

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Toxicologia

**Inibidores de Desmetilase Lisina-Específica 1
(LSD1) como candidatos a agentes antineoplásicos**

Elys Juliane Cardoso Lima

Tese para obtenção do título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Toxicologia

**Inibidores de Desmetilase Lisina-Específica 1
(LSD1) como candidatos a agentes antineoplásicos**

Elys Juliane Cardoso Lima

VERSÃO ORIGINAL

Tese para obtenção do título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo

2021

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

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

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

732i Lima, Elys Juliane Cardoso
 Inibidores de Desmetilase Lisina-Específica 1
 (LSD1) como candidatos a agentes antineoplásicos /
 Elys Juliane Cardoso Lima. - São Paulo, 2021.
 155 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Trossini , Gustavo Henrique
Goulart

1. Câncer. 2. LSD1. 3. Ensaio enzimático. 4.
Viabilidade celular. 5. Ancoramento molecular. I.
T. II. Trossini , Gustavo Henrique Goulart ,
orientador.

Elys Juliane Cardoso Lima

**Inibidores de Desmetilase Lisina-Específica 1
(LSD1) como candidatos a agentes antineoplásicos**

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Gustavo Henrique Trossini
Orientador e Presidente

Primeiro examinador

Segundo examinador

Terceiro examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2021.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que com sua infinita sabedoria sempre me guiou pelos melhores caminhos. À Nossa Senhora de Nazaré, minha mãe e intercessora das minhas causas.

Dedico à minha família, mãe Ercy Cardoso Lima, Tia Iraci Cardoso Lima, pai José Maria Silva Lima, irmã Ellen Juliana Cardoso Lima e esposo Fernando de Moura Gatti. São Pessoas especiais em minha vida e a eles devo total dedicação e respeito. Tiveram paciência e companheirismo ao me apoiar nos momentos que mais foi preciso, tanto de estresse, como de alegria e me incentivaram para que fosse possível concluir e obter essa conquista.

Ofereço também, ao meu orientador e amigo Gustavo Trossini, o qual abriu as portas do seu grupo de pesquisa e me recebeu sem nenhum julgamento, para que pudéssemos desenvolver juntos esse trabalho. Agradeço imensamente pelo apoio e oportunidade que só foram possíveis com seu auxílio e conselhos.

In memoriam à minha amiga Rosania Yang, minha motivadora e companheira. A pessoa mais positiva e doce que conheci. Boa filha, amiga, namorada, minha eterna madrinha de casamento e fiel escudeira. Me faltam palavras pra te agradecer por tudo.

Agradecimentos

A presente tese foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- código de financiamento 001.

Agradeço imensamente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) por ter permitido a realização deste trabalho.

À agência de fomento CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, por ter financiado 1 ano do meu doutorado sanduíche e ao órgão de fomento DAAD- *Deutscher Akademischer Austauschdienst*, pela oportunidade e financiamento da realização de dois meses do curso de língua alemã na CDC- *Carl Duisberg Center* – Colônia, Alemanha.

Ao Prof. Dr. Bernhard Wunsch, minha eterna referência de pesquisador e líder. Sou muito grata pela recepção calorosa, muito respeitosa e a atenção dada a mim enquanto aluna da Universidade de Münster-Alemanha. Além de poder ter a oportunidade de trabalhar em um projeto do grupo AK Wunsch, que me permitiu muitas discussões, ensinamentos e aprendizados.

Aos técnicos e profissionais da Universidade de Münster e ao amigo Luciano Sales do Centro Brasileiro, responsável por orientar e agilizar todos os processos burocráticos e também a todos os membros do AK Wunsch por serem tão solícitos e me receberem de forma acolhedora.

Aos profissionais do Bloco 13 da FCF-USP, a Dra. Mônica Zannini, Dra. Maria Inês Gonçalves ambas responsáveis pelas análises de RMN, aos técnicos Charles Brito e Elisabete Antunes pelo suporte nas análises de Infravermelho e HPLC e a senhora Dora pelos cafés diários.

Aos alunos de iniciação científica, André Barrizzelli Murino, Thabata Navarro e Adriano Izidorio, os quais trabalharam junto a mim na parte sintética deste trabalho, sendo sempre dedicados e atenciosos nas suas atividades.

Aos colegas de trabalho do grupo LITEC, que tornaram os dias de pesquisa mais descontraídos e agradáveis, Prof. Gustavo Trossini por todos os anos de convívio, Renan Augusto, Witor Ferraz, André Novaes, Raisia Calil, Thabata Navarro, João Machado, Evelin Fornari, Ana Carolina Silva.

Aos amigos do bloco 13 e de laboratório, pelos debates e ensinamentos, e assim pela companhia maravilhosa ao longo desses 10 anos. Citando em especial, *In memoriam* Marcos Arribas que receba a luz eterna, Natanael Segretti, Lorena Paes, Gláucio Ferreira, Alfredo Souza, Rodrigo Gonzaga, Thais Fernandes, Gustavo Vasco, Micael Cunha, Karinne Prado e Mariana Darbem.

Aos meus fies escudeiros, amigos de todas as horas, amigos que me conhecem pelo olhar, aqueles que estão comigo na vitória, na derrota e que sempre tem uma palavra de apoio pra me dar: Luciane Casimiro, Luciana Margalho, Fernando Macedo, Drielle Fujii, Sâmella Russo e Jefferson Perreira.

Aos amigos feitos no período sanduíche, Juliana e Mariana Nascimento, Daniel Gedder, Felipe Texeira, Anderson da Silva, Denise Ilari, pelos bons momentos, encorajamento e conselhos que acalentaram meu coração nesse período longe de casa.

Agradeço também ao seu Luís Gatti, Renata de Moura, Camilla Gatti e Daniella Gatti, por serem minha família aqui em São Paulo. Por me receberem de braços abertos, me acolheram e sempre estarem dispostos a me ajudar.

Ao meu esposo, Fernando de Moura Gatti, amigo, confidente, colega de profissão e parceiro de todas as horas. Aquele que esteve comigo em todos os momentos, me fazendo refletir sobre as escolhas pessoais e profissionais. Sou grata por ter você na minha vida. Muito obrigada, por todo seu cuidado e amor.

*“É preciso que eu suporte duas ou três larvas
se quiser conhecer as borboletas. Dizem que são tão belas”*

-O pequeno príncipe-

RESUMO

LIMA, E. J.C. Inibidores de Desmetilase Lisina-Específica 1 (LSD1) como candidatos a agentes antineoplásicos. 2021. 155f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo sendo, atualmente, a segunda principal causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, tornando-se um grande desafio para as autoridades de saúde pública. No Brasil são estimados 625000 novos casos desta enfermidade para o triênio de 2020-2022. Nesse cenário, vários alvos epigenéticos são considerados alternativas no desenvolvimento de inibidores para a terapia do câncer devido serem identificados e relacionados com a carcinogênese, incluindo modificações no perfil de metilação do DNA e modificações de histonas como a metilação, acetilação e fosforilação. Dentre estas modificações, a metilação de histonas é regulada reversivelmente por histonas metiltransferases e desmetilases. A enzima desmetilase lisina-específica 1 (LSD1) foi a primeira histona desmetilase caracterizada e catalisa a remoção de grupos metila das lisinas 4 e 9 da histona H3 (H3K4 e H3K9), utilizando o FAD como cofator. Superexpressa em vários tumores de alto risco e tendo seus níveis correlacionados com a reincidência do tumor durante o tratamento, a LSD1 apresenta papel fundamental na tumorigênese. Portanto, tem sido considerado um alvo biológico promissor no desenvolvimento de novos fármacos para terapêutica contra o câncer. Sendo assim, neste trabalho, a partir de dados de triagem virtual baseado neste alvo biológico, selecionou-se um *hit*, o qual foi utilizado como protótipo para o planejamento de análogos visando melhorar as características farmacológicas, pois possuem grupos químicos passíveis das mesmas interações com o alvo. Foram sintetizadas 16 moléculas, sendo 7 compostos finais inéditos derivados carboxâmídicos e 9 derivados sulfonâmídicos. Todos os compostos foram caracterizados por RMN (^1H e ^{13}C), espectrometria de massas de alta resolução, espectroscopia de infravermelho, ponto de fusão, polarímetro e a pureza dos compostos foi avaliada por CLAE. Os compostos finais foram submetidos ao ensaio enzimático frente à LSD1, acoplado a Enzima *Horseradish* Peroxidase (EHP), mostrando que apenas o composto **4g** apresentou atividade inibitória de 64% e 57% em 50 μM e 500 μM respectivamente. No ensaio de viabilidade celular na linhagem HEL (linhagem leucêmica) os 16 compostos (**4a- 4g, 5a-5d e 6a-6d**) apresentaram-se ativos com valores de CI_{50} na faixa de 5,3 μM a 20,25 μM . Os compostos mais potentes foram os **4e** (CI_{50} = 6,9 μM), **5d** (CI_{50} = 5,30 μM) e **6a** (CI_{50} = 6,61 μM), evidenciando que os compostos possuem elevada potência, tornando-se moléculas promissoras em linhagens leucêmicas. Os estudos de ancoramento molecular com a LSD1 sugeriram que a mudança de orientação do composto **4g**, permitiu que o grupo benzila da porção benzilamida faça interação com os resíduos PHE560 e TYR807 no bolso hidrofóbico, o que possivelmente acarretou um bloqueio na entrada da cavidade, permitindo a inibição pelo composto.

Palavras-chave: Câncer; LSD1; Síntese; Ensaio enzimático; Viabilidade celular; Ancoramento molecular.

ABSTRACT

LIMA, E. J.C. **Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) inhibitors as candidates for antineoplastic agents**. 2021. 155p. Thesis (PhD degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Cancer is one of the leading causes of death in the world and is currently the second leading cause of death, second only to cardiovascular disease, making it a major challenge for public health authorities. In Brazil, approximately, 625000 new cases of this disease are estimated for the 2020-2022 period. In this scenario, several epigenetic targets are considered alternatives in the development of inhibitors in cancer therapy, since they are identified and related to carcinogenesis, including changes in the DNA methylation profile and changes in histones such as methylation, acetylation and phosphorylation. Among these modifications, histone methylation is reversibly regulated by histone methyltransferases and demethylases. Lysine-specific demethylase1 (LSD1) was the first histone demethylase characterized and catalyzes the removal of methyl groups from lysines 4 and 9 of histone H3 (H3K4 and H3K9), using FAD as a cofactor. LSD1 has been found to be overexpressed in several high-risk tumors and these levels are correlated with tumor recurrence during treatment. Therefore, it has been considered a promising biological target in the development of new drugs with therapeutic potential against cancer. Thus, in this work, the virtual screening technique based on the biological target was used to discover LSD1 interactions, and then based on the hit found, we propose to synthesize compounds that have chemical groups susceptible to such interactions, seeking to evaluate the enzymatic activity in LSD1 enzyme. Were synthesized 16 molecules, 7 of which are unpublished final compound derived from carboxamides and 9 sulfonamide derivatives. All compounds were characterized by NMR (^1H and ^{13}C), high resolution mass spectrometry, infrared spectroscopy, melting point, polarimeter and the purity of the compounds was assessed by CLAE. The final compounds were subjected to enzymatic assays Against LSD1, coupled with enzyme Horseradish Peroxidase (HRP), showing that only the **4g** compound showed 64% and 57% inhibitory activity in 50 μM and 500 μM respectively. In the cell viability assay in the HEL line (Leukemic line) the 16 compounds (**4a-4g**, **5a-5d** and **6a-6d**) were active with IC 50 values in the range of 5.3 μM to 20.25 μM . The most potent compounds were **4e** (CI50 = 6.9 μM), **5d** (CI50 = 5.30 μM) and **6a** (CI50 = 6.61 μM), showing that the compounds have high potency, becoming promising molecules in leukemic lines. Docking studies with LSD1 suggested, that the change in orientation of the **4g** compound allows the benzyl group of the benzylamide portion to interact with the PHE560 and TYR807 residues in the hydrophobic pocket, which possibly cause a block in the entrance of the cavity, allowing the inhibition by the compound. Thus, the results obtained indicate that the class of compounds described is likely to continue to be investigated, both in the search for new LSD1 inhibitory hits based on the structure of the **4g** compound, how to deepen the studies with 16 compounds of the present work in the performance of more specific tests in leukemic cells, in order to unravel the mechanism of action and possible targets.

Keywords: Cancer; LSD1; Synthesis; Enzymatic assay; Cell viability; Docking.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - A. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira. B. Distribuição proporcional por sexo dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil. Ambos os dados estimados para 2020-2022..... 15
- Figura 2** - Mecanismos epigenéticos: metilação do DNA, modificação das histonas e RNA não codificante. DNA metiltransferase (DNMT) estão envolvidas na metilação do DNA nas ilhas CpG (Citosina/fosfato/Guanina). HMT (Histona metiltransferase) e HDM (Histona desmetilase) estão envolvidas na metilação e desmetilação das histonas, HAT (Histona acetiltransferase) e HDAC (Histona desacetilase) estão envolvidos na acetilação e desacetilação de histonas respectivamente, todas responsáveis pela remodelação da cromatina, ativando e inativando genes. Os microRNAs estão envolvidos no controle pós-transcrição dos genes..... 17
- Figura 3** - Níveis de organização da cromatina. A. Histonas são as principais proteínas que compõem o nucleossomo determinando o grau de compactação da cromatina. Duas histonas de cada classe (H2A, H2B, H3 e H4) unem-se para dar origem a um nucleossomo, em associação com o DNA. B. Alterações pós-traducionais das histonas ocorrem por mecanismo de modificação epigenética..... 19
- Figura 4** - Estrutura cristalográfica da LSD1 complexada com seu cofator FAD. Código do PDB (Protein Data Bank): 2HKO. B. Interpretação da estrutura da LSD1. Vermelho: FAD; verde: domínio N-terminal SWIRM; azul claro e escuro: domínio amino oxidase C-terminal (domínio C-terminal AOL) e seus 2 subdomínios; amarelo: domínio torre helicoidal (domínio TOWER); cinza: região N-flexível e C-terminal..... 21
- Figura 5** - Mecanismo catalítico de LSD. Durante a reação, cada ciclo catalítico elimina o grupo metil e produz uma molécula de formaldeído e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), respectivamente, enquanto consomem O₂. O oxigênio molecular é utilizado como aceptor de elétrons oxidando o grupo metil. O cofator FAD, ligado à proteína LSD1, é submetido a redução de dois elétrons por oxidação do substrato. A forma oxidada do FAD é restaurado pelo oxigênio molecular para gerar peróxido de hidrogênio..... 21
- Figura 6** - Inibidores de MAO com ação na LSD1. Concentração inibitória máxima (CI₅₀) e K_i= Constante de inibição..... 23

Figura 7	- Mecanismo de inibição da LSD-1 pela tranilcipromina.	24
Figura 8	- Inibidores de LSD1 em ensaios clínicos. A. inibidores irreversíveis. B. inibidores reversíveis. CI_{50} = Concentração inibitória máxima. ND=não descrito.....	25
Figura 9	- Abordagem simplificada do planejamento racional de fármacos.....	26
Figura 10	- Ensaio de detecção por H_2O_2 para LSD1. A. Quando um substrato de LSD1 é desmetilado, o cofator FAD é reduzido a $FADH_2$. O cofator é re-oxidado pelo oxigênio molecular para formar H_2O_2 . A EHP usa H_2O_2 para reagir 4-AP com DHBS e formar o cromóforo, detectado em 515 nm. B. Oxidação do <i>Amplex red</i> em resorufin, altamente fluorescente usando EHP e H_2O_2	29
Figura 11	- Ilustração da metodologia seguida na triagem virtual baseada na estrutura da LSD1.....	31
Figura 12	- A- Composto ZINC09611484. B- Principais interações do composto ZINC09611484 com os resíduos de aminoácidos da LSD1(PDB ID 3ZMT; TORTORICI, et al., 2013). C- Modelo de interações do receptor com peptídeos sintetizados por Tortorici e colaboradores para definição dos parâmetros utilizados como filtro. D- Grupos químicos passíveis de interações com a LSD1.....	32
Figura 13	- Proposta de modificações moleculares para série de compostos do projeto. A. compostos finais. B. Compostos intermediários derivados sulfonamídicos.....	33
Figura 14	- Síntese do composto 1	53
Figura 15	- Espectro de RMN 1H do 2-(1H)-quinolinona (1).....	54
Figura 16	- Espectro de RMN ^{13}C do 2-(1H)-quinolinona (1).....	55
Figura 17	- Síntese de composto 2	55
Figura 18	- Espectro de RMN 1H do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)	57
Figura 19	- Espectro de RMN ^{13}C do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)	58

Figura 20	- Espectro de RMN ¹ H (<i>S</i>)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (3)	59
Figura 21	- Espectro de RMN ¹ H (<i>S</i>)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (3)	60
Figura 22	- Espectro de RMN ¹³ C (<i>S</i>)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (3)	6
Figura 23	- Espectro de IV do (<i>S</i>)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (3)	62
Figura 24	- Síntese do composto finais (4a-4g)	64
Figura 25	- Espectro de RMN ¹ H do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioxoimidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (4b).....	66
Figura 26	- Espectro de RMN ¹³ C do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioxoimidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (4b).....	68
Figura 27	- Espectro de IV do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioxoimidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (4b).....	69
Figura 28	- Síntese dos compostos derivados sulfonamídicos (5a-d e 6a-d)	70
Figura 29	- Espectro de RMN ¹ H do (<i>S</i>)-Ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoíco (6a).....	72
Figura 30	- Espectro de RMN ¹³ C do (<i>S</i>)-Ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoíco (6a).....	73
Figura 31	- Espectro no IV do (<i>S</i>)-Ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoíco (6a).....	74
Figura 32	- Gráfico do resultado de ensaio enzimático do composto 3 e compostos finais (4a-4g) frente à enzima LSD1 na concentração de 5 µM.....	75
Figura 33	- Gráfico do resultado de ensaio enzimático dos compostos 4c e 4g frente à enzima LSD1 na concentração de 5 µM, 50 µM e 500 µM.....	76
Figura 34	- Gráficos obtidos com os resultados de bioredução do MTT correlacionando a porcentagem de inibição de crescimento (%) <i>versus</i> concentração, em escala logarítmica [µM], dos 16 compostos testados.....	79

Figura 35 - Resultado da validação de ancoramento por <i>redocking</i> do peptídeo PRSFLV (laranja) sobreposto ao peptídeo na estrutura cristalografada da enzima LSD1- 3ZMT (azul) (à direita) e gráfico relacionando os valores da função de ranqueamento ChemPLP <i>versus</i> valores de RMSD das 20 melhores poses (à esquerda)	82
Figura 36 - Interações presentes na estrutura cristalografada do Peptídeo PRSFLV (PDB:3ZMT).....	83
Figura 37 - Resultados da simulação de <i>Docking</i> . A. Interações observados do protótipo ZINC0961148410 com a LSD1. B. Interações observadas do composto 4g com a LSD1.....	84
Figura 38 - Sobreposição do peptídeo PRSFLV (verde turquesa), protótipo ZINC09611484 (roxo) e o composto 4g (azul) na cavidade catalítica da LSD1.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Gradiente de eluição dos solventes utilizados no Método A e B da análise de CLAE.....	39
Tabela 2	- Dados gerais e de caracterização dos compostos finais (4a-4g)	65
Tabela 3	- Comparação dos sinais do RMN de ¹ H do composto intermediário (3) e final (4b)	67
Tabela 4	- Dados gerais e de caracterização dos compostos derivados sulfonamídicos (5a-d e 6a-d)	70
Tabela 5	- Valores obtidos pelo ensaio de biorredução do MTT.....	78
-		
Tabela 6	- Resultados obtidos das funções de escore ChemPLP.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Discriminação dos reagentes, solventes e matérias-primas utilizados no desenvolvimento de toda a parte experimental do trabalho.....	35
Quadro 2	- Discriminação dos equipamentos e programas utilizados nas etapas sintéticas, caracterização das moléculas, ensaio enzimático, ensaio de viabilidade e ancoramento molecular.....	36
Quadro 3	- Deslocamento dos solventes deuterados utilizados.....	40
Quadro 4	- Pontuação da análise visual dos ancoramentos baseados na estrutura do peptídeo PRSFLV encontrada no cristal da enzima LSD1 (3ZMT).....	52

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	- Esquema geral das sínteses dos compostos finais.....	43
Esquema 2	- Esquema de síntese do composto 1	44
Esquema 3	- Esquema de síntese do composto 2	45
Esquema 4	- Esquema de síntese do composto 3	46
Esquema 5	- Esquema de síntese dos compostos 4a-g	47
Esquema 6	- Esquema de síntese dos compostos 5a-d e 6a-d	48
Esquema 7	- Proposta de mecanismo para o composto 1	53
Esquema 8	- Mecanismo de sulfonação para formar o composto 2	56
Esquema 9	- Mecanismo de formação do composto 3	59
Esquema 10	- Mecanismo de reação para obtenção dos compostos finais (4a-4g)	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Câncer	14
1.2 Epigenética e o câncer	16
1.2.1 Mecanismos epigenéticos e a carcinogênese.....	18
1.2.2 LSD1 e o câncer.....	20
1.3 Inibidores de LSD1: terapia oncológica	22
1.4 Planejamento de fármacos	25
1.4.1 Triagem virtual (<i>virtual screening</i>)	27
1.4.2 Ancoramento Molecular (<i>docking</i>).....	27
1.4.3 Avaliação biológica.....	28
1.4.3.1 <i>Ensaios bioquímicos enzimáticos de LSD1</i>	28
1.5 Plano de trabalho	30
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material	35
3.1.1 Reagentes, solventes e matérias-primas.....	35
3.1.2 Equipamentos.....	36
3.2 Métodos	36
3.2.1 Técnicas gerais de trabalho.....	36
3.2.2 Métodos analíticos.....	36
3.2.3 Métodos sintéticos.....	42
3.2.3.1 <i>Descrição sintética geral</i>	42
3.2.3.1.1 <u>Síntese do 2-(1H)-quinolinona (1)</u>	44
3.2.3.1.2 <u>Síntese do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)</u>	44
3.2.3.1.3 <u>Síntese do (S)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanoico (3)</u>	45
3.2.3.1.4 <u>Síntese dos compostos finais: compostos 4a-g</u>	46
3.2.3.1.5 <u>Síntese de derivados sulfonamídicos: compostos 5a-d e 6a-d</u>	48
3.2.4 Método biológico.....	49

3.2.4.1 Ensaio enzimático.....	49
3.2.4.2 Ensaio de viabilidade celular.....	50
3.2.5 Métodos <i>in silico</i>	51
3.2.5.1 Ancoramento Molecular (<i>docking</i>).....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Síntese e caracterização dos compostos planejados.....	52
4.1.1 Síntese e caracterização do composto 2-(1H)-quinolinona (1).....	53
4.1.2 Síntese e caracterização do composto cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)	55
4.1.3 Síntese e caracterização do (<i>S</i>)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (3)	58
4.1.4 Síntese e caracterização dos compostos finais (4a-4g)	62
4.1.5 Síntese e caracterização dos derivados sulfonamídicos (5a-d e 6a-d)	69
4.2 Ensaio Biológico.....	74
4.2.1 Ensaio enzimático.....	74
4.2.2 Ensaio de viabilidade celular.....	77
4.3 Estudos <i>in silico</i>.....	81
4.3.1. Ancoramento molecular (<i>Docking</i>).....	81
5. CONCLUSÃO.....	86
6. REFERÊNCIA.....	88
Anexos.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

No modelo da oncogênese, o câncer surge a partir de células que sofrem mutações ou alterações genéticas capazes de se multiplicar de forma, geralmente, acelerada e desordenada, formando uma massa de tecido anormal, com potencial para invadir e se multiplicar em tecidos adjacentes e/ou distantes ao seu local de surgimento (ACS, 2020; WHO, 2020). O desenvolvimento de tumores secundários em uma parte do corpo que está longe do câncer primário original é denominado metástase, característica central da malignidade do câncer e responsável pela principal causa de morte para > 90% dos pacientes com a doença (FARES et al., 2020).

As alterações que levam ao câncer podem ser resultado de uma variedade de fatores, tanto intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, quanto extrínsecos, como estilo de vida (tabagismo e obesidade), dano e instabilidade genética induzida por radiação, substâncias químicas ou por infecção viral e o envelhecimento (ACS, 2020; INCA, 2020; FARES et al., 2020; HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam o câncer sendo responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018 e juntamente com a sua Agência Internacional de pesquisa em câncer (IARC, acrônimo de *International Agency for Research on Cancer*) estimam 21,5 milhões o número de novos casos para 2025 podendo chegar a 29,5 milhões em 2040 (WHO, 2020).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, o câncer é um dos principais problemas de saúde pública e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) (INCA, 2020).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou que para o triênio 2020-2022, haverá ocorrência de aproximadamente 625 mil novos casos de câncer, sendo o de pele do tipo não melanoma (177 mil casos novos) o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata e mama (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (Figura 1A). Os tipos mais frequentes em homens serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%), à exceção do câncer de pele não melanoma em ambos os sexos,

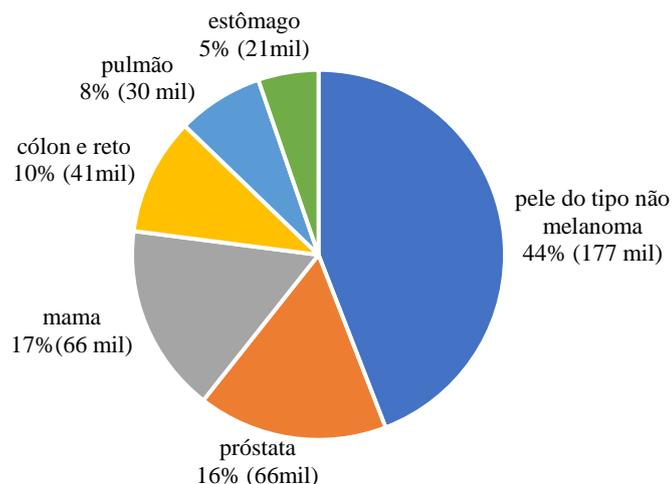
como podemos observar na Figura 1B. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% e 29,5% de todos os casos de câncer em homens e em mulheres respectivamente (INCA, 2020).

Em contrapartida, o Sistema Único de Saúde (SUS) dispõe de estrutura limitada para absorver e tratar adequadamente todos esses novos casos. Os gastos do governo com assistência oncológica no país aumentaram mais de 100% em 7 anos, passando de R\$ 2,1 bilhões (em 2010) para R\$ 4,5 bilhões (em 2017). Esses valores referem-se apenas aos gastos diretos aplicados na atenção oncológica que englobam cirurgias, radioterapia e quimioterapia (INTERFARMA, 2019; Data-SUS, 2017).

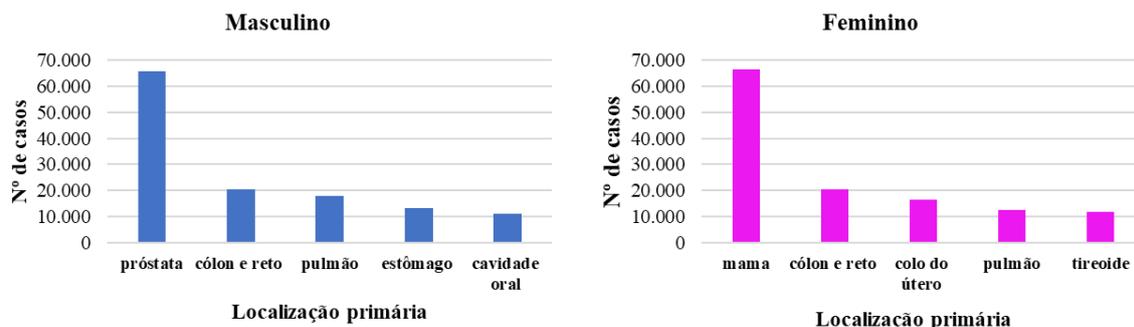
Figura 1.A. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira. **B.** Distribuição proporcional por sexo dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil. Ambos os dados estimados para 2020-2022 (INCA, 2020).

A.

**Estimativa de tipos de câncer mais incidentes no Brasil
(triênio 2020-2022)**



B.



Face ao exposto, o aumento no número de indivíduos acometidos por câncer, somados à tendência de envelhecimento da população e os elevados custos da terapia antineoplásica, vêm despertando cada vez mais o interesse de pesquisadores nessa área. O reflexo da busca de antineoplásicos mais eficazes pode ser observado em dados publicados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), que apontam que 41% dos fármacos aprovados no primeiro semestre de 2020 foram destinados ao tratamento do câncer (FDA, 2020). Em vista das limitações terapêuticas devido à alta toxicidade e baixa seletividade dos fármacos utilizados para o tratamento do câncer é necessário a busca por moléculas bioativas, que apresentem melhor espectro de ação, eficácia contra tumores resistentes aos fármacos disponíveis e, ainda, que melhorem a tolerabilidade ao tratamento (PUSHPAKOM et al., 2019; ROSNER et al., 2011).

1.2 Epigenética e o câncer

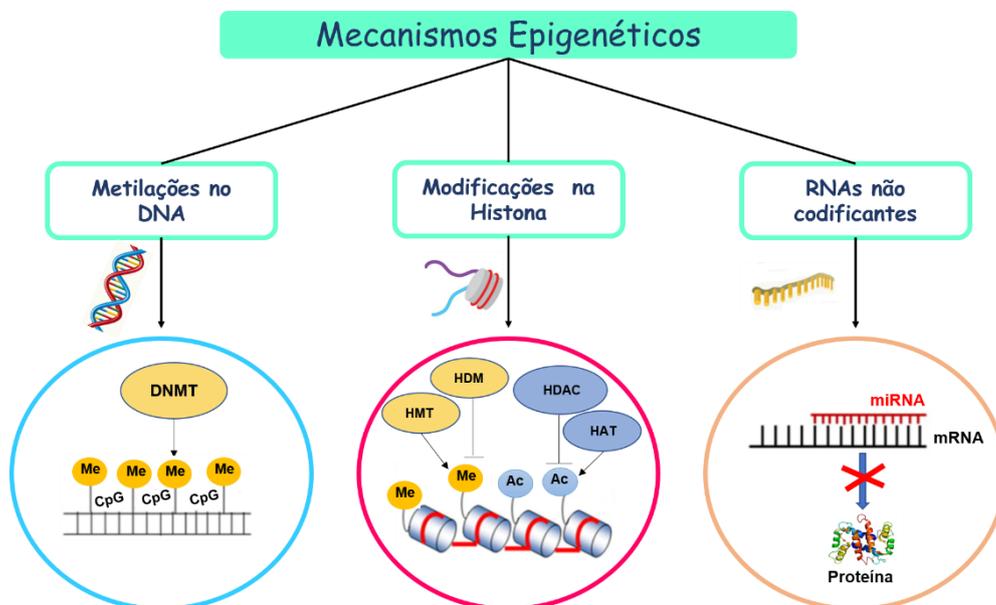
O termo epigenética surgiu na metade do século XX após estudos correlacionando bases genéticas e embriológicas. O prefixo *epi*, do grego por cima, apresenta uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética com base no DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*). Epigenética investiga, principalmente, os papéis funcionais e hereditários do gene que não são acompanhadas por alterações da sequência primária de DNA. Sendo assim, o fenótipo de um organismo pode ser alterado mesmo não havendo mutações na sequência gênica, apenas por meio da regulação da expressão desses genes (QUAGLIANO et al., 2020; ZHENG et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2010, ESTELLER, 2007).

As constantes alterações extremas no microambiente celular necessitam de mecanismos para adaptação às novas realidades metabólicas e de espaço. Nesse contexto, as alterações epigenéticas mostram-se importantes para esse processo, tendo em vista que apresentam aspectos importantes como seu potencial de herdabilidade, estabilidade à longo prazo e plasticidade. Assim, mecanismos epigenéticos proporcionam meios moleculares para reagir às modificações ambientais com mudanças estáveis de expressão gênica (BISWAS; HOA, 2018; BHAT et al., 2015, DUPONT et al., 2009).

Os mecanismos epigenéticos são descritos por uma variedade de processos, incluindo metilação do DNA, modificações de histonas e RNAs (ácidos ribonucleicos, do inglês *ribonucleic acids*) não codificantes, como os microRNAs (miRNAs) que são mecanismos chaves associados a iniciação do tumor, progressão do câncer e metástase

(Figura 2). Estas alterações funcionam em conjunto para regulação do funcionamento do genoma, alterando a dinâmica estrutural da cromatina e, principalmente, regulando sua acessibilidade e compactação (QUAGLIANO et al., 2020; BISWAS; HOA, 2018; SHARMA et al., 2010, DUPONT et al., 2009).

Figura 2. Mecanismos epigenéticos: metilação do DNA, modificação das histonas e RNA não codificante. DNA metiltransferase (DNMT) estão envolvidas na metilação do DNA nas ilhas CpG (Citosina/fosfato/Guanina). HMT (Histona metiltransferase) e HDM (Histona desmetilase) estão envolvidas na metilação e desmetilação das histonas, HAT (Histona acetiltransferase) e HDAC (Histona desacetilase) estão envolvidos na acetilação e desacetilação de histonas respectivamente, todas responsáveis pela remodelação da cromatina, ativando e inativando genes. Os microRNAs estão envolvidos no controle pós-transcrição dos genes.



Adaptado de CHATURVEDI, TYAGI, 2014.

No contexto tumoral, observa-se alterações nos padrões de metilação, podendo haver aumento ou diminuição; modificação na configuração das histonas, o que resulta na alteração da acessibilidade ao genoma e modificação na expressão de alguns genes, devido aos eventos de *imprinting* genômico; bem como expressão diferencial de microRNAs (miRNA). Assim, os mecanismos epigenéticos atuam para a tumorigênese, sendo de grande importância para compreender, não apenas as mudanças genéticas, mas também as modificações no epigenoma das células tumorais (CHENG et al., 2019; FLAVAHAN et al. 2017; ZHENG et al., 2015, SHARMA et al., 2010).

A importância dos processos epigenéticos tem sido fortemente enfatizada pelo crescente número de falhas reportadas em estudos relacionados a tumorigênese. Nestas observações, as alterações epigenéticas foram identificadas em vários tipos tumorais, entre eles, câncer de cólon, endométrio, hepáticos, do sistema nervoso, de mama, esôfago, bexiga, pele, leucemias, entre outros (FLAVAHAN et al. 2017, FU et al., 2017; HØJFELDT et al., 2013)

Estudos publicados por FLAVAHAN e colaboradores 2017, descrevem que o modelo mecanístico geral para a epigenética do câncer, parte da ideia primordial que a genética específica, fatores ambientais e estímulos metabólicos perturbam o equilíbrio homeostático da cromatina, fazendo com que ela se torne anormalmente restritiva ou permissiva para expressão de genes (FLAVAHAN et al., 2017). Tais estímulos podem atuar em uma célula pré-maligna, para promover a iniciação tumoral e/ou em uma célula maligna, para acelerar a evolução do tumor e adaptação. Este modelo pode explicar diversos estímulos oncogênicos cujos efeitos são mediados através dessas alterações da cromatina. A ação em conjunto de tais estímulos sugere que as alterações epigenéticas contribuam para diversos aspectos da biologia do câncer (CHENG et al., 2019; FLAVAHAN et al., 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

1.2.1 Mecanismos epigenéticos e a carcinogênese

A carcinogênese é um processo cumulativo e microevolutivo, no qual há a perda do controle do ciclo celular, resultando em capacidade de proliferação descontrolada, fenótipo invasivo e, muitas vezes, resistência a uma grande variedade de fármacos citotóxicos. Há, portanto, uma coocorrência entre fatores genéticos e epigenéticos no desenvolvimento tumoral e isso sugere que a estabilidade genética e epigenética estejam intimamente relacionadas (ARISTIZABAL, et al., 2019; PERRI et al., 2017; PISANIC et al., 2016, HOLLIDAY R., 1979).

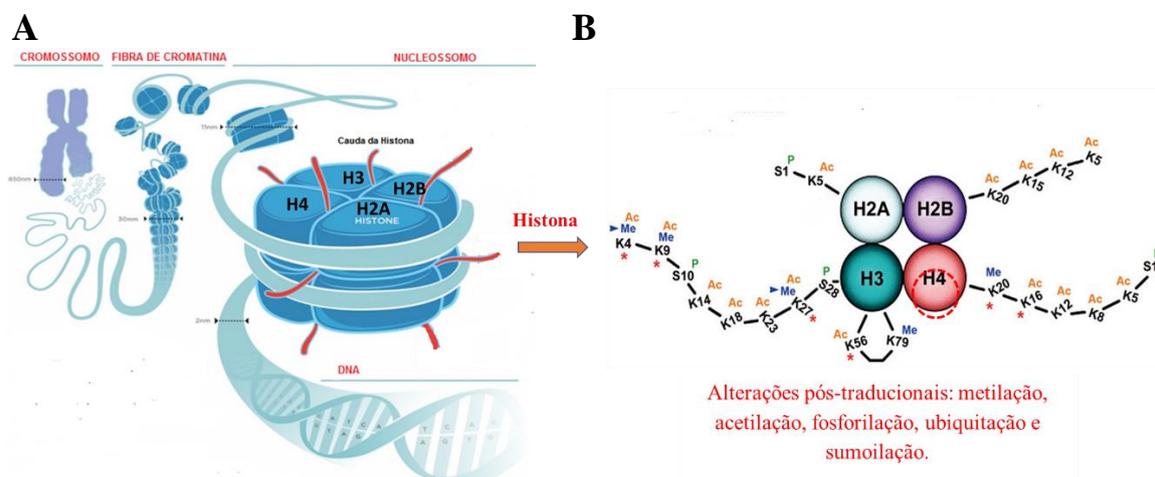
No mecanismo epigenético, a metilação do DNA ocorre na presença de uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT), as quais catalisam a transferência de um grupo metila da S-adenosilmetionina para ao carbono 5 do anel das citosinas presentes no DNA formando a 5-metil-desoxicitidina e a S-adenosil homocisteína. No processo de carcinogênese o perfil de metilação de células neoplásicas, no geral, é marcado por hipometilação ao longo do genoma (gera o crescimento desordenado das células pelo favorecimento da transcrição dos proto-oncogenes) e

hipermetilação em regiões promotoras (silenciamento de genes supressores de tumor), combinando-se com a presença de um padrão exacerbado de modificação de histonas (ARISTIZABAL, et al., 2019; BISWAS; RAO, 2017; HØJFELDT et al., 2013, LODI et al., 2012, DE OLIVEIRA et al., 2012, RELTON, 2010).

