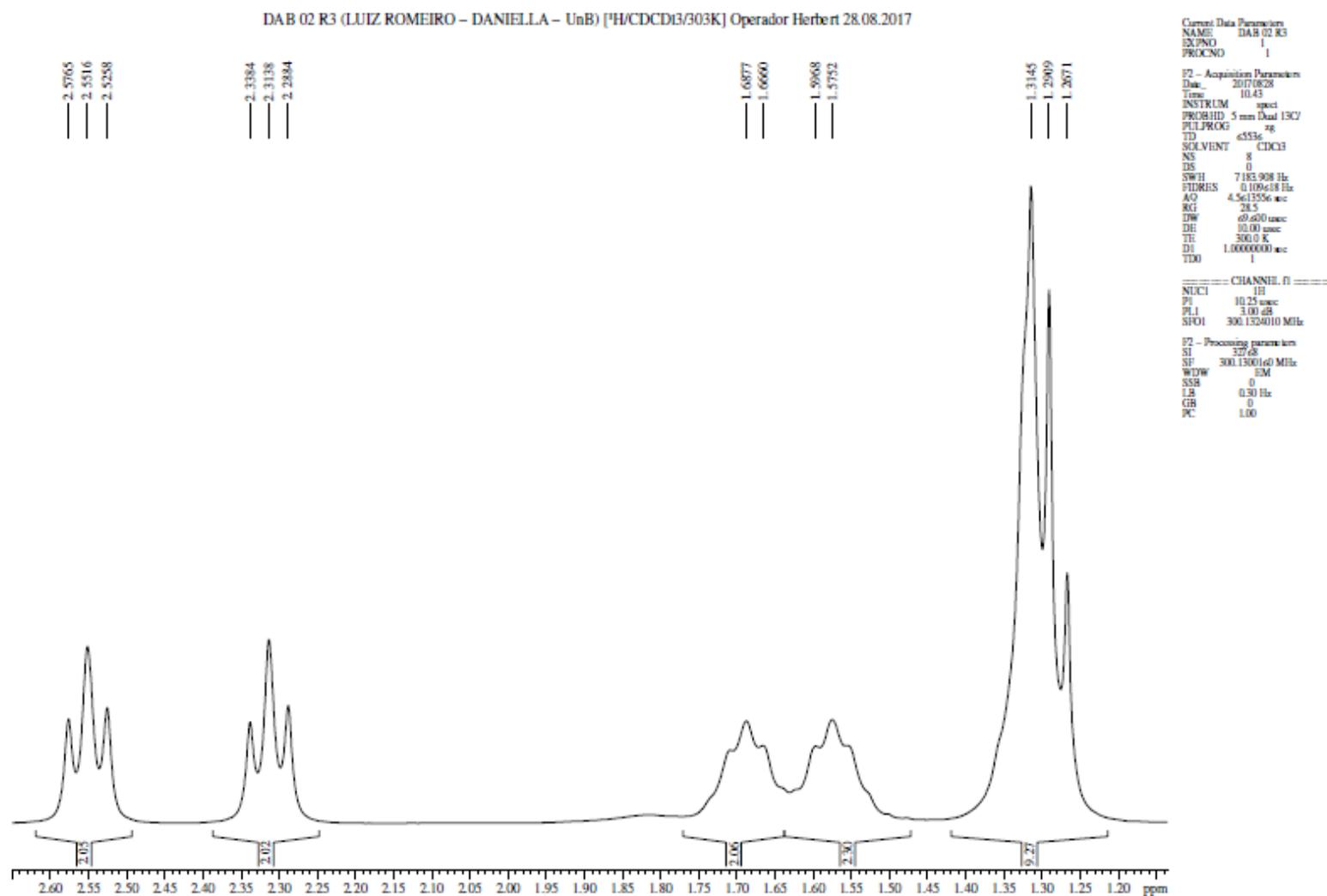
ANEXO 12– Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Expansão);
 Ácido 8-(3-Carboetoximetóxilfenil)octanóico (LDT298, **32**)



ANEXO 14– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT700 (**33**)

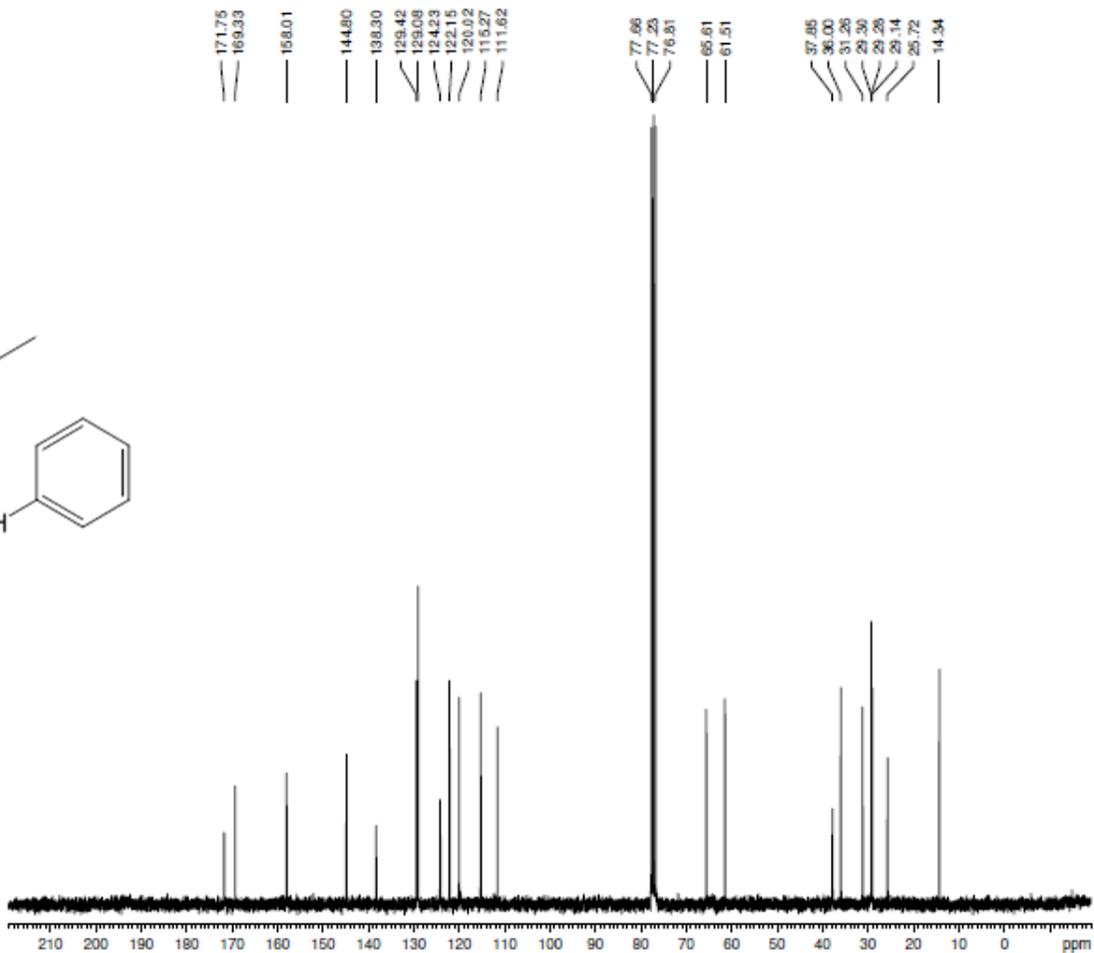
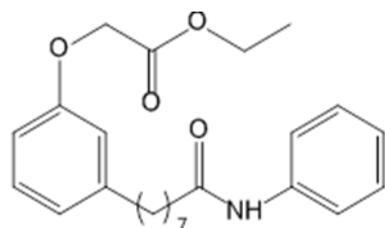


ANEXO 15– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT700 (**33**)



ANEXO 16– Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
LDT700 (33)

DAB 02 R3 (LUIZ ROMEIRO – DANIELLA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operator Herbert 28.08.2017



```

Current Data Parameters
NAME      DAB 02 R3
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20170828
Time     11.17
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       0
SWH      17985.414 Hz
FIDRES   0.1488777 Hz
AQ       0.9110004 sec
RG       32768
IN       37.800 usec
DE       10.00 usec
TE       303.2 K
D1       1.0000000 sec
d11      2.0300000 sec
DELTA    2.8999999 sec
TD0      1

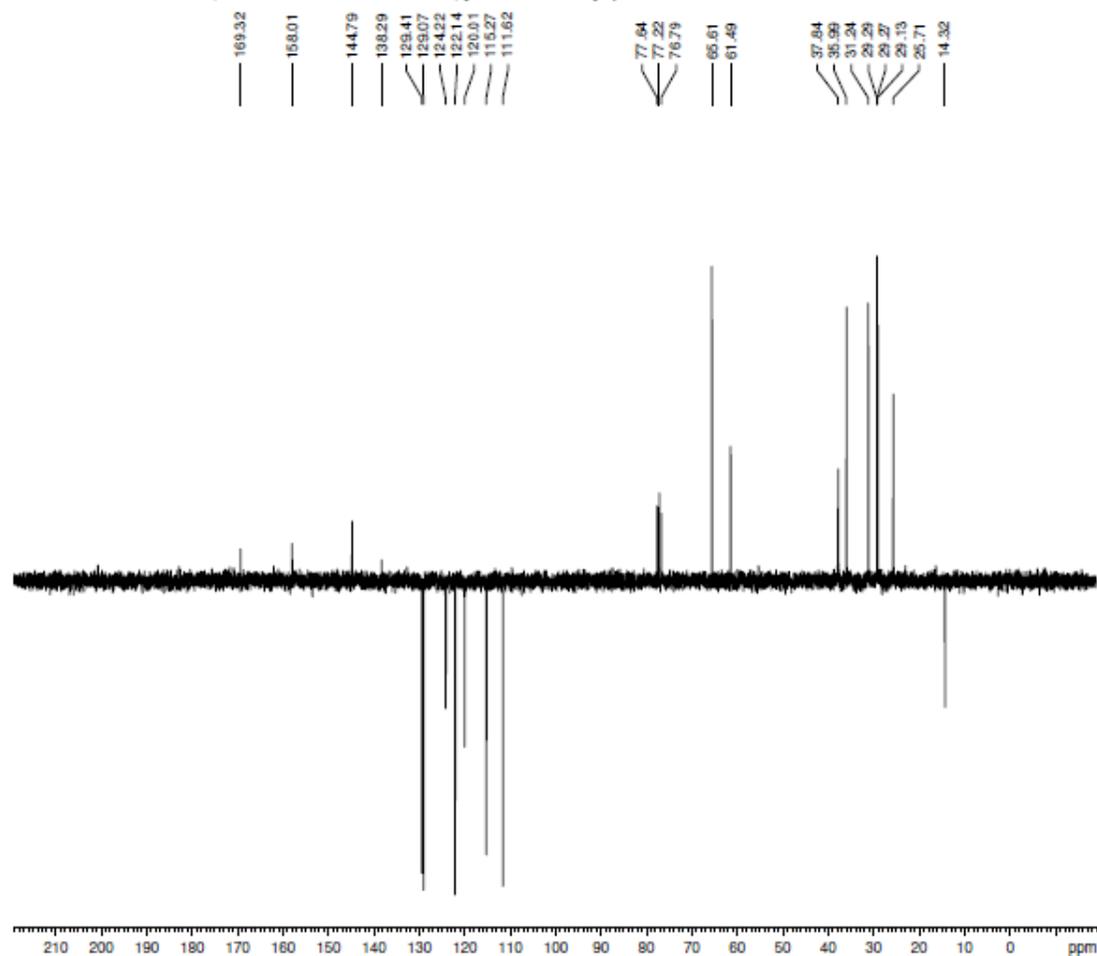
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1       11.00 usec
PL1      3.00 dB
SFO1     75.4752460 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    80.00 usec
PL2      3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2     300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        42936
SF       75.4677301 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
CB       0
PC       1.40
  
```

**ANEXO 17– Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT700 (33)**

DAB 02 R3 (LUIZ. ROMEIRO – DANIELLA – UnB) [APT/CDCl3/303K] Operador Herbert 28.08.2017



```
Current Data Parameters
NAME      DAB 02 R3
EXPNO    3
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20170828
Time      11.50
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         1024
DS         0
SWH        17985.611 Hz
FIDRES    0.148877 Hz
AQ         0.911000 sec
RG         32768
SM         27.800 spm
SFO        101.626 MHz
TE         300.2 K
CHST2     145.000000
CHST11    1.000000
DI         1.0000000 sec
AQO        0.0069462 sec
DELTA     0.0000464 sec
TDO        1

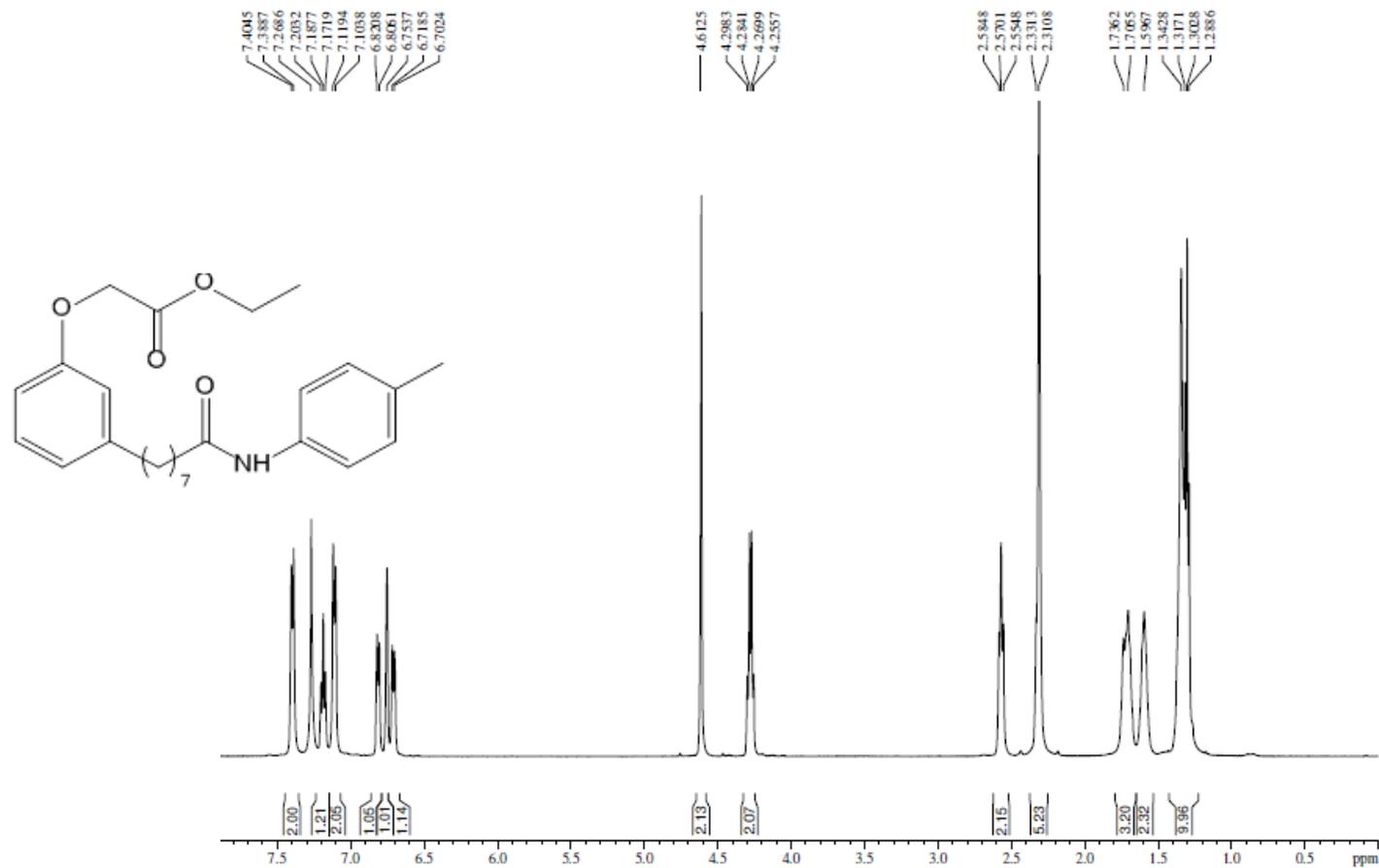
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13C
P1         11.50 spm
PC1        23.00 spm
PL1        0.00 dB
SFO1       75.4752650 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CHPROG2   waltz16
NUC2       1H
PCPG2      60.00 spm
PL2        0.00 dB
PL12       19.40 dB
SFO2       300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         75.4677107 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
CB         0
PC         1.40
```

**ANEXO 18 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
LDT701 (34)**

DAB 04 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT – 18.10.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 04
EXPNO 1
PROCNO 1

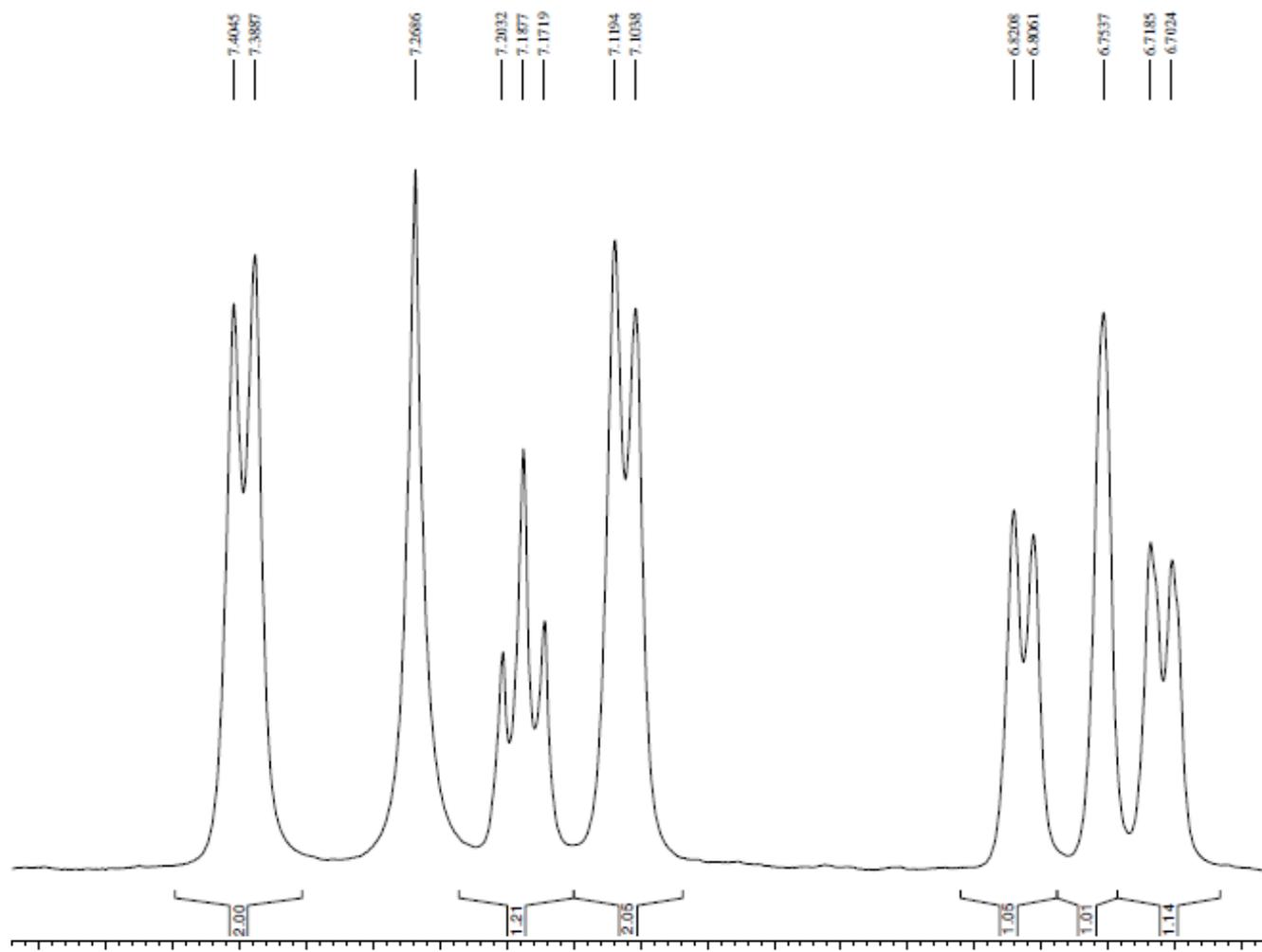
F2 - Acquisition Parame
Date_ 20171018
Time 8.54
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632 Hz
AQ 3.1719923 sec
RG 101.6
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing parame
SI 32768
SF 499.6000191 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 19 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT701 (34)**

DAB 04 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT – 18.10.2017



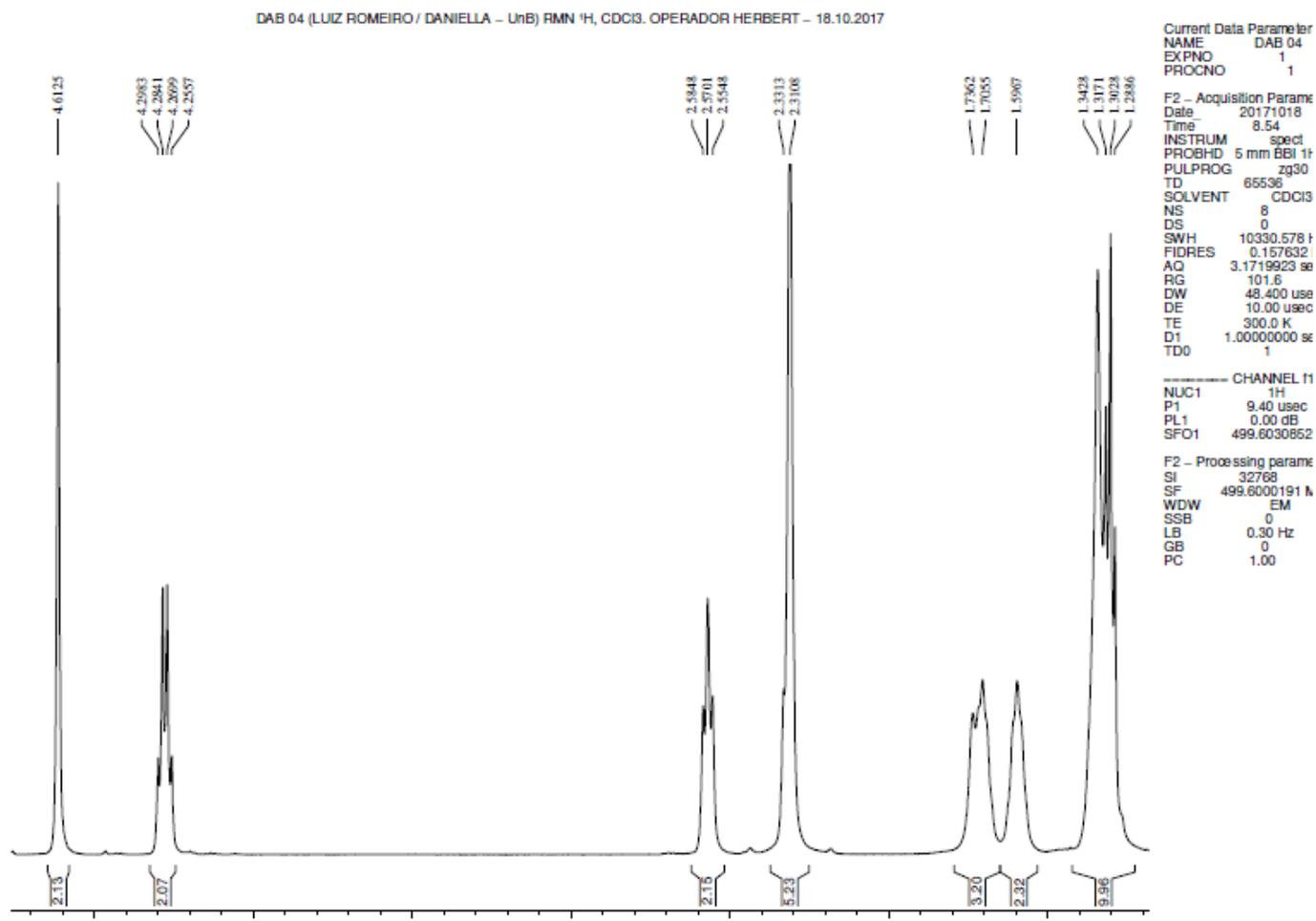
Current Data Parameter
NAME DAB 04
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parame
Date 20171018
Time 8.54
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1+
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632
AQ 3.1719923 sec
RG 101.6
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

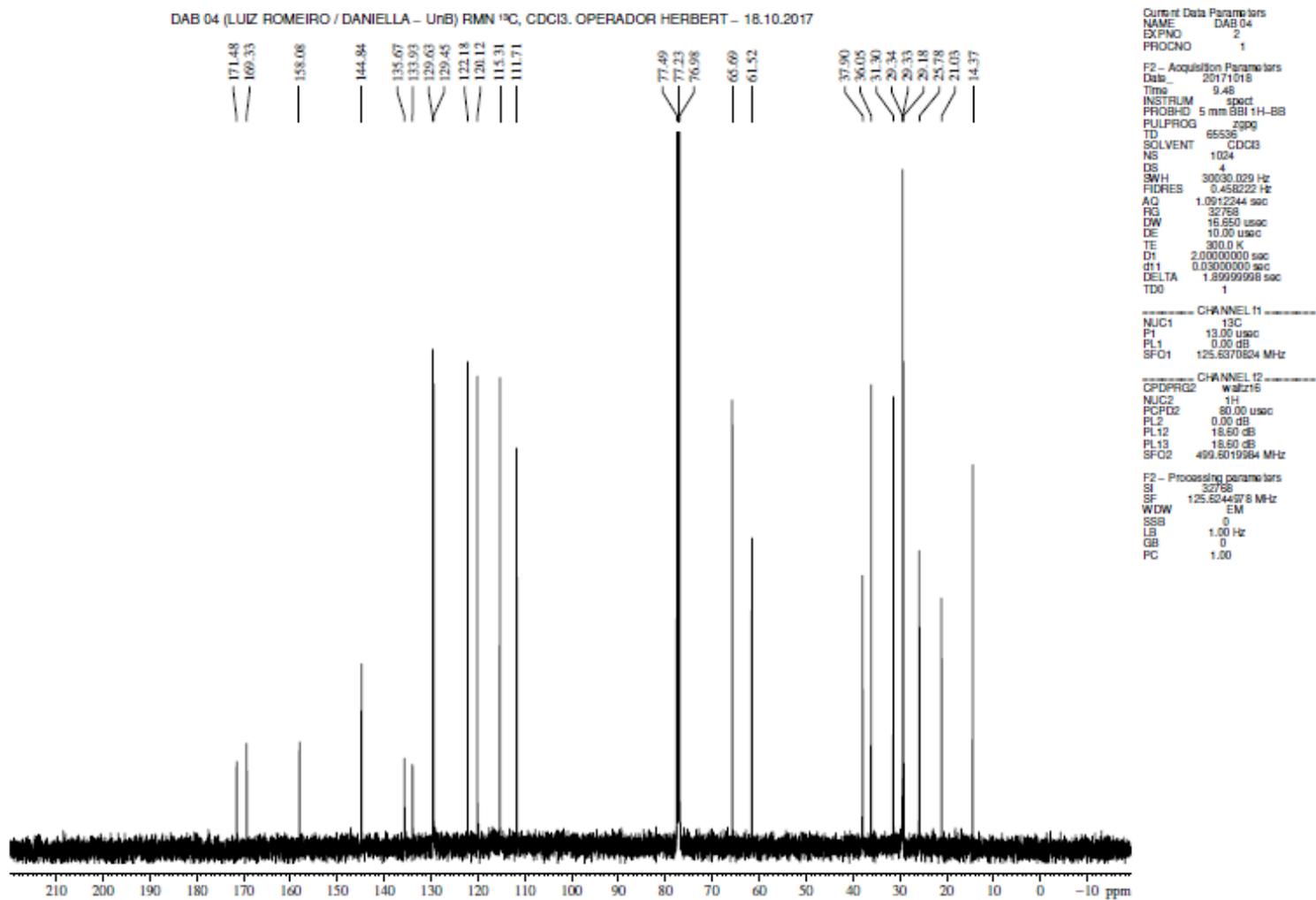
CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing parame
SI 32768
SF 499.6000191 Hz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