A estrutura primária da cromatina e o posicionamento dos nucleossomos são específicos de cada tipo celular, e estes fatores influenciam na suscetibilidade de mutação do DNA em locais específicos (*hotspots*), evento relevante para a progressão tumoral (ARISTIZABAL, et al., 2019; FERRARO, 2016).

Um outro mecanismo de modificação epigenética observado no câncer são as alterações pós-traducionais das histonas. As histonas são proteínas associadas às moléculas de DNA e que determinam o grau de compactação da cromatina, podendo ser metiladas, acetiladas, fosforiladas, ubiquitadas e sumoiladas (Figura 3A). A metilação de histonas ocorre em resíduos de lisina e arginina, sendo esta modificação catalisada por histonas metiltransferases. Um dos eventos característicos é a depleção de histonas com marcas repressivas, como a trimetilação da lisina 20 da histona H4 (H4K20me3) ocasionando a perda de heterocromatina nessas regiões (Figura 3A). Geralmente, essas alterações nos padrões de modificação das histonas foram relatadas em uma variedade de tumores e correlacionadas com o estágio do tumor e prognóstico (PARK et al., 2019; HØJFELDT, et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2012; KOUZARIDES, 2007).

Figura 3. Níveis de organização da cromatina. A. Histonas são as principais proteínas que compõem o nucleossomo determinando o grau de compactação da cromatina. Duas histonas de cada classe (H2A, H2B, H3 e H4) unem-se para dar origem a um nucleossoma, em associação com o DNA. B. Alterações pós-traducionais das histonas ocorrem por mecanismo de modificação epigenética.



Adaptado de *Resverlogix.com*

Anteriormente acreditava-se que a metilação de histonas seria uma marcação epigenética permanente, sendo apenas removida em condições específicas como a replicação do DNA. Entretanto, esse entendimento mudou com a demonstração que a Desmetilase Lisina-Específica 1 (LSD1) promove a desmetilação das lisinas 4 e 9 da histona H3. A metilação de lisinas em histonas, portanto, pode ser regulada dinamicamente por meio do recrutamento de metiltransferases e desmetilases, de maneira similar à acetilação de histonas. No entanto, a desregulação da acetilação e da metilação em histonas leva ao silenciamento de genes supressores de tumor ou a ativação de genes pró-oncogenes contribuindo para a progressão do câncer (ARISTIZABAL, et al., 2019; CHEN et al., 2012; YANG et al., 2007).

No que diz respeito aos miRNAs, são curtos (~22 nucleotídeos), de fita simples e são RNAs não codificantes que interagem com proteínas para formar complexos de silenciamento induzidos por RNA, no qual regulam mRNAs por meio da degradação ou inibição de sua tradução em proteínas (BITETTI et al., 2018). Alguns miRNAs já possuem sua capacidade oncogênica bem estabelecida, como o miR-21 para o câncer de mama, cervical, glioblastoma e câncer pancreático e o miR-155 para linfomas. Sendo assim, pode-se sugerir que o perfil de expressão de miRNAs possa ser uma maneira mais precisa de classificar tumores, se comparado com o perfil de expressão gênica (ABBA et al., 2017).

Sendo assim, com o avanço no entendimento dos mecanismos epigenéticos e sua relação com o câncer, em específico a comprovação que as alterações pós-traducionais das histonas são reguladas dinamicamente, a LSD1 vêm demonstrando evidências crescentes que a desregulação da sua função possui um impacto significativo sobre a carcinogênese. Neste contexto, a LSD1 é considerada alvo promissor para terapia oncológica (RAVASIO et al., 2020; SAITO et al., 2019; FU et al., 2017; ZHENG et al., 2015; CHEN et al., 2012).

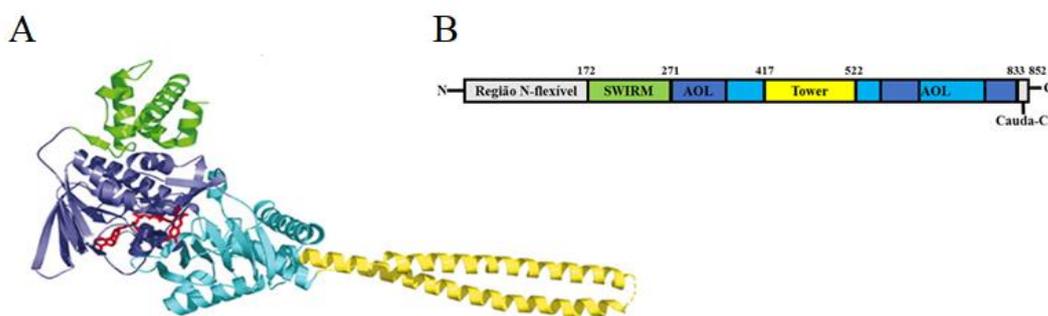
1.2.2 LSD1 e o câncer

A Desmetilase Lisina-Específica 1 (LSD1) foi a primeira desmetilase de histona a ser identificada. É uma proteína nuclear (852 aminoácidos) da família das amino oxidases dependentes de FAD (*flavin adenine dinucleotide*) que participa da regulação epigenética da expressão gênica (SHI et al., 2004).

A estrutura da LSD1 consiste em 3 domínios maiores: o domínio N-terminal SWIRM, o domínio amino oxidase C-terminal (domínio C-terminal AOL) e o domínio

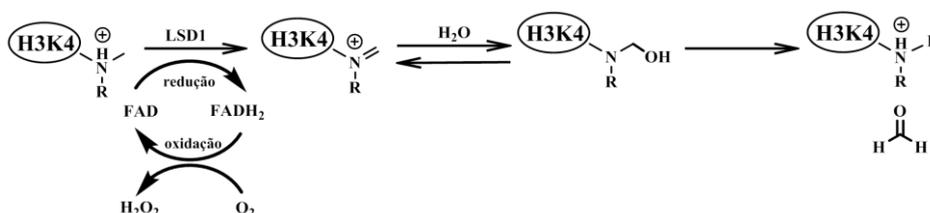
torre helicoidal (domínio *TOWER*), esse indispensável para a atividade catalítica da LSD1 (Figura 4). A LSD1 requer o co-repressor CoREST, o qual interage com o domínio “torre”, para desmetilar as lisinas di- e monometiladas da histona H3 no núcleo (CHEN et al., 2012).

Figura 4. A. Estrutura cristalográfica da LSD1 complexada com seu cofator FAD. Código do PDB (Protein Data Bank: 2HKO). B. Interpretação da estrutura da LSD1. Vermelho: FAD; verde: domínio N-terminal SWIRM; azul claro e escuro: domínio amino oxidase C-terminal (domínio C-terminal AOL) e seus 2 subdomínios; amarelo: domínio torre helicoidal (domínio *TOWER*); cinza: região N-flexível e C-terminal (CHEN et al., 2006).



A LSD1 atua desmetilando especificamente as lisinas 4 e 9 di- e monometiladas da histona H3 (H3K4 e H3K9) utilizando o FAD como cofator via processo redox (HOFFMANN et al., 2012) (Figura 5). Além disso, a capacidade de modular uma ampla gama de substratos diferentes de histonas como p53, E2F1, DNMT e vias celulares, faz com que a LSD1 tenha um papel crucial em diversos processos biológicos e patológicos como o câncer (GANESAN et al., 2019; FU et al., 2017; CHEN et al., 2012; HOFFMANN et al., 2012).

Figura 5. Mecanismo catalítico de LSD. Durante a reação, cada ciclo catalítico elimina o grupo metil e produz uma molécula de formaldeído e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), respectivamente, enquanto consomem O₂. O oxigênio molecular é utilizado como aceptor de elétrons oxidando o grupo metil. O cofator FAD, ligado à proteína LSD1, é submetido a redução de dois elétrons por oxidação do substrato. A forma oxidada do FAD é restaurado pelo oxigênio molecular para gerar peróxido de hidrogênio (ZHEN et al., 2015).



Lian e colaboradores descobriram que a LSD1 promove a tumorigênese e prevê prognóstico no câncer da vesícula biliar. A mesma foi, ainda, encontrada superexpressa em certos tumores de alto risco e esses níveis estão correlacionados com a reincidência do tumor durante o tratamento (LIAN et al., 2015; KAHL et al., 2006; METZGER et al., 2005). A nível celular, a superexpressão de LSD1 no carcinoma da próstata é o suficiente para promover a transcrição dependente de Receptor Androgênico (RA) mesmo na ausência de androgênios (KAHL et al., 2006).

Estudos de Huang e colaboradores demonstraram que o gene p53, responsável pela supressão de tumor e ativador da transcrição, é regulado por inúmeras modificações pós-traducionais, incluindo a metilação da lisina. Conforme dados deste estudo, a LSD1 interage com o p53 para reprimir a ativação da transcrição mediada pelo mesmo e inibir o seu papel na promoção da apoptose (CHEN et al., 2012; HUANG et al. 2007).

Além disso, uma nova área na pesquisa do câncer é o estudo das células-tronco cancerosas (CSCs) e as implicações translacionais para as supostas terapias epigenéticas direcionadas contra elas. Considerando que a LSD1 desempenha um papel de modulação, expressão e proliferação nas células-tronco hematopoiéticas e neuronais normais ela se torna um alvo a ser explorado nesse campo (HOSSEINI; MINUCCI et al., 2017). Estudos recentes relataram que a mesma está envolvida na regulação de CSCs em diferentes leucemias e tumores sólidos. Contudo, os mecanismos precisos que a LSD1 usa para mediar seus efeitos sobre o câncer são ainda desconhecidos (KARAKAIDOS et al., 2019).

Assim, a LSD1 encontra-se com níveis alterados em vários tipos de câncer e apresenta um importante papel na carcinogênese. Portanto, apresenta-se como alvo terapêutico promissor para o tratamento do câncer (TU et al., 2020; GANESAN et al., 2019, FANG et al. 2019; ZHEN et al., 2015, HOFFMANN et al., 2012).

1.3 Inibidores de LSD1: terapia oncológica

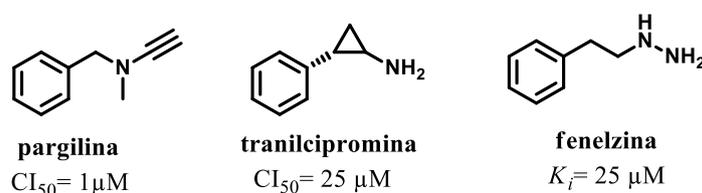
As enzimas desmetilase lisina-específica (LSD1 e LSD2), compartilham o domínio amino oxidase com um grande número de famílias oxidases, incluindo as poliamino oxidases e monoamino oxidases A e B (MAO-A e MAO-B), estas últimas apresentam identidade estrutural de 17,6% com a LSD1 (YE et al., 2014).

Embora a LSD1 e LSD2 apresentem os domínios SWIRM e amino oxidase, eles não são totalmente idênticos. Curiosamente, estudos estruturais de LSD2 em complexos

com a NPAC (proteína de múltiplos domínios) demonstraram que a mesma possui dois locais de ligação que, juntos, interagem com a cauda da histona 3 e, ao contrário da LSD1, a atividade do nucleossomo - desmetilase do LSD2 depende da proteína NPAC. Sendo assim, LSD1 e LSD2 são histonas demetilases homólogas com resultados biológicos diferentes relacionados ao silenciamento da cromatina e ao alongamento da transcrição, respectivamente (MARABELLI et al., 2019; TO et al., 2013).

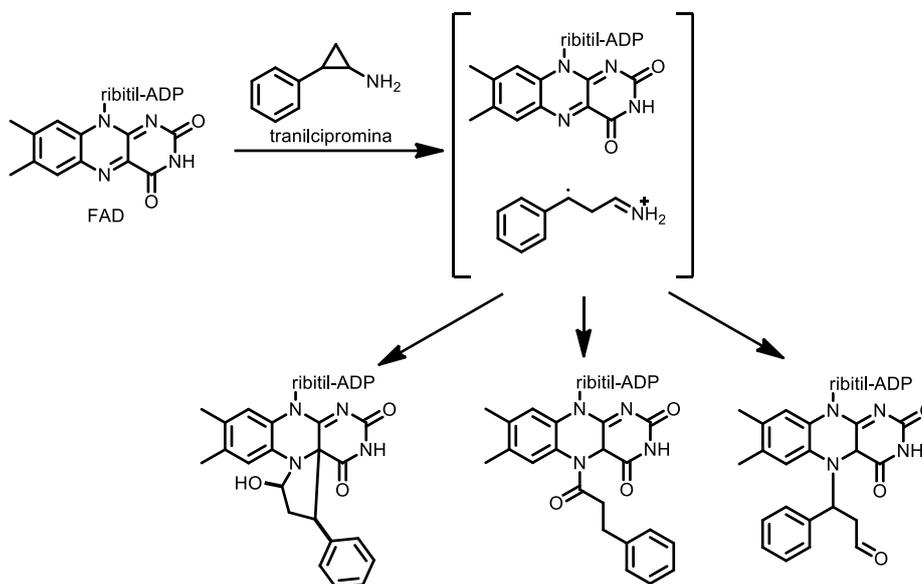
Os primeiros inibidores testados frente a LSD1 foram a pargilina, tranilcipromina (2-PCPA) e fenelzina os quais são descritos como inibidores irreversíveis (Figura 5). (DAI et al., 2020; GANESAN et al. 2019; FU et al., 2017; ZHENG et al., 2015; POLLOCK et al., 2012).

Figura 6. Inibidores de MAO com ação na LSD1. Concentração inibitória máxima (CI_{50}) e K_i = Constante de inibição (ZHENG et al., 2015).



A 2-PCPA liga-se covalentemente com o FAD dentro da cavidade reativa da LSD1 devido à abertura de seu grupo ciclopropil gerando espécies radiculares que formam uma ligação covalente com o cofator FAD (Figura 7). Dessa forma, o mecanismo de inibição da LSD-1 pela 2-PCPA é irreversível. No entanto, devido à limitação da sua potência e falta de selectividade, este composto ainda permanece em estudo clínico e avaliação no tratamento combinado com ATRA (ácido *trans*-retinóico) e azacitidina para terapia do câncer (DAI et al., 2020; FANG et al., 2019; ZHENG et al., 2015). Sendo assim, há um considerável interesse de indústrias farmacêuticas em desenvolver inibidores específicos e reversíveis para esse alvo (FANG et al., 2020, FANG et al., 2019; ZHANG et al., 2020; HØJFELDT et al., 2013).

Figura 7. Mecanismo de inibição da LSD-1 pela tranilcipromina.

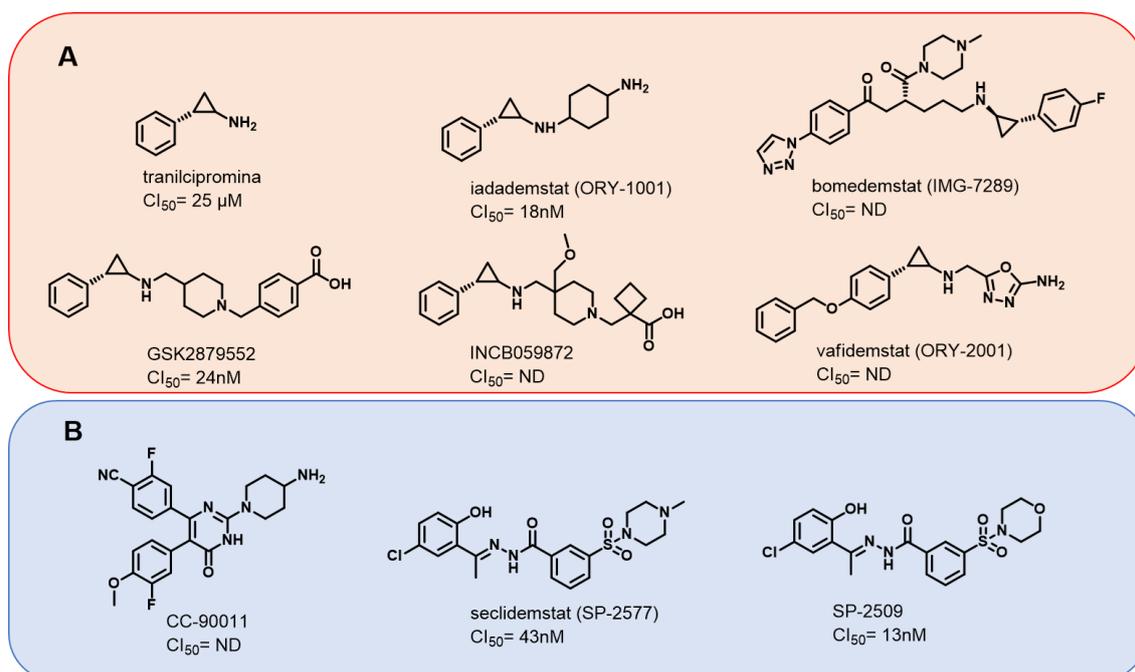


Adaptado de ZHENG et. al, 2015.

Diversos inibidores de LSD1 já foram reportados, entre eles análogos de 2-PCPA, peptídeos, hidrazidas, aminotiazoles, feniloxazoles, amidoximas, triazol-ditiocarbamato, poliaminas biguanida, tiazol sulfonamidas, bisguanidina e derivados de produtos naturais. Estes últimos inibidores podem ser divididos, principalmente, em 4 categorias incluindo peptídeos cíclicos, alcalóides de protoberberina, polifenóis e compostos carbonílicos α , β -insaturados (FANG et al., 2020; ZHEN et al., 2015). Alguns desses inibidores promovem inibições com elevada potência, em escala nanomolar. No entanto, apresentaram em ensaios clínicos falta de seletividade, baixa biodisponibilidade oral e propriedades farmacocinéticas inadequadas (FANG et al., 2020; FU et al., 2017; ZHEN et al 2015, SORNA et al.,2013).

Os inibidores de LSD1 que atualmente estão em avaliação clínica para terapia do câncer são 2-PCPA, iadamemstat (ORY-1001), GSK-2879552, bomedemstat (IMG-7289), INCB059872 (estrutura não revelada), CC-90011, vafidemstat (ORY-2001), seclidemstat (SP-2577) e SP-2509, particularmente para câncer de pulmão de pequenas células (SCLC), leucemia mieloide aguda (AML), tumores sólidos avançados e para Sarcoma de Ewing (Figura8) (DAI et al., 2020; SOLDI et al., 2020; FANG et al., 2020; FANG et al., 2019; THEISEN et al., 2016).

Figura 8. Inibidores de LSD1 em ensaios clínicos. A. inibidores irreversíveis. B. inibidores reversíveis. CI_{50} = Concentração inibitória máxima. ND=não descrito.



Descobertas relacionadas a compostos capazes de inibir de forma reversível a LSD1 (naturais ou não naturais) ainda são desafiadoras, visto a natureza não-funcional da região de ligação do substrato. Contudo, fica evidente a relevância da LSD1 como alvo epigenético, visto os resultados da atividade antitumoral, porém a utilização de inibidores desta enzima como terapêutica ainda é um obstáculo, mesmo com a evidência do elevado potencial que este alvo possui em ser utilizado. Assim, estratégias de planejamento racional podem ser propostas para síntese de novas entidades químicas, com objetivo de atingir melhores perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos (SOLDI et al., 2020; FANG et al., 2020; GANESAN et al. 2019; FU et al., 2017; WERMUTH, 2008).

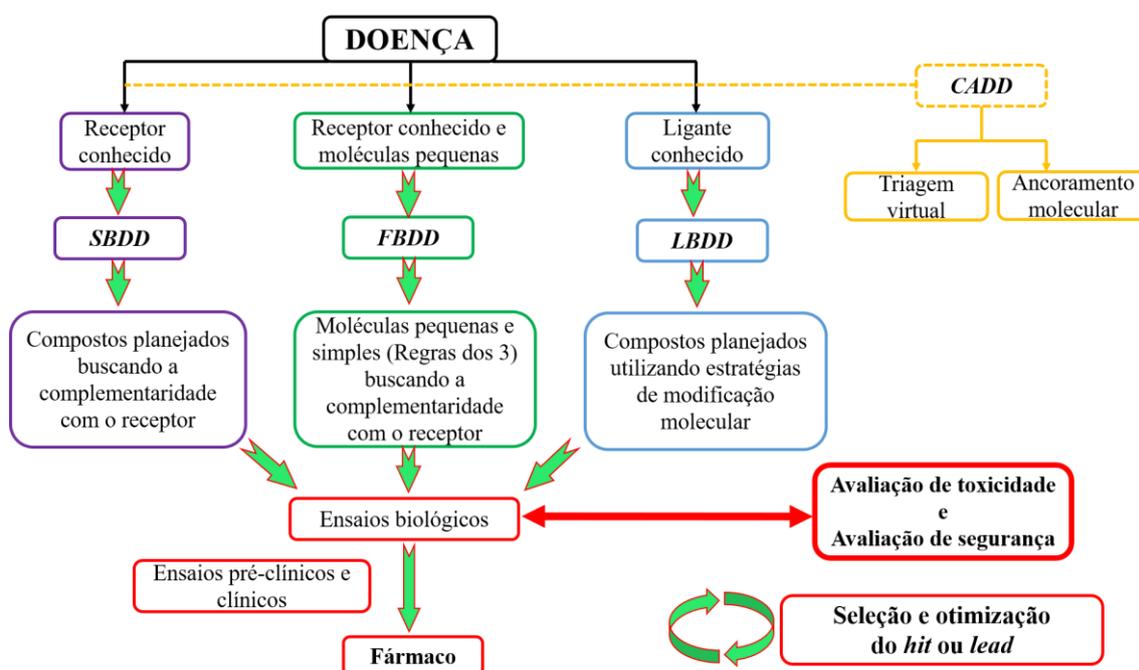
1.4 Planejamento de fármacos

As estratégias de planejamento racional e desenvolvimento de candidatos a fármacos fundamentam-se no conhecimento prévio do processo fisiológico envolvido no surgimento da doença e na seleção de um alvo macromolecular adequado (SMITH et al., 2018; BARREIRO; FRAGA, 2015; KHAN et al., 2011; DREWS, 2000).

Na busca de novos compostos biologicamente ativos, três estratégias principais podem ser traçadas: planejamento baseado no ligante (LBDD, *Ligand-Based Drug*

Design), planejamento baseado na estrutura da biomacromolécula alvo (SBDD, *Structure-Based Drug Design*) e baseado nos fragmentos moleculares que podem ser novos pontos de partida para o desenvolvimento (FBDD, *Fragment-Based Drug Design*) (LU et al., 2018; USHA et al., 2017; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2011; SAMS-DODD, 2007). Estas estratégias podem ser desenvolvidas com auxílio de abordagens e formalismos do planejamento racional auxiliado por computador (CADD, *Computer-Assisted Drug Design*) que visam aperfeiçoar o processo de descoberta e obtenção dos compostos ativos (figura 9) (LU et al., 2018; PATRICK, 2009b; MOITTESSIER, et al., 2008; TANG et al., 2006).

Figura 9. Abordagem simplificada do planejamento racional de fármacos.



Neste contexto, o planejamento auxiliado por computador, promove a redução de tempo e menores gastos no processo de planejamento desses compostos. Dentre os métodos do CADD estão o ancoramento molecular (*docking*) e a triagem virtual (*virtual screening*) que foram as técnicas abordadas neste trabalho. Ressalta-se, contudo, que em todos os casos, as propriedades biológicas devem ser determinadas experimentalmente, sendo necessário a utilização de ensaios padronizados e validados com alta qualidade (KANCHARLA et al., 2020; SCAPIN et al., 2018; GUIDO et al., 2010).

1.4.1 Triagem virtual (*virtual screening*)

Devido aos avanços tanto em algoritmos e hardwares como na disponibilidade de bibliotecas de compostos públicas e privadas, os métodos de triagem virtual foram melhorados de forma a permitir a busca e seleção *in silico* de um número limitado de candidatos com potencial atividade frente a um alvo biológico (DE SOUSA et al., 2020; FRADERA & BABAOGLU et al., 2017; LEMKE et al., 2008).

Basicamente, o protocolo experimental da triagem virtual pode ser descrito da seguinte forma: (1) Construção dos bancos de dados virtual de compostos; (2) Geração dos parâmetros de busca do banco de dados, seja do modelo farmacofórico (triagem virtual baseado no ligante) ou das regiões de interação do receptor (triagem virtual baseada na estrutura da proteína); (3) Realizar a busca por compostos líderes nos bancos de dados; (4) Seleção de *hits* (compostos que atendem aos parâmetros do modelo) baseada em critérios definidos; (5) Validação dos *hits* via ensaios *in vivo/in vivo*; (6) Otimização do composto líder virtual e experimentalmente para melhorar sua atividade biológica (FRADERA & BABAOGLU et al., 2017; LEMKE et al., 2008).

Portanto, essa abordagem foi utilizada na seleção do protótipo deste projeto, o que possibilitou nortear o planejamento estrutural dos análogos propostos.

1.4.2 Ancoramento Molecular (*docking*)

Ancoramento molecular (*docking*) é outra abordagem importante no processo de identificação de compostos ativos (*hits*). Esta técnica permite avaliar a complementariedade entre determinado alvo molecular e o ligante e, por meio de funções de ranqueamento, pontuar os de maior afinidade em relação à biomacromolécula alvo. Este método de modelagem molecular consiste na previsão do modo de ligação de uma pequena molécula (ligante, inibidor) na região do sítio de interação de um alvo molecular e na quantificação, de modo teórico, da afinidade de ligação/interação entre alvo (receptor, enzima entre outros) e ligante (PINZI, RASTELLI, 2019; MOITESSIER, et al. 2008; KITCHEN et al., 2004).

O ancoramento molecular considera, em geral, duas etapas de investigação: (i) a escolha de um algoritmo que explore de maneira eficaz uma complexa hipersuperfície de energia para prever a conformação e a orientação de uma molécula ligante em relação ao

sítio de interação da biomacromolécula alvo; (ii) previsão da afinidade de ligação de um complexo alvo-ligante, ou seja, o desenvolvimento de um modelo de avaliação da energia livre de interação de Gibbs (ΔG) (função *scoring*), que seja computacionalmente viável, para discriminar de forma confiável diferentes modos de ligação do mesmo ligante e/ou para determinar entre dois ligantes distintos aquele com maior afinidade de ligação em relação ao alvo molecular (PINZI, RASTELLI, 2019; KITCHEN et al., 2004).

Portanto, o desenvolvimento de estudo de ancoramento molecular neste projeto foi relevante para a avaliação de complementaridade entre os compostos inibidores propostos e o sítio catalítico de LSD1, permitindo entender e elucidar as interações moleculares que contribuiriam à ação dos compostos, além de fornecer subsídios para o planejamento de novos e potenciais agentes antitumorais.

1.4.3 Avaliação biológica

Na avaliação biológica vários ensaios moleculares, celulares e de animais são utilizados para definir a atividade e a seletividade do futuro candidato a fármaco. O tipo e o número de testes iniciais dependem do objetivo farmacológico buscado. No geral, as moléculas também podem ser estudadas para avaliar variedade de outras ações, a fim de estabelecer o seu mecanismo de ação e seletividade. Isso tem a vantagem de demonstrar efeitos tóxicos inesperados e, em certas ocasiões, revelar uma ação terapêutica não prevista anteriormente (KANCHARLA et al., 2020; SCAPIN et al., 2018; HUGLES et al., 2011; BARREIRO, 2002).

1.4.3.1 Ensaios bioquímicos enzimáticos de LSD1

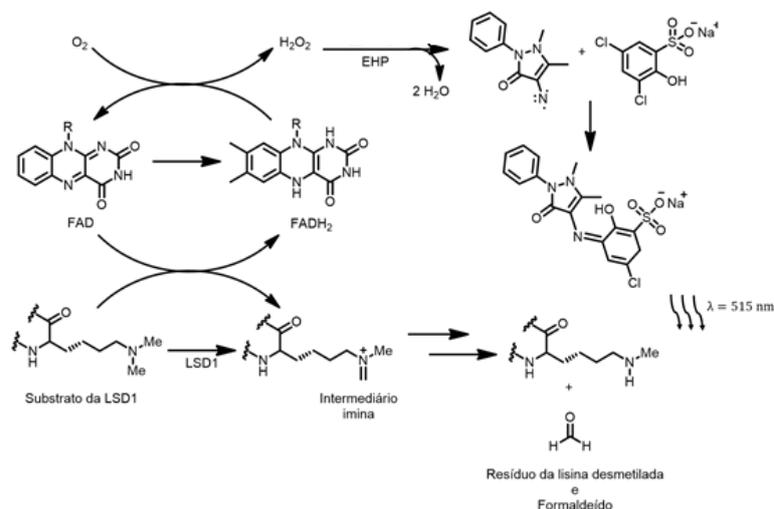
Em relação aos ensaios desenvolvidos para análise de compostos avaliados frente a LSD1, a análise da cinética reacional no processo de desmetilação é importante tanto para entender as características mecanísticas da reação como para o rastreamento e análise de inibidores de LSD1. Vários ensaios bioquímicos enzimáticos de LSD1 foram desenvolvidos *in vitro*, incluindo a detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de um ensaio acoplado a peroxidase; detecção de formaldeído através de ensaio de formaldeído desidrogenase; medidas radioativas para monitorar alterações em um substrato de peptídeo radiomarcado e análise de espectrometria de massa para medir mudanças no substrato não marcado (BLAIR et al., 2011; KOKURA, SUN & FANG, 2015). Além disso,

alguns ensaios celulares foram adaptados para quantificar os efeitos mediados por LSD1 na metilação de histona H3K4 usando detecção por anticorpos (SCHMITTS et al., 2014).

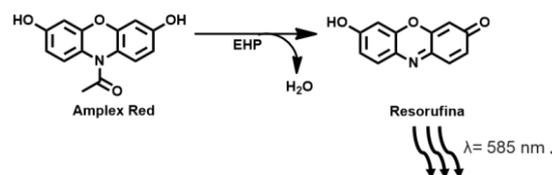
Mattevi e colaboradores (2005) descreveram o uso de ensaios acoplados a Enzima *Horseradish Peroxidase* (EHP) para medir com precisão a atividade de LSD1 com substratos de peptídeos na cauda da histona H3 metilados. Esta abordagem utiliza metodologias bem estabelecidas que foram aplicadas há décadas no estudo de monoamina oxidases. O H_2O_2 é um produto secundário obrigatório da desmetilação catalisada por LSD1 e um substrato para EHP. Na presença de 4-aminoantipirina (4-AP) juntamente com 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfonato (DHBS), a EHP reage com o H_2O_2 e permite a formação do cromóforo detectado por fluorimetria em comprimento de onda de 515 nm (figura 10A) (FORNERIS et al., 2005). Este é um ensaio relativamente sensível e confiável que pode ser feito de forma contínua. Uma versão mais sensível deste ensaio substitui 4-AP/DHBS por *Amplex red* para gerar resorufina (composto fluorescente) que possui emissão da fluorescência detectada a 585 nm (figura 10B) (SCHMITT et al., 2014).

Figura 10. Ensaio de detecção por H_2O_2 para LSD1. A. Quando um substrato de LSD1 é desmetilado, o cofator FAD é reduzido a $FADH_2$. O cofator é re-oxidado pelo oxigênio molecular para formar H_2O_2 . A EHP usa H_2O_2 para reagir 4-AP com DHBS e formar o cromóforo, detectado em 515 nm. B. Oxidação do *Amplex red* em resorufina, altamente fluorescente usando EHP e H_2O_2 . (FORNERIS et.al, 2005; SCHIMITT et al., 2014).

A



B



Adaptado de Hayward and Cole, 2016.

Outro principal produto secundário do mecanismo catalítico de LSD1 é o formaldeído. A liberação de formaldeído pode ser monitorada por meio da sua oxidação pela formaldeído desidrogenase, onde a formação do cofator FAD é medida por espectrofotometria a 340 nm (KOKURA, SUN & FANG, 2015). Tanto os ensaios de EHP, como o de formaldeído desidrogenase são de custo relativamente alto e podem ser feitos de forma contínua para medir a atividade inibitória de LSD1 em tempo real. Na comparação entre os métodos, a análise de formaldeído desidrogenase é mais complexa que a análise por EHP, pois a mudança do Ultra-Violeta (UV) para redução de FAD é menos sensível do que a detecção indireta de H₂O₂ e, portanto, o teste de EHP é tipicamente preferido (HAYWARD; COLE, 2016).

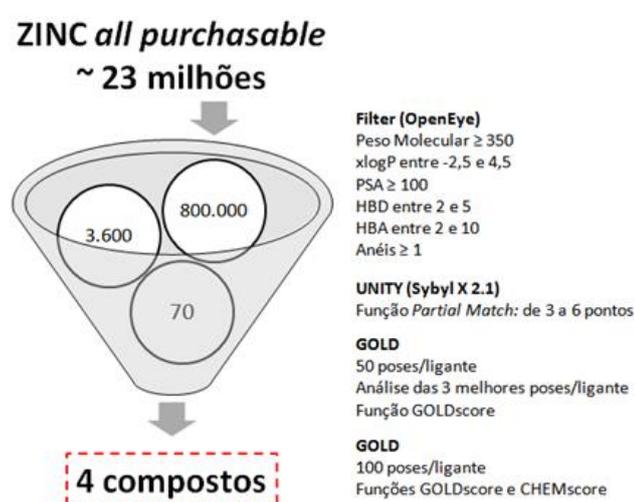
Sendo assim, utilizamos para avaliação das atividades dos compostos sintetizados frente a enzima LSD1, kits disponíveis comercialmente que baseiam-se na metodologia de EHP, pois fornecem informações cinéticas em tempo real, e são particularmente sensíveis para analisar possíveis inativações dependentes do tempo, um fenômeno comum de inibidores de LSD1 (HAYWARD; COLE, 2016).

1.5 Plano de trabalho

A primeira etapa do planejamento racional dos inibidores de LSD1 foi realizada pelo então Pós-doc. do nosso grupo de pesquisa Vinícius Gonçalves Maltarollo, no qual utilizou-se a triagem virtual baseada na estrutura (SBDD) de diversos peptídeos inibidores da enzima em questão (TORTORICI et al., 2013). Inicialmente, o estudo publicado por Tortorici e colaboradores foi avaliado quanto suas regiões de interações comuns da enzima e seus inibidores para a construção de um modelo farmacofórico (estruturas cristalográficas disponíveis no PDB: 3ZMS, 3ZMT, 3ZMU, 3ZMV, 3ZMZ, 3ZNO, 3ZNL), apresentado na FIGURA 12-C. Então, biblioteca virtual de compostos *ZINC all purchasable* foi empregada para a triagem virtual, a qual foi submetida aos seguintes filtros: (i) físico-químico que selecionou compostos com massa molecular acima de 350 da., logP entre -2,5 e 4,5, área de superfície polar maior que 100Å², número de doadores de ligação de H entre 2 e 5, número de aceitadores de ligação de H entre 2 e 10 e mais do que 1 anel; (ii) compostos que se encaixavam tridimensionalmente em 3 a 6 pontos do modelo farmacofórico construído; (iii) estudos de ancoramento molecular usando o programa

GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*), gerando 50 poses por algoritmo genético e empregando a função de score GoldScore; (iv) estudos mais refinados de ancoramento molecular usando o programa GOLD, gerando 100 poses por algoritmo genético e empregando as funções de escore GoldScore e ChemScore. Desta forma, de 23 milhões de entidades químicas iniciais, 4 compostos foram selecionados para ensaios de inibição enzimática (Figura 11). Dentre eles, o composto ZINC09611484 (Figura 12-A) apresentou melhor atividade inibitória *in vitro* com concentração inibitória (CI₅₀) de 5 µM e maior score (menor energia) nos estudos de ancoramento molecular.

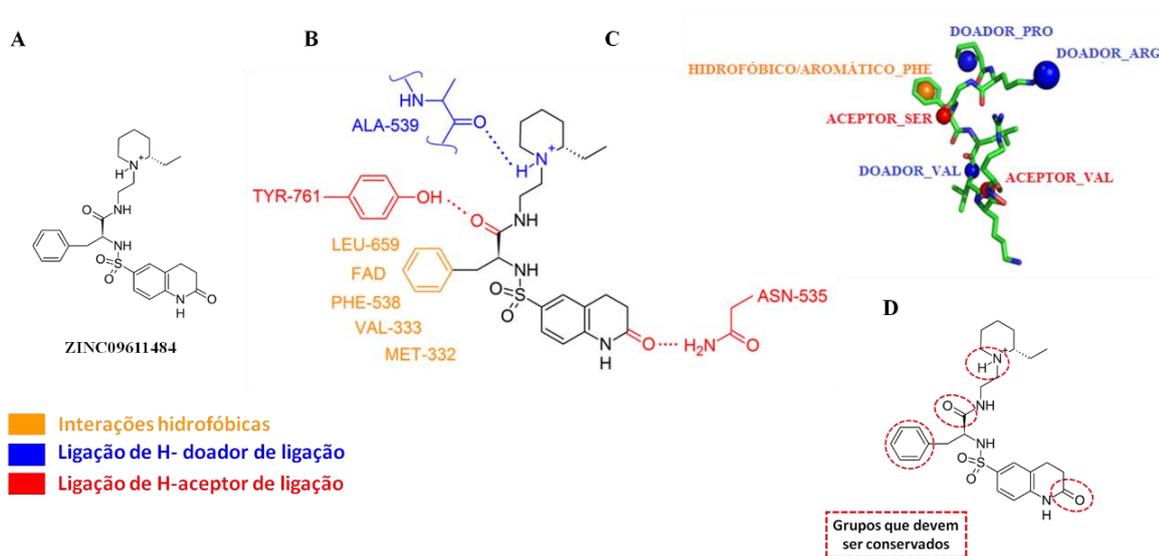
Figura 11. Ilustração da metodologia seguida na triagem virtual baseada na estrutura da LSD1.



Adaptado do Relatório de MALTAROLLO, 2015.

No estudo de ancoramento molecular (*docking*) realizado com o composto ZINC09611484 foi possível observar as seguintes interações: hidrofóbicas (LEU-659, FAD, PHE-538, VAL-333 e MET-332), ligação de hidrogênio com o resíduo ALA 539 - doador de ligação de H; e ligação de hidrogênio com os resíduos TYR-761 e ASN-535 - aceptores de ligação (PDB ID 3ZMT) (Figura 12-B). Assim, conhecendo-se a complementariedade e as interações do composto ZINC09611484 com a enzima LSD1, foram propostas séries de compostos nos quais estão presentes grupos químicos passíveis de interações nos mesmos pontos, apresentando as mesmas ligações que o protótipo (Figura 12-D), buscando uma melhor afinidade pelo receptor e, conseqüentemente, melhoria da atividade biológica.

Figura 12. A- Composto ZINC09611484. B- Principais interações do composto ZINC09611484 com os resíduos de aminoácidos da LSD1(PDB ID 3ZMT; TORTORICI, et al., 2013). C- Modelo de interações do receptor com peptídeos sintetizados por Tortorici e colaboradores para definição dos parâmetros utilizados como filtro. D- Grupos químicos passíveis de interações com a LSD1.

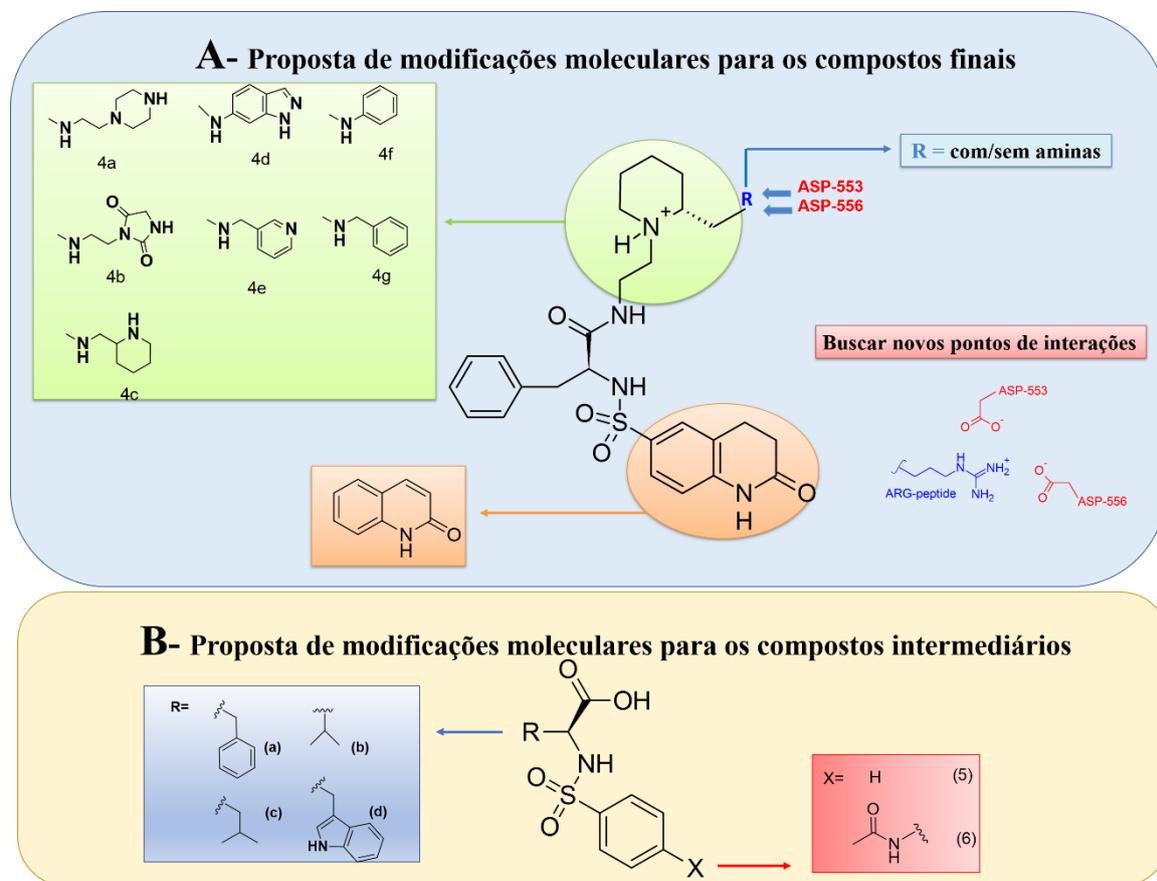


Adaptado do Relatório de MALTAROLLO, 2015.

A proposta para obtenção dos novos análogos baseou-se em variações de anéis heterocíclicos (piperazina, hidantoína e piperidina); heteroaromáticos (indazol e piridina) e anéis aromáticos (fenil e benzil) na região do grupamento básico do composto ZINC09611484, permitindo avaliar as possíveis ligações de H com o resíduo de ALA 539, bem como ausência dessas interações; novos pontos de interações com os ácidos aspárticos 555 e 556; e pela variação de cadeia carbônica entre as amidas e os grupamentos heterocíclicos, heteroaromáticos e aromáticos (Figura 13A).

Paralelamente à proposta principal do projeto foram sintetizados outros esqueletos estruturais derivados sulfonamídicos com variações de aminoácidos apolares (L-valina, L-leucina e L-triptofano) e variações do grupamento sulfonila (benzeno e 4-acetaminobenzeno), com intuito de comparar a potência do esqueleto principal (*scaffold*) do projeto (Figura13B).

Figura 13. Proposta de modificações moleculares para série de compostos do projeto. A. compostos finais. B. Compostos intermediários derivados sulfonamídicos.



Após a síntese e caracterização dos compostos propostos foram realizados ensaios *in vitro* de inibição enzimática, com kits obtidos comercialmente que se baseiam na metodologia de EHP. Os compostos também foram encaminhados para avaliações em *in vitro* em linhagens leucêmicas.

2. OBJETIVOS

Diante da possibilidade do uso da enzima LSD1 como alvo promissor para a busca e desenvolvimento de moléculas candidatas ao tratamento do câncer, devido a sua relevância comprovada como alvo epigenético frente aos resultados da atividade antitumoral e evidenciado o elevado potencial que esta possui em ser utilizada como alvo no desenvolvimento de estruturas otimizadas, propôs-se, neste trabalho, a busca por inibidores de LSD1 mostrando-se promissora estratégia no planejamento de novas moléculas com atividade anticâncer, assim como potenciais moléculas com atividade celular em células tumorais (GANESAN et al., 2019; ZHENG et al 2015; SORNA et al., 2013, CHEN et al., 2012).

Portanto, este projeto tem como objetivo central, sintetizar e avaliar possíveis inibidores da enzima LSD1 e sua atividade em ensaios celulares, considerando os seguintes objetivos específicos:

- I. Realizar a síntese de candidatos a inibidores de LSD1, considerando informações obtidas por meio de triagem virtual baseada na estrutura da LSD1 previamente construídos e validados;
- II. Caracterizar as estruturas obtidas na síntese por técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- III. Realizar o ensaio *in vitro* de inibição enzimática frente a LSD1 dos compostos sintetizados;
- IV. Realizar ensaio *in vitro* de viabilidade celular em linhagem leucêmica de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) com os compostos sintetizados;
- V. Realizar estudos de ancoramento molecular (*docking*) para o entendimento dos principais resíduos e orientações dos compostos, que norteiam a inibição enzimática frente a enzima LSD1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes, solventes e matérias-primas

Quadro 1. Discriminação dos reagentes, solventes e matérias-primas utilizados no desenvolvimento de toda a parte experimental do trabalho.

ácido clorídrico (Synth)	cloreto de metanossulfonila (Sigma-Aldrich)	Hidroxibenzotriazol (Merck)
ácido acético glacial (Synth)	carbonato de sódio (Synth)	L-leucina (Sigma-Aldrich)
ácido clorossulfônico (Synth)	cloridrato de 1-Etil-3-(3- dimetilaminopropil) carbodiimida (Sigma-Aldrich)	metanol (Synth)
ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich)	clorofórmio (merck)	metanol grau hplc (Merck)
acetato de etila (Synth)	clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories Inc.)	molibdato Cérico de Amônio (Sigma-Aldrich)
acetonitrila (Synth)	cloreto de Lítio (Merk)	ninidrina (Merck)
acetonitrila grau hplc (Merck)	dimetilsulfóxido deuterado (Cambridge Isotope Laboratories Inc.)	peróxido de hidrogênio (Synth)
anilina (Sigma-Aldrich)	dimetilformamida (Synth)	Piridin-3-il-metanamina (Sigma-Aldrich)
2-(aminometil)piperidina (Sigma-Aldrich)	N,N-diisopropiletilamina (Sigma-Aldrich)	Quinolina (Sigma-Aldrich)
3-2-(aminoetil)hidantoina (Sigma-Aldrich)	diclorometano (Synth)	Sulfato de sódio anidro (Synth)
5-amina-1H-indazol (Sigma-Aldrich)	éter etílico (Synth)	L-triptofano (Sigma-Aldrich)
benzilamina (Sigma-Aldrich)	Etanol (Synth)	trietilamina (Synth)
cloreto de N-acetilsulfonilil (Sigma-Aldrich)	L-fenilalanina (Sigma-Aldrich)	L-valina (Sigma-Aldrich)
cloreto de benzosulfonila (Sigma-Aldrich)	hexano (Synth)	vanilina (Quimex)

3.1.2 Equipamentos

Quadro 2. Discriminação dos equipamentos e programas utilizados nas etapas sintéticas, caracterização das moléculas, ensaio enzimático, ensaio de viabilidade e ancoramento molecular.

Agitadores magnéticos – Fisatom e IKA
Aparelho de ponto de fusão capilar Büchi, modelo M565
Balança semi-analítica
Barra magnética
Bomba de alto vácuo Edwards, modelo E2M5
Bomba de vácuo, compressor de ar – Vacuubrand – ME 1C
Câmara de ultra-violeta (UV)
Coluna para CLAE Phenomenex, C-18 gemini; 5 μ ; 110 Å; 150 x 4,60mm; 5 micron
Cromatoplas de sílica-gel 60 F254nm- Macherey-Nagel, Alugram® (20cm x 20cm x 0,20 mm).
Cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE) - Shimatzu
Fusão Capilar Buchi-565
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300MHz BRUKER, modelo Advance DPX-300
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 400MHz Varian®, modelo Unity Mercury Plus
Espectrômetro de massas Bruker Daltonics
Espectrofotômetro de Fluorescência- <i>Synergy</i> H1- Bio Tek
Evaporador rotatório modelo R-215- Büchi
Lâmpada de radiação ultravioleta Spectroline, modelo ENF – 260C
Mantas de aquecimento - Fisatom
Soprador Térmico – Instruterm- AS-300-220
Tubo capilar sem heparina (Precision Glass Inc.)
Ultra-filtrador Gehaka
Polarímetro Anton Paar MCP 200 Sucramat
Programa GraphPad Prism v.7.0
Programa MarvinSketch
Programa Chimera versão 1.12
Programa Spartan'14
Plataforma SYBYL versão 2.1
Programa GOLD, versão CCDC Software Ltd
Programa PyMOL versão 2.4
Computador dell inspiron serie 5000 i7, 1TB, 8GB

3.2 Métodos

3.2.1 Técnicas gerais de trabalho

Para solventes e reagentes que necessitaram de maior grau de pureza ou retirada de água para reações anidras realizou-se procedimentos descritos por Armarego e Chai (2009). Solventes com alto grau de pureza (conhecido como grau HPLC- em inglês, *High Performace Liquid Chromatografy*) foram utilizados para as análises de cromatografia de alta eficiência (CLAE) e a água ultra-pura foi obtida por ultrapurificador Gehaka. Todos os eluentes foram desgaseificados em sonicador antes do uso.

Reações sensíveis a oxigênio e umidade foram realizadas em vidaria anidra (submetida a pressão reduzida e aquecimento, seguida de fluxo de nitrogênio -adaptação de sistema *Schlenk* para reações em sistema inerte). Todos os processos sintéticos foram monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD) para determinação do término reacional.

3.2.2 Métodos analíticos

3.2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para monitoramento das reações, a qual foi realizada em cromatoplasmas de sílica-gel 60 F_{254nm}. A visualização das manchas características dos reagentes e produtos formados foram monitorados por lâmpada ultra-violeta (UV) (254nm e 365nm), metodologia descrita como não destrutiva, ou por imersão em solução reveladora (ninidrina, vanilina e molibdato cérico) e aquecidas com soprador térmico até coloração e identificação das manchas (JORK et al., 1994).

- Solução de vanilina: Vanilina (1g), EtOH (45mL), H₂O (45mL) e H₂SO₄ (10 mL).
- Solução de ninidrina: Ninidrina (0,3g), H₃CCOOH (3mL) e EtOH (97mL).
- Solução de molibdato cérico: Ce(SO₄)₂ (1,8g), (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O (45g) e H₂SO₄ (30 mL).

3.2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A pureza dos compostos obtidos foi determinada por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ou do inglês, *High performance liquid chromatography – HPLC*). As análises foram realizadas por dois diferentes aparelhos e métodos.

Método A:

Foi realizado em cromatógrafo líquido LC-10AD (Shimadzu), integrado com degaseificador DGU-14A-VP (Shimadzu), controlador SCL-10^a-VP (Shimadzu), sistema de dispensação de solventes múltiplo, amostrador automático SIL-10AD-VP (Shimadzu), forno de coluna CTO-10AS-VP e detector RF10A-VP (Shimadzu). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Waters (WAT027324, C₁₈ μBondpackTM, 300 x 3,90 mm).

Temperatura da coluna: 28 °C

Solvente:

Componente A: H₂O bidestilada + 0,05% (V/V) ácido trifluoracético (TFA)

Componente B: ACN + 0,05% (V/V) TFA

Fluxo: 1,0 mL/ minuto

Volume de injeção: 25 μL

Diluição da amostra: 1mg/ mL

Método B:

Foi realizado em cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu), integrado com degaseificador DGU-20A₅ (Shimadzu), controlador CBM-20A (Shimadzu), sistema de dispensação de solventes múltiplo, amostrador automático SIL-10AD (Shimadzu) e detector UV/VIS SPD-20A (Shimadzu). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Waters (WAT027324, C₁₈ μBondpackTM, 300 x 3,90 mm).

Temperatura média da coluna: 25 °C

Solvente:

Componente A: H₂O bidestilada + 0,05% (V/V) ácido trifluoracético (TFA)

Componente B: ACN + 0,05% (V/V) TFA

Fluxo: 1,0 mL/ minuto

Volume de injeção: 25 μ L

Diluição da amostra: 1mg/ mL

Tabela 1- Gradiente de eluição dos solventes utilizados no Método A e B da análise de CLAE.

Tempo (minutos)	Componente A (%)	Componente B (%)
0,0	90	10
4,0	90	10
29,0	0	100
31,0	0	100
31,5	90	10
40,0	90	10

Detecção: 210 nm, tempo de aquisição: 30 minutos

Integração: Subtração manual do branco para a mesma série

Método de cálculo: área em %

3.2.2.3 Ponto de Fusão

Para obtenção do ponto de fusão dos compostos utilizou-se aparelho de fusão capilar Büchi-M565. A análise foi realizada conforme a Farmacopeia Brasileira 5^a Ed (p.82-83) (ANVISA, 2010), no qual todos os compostos foram avaliados em triplicata estando todos previamente secos e mantidos em dessecador com sílica gel por no mínimo 24h.

Inicialmente realizou-se uma varredura entre a faixa de 50-300 °C, com elevação da temperatura de 20 °C/minuto para assim determinar o intervalo aproximado de fusão de cada composto. Prosseguiu-se com a mensuração da triplicata, e para isso iniciou-se a varredura com variação de 5 °C do ponto de fusão pressuposto (abaixo e acima), elevando-se a temperatura de 1 °C/minuto, até verificar a completa fusão. Assim, evidenciado o total desaparecimento da forma sólida, foi determinado o ponto de fusão da substância realizando-se a média da triplicata.

O aparelho de ponto de fusão foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

3.2.2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização dos compostos obtidos foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), sendo registrados em 300 MHz e 75 MHz respectivamente, utilizando aparelho Bruker ADVANCE DPX-300. A análise foi realizada nas dependências da FCF-USP, no Laboratório Multiusuário de RMN do Departamento de Farmácia da instituição, com auxílio da responsável técnica Maria Inês de Almeida Gonçalves e a especialista de laboratório Dra. Mônica Zannini. Para alguns compostos, a espectroscopia de RMN foi realizada em um aparelho *Unity Mercury Plus 400 NMR spectrometer* (Varian®), utilizando 400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C ou ou Agilent 600-MR, utilizando 600 MHz para RMN ^1H e 151 MHz para RMN ^{13}C , durante o estágio no exterior, pela técnica Claudia Thier, do *Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie – WWU Münster*.

Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em partes por milhão (ppm) e foram calibrados de acordo com o solvente deuterado utilizado (quadro 3), exceto quando citado foi utilizado o padrão interno TMS (0 ppm).

As abreviações usadas para a multiplicidade do pico são: singlete (*s*), singlete largo (*sl*), duplete (*d*), duplo duplete (*dd*), tripleto (*t*), triplo duplete (*td*), quarteto (*q*) e multiplete (*m*) e a constante de acoplamento (*J*) é dada em Hertz (Hz). Para consulta dos sinais de possíveis interferência de solventes nas análises de RMN utilizou o trabalho de FULMER e colaboradores, 2010.

Todos os espectros foram analisados com o programa MestReNova versão $\geq 7.1.1$ (*MestReLab Research Software*, Universidade de Santiago de Compostela, Departamento de Química Orgânica, Espanha).

Quadro 3. Deslocamento dos solventes deuterados utilizados.

Solventes deuterados	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)	H ₂ O (residual) (ppm)
DMSO-d ₆	2,51	39,5	3,30
CDCl ₃	7,26	77,16	1,56
D ₂ O	4,79	–	–

3.2.2.5 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Para realização da espectroscopia de infravermelho (IV) dos compostos, utilizou-se o espectrofotômetro de IV por transformada de Fourier, modelo IRAffinity-1, da marca SHIMADZU. As análises foram realizadas nas dependências da FCF-USP, na Central Analítica do Departamento de Farmácia da instituição, com auxílio do responsável técnico Charles de Lima Brito.

A região do espectro eletromagnético de maior interesse para esta técnica encontra-se entre 4000 a 500 cm^{-1} . Empregou-se a técnica de contato de refletância total atenuada (ATR), que pode ser utilizada tanto para sólidos quanto para líquidos – no caso do presente trabalho, apenas sólidos foram submetidos à análise. A quantidade de amostra necessária para fazer a análise é de no mínimo 2 mg (PAIVA, 2006).

Antes de se iniciar as varreduras de espectro dos produtos intermediários sintetizados, foi realizada a varredura do *background*, empregando apenas o ar ambiente. Isto serve como branco visando eliminar interferências advindas do ambiente em que se realiza a análise, como presença de umidade (H_2O) e gás carbônico (CO_2) (HAACK, 2010).

Contudo, é sabido que a técnica de ATR apresenta a dificuldade acerca da pressão exercida sobre a amostra a ser analisada, de forma que a área de contato entre a mesma e o cristal varia. Assim sendo, o equipamento empregado realiza 19 leituras, forçando os resultados médios (PAIVA, 2006)

3.2.2.6 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

As determinações das massas em alta resolução foram feitas por infusão direta em um espectrômetro de massas equipado com um analisador microTOFII-ESI-Q-TOF (*Bruker Daltonics*), empregando uma bomba de infusão (*Kd Scientific*) com fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. A voltagem do capilar e do cone foram de 3500 V e 500 V, respectivamente, em modo positivo ou negativo de ionização, com temperatura do gás de secagem (N_2) de 180 $^\circ\text{C}$, vazão de 4 L/min , 0,4 bar de pressão. Para a fragmentação foi usada uma rampa de energia variando de 5 a 50 eV. Para calibração interna, foi usada uma solução de ácido trifluoroacético sódico, na concentração de 10 mg/mL . Os dados foram adquiridos e analisados usando o software Data Analysis 4.1 (Bruker). As análises foram realizadas nas dependências da FCFRP-USP (Ribeirão-Preto), pelo pós-doutorando Rodrigo Moreira da

Silva, na Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas orgânicas, coordenado pelo Prof. Dr. Noberto Peporine Lopes.

3.2.2.7 Polarímetro

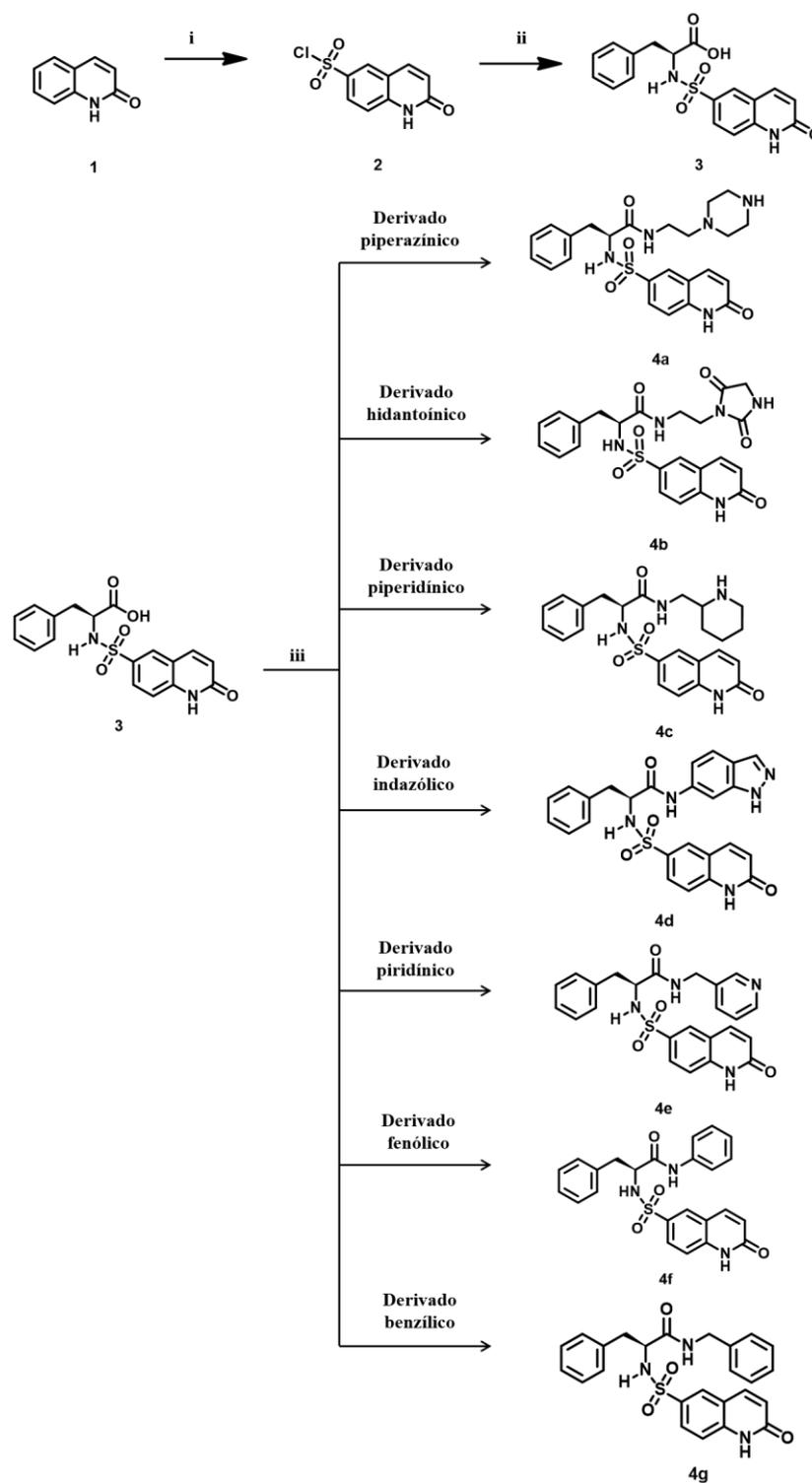
As rotações ópticas ($[\alpha]_D^{20}$) foram medidas em polarímetro digital da marca Anton Paar MCP 200 sucromat a 589 nm (Linha D de uma lâmpada de sódio), temperatura de 20 °C usando célula para amostra com V=11 mL ($c=0,1$). As análises foram realizadas nas dependências da FCF-USP, no Laboratório de Compostos Heterocíclicos do Prof. Dr. Helio Alexandre Stefani.

3.2.3 Métodos sintéticos

A síntese dos compostos propostos foi realizada nas dependências da FCF-USP, no Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais (LITEC) e no laboratório de síntese do *Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie – WWU Münster*.

3.2.3.1 Descrição sintética geral

Conforme o esquema 1, a proposta sintética geral deste projeto partiu da sulfonação da 2-(1H)-quinolinona (1) (etapa i) para formar o cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2), seguindo de reação de substituição nucleofílica entre o cloreto de sulfonila e a amina do aminoácido L-fenilalanina, para obtenção do (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanóico (3) (etapa ii). Após esta etapa, reagiu-se o ácido carboxílico do intermediário sulfonamídico (3) com as aminas heterocíclicas (piperazina, hidantoína e piperidina), heteroaromáticas (indazol e piridina) e aminas aromáticas (fenil e benzil), dando origem aos compostos finais derivados dos anéis: piperazínico (4a), hidantoinico (4b), piperidínico (4c), indazólico (4d), piridínico (4e), fenólico (4f) e benzílico (4g). As reações de substituição nucleofílica, foram realizadas via agente condensante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (UGWU et al., 2017; SILVA et al. 2017; ORTIZ- MEOZ et al., 2015).

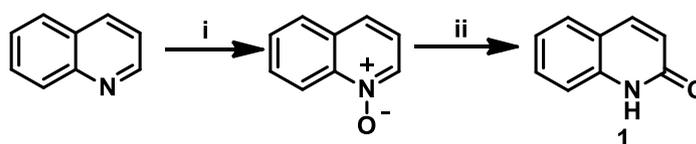
Esquema 1. Esquema geral das sínteses dos compostos finais.

Condições reacionais: **(i)** 2-(1H)-quinolinona (1) (1,30 g, 8,96 mmol), ácido clorossulfônico, (3,90 mL, 58,7mmol), 90 °C, 3 h. **(ii)** Cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2) (0,213g, 0,87 mmol), L-fenilalanina (0,144g, 0,87mmol), Na₂CO₃ (0,016g, 0,15mmol), H₂O (10 mL), -5°C por 1h, T °C amb., *overnight*. **(iii)** (S)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (3) (0,144g, 0,386 mmol, 1eq.), EDC.HCl (0,092g, 0,479 mmol), HOBt (0,065g, 0,481 mmol), DIPEA (0,06g, 0,464mmol, 80,9 μL), DMF (10 mL), aminas derivadas (1,2 eq.), 24 h, atm de N₂, T °C amb. **(i)** ORTIZ- MEOZ et al., 2015 **(ii)** UGWU et al., 2017. **(iii)** SILVA et al. 2017.

3.2.3.1.1 Síntese do 2-(1H)-quinolinona (1)

A síntese do 2-(1H)-quinolinona foi realizada utilizando como base a metodologia descrita por Xie e colaboradores (2017) conforme esquema abaixo (esquema 2):

Esquema 2. Esquema de síntese do composto **1**

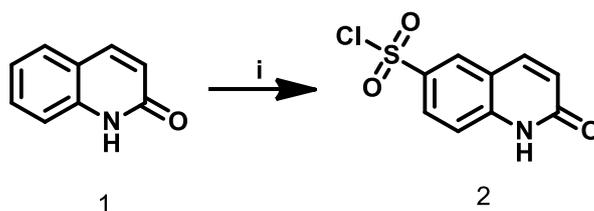


Condições reacionais: **i.** Quinolona (3g, 23 mmol, 1eq.), ácido acético (12 mL), H₂O₂ (35% em água, 3,5 g, 34,5 mmol, 1,5 eq.), 70 °C, 24h. **ii.** H₂O (235 mL), MsCl (4,76g, 41,86 mmol, 1,82 eq.), T °C amb., 30 minutos.

Para a síntese do 2-(1H)-quinolinone (1) foi utilizado balão unitubular de fundo redondo (250 mL), no qual adicionou-se 2,42 mL de peróxido de hidrogênio em mistura de 3g de quinolina e 12 mL de ácido acético. A reação foi mantida sob agitação por 24h a 70 °C. Em seguida o ácido acético foi removido em rota-evaporado sob vácuo à 60 °C. O N-óxido-quinolina formado foi resfriado até temperatura ambiente e adicionados 235 mL de água. Em seguida foi adicionado lentamente, cloreto de metanossulfonila (MsCl) e agitado por 30 minutos até completa formação de um precipitado branco. O produto foi filtrado a pressão reduzida e lavado com 5 mL de acetato de etila. O consumo dos reagentes e possível formação dos produtos foram observados por CCD, utilizando como fase móvel acetato de etila : hexano (2:1), revelado em ninidrina e/ou lâmpada U.V. O precipitado obtido permaneceu em dessecador com cloreto de cálcio anidro por 24h horas, sendo posteriormente submetido a análises de RMN de ¹H e ¹³C.

3.2.3.1.2 Síntese do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)

A síntese do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2) foi realizada utilizando a metodologia descrita por Ortiz-Meoz e colaboradores (2015) conforme o esquema 3.

Esquema 3. Esquema de síntese do composto **2**

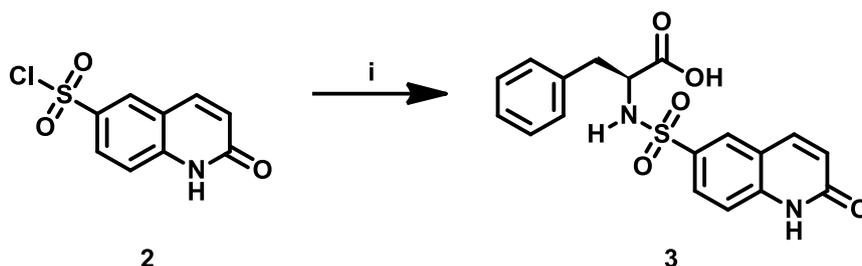
Condições reacionais: **i.** 2-(1H)-quinolinona (1,30 g, 8,96 mmol, 1 eq.), ácido clorossulfônico, (3,90 mL, 58,7mmol, 6,5 eq.), 90 °C, 3 h.

Realizou-se a síntese do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila em balão unitubular de fundo redondo (50 mL), utilizando 1,3g de 2-(1H)-quinolinona em 3,9 mL de ácido clorossulfônico. A reação foi agitada à 90 °C por 3h. A mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida foram adicionados cuidadosamente 50 mL de gelo picado levando a formação do precipitado. O produto foi filtrado a pressão reduzida e lavado com pequenas porções de água gelada. A formação do produto foi observada por CCD, em fase móvel acetato de etila : hexano (2:1) revelado em lâmpada U.V. Obteve-se um sólido levemente marrom que permaneceu em dessecador com cloreto de cálcio anidro por 24h horas, sendo posteriormente submetido a análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

3.2.3.1.3 Síntese do (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanóico (3)

A síntese do (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanóico (3), intermediário comum aos compostos planejados, foi realizada utilizando como base a metodologia descrita por Ugwu e colaboradores (2017) conforme esquema 4 abaixo.

Esquema 4. Esquema de síntese do composto **3**



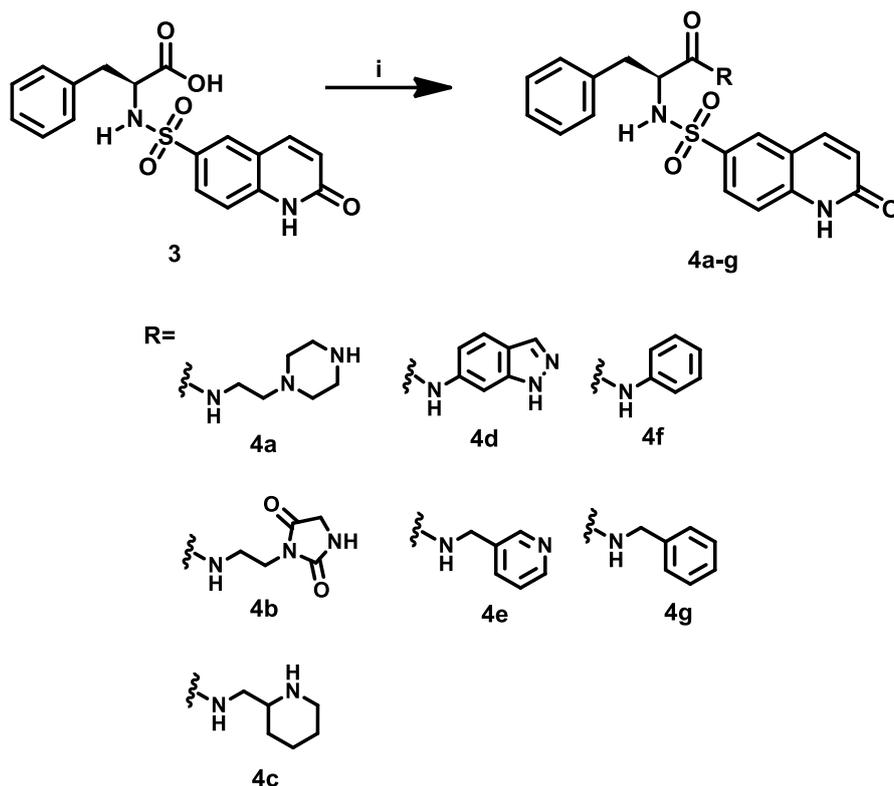
Condições reacionais: **i.** Cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (**2**) (0,213g, 0,87 mmol), L-fenilalanina (0,144g, 0,87mmol), Na₂CO₃ (0,016g, 0,15mmol), H₂O (10 mL), -5°C por 1h, T °C amb., *overnight*.

Para a síntese do intermediário **3** foi utilizado balão unitubular de fundo redondo (50 mL), no qual adicionou-se solução aquosa de Na₂CO₃ (0,016g/10 mL, 0,015M) e em seguida, sob agitação a temperatura ambiente, adicionou-se 0,144g de L-fenilalanina aguardando sua completa solubilização. A mistura reacional foi resfriada a -5°C e 0,213g de cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (**2**) foi adicionado cuidadosamente dividido em 4 porções durante 1 hora. A reação seguiu-se em T °C ambiente e agitação *overnight*. O consumo dos reagentes e possíveis formações dos produtos foram observados por CCD, utilizando como fase móvel acetato de etila : hexano (2:1), revelado em ninidrina e/ou lâmpada U.V. Após o término da reação, o balão foi colocado em banho de gelo, e com agitação contínua foi acidificado com ácido clorídrico até pH 1. Após a acidificação, observou-se a formação de precipitado que foi filtrado sob pressão reduzida em bomba de vácuo. Em seguida, o sólido foi lavado com água destilada gelada. O precipitado branco obtido permaneceu em dessecador com cloreto de cálcio anidro por 24h horas, sendo submetido a todas as análises de caracterização e pureza já citadas anteriormente.

3.2.3.1.4 Síntese dos compostos finais: compostos **4a-g**

Os compostos propostos, derivados carboxâmídicos (**4a-g**), foram sintetizados utilizando metodologias descritas por Silva e colaboradores (2017) conforme o esquema 5 abaixo.

Esquema 5: Esquema de síntese dos compostos **4a-g**.



Condições reacionais: **i.** (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (**3**) (0,144g, 0,386 mmol, 1eq.), EDC.HCl (0,092g, 0,479 mmol), HOBt (0,065g, 0,481 mmol), DIPEA (0,06g, 0,464mmol, 80,9 μ L), DMF (10 mL), aminas derivadas (1,2 eq.), 24h, atmosfera de N_2 , T °C amb.

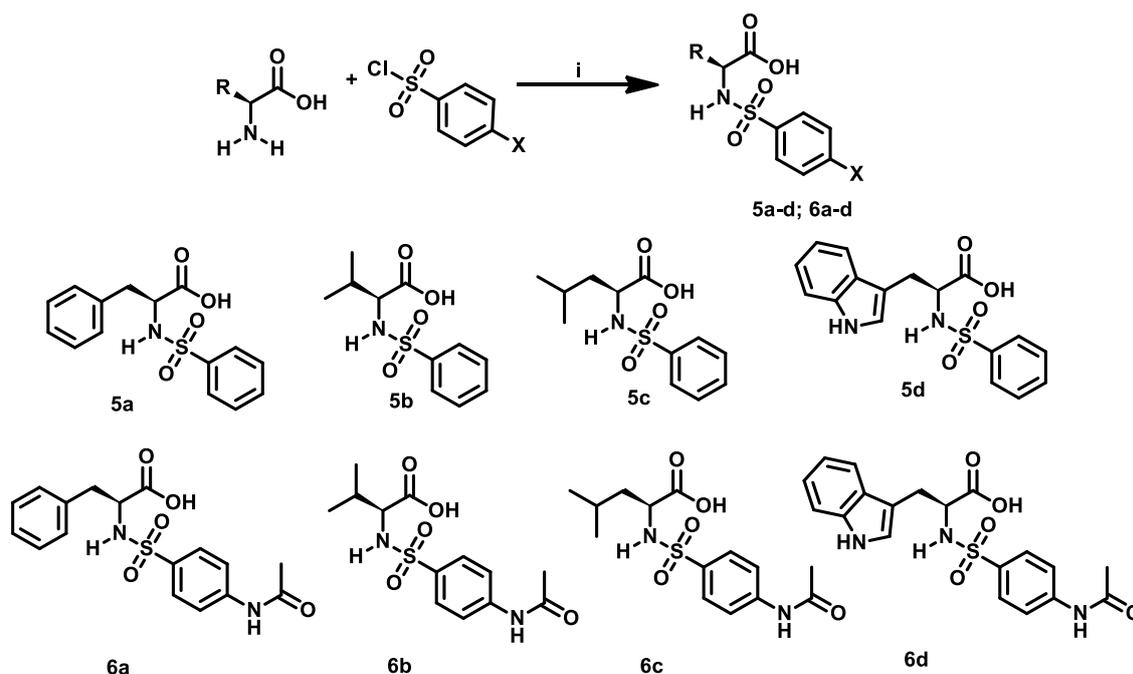
Para a síntese dos compostos **4a-g** foi utilizado o sistema schlenk, totalmente anidro em atmosfera de nitrogênio. Em 10 mL de DMF anidro, foi adicionado 0,144g do (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (**3**) sob agitação. A mistura reacional foi resfriada a 0 °C e em seguida adicionados 0,092g de EDC.HCl, 0,065g de HOBt e 80,9 μ L de DIPEA permanecendo em agitação por 50 minutos. Logo após esse tempo, mantendo-se a temperatura a 0 °C adicionou-se 1,2 equivalente da amina correspondente. A mistura reacional foi agitada 24h em T °C ambiente. A formação dos produtos foi observada por CCD, utilizando como fase móvel diclorometano : metanol (9:1), revelado em molibdato cérico e/ou lâmpada U.V. Ao fim da reação a mesma foi diluída com 5 mL de água e 5 mL de solução aquosa saturada de LiCl 5% e extraída com 30 mL de acetato de etila em 2 lavagens. Em seguida a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). A fase orgânica foi rota-evaporada sob pressão reduzida à 50 °C, obtendo-se o produto bruto, do qual foram removidos os resíduos de solvente em bomba de alto vácuo por 24h. Ao mesmo

foi adicionado acetonitrila ocorrendo a precipitação dos compostos finais. Os produtos sólidos obtidos foram isolados e submetidos a recristalização com acetonitrila e/ou acetato de etila. Os compostos finais foram isolados e secos em bomba de alto vácuo por 24h. Em seguida foram submetidos a todas as análises de caracterização completa e pureza já citadas anteriormente.