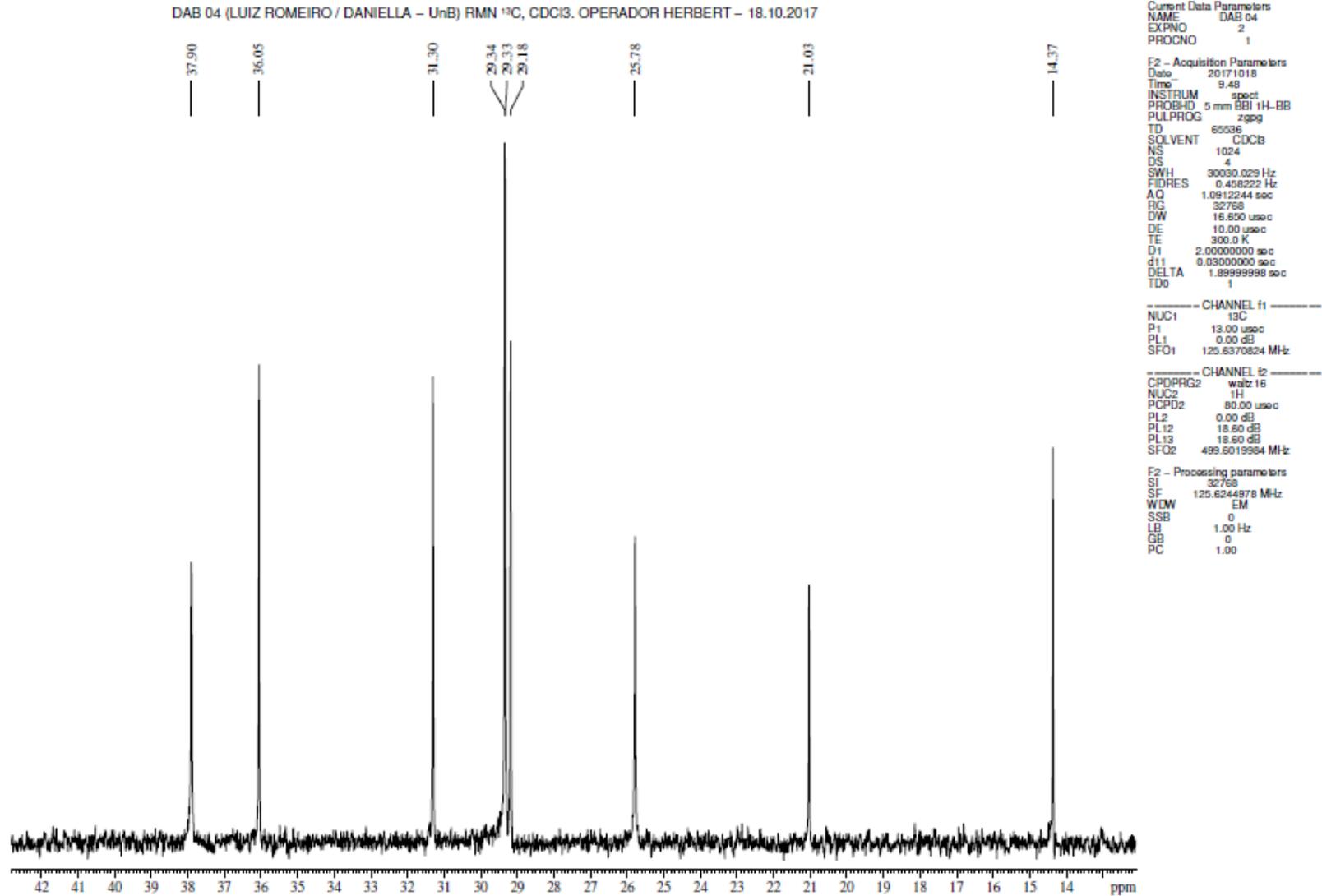
**ANEXO 20 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT701 (34)**



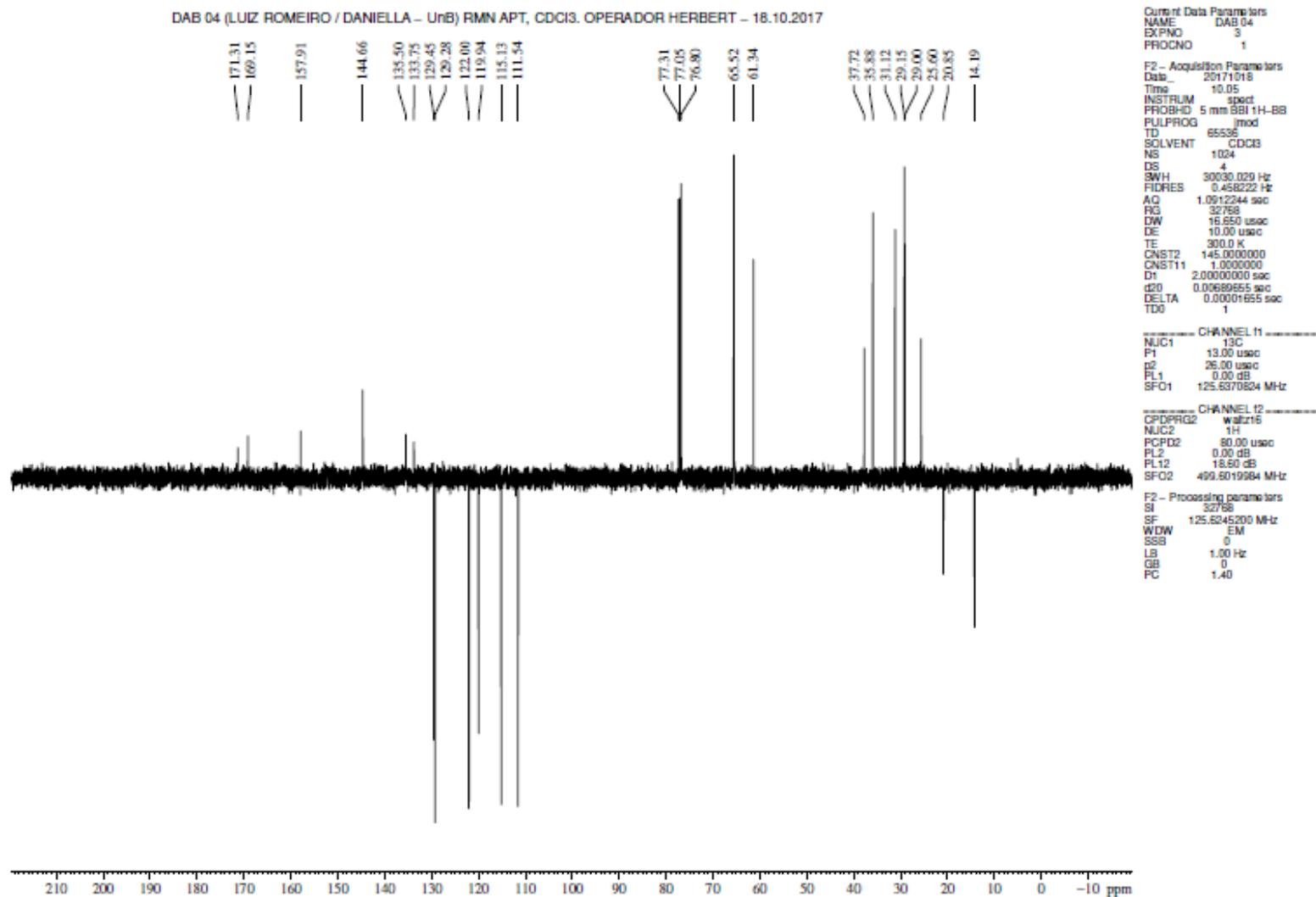
ANEXO 21 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3):
LDT701 (34)



**ANEXO 22 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT701 (34)**

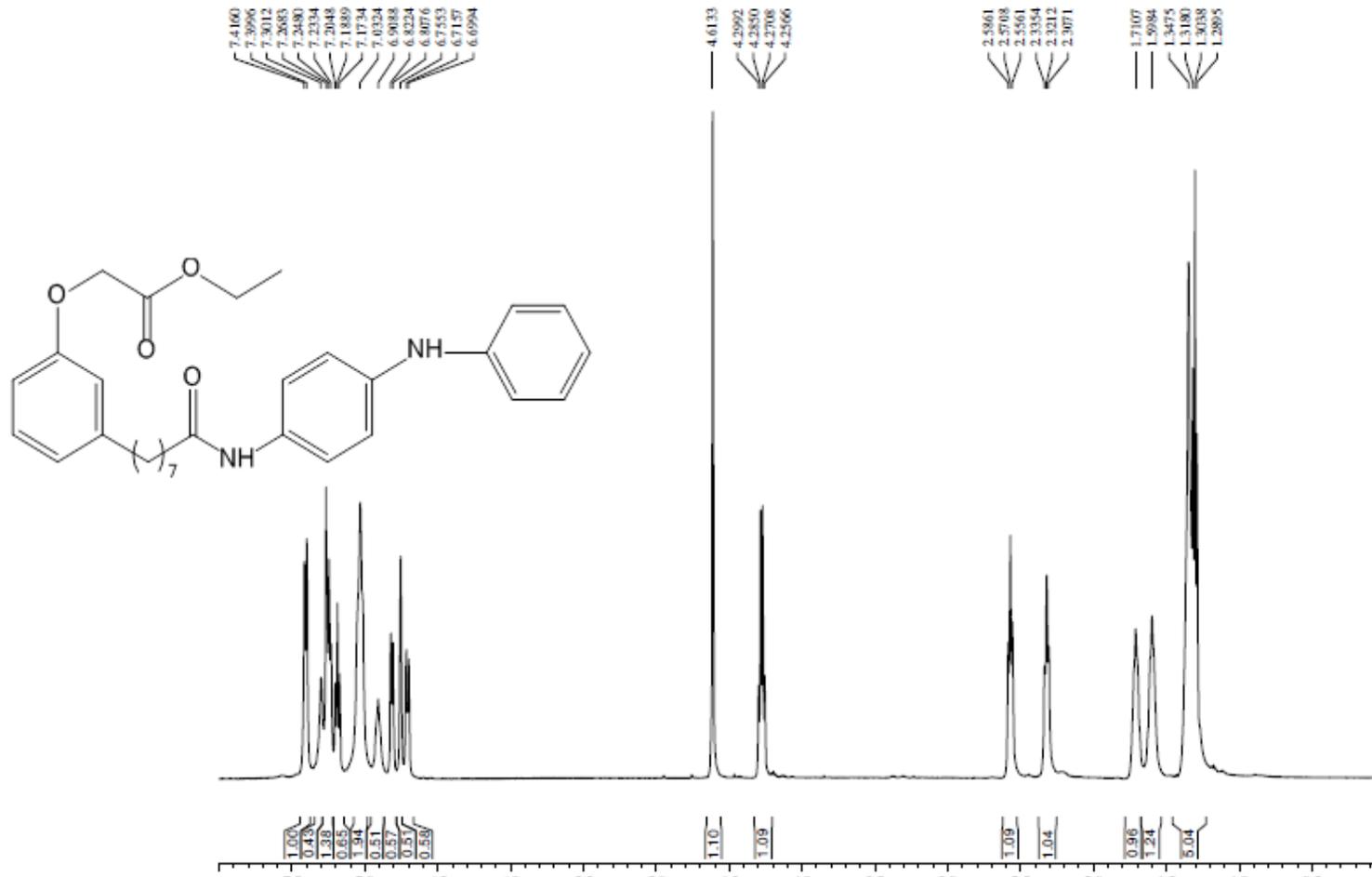


ANEXO 23 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT701 (34)



ANEXO 24– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
LDT702 (**35**)

DAB 05 (LUIZ ROMEIRO/ DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT – 10.10.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 05
EXPNO 1
PROCNO 1

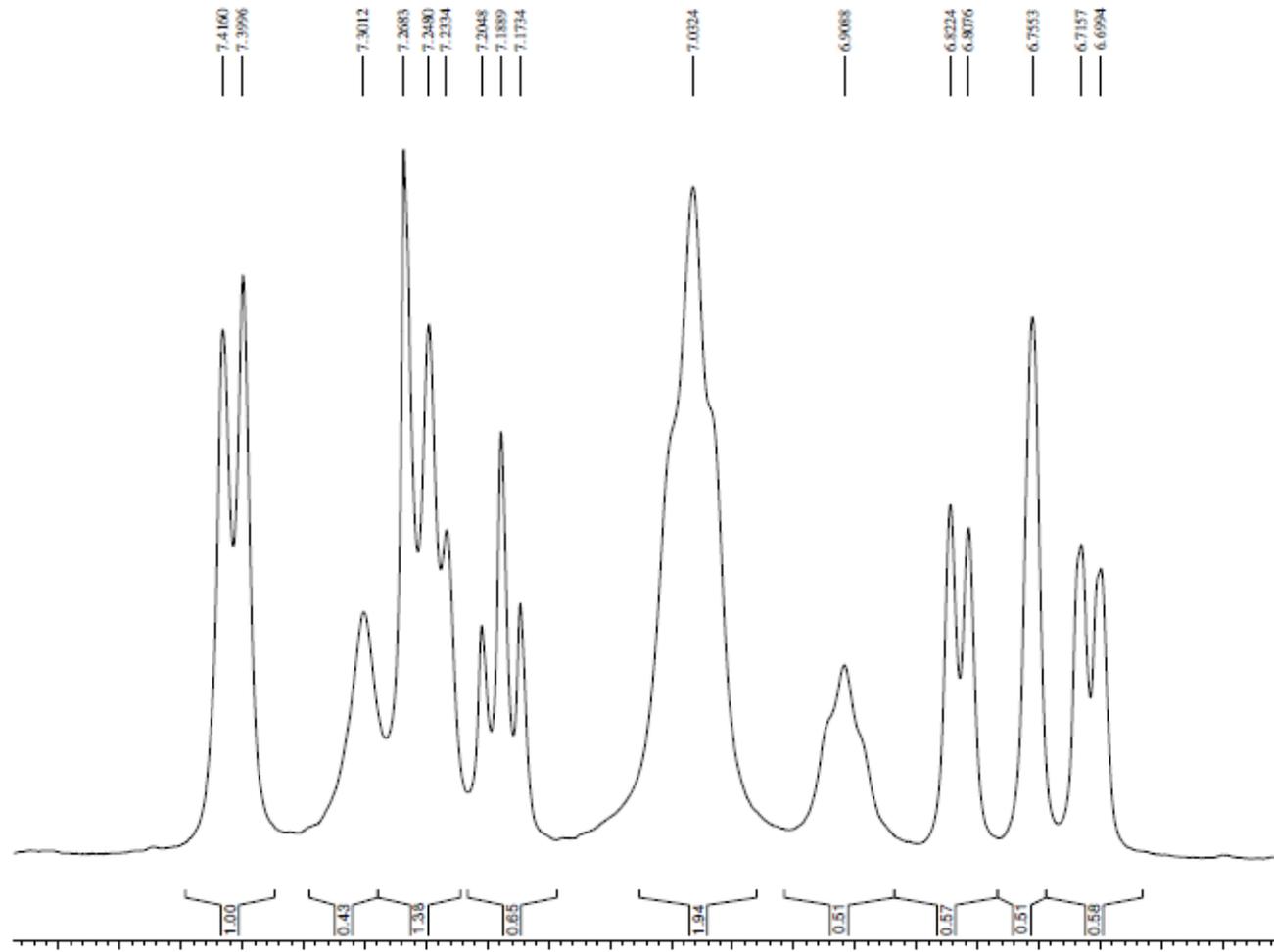
F2 - Acquisition Parameter
Date 20171010
Time 8.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1†
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 †
FIDRES 0.157632 †
AQ 3.1719923 †
RG 128
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 †
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing parameter
SI 32768
SF 499.6000191 †
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 25– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT702 (35)

DAB 05 (LUIZ ROMERO / DANIELLA - UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT - 10.10.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 05
EXPNO 1
PROCNO 1

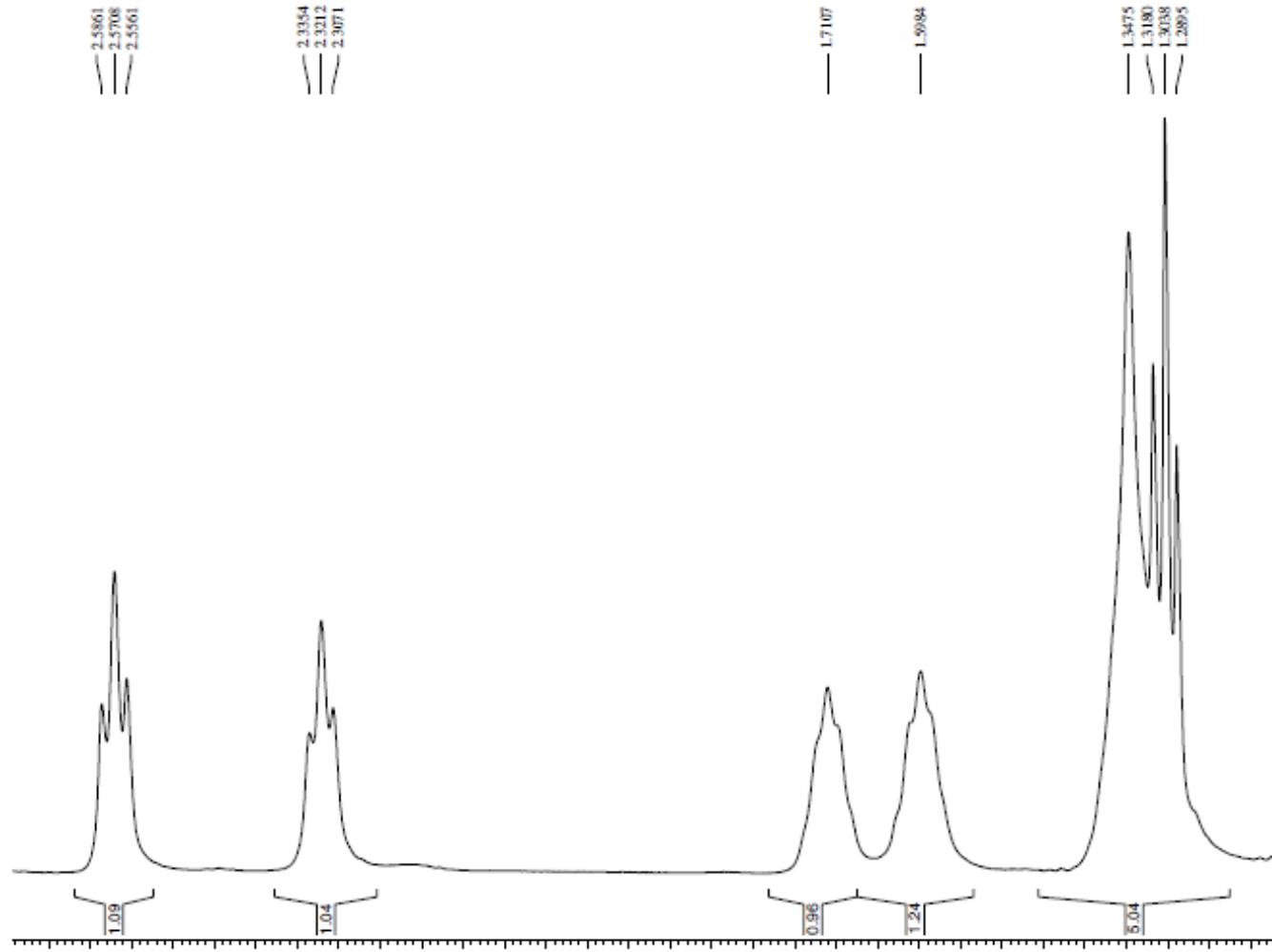
F2 - Acquisition Parameter
Date_ 20171010
Time 8.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1+
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632 Hz
AQ 3.1719923 sec
RG 128
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852 MHz

F2 - Processing parameter
SI 32768
SF 499.6000191 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 26– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT702 (35)

DAB 05 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT – 10.10.2017



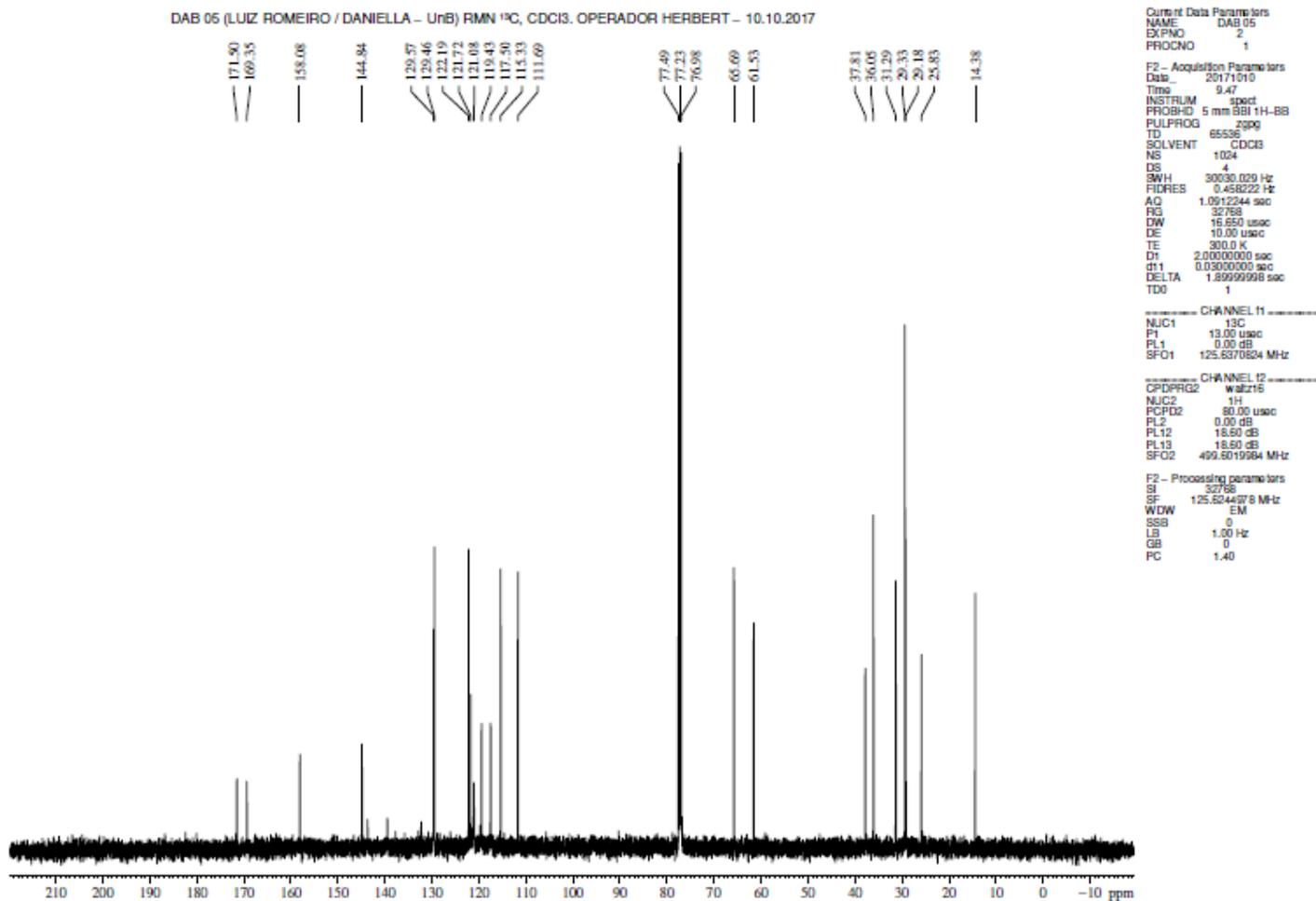
Current Data Parameter
NAME DAB 05
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Param
Date 20171010
Time 8.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632
AQ 3.1719923 sec
RG 128
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

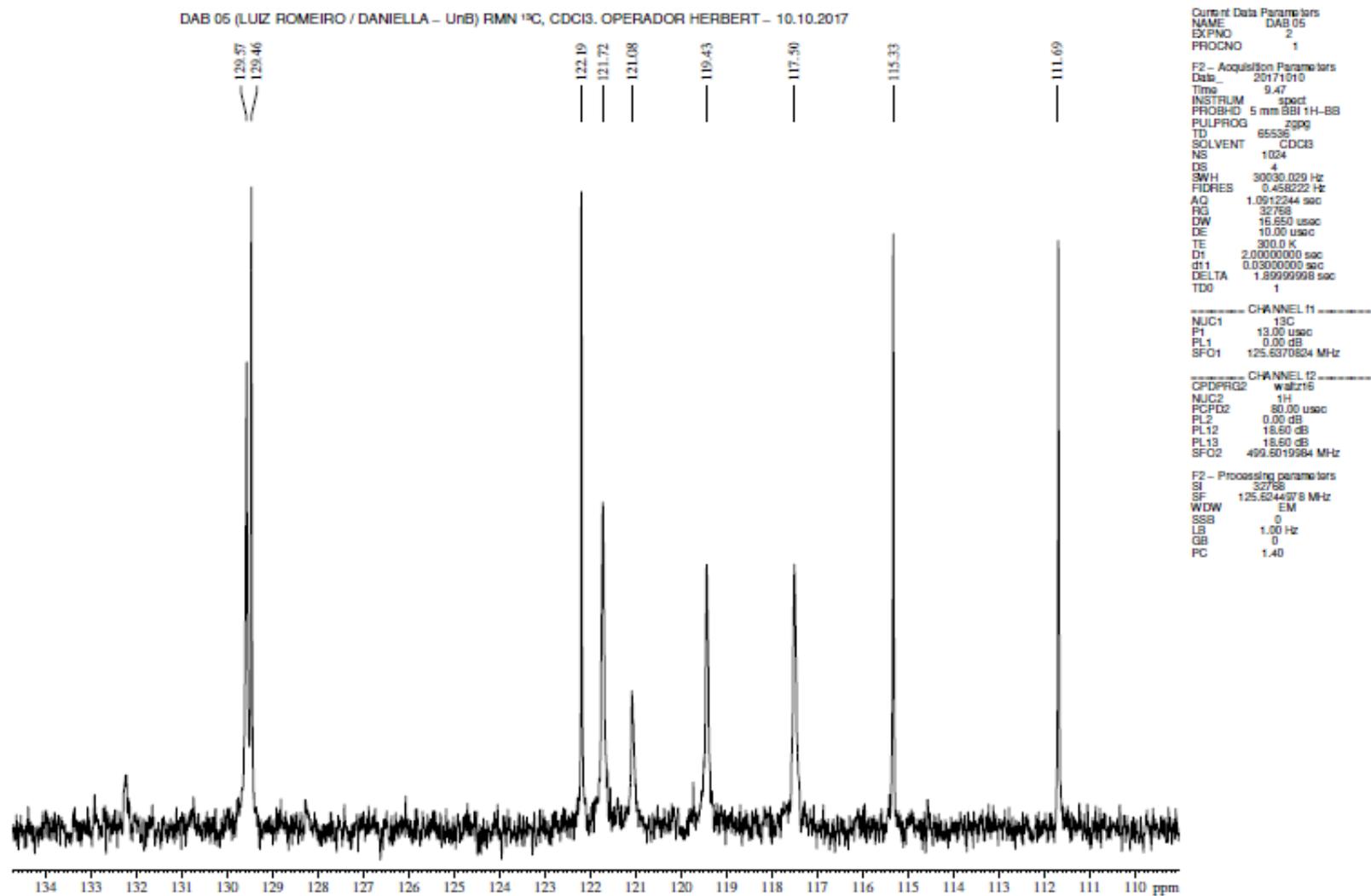
CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing param
SI 32768
SF 499.6000191 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