3.2.3.1.5 Síntese de derivados sulfonamídicos: compostos **5a-d** e **6a-d**

Os compostos derivados sulfonamídicos (**5a-d** e **6a-d**) foram sintetizados usando como base a metodologia descrita por Schröder e colaboradores (2001), conforme esquema abaixo (esquema 6):

Esquema 6. Esquema de síntese dos compostos **5a-d** e **6a-d**.



Condições reacionais: (i) L-aminoácidos (12 mmol), cloretos de sulfonila (10 mmol), 20 mL de sol. de K_2CO_3 (1,1M), refluxo por 1h.

Para a síntese dos compostos 5a-d e 6a-d foi utilizado balão unitubular de fundo redondo (50 mL) adaptado a condensador de refluxo, no qual adicionou-se solução aquosa de K_2CO_3 (3,04g/20 mL, 1,1M) e em seguida, sob agitação a temperatura ambiente, adicionou-se o respectivo L-aminoácido (12mmol). Prosseguiu-se com a adição de 1,8g de cloreto de sulfonila (10mmol) lentamente, sobre a solução. A reação foi submetida a

refluxo e agitada vigorosamente durante 1 hora. O consumo dos reagentes e possíveis formações dos produtos foram observados por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio: metanol (2:1), revelado em ninidrina e/ou lâmpada U.V. Após o término da reação, o balão foi colocado em banho de gelo, com agitação contínua e foi acidificado com ácido clorídrico até pH 1. Após a acidificação, observou-se a formação de precipitado que foi filtrado sob pressão reduzida. Em seguida, o sólido foi lavado com água destilada gelada. O precipitado obtido permaneceu em dessecador com cloreto de cálcio anidro por 24h horas. Os mesmos foram posteriormente submetidos a análises de caracterização completa e pureza citadas anteriormente.

3.2.4 Método biológico

3.2.4.1 Ensaio enzimático

Foram seguidos os protocolos do Kit de ensaio fluorescente “*LSD1 (KDM1A) Fluorescent Assay Kit (BPS Bioscience # 50106)*” para medir a atividade da enzima LSD1. O ensaio baseia-se na análise indireta de H₂O₂ produzido durante a reação de desmetilação mediada por LSD1 (figura9).

Inicialmente, preparou-se uma mistura do peptídeo metilado (2μM em 5 μL de água) e tampão de ensaio LSD1(15 μL) que foram adicionados em cada placa preta de 96 poços. Diferentes diluições dos compostos foram adicionadas a mistura e incubados com a enzima LSD1(15 ng/ μL) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, a mistura de 10 mM Amplex Red e 10 U/ mL de peroxidase foram adicionados aos poços e a placa incubada em temperatura ambiente por mais 5 minutos. O sinal de fluorescência foi detectado em comprimentos de onda de excitação e emissão $\lambda_{ex}=530$ nm e $\lambda_{em}=590$ nm, respectivamente, com o leitor de microplacas *Synergy HI Bio-Tek*. Os dados brutos foram coletados e analisados com o programa GraphPad Prism. Os resultados foram realizados em duplicata e expressos como unidades de fluorescência relativa (*Relative Fluorescence Unit – RFU*) e comparados com 100% da atividade enzimática (LSD1 + substrato sem inibidor). O valor do branco foi subtraído de todas as medidas e como controle positivo foi utilizado o inibidor GSK2879552.

As análises foram realizadas na *KOÇ university* em Istambu- Turquia, pela pós-doutoranda Ipek Bulut, no *Research Center for Translational Medicine (KUTTAM)*, coordenada pela Prof^a. Dr^a. Ceyda Açılan Ayhan.

3.2.4.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio *in vitro* de biorredução do MTT (brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio) (SCHERLIEß, 2011; AZIZ, 2006; CARMICHAEL et al., 1987; PARK et al., 1987; MOSMANN, 1983).

Os compostos planejados, inicialmente diluídos em DMSO a uma concentração de 10 mM, foram preparados em soluções-estoque com concentrações sucessivas (0,0032; 0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 e 50 µM) em meio de cultivo celular RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Para a correta condução dos ensaios e confiabilidade dos resultados, a concentração final de DMSO foi de 0.5%, visto que é de amplo conhecimento o potencial citotóxico do mesmo em concentrações maiores que 2% (PICOLI et al., 2015; GALMES et al., 2007). Ressaltamos que nenhum composto apresentou problemas de solubilidade durante a condução dos ensaios.

A linhagem celular de leucemia mielóide aguda (LMA) do tipo HEL (*Human Erythroleukaemia Cell Line*) foi plaqueada 4×10^4 células por poço (200 µL de meio) em placas de 96 poços (2×10^5 células/ml). Em seguida, as substâncias foram adicionadas em concentrações que variaram de 0.0032 a 50 µM nos poços - cada concentração em duplicata. As placas foram incubadas em estufa com CO₂ 5% e 37 °C por 72 horas. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo e o dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo. Após o período de tratamento, foi adicionado a cada poço 10 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL). As placas foram incubadas por mais três horas e o precipitado de formazan foi dissolvido em 90 µL da solução de ácido clorídrico e isopropanol, e a absorbância foi medida a 570 nm. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism v.7.0 e a porcentagem de inibição do crescimento celular medida em relação ao controle negativo. Foram realizados três ensaios independentes, obtendo dados de CI₅₀ (concentração inibitória média), IC 95% (intervalo de confiança de 95%) e R² (coeficiente de determinação).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Farmacologia Marinha no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), pela doutoranda Luciana C. Furtado, coordenados pela Profa. Dra. Letícia V. Costa Lotufo e Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto.

3.2.5 Métodos *in silico*

3.2.5.1 Ancoramento Molecular (*docking*)

A primeira etapa realizada foi o desenho e determinação da protonação dos compostos analisados em pH do meio fisiológico, utilizando o programa MarvinSketch (<https://www.chemaxon.com/download/marvin-suite/#mbeans>). Após esta etapa, as cargas foram calculadas no programa Chimera 1.12 utilizando o campo de força Amber ff14SB (AM1-BCC) (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). O programa Spartan'14 foi utilizado para minimização das estruturas, utilizando o campo de força MMFF (Merk Molecular force Field) (Halgren, 1996).

Para determinar o método mais adequado para as simulações de ancoramento entre os compostos e a proteína alvo- LSD1, foi empregado a metodologia de *redocking* a partir da estrutura cristalografada da enzima LSD1 de humanos e seu ligante peptídico PRSFLV co-cristalizado, retirados do banco de dados de proteínas (pdb: 3ZMT) (*Protein Data Bank- PDB*) e preparados na plataforma SYBYL X 2.1 (para Windows). Antes do ancoramento, ligantes e moléculas de água foram removidas da cavidade de ligação; os átomos de hidrogênio foram adicionados na geometria padrão e o FAD⁺ (cofator) foi mantido na estrutura da enzima LSD1.

No *redocking* do peptídeo PRSFLV foram testadas todas as funções de ranqueamento presentes no programa GOLD, versão CCDC Software Ltd. (ASP, ChemPLP, GoldScore e ChemScore), que utiliza-se de algoritmo genético (algoritmo de otimização e busca), baseando-se em mecanismo evolutivo.

Assim, variou-se o átomo centroide e o tamanho do raio do sítio de interação. Sendo o método escolhido aquele que apresentou a melhor relação, entre os valores de ChemPLP, o valor da raiz do desvio quadrático médio (RMSD) e a análise visual, levando em consideração o peptídeo PRSFLV docado e a estrutura cristalografada na enzima.

A validação do método foi realizada pela obtenção de 100 poses, as quais foram visualizadas pelo programa PyMOL 2.0 e avaliadas pela relação entre a obtenção do maior valor de ChemPLP, o menor valor do RMSD e a maior pontuação dada com a análise visual realizada conforme o quadro 4.

Quadro 4. Pontuação da análise visual dos ancoramentos baseados na estrutura do peptídeo PRSFLV encontrada no cristal da enzima LSD1 (3ZMT).

Critério da análise visual	Pontuação
Ligante na cavidade não esperada	0
Ligante na cavidade esperada, porém sem a mesma orientação	1
Ligante na cavidade esperada, porém sem sobreposição total	2
Sobreposição total	3

Procedeu-se o ancoramento das estruturas dos compostos 4g e protótipo ZINC0961148410 considerando-se 50 poses na estrutura cristalografada (pdb: 3ZMT). Utilizou-se o método selecionado pelo *redocking*, sendo este: função de escore ChemPLP, RMSD e avaliação visual; carbono aromático (CZ- Phe538) como centro do sítio e raio de 14 Å a partir do centroide.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

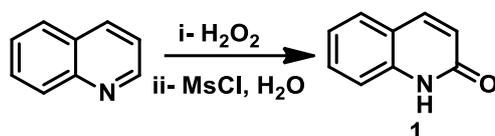
4.1 Síntese e caracterização dos compostos planejados

No total foram obtidos 18 compostos, divididos em 2-(1H)-quinolinona (**1**), cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (**2**), (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (**3**), 7 compostos finais derivados carboxamídicos (**4a-4g**) e 8 derivados sulfonamídicos (**5a-5d** e **6a-6d**). Os compostos derivados carboxamídicos e sulfonamídicos foram caracterizados por ponto de fusão, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas de alta resolução, espectroscopia de infravermelho, polarímetro e a determinação de pureza foi realizada por CLAE.

4.1.1 Síntese e caracterização do composto 2-(1H)-quinolinona (**1**)

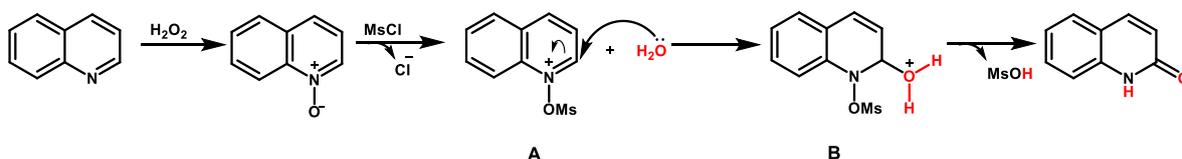
O composto **1**, derivado da quinolina, teve sua síntese realizada com base na metodologia de química verde, descrita por Xie e colaboradores (2017) (Figura 14). A reação constitui em um processo sequencial *one-pot* envolvendo oxidação *in situ* da quinolina, seguida por adição regioseletiva da água em uma hidroxilação, obtendo-se o composto em questão.

Figura 14. Síntese do composto **1**



Segundo Xie e colaboradores (2017), para o mecanismo reacional de obtenção do composto **1**, a formação de *N*-óxido de quinolina desempenha um papel crucial para obtenção do composto e foi proposto conforme o esquema 7. Primeiramente, a quinolina foi oxidada pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerando o *N*-óxido de quinolina, seguido da ativação pelo cloreto de metanossulfonil para gerar uma ligação O-S e o intermediário A. Então, o carbono-2 do intermediário A foi atacado pela água formando o intermediário B, que restabeleceu a aromaticidade para proporcionar a formação da 2-(1H)-quinolinona (**1**).

Esquema 7. Proposta de mecanismo para o composto **1**.

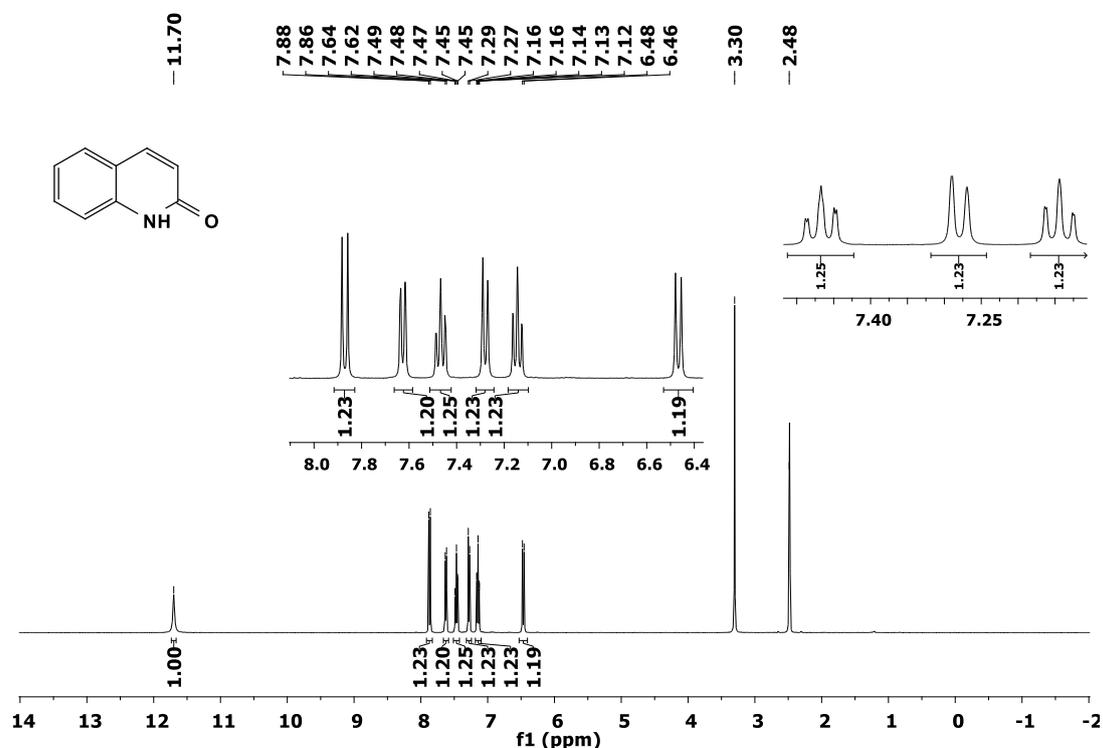


Fonte: Adaptada de Xie et al. 2017.

A metodologia utilizada para a síntese do composto **1** apresentou-se eficaz, com rendimento de 88%. Obteve-se como produto um sólido branco, com faixa de fusão = 196-197 °C, semelhante aos valores de referência (Ref: sólido branco, p.f. 198-199°C), o qual foi analisado por RMN ^1H e RMN ^{13}C , tendo os sinais detalhados nos espectros apresentados nas figuras 15 e 16.

O espectro de RMN ^1H apresentou os sinais correspondentes à formação do composto **1**. Nele é possível observar os sinais relacionados ao hidrogênio amidíco (C=ONH) em 11,70 ppm (singlete); o duplete do hidrogênio do carbono- β à carbonila em 7,87 ppm e o duplete do hidrogênio do carbono- α em 6,47 ppm, ambos com constante de acoplamento $J= 9,5$ Hz e os 4 hidrogênios do anel aromático em 7.63 ppm com constante de acoplamento $J= 7,6$ Hz (duplete), 7.52 ppm – 7.40 ppm (multiplete), 7.28 ppm com constante de acoplamento $J= 7,6$ Hz (duplete) e 7.19 ppm – 7.08 ppm (multiplete).

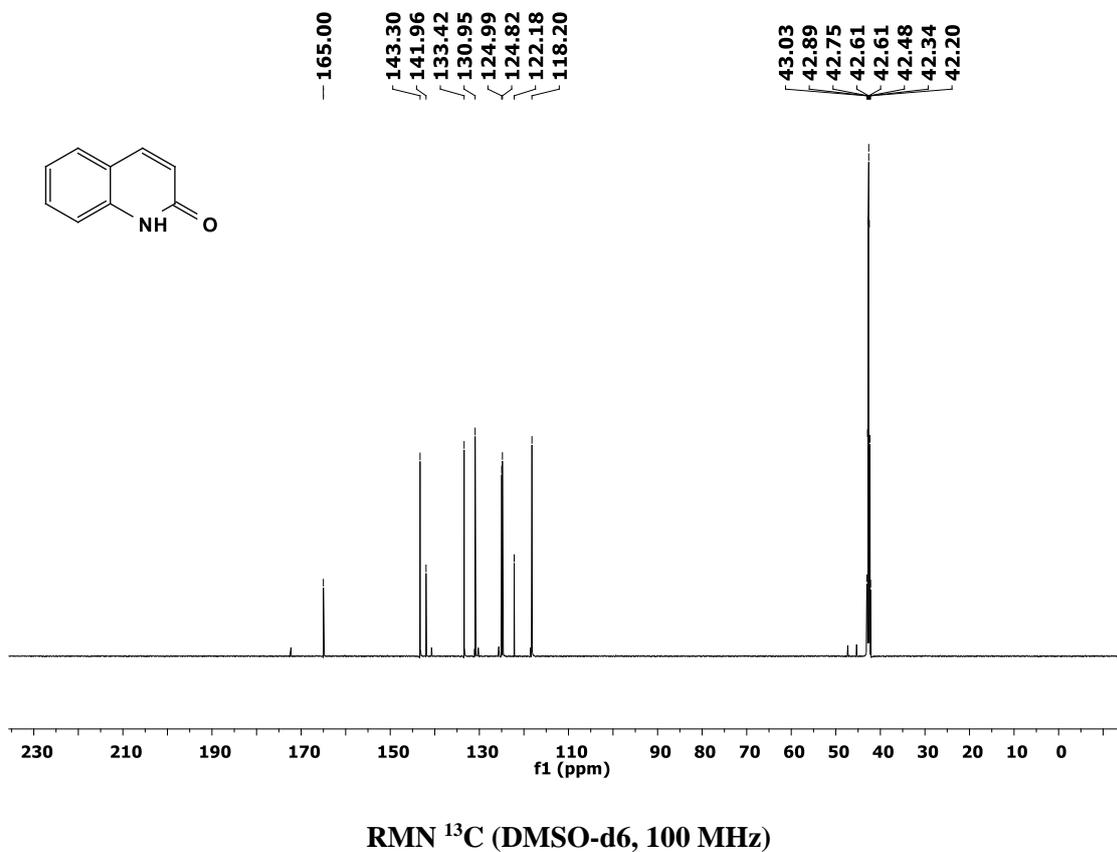
Figura 15. Espectro de RMN ^1H do 2-(1H)-quinolinona (**1**)



RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz)

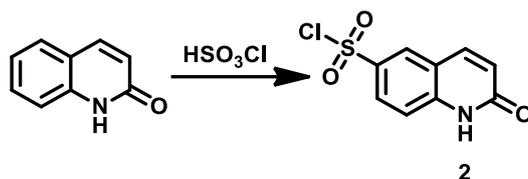
No espectro de RMN ^{13}C , identificou-se o composto **1** pela presença do carbono carbonílico da amida em 165,00 ppm, pelos sinais em 124,82 ppm e 143,30 ppm referentes aos carbonos α e β à carbonila, respectivamente e aos demais sinais 141,96 ppm, 133,42 ppm, 130,95 ppm, 124,99 ppm, 122,18 ppm, 118,20 ppm referentes aos carbonos do anel aromático presente, confirmando a formação do produto. Todas as atribuições foram compatíveis com o estudo anteriormente publicado por Xie e colaboradores (2017).

Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C do 2-(1H)-quinolinona (**1**)

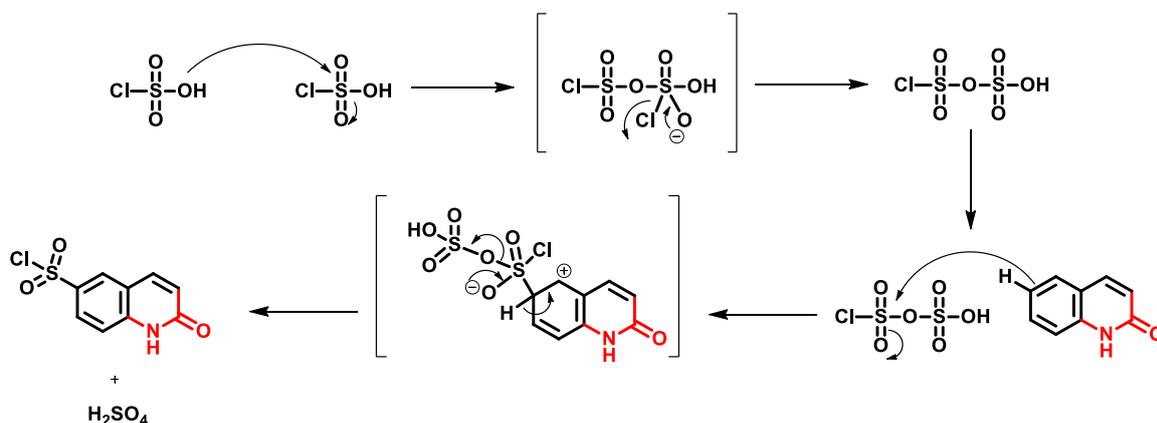


4.1.2 Síntese e caracterização do composto cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (**2**)

A reação para obtenção do composto **2** foi realizada com base na metodologia de Ortiz-Meoz e colaboradores (2015) (Figura 17). Nesta reação de sulfonação, o ácido clorossulfônico sofre dimerização para gerar o reagente eletrofílico usado para reagir com o composto **1** numa substituição eletrofílica formando o composto **2**.

Figura 17. Síntese de composto 2

Neste mecanismo de formação do composto 2, a ligação π do anel aromático reage com o átomo de enxofre eletrofílico do anidrido clorossulfônico. A ligação π envolvida na reação leva a obtenção do composto com o cloreto de sulfonila na posição *para* em relação a amida já existente no anel. O grupo amida é um grupo ativador *orto-para* dirigente (em vermelho no esquema 8). Conforme os elétrons π do anel reagem com o átomo de enxofre, a ligação π (S=O) se rompe para gerar uma carga formal no átomo de oxigênio. O carbono não reagente da ligação π do anel aromático assume uma carga formal de +1. Os elétrons no oxigênio carregado negativamente, então retornam para formar novamente a ligação π (S=O) eliminando bissulfato. Ao mesmo tempo, um átomo de hidrogênio do anel cede seus elétrons para restituir a ligação π , restaurando a aromaticidade, tendo como subproduto reacional o ácido sulfúrico (esquema 8) (CLAYDEN, GREEVS, WARREN, 2012).

Esquema 8. Mecanismo de sulfonação para formar o composto 2

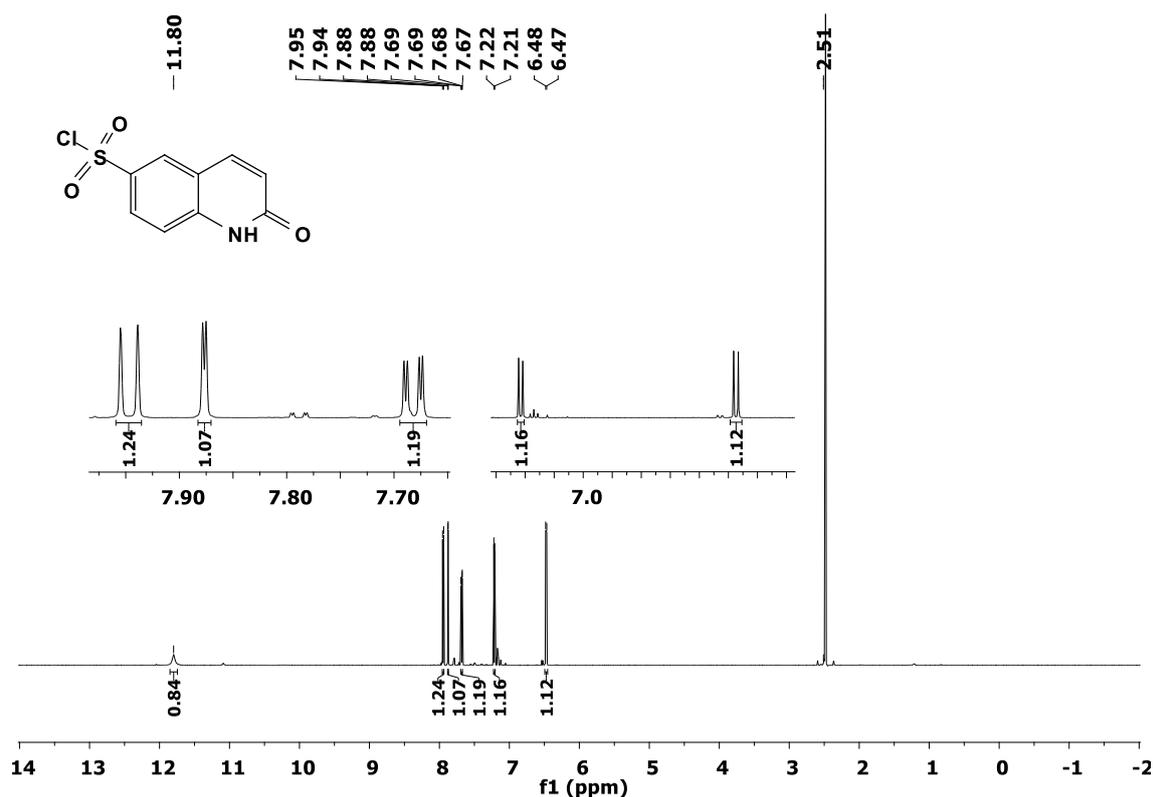
Fonte: Mecanismo de reação adaptada de CLAYDEN, GREEVS, WARREN, 2012 (c. 21, p. 476)

A metodologia sintética empregada mostrou-se eficiente, com rendimento de 80%. Obteve-se como produto um sólido levemente marrom, o qual foi analisado por RMN ¹H e RMN ¹³C, tendo os sinais detalhados nos espectros apresentados nas figuras 18 e 19.

No RMN ^1H , os sinais correspondentes à formação do composto **2** foram observados relacionados ao hidrogênio amidíco (C=ONH-) em 11,80 ppm (singleto); o duplete do hidrogênio do carbono- β à carbonila em 7,95 ppm e o duplete do hidrogênio do carbono- α em 6,47 ppm, ambos com constante de acoplamento $J= 9,5$ Hz e a presença dos sinais dos 3 hidrogênios do anel aromático em 7,88 ppm com constante de acoplamento $J= 1,9$ Hz (duplete), 7,69 ppm – 7,67 ppm com constante de acoplamento $J= 8,5$ Hz e 1,9 Hz (duplo duplete) e 7,21 ppm com constante de acoplamento $J= 8,5$ Hz (duplete).

Ao realizar uma análise comparativa com o RMN ^1H do composto **1**, observamos o desaparecimento do multiplete entre 7.19 ppm – 7.08 ppm referente a 1H do anel aromático, confirmando a substituição do mesmo, pelo cloreto de sulfonila.

Figura 18. Espectro de RMN ^1H do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (**2**)

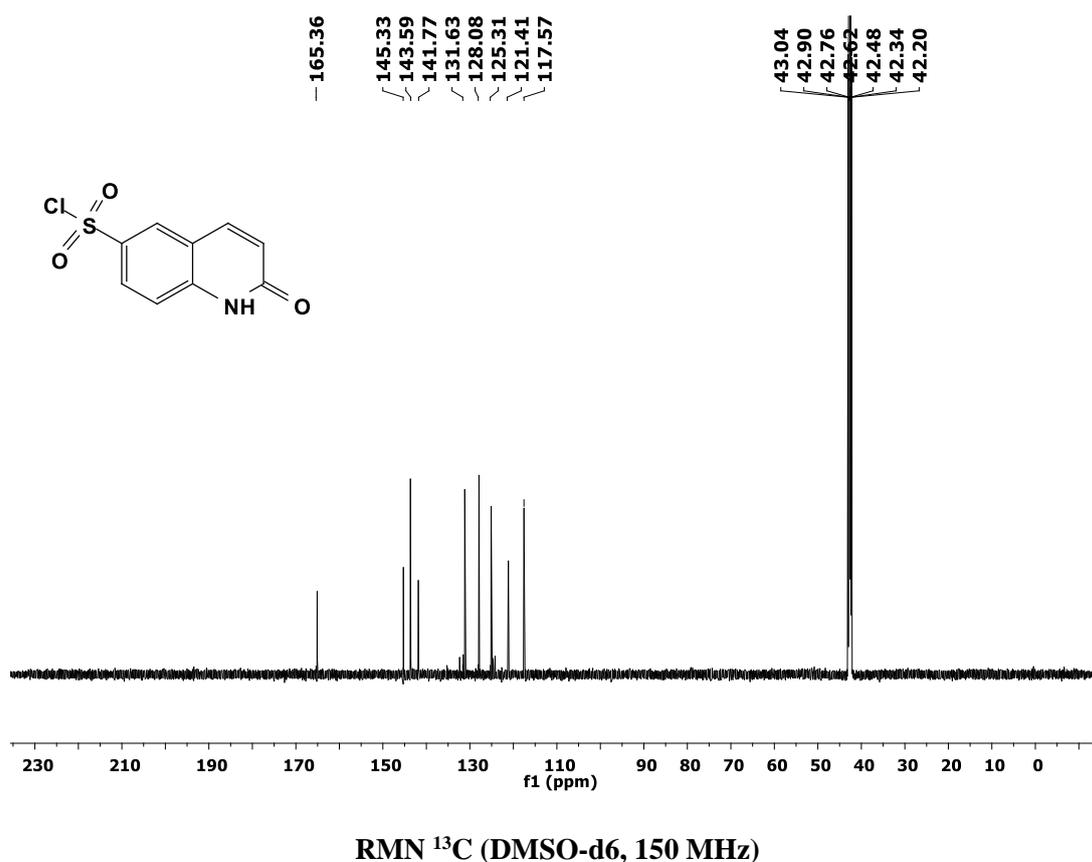


RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz)

No espectro de RMN ^{13}C , foram verificados sinais referentes ao composto **2**, sendo eles o do carbono carbonílico da amida em 165,36 ppm, pelo sinal do carbono ligado ao

grupo sulfonil em 145,29 ppm, pelos sinais em 125,3 ppm e 143,59 ppm referentes aos carbonos α e β à carbonila, respectivamente (dados confirmados por RMN bidimensional-gHSQCAD- anexo A, pág.104) e aos demais sinais 141,77 ppm, 131,63 ppm, 128,08 ppm, 121,15 ppm, 117,57 ppm referentes aos carbonos do anel aromático confirmando a formação do produto.

Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)

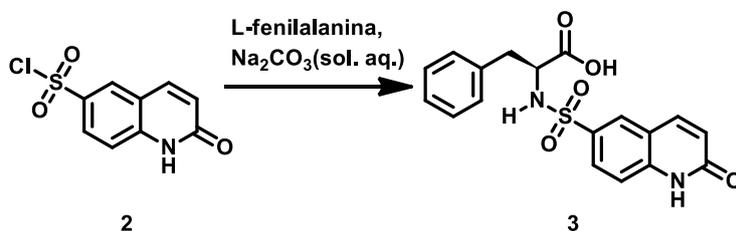


4.1.3 Síntese e caracterização do (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (3)

A reação para obtenção do composto **3**, esqueleto principal dos compostos planejados foi realizada com base na metodologia descrita por Ugwu e colaboradores (2017) (Figura 20). A reação de formação da sulfonamida trata-se de uma reação de adição/eliminação e foi realizada em meio básico de Na_2CO_3 para: aumentar a solubilidade

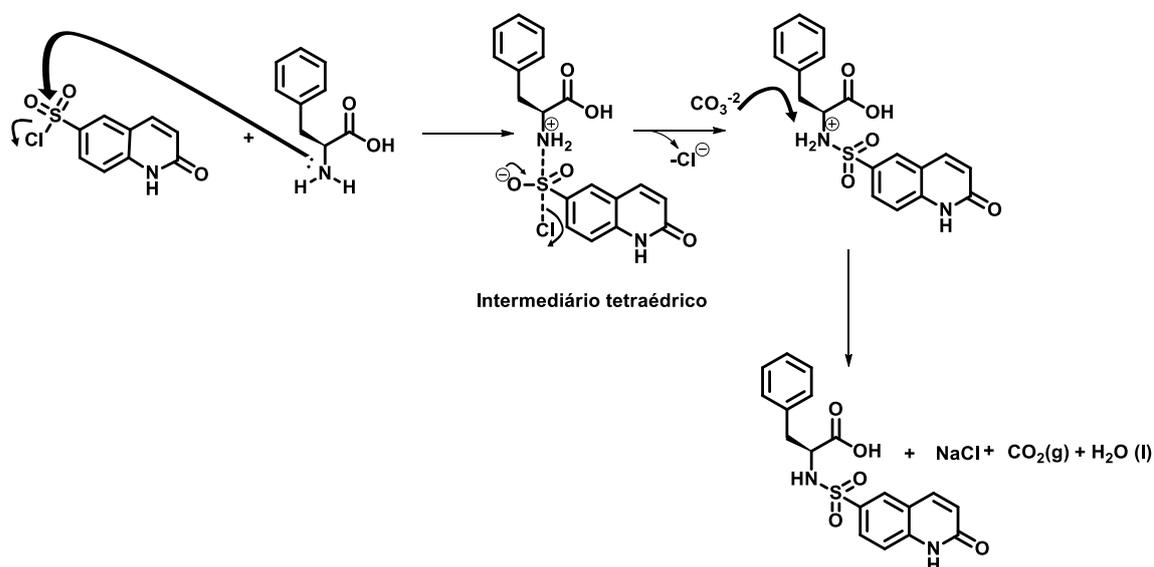
da L-fenilalanina em água; remoção do próton ligado ao nitrogênio do cátion resultante do primeiro ataque e neutralização do ácido formado no meio reacional (McMURRY, 2011).

Figura 20. Síntese do composto 3



Nesta reação, a amina primária do aminoácido age como nucleófilo, promovendo o ataque ao átomo eletronicamente deficiente, nesse caso o átomo de enxofre tetravalente do cloreto de sulfonila. O ataque nucleofílico ocorre em posição oposta ao grupo de saída. Por sua vez, o cloreto de sulfonila possui alta reatividade, devido o cloro ser um bom grupo abandonador, possibilitando a formação da ligação sulfonamídica (esquema 9) (CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012; McMURRY, 2011).

Esquema 9. Mecanismo de formação do composto 3.



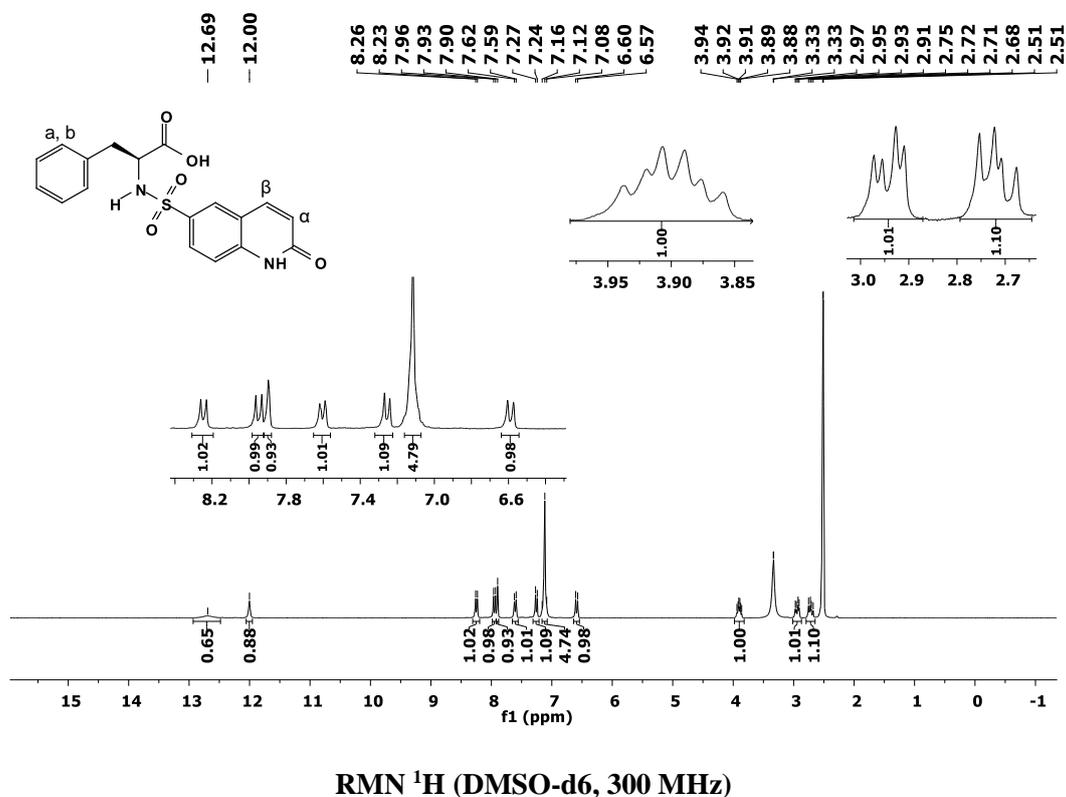
Fonte: Adaptado de McMURRY, 2011.

A metodologia proposta para a síntese em questão apresentou-se eficaz, com rendimento de 75%. Obteve-se como produto um sólido levemente amarelo, com ponto de fusão = 238-240 °C e pureza de 95% em CLAE, o qual foi analisado por RMN ^1H e RMN ^{13}C (figura 20 e 21, respectivamente), espectrometria de massas de alta resolução

$C_{18}H_{16}N_2O_5S$: $[M + H]^+$ m/z 372,08, encontrado 373,0844 e rotação óptica $[\alpha]_D^{20} = -25,00$ ($c = 0,1$, MEOH). Todos espectros e cromatogramas encontram-se no anexo A (págs. 104-107).

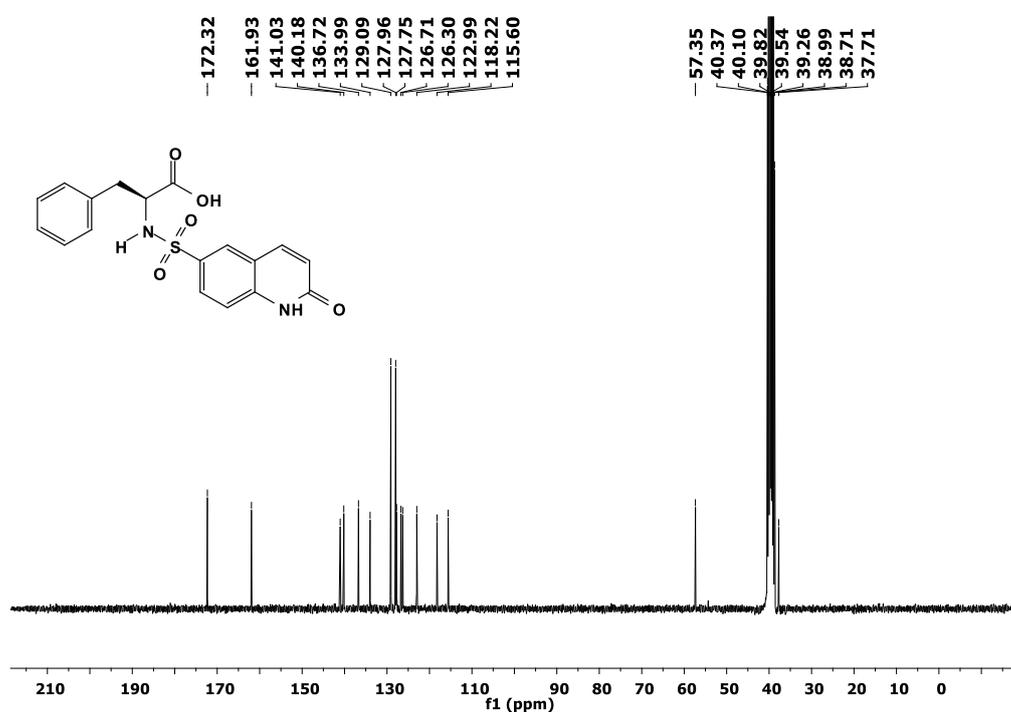
Na figura 21 apresentamos o espectro de RMN 1H do composto **3**, no qual podem ser observados os sinais referentes a formação do produto. Pode-se observar os deslocamentos em 12,69 ppm (singlete largo) referente a hidroxila do ácido carboxílico (COOH); o hidrogênio amidíco (C=ONH) em 12,00 ppm (singlete); a presença dos hidrogênios do carbono- α, β à carbonila da quinolinona em 7,95 ppm e 6,59 ppm ambos com constante de acoplamento $J = 9,6$ Hz (duplete); o hidrogênio do carbono quiral (CH-N) em 3,90 ppm com constante de acoplamento $J = 9,2, 6,0$ Hz (triplo dubleto), os dois hidrogênios em 2,94 ppm (CH_a de CH_2) e 2,71 ppm (CH_b de CH_2) com constante de acoplamento $J = 13,6, 5,1$ Hz e $J = 13,7, 9,3$ Hz respectivamente (ambos duplo dubleto) e um singlete com 5 hidrogênios em 7,12 ppm referente ao fenil da L-fenilalanina.

Figura 21. Espectro de RMN 1H (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (**3**)



Na análise de RMN ^{13}C do composto 3 (figura 22), estão presentes os dois sinais em 172,32 ppm e 161,93 ppm correspondentes aos carbonos carbonílicos do ácido carboxílico e da amida respectivamente. O sinal em 57,35 ppm correspondente ao carbono quiral e o sinal em 37,71 ppm referente ao do carbono alifático do benzil presente na L-fenilalanina, sinal pouco intenso e blindado. Também é possível observar os sinais correspondentes aos demais carbonos da molécula conforme a identificação do RMN ^{13}C do composto 2.

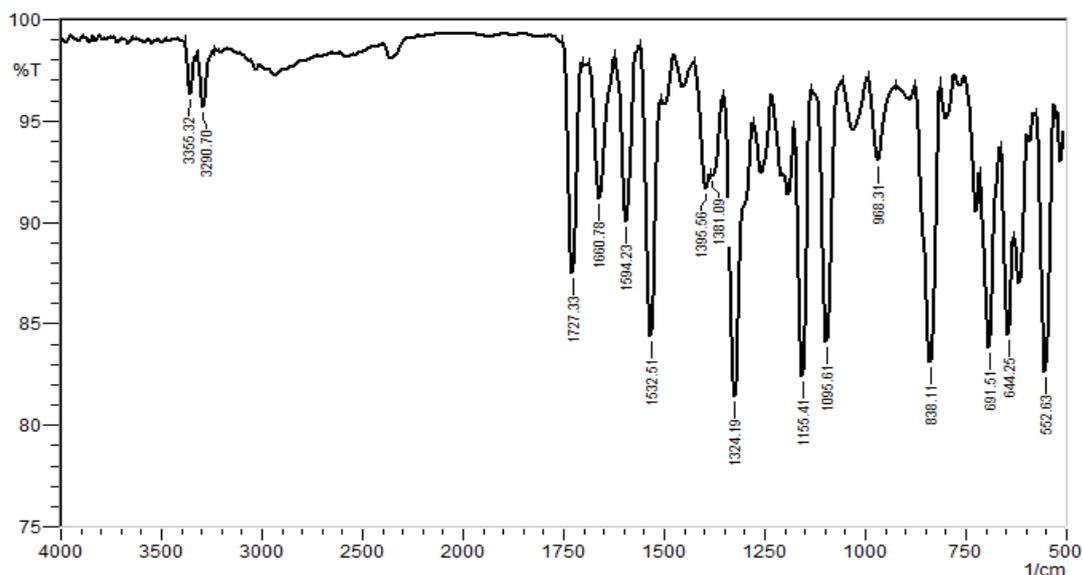
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (*S*)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (**3**)



RMN ^{13}C (DMSO-d₆, 75 MHz)

No espectro de infravermelho do composto 3 apresentado na figura 23, observa-se as bandas de deformação axial de N-H em 3290 cm^{-1} referente a sulfonamida secundária, o um estiramento em 1727 cm^{-1} referente a carbonila do ácido carboxílico, uma banda em 3355 cm^{-1} referente a deformação axial e outra em 1660 cm^{-1} referente a deformação angular do N-H da amida da quinolinona. Também são evidenciadas bandas de estiramento assimétrico e simétrico do grupo SO_2 em 1324 e 1155 cm^{-1} , respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2006).

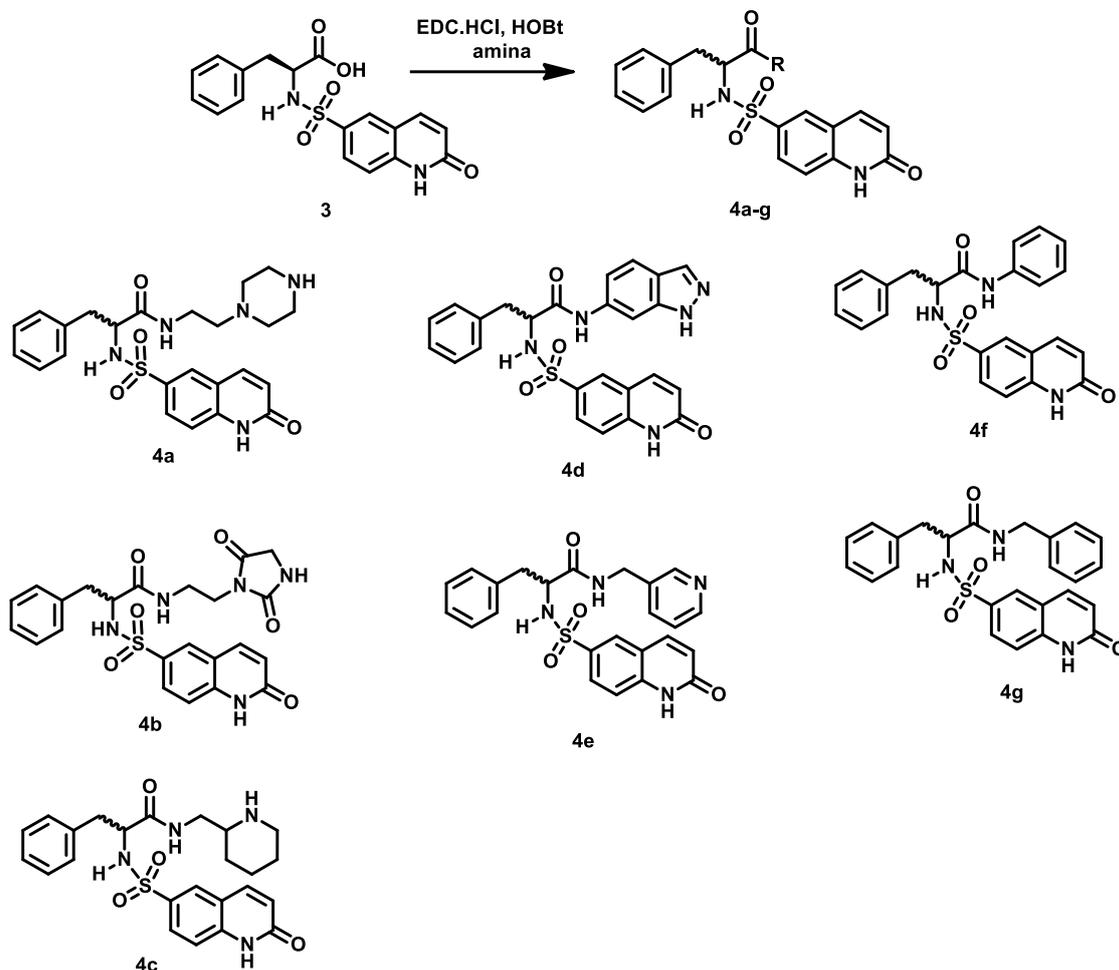
Figura 23. Espectro de infravermelho do (*S*)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (**3**)



4.1.4 Síntese e caracterização dos compostos finais (**4a-4g**).

Para a obtenção dos 7 compostos finais planejados (Figura 24) foi seguida a metodologia proposta por Silva e colaboradores (2017), que utilizou como agente condensante o cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC.HCl) e como catalisador da reação o hidroxibenzotriazol (HOBt), os quais favoreceram a reação das aminas propostas com o ácido carboxílico do composto **3**.

A síntese destes compostos ocorreu por meio de uma substituição nucleofílica no carbono carbonílico do (*S*)-ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanóico (**3**) e as aminas propostas (Figura 24). O mecanismo de substituição à carbonila ocorre em duas etapas: a primeira é a adição do nucleófilo ao carbono carbonílico, formando um intermediário tetraédrico e a segunda etapa é a saída do grupo abandonador.

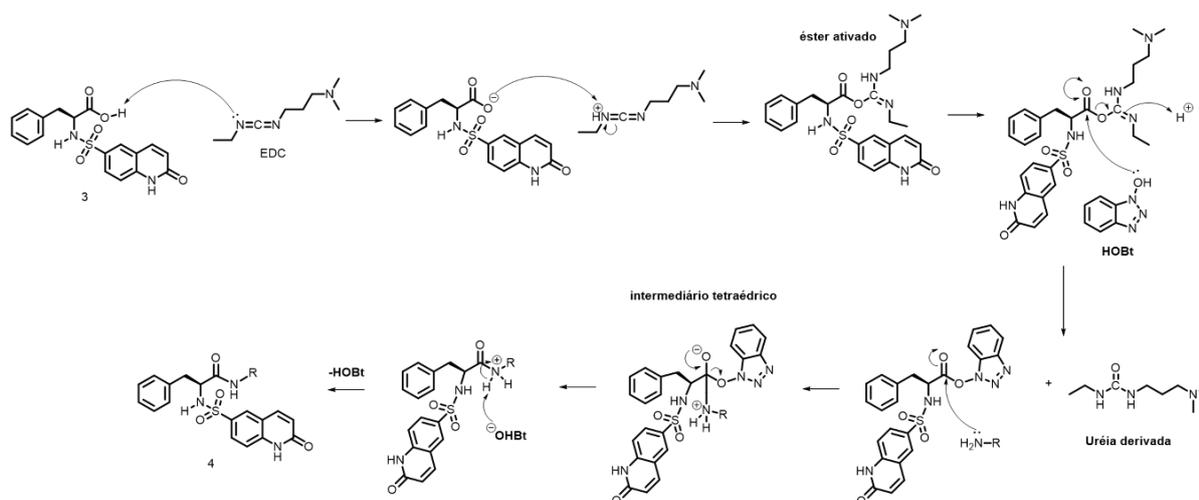
Figura 24. Síntese do composto finais (**4a-4g**)

Para que a reação seja favorecida, o composto deve possuir um bom grupo de saída ligado ao carbono tetraédrico. Neste contexto, como ácidos carboxílicos são pouco reativos para reagir com aminas primárias, por não possuírem um bom grupo abandonador, uma das formas de aumentar a reatividade é utilizando agentes condensantes (ou reagentes de acoplamento) como por exemplo as carbodiimida, que possuem um grupo reativo (-N=C=N-) em sua estrutura (esquema 10) (CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012).

Nesta etapa reacional de obtenção dos compostos planejados utilizamos como agente condensante o EDC.HCl. Nessa reação a carbodiimida após reagir com o ácido carboxílico do composto **3**, forma um grupamento éster ativado, mais reativo que o ácido carboxílico, esse grupamento por sua vez, tende a sofrer facilmente um ataque nucleofílico pelo fato de ser um bom grupo de saída, formando o derivado da uréia estável.

O HOBt é um reagente bastante comum em reações de acoplamento para formação de amidas na presença agentes condensantes. Esses tipos de reações são aceleradas na presença de HOBt, pois favorecem o ataque nucleofílico da amina. O HOBt também tem a função de evitar a racemização, pois intercepta o éster ativado formado pelo EDC rapidamente, antes que a racemização ocorra. O mecanismo reacional é apresentado no esquema 10 a seguir (CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012; AL-WARHI; AL-HAZIMI; EL-FAHAM, 2012; EL-FAHAM; ALBERICIO, 2011).

Esquema 10. Mecanismo de reação para obtenção dos compostos finais (**4a-4g**).



Fonte: Mecanismo de reação adaptado de CLAYDEN, GREEVES, WARREN, 2012 (c. 10, p. 200; c. 29, p. 747).

A aplicação da metodologia utilizando EDC.HCL como agente condensante mostrou-se eficaz para obtenção dos compostos finais planejados. Os dados referentes aos produtos obtidos são apresentados na tabela 3, sendo esses: aspecto físico, rendimento da reação, ponto de fusão, os valores experimentais de espectrometria de massas, rotação óptica e a pureza por CLAE. De forma geral, os produtos obtidos apresentaram rendimentos condizentes com os dados obtidos na literatura para reações de acoplamento usando EDC.HCl. Acreditamos que os menores rendimentos se devem, possivelmente, a solubilidade ou a menor reatividade das aminas utilizadas na síntese dos compostos **4c** e **4e**. Outro ponto a ser aprimorado é a purificação dos compostos **4a** e **4c**, visto que apresentaram pureza abaixo de 90% (tabela 2). A caracterização completa dos compostos, espectros e cromatogramas seguem descrita no anexo A págs. 107-130 deste trabalho.

As reações foram monitoradas por CCD e os produtos finais purificados por recristalização e precipitação conforme descrito na metodologia. É válido ressaltar que a

maioria apresentou valores de ponto de fusão, espectrometria de massas de alta resolução e pureza dentro dos valores aceitáveis de desvio, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Dados gerais de caracterização dos compostos finais (**4a-4g**).

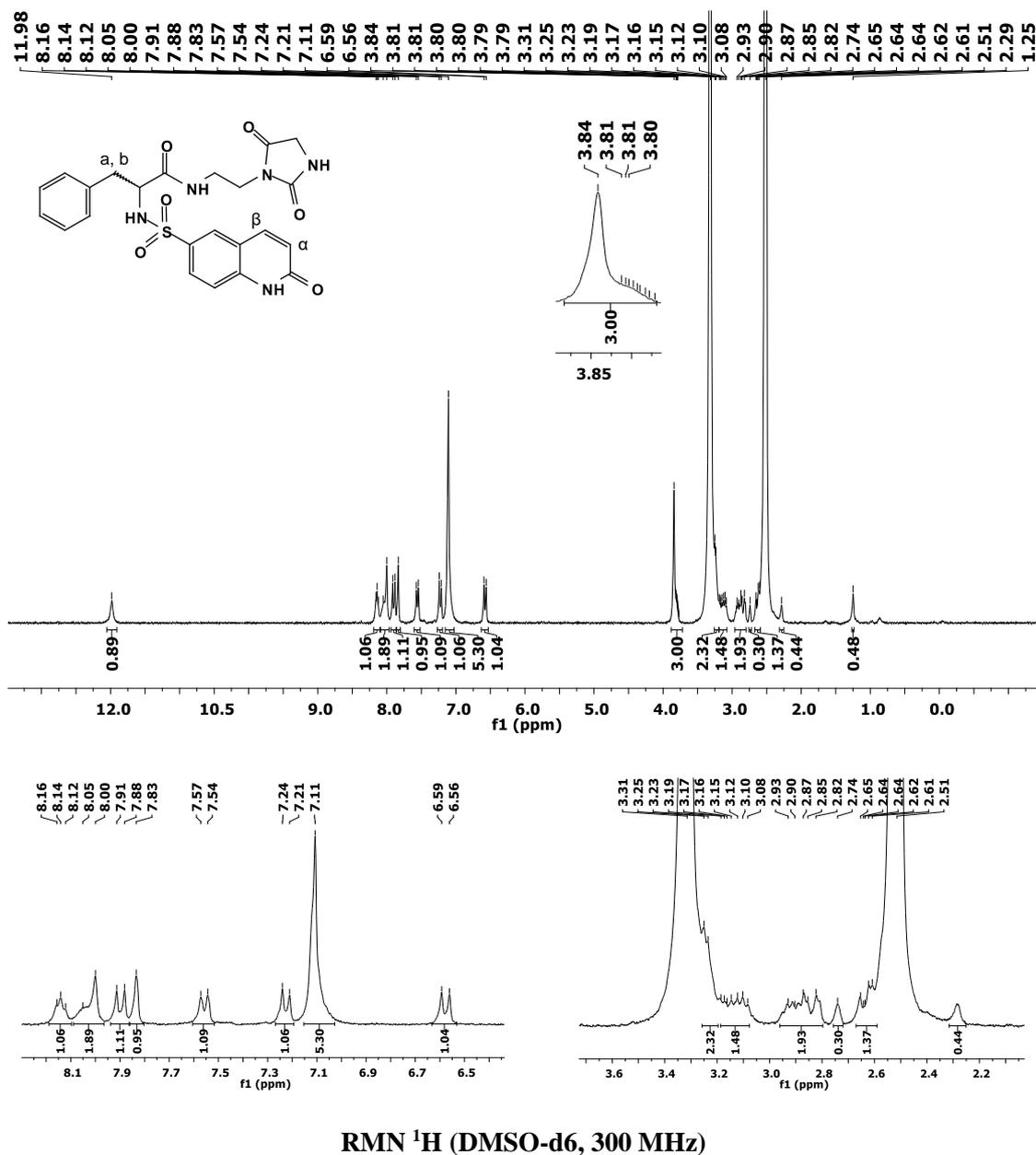
Compostos	Aspecto físico	Ponto de fusão (°C)	Rendimento (%)	Massas Experimental [M+H] ⁺ m/z	Rotações ópticas ([α] _{D²⁰})	Pureza (%)
4a	Sólido branco	183-185	41	484,1877	15,00	83
4b	Sólido branco	160-162	57	498,1388	-5,00	95
4c	Sólido branco	148-150	30	469,1865	3,00	85
4d	Sólido rosa	163-165	54	488,1360	2,00	92
4e	Sólido branco	210-212	25	463,1444	-10,00	92
4f	Sólido branco	161-163	56	448,1321	6,00	96
4g	Sólido amarelo	168-170	50	462,1468	2,00	95

Dentre os 7 compostos sintetizados, 6 são inéditos, tendo como exceção o composto **4f** derivado aromático da anilina. Conforme os dados da tabela 2, na qual constam propriedades que caracterizam os compostos **4a-4g**, são apresentados valores obtidos nos experimentos de espectrometria de massas que se apresentaram dentro de valores aceitáveis de desvios, não sendo superiores a 5 partes por milhão-ppm. As análises de rotações ópticas foram realizadas por se tratarem de compostos que possuem centro quiral, sendo assim são substâncias opticamente ativas que podem ser caracterizadas enquanto o desvio da luz polarizada para a direita (dextrógira) ou para esquerda (levógira). Os resultados destes experimentos nos mostraram que dentre os compostos obtidos temos 5 moléculas (**4a**, **4c**, **4d**, **4f** e **4g**) dextróginas e 2 (**4b** e **4e**) levóginas. Em relação a pureza dos compostos a qual foi obtida por CLAE, dois dos compostos, **4a** e **4c**, apresentando valores < 90%. Outra propriedade medida foi ponto de fusão, o qual mostra variações de até 2° C o que sugere, também, uma alta pureza dos compostos obtidos.

Em relação a caracterização por RMN, os compostos finais apresentaram deslocamentos químicos comuns para toda a série (**4a-4g**), que puderam ser usados para

comparar e comprovar a formação dos mesmos. Para a análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C utilizamos como referência o composto 4b apresentado na figura 25 e 26 respectivamente. Esse composto foi utilizado como referência visto ter sinais comuns a todo a série e, também, por apresentar pureza de 95%. Além disso, permite a confirmação da formação do produto pelo sinal referente ao carbono metilênico (CH_2) do anel hidantoínico em 3,84 ppm (singlete).

Figura 25. Espectro de RMN ^1H do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (**4b**)



Os sinais de RMN ^1H correspondentes à formação do composto **4b** (figura 25), foram analisados comparativamente ao intermediário **3** (tabela 3). Na análise evidenciamos o desaparecimento do sinal referente ao singlete largo em 12,69 ppm pertencente ao ácido carboxílico (COOH) do composto **3**, o surgimento de um singlete do hidrogênio amidíco (C=ONH) em 8,00 ppm que corresponde a formação da amida, fruto da reação de acoplamento e o aparecimento do tripleto em 8,14 ppm ($J = 5,4 \text{ Hz}$ - 1H) referente ao hidrogênio amidíco (C=ONH) do anel hidantoínico. Assim como, foi detectado o aparecimento do singlete em 3,84 ppm correspondente a 2 hidrogênios metilênicos (CH_2) da hidantoína somados, na mesma região a permanência do multiplete em 3,81-3,77 ppm, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono quiral da L-fenilalanina. Além da presença dos sinais em 3,24 ppm (dublete, $J = 4,8 \text{ Hz}$ - 2H) e 2,93-2,82 ppm (multiplete- 2H) referente aos 4 hidrogênios da região alifática da 3-2-(aminoetil)hidantoína. Os demais sinais comparativos matêm-se presente na estrutura e estão descritos na tabela 3 confirmando a obtenção do composto.

Tabela 3. Comparação dos sinais do RMN de ^1H do composto intermediário (**3**) e final (**4b**).

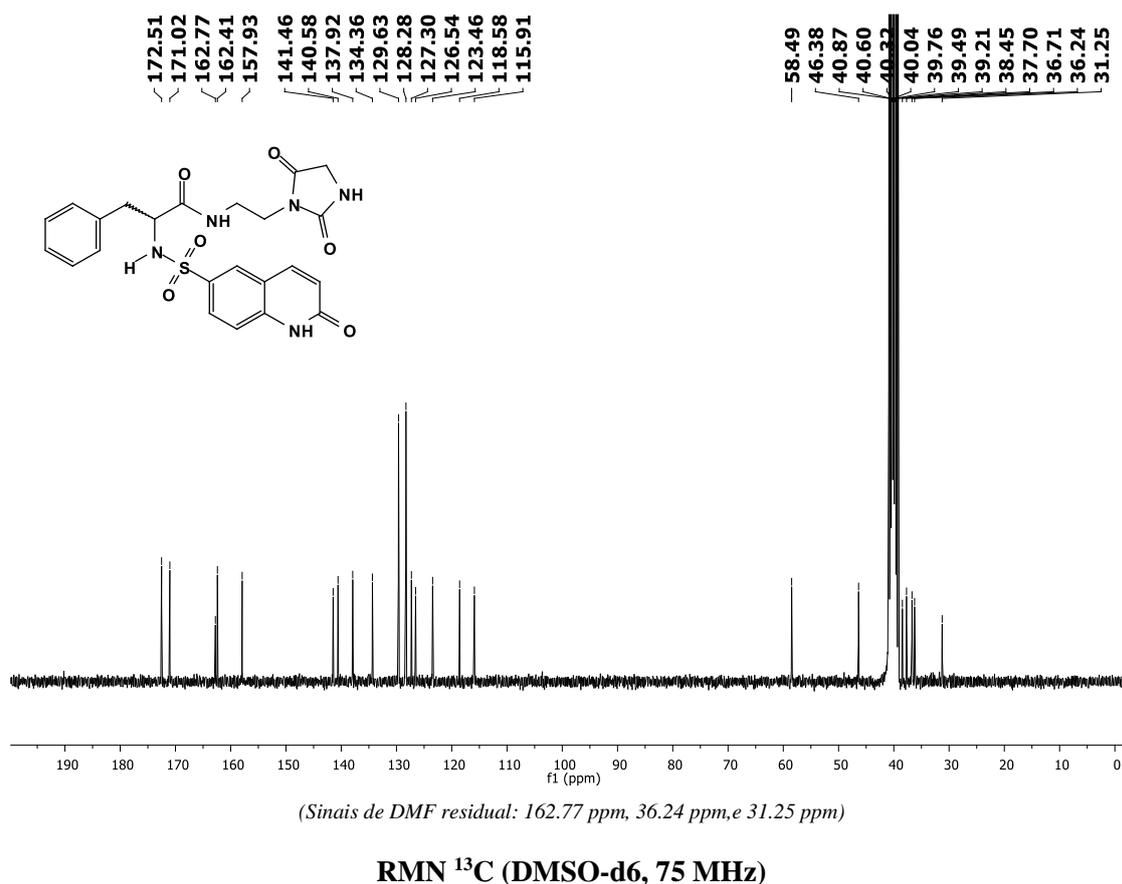
Compostos	COOH	C=ONH _q	C=ONH _h	ArH	C=ONH	CH _β	SO ₂ -NH	ArH	ArH	ArH _{fenil}	CH _α	CH _{2h}	CH _{quiral}	CH ₂	CH ₂	CH _α de CH ₂	CH _β de CH ₂
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
3	12,69 (s, 1H)	12,00 (s, 1H)	-	8,25 (d, $J = 9,1 \text{ Hz}$, 1H)	-	7,95 (d, $J = 9,6 \text{ Hz}$, 1H)	7,90 (s, 1H)	7,60 (d, $J = 8,7 \text{ Hz}$, 1H)	7,25 (d, $J = 8,7 \text{ Hz}$, 1H)	7,12 (s, 5H)	6,59 (d, $J = 9,6 \text{ Hz}$, 1H)	-	3,90 (td, $J = 9,2, 6,0 \text{ Hz}$, 1H)	-	-	2,94 (dd, $J = 13,6, 5,1 \text{ Hz}$, 1H)	2,71 (dd, $J = 13,7, 9,3 \text{ Hz}$, 1H)
4b	-	11,98 (s, 1H)	8,14 (t, $J = 5,4 \text{ Hz}$, 1H)	8,05 (d, $J = 9,0 \text{ Hz}$, 1H)	8,00 (s, 1H)	7,90 (d, $J = 9,6 \text{ Hz}$, 1H)	7,83 (s, 1H)	7,56 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 1H)	7,23 (d, $J = 8,8 \text{ Hz}$, 1H)	7,11 (s, 5H)	6,58 (d, $J = 9,6 \text{ Hz}$, 1H)	3,84 (s, 2H)	3,81- 3,77 (m, 1H)	3,24 (d, $J = 4,8 \text{ Hz}$, 2H)	2,93- 2,82 (m, 2H)	3,19- 3,08 (m, 1H)	2,65- 2,61 (m, 1H)

C=ONH_q (q=quinolinona); C=ONH_h (h=hidantoína); CH_{2h} (h=hidantoína), ArH_{fenil} (fenil=fenilalanina).

Em relação aos sinais do RMN de ^{13}C (figura 26), os principais deslocamentos relacionados aos carbonos carbonílicos das amidas são observados em 172,51 ppm. Esses sinais são referentes a amida formada pela reação de acoplamento em 171,02 ppm pertencente a quinolinona e os sinais com deslocamentos de 162,41 ppm e 157,93 ppm referentes as carbonílas do anel hidantoínico. Os deslocamentos químicos e a intensidade dos sinais de carbono do anel aromático derivados da L-fenilalanina também foram observados em 129,63

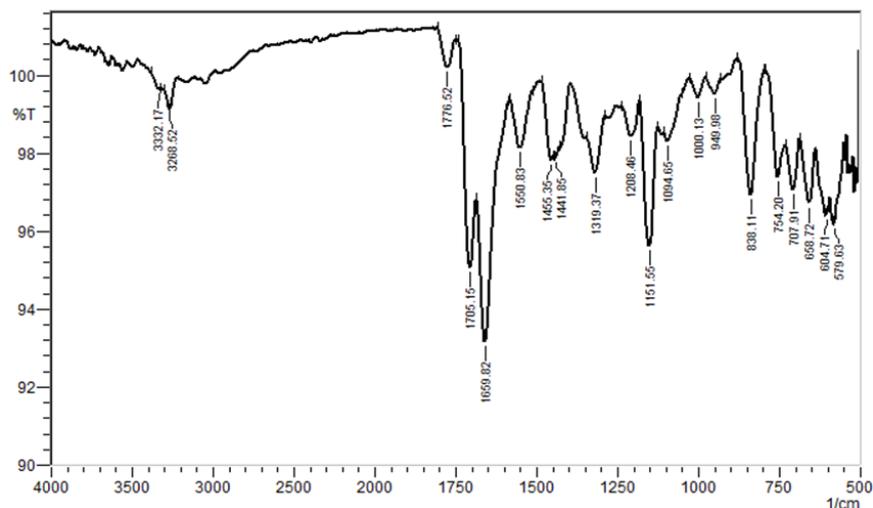
ppm e 128,28 ppm com o dobro da intensidade. Por fim, o evidente sinal do carbono quiral em 58,49 ppm e o sinal do único carbono metilênico (CH₂) pertencente a hidantoína em 46,38 ppm.

Figura 26. Espectro de RMN ¹³C do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (**4b**)



No espectro de infravermelho do composto **4b** (Figura 27), podemos observar as bandas de deformação axial de N-H em 3268 cm⁻¹ referente a sulfonamida e em 3332 cm⁻¹ correspondente a quinolinona. Além disso, podem ser visualizadas as vibrações de deformação axial em 1776 cm⁻¹ da carbonila (C=O) do anel hidantóinico, 1705 cm⁻¹ referente a carbonila (C=O) da amida secundária formada e outra banda em 1659 cm⁻¹ da deformação angular do N-H da quinolinona. Também são evidenciadas bandas de estiramento assimétrico e simétrico do grupo SO₂ em 1319 e 1151 cm⁻¹, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2006).

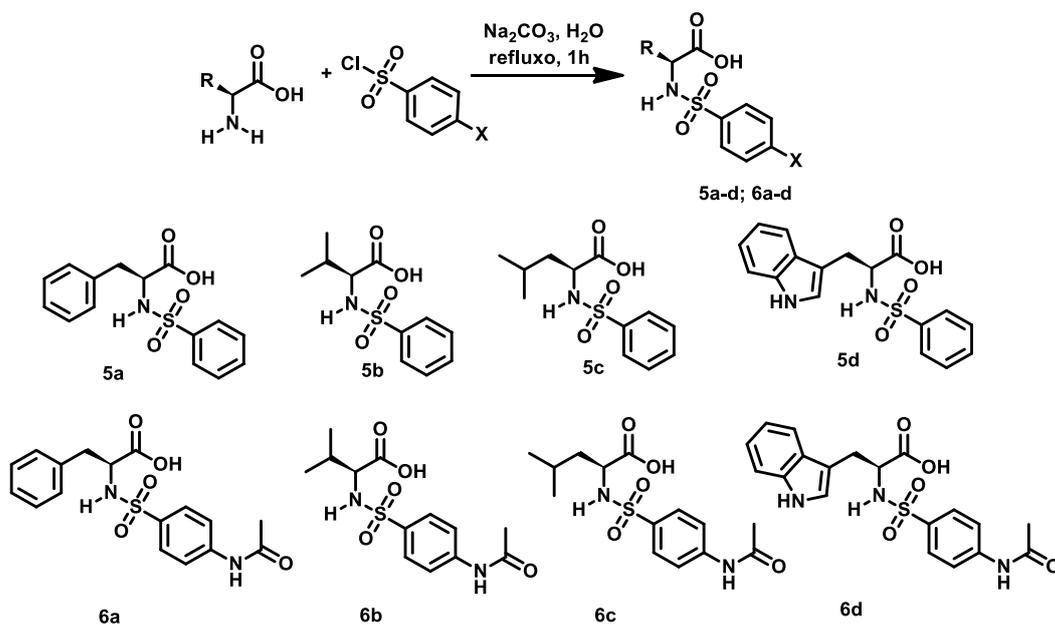
Figura 27. Espectro de IV do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (**4b**)



4.1.5 Síntese e caracterização dos derivados sulfonamídicos (**5a-d** e **6a-d**)

A metodologia aplicada para obtenção dos 8 compostos derivados sulfonamídicos (**5a-d** e **6a-d**) foi realizada com base em metodologia adaptada de Schröder e colaboradores (2001) (Figura 28). A reação de formação da sulfonamida trata-se de uma reação de adição/eliminação, conforme o mesmo mecanismo de reação apresentando no esquema 9.

Figura 28. Síntese dos compostos derivados sulfonamídicos (**5a-d** e **6a-d**).



A metodologia descrita por Schröder e colaboradores sofreu adaptações nas condições reacionais e de purificação tornando-se eficaz para obtenção dos nossos derivados sulfonamídicos. Primeiramente nas condições reacionais elevamos a temperatura de 70 °C para 100 °C (temperatura de refluxo). Optou-se por essa temperatura, visto que depois de 30 minutos (metodologia seguida), ainda observávamos por análise de CCD grande quantidade de reagentes de partida, além dos mesmos não estarem totalmente solúveis na reação. Sugere-se que o aumento da temperatura seja necessário para aumentar a solubilidade e reatividade dos reagentes em questão. Em relação a purificação, diminuimos o pH 2,5 (metodologia seguida) para pH 1, pelo fato de que em pH 2,5 ainda visualizamos por análise de CCD a presença de produto na fase aquosa e não totalmente precipitado. Sendo assim, consideramos que para reações de sulfonilação com aminoácidos, a temperatura da reação e o pH, no processo de purificação, devem ser cuidadosamente monitorados, pois são fatores que influenciam diretamente no rendimento final da reação (UGWU et al., 2017).

Os aspectos físicos, rendimentos das reações, pontos de fusão, valores experimentais de espectrometria de massa, rotações ópticas e a purezas por CLAE obtidos para os compostos **5a-d** e **6a-d** encontram-se descritas na tabela 4. A caracterização completa, espectros e cromatogramas dos compostos encontram-se no anexo A págs. 131-155.

Tabela 4. Dados gerais e de caracterização dos compostos derivados sulfonamídicos. (**5a-d** e **6a-d**).

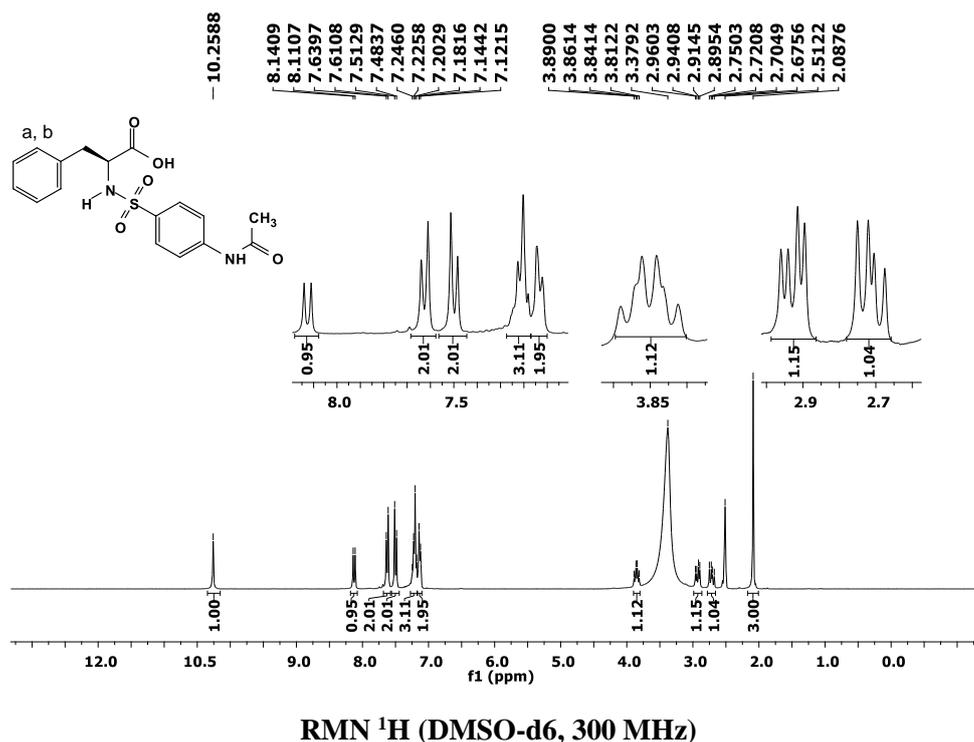
Compostos	Aspecto físico	Ponto de fusão (°C)	Rendimento (%)	Massas Experimental [M-H] ⁻ m/z	Rotações ópticas ([α] _{D²⁰})	Pureza (%)
5a	Sólido branco	100-102	65	304,0734	43,00	98
5b	Sólido branco	180-182	80	256,0750	28,00	98,5
5c	Sólido branco	139-140	75	270,0933	-19,00	97
5d	Sólido cinza	226-227	55	343,0929	-82,00	96
6a	Sólido branco	199-201	65	361,1008	3,00	96
6b	Sólido branco	114-116	82	313,0889	59,00	96,5
6c	Sólido branco	105-106	75	327,1037	22,00	96
6d	Sólido cinza	106-108	50	400,1203	-142,00	86

Os rendimentos obtidos para os compostos **5a**, **5d**, **6a** e **6d** foram menores, quando comparados aos outros compostos. Atribuímos o ocorrido à perda de produto no processo de purificação, visto que após a precipitação o produto apresentou características higroscópicas, dificultando o processo de filtração e lavagem. Acreditamos que isso tenha influenciado não somente no rendimento, mas também, na purificação do composto **6d** que atingiu apenas 86% de pureza (tabela 4).