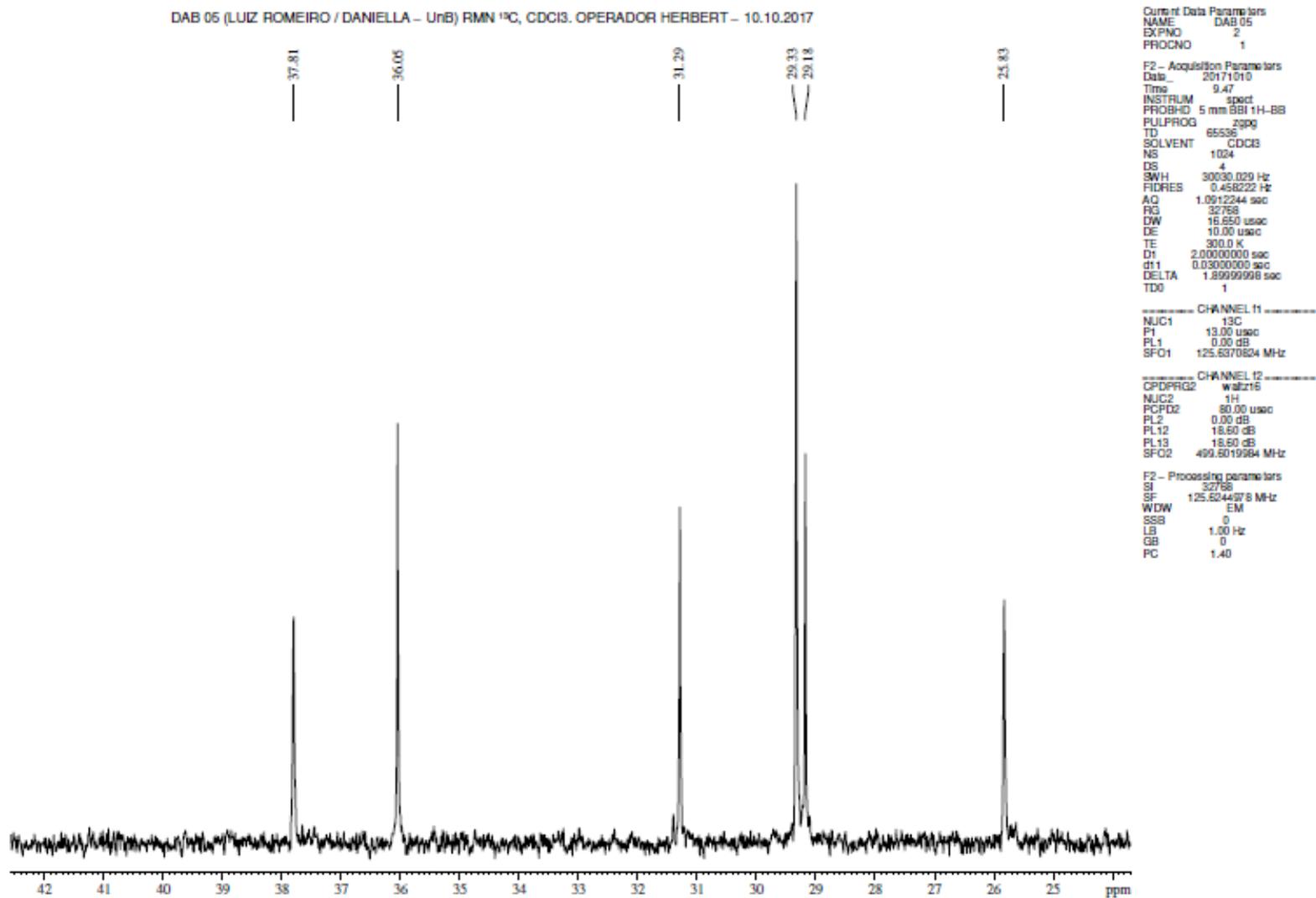
ANEXO 27 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3):
LDT702 (36)



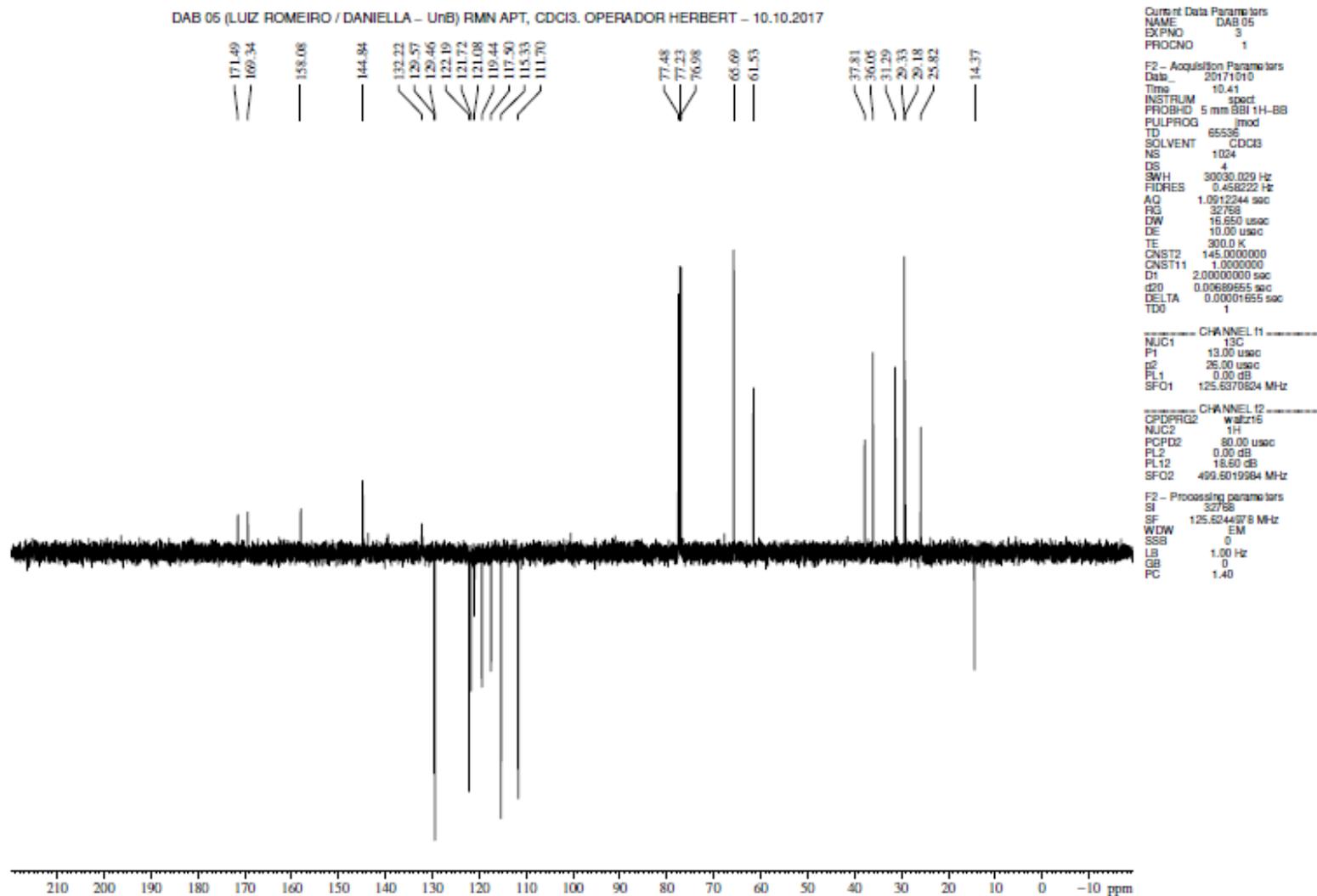
ANEXO 28 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT702 (36)



ANEXO 29 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT702 (**36**)

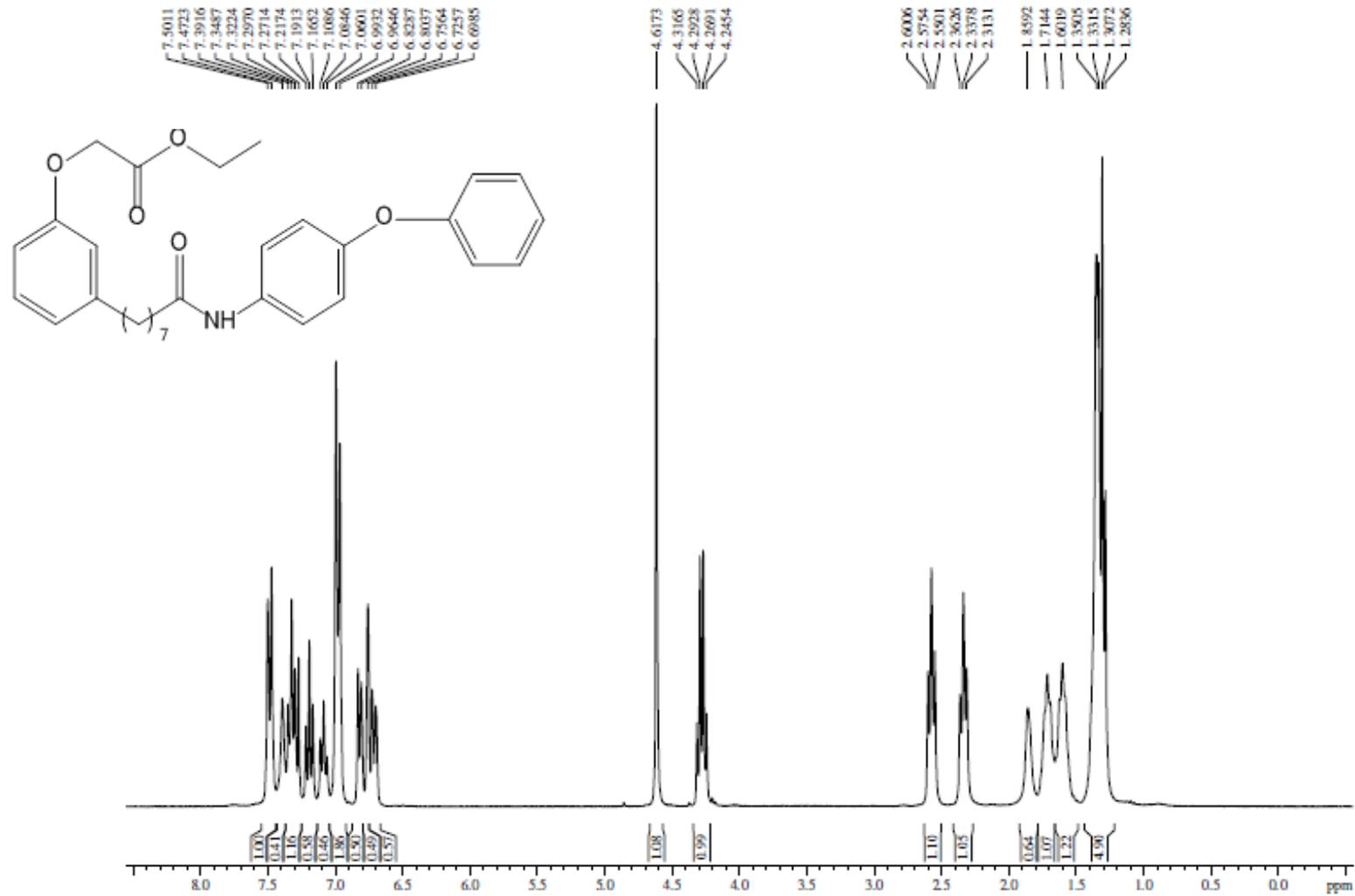


ANEXO 30 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT702 (36)



ANEXO 31– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
LDT703 (**37**)

DAB 08 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) [$^1\text{H}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 16.10.2017



```

Current Data Parameters
NAME: DAB 08
EXPNO: 1
PROCNO: 1

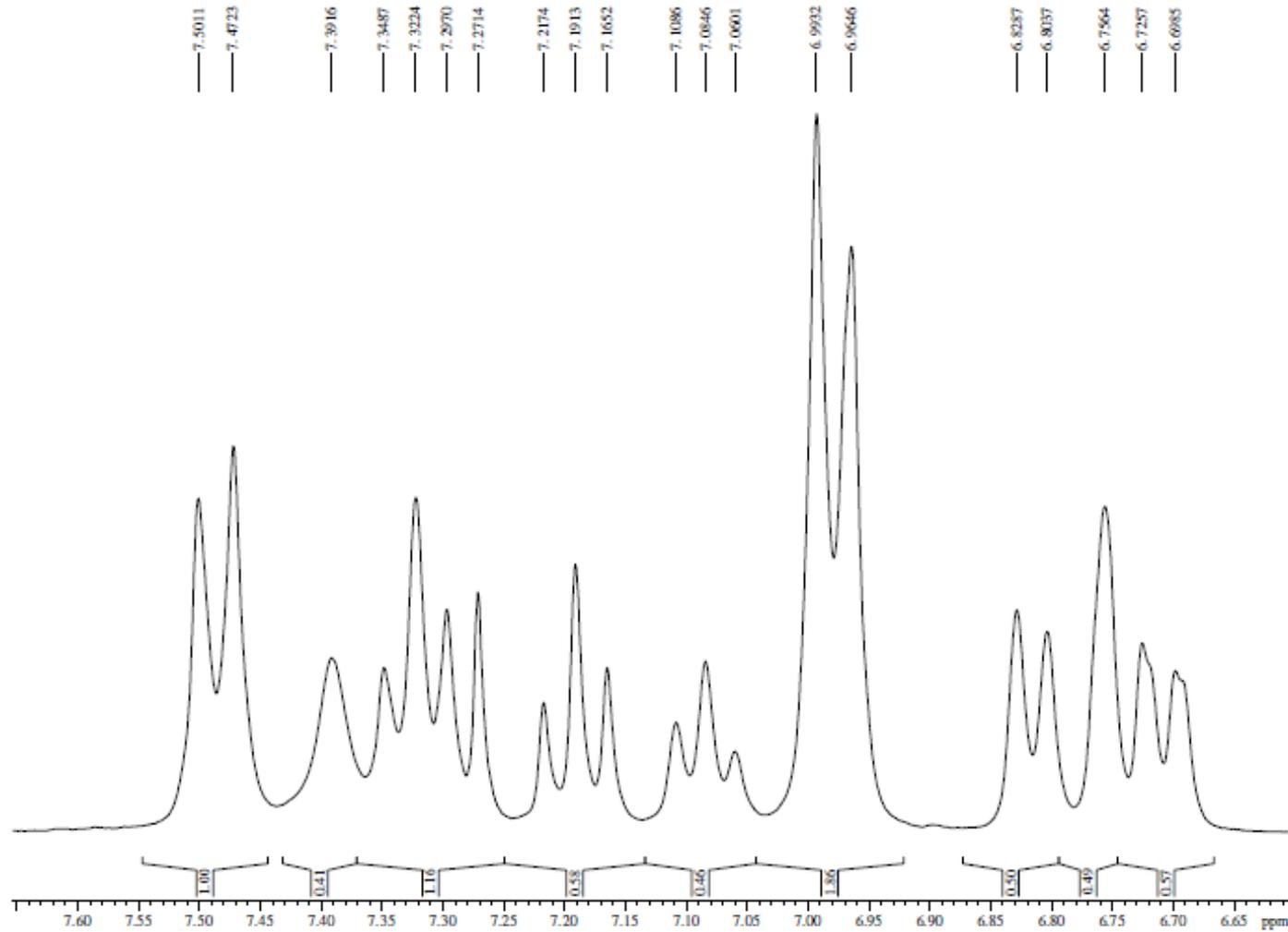
F2 - Acquisition Parameters
Date_ : 20171016
Time : 9.44
INSTRUM : spect
PROBHD : 5 mm Dnat 13C/
PULPROG : zgpg
TD : 65536
SOLVENT : CDCl3
NS : 8
DS : 0
SWH : 7183.908 Hz
FIDRES : 0.108618 Hz
AQ : 4.5613556 sec
RG : 50.8
DW : 69.600 nsec
DE : 0.00 nsec
TE : 300.0 K
D1 : 1.0000000 sec
TDO : 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 : 1H
P1 : 10.25 nsec
PL1 : 3.00 dB
SFO1 : 300.132010 MHz

F2 - Processing parameters
SI : 32768
SF : 300.1300121 MHz
WDW : EM
SSB : 0
LB : 0.30 Hz
GB : 0
PC : 1.00
  
```

ANEXO 32– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT703 (**37**)

DAB 08 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) [$^1\text{H}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 16.10.2017



Current Data Parameters
NAME DAB 08
EXPNO 1
PROCNO 1

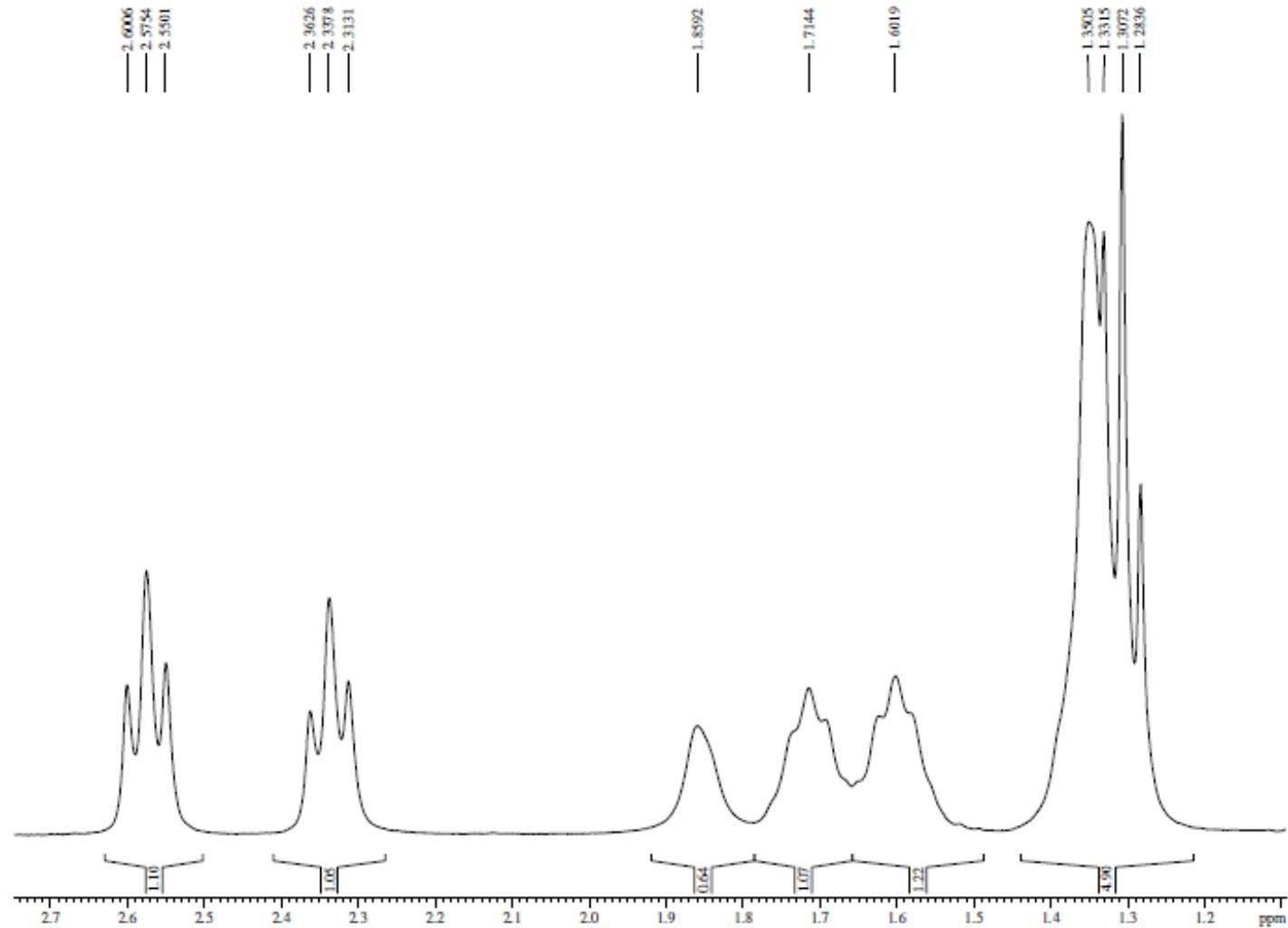
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171016
Time 9:44
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109418 Hz
AQ 4.561356 sec
RG 518
DWF 69.600 sec
DE 10.00 sec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 ====
NUC1 ^1H
P1 10.25 sec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300121 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 33– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT703 (**37**)

DAB 08 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) [$^1\text{H}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 16.10.2017



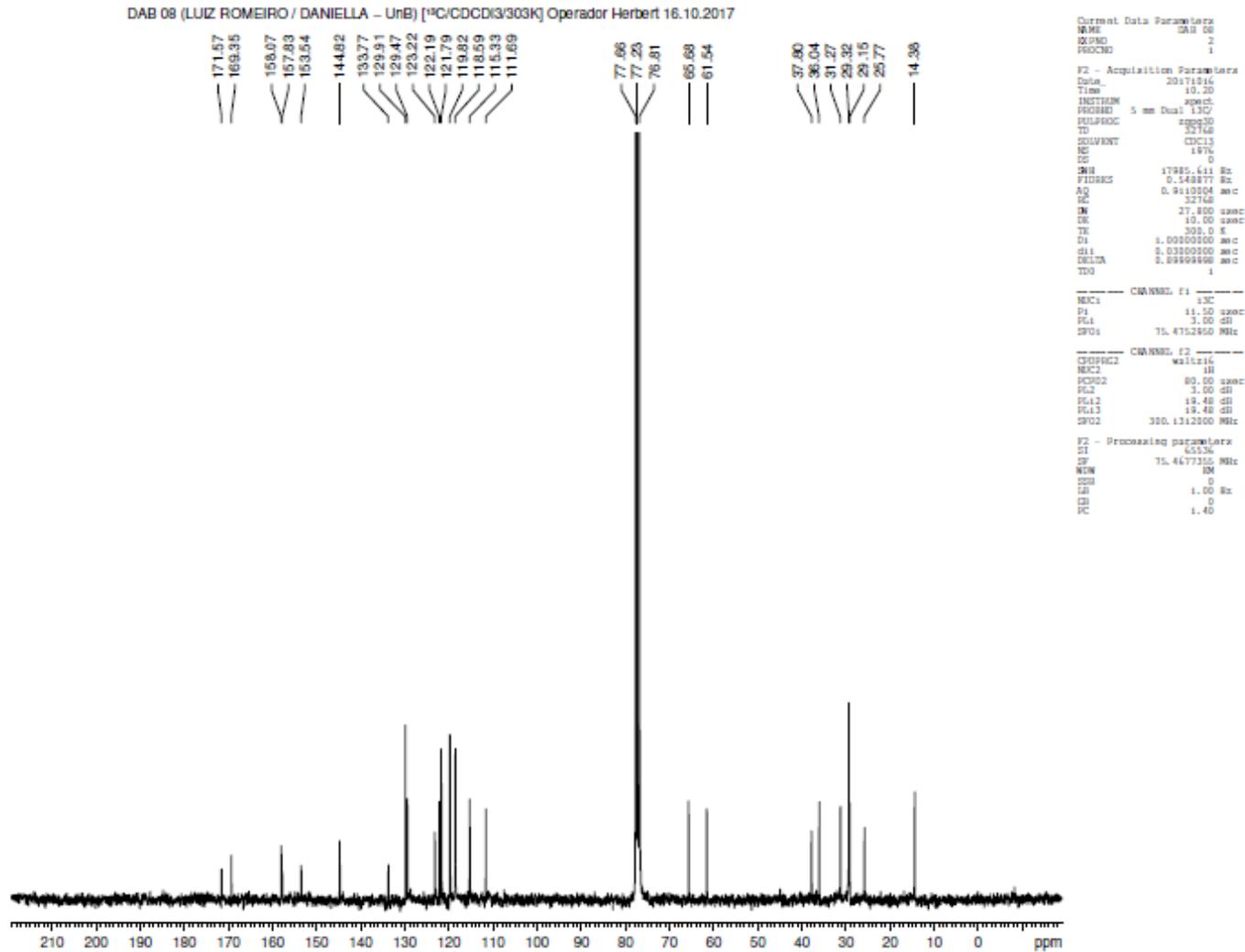
Current Data Parameters
NAME DAB 08
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171016
Time 9.44
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109618 Hz
AQ 4.5612556 sec
RG 512
DWT 69.600 msec
DE 10.00 msec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 sec
TDO 1