Para todos os compostos derivados sulfonamídicos (**5a-5b** e **6a-6b**), os valores experimentais de espectrometria de massas apresentaram-se dentro de valores aceitáveis de desvios, previamente relatados. As análises de rotações ópticas apresentam 5 moléculas (**5a**, **5b**, **6a**, **6b** e **6c**) dextrógiras e 3 (**5c**, **5d** e **6d**) levógiras confirmando a presença de centro quiral nos compostos. Em relação a porcentagem de pureza por CLAE, mesmo o composto **6d** apresentando-se com 86%, não houve variação maior que 2° C nos valores de ponto de fusão (tabela 4).

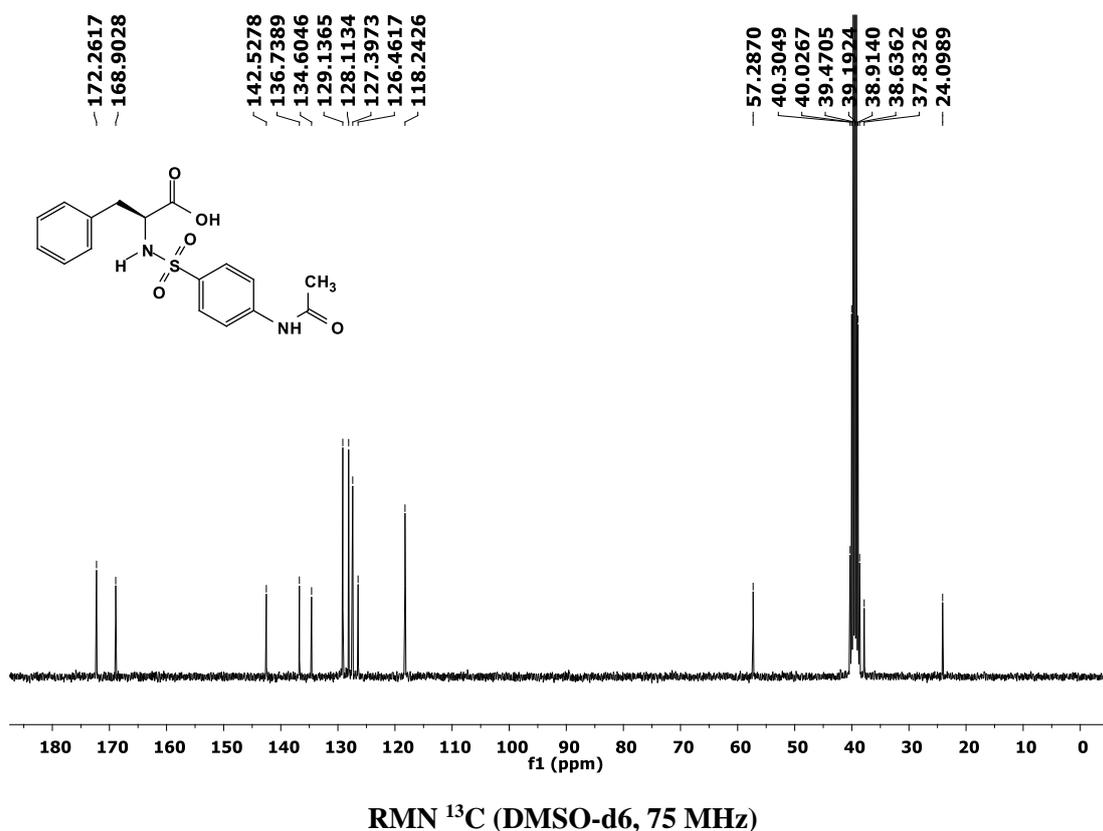
De modo a ilustrar o perfil dos sinais espectroscópicos característicos dos compostos formados, utilizamos como exemplo, os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e de infravermelho obtidos para o composto **6a** (figuras 29, 30 e 31 respectivamente).

Figura 29. Espectro de RMN ^1H (*S*)-Ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoico (**6a**).



No espectro de RMN ^1H do composto **6a** (Figura 29), são observados os sinais que evidenciam a formação do produto pelos deslocamentos do singlete em 10,25 ppm característico da amida do substituinte *p*-acetamida (C=O-NH), do duplete em 8,13 ppm referente ao hidrogênio do nitrogênio sulfonamídico (SO₂-NH) que possui constante de acoplamento $J = 9,0$ ppm, possivelmente pelo acoplamento com o hidrogênio do carbono quiral em 3,85 ppm (td, $J = 8,7, 6,2$ Hz). Enquanto que o carbono quiral também acopla com o CH_b do CH₂ da fenilalanina em 2,71 ppm (duplo dubelto, $J = 13,6, 8,8$ Hz). Apresentam também dois dupletos em 7,63 ppm ($J = 8,7$ ppm) e 7,50 ppm ($J = 8,8$ ppm), deslocamentos característicos dos hidrogênios do anel aromático *para*-substituído, além do singlete em 2,09 ppm referente aos hidrogênios da metila (C=O-CH₃) do substituinte *p*-acetamida.

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-Ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoico (**6a**).

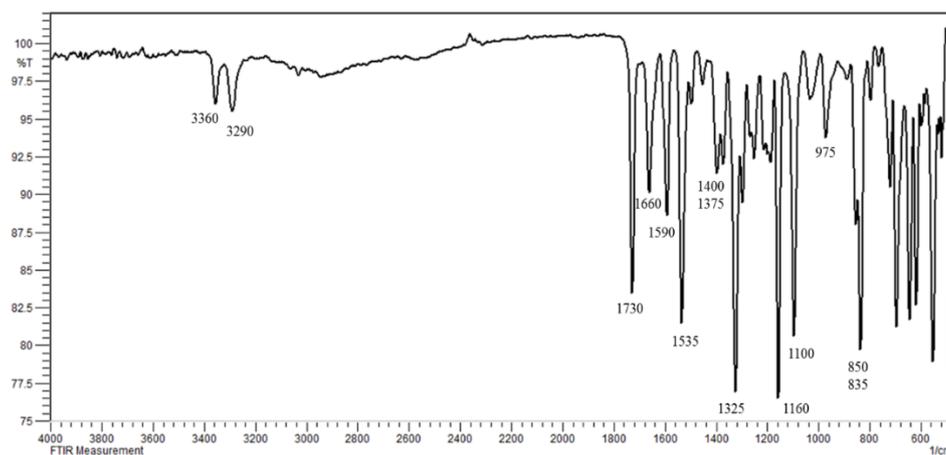


Na análise do espectro de RMN ^{13}C do composto **6a** (figura 30), pode-se observar os sinais da carbonila do ácido carboxílico em 172,26 ppm, o sinal da carbonila do

substituinte *p*-acetamida em 168,90 ppm, dois sinais em 142,53 ppm e 136,74 ppm que correspondem aos carbonos em *para* do anel aromático ligado a porção sulfonílica e a porção acetamídica, o sinal em 57,29 ppm correspondente ao carbono quiral ligada ao nitrogênio da sulfonamida e o sinal em 24,10 ppm ao carbono da metila do substituinte *p*-acetamida, sinal mais blindado.

Já no espectro de IV do composto **6a**, apresentado na figura 31, as bandas de deformação axial de N-H em 3290 cm^{-1} referente a sulfonamida. Além disso, pode ser observada uma banda em 3360 cm^{-1} referente a deformação axial e outra em 1660 cm^{-1} referente a deformação angular do N-H da amida do grupo substituinte *p*-acetamida. Também são evidenciadas bandas de estiramento assimétrico e simétrico do grupo SO_2 em 1325 e 1160 cm^{-1} , respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2006).

Figura 31. Espectro no IV do (*S*)-Ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoico (**6a**).



De forma geral, os compostos derivados sulfonamídicos não apresentaram dificuldades para serem isolados e foram obtidos em quantidades suficientes para realização de ensaios biológicos e, também, para dar continuidade a rota sintética estabelecida.

4.2 Ensaio Biológico

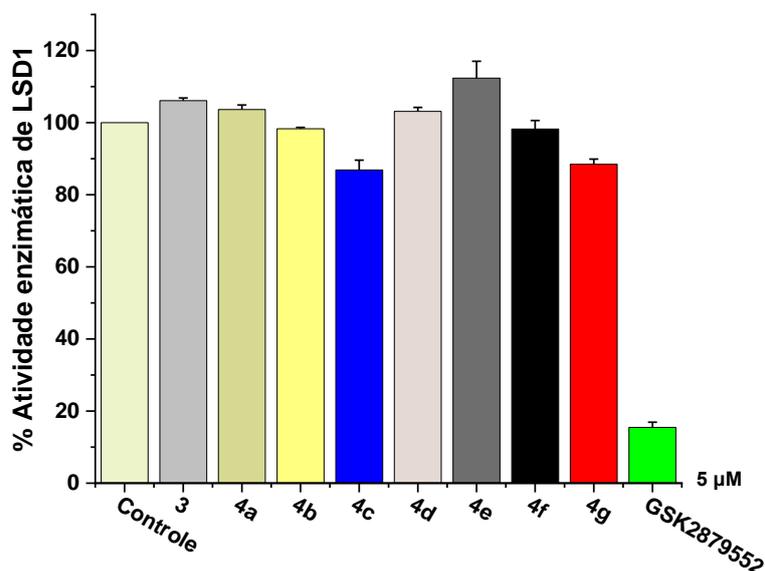
4.2.1 Ensaio enzimático

O ensaio enzimático usados para estudo com a enzima LSD1 está acoplado à Enzima *Horseradish* Peroxidase (EHP) e baseia se numa metodologia indireta de formação de H₂O₂ produzido durante a reação de desmetilação mediada por LSD1 (FORNERIS et al, 2005). Sendo assim, no modelo experimental de inibição enzimática que possua a presença de possíveis moléculas inibidoras, a quantidade de H₂O₂ liberada diminui, devido a diminuição da atividade da enzima, o que promove consequentemente a diminuição da oxidação do *Amplex red* em resorufina (composto fluorescente), permitindo a quantificação dessa atividade pelo fluorímetro (SCHMITT et al., 2014). O mecanismo detalhado do ensaio enzimático está descrito no sub-tópico 1.4.3.1.

Assim, o composto **3** (esqueleto principal) e os compostos finais planejados (**4a-4g**) foram submetidos aos ensaios enzimáticos frente à enzima LSD1. Realizou-se estes testes com o intuito de determinar a potência desta classe de compostos. Os demais compostos derivados sulfonamídicos (**5a-5d** e **6a-6d**) ainda estão sendo ensaiados.

Em um primeiro momento, como observado no gráfico da figura 32, os compostos foram testados em dose única, na concentração de 5 µM, dose esta utilizada como referência nos protocolos de inibição para a enzima LSD1. Como controle positivo foi usado o composto GSK2879552 (85% de inibição, barra verde figura 32), na mesma concentração. Os experimentos foram efetuados em duplicata e calculado o desvio padrão. Nesta concentração, a maioria dos compostos não apresentaram inibição significativa, visto que a atividade enzimática da LSD1 se mostra ≥ 100 %, com exceção dos compostos **4c** (barra azul) e **4g** (barra vermelha) que apresentaram inibição enzimática com valores de 9% e 11% respectivamente.

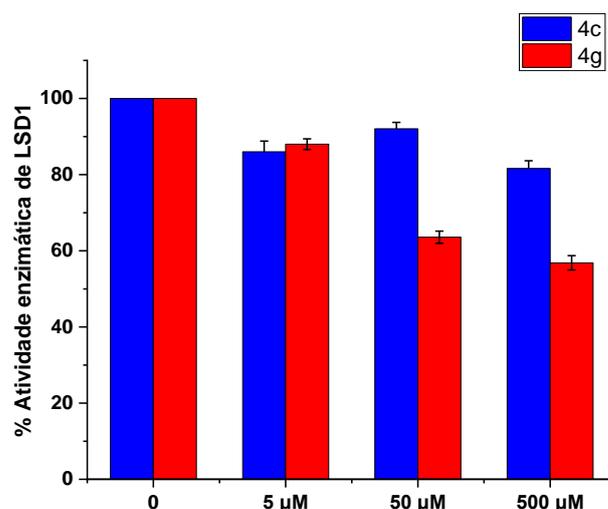
Figura 32. Gráfico do resultado de ensaio enzimático de dose única do composto **3** e compostos finais (**4a-4g**) frente à enzima LSD1 na concentração de 5 μ M.



Após os resultados preliminares, novos testes de inibição foram realizados para os compostos **4c** e **4g**, desta vez em concentrações de 50 μ M e 500 μ M. Assim como anteriormente, os experimentos foram realizados em duplicata, sendo calculado o desvio padrão. Os resultados obtidos são apresentados na figura 33 e como observado no gráfico, o composto **4c** (barra azul) em 50 μ M e 500 μ M não apresentou inibição da enzima LSD1 suficiente para ser considerada significativa e com atividade promissora. Contudo, o composto **4g** (barra vermelha) promoveu uma diminuição na atividade enzimática de 64% em 50 μ M e 57% em 500 μ M.

Uma vez que muitos eventos podem modular uma inibição enzimática e, também, influenciam significativamente na avaliação *in vitro* da atividade de compostos químicos, o aumento da concentração dos inibidores em 10x e a pouca variação em relação a atividade inibitória frente a LSD1 sugerem um possível mecanismo promíscuo de inibição. (VIVIANI et al., 2018; McGOVERN et al., 2003).

Figura 33. Gráfico do resultado de ensaio enzimático dos compostos **4c** e **4g** frente à enzima LSD1 na concentração de 5 μM , 50 μM e 500 μM .



Uma inibição enzimática é considerada “promíscua” quando não se dá exatamente pela interação do inibidor com a enzima, mas quando ocorre a formação de agregados moleculares, que são formados em soluções, com concentrações micromolares e submicromolares, inibindo ou ativando proteínas de forma não específica e reversível, principalmente por adsorção na superfície das enzimas (ALDRICH et al., 2017; IRWIN et al., 2015).

Este tipo de inibição pode ter sido responsável pelos valores obtidos no ensaio de inibição enzimática do composto **4g**. Possivelmente esse composto, atingiu a concentração de agregação crítica (CAC) que é específica para cada composto, sendo assim, alguns compostos podem agregar a 5 μM , enquanto outros a 50 μM . Portanto, nem todos os agregados se comportam da mesma maneira em relação ao mesmo alvo. Além disso, estudos que correlacionam os mesmos agregadores *versus* diferentes alvos, demonstram que as proteínas têm diferentes suscetibilidades à agregação. É importante ressaltar que a formação de agregados depende de múltiplos fatores experimentais, incluindo a estrutura dos compostos, as condições do ensaio e a suscetibilidade do alvo na presença de agregados (TOROSYAN, SCHOICHET, 2019; AULD et al., 2017).

Em 2003, McGovern e colaboradores descreveram 3 possíveis mecanismos de ação que podem explicar a inibição baseada em agregados. O primeiro propõe que a ligação ao agregado promove um evento de desdobramento parcial da enzima, por outro lado, a ligação ao mesmo pode ter o efeito oposto, pois em vez de aumentar a flexibilidade, pode

enrijecê-la, restringindo movimentos dinâmicos necessários para a catálise e finalmente o agregado bloqueia fisicamente o sítio ativo e sequestra a enzima do substrato (COAN et al., 2009; McGOVERN et al., 2003).

Neste contexto, a literatura destaca a importância do uso de procedimentos experimentais como, por exemplo, o uso de detergente não iônico (Triton X-100 e Tween-80), já que a inibição baseada em agregados pode ser rapidamente revertida pela adição do detergente, indicando a recuperação da atividade enzimática. Assim, esses experimentos podem ser explorados, com o objetivo de corroborar para o entendimento dos resultados de ensaio enzimático dos compostos planejados (VIVIANI et al., 2018; MALVEZZI et al., 2008). De forma geral, os compostos analisados não apresentaram inibição frente à LSD1, com exceção do composto **4g**. Contudo, novos estudos devem ser traçados para certificarmos se esses compostos são verdadeiramente inativos ou ativos contra a LSD1.

4.2.2 Ensaio de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pela biorredução do MTT ou sal de tetrazólio à formazan (um cristal de cor escura). Esse ensaio é um método colorimétrico que avalia o metabolismo celular, por meio da atividade da enzima succinato-desidrogenase, responsável pela conversão do sal, que está presente nas mitocôndrias. Esse cristal, insolúvel em meio aquoso e solúvel em DMSO, pode ser quantificado por espectrofotometria após lise celular induzida. Esta técnica baseia-se numa relação diretamente proporcional entre a quantidade de formazan produzida e a concentração de células viáveis no meio, visto que quanto maior a concentração de células viáveis, maior será a quantidade de redução do sal de tetrazólio e formação de formazan. Assim, foi possível quantificar a viabilidade celular expondo a linhagem celular escolhida em contato aos compostos planejados neste trabalho (SCHERLIEß, 2011; AZIZ, 2006; CARMICHAEL et al., 1987; PARK et al., 1987; MOSMANN, 1983).

Para este teste foi utilizada linhagem celular de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) do tipo HEL e avaliados 16 compostos (compostos **3**; **4a-4g**; **5a-5d** e **6a-6d**). As células de LMA são amplamente estudadas, visto o desenvolvimento de recidivas quimio-resistentes, o que torna este tipo de câncer de sangue com alta letalidade (CAIADO et al., 2019; FERRERA & SCHIFFERS, 2013).

Na tabela 5, apresentamos os resultados de concentração inibitória média (CI_{50}), intervalo de confiança 95% (IC 95%) e R^2 (coeficiente de determinação), obtidos com a análise dos 16 compostos, utilizando como controle positivo a doxorrubicina. A CI_{50} refere-se à concentração dos compostos necessária para reduzir o número de células viáveis em 50%, o resultado de IC 95% é o intervalo que possui o valor superior e inferior de CI_{50} calculado a partir de uma amostra e o R^2 indica o quanto o modelo foi capaz de explicar os dados coletados, nele o R^2 varia entre 0 e 1, assim quanto maior o R^2 mais explicativo é o modelo (TSUBONE et al., 2017; O'BRIEN et al., 2016, MONTGOMERY et al., 2006).

Tabela 5. Valores obtidos pelo ensaio de biorredução do MTT.

Compostos	CI_{50} [μ M] ^a	IC 95%	R^2
3	8,466	6,366 – 11,10	0,8899
4a	9,164	7,562 – 11,06	0,9390
4b	20,25	ND	0,2528
4c	7,800	5,576 – 10,66	0,8591
4d	7,827	5,065 – 11,71	0,7828
4e	6,960	4,702 – 9,919	0,8318
4f	9,274	6,890 – 12,21	0,8738
4g	13,58	10,13 – 18,34	0,8073
5a	8,704	5,971 – 12,43	0,8320
5b	15,87	7,932 – 47,43	0,5592
5c	10,38	6,077 – 18,63	0,6966
5d	5,302	3,830 – 7,213	0,8937
6a	6,615	4,431 – 9,608	0,8407
6b	10,02	6,328 – 17,09	0,7355
6c	11,33	8,861 – 14,38	0,8861
6d	8,143	5,946 – 11,00	0,8712
Doxorrubicina	0,3405	0,2891 – 0,40	0,9478

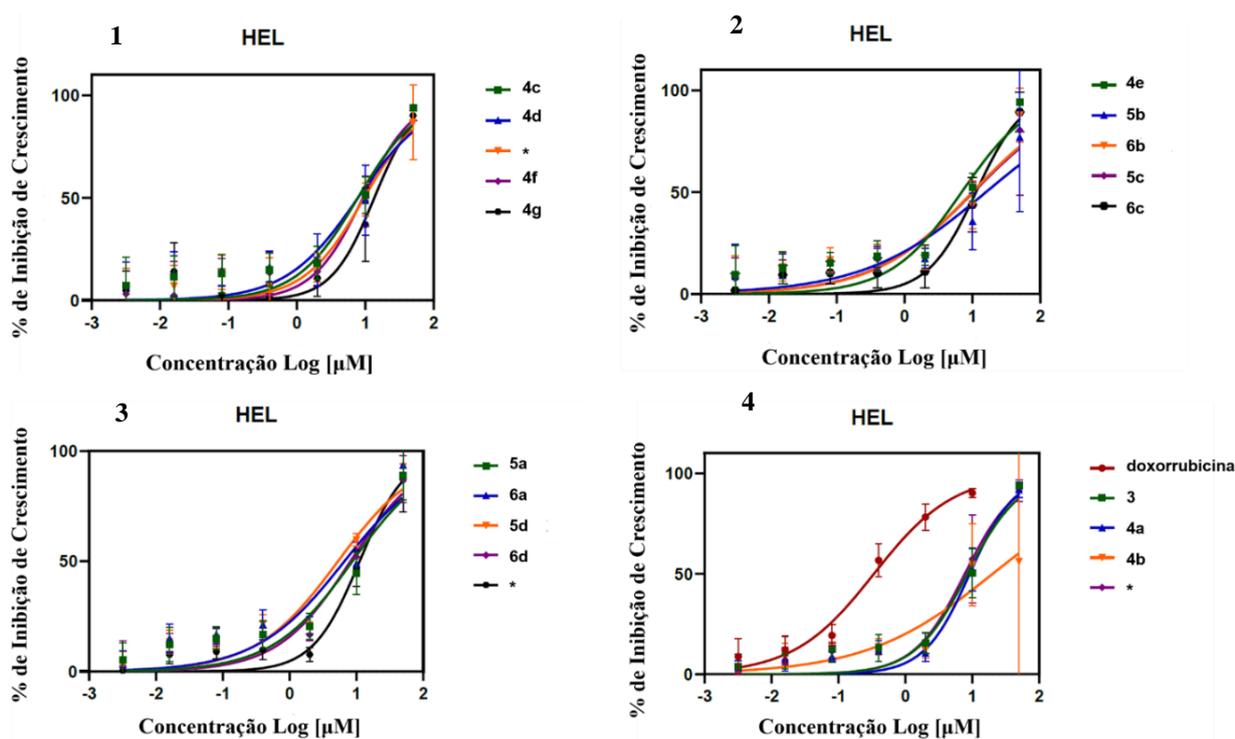
^a n=3 experimentos independentes, realizados em duplicata. ND= Não Determinado

De forma geral, os compostos apresentaram-se ativos frente a linhagem HEL com valores de CI_{50} muito próximos, tendo como exceção o composto **4b** cujo valor de CI_{50} de 20,25 μ M. Os compostos mais potentes foram os **4e**, **5d** e **6a** com valores de CI_{50} de 6,96 μ M, 5,30 μ M e 6,61 μ M, respectivamente, apresentando concentrações muito próximas, sugerindo potências muito semelhantes.

É importante ressaltar que os compostos avaliados apresentaram-se menos potentes em comparação ao fármaco referência, visto que apresentaram valores de CI_{50} maiores que

o fármaco doxorrubicina (0,34 μM) (Figura 34). No entanto, mesmo não apresentando valores próximos ao do composto referência é válido a continuidade dos estudos, visto as estruturas dos compostos **4a-4g** serem diferentes do composto referência e possivelmente, atuem por mecanismos de ação diferentes da doxorrubicina. Além de se saber, que mesmo bem utilizada na terapêutica, possui grande toxicidade, podendo causar principalmente cardiopatias e em alguns casos resistência aos tratamentos recidivos (RAZAVI-AZARKHIAVI et al., 2017). Assim, os resultados obtidos são de grande importância, porém os dados são preliminares e estudos mais aprofundados precisam ser realizados, assim como ensaios de toxicidade em células não-tumorais e também outras linhagens celulares tumorais e normais.

Figura 34. Gráficos obtidos com os resultados de bio-redução do MTT correlacionando a porcentagem de inibição de crescimento (%) *versus* concentração, em escala logarítmica [μM], dos 16 compostos testados.



* Compostos do grupo testados que não fizeram parte do planejamento.

Nos gráficos apresentados na figura 34, os compostos apresentam curvas de concentração de CI_{50} muito semelhantes (gráficos 1 e 3), onde as mesmas apresentam o mesmo acento, indicando que eles podem vir a apresentar o mesmo potencial de inibição do crescimento, sendo os compostos mais ativos o **4c** ($\text{CI}_{50} = 7,80 \mu\text{M}$) no gráfico 1 e o **5d**

(CI_{50} = 5,30 μ M) no gráfico 3. Já no gráfico 2, o composto mais ativo é o **4e** (CI_{50} = 6,96 μ M) e o com maior CI_{50} é o **5b** (15,87 μ M), sendo, portanto, menos ativo que os outros. Contudo, sua curva-dose resposta é muito similar as curvas dos compostos **5c** e **6b**, que apresentam CI_{50} muito próximas (10,38 e 10,02, respectivamente). Observa-se que tais curvas inibem muito pouco o crescimento das células a partir da terceira concentração testada (porcentagem de inibição próxima de zero). O gráfico 4, evidencia a maior potência da doxorubicina em comparação aos compostos **3** (CI_{50} = 8,46 μ M), **4a** (CI_{50} = 9,16 μ M) e **4b** (CI_{50} = 20,25 μ M) visivelmente menos ativo.

Numa sugestão preliminar da avaliação estrutural dos compostos, comparando os dados obtidos de CI_{50} , observamos que 4 dos 8 compostos derivados sulfonamídicos (**5a-5d** e **6a-6d**) que tem sua estrutura oriundas dos aminoácidos hidrofóbicos alifáticos como: a valina e a leucina, independentemente da variação de cloreto de sulfonila, apresentaram diminuição da atividade ($CI_{50} > 10 \mu$ M) quando comparados aos aminoácidos hidrofóbicos aromáticos (**5a, 5d, 6a** e **6d**). Esses compostos são os **5b** (CI_{50} = 15,87 μ M), **5c** (CI_{50} = 10,38 μ M), **6b** (CI_{50} = 10,02 μ M) e **6c** (CI_{50} = 11,33 μ M).

Em relação as variações do cloreto de sulfonila, a presença ou não do grupo *p*-acetamida para os análogos **5a** e **6a**, **5b** e **6b** e **5c** e **6c**, não promoveu diferença de citotoxicidade, pois os valores de CI_{50} se encontram dentro do intervalo de confiança entre os pares, sugerindo que possam ter potências semelhantes (Tabela 5). Diferentemente dos compostos **5d** e **6d**, que apresentam CI_{50} de 5,3 μ M e 8,14 μ M respectivamente, porém os valores da margem de confiança do composto **5d** (IC 95 = 3,83-7,21) não abrange o valor de CI_{50} do composto **6d** (IC 95 = 5,94-11,00), e assim é válido para a análise contrária. Portanto, possivelmente a presença do grupo *p*-acetamida promoveu o aumento dessa citotoxicidade.

De toda forma, os resultados comprovam uma robustez quanto a atividade celular da classe de composta estudada, visto que apesar das alterações estruturais realizadas sobre o esqueleto das moléculas, a atividade manteve-se semelhante, o que torna uma possível classe promissora de antineoplásicos.

Novos testes serão realizados no intuito de obtermos o entendimento sobre a potência desta classe de compostos frente as linhagens leucêmicas, haja visto os valores interessantes de CI_{50} encontrados, o que podem trazer a possibilidade de mais opções para clínica no tratamento das leucemias.

4.3 Estudos *in silico*

4.3.1. Ancoramento molecular (*Docking*)

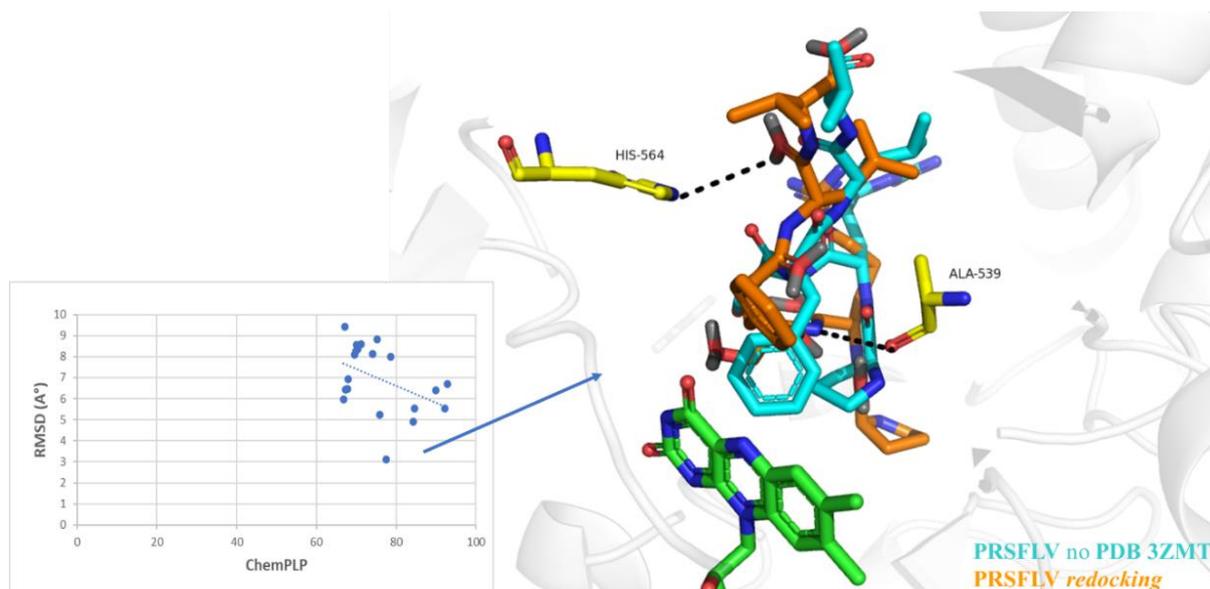
Buscando entender a complementariedade estrutural entre os ligantes e LSD1, o que pode nos fornecer subsídio teórico para o entendimento do mecanismo de inibição enzimática deste alvo, foi feito um estudo de ancoramento molecular utilizando a estrutura cristalográfica da enzima (pdb: 3ZMT) e as estruturas dos ligantes (protótipo ZINC0961148410 e **4g**). O reconhecimento dos principais resíduos de interação molecular e orientações dos ligantes ativos no sítio ativo da enzima, devem nos nortear o entendimento do mecanismo de inibição enzimática da enzima LSD1, e com isso sugerir os motivos que levaram a inibição enzimática com composto **4g**.

O protocolo de *docking* foi estabelecido pelo *redocking* do peptídeo PRSFLV na enzima LSD1, pdb: 3ZMT (Figura 35). Para isso durante o *redocking* foram testadas todas as funções de escore presentes no programa GOLD (ASP, ChemPLP, GoldScore, ChemScore) e variou-se o átomo centroide e o tamanho do raio do sítio de interação, nos permitindo obter poses do ligante fidedignas em relação a pose do cristal. Assim, O protocolo foi estabelecido visto a melhor relação, entre os valores de função de ranqueamento ChemPLP, RMSD e a análise visual (sub-tópico 3.2.5.1 -Quadro 4); carbono aromático da Phe538 (CZ- Phe538) como centro do sítio e raio de 14 Å a partir do centroide. O FAD foi mantido durante o processo, pois é o cofator essencial para o mecanismo catalítico da LSD1. O critério da análise visual permite pontuar cada pose, conforme sua sobreposição em relação ao peptídeo PRSFLV co-cristalizado, considerando a maior pontuação aquela que apresenta sobreposição total ao peptídeo em questão e a menor pontuação aquela em que o ligante encontra-se em uma cavidade não esperada.

Após o *redocking*, foram escolhidas 20 melhores poses as quais selecionou-se a que apresentou concomitantemente o maior valor de função de ranqueamento ChemPLP (77,505), menor RMSD (3,0 Å) e a maior pontuação frente a análise visual feita pela sobreposição do peptídeo PRSFLV na estrutura cristalografada da LSD1- 3ZMT. Nesta análise não observamos a total sobreposição da pose escolhida, porém ela ocupa as mesmas cavidades do peptídeo PRSFLV e evidenciamos as interações com os resíduos His564 e ALA539 que são descritos como importantes para atividade enzimática como observado na Figura 35 (TORTORICI et al. 2013). Também levando-se em consideração a

flexibilidade do peptídeo PRSFLV podemos considerar o método validado, visto que segundo Kurcinski e colaboradores (2015) em análise de *docking* com 5 a 15 aminoácidos o $\text{RMSD} \leq 3,0 \text{ \AA}$ é considerado com predição de alta qualidade (KURCINSKI et al., 2015).

Figura 35. Resultado da validação de ancoramento por *redocking* do peptídeo PRSFLV (laranja) sobreposto ao peptídeo na estrutura cristalografada da enzima LSD1- 3ZMT (azul) (à direita) e gráfico relacionando os valores da função de ranqueamento ChemPLP *versus* valores de RMSD das 20 melhores poses (à esquerda).



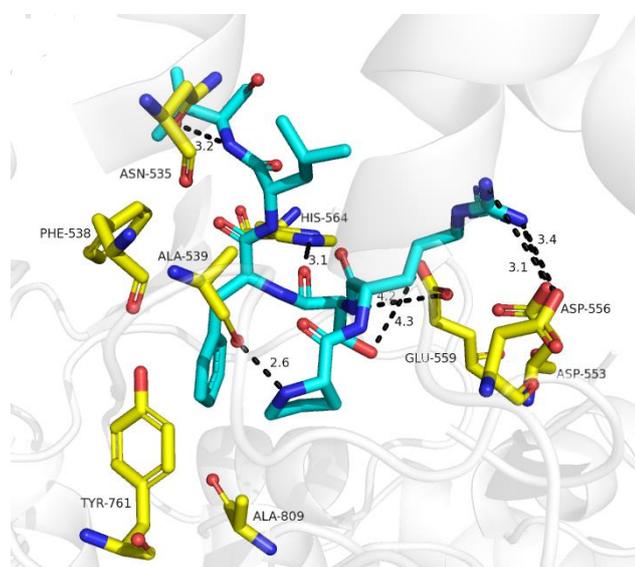
A função de ranqueamento selecionada (ChemPLP) é padrão no programa Gold versão 5.1. Esta função usa dados de ligação de hidrogênio do ChemScore e múltiplas potências lineares para o modelo de Van der Waals. Possui rápida performance para cálculos (4x mais rápido que a função GoldScore) e em testes de validação mostrou-se ser, geralmente, mais eficaz do que outras funções de pontuação, tanto para previsão de poses quanto para a triagem virtual (CCDC, 2020).

Após a validação da metodologia, foi realizado o *docking* em triplicata dos compostos **4g** e protótipo ZINC0961148410. Ambos apresentaram valores de funções ChemPLP similares como podemos observar na tabela 6.

Tabela 6. Resultados obtidos das funções de escore ChemPLP.

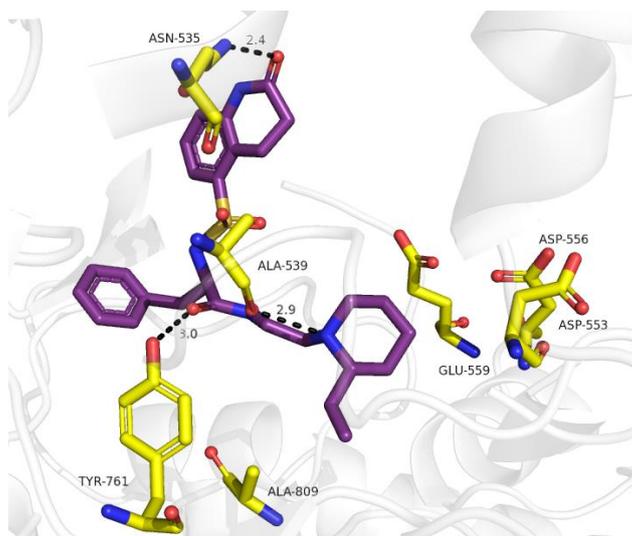
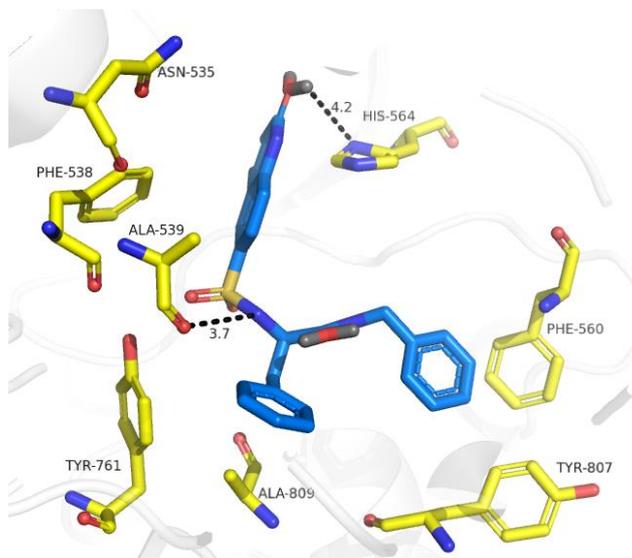
Docking em LSD1	Função de score ChemPLP (triplicata)			
	#1	#2	#3	Média
Protótipo- ZINC0961148410	71,68	72,93	72,92	72,51
4g	73,36	72,82	70,29	72,15

As interações comuns encontradas entre o peptídeo PRSFLV co-cristalizados (Figura 36), o protótipo ZINC0961148410 (figura 37-A) e o composto **4g** (figura 37-B) são interações hidrofóbicas (FAD, PHE-538, ALA809), ligações de hidrogênio com o resíduo ALA539 (aceptor de ligação de H) e nitrogênios básicos das moléculas, assim como ligações de hidrogênio entre a HIS564 (aceptor de hidrogênio) e hidroxilas e carbonilas das estruturas. Já quando comparamos o protótipo ao composto **4g**, observamos apenas a interação com o resíduo ALA539 (aceptor de ligação de H). Este resíduo é descrito como de grande importância na inibição da LSD1, assim sugerimos que o composto **4g** possa atuar da mesma maneira na inibição (TORTORICI et al. 2013). Contudo, não é observada a interação do composto **4g** com os resíduos TYR761 e ASN535 (doadores de ligação H) por meio de ligação de hidrogênio, presentes na interação do protótipo ZINC09611484, o que pode possivelmente ter acarretado a diminuição de sua atividade na inibição da LSD1 (Figura 37).

Figura 36. Interações presentes na estrutura cristalografada do Peptídeo PRSFLV (PDB:3ZMT).

Também observamos que os resíduos GLU559, ASP553 e ASP556 que interagem com o peptídeo PRSFLV (Figura 36), não possuem interação com o protótipo (Figura 37-A) e nem com o composto **4g** (Figura 37-B). Esse resultado nos dá indícios de que essas interações eletrostáticas, entre o grupo de aminas positivamente carregadas e os resíduos negativamente no sítio ativo da enzima, devem ser melhor exploradas visando a obtenção de inibidores. Essa observação é permissiva, visto que essas interações não se mostraram cruciais para a inibição da LSD1, pois os compostos que não as apresentaram não tiveram perda total de inibição enzimática, porém as interação com esses resíduos pode levar a um aumento na potência (FU et al., 2017).

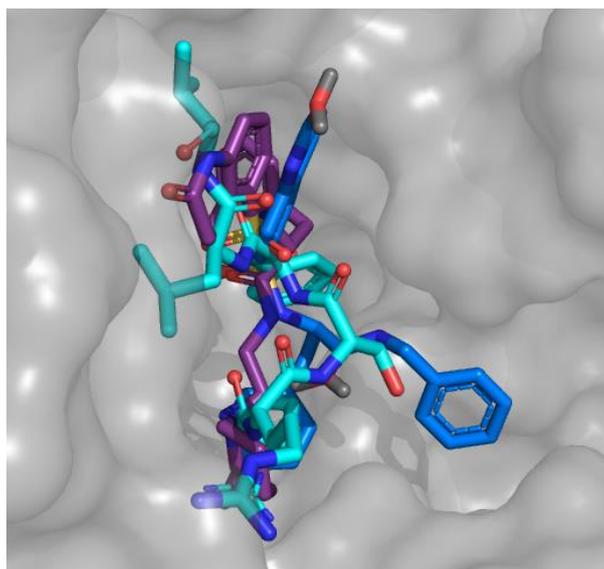
Figura 37. Resultados da simulação de *Docking*. A. Interações observados do protótipo ZINC0961148410 com a LSD1. B. Interações observadas do composto **4g** com a LSD1.

A**B**

Para o análogo derivado benzilamínico (**4g**) o resultado do *docking* (figura 37-B), sugere que os grupos sulfonamídicos e amídicos ocupam a mesma região da enzima quando comparado ao protótipo ZINC0961148410. As interações observadas para o composto **4g** em relação a LSD1 foram com His564 (aceptor de ligação de hidrogênio), ALA539 (aceptor de ligação de H) e com os resíduos PHE560, TYR807 e ALA809 no bolso hidrofóbico.

Ao sobrepor o peptídeo PRSFLV co-cristalizado, o protótipo ZINC09611484 e o composto **4g** na cavidade da LSD1 (figura 38), pode ser observada a ocupação do bolso hidrofóbico do sítio ativo da enzima pelo grupo benzila da porção benzilamida do composto **4g** (interações com resíduos PHE560, TYR807- Figura 37-B). É notável que esse bolso não é ocupado pelo grupo aromático do peptídeo PRSFLV e do protótipo ZINC09611484 (Figuras 36 e 37-A). Esse resultado sugere que a ocupação desta região deve proporcionar o bloqueio na entrada da cavidade do sítio ativo da enzima, dificultando a entrada do substrato e, portanto, diminuindo a atividade da enzima. Estes dados nos motivam a continuar buscando novos *hits* baseados na estrutura desses compostos, visto que poucos compostos com mecanismo reversíveis chegaram aos testes clínicos.

Figura 38. Sobreposição do peptídeo PRSFLV (verde turquesa), protótipo ZINC09611484 (roxo) e o composto **4g** (azul) na cavidade da LSD1.



5. CONCLUSÃO

Para a presente tese, o planejamento e síntese das moléculas foi realizado com a finalidade de obtenção de compostos derivados carboxamídicos (**4a-4g**) e compostos derivados sulfonamídicos (**5a-5d** e **6a-6d**), no intuito de avaliar suas atividades inibitórias frente a enzima LSD1 e viabilidade celular em linhagens HEL de leucemia mieloide aguda (LMA). Estudos de ancoramento molecular (*docking*) também foram simulados para avaliarmos as importantes interações e complementaridade do protótipo ZINC09611484, obtido preliminarmente por triagem virtual, e do composto **4g** com o sítio de interação da LSD1.

Primeiramente, as metodologias de sínteses aplicadas apresentaram-se adequadas e eficazes. Dos 7 compostos finais planejados (**4a-4g**), 6 são compostos inéditos os quais foram completamente caracterização por RMN ¹H, RMN ¹³C, ponto de fusão, infravermelho, valores experimentais de espectrometria de massas, rotação óptica e definição da pureza por CLAE. A maioria dos compostos se apresentou com pureza de ~95%, ou seja, em condições adequadas para a realização dos ensaios biológicos, com exceção dos compostos **4a** e **4c** que apresentou 83% e 85% de pureza respectivamente e seu método de purificação precisará ser reavaliado. Os rendimentos reacionais variaram de 25% a 57%, valores compatíveis com os dados da literatura para a reação de acoplamento com EDC.HCl.

Quanto à série dos derivados sulfonamídicos (**5a-5d** e **6a-6d**), foram obtidos 9 compostos com pureza maior que 95%, com exceção do composto **6d** que obteve 86% e precisa ter sua purificação aprimorada. Apresentaram metodologia sintética adequadas e eficazes com rendimentos entre 50-82%. Os compostos foram totalmente caracterizados por técnicas já citadas anteriormente e juntamente com os compostos finais planejados (**4a-4g**) foram enviados aos ensaios biológicos de inibição enzimática de LSD1 e ensaio de viabilidade celular na linhagem HEL.

Os ensaios enzimáticos realizados com os compostos **4a-4g** indicaram que apenas o composto **4g** teve capacidade de inibir a LSD1 em 64% e 57% em 50 µM e 500 µM respectivamente. O aumento da concentração em 10x e a pouca variação em relação a atividade enzimática da LSD1, sugerem possível mecanismos promíscuos de inibição, que podem influenciar significativamente nos resultados de ensaios inibição enzimática. Assim novos testes devem ser realizados para esclarecer possíveis resultados.

No ensaio de viabilidade celular na linhagem HEL os 16 compostos (**4a- 4g**, **5a-5d** e **6a-6d**) sintetizados apresentaram-se ativos com valores de CI_{50} muito próximos, tendo como exceção o composto **4b** cujo valor de CI_{50} de 20,25 μ M. Os compostos mais potentes foram os **4e** (CI_{50} =6,9 μ M), **5d** (CI_{50} =5,30 μ M) e **6a** (CI_{50} =6,61 μ M), sugerindo potências muito semelhante em linhagens leucêmicas.

Os resultados obtidos com a simulação do *docking* para o análogo derivado benzilamínico (**4g**) e para protótipo ZINC0961148410, sugeriu que os grupos sulfonamídicos e amídicos se posicionam na mesma região da enzima para ambos. Porém, o composto **4g** mostra um menor número de interações que o protótipo ZINC09611484. As interações observadas para o composto **4g** em relação a LSD1 foram com HIS564 (acceptor de hidrogênio), ALA539 (acceptor de hidrogênio) e com os resíduos PHE560, TYR807 e ALA809 no bolso hidrofóbico. Possivelmente as interações nesse bolso hidrofóbico podem ter gerado um bloqueio na entrada da cavidade da enzima, dificultando o acesso do substrato, acarretando na diminuição da atividade enzimática.

De posse de todas as informações obtidas, estes dados nos motivam a continuar a pesquisa desses compostos, tanto na busca de novos *hits* baseados na estrutura do composto **4g**, como aprofundar os estudos com os 16 compostos na realização de ensaios mais específicos em células leucêmicas resistentes e células sanguíneas normais, com intuito de desvendar o mecanismo de ação e possíveis alvos. Além de tudo, apresentamos compostos inéditos com CI_{50} interessantes, o que possibilita a pesquisa de mais opções para o tratamento das leucemias.

6. RERERÊNCIA

ABBA, M.L.; PATIL, N.; LEUPOLD, J.H.; MONIUSZKO M.; UTIKAL J.; NIKLINSKI J.; ALLGAYER H. MicroRNAs a novel targets and tools in cancer therapy. *Cancer Letters*. v. 387, p. 84-94, 2017.

ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY. *What is cancer*. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 01 Out. 2020.

ALDRICH, C.; BERTOZZI, C.; GEORG, GI; KIESSLING, L.; LINDSLEY, C.; LIOTTA, D.; MERZ, KM; SCHEPARTZ, A.; WANG, S. The Ecstasy and Agony of Assay Interference Compounds. *J. Med. Chem.* v. 3, 3, p. 143–147, 2017.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Farmacopéia Brasileira*. (2010). 5ª ed. Brasília-DF, Brasil. v.1, p. 82-83, Determinação do ponto ou intervalo de fusão; p. 99-102, Espectrofotometria no ultravioleta, visível e infravermelho.

ARISTIZABAL, MARIA J., ANREITER, INA., HALLDORSDDOTTIR, THORHILDUR., ODGERS, CANDICE L., MCDADE, THOMAS W., GOLDENBERG, ANNA, MOSTAFAVI, SARA., KOBOR, MICHAEL S., BINDER, ELISABETH B., SOKOLOWSKI, MARLA B., O'DONNELL, KIERAN J. Biological embedding of experience: A primer on epigenetics. *PNAS*. v. 17 (38), p. 23261-23269, 2019

ARMAREGO, W. L. F. CHAI, C. L. L. *Purification of laboratory chemicals*. (2009). 6º ed. Elsevier, Amsterdam, 743p.

AZAVI-AZARKHIAVI K, JAAFARI MR, ABNOUS K, RAZAVI BM, JAFARIAN AH, HASSANI FV, SHIRANI K, KARIMI G. The Cardiotoxic Mechanism of Doxorubicin (DOX) and Pegylated Liposomal DOX in Mice Bearing C-26 Colon Carcinoma: a Study Focused on microRNA Role for Toxicity Assessment of New Formulations. *Pharm Res*. v.34(9), p.1849-1856, 2017

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed, 3ed. p.243, 2015.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed, 2ed. p.243, 2008.

BHAT, M. A.; ANUPA, G.; GHOSH, D. Transgenerational epigenetic inheritance: Where do we stand today? *Journal of Reproductive Health and Medicine*. v.1 p. 47-49, 2015.

BISWAS S, RAO CM. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. v. 837:8–24, 2018

BISWAS, S.; RAO, C. M. Epigenetics in câncer: Fundamentals and Beyond, Pharmacology and Therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*. v. 173, p.118-134, 2017.

BITETTI, A., MALLORY, A.C., GOLINI, E. et al. MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior. *Nat Struct Mol Biol.* v.25, p. 244–251, 2018.

BLAIR LP, AVARITT NL, HUANG R, COLE PA, TAVERNA SD, TACKETT AJ. An assay for quantitative measurement of lysine demethylase activity. *Epigenetics.*v.6, p.490–499, 2011.

CAIADO, F., MAIA-SILVA, D., JARDIM, C. et al. Lineage tracing of acute myeloid leukemia reveals the impact of hypomethylating agents on chemoresistance selection. *Nat Commun.*v. 10, 4986, 2019.

CHATURVEDI P; TYAGI S.C. Epigenetic mechanisms underlying cardiac degeneration and regeneration. *International Journal of Cardiology.* v. 173, n° 1, p. 01-11, 2014.

CHEN, Y.; JIE, W.; YAN, W.; ZHOU, K.; XIAO, Y. Lysine-specific histone demethylase 1: A potential molecular target for tumor therapy. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic gene expression.* v. 22, p.53-59, (2012).

CHEN, Y.; YANG, Y.; WANG, F.; WAN, K.; YAMANE, K.; ZHANG, Y.; LEI, M. Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *PNAS.* v. 103, p. 13956-13961, 2006.

CHENG, Y., HE, C., WANG, M. ET AL. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Sig Transduct Target Ther.* v.4, p. 62, 2019.

CHROVIAN C.C., RECH J.C., BHATTACHARYA A., LETAVIC M.A. P2X7 Antagonists as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of CNS Disorders. *Progress in Medicinal Chemistry.* v.53, p. 65–100, 2014.

CLAYDEN, J. GREEVESS, N.; WARREN, S. nucleophilic substitution at C=O with loss of carbonyl oxygen In: CLAYDEN, J. GREEVESS, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry.* (2012b). 2^a ed. Oxford University Press Inc, New York, USA. cap. 11, p. 230-232.

CLAYDEN, J. GREEVESS, N.; WARREN, S. nucleophilic substitution at C=O with loss of carbonyl oxygen In: CLAYDEN, J. GREEVESS, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry.* (2012b). 2^a ed. Oxford University Press Inc, New York, USA. cap. 11, p. 230-232.

CLAYDEN, J. GREEVESS, N.; WARREN, S. Nucleophilic substitution at the carbonyl group In: CLAYDEN, J. GREEVESS, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry.* (2012c). 2^a ed. Oxford University Press Inc, New York, USA. cap. 10, p. 197-204.

DAI XJ, LIU Y, XIONG XP, XUE LP, ZHENG YC, LIU HM. Tranylcypromine Based Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor: Summary and Perspective. *J Med Chem.* v.10;63(23), p. 14197-14215, 2020.

DATASUS. Estatísticas vitais. Disponível em <<https://datasus.saude.gov.br/>>2017. Acesso em: 01 Out. 2020.

DE OLIVEIRA, J. C. Epigenética e doenças humanas. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina,* v. 33, p. 21-34. 2012.

DE SOUSA, A.C.C., COMBRINCK, J.M., MAEPA, K. *et al.* Virtual screening as a tool to discover new β -haematin inhibitors with activity against malaria parasites. *Sci Rep.* v. 10, p.3374, 2020.

DEY C. AND KÜNDIG E. P. Synthesis of 1,3-Dimethyl-3-(p-tolyl)-1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2(3H)-one by Cu(II)-Mediated Direct Oxidative Coupling. *Organic Syntheses.* v. 91, p. 221-232. 2014.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. *Science.* v.287, p.1960-1964, 2000.
Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* (2009) 27:351–7. doi: 10.1055/s-0029-1237423

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics,* v. 8, p. 286-298, 2007.

FANG Y, LIAO G, YU B. Targeting histone lysine demethylase LSD1/KDM1A as a new avenue for cancer therapy. *Curr Top Med Chem.* v. 19:889e91, 2019.

FDA - *FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Novel Drug Approvals for 2017.*
Disponível em:
<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm537040.htm>. Acesso em: 10 nov. 2020.

FARES, J., FARES, M.Y., KHACHFE, H.H. *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther.* v.5, p. 28, 2020.

FERRARA, F. & SCHIFFER, C. A. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet (Lond., Engl.).* v.381, p. 484–495, 2013.

FERRARO, A. Altered primary chromatin structures and their implications in cancer development. *Cell Oncology.* v. 39, p. 195-210, 2016.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. *Química Nova.*v.34, p. 1770-1778, 2011.

FLAVAHAN W. A; GASKELL E.; BERNSTEIN B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of câncer. *Sciense.* v.357, eaal 2380, 2017.

FORNERIS F, BINDA C, ANTONIETTA VANONI M, BATTAGLIOLI E, MATTEVI A. Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *The Journal of Biological Chemistry.*v. 280, p. 41360–41365, 2005.

FOUAD Y. A.; AANEI C. Revisiting the hallmarks of câncer. *American Journal of cancer research.* v. 7, nº 5, p. 1016-1036, 2017.

FRADERA, X. & BABAOGU, K. Overview of methods and strategies for conducting virtual small molecule screening. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* v.9, p.196–212, 2017.

FU X.; ZHANG P.; YU B. Advances toward LSD1 inhibitors for cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry*. v. 9, n° 11, p. 1227-1242, 2017.

GALMES, A.; GUTIÉRREZ, A.; SAMPOL, A.; et al. Long-term hematologic reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethylsulfoxide at -80 oC in a mechanical freezer. *The Hematology Journal*, v. 92, n. 7, p. 986-989, 2007.

GANESAN, A., ARIMONDO, P.B., ROTS, M.G. et al. The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. *Clin Epigenet*. v. 11, p. 174, 2019.

GAWANDI, V.; FITZPATRICK., P. The synthesis of deuterium-labeled spermine, N-acetylspermine and N-acetylspermidine. *Journal Labelled Comp Radiopharm*. v.50, p. 666-670, 2007.

GILLES V., VIEIRA M., LACERDA V., V. R. CASTRO E., SANTOS R., ORESTES E., CARNEIRO J. AND GRECO S.J. A New, Simple and Efficient Method of Steglich Esterification of Juglone with Long-Chain Fatty Acids: Synthesis of a New Class of Non-Polymeric Wax Deposition Inhibitors for Crude Oil. *J. Braz. Chem. Soc.*v. 26, No. 1, p. 74-83, 2015.

GOWDA B. T.; FORO S.; NIRMALA P.G.; FUESS H. N-(2,4- Dichlorophenyl)benzenesulfonamide. *Acta Crystallographica Section*. E66, p.229, 2009.

GUIDO, R. V. C; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Modern drug Discovery Technologies: Opportunities and challenges in lead discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. São Carlos – SP, Brasil. v. 14, n. 10, p. 830-839, 2011.

GUIDO, R. V. C; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *SciELO*. V.24, n° 70, p. 81-94, 2010.

HAACK, M. S. Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do Sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025. Porto Alegre, 2010. Disponível em :< <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/Handle/10183/28602/000771298.pdf>>. Acesso: 6 Out. 2020.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF9. *J. Comp. Chem*. p 490-519, 1996.

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

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*. v.100, p. 57–70, 2000.

HAYARPI TOROSYAN AND BRIAN K. SHOICHET. Protein Stability Effects in Aggregate-Based Enzyme Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 62 (21), 9593-9599, 2019.

HAYWARD D. AND COLE P. A. LSD1 Histone Demethylase Assays and Inhibition. *Methods Enzymol.* v.573, p. 261–278, 2016.

HOFFMANN I.; ROATSCH M.; SCHMITT M. L, LUCA CARLINO L.; PIPPEL M.; SIPPL W.; JUNG M. The role of histone demethylases in cancer therapy. *SciVerse ScienceDirect*. v.6, p. 683-703, 2012.

HØJFELDT, J. W.; AGGER, K.; HELIN, K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 12, p. 917–930, 2013.

HOLLIDAY, R. A new theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer*.v.40, p. 513-522, 1979.

HOSSEINI A., MINUCCI S. A comprehensive review of lysine-specific demethylase 1 and its roles in cancer. *Epigenomics*. v.9(8), p.1123-1142, 2017.

HUANG J, SENGUPTA R, ESPEJO AB, LEE MG, DORSEY JA, RICHTER M, OPRAVIL S, SHIEKHATTAR R, BEDFORD MT, JENUWEIN T, BERGER SL. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature*. v. 449, p. 105–108, 2007.

HUGHES, J. P.; REES, S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* v.162, p.1239–1249, 2011.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Câncer*. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 09 Out. 2020.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Câncer*. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 26 julho. 2020.

INTERFARMA. Câncer gera custo anual de R\$ 68,2 milhões. Disponível em: <<http://www.interfarma.org.br/>>. Acesso em: 01 Out. 2020.

IRWIN, JJ; DUAN, D.; TOROSYAN, H.; DOAK, AK; ZIEBART, KT; STERLING, T.; TUMANIAN, G.; SHOICHET, BK. Um consultor de agregação para Ligand Discovery. *J. Med. Chem.* v. 58, 7076–7087, 2015.

JORK, H. et al. *Thin-Layer Chromatography*. Reagents and Detections Methods. (1994). VCH, Weinheim, Alemanha. v. 1, 497p. Physical and chemical detection methods, v. 1a, v. 1b.

KAHL P, GULLOTTI L, HEUKAMP LC, WOLF S, FRIEDRICHS N, VORREUTHER R, SOLLEDER G, BASTIAN PJ, ELLINGER J, METZGER E, SCHULE R, BUETTNER R. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res*.v.66, p. 11341-11347, 2006.

KANCHARLA, P.; DODEAN, R. A.; LI, Y.; POU, S. et. al. Lead Optimization of Second-Generation Acridones as Broad-Spectrum Antimalarials. *J. Med. Chem.* v. 2-98, 2020.

KARAKAIDOS P.; VERIGOS J.; MAGKLARA A. LSD1/KDM1A, a Gate-Keeper of Cancer Stemness and a Promising Therapeutic Target. *Cancers (Basel)*. v. 11(12), p.1821, 2019.

KHAN, F. et al. Modern methods & web resources in drug design & discovery. *Letters in Drug Design & Discovery*. v. 8, n. 5, p. 469-490, 2011.

KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J.R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*. v.3, p. 935–949, 2004.

KOKURA, K.; SUN, L.; FANG, J. In vitro histone demethylase assays. *Methods in molecular biology*. v.1288, p. 109-122, 2015.

KOUZARIDES T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*. v. 131, p. 822, 2007.

KRISTIN E. D. COAN, DAVID A. MALTBY, ALMA L. BURLINGAME, AND BRIAN K. SHOICHET. Promiscuous Aggregate-Based Inhibitors Promote Enzyme Unfolding. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 52 (7), 2067-2075, 2009.

LAFRANCE D.; BOWLES P.; LEEMAN K.; RAFKA R. Mild Decarboxylative Activation of Malonic Acid Derivatives by 1,1-Carbonyldiimidazole. *Org. Lett.* v. 13, p. 2322-2325, 2011.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 6th Edition, chapter 3, 2008.

LIAN SX, SHAO YB, LIU HB, HE JY, LU WQ, ZHANG Y, JIANG Y, ZHU. Lysine-specific demethylase 1 promotes tumorigenesis and predicts prognosis in gallbladder cancer. *Journal Oncotarget*. v.6, n° 32, p.33065-76, 2015.

LODI, C. T. C.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C.; LIMA, M. I. M.; MELO, V. H. Metilação genética, neoplasia intraepitelial cervical e cancer do colo uterino. *FEMINA*. v.40, p. 287-293, 2012.

LU, W.; ZHANG, R.; JIANG, H.; ZHANG, H.; LUO, C. Computer-Aided Drug Design Epigenetics. *Front. Chem.*, v. 6, 57, 1-23, 2018.

LU, W.; ZHANG, R.; JIANG, H.; ZHANG, H.; LUO, C. Computer-Aided Drug Design in Epigenetics. *Front. Chem.* v. 6, 57, p.1-23, 2018.

MALVEZZI, A.; DE REZENDE, L.; IZIDORO, M.A.; CEZARI, M.H.S.; JULIANO, L.; AMARAL, A.T.D. Uncovering false positives on a virtual screening search for cruzain inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* v. 18, 350–354, 2008.

MARABELLIC., MARROCCO B., PILOTTO S. A Tail-Based Mechanism Drives Nucleosome Demethylation by the LSD2/NPAC Multimeric Complex. *Cell reports*. v.27, Issue 2, P. 387-399.e7, 2019.

MARVINSKETCH (version 17.28), 2017, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com/download/marvin-suite/#mbeans>).

MATEUSZ KURCINSK M.; JAMROZ M.; BLASZCZYK M.; KOLINSKI A.; KMIECIK S. CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Nucleic Acids Research*. v. 43, p. 419-424, 2015.

MCGOVERN, SL; HELFAND, BT; FENG, B.; SHOICHET, BK. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J. Med. Chem*. v. 46, 4265–4272, 2013.

McMURRY, J. *Química Orgânica*. (2011) 7^a ed. Cengage Learning. São Paulo, Brasil. V.1 e 2. Cap 11, p. 336-349; cap.19, p.656-659; cap. 24, p. 855-898.

METZGER E, WISSMANN M, YIN N, MULLER JM, SCHNEIDER R, PETERS AH, GUNTHER T, BUETTNER R, SCHULE R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*. v. 437, p. 436–439, 2005.

MOITESSIER, N. et al. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*. Québec, Canadá. v. 153, S7-S26, 2008.

MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A & VINING, G. G. Introduction to linear regression analysis, 3rd ed, Wiley-Interscience, 2006.

MOSMANN, T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of immunological methods*. Pag. 65, 55, 1983.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Novas estratégias são traçadas para o atendimento oncológico. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/08/novas-estrategias-sao-tracadas-para-atendimento-oncologico>>. Acesso em: 05 Out. 2020.

NEISES, G. B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int.v.17*, p.522-524, 1978.

O'BRIEN SF, YI QL. How do I interpret a confidence interval? *Transfusion*. v.56(7):1680-3, 2016.

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. P. S. Metilação de DNA e Câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*.v. 56, p. 493-499, 2010.

PAIVA, M. C., espectroscopia de IV. 2006. Disponível em http://www.dep.uminho.pt/mcpaiva/pdf/IP_UCI_I/0607f01.pdf> Acesso: 05. Out. 2020.

PARK, JW, HAN, J. Targeting epigenetics for cancer therapy. *Arco. Pharm. Res*.v. 42, p. 159-170, 2019.

PATRICK, G. L. Computers in Medicinal Chemistry. In: PATRICK, G. L. *An introduction to Medicinal Chemistry*. 4^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2009b. c. 17, p. 332-376.

PERRI, F. LONGO F.;GIULIANO M.; SABBATINO F.; FAVIA G.; IONNA F.; ADDEO R.; DELLA VITTORIA SCARPATI G.; DI LORENZO G., PISCONTI S. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v. 111, p. 166-172, 2017.

PETERS, J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature Reviews Genetics*, v. 15, p. 517-530, 2014.

PETTERSEN EF, GODDARD TD, HUANG CC, COUCH GS, GREENBLATT DM, MENG EC, FERRIN TE. UCSF chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*.v. 25, n°13, p.1605-12, 2004.

PICOLI, TONY; BARBOSA, JÉSSICA SEVILHA; VARGAS, GILBERTO D'ÁVILA; HÜBNER, SILVIA DE OLIVEIRA; FISCHER, GEFERSON. Toxicidade e eficiência do Dimetilsulfóxido (DMSO) no congelamento de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK). *Science and Animal Health*. v.3, n.2, 2015.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. v.20(18), p. 4331, 2020.

PISANIC II, T. R; ATHAMANOLAP, P.; WANG, T. Defining, distinguishing and detecting the contribution of heterogeneous methylation to cancer heterogeneity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. v.64, p.5-17, 2017.

POLLOCK, J. A., LARREA, M. D., JASPER, J. S., MCDONNELL, D. P., MCCAFFERTY, D. G. Lysine-specific histone demethylase 1 inhibitors control breast cancer proliferation in ER α -dependent and -independent manners. *American Cancer Society Chemistry. Biology*. v.7, p. 1221–1231, 2012.

PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; ESCOTT, K. J.; HOPPER, S.; WELLS, A.; DOIG, A.; GUILLIAMS, T.; LATIMER, J.; MCNAMEE, C.; NORRIS, A.; SANSEAU, P.; CAVALLA, D.; PIRMOHAMED, M. Drug Repurposing: Progress, Challenges and Recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. v. 18(1), p. 41-58, 2019.

PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schödinger, LLC.

QUAGLIANO, A., GOPALAKRISHNAPILLAI, A., & BARWE, S. P. Understanding the Mechanisms by Which Epigenetic Modifiers Avert Therapy Resistance in cancer. 2020

R. PAUL AND G. W. ANDERSON. "N,N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent". *Journal of the American Chemical Society*.v. 82, n°17, p.4596–4600, 1960.

RAVASIO R, CECCACCI, E., NICOSIA, L., HOSSEINI A., et al. Targeting the scaffolding role of LSD1 (KDM1A) poises acute myeloid leukemia cells for retinoic acid–induced differentiation. *Sci. Adv*. v. 6: eaax2746, 2020.

RELTON, C.L., DAVEY SMITH, G. Epigenetic Epidemiology of Common Complex Disease: Prospects for Prediction, Prevention, and Treatment. *PLoS Med.* v.7, nº 10, 2010.

RESVERLOGIX CORP. Epigenetics. Disponível em <<https://www.resverlogix.com/science-and-programs/epigenetics>>2020. Acesso em: 01 Out. 2020.

ROSNER, K.; KASPRZAK, M.F.; HORENSTEIN, A.C.J.; THURSTON, H.L.; ABRAMS, J.; KERWIN, L.Y.; MEHREGAN, D.A.; MEHREGAN, D.R. Engineering a waste management enzyme to overcome cancer resistance to apoptosis: adding DNase1 to the anti-cancer toolbox. *Cancer Gene Therapy.* v.18, p.346-357, 2011.

RYAN, A. J.; GRAY, N. M.; LOWE, P. N.; CHUNG, C. W. Effect of detergent on “promiscuous” inhibitors J. Med. Chem. p. 3448, 3451, 2003.

SAITO S., KIKUCHI, J., KOYAMA, D., SATO, S., et al. *Clin Cancer Res.* v.1;25(5), p.1601-1611, 2019

SAMS-DODD, F. Research & market strategy: how choice of drug discovery approach can affect market position. *Drug Discovery Today.* v. 12, n. 7-8, p. 314-318, abr. 2007.

SCAPIN, G.; POTTER, C. S.; CARRAGHER, B. Cryo-EM for small molecules discovery, design, understanding, and application. *Cell Chem. Biol.* v. 25, p.1318-1325, 2018.

SCHMITT ML, LADWEIN KI, CARLINO L, SCHULZ-FINCKE J, WILLMANN D, METZGER E. Heterogeneous antibody-based activity assay for lysine specific demethylase I (LSD1) on a histone peptide substrate. *Journal of Biomolecular Screening.* v.19, p. 973–978, 2014.

SCHRÖDER J.; HENKE A.; WENZEL H.; BRANDSTETTER H.; Stammer H. G.; STAMMLER Anja, PFEIFFER W. D.; Schesche, H. Structure-Based Design and Synthesis of Potent Matrix Metalloproteinase Inhibitors Derived from a 6H-1,3,4-Thiadiazine Scaffold. *Journal Medicinal Chemistry.* v.44, p.3231-3243, 2001.

SHARMA, R. K. et al. Synthesis and structure-activity-relationship studies of thiazolidinediones as antiplasmodial inhibitors of the Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2. *European Journal of Medicinal Chemistry.* v. 90, p. 507-518, 2015.
SHARMA, S.; KELLY, T.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* v. 31, nº 1, p. 27-36, 2010.

SHI, Y. Histone Lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nature Reviews Genetics.* v. 8, p.829-833, 2007.

SILVERSTEIN, R.M. BASSLER, G.C. MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. (2006), John Wiley e Sons, Inc.299p.

SMITH, J. S.; ROITBERG, A. E.; ISAYEVI, O. Transforming computational drug discovery with machine learning and AI. *ACS Med. Chem. Lett.* v, 9 (11), 1065–1069, 2018.

SOLDI R, GHOSH HALDER T, WESTON A, THODE T, DRENNER K, LEWIS R, et al. The novel reversible LSD1 inhibitor SP-2577 promotes anti-tumor immunity in SWI/SNF complex mutated ovarian cancer. *PLoS ONE*. v.15(7), e235705, 2020.

SORNA V, THEISEN ER, STEPHENS B, WARNER SL, BEARSS DJ, VANKAYALAPATI H, SHARMA S. High-throughput virtual screening identifies novel *N*-(1-phenylethylidene)-benzohydrazides as potent, specific, and reversible LSD1 inhibitors. *Journal Medicinal Chemistry*.v.56, p. 9496–9508, 2013.

SPARTAN 14, v.112 (2013) Wavefunction, Inc., Irvine. (downloads.wavefun.com/Spartan14Manual.pdf).

SPERANZINI V, ROTILI D, CIOSSANI G., PILOTTO S.; MARROCCO B.; FORGIONE F., MEHDIPOUR P., VELANKAR S., MAI A., MATTEV A. Polymyxins and quinazolines are LSD1/KDM1A inhibitors with unusual structural features. *Sci. Adv.*v.2, n° 9, e1601017, 2016.

SUSUMU, K.; OH, E.; DELEHANTY, J.B.; BLANCO-CANOSA, J.B, JOHNSON, B.J, JAIN, V.; HERVEY, W.J. 4TH. ALGAR, W.R, BOENEMAN, K., DAWSON, P.E., MEDINTZ, I.L. Multifunctional compact zwitterionic ligands for preparing robust biocompatible semiconductor quantum dots and gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* v.133, p. 9480-9496. 2011.

SYBYL X 2.1, *Tripes International*, St. Louis, MO, 2012.

TANG, Y.; ZHU, W.; CHEN, K.; JIANG, H. New technologies in computer-aided drug design: Toward taret identification and new chemical entity discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*. v. 3, p. 307-313, 2006.

TERAMOTO S.; TANAKA M.; SHIMIZU H., FUJIOKA T.; TABUSA F.; IMAIZUMI, T.; YOSHIDA K.; FUJIKI H.; MORI, T.; SUMIDA T.; TOMINAGA, M. Novel Selective Hindlimb Vasodilators: Synthesis and Biological Activity of 1-Acyl-4-aminopiperidine Derivatives. *Journal Medicinal Chemistry*. v.46, p. 3033-3044, 2003.

THE CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAFIC DATA CENTRE (CCDC). GOLD User Guide: Introduction. Cambridge, 2017.

THEISEN ER, PISHAS KI, SAUND RS, LESSNICK SL. Therapeutic opportunities in Ewing sarcoma: EWS-FLI inhibition via LSD1 targeting. *Oncotarget*. v.7(14), p.17616-17630, 2016.

TO, L. & EDITOR, T. H. E. Structural insight into substrate recognition by histone. v. 23, p. 306–309, 2013.

TORTORICI M, BORRELLO MT, TARDUGNO M, CHIARELLI LR, PILOTTO S, CIOSSANI G, VELLORE NA, BAILEY SG, COWAN J, O'CONNELL M, CRABB SJ,PACKHAM G, MAI A, BARON R, GANESAN A, MATTEVI A. Protein recognition by short peptide reversible inhibitors of the chromatin-modifying LSD1/CoREST lysine demethylase. *ACS Chem Biol*. v.8, p.1677–1682, 2013.

TSUBONE, T.M., MARTINS, W.K., PAVANI, C. *et al.* Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. *Sci Rep.* v. 7, 6734, 2017.

TU WJ, MCCUAIG RD, TAN AHY, HARDY K, SEDDIKI N, ALI S, DAHLSTROM JE, BEAN EG, DUNN J, FORWOOD J, TSIMBALYUK S, SMITH K, YIP D, MALIK L, PRASANNA T, MILBURN P AND RAO S. Targeting Nuclear LSD1 to Reprogram Cancer Cells and Reinvigorate Exhausted T Cells via a Novel LSD1-EOMES Switch. *Front. Immunol.* v.11, p.1228, 2020.

UGWU D. I.; U.C. U.C.; UKOHA P.O; OKAFOR S.; IBEZIM A.; KUMAR N. M. Synthesis, characterization, molecular docking and in vitro antimalarial properties of new carboxamides bearing sulphonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry.* v.135, p. 349e369, 2017.

UGWU, D.I., OKORO A, U.C., P.O. UKOHA A, S. OKAFOR B, A. IBEZIM B, N.M. KUMAR. Synthesis, characterization, molecular docking and in vitro antimalarial properties of new carboxamides bearing sulphonamide. *European Journal of Medicinal Chemistry.* v.135, p. 349e369, 2017.

USHA, T.; SHANMUGARAJAN, D.; GOYAL, A. K.; KUMAR, C. S. MIDDHA. S. K. Recent Updates on Computer-aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. *Curr. Top. Med. Chem.* v. 17, p. 1-12, 2017.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R.D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, v.52, p. 609-623, 2003.

VIVIANI, L.G.; PICCIRILLO, E.; CHEFFER, A.; DE REZENDE, L.; ULRICH, H.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.T.-D. Be Aware of Aggregators in the Search for Potential Human *ecto-5'*-Nucleotidase Inhibitors. *Molecules.* v. 23, 1876, 2018.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: *The practice of medicinal chemistry.* San Diego: Academic Press, 3ed., 2008. p. 382-721-746.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Câncer.* Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 09 Out. 2020.

XI, I., XU, S., WU, L., MA, T., et al. Design, synthesis and biological activity of 3-oxoamino-benzenesulfonamides as selective and reversible LSD1 inhibitors. *Bioorganic Chemistry.* v. 72, p. 182-189, 2017.

XIE, L., DUAN Y., LING-HUI LU, L., YONG-JIAN LI, Y., SHA PENG S., CHAO WU, C., LIU K, WANG Z, AND HE, W. Fast, Base-Free and Aqueous Synthesis of Quinolin-2(1H)-ones under Ambient Conditions. *ACS Sustainable Chem. Eng.* v. 5, p. 10407-10412, 2017.

YANG, M.; CULHANE, J., C.; SZEWCZUK, L. M.; JALILI, P., BALL, H. L.; MACHIUS, M.; COLE, P.A.; YU, H. Structural Basis for the Inhibition of the LSD1 Histone Demethylase by the Antidepressant trans -2-Phenylcyclopropylamine. *Biochemistry.* v.46, p.8058-8065, 2007.

YE, X-W.; ZHENG, Y-C. et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin-1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potent LSD1 inhibitors. *Med. Chem. Commun.* v. 5, p. 650-654, 2014.

YUAN FANG, CHAO YANG, ZHIQIANG YU, XIAOCHUAN LI, QINGCHUN MU, GUOCHAO LIAO, BIN YU. Natural products as LSD1 inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020.

YUAN FANG, GUOCHAO LIAO & BIN YU. LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects. *Journal of Hematology & Oncology*. V.12, number: 129, 2019.

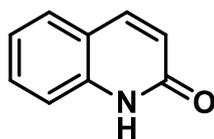
ZHANG, LI, GENAY PILAROWSKI G., PICH E. M., NAKATANI A., et al. Inhibition of KDM1A activity restores adult neurogenesis and improves hippocampal memory in a mouse model of Kabuki syndrome. *bioRxiv*. version posted March 11, 2020.

ZHENG, Y.C.; MA, J.; WANG, Z.; LI. J.; JIANG, B.; ZHOU, W.; SHI, X.; WANG, X.; ZHO, W; LIU, H.M. A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors. *Medicinal Research Reviews*.v.35, p 1032-1071, 2015.

ZHENG, Y.C.; MA, J.; WANG, Z.; LI. J.; JIANG, B.; ZHOU, W.; SHI, X.; WANG, X.; ZHO, W; LIU, H.M. A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors. *Medicinal Research Reviews*.v.35, p 1032-1071, 2015.