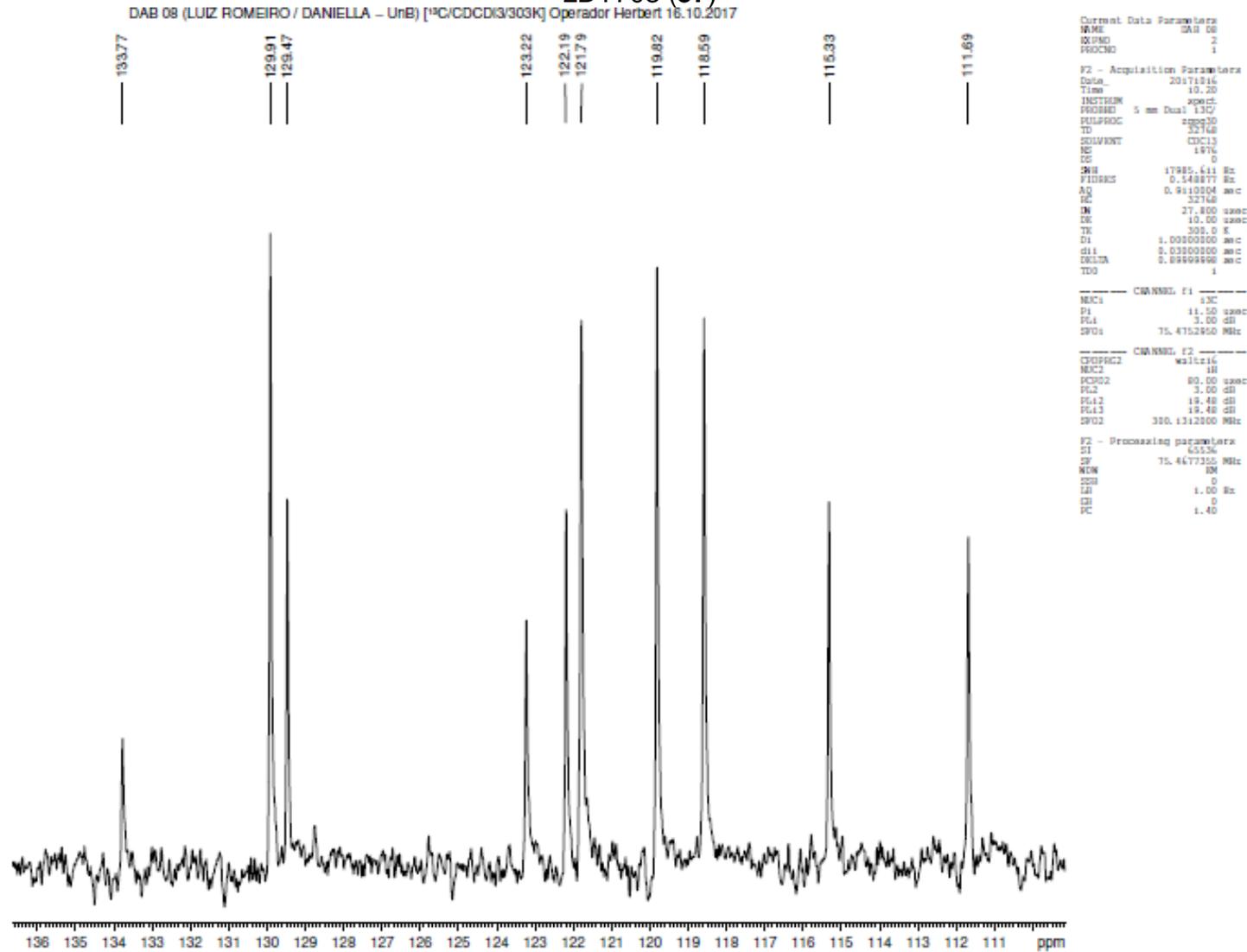
==== CHANNEL f1 ====
NUC1 1H
P1 10.25 msec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1354010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1354010 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.50 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 34 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
LDT703 (37)**

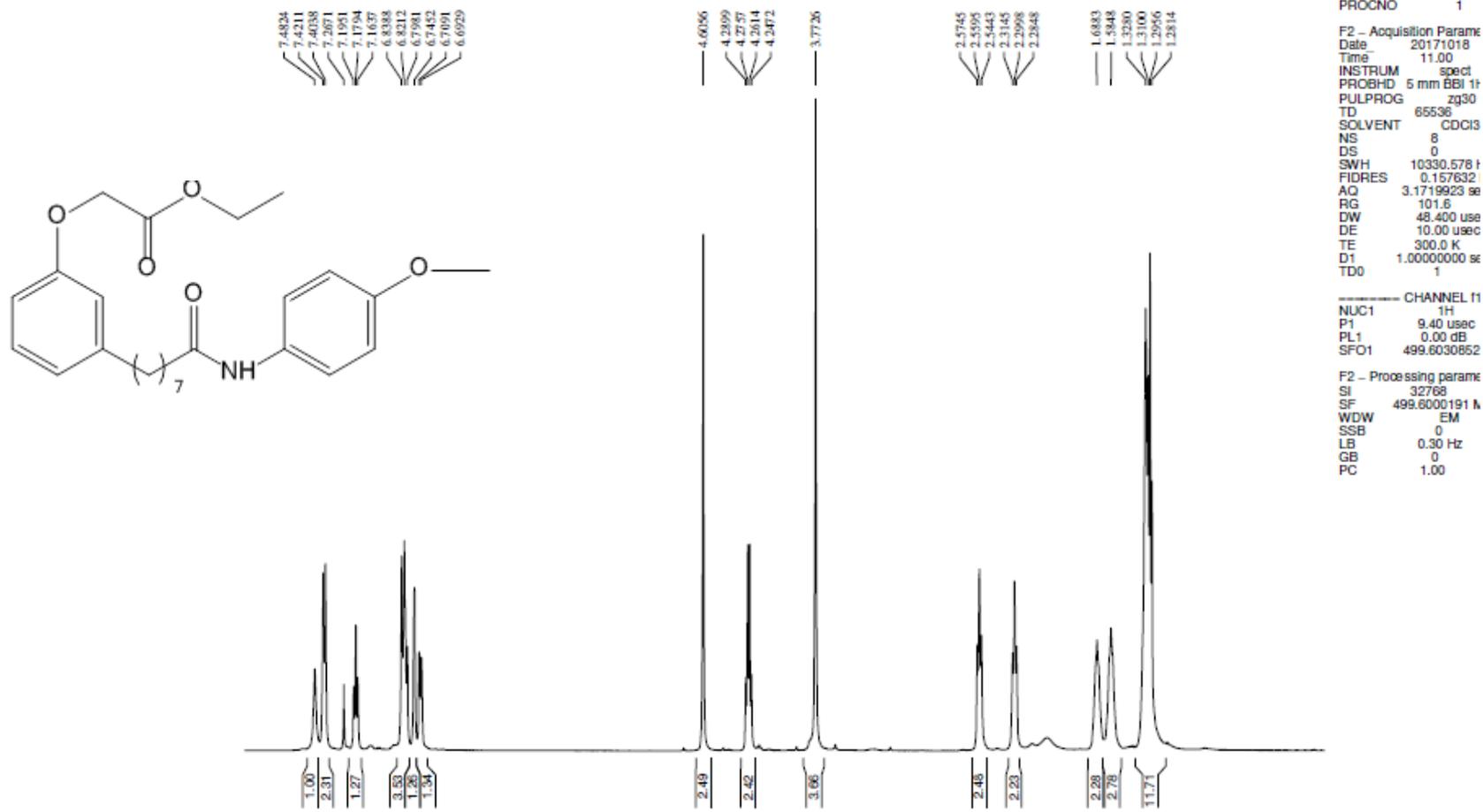


**ANEXO 35 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT703 (37)**



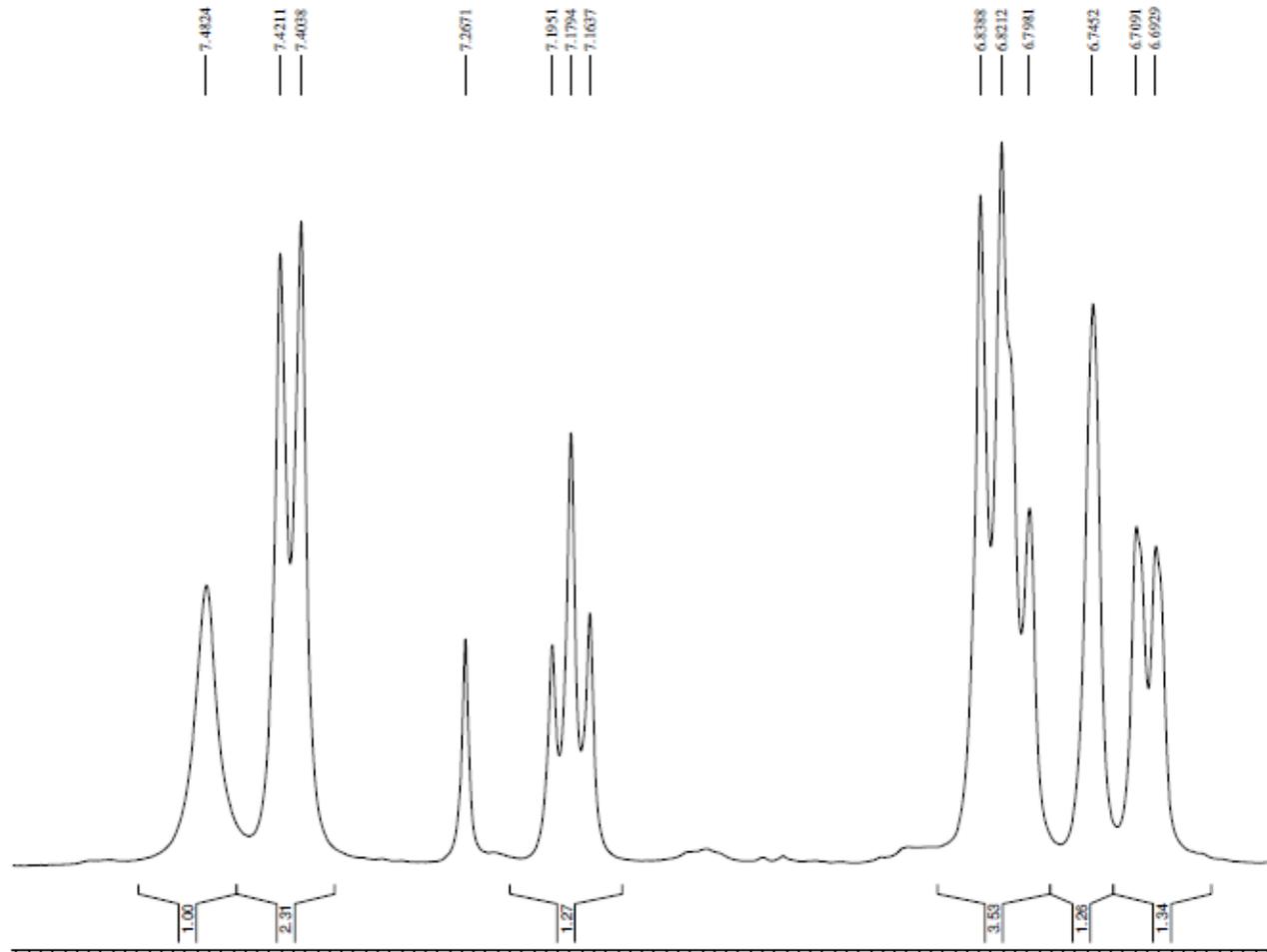
ANEXO 36– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
LDT704 (**38**)

DAB 09 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT – 18.10.2017



ANEXO 37– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 (Expansão):
LDT704 (38)

DAB 09 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 , OPERADOR HERBERT – 18.10.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 09
EXPNO 1
PROCNO 1

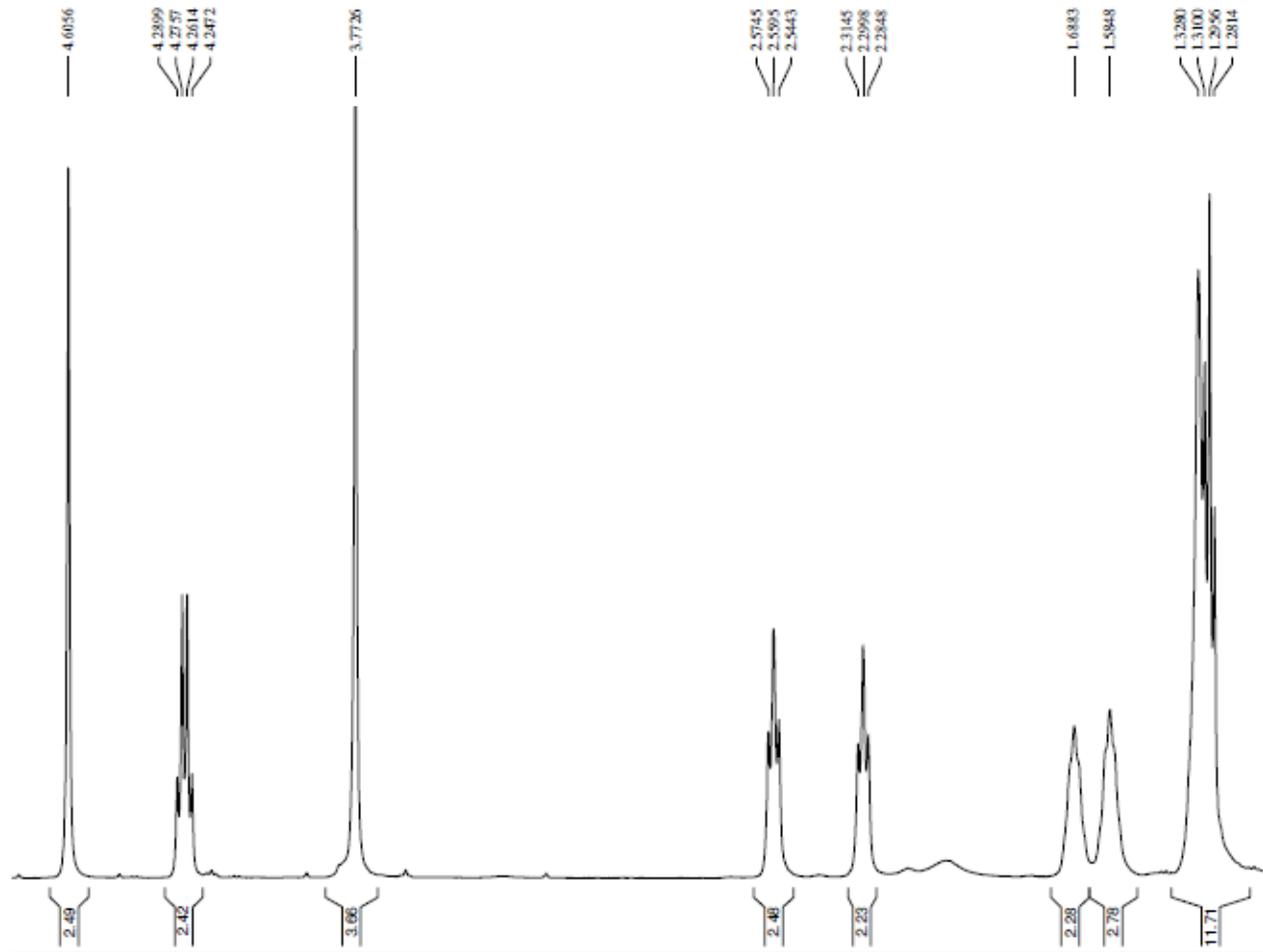
F2 - Acquisition Param
Date_ 20171018
Time 11.00
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1h
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632
AQ 3.1719923 sec
RG 101.6
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing param
SI 32768
SF 499.6000191 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 38– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 (Expansão):
LDT704 (**38**)

DAB 09 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , CDCl_3 . OPERADOR HERBERT – 18.10.2017



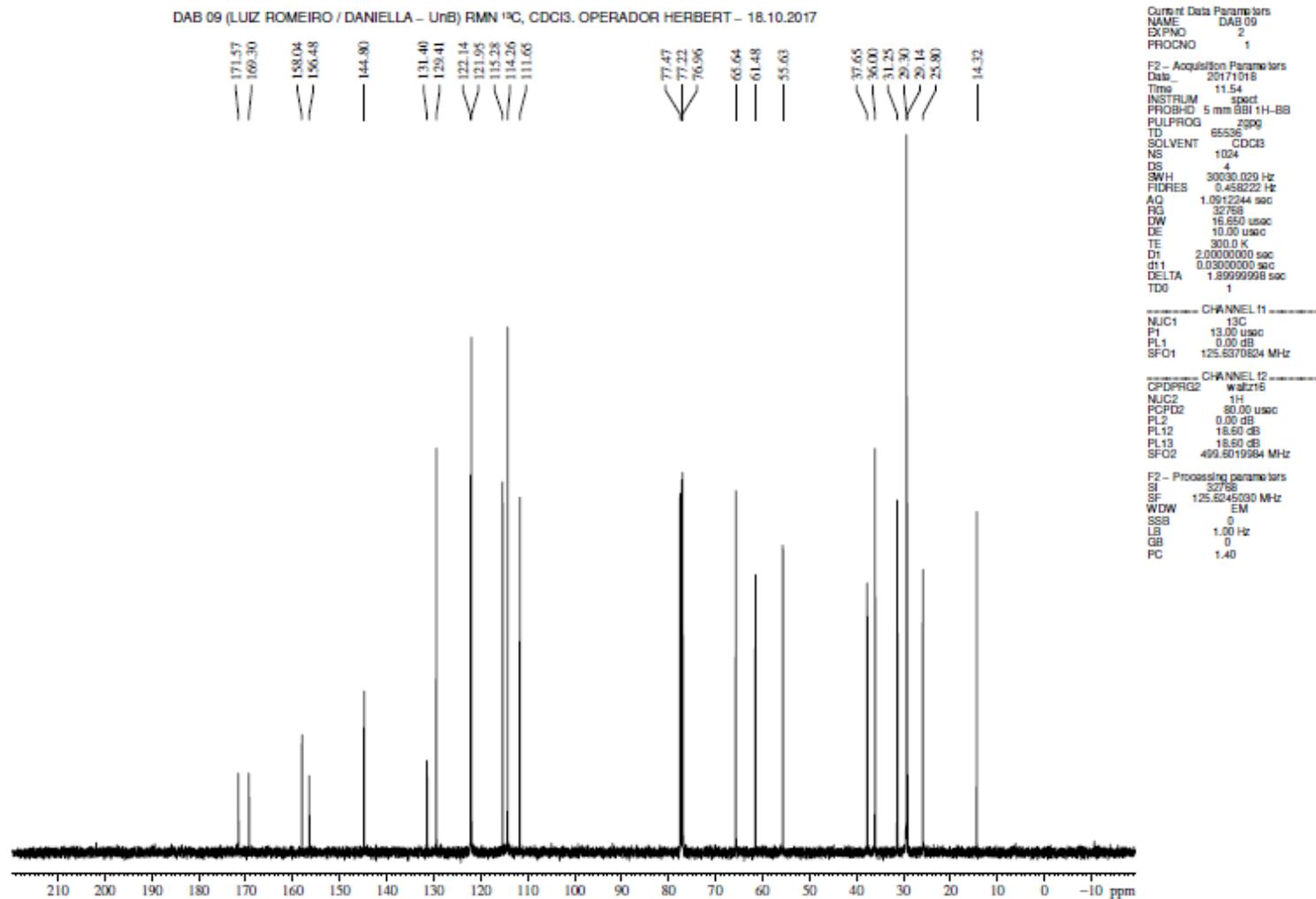
Current Data Parameter
NAME DAB 09
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Param
Date 20171018
Time 11.00
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632
AQ 3.1719923 sec
RG 101.6
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

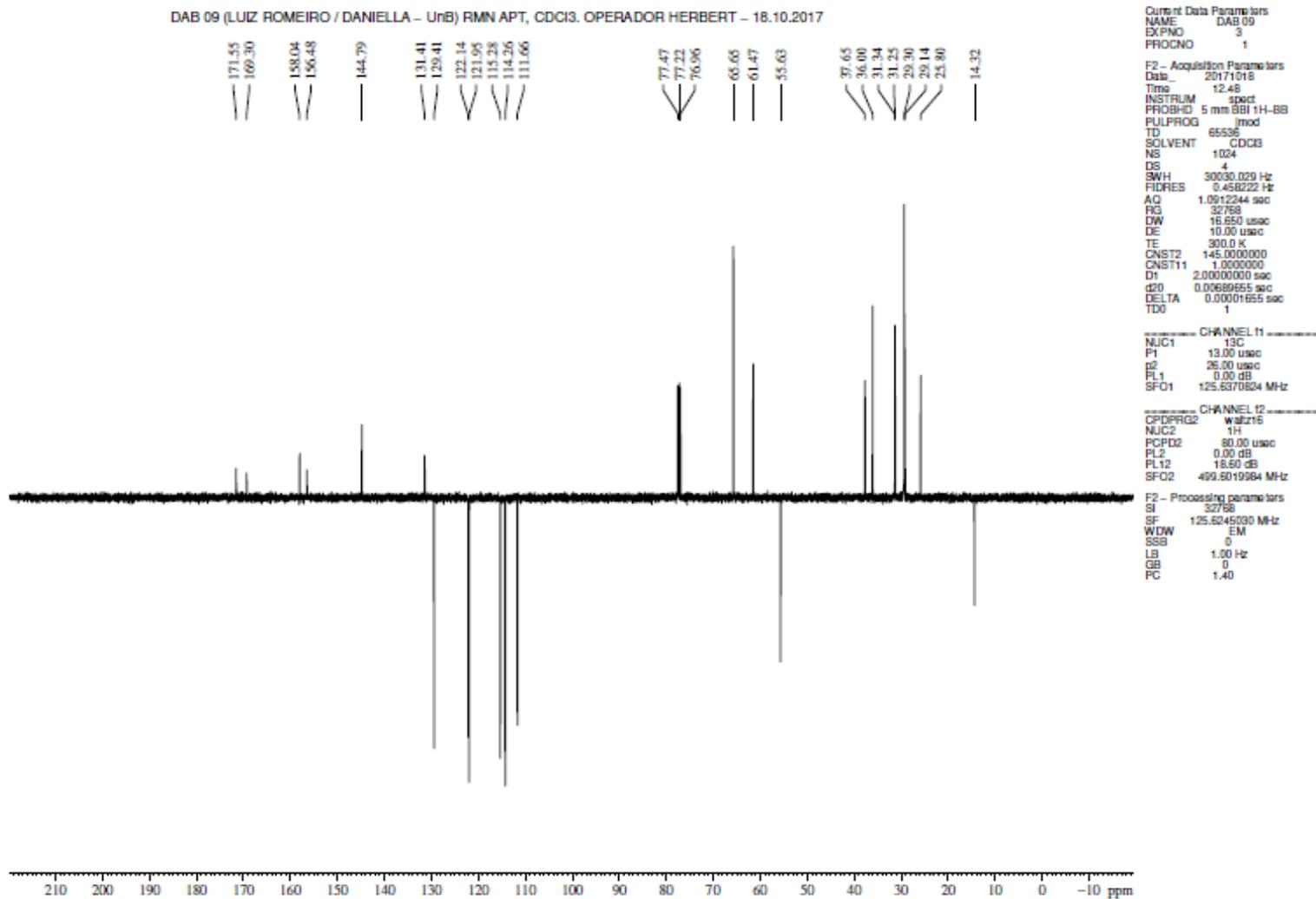
----- CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing param
SI 32768
SF 499.6000191 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 39 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3):
LDT704 (38)

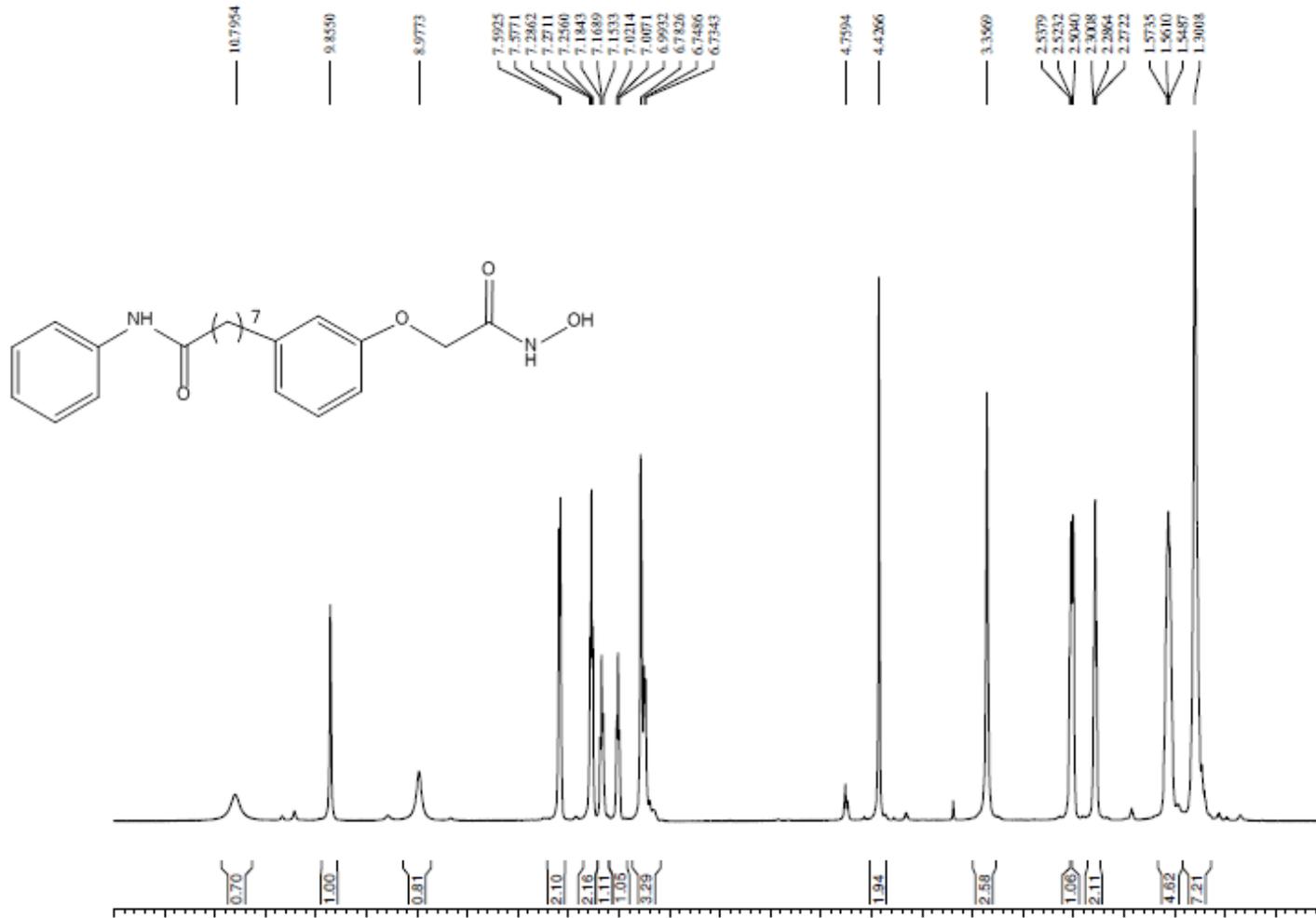


ANEXO 39 – Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) (Expansão):
LDT704 (38)



ANEXO 40– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO):
LDT705 (**39**)

DAB 10 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , DMSO. OPERADOR HERBERT – 06.12.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 10
EXPNO 1
PROCNO 1

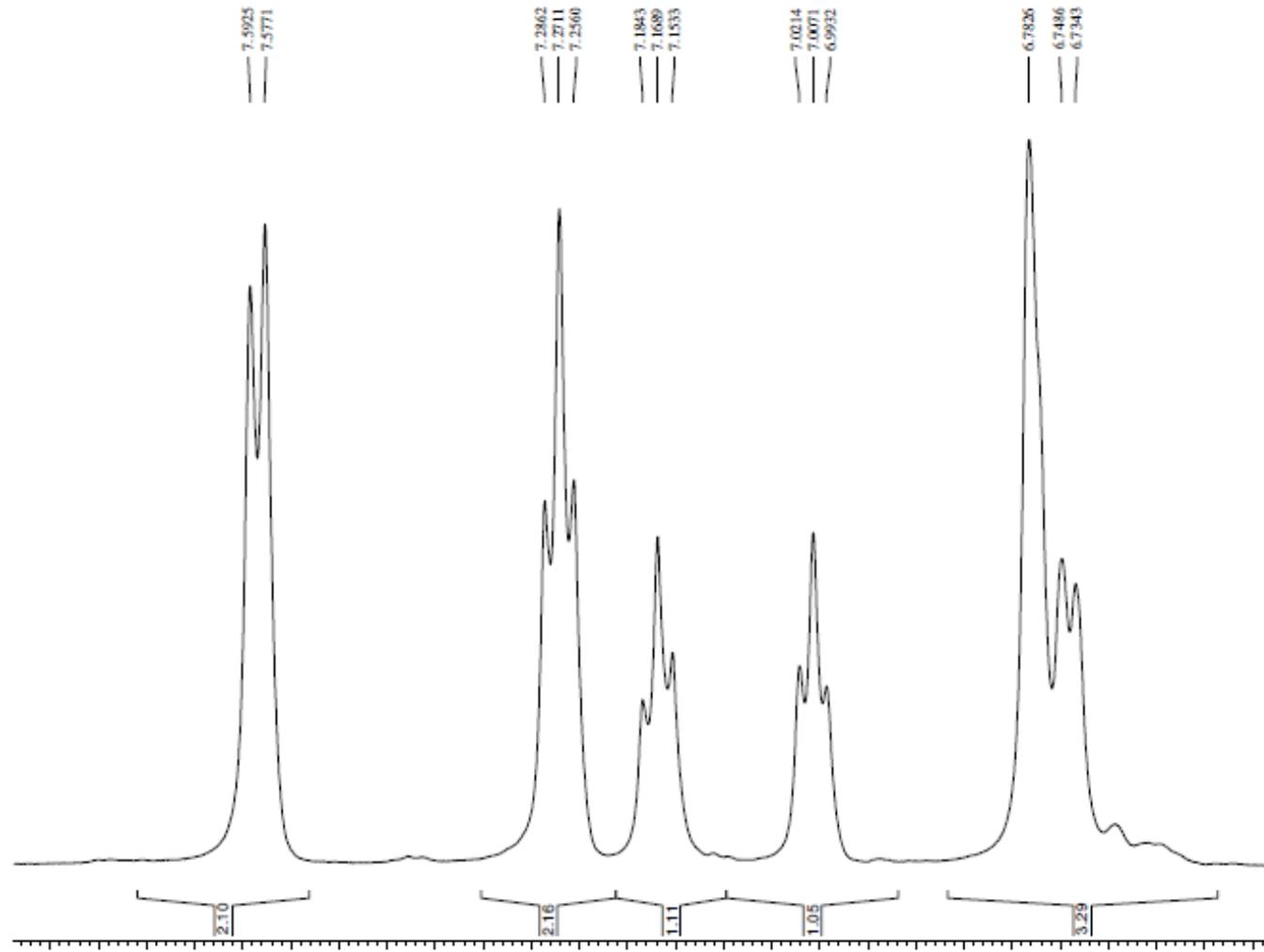
F2 - Acquisition Parameter
Date_ 20171206
Time 14.11
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632 Hz
AQ 3.1719923 sec
RG 64
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852 MHz

F2 - Processing parameter
SI 32768
SF 499.6000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 41– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT705 (**39**)

DAB 10 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , DMSO. OPERADOR HERBERT – 06.12.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 10
EXPNO 1
PROCNO 1

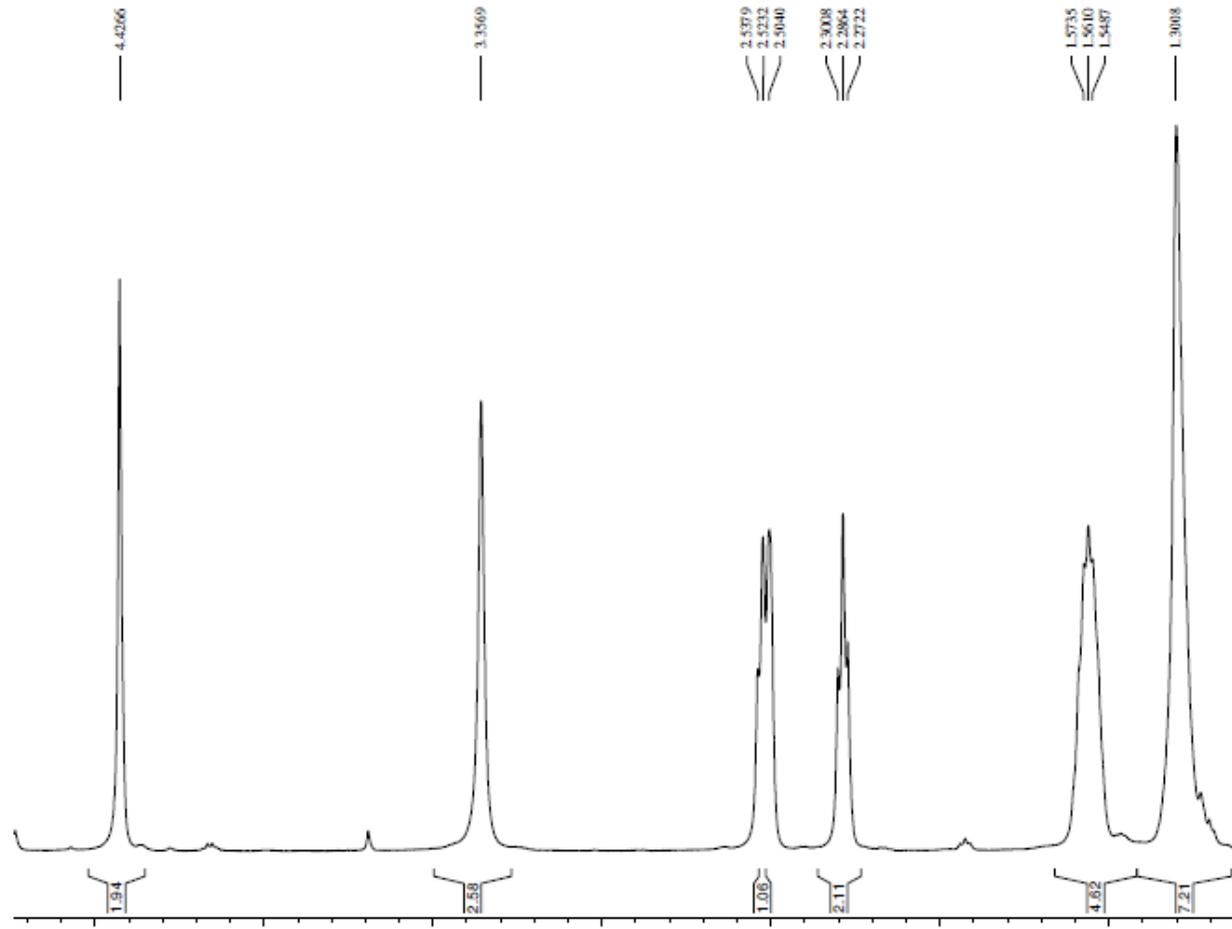
F2 - Acquisition Param
Date 20171206
Time 14.11
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSC
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632
AQ 3.1719923 sec
RG 64
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing param
SI 32768
SF 499.6000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 42– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT705 (39)**

DAB 10 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , DMSO, OPERADOR HERBERT – 06.12.2017



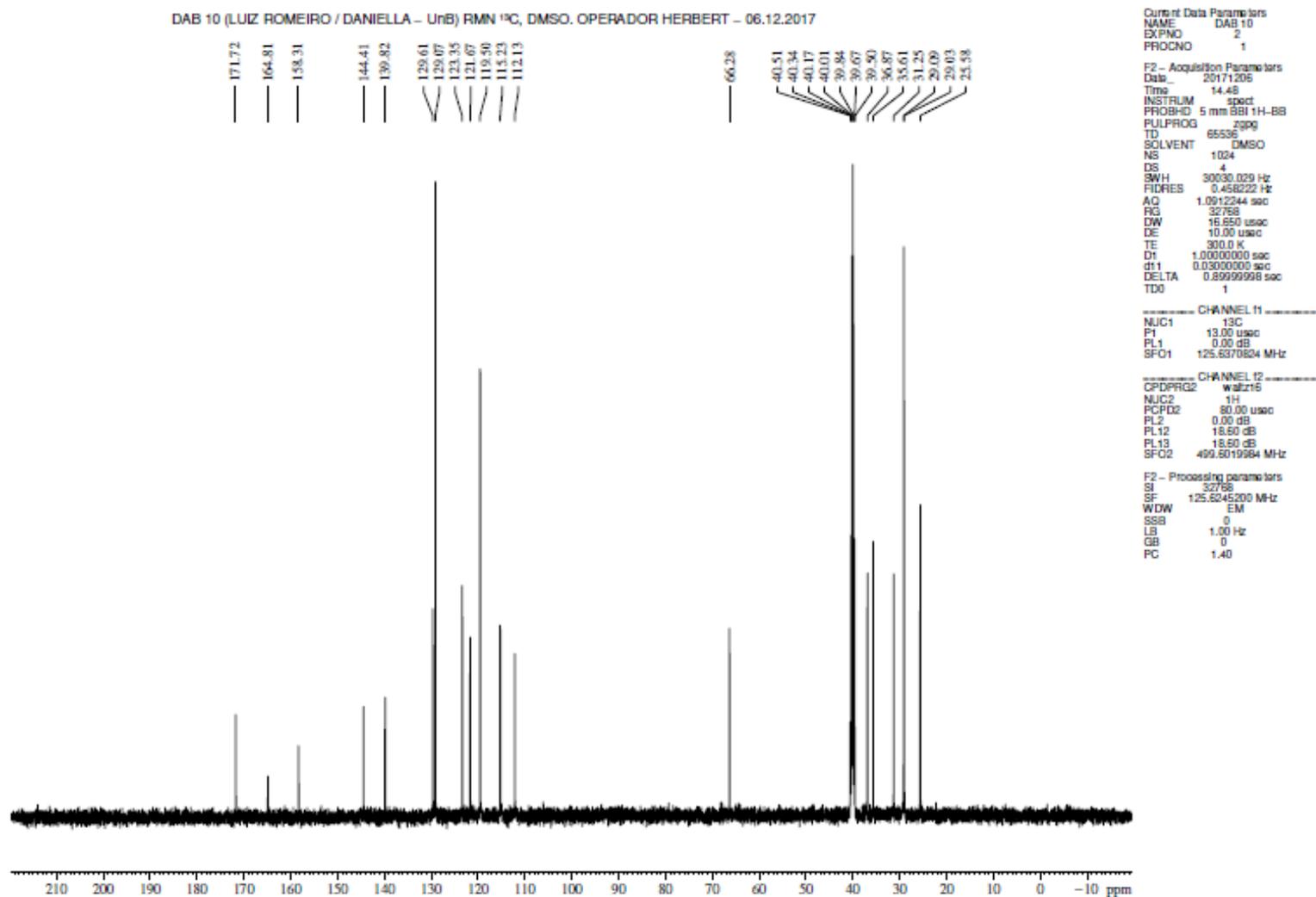
Current Data Parameter
NAME DAB 10
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameter
Date_ 20171206
Time 14.11
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1t
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 t
FIDRES 0.157632
AQ 3.1719923 s
RG 64
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 s
TD0 1

----- CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

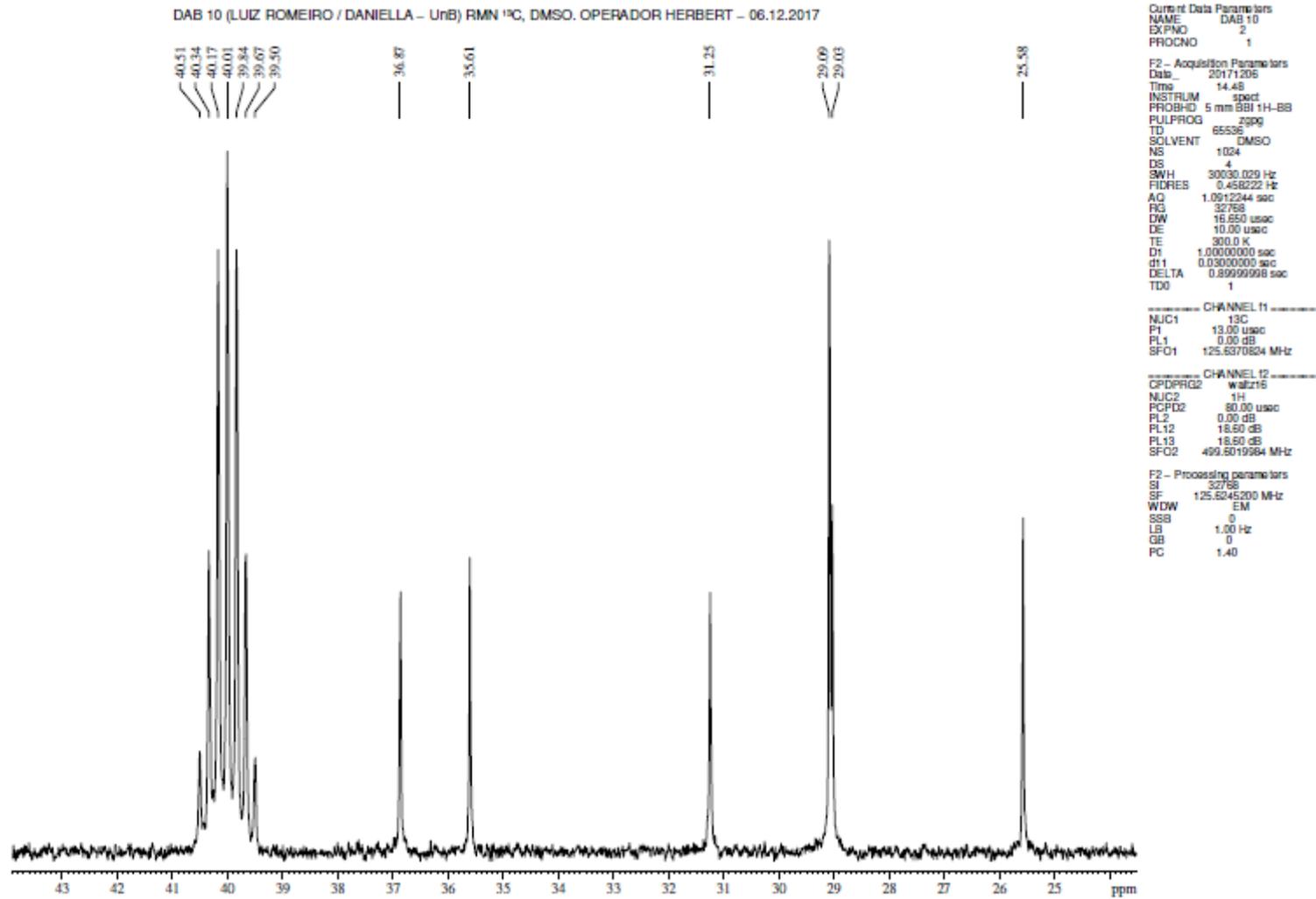
F2 - Processing parameter
SI 32768
SF 499.6000000 M
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 43– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO):
LDT705 (39)**



ANEXO 44– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO) (Expansão):

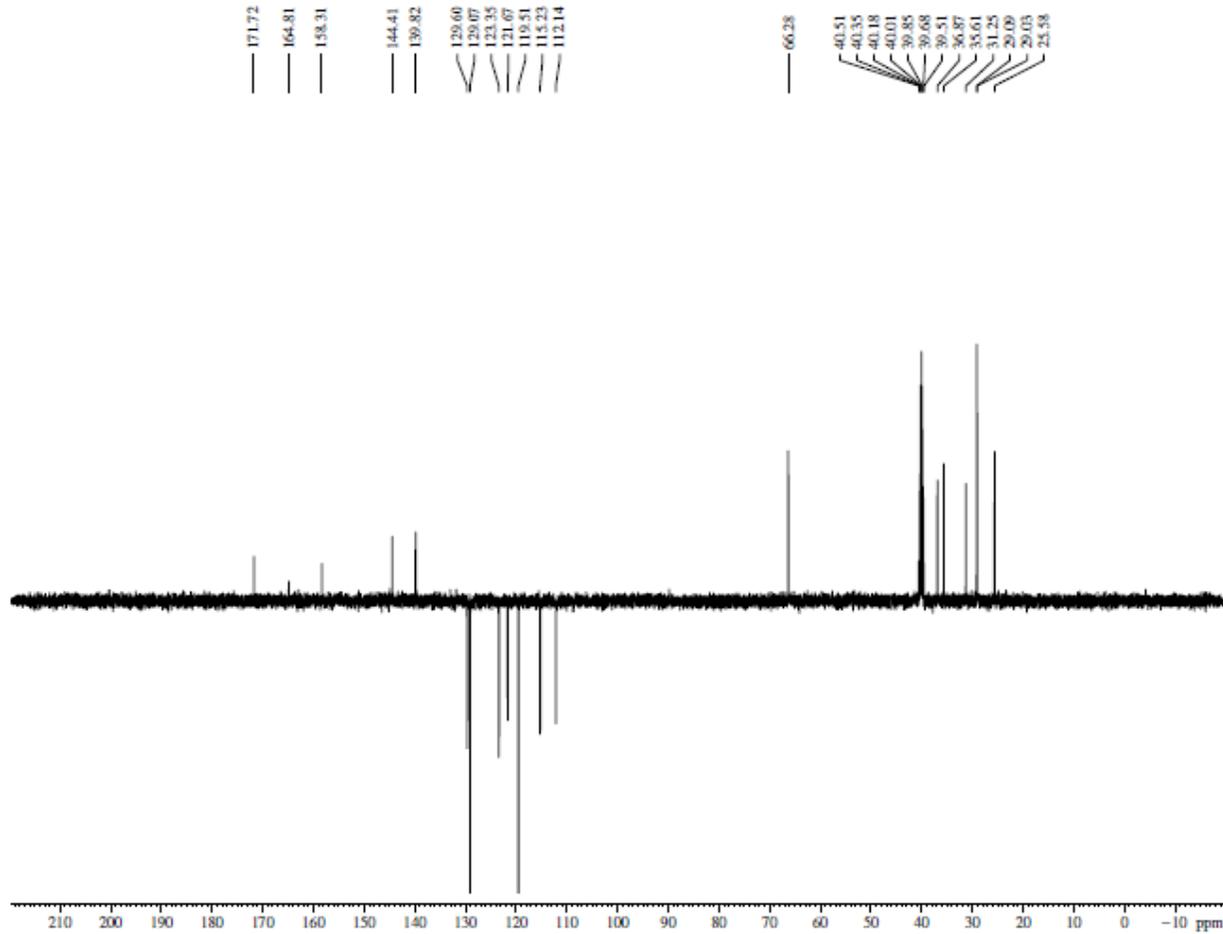
LDT705 (39)



ANEXO 45– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO) (Expansão):

LDT705 (39)

DAB 10 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) RMN APT, DMSO. OPERADOR HERBERT – 08.12.2017



Current Data Parameters
 NAME DAB 10
 EXPNO 3
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171208
 Time 15:19
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
 PULPROG gmod
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 856
 DS 4
 SWH 30030.029 Hz
 FIDRES 0.458222 Hz
 AQ 1.0912244 sec
 RG 32768
 DW 16.650 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 CNST2 145.000000
 CNST11 1.0000000
 Dt 1.0000000 sec
 d20 0.00689655 sec
 DELTA 0.0001655 sec
 TDO 1

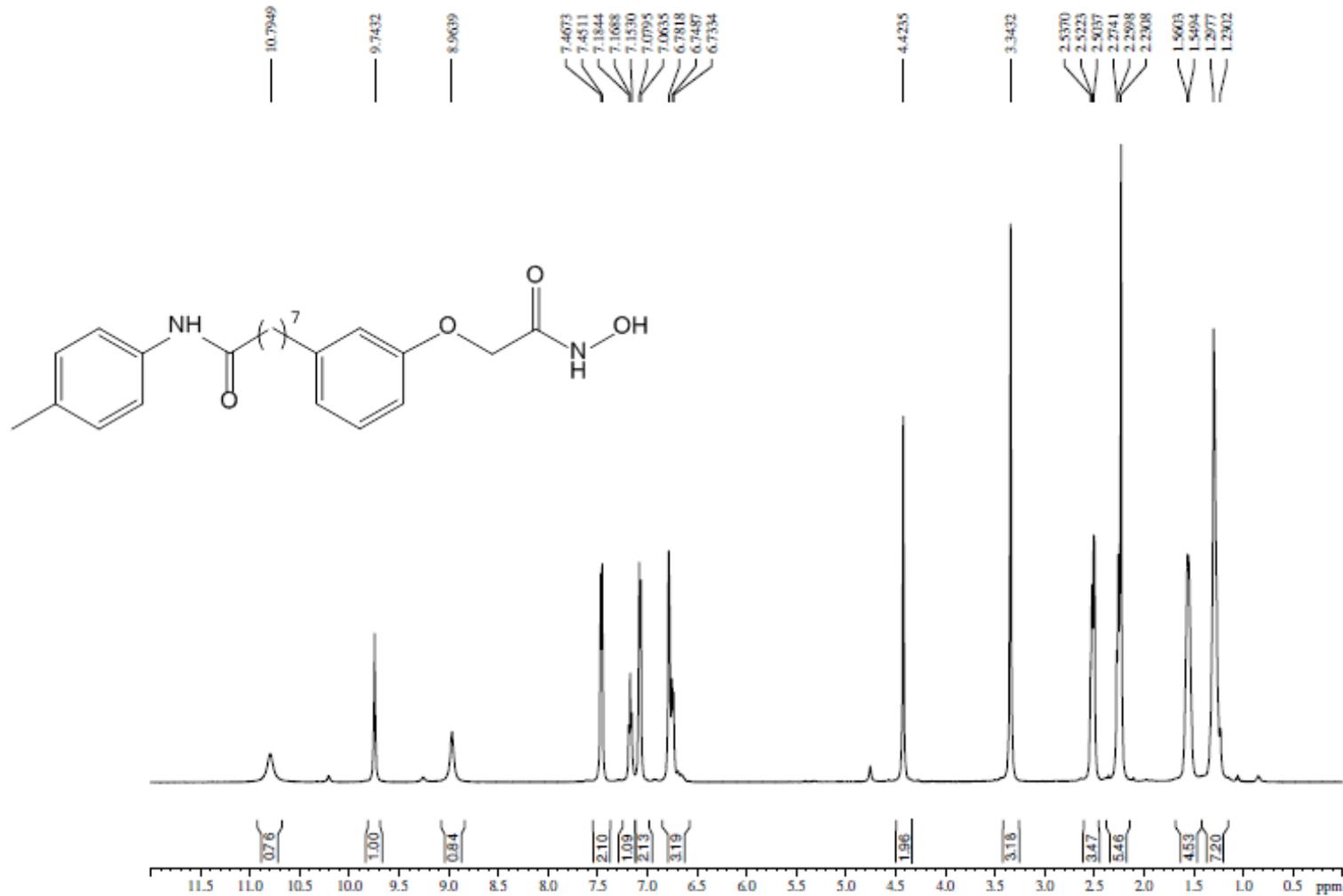
----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 ^{13}C
 P1 13.00 usec
 p2 26.00 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 125.5370624 MHz

----- CHANNEL f2 -----
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 ^1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 18.50 dB
 SFO2 499.5019964 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.5245200 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

ANEXO 46– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO):
LDT706 (**40**)

DAB 12 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , DMSO, OPERADOR HERBERT – 06.12.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 12
EXPNO 1
PROCNO 1

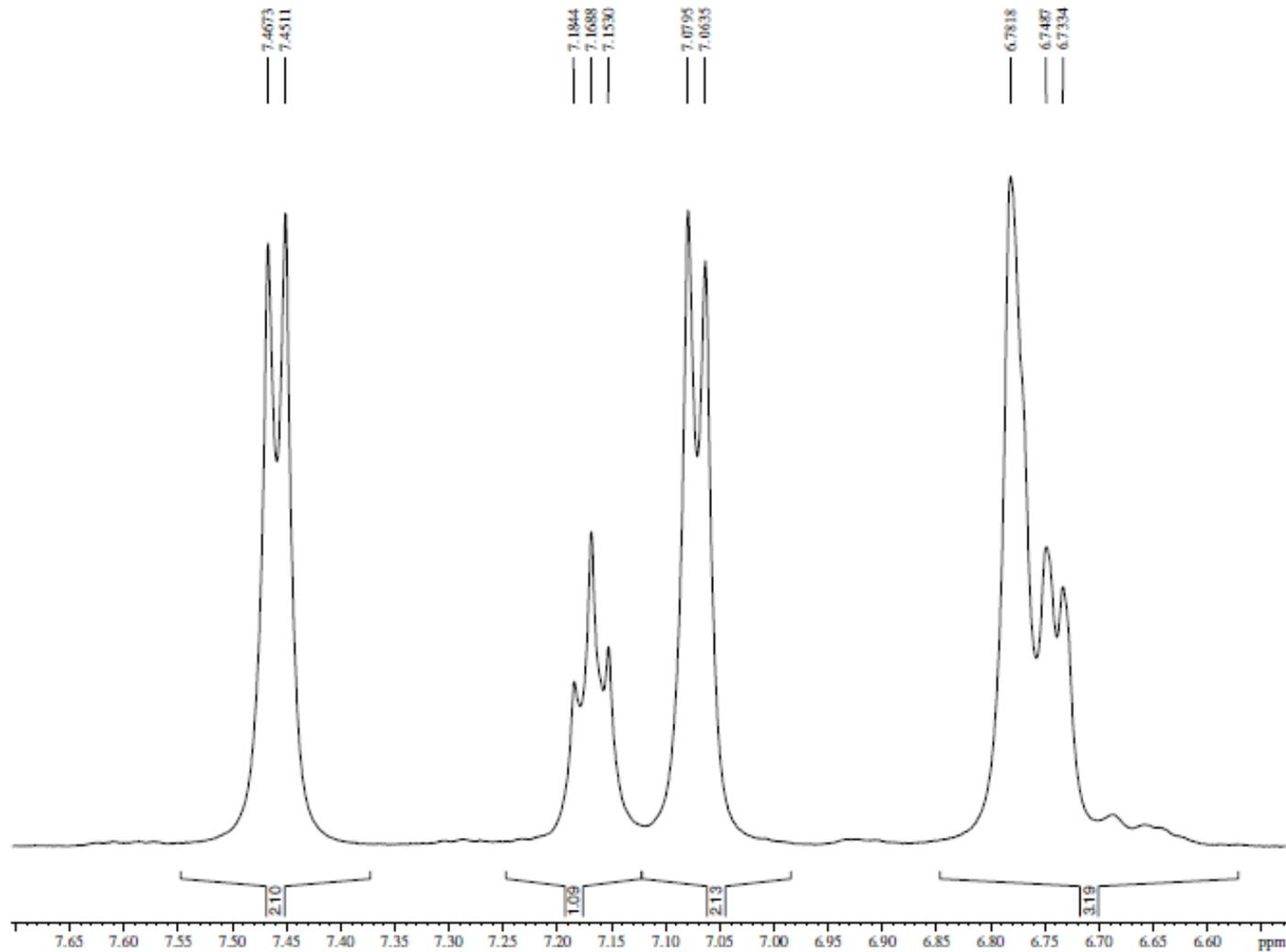
F2 - Acquisition Parameter
Date_ 20171208
Time 15.24
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1†
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 †
FIDRES 0.157632 †
AQ 3.1719923 †
RG 64
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 †
TD0 1

----- CHANNEL f1
NUC1 ^1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

F2 - Processing parameter
SI 32768
SF 499.6000000 †
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 47– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT706 (40)**

DAB 12 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , DMSO. OPERADOR HERBERT – 06.12.2017



Current Data Parameter
NAME DAB 12
EXPNO 1
PROCNO 1

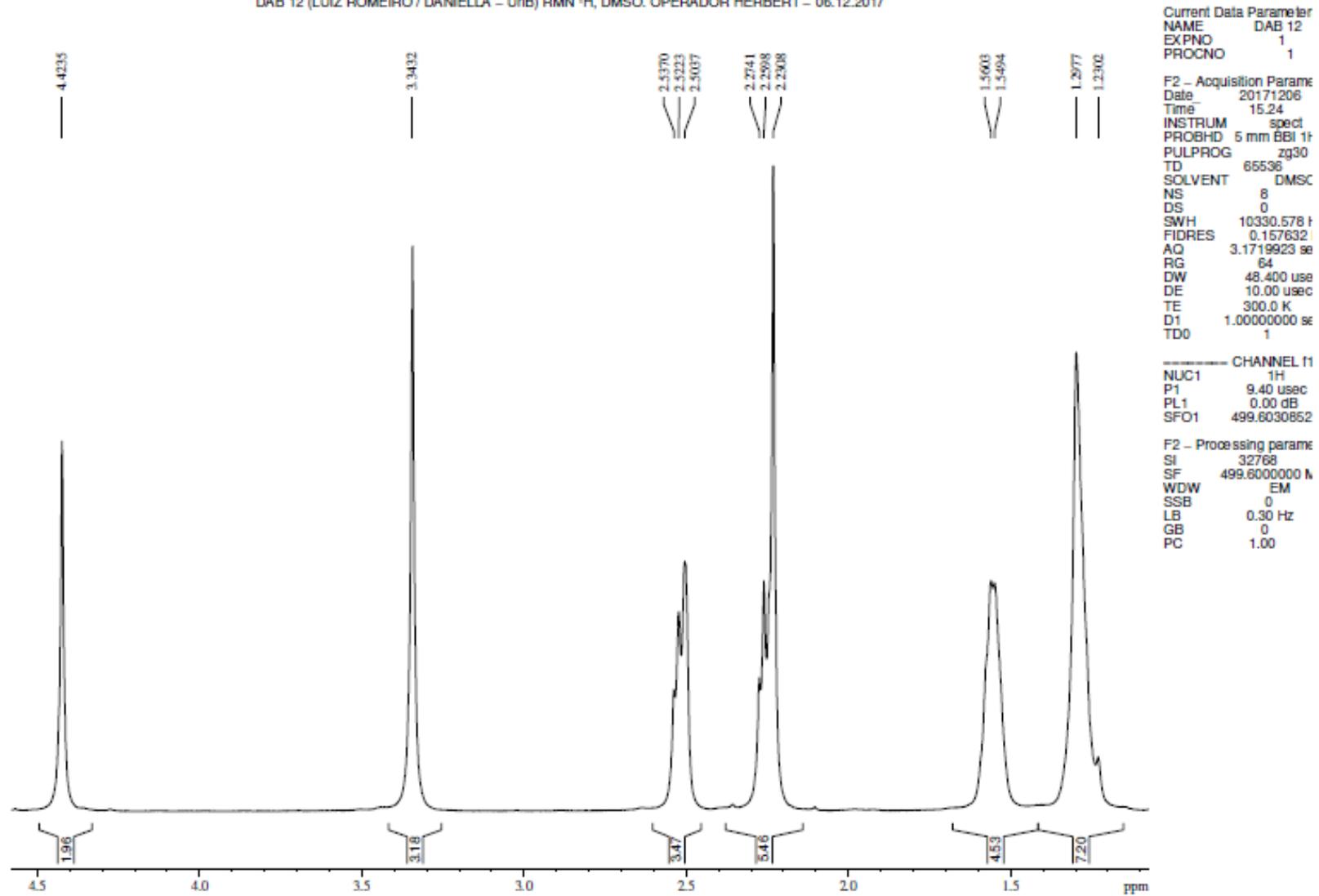
F2 - Acquisition Parame
Date 20171206
Time 15.24
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 8
DS 0
SWH 10330.578 Hz
FIDRES 0.157632
AQ 3.1719923 sec
RG 64
DW 48.400 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 9.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.6030852

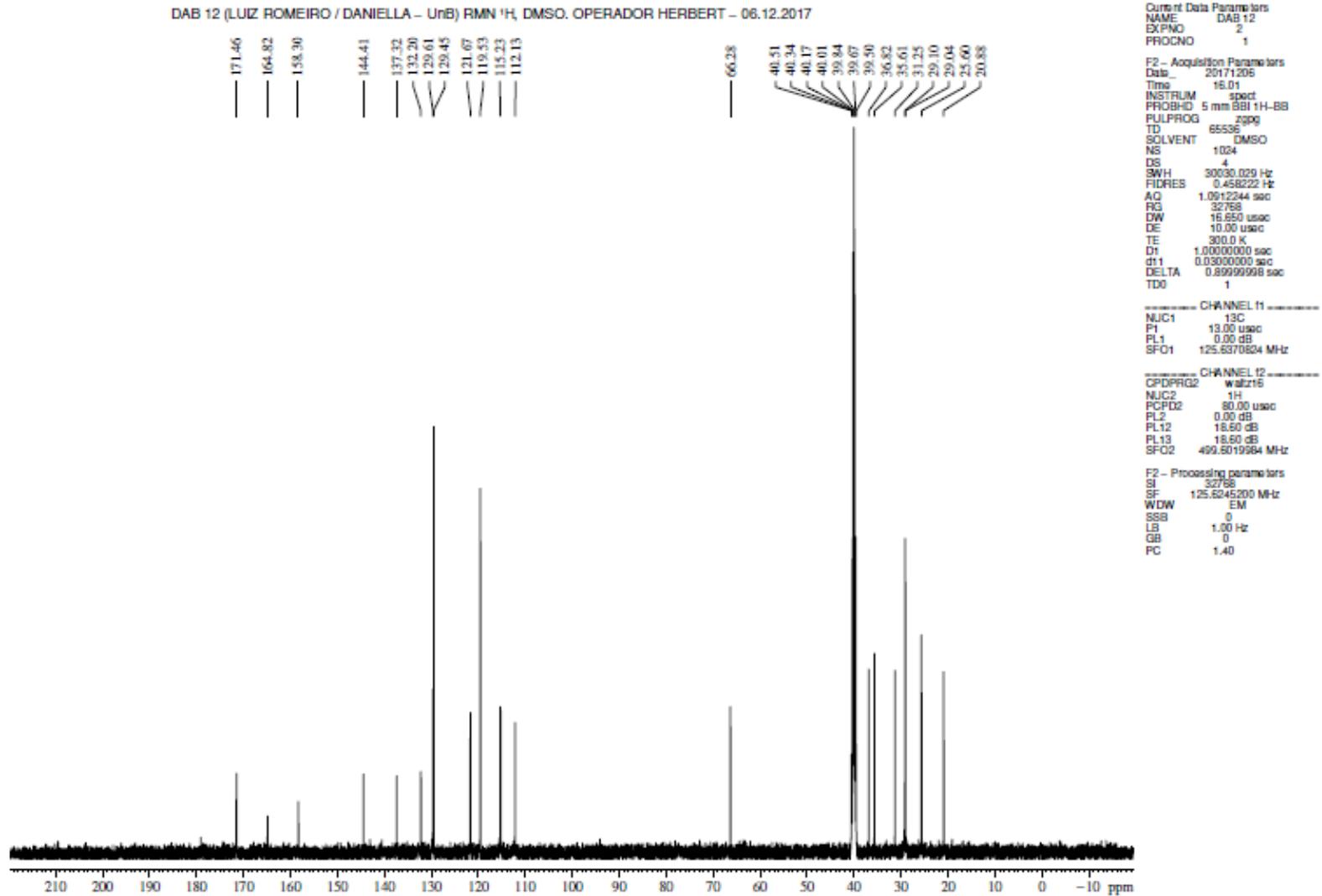
F2 - Processing param
SI 32768
SF 499.6000000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 48– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT706 (40)

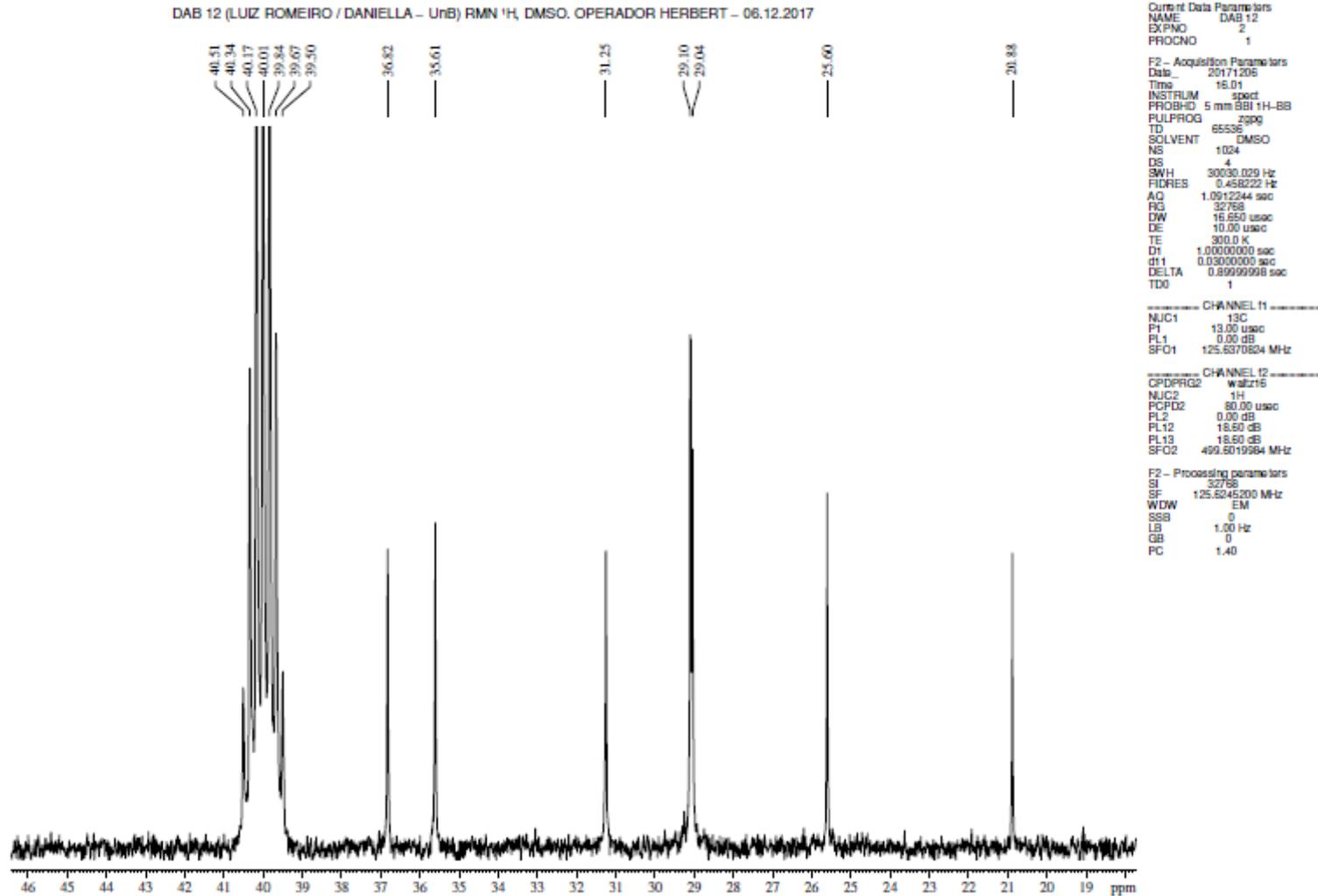
DAB 12 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , DMSO. OPERADOR HERBERT – 06.12.2017



ANEXO 49– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO):
LDT706 (40)

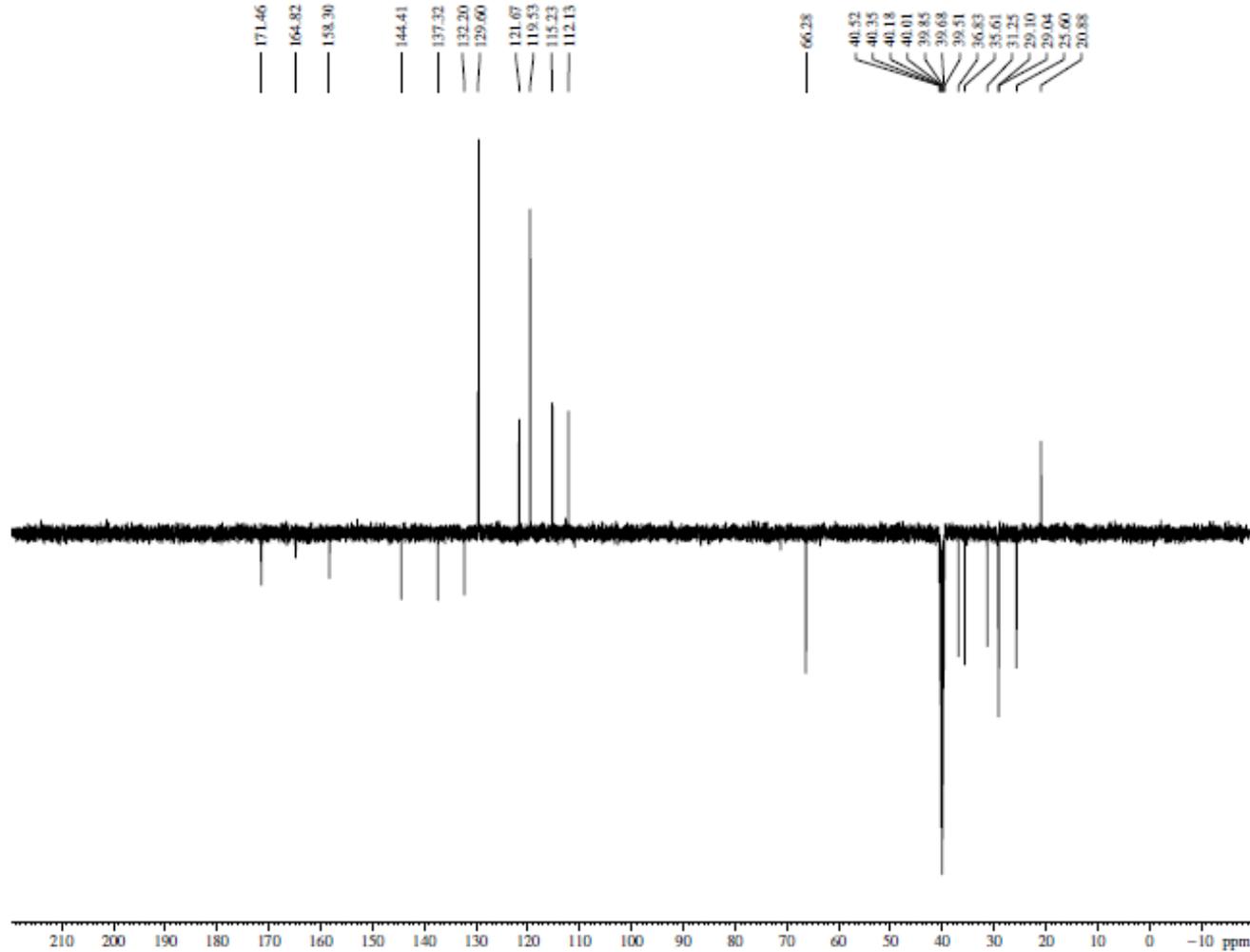


**ANEXO 50– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT706 (40)**



ANEXO 51– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT706 (40)

DAB 12 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA - UrB) RMN APT, DMSO, OPERADOR HERBERT - 06.12.2017



Current Data Parameters
NAME DAB 12
EXPNO 3
PROCNO 1

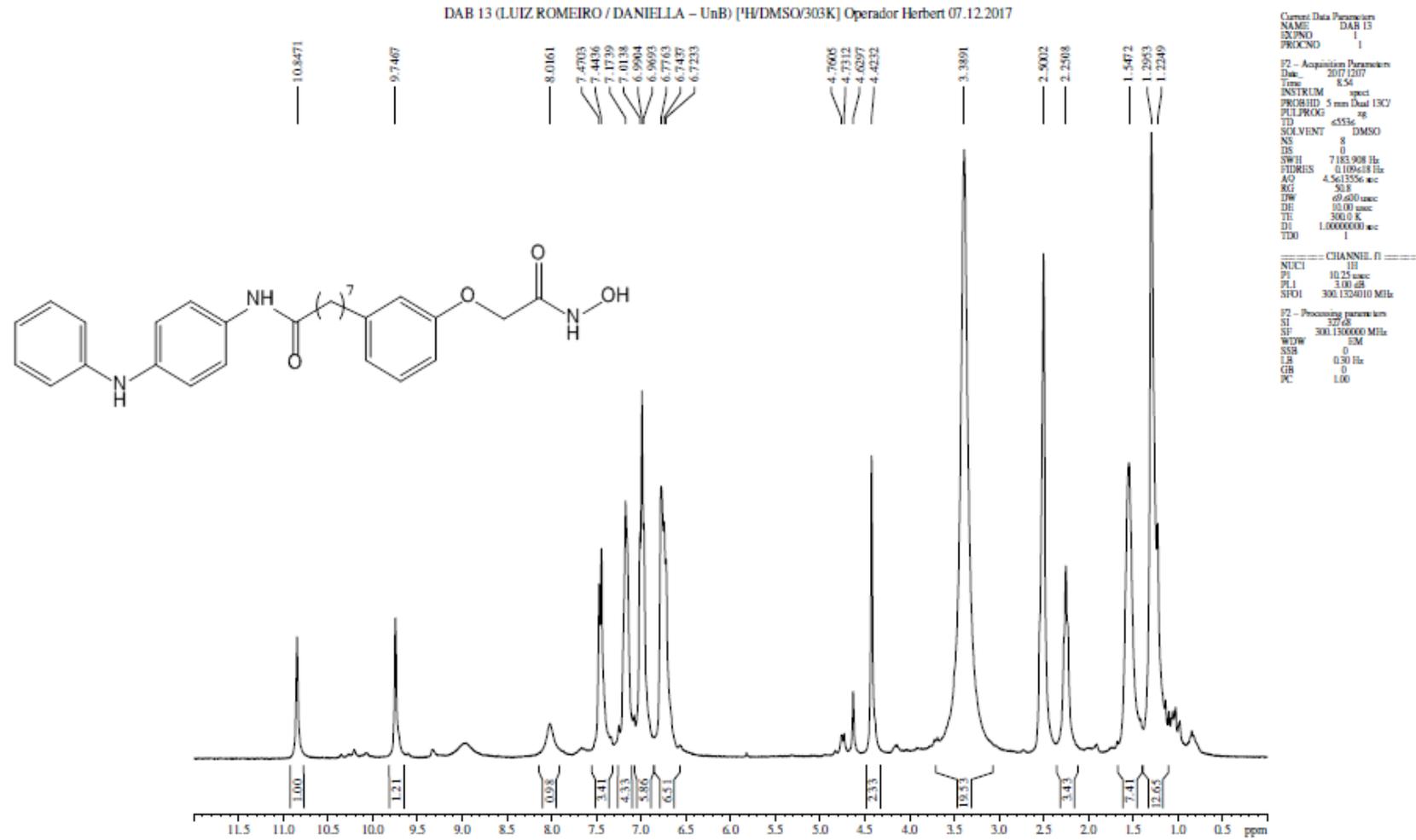
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171206
Time 16.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 1024
DS 4
SWH 30030.029 Hz
FIDRES 0.458222 Hz
AQ 1.0912244 sec
RG 32768
DW 16.650 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
CNST2 145.000000
CNST11 1.000000
D1 1.00000000 sec
d20 0.00689555 sec
DELTA 0.00001655 sec
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 ^{13}C
P1 13.00 usec
p2 25.00 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 125.6370824 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2 waltz16
NUC2 ^1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 18.50 dB
SFO2 499.6019984 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.6245200 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

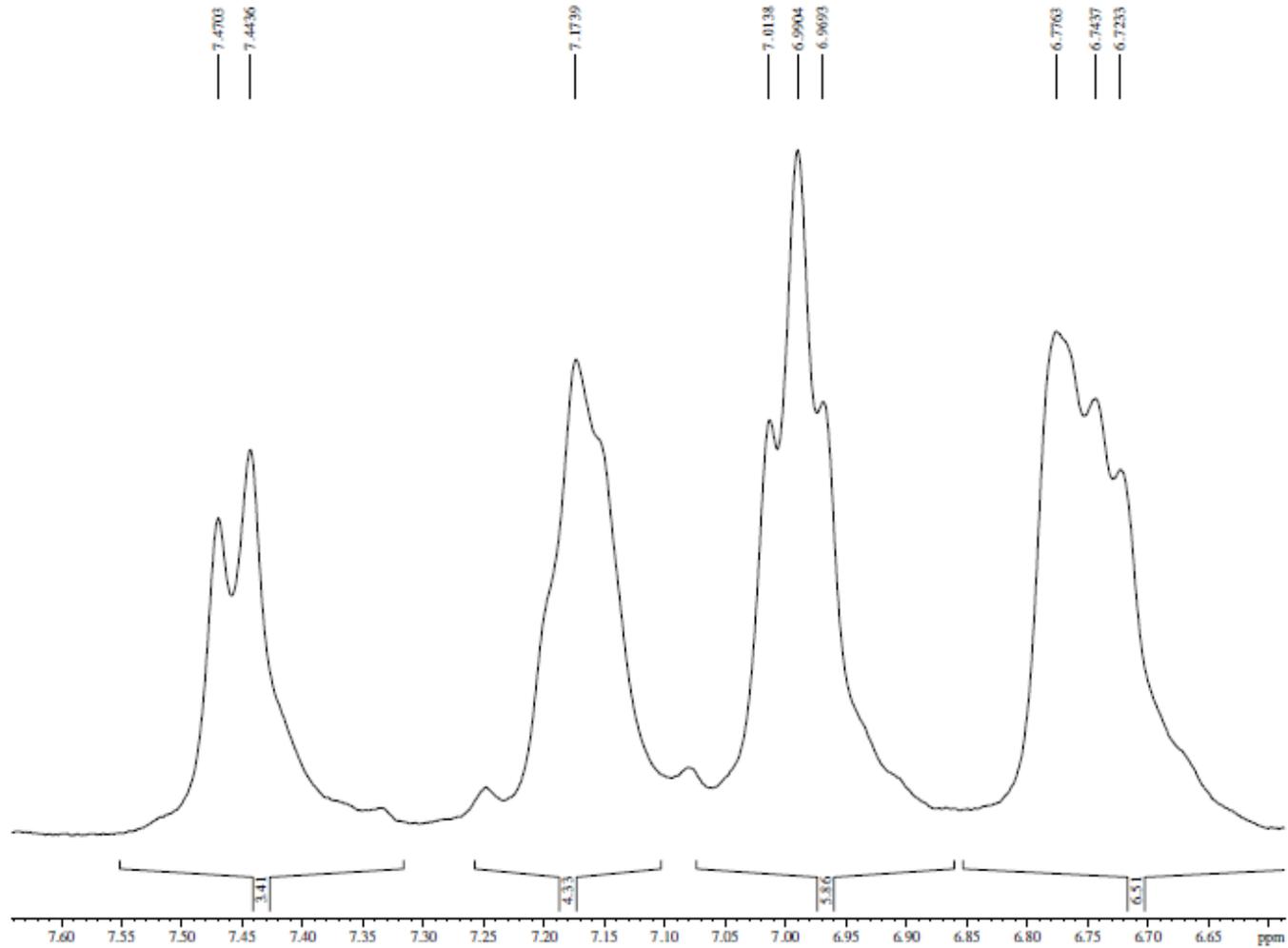
ANEXO 52– Espectro de RMN de¹H (500 MHz, DMSO):
LDT707 (41)



ANEXO 53– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):

LDT707 (41)

DAB 13 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) [^1H /DMSO/303K] Operador Herbert 07.12.2017

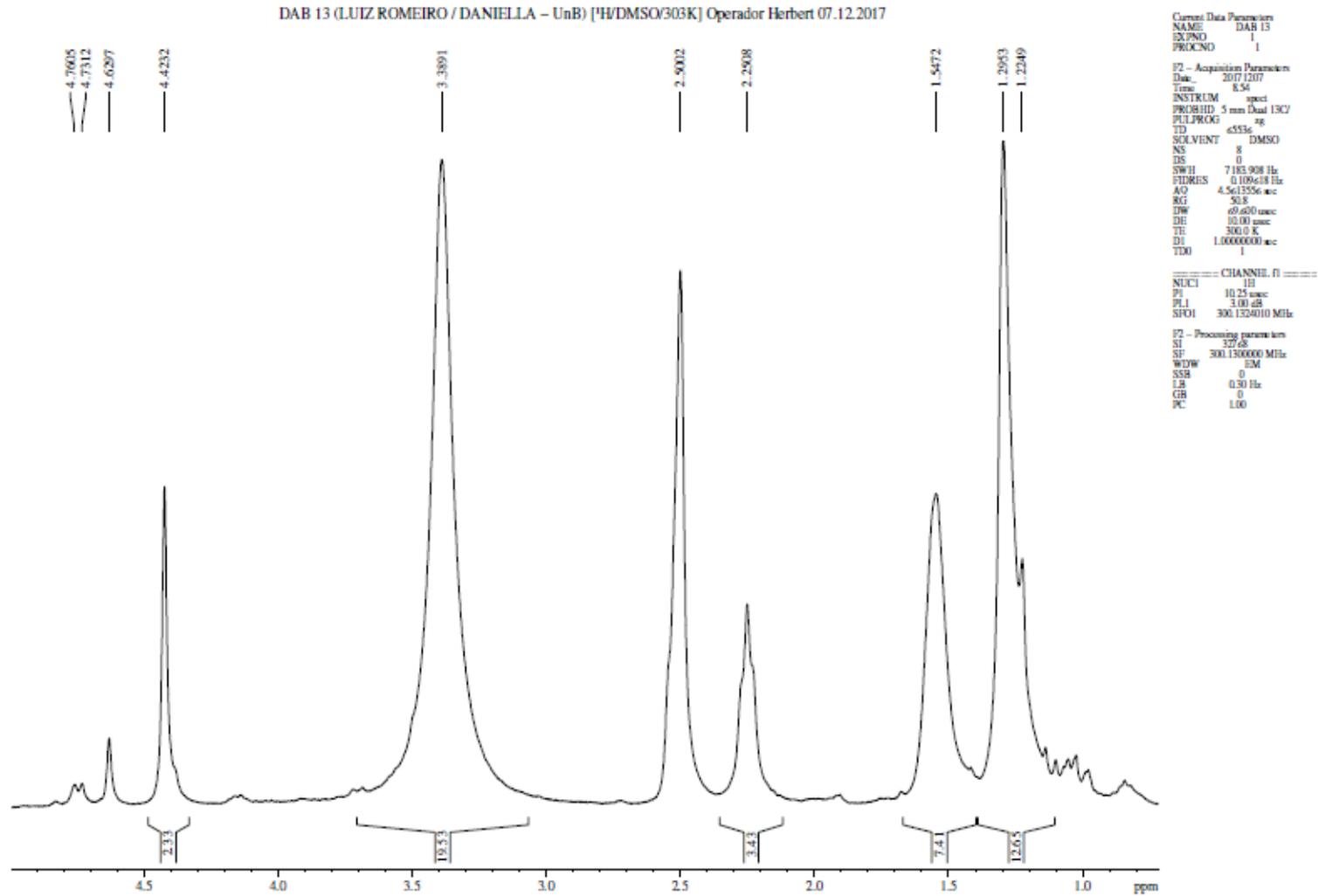


Current Data Parameters
 NAME DAB 13
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171207
 Time 8.54
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.561556 sec
 RG 503
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TDO 1

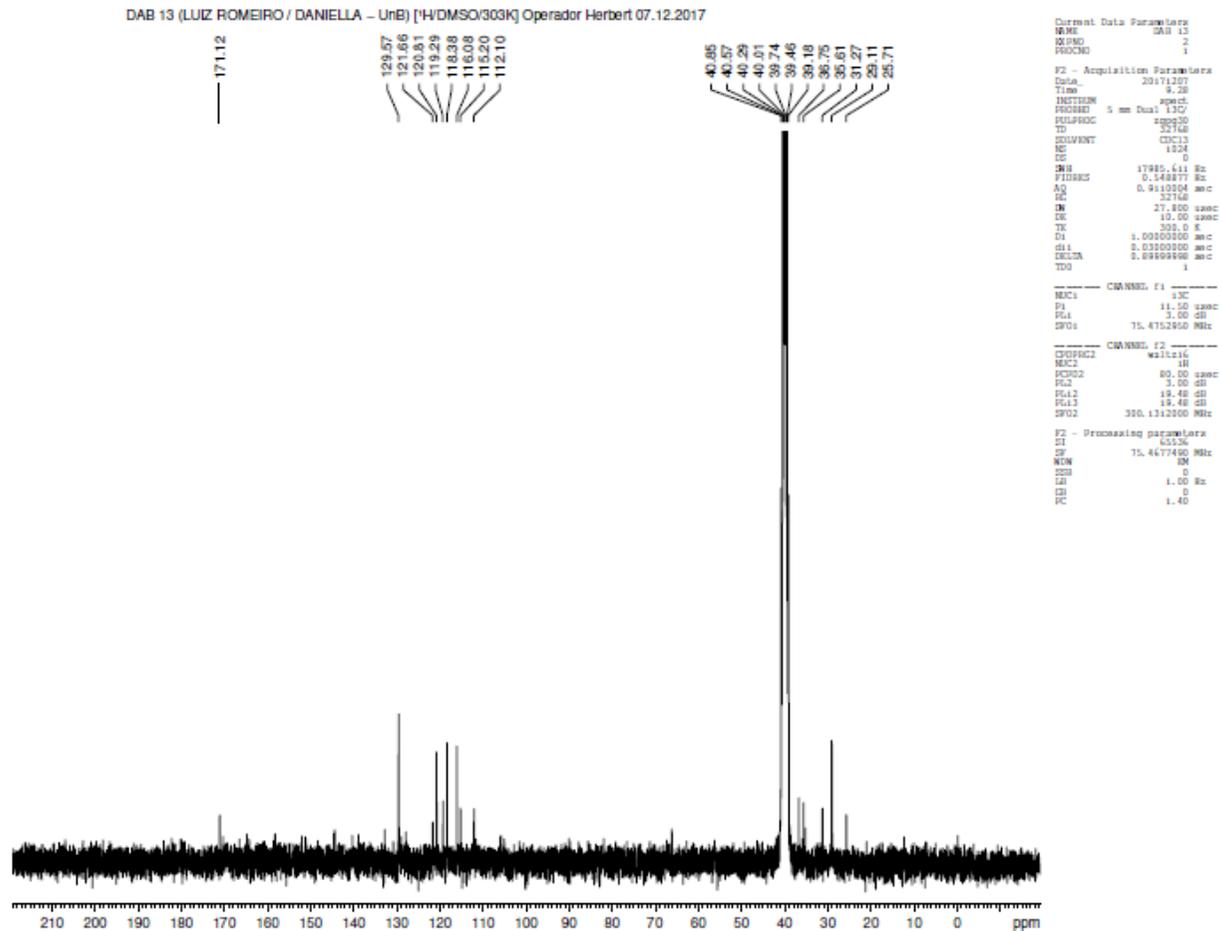
===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO 54– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT707 (41)

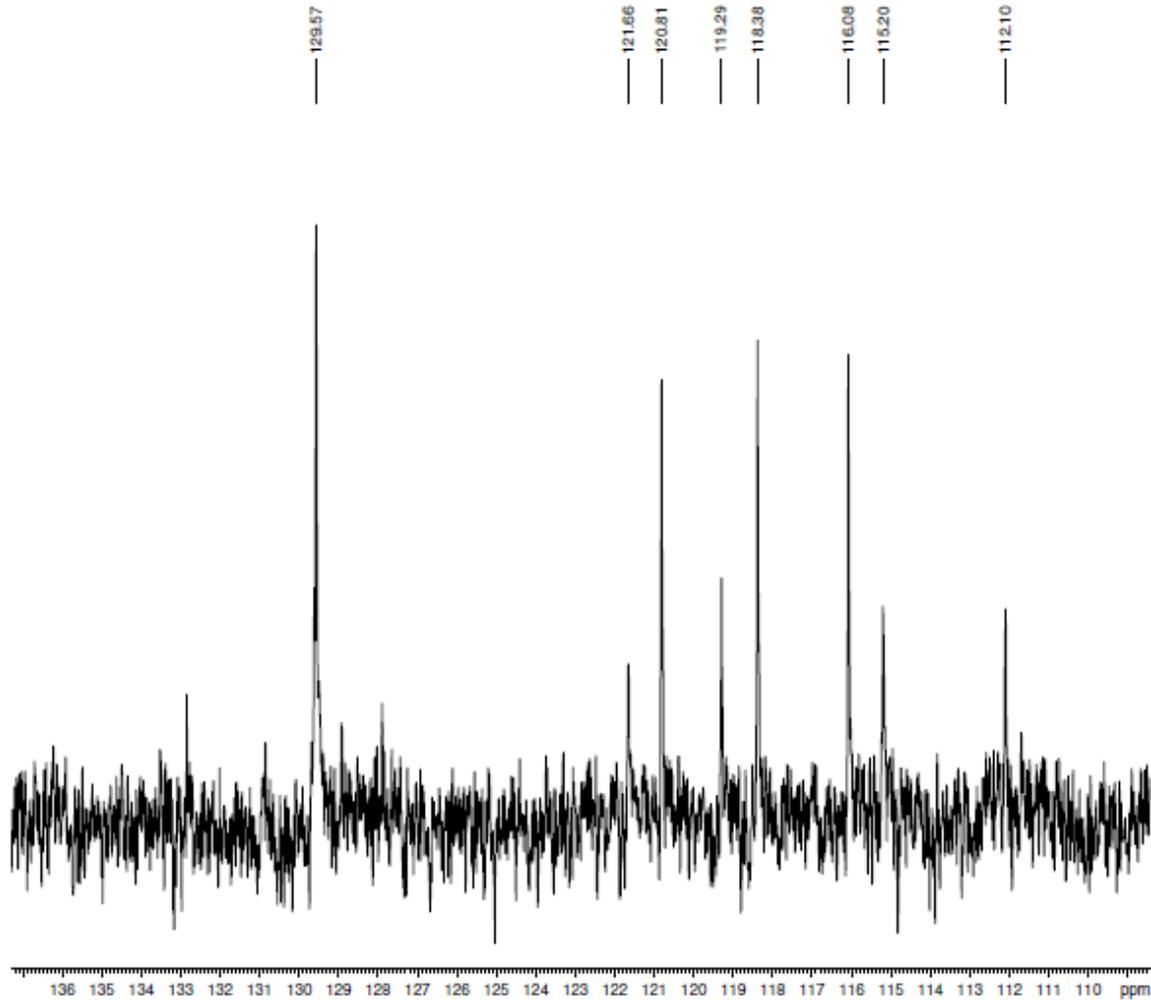


**ANEXO 55– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO):
LDT707 (41)**



ANEXO 56– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT707 (41)

DAB 13 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) [^2H /DMSO/303K] Operador Herbert 07.12.2017



```

Current Data Parameters
NAME      DAB 13
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20171207
Time     9.28
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.146877 Hz
AQ       0.911004 sec
RG       32768
IN       27.800 usec
DE       10.00 usec
TE       300.2 K
D1       1.00000000 sec
d11      0.03000000 sec
DELTA    2.89999999 sec
TDO      1

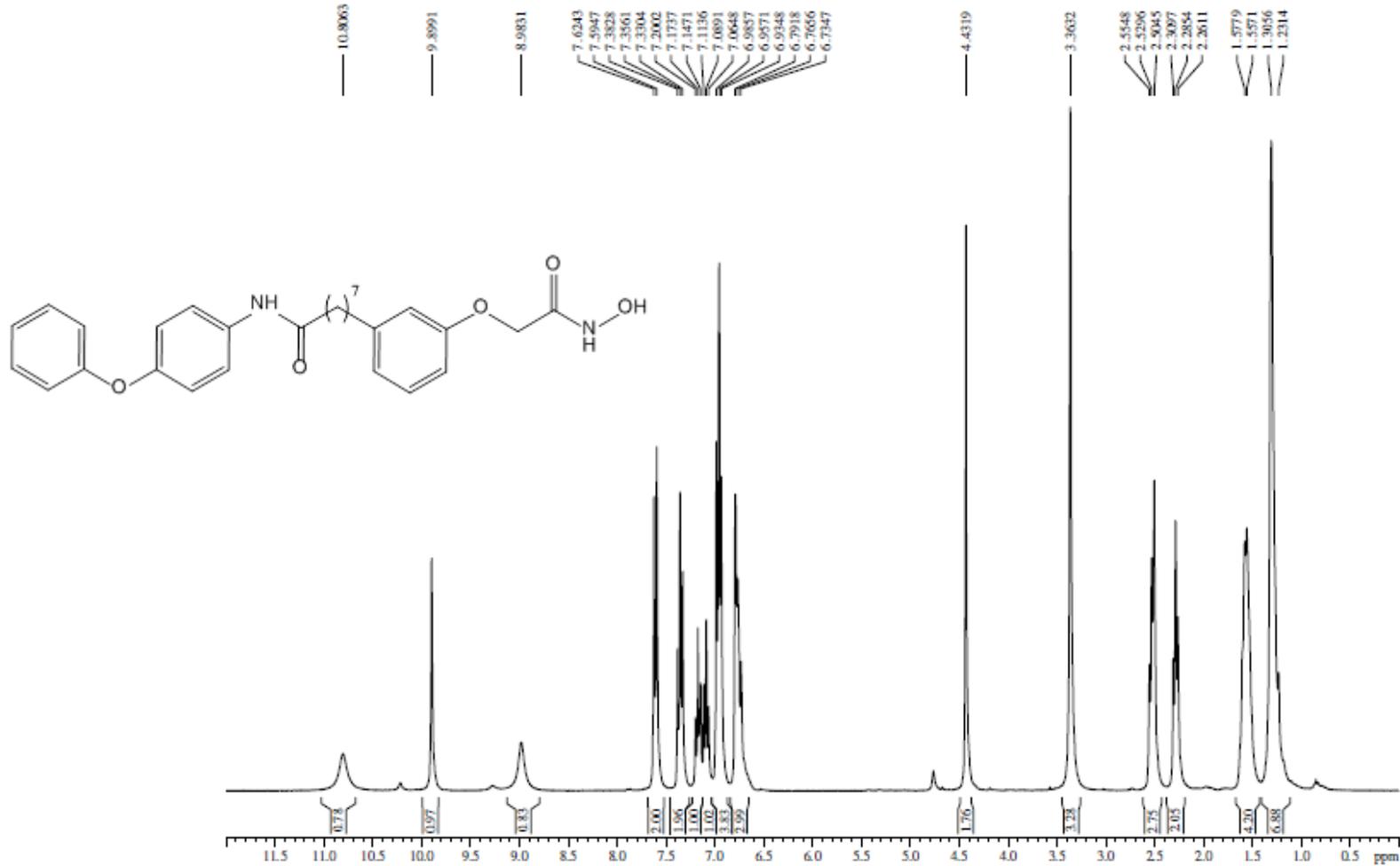
----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13C
P1       11.00 usec
PL1      3.00 dB
SFO1     75.4752850 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPOPC2   waltz16
NUC2     1H
PCPOC2   80.00 usec
PL2      3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2     300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       75.4677400 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
  
```

ANEXO 57– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO):
LDT708 (**42**)

DAB 16 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) [^1H /DMSO/303K] Operador Herbert 07.12.2017



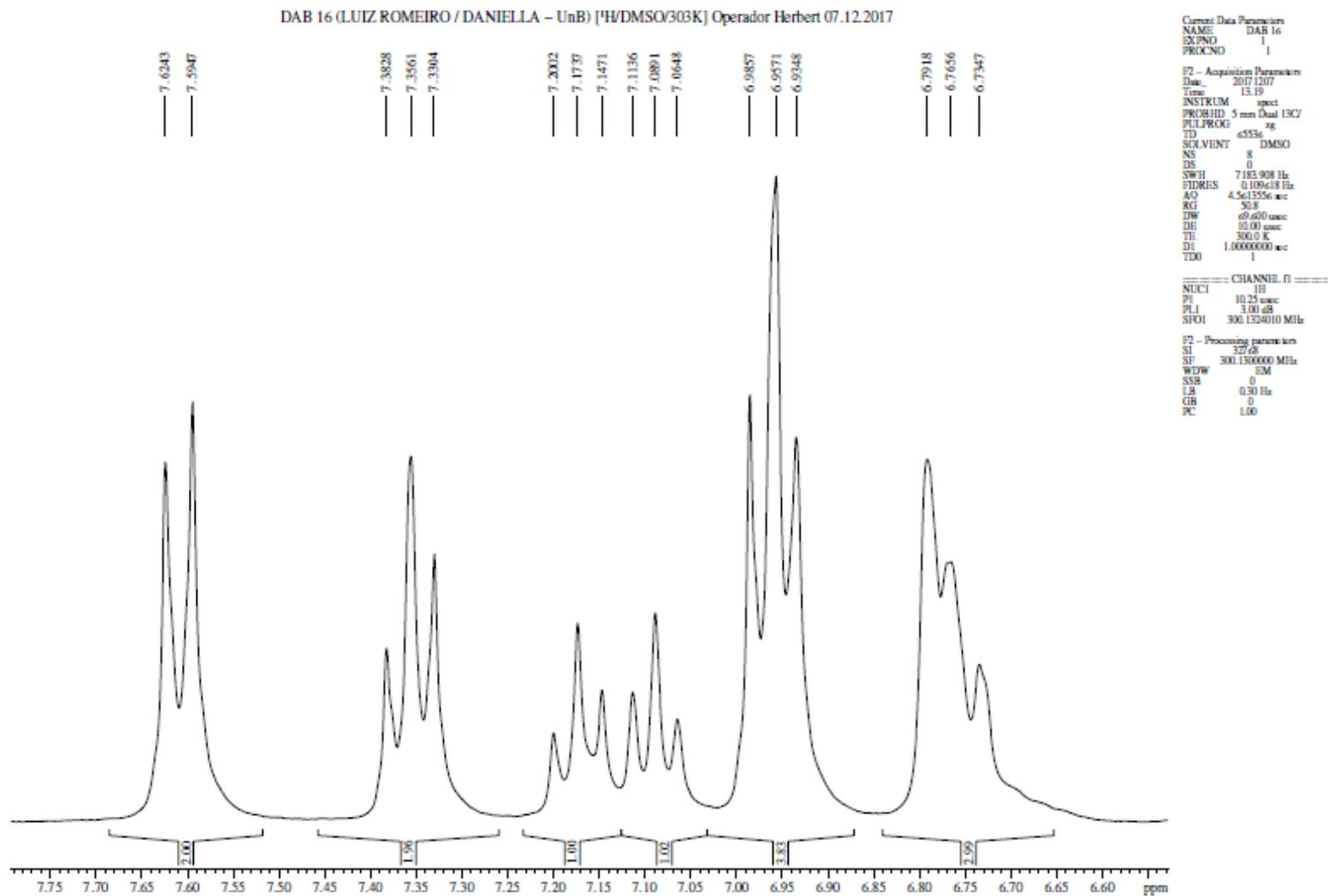
Current Data Parameters
NAME: DAB 16
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20171207
Time: 13.19
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dnat 13C/
PULPROG: zg
TD: 65536
SOLVENT: DMSO
NS: 8
DS: 0
SWH: 7183.908 Hz
FIDRES: 0.109618 Hz
AQ: 4.5613556 sec
RG: 508
DQ: 69.600 usec
DH: 10.00 usec
TE: 300.0 K
D1: 1.00000000 sec
TD0: 1

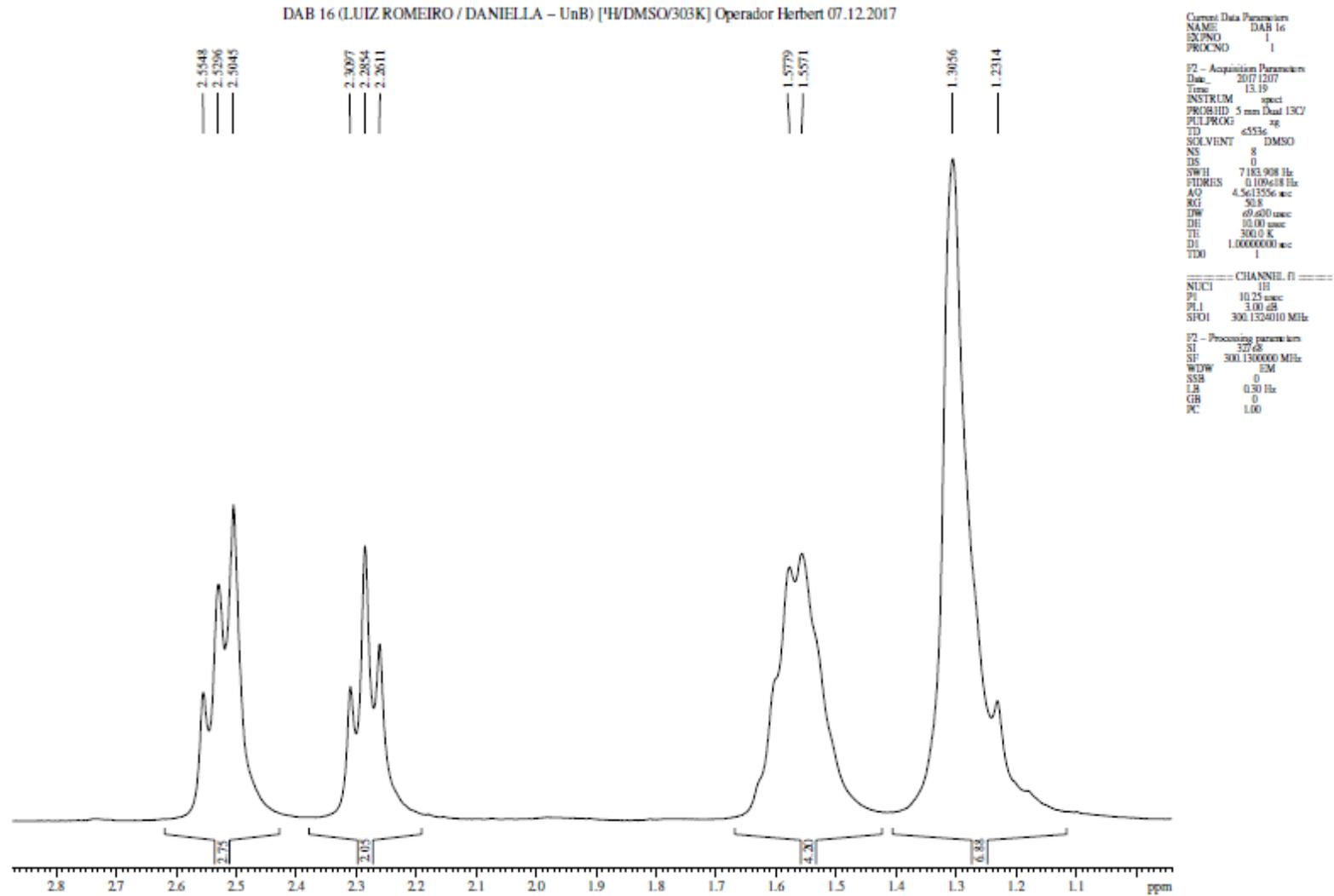
==== CHANNEL f1 =====
NUC1: ^1H
P1: 10.25 usec
PL1: 3.00 dB
SFO1: 300.132010 MHz

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 300.1300000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.30 Hz
GB: 0
PC: 1.00

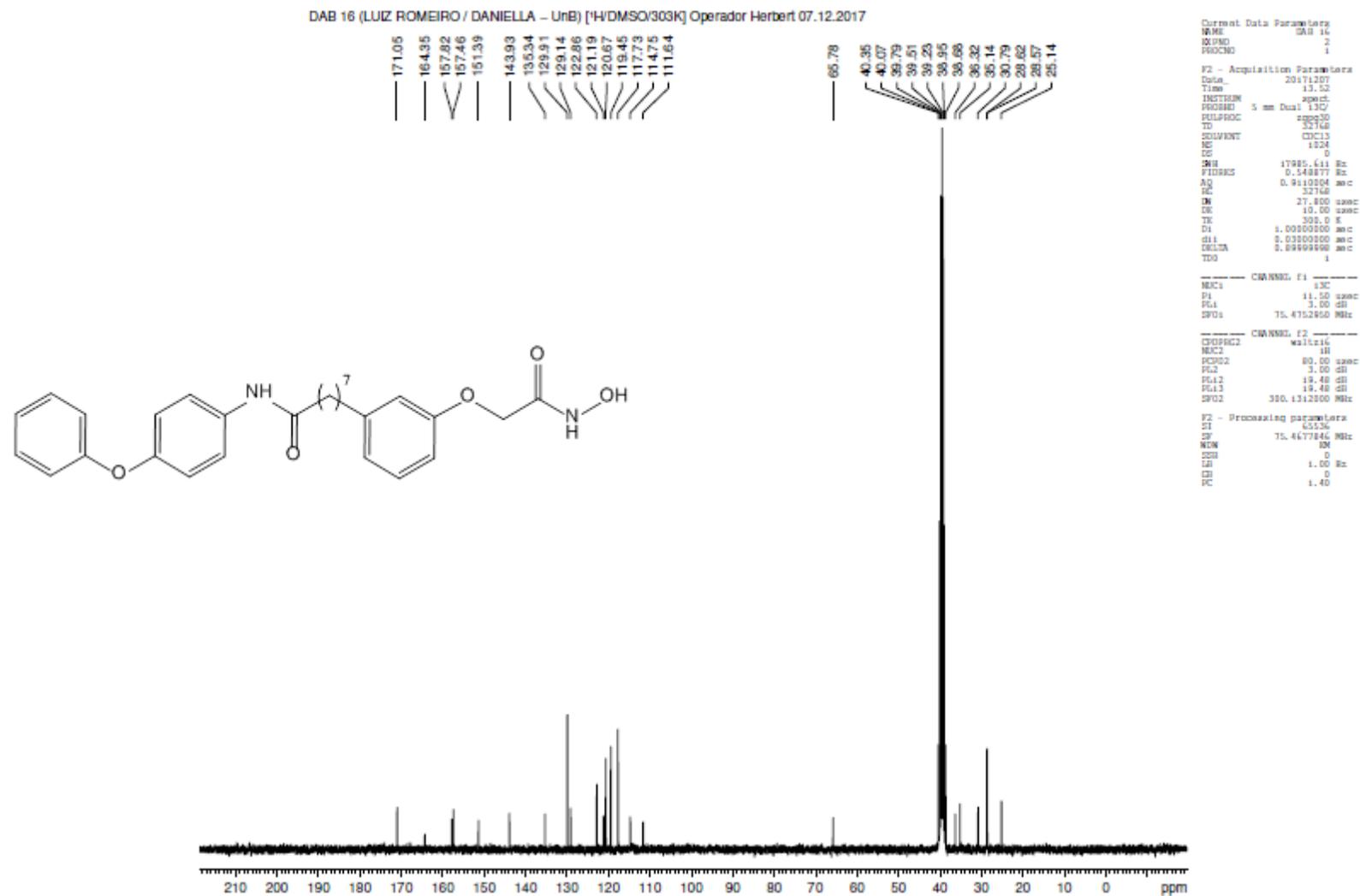
ANEXO 58– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT708 (42)



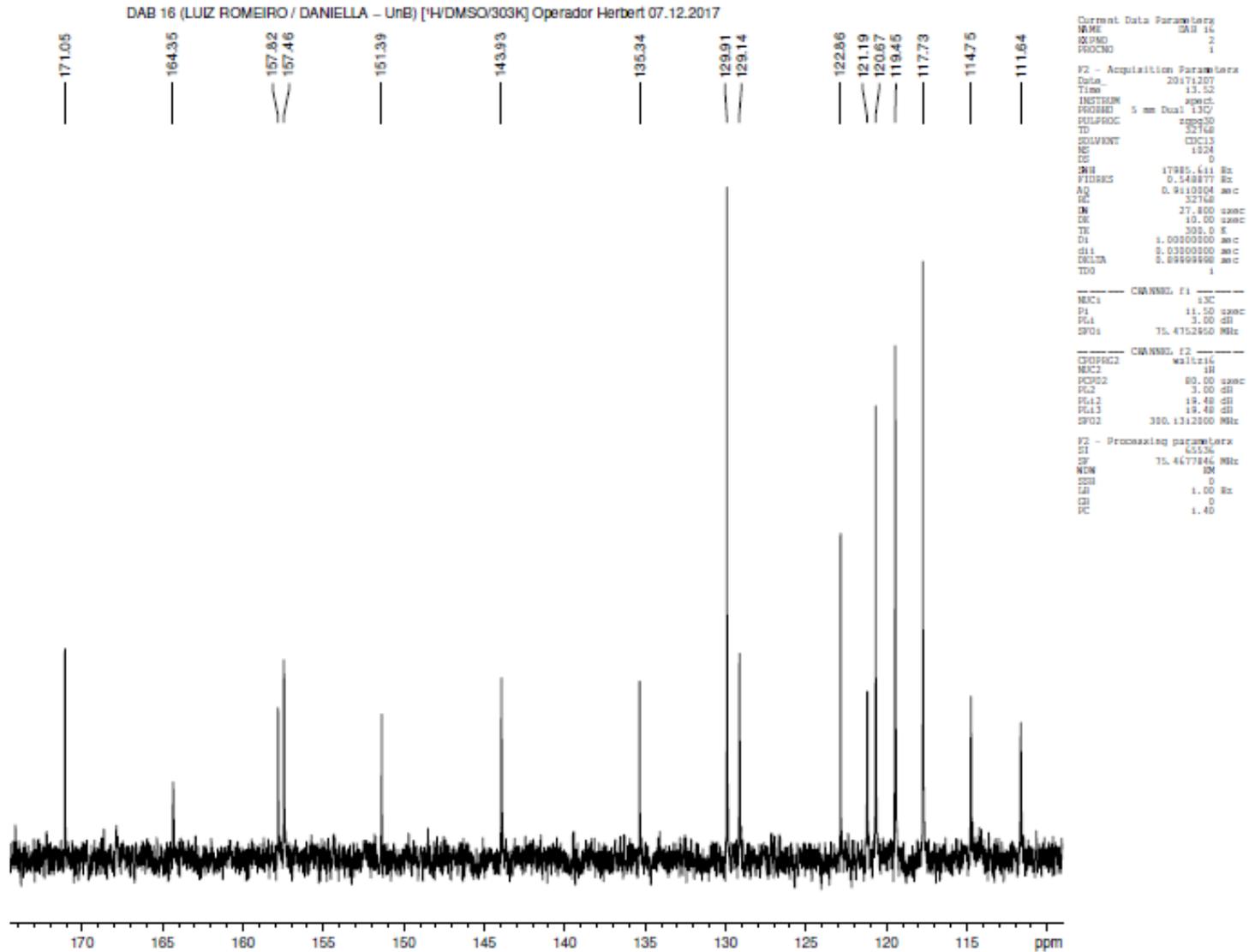
ANEXO 59– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT708 (**42**)



ANEXO 60– Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO):
LDT708 (42)

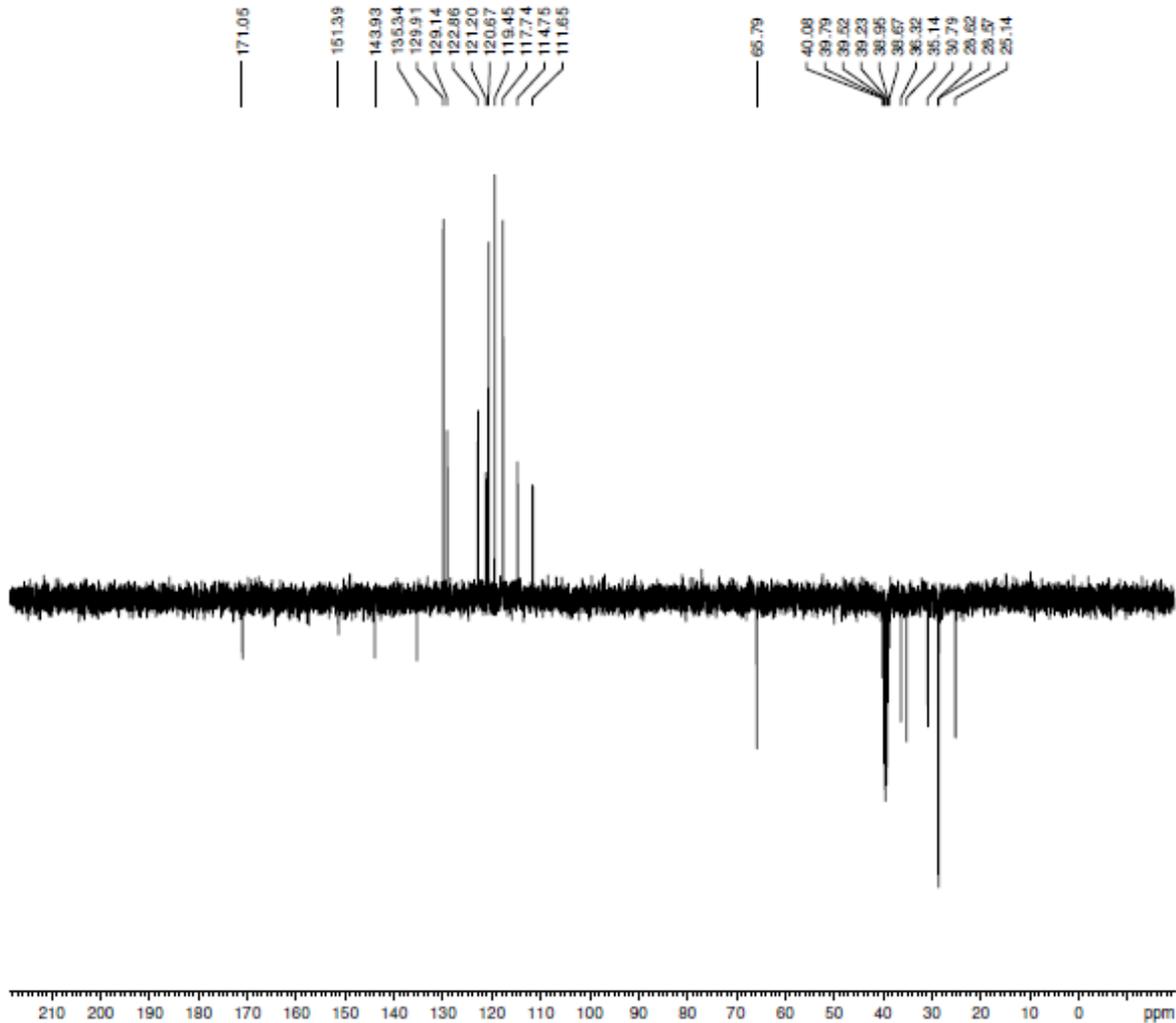


**ANEXO 61– Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT708 (42)**



ANEXO 62– Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT708 (42)

DAB 16 (LUIZ ROMEIRO / DANIELLA – UnB) [APT/DMSO/303K] Operador Herbert 07.12.2017



```

Current Data Parameters
NAME      DAB 16
EXPNO    3
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20171207
Time     14.59
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg
TD        32768
SOLVENT  DMSO-d6
NS        489
DS        0
MH        17985.611 Hz
FIDRES    0.148877 Hz
AQ        0.9410304 sec
RG        32768
IN        27.800 usec
DE        10.00 usec
TE        300.0 K
CMT2     145.000000
CMT11    1.0000000
D1        1.0000000 sec
dD0       2.0048455 sec
DELTA     2.00001464 sec
TD0       1

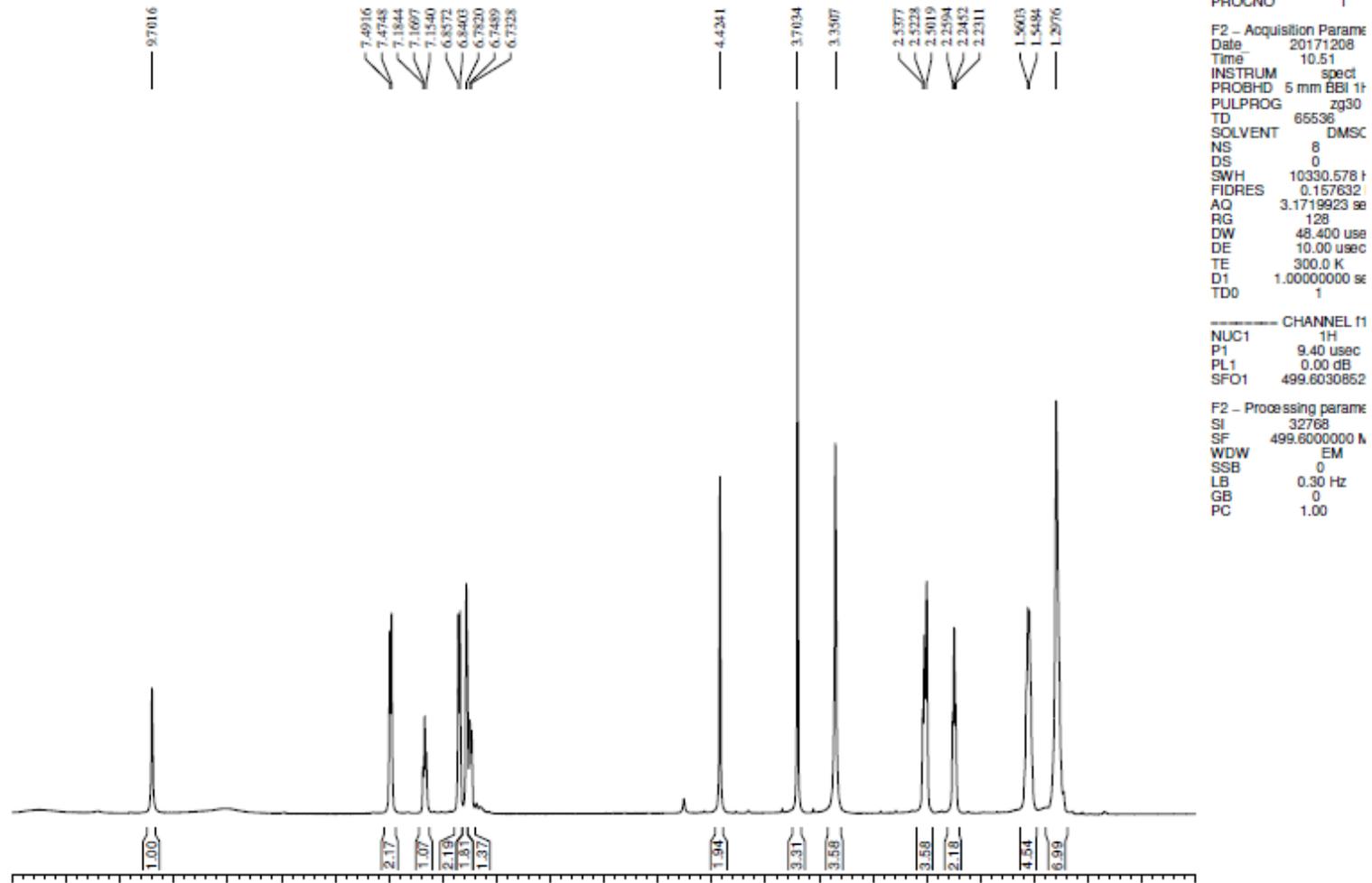
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13C
P1        11.00 usec
PC1       23.00 usec
PL1       0.00 dB
SFO1      75.4752650 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   waltz16
NUC2       1H
PCPD2     80.00 usec
PL2       0.00 dB
PL12      19.48 dB
SFO2      300.1312000 MHz

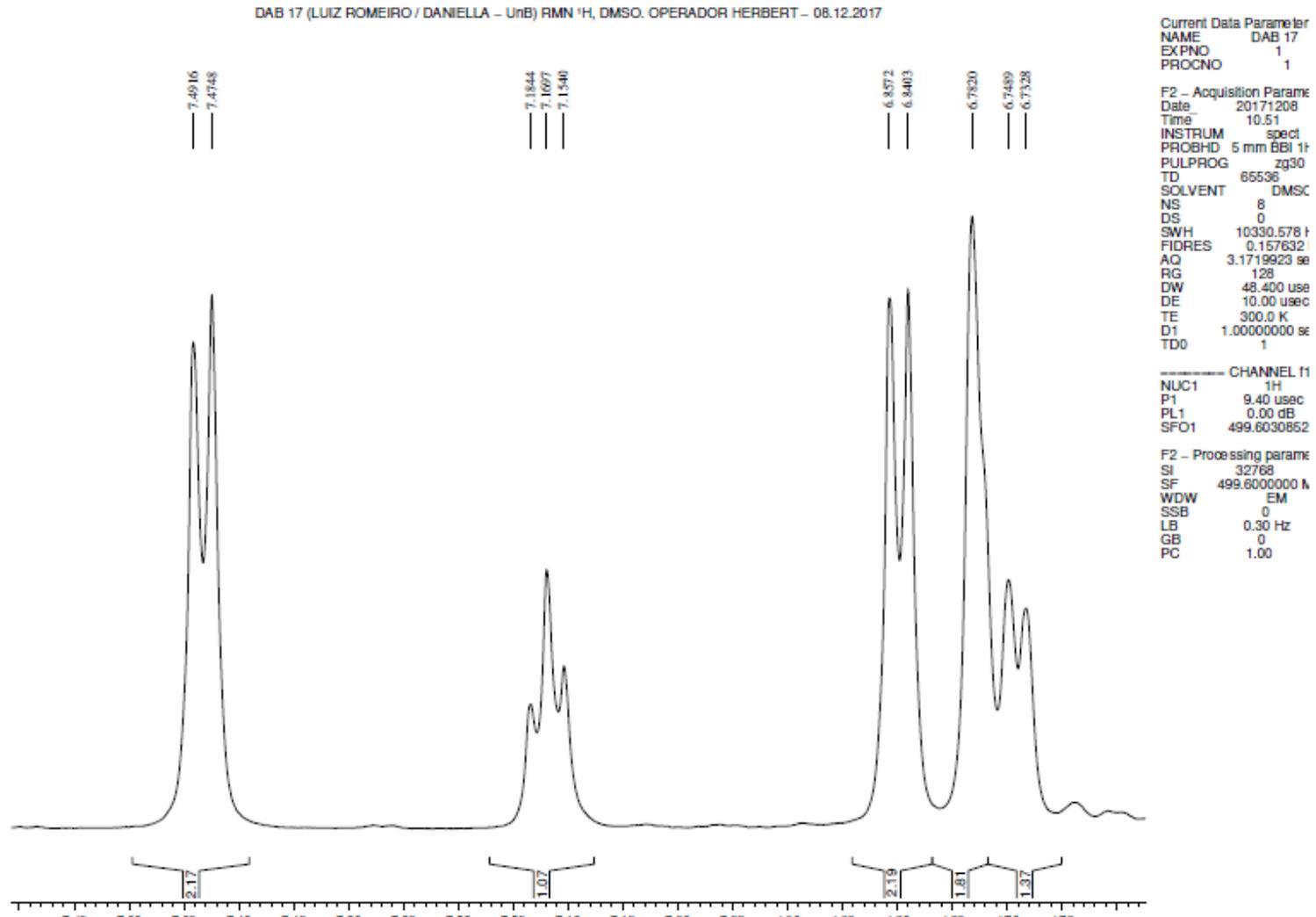
F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         75.4677845 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
  
```

ANEXO 63– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO):
LDT709 (43)

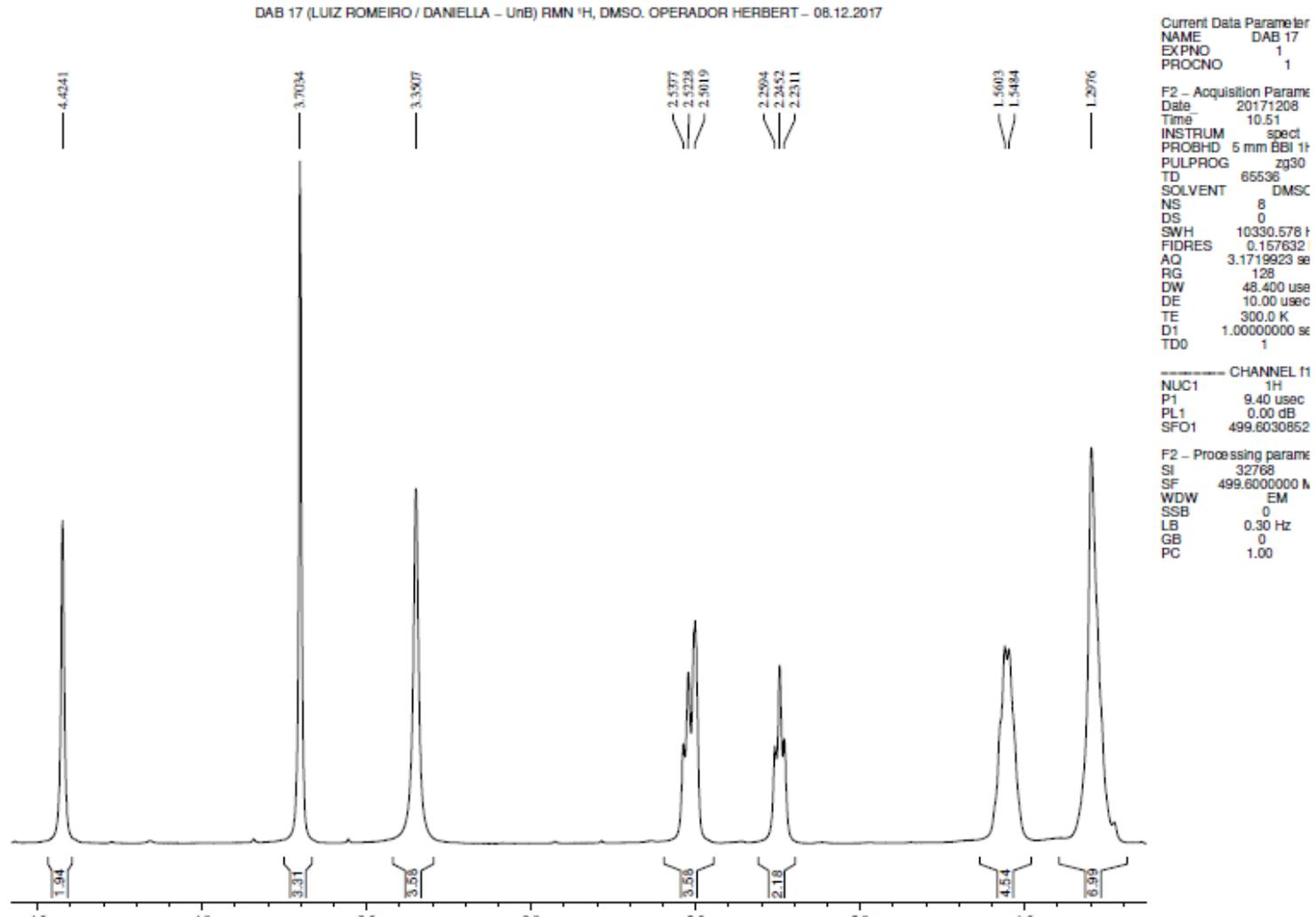
DAB 17 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) RMN ^1H , DMSO. OPERADOR HERBERT – 08.12.2017



ANEXO 64– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT709 (43)

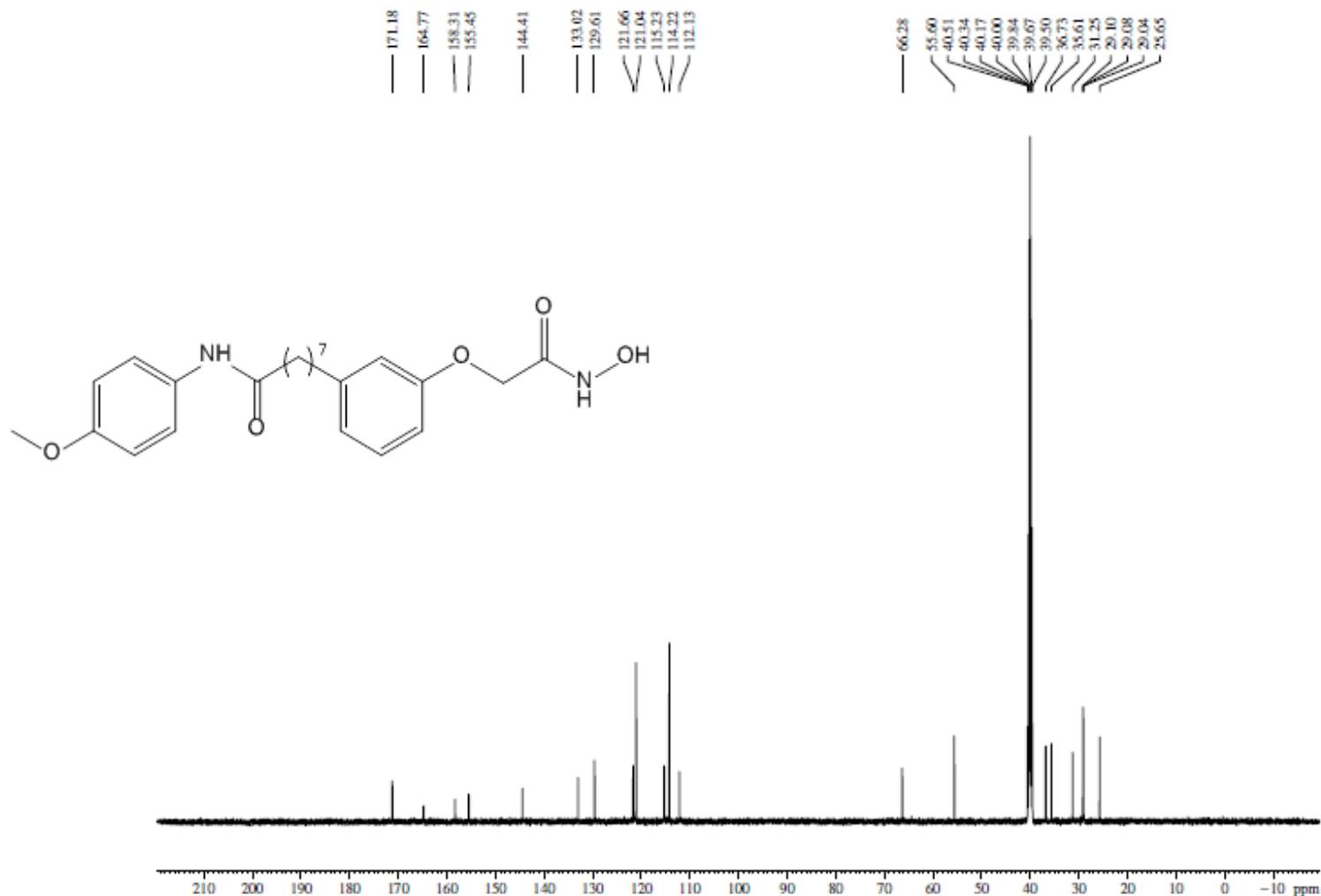


ANEXO 64– Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT709 (43)



ANEXO 65– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO):

LDT709 (43)

DAB 17 (LUIZ ROMERO / DANIELLA – UnB) RMN ^{13}C , DMSO, OPERADOR HERBERT – 08.12.2017

Current Data Parameters
 NAME: DAB 17
 EXPNO: 2
 PROCNO: 1

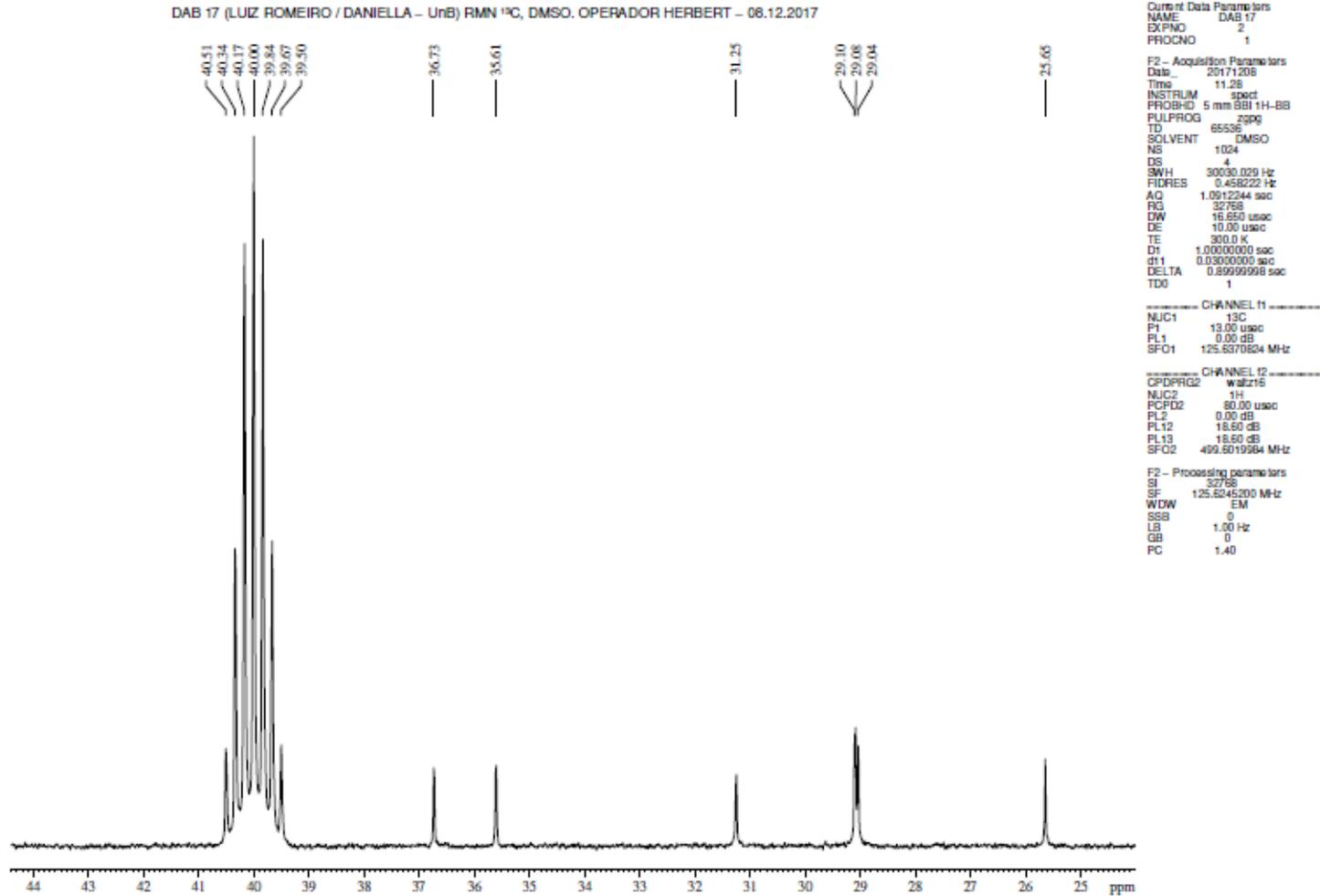
F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 20171208
 Time: 11.28
 INSTRUM: spect
 PROBHD: 5 mm BBI 1H-BB
 PULPROG: zgpg
 TD: 65536
 SOLVENT: DMSO
 NS: 1024
 DS: 4
 SWH: 30030.029 Hz
 FIDRES: 0.458222 Hz
 AQ: 1.0912244 sec
 RG: 32768
 DW: 16.650 usec
 DE: 10.00 usec
 TE: 300.0 K
 D1: 1.0000000 sec
 d11: 0.0300000 sec
 DELTA: 0.8999998 sec
 TDO: 1

----- CHANNEL f1 -----
 NUC1: ^{13}C
 P1: 13.00 usec
 PL1: 0.00 dB
 SFO1: 125.6370624 MHz

----- CHANNEL f2 -----
 CPDPRG2: waltz16
 NUC2: ^1H
 PCPD2: 80.00 usec
 PL2: 0.00 dB
 PL12: 18.80 dB
 PL13: 18.80 dB
 SFO2: 499.8019984 MHz

F2 - Processing parameters
 SI: 32768
 SF: 125.6245200 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 1.00 Hz
 GB: 0
 PC: 1.40

ANEXO 66– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT709 (43)



ANEXO 67– Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO) (Expansão):
LDT709 (43)