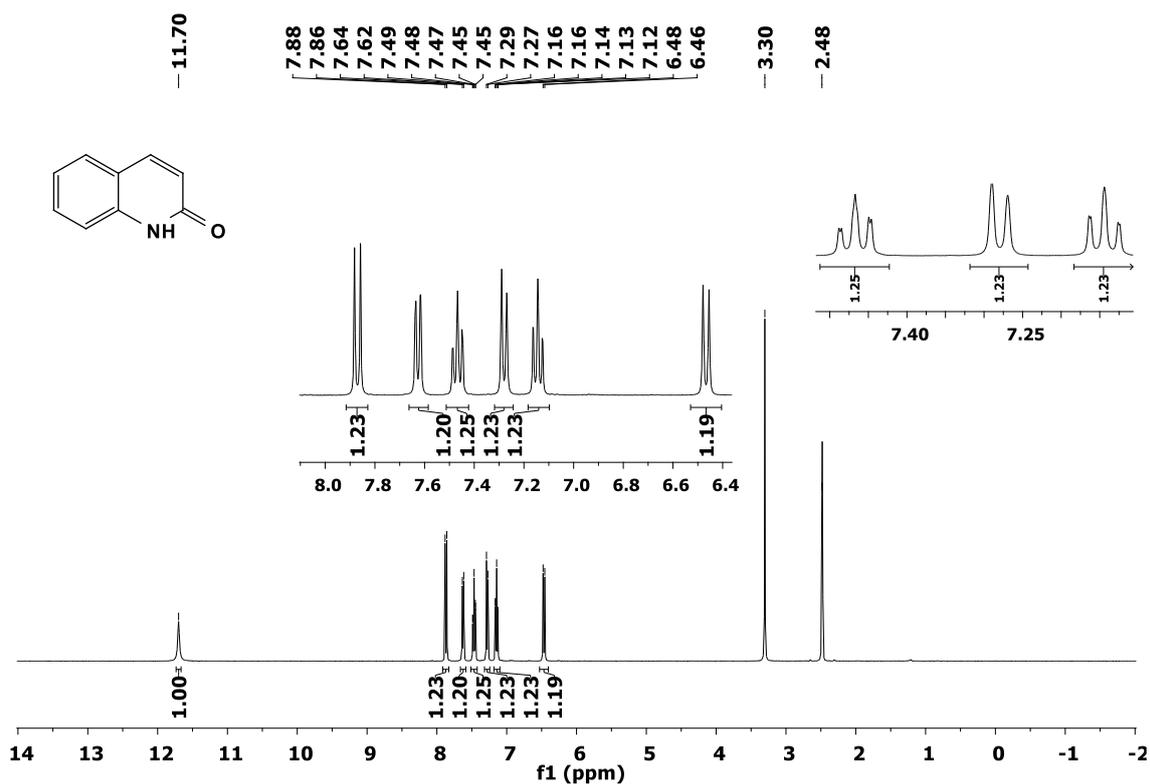
Anexo A

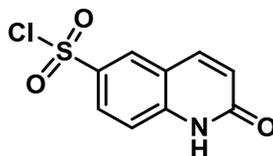
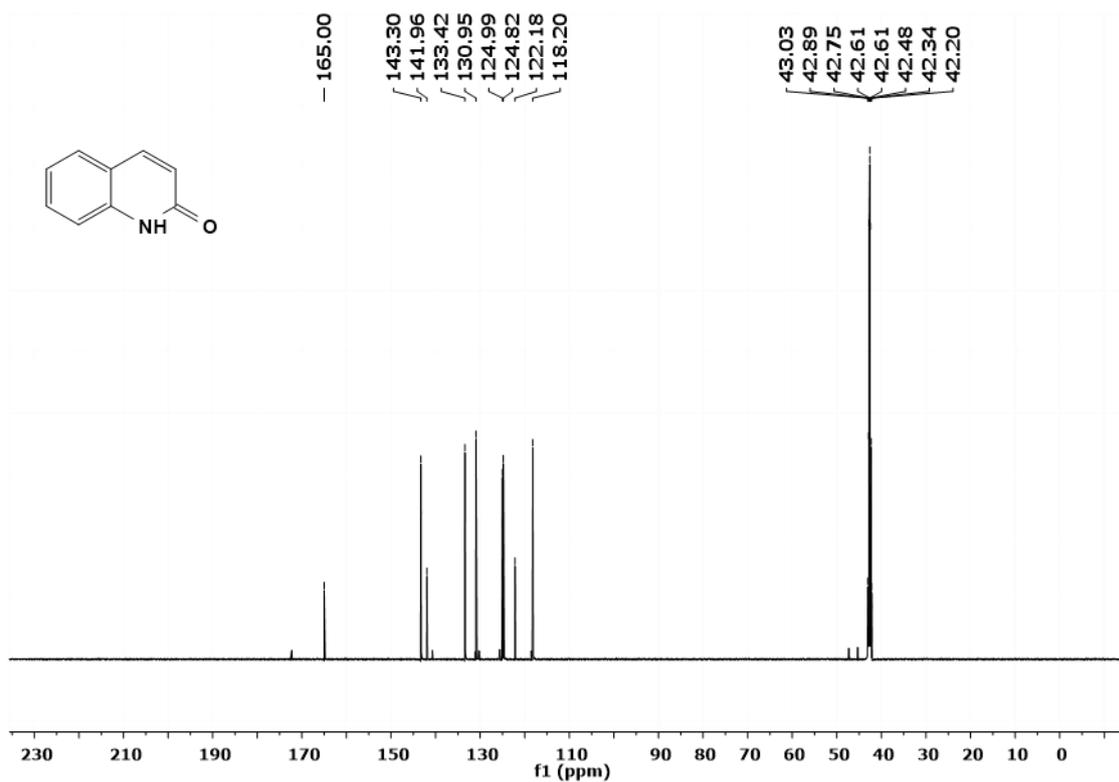
Descrição, Espectros e Cromatogramas



1

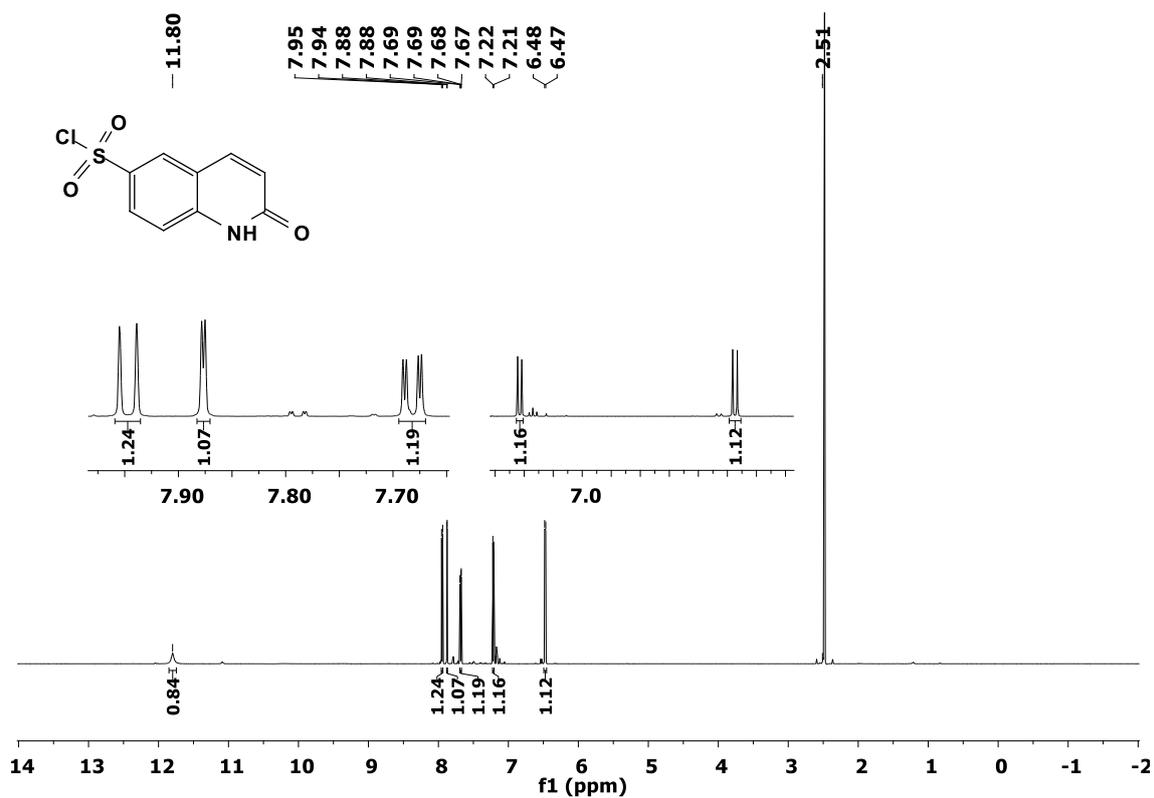
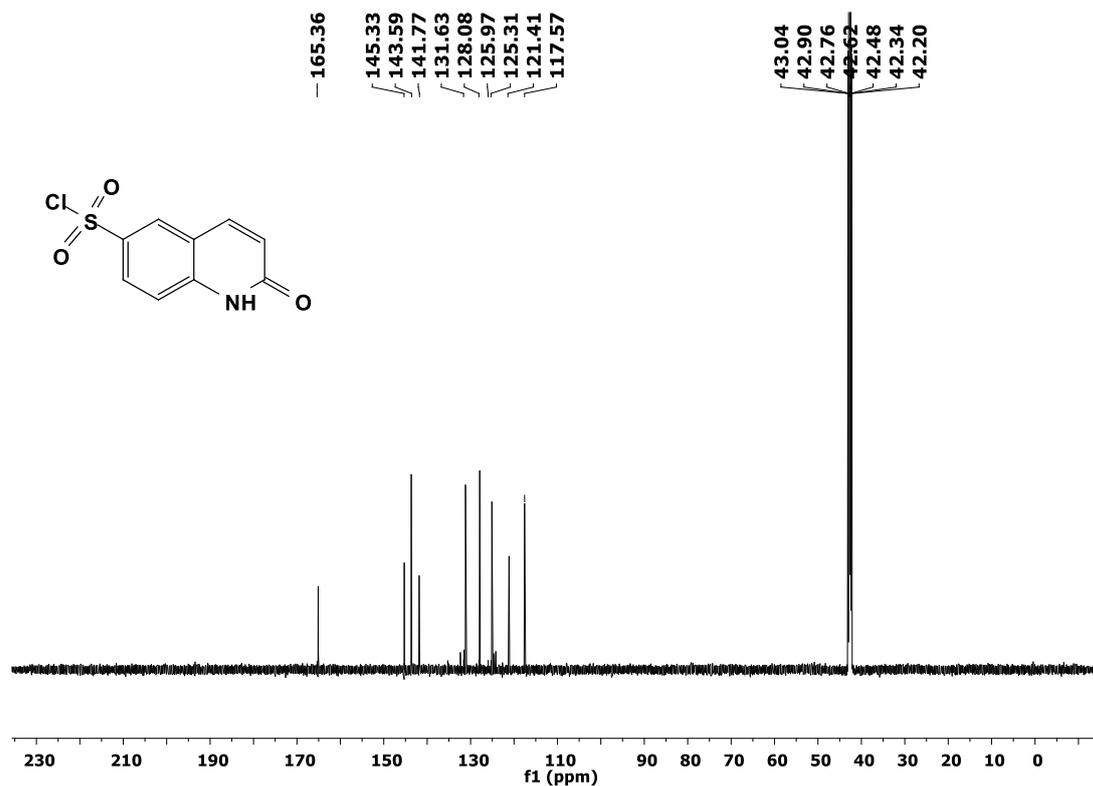
2-(1H)-Quinolinona (1): RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,70 (s, 1H- C=ONH), 7,87 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H- CH_β), 7,63 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H-ArH), 7,52 – 7,40 (m, 1H-ArH), 7,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H-ArH), 7,19 – 7,08 (m, 1H-Ar-H), 6,47 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H- CH_α). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 165,00, 143,30, 141,96, 133,42, 130,95, 124,99, 124,82, 122,18, 118,20. Faixa de fusão = 196-197 °C. Sólido branco. Rendimento= 88%.

Espectro de RMN ^1H do 2-(1H)-quinolinona (1)

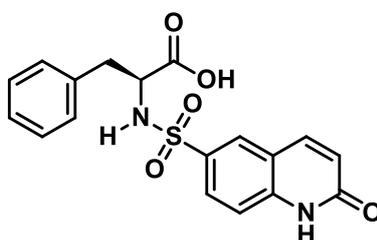
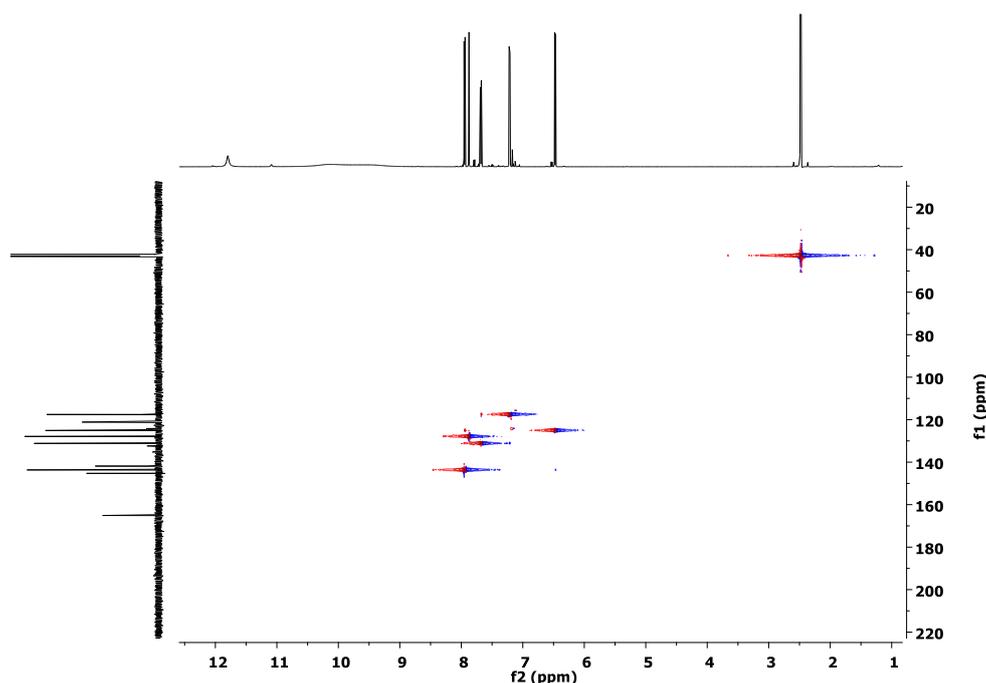
Espectro de RMN ^{13}C do 2-(1H)-quinolinona (1)

2

Cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2): RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11,80 (s, 1H, s, 1H, C=ONH), 7,95 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, CH_β), 7,88 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, ArH), 7,69-7,67 (dd, $J = 8,5, 1,9$ Hz, 1H, ArH), 7,21 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, ArH), 6,47 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, CH_α). RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ 165,36, 145,29, 143,59, 141,77, 131,63, 128,08, 125,31, 121,15, 117,57. Sólido marrom claro. Rendimento:80%

Espectro de RMN ^1H do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)Espectro de RMN ^{13}C do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)

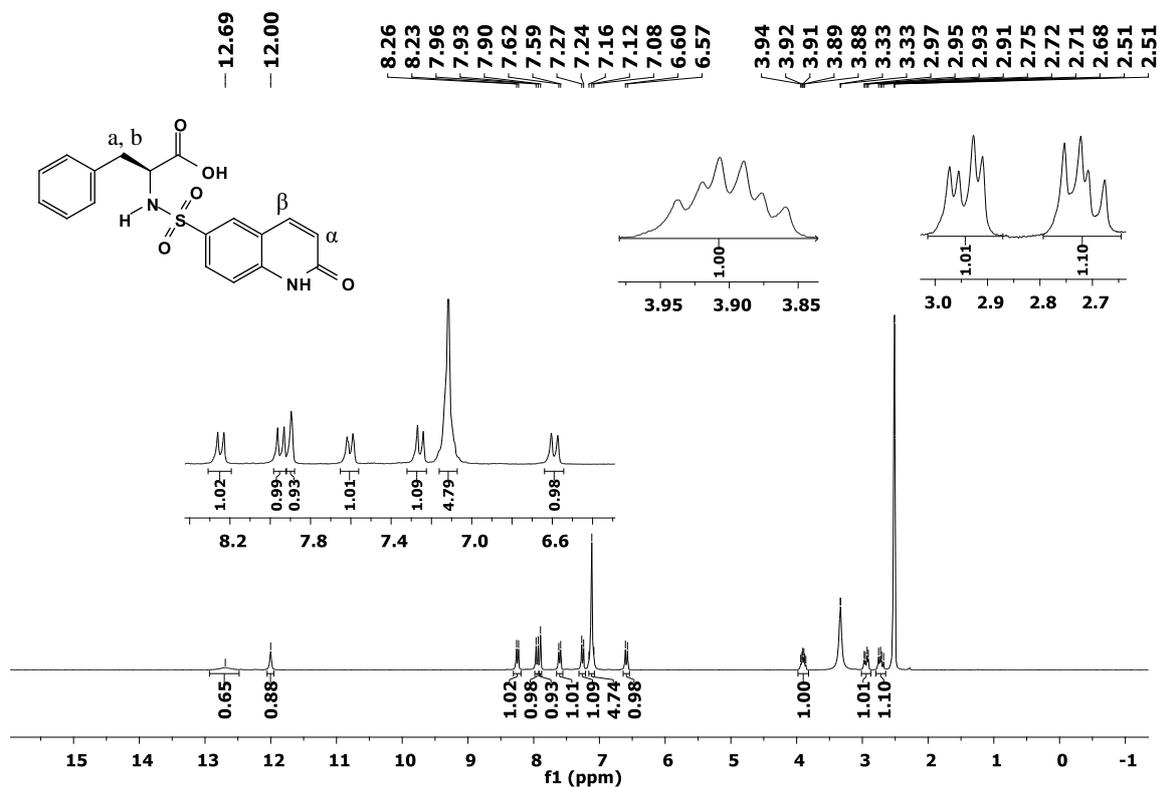
Espectro do RMN 2D- gHSQCAD do cloreto de 2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonila (2)



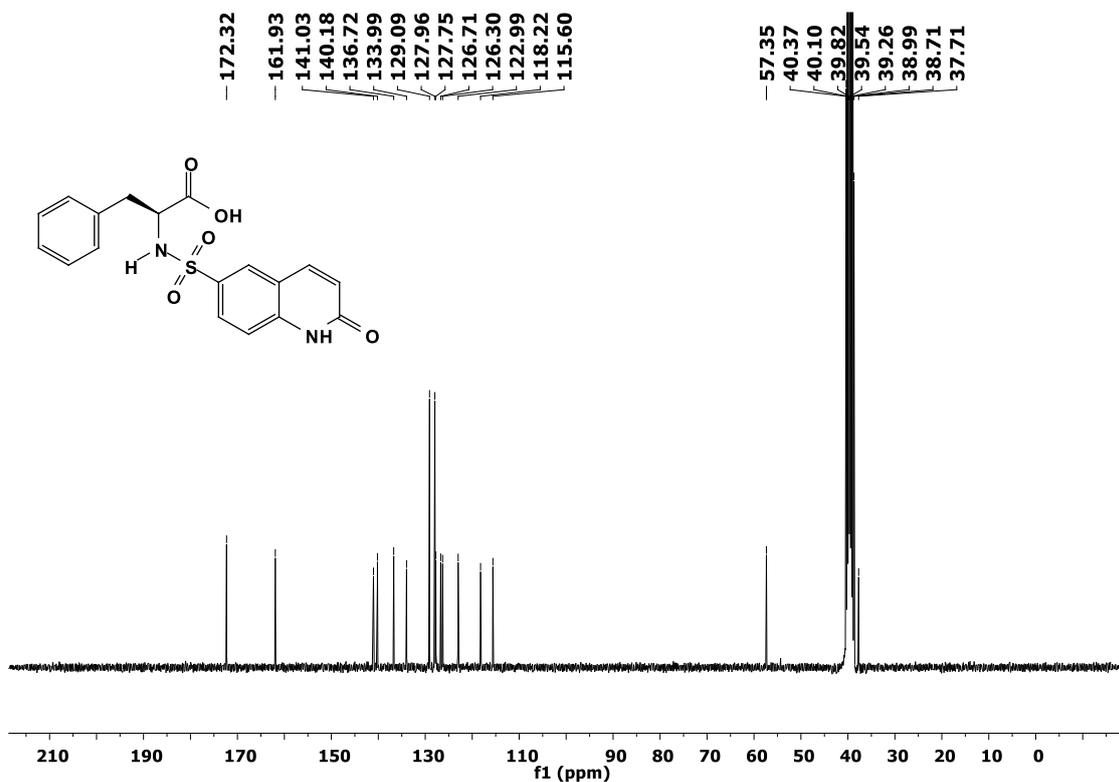
3

(S)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanoico (3): RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12,69 (s, 1H-COOH), 12,00 (s, 1H, C=ONH $_q$), 8,25 $J = 9,1$ Hz, 1H, ArH), 7,95 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, CH $_\beta$), 7,90 (s, 1H, SO $_2$ -NH), 7,60 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, ArH), 7,25 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, ArH), 7,12 (m, 5H, ArH $_{\text{fenil}}$), 6,59 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, CH $_\alpha$), 3,90 (td, $J = 9,2, 6,0$ Hz, 1H, CH $_{\text{quiral}}$), 2,94 (dd, $J = 13,6, 5,1$ Hz, 1H, CH $_a$ de CH $_2$), 2,71 (dd, $J = 13,7, 9,3$ Hz, 1H, CH $_b$ de CH $_2$). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172,32, 161,93, 141,03, 140,18, 136,72, 133,99, 129,09, 127,96, 127,75, 126,71, 126,30, 122,99, 118,22, 115,60, 57,35, 37,71. FTIR (cm^{-1}): 3355, 3290, 1727, 1660, 1594, 1532, 1395, 1324, 1155, 1095, 968. ESI HRMS cal. para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 372,08. Achado 373,0844. Pureza: 95%. $[\alpha]_{\text{D}^{20}} = -25,00$ ($c = 0,1$, MEOH). Ponto de fusão = 238 - 240 °C. Sólido amarelo claro. Rendimento = 75%.

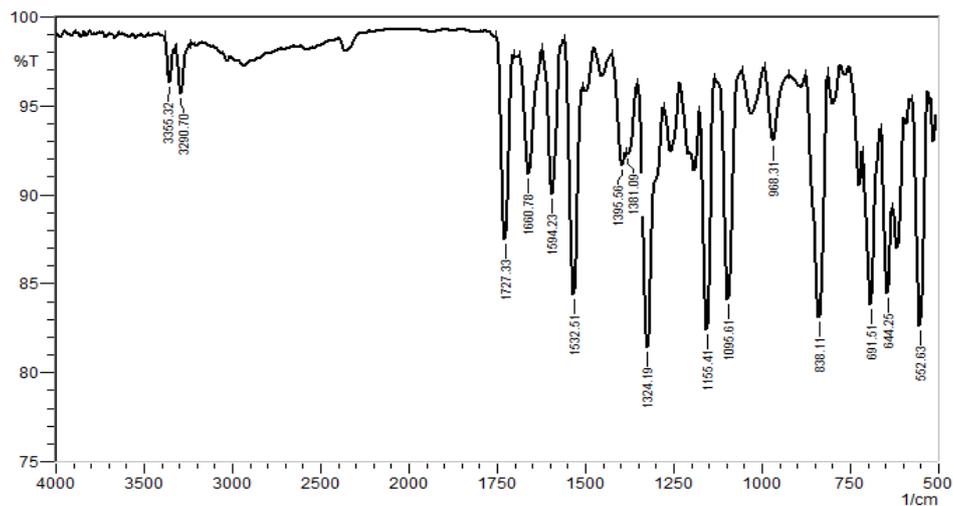
Espectro de RMN ^1H do (*S*)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanoico (3)



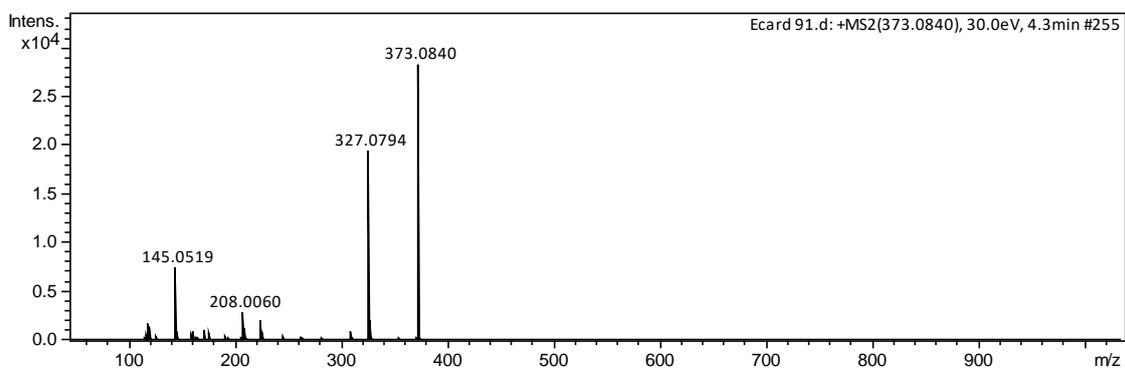
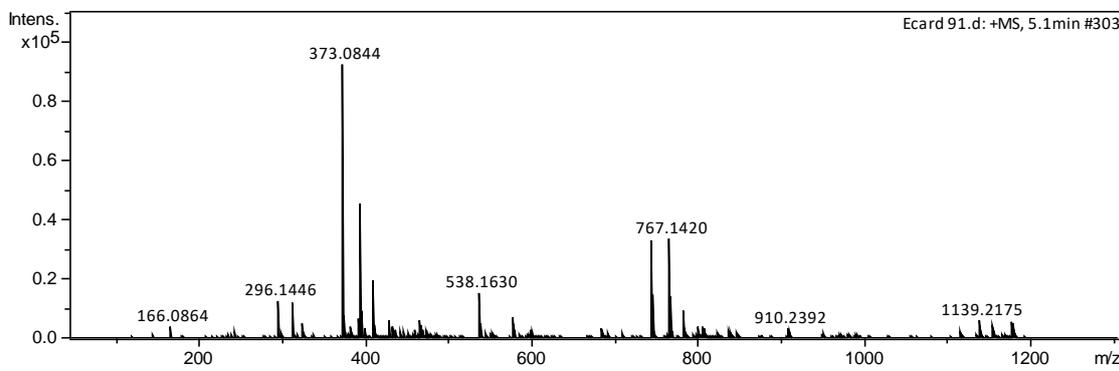
Espectro de RMN ^{13}C (*S*)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanoico (3):



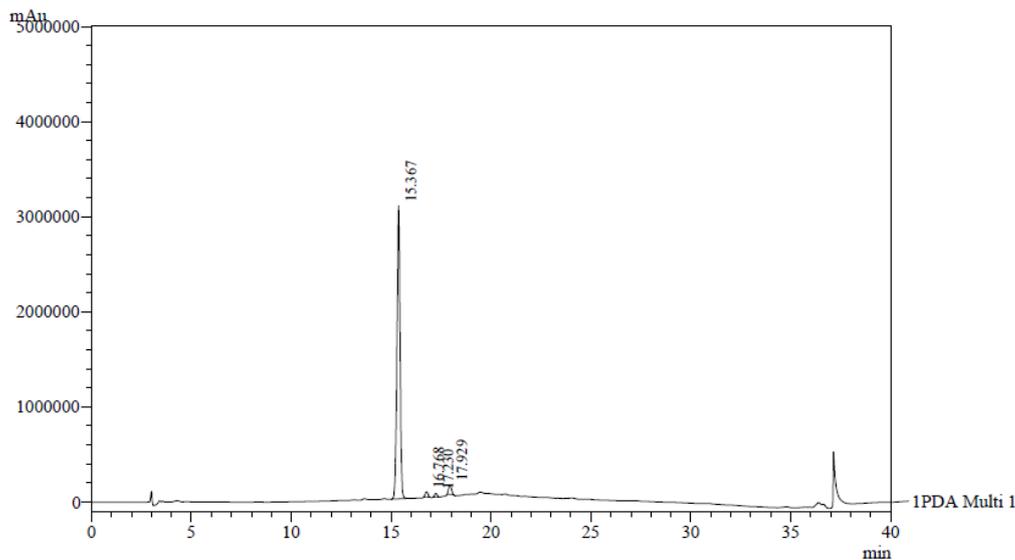
Espectro de infravermelho do (*S*)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanoico (3):



Espectro de HRMS do (*S*)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanoico (3):



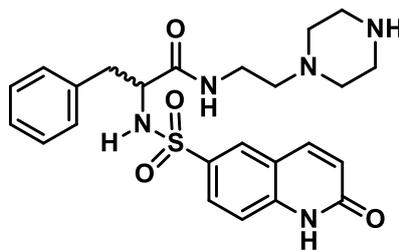
Cromatograma de CLAE do (*S*)-Ácido 3-fenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanoico (3):



1 PDA Multi 1 / 210nm 4nm

PDA Ch1 210nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Tailing Factor	Area %	Peak Purity Index
1	15.367	32751299	0.000	0.975	94.668	0.99904
2	16.768	491040	4.921	1.105	1.419	1.00000
3	17.230	335955	1.774	1.015	0.971	1.00000
4	17.929	1017737	2.527	1.261	2.942	0.99277
Total		34596030			100.000	

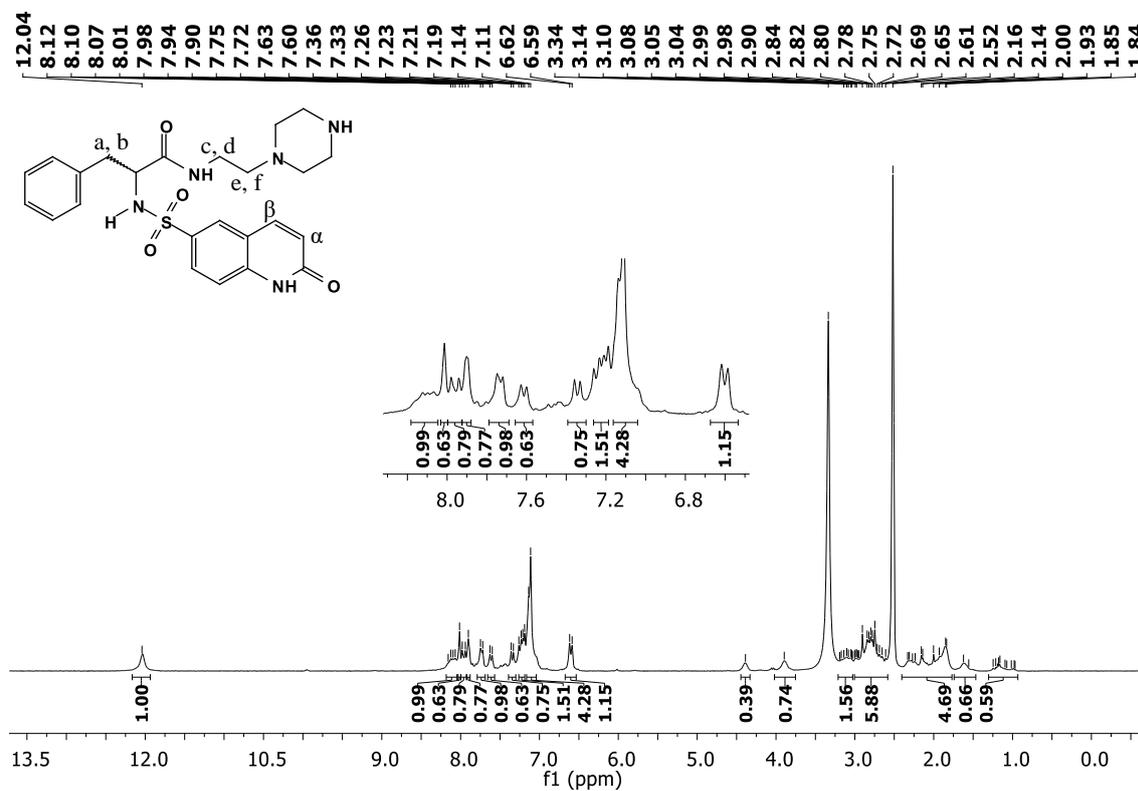


4a

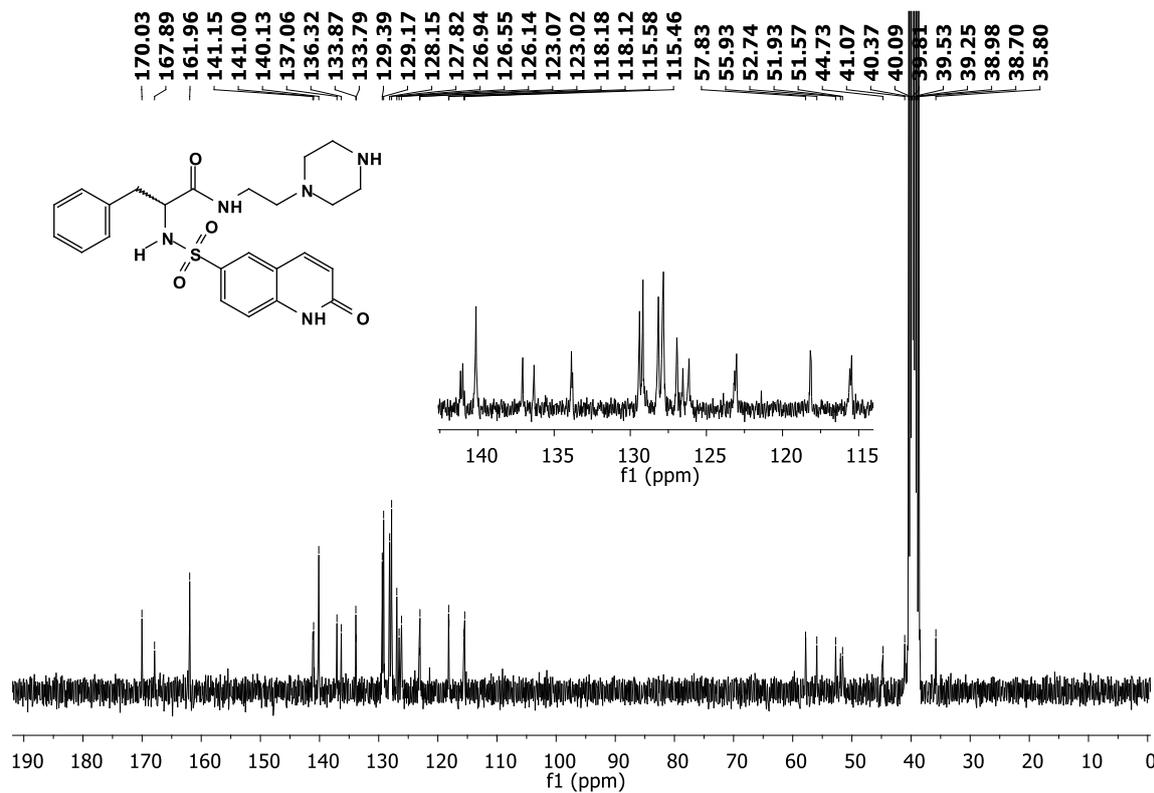
3-fenil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4a):RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,04 (s, 1H, C=ONH_q), 8,11 (dd, $J = 17,5$, 9,2 Hz, 1H, ArH), 8,01 (s, 1H, C=ONH), 7,96 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, CH _{β}), 7,90 (s, 1H, SO₂-NH), 7,73 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, ArH), 7,34 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, ArH), 7,22 (dd, $J = 14,1$, 7,4 Hz, 1H, ArH_{fenil}), 7,12 (d, $J = 7,4$ Hz, 4H, ArH_{fenil}), 6,60 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, CH _{α}), 3,90 (s, 1H, CH_{quiral}), 3,14 – 3,03 (m, 2H, CH_c e CH_d de CH₂), 3,00 – 2,61 (m, 6H, CH_e e CH_f de

CH₂, CH_a e CH_b de CH₂ e CH₂ piper), 2,33 – 1,84 (m, 5H, CH₂ piper), 1,62 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, CH_{piper}), 1,35 – 0,90 (m, 1H, NH_{piper}). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,03, 161,96, 141,15, 141,00, 140,13, 137,06, 136,32, 133,87, 133,79, 129,39, 129,17, 128,15, 127,82, 126,94, 126,55, 126,14, 123,07, 123,04, 123,02, 118,18, 118,12, 115,58, 115,46, 57,83, 55,93, 52,74, 51,93, 51,57, 44,73, 41,07, 35,80. FTIR (cm⁻¹): 3165, 3059, 1655, 1556, 1321, 1151, 1085, 952, 835, 750. ESI HRMS cal, para C₂₄H₂₉N₅O₄S: [M + H]⁺ *m/z* 483,58, Achado 484,1877. Pureza: 86%. [α]_D²⁰ = 15,00 (*c*=0,1, MEOH). Ponto de fusão: 183-185 °C. Sólido branco. Rendimento= 41%,

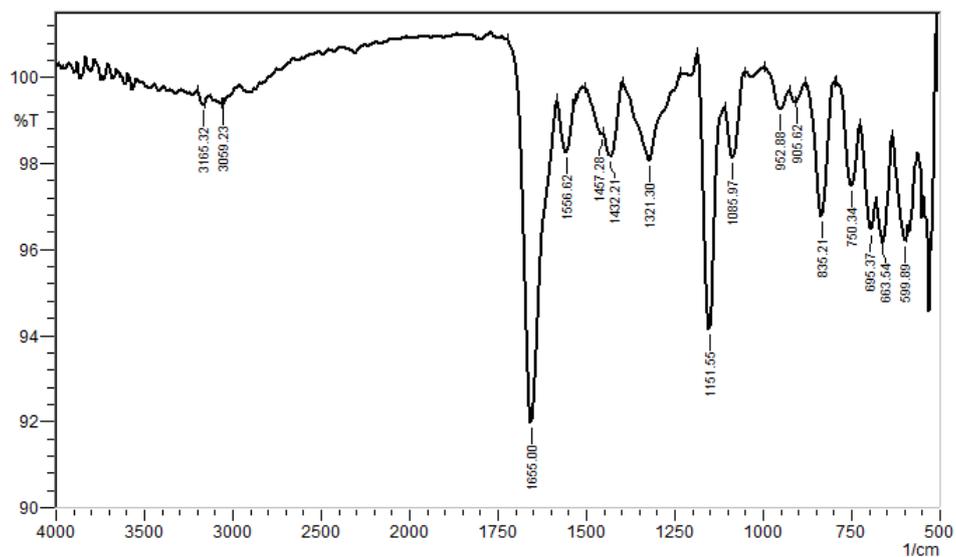
Espectro de RMN ¹H do 3-fenil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4a)



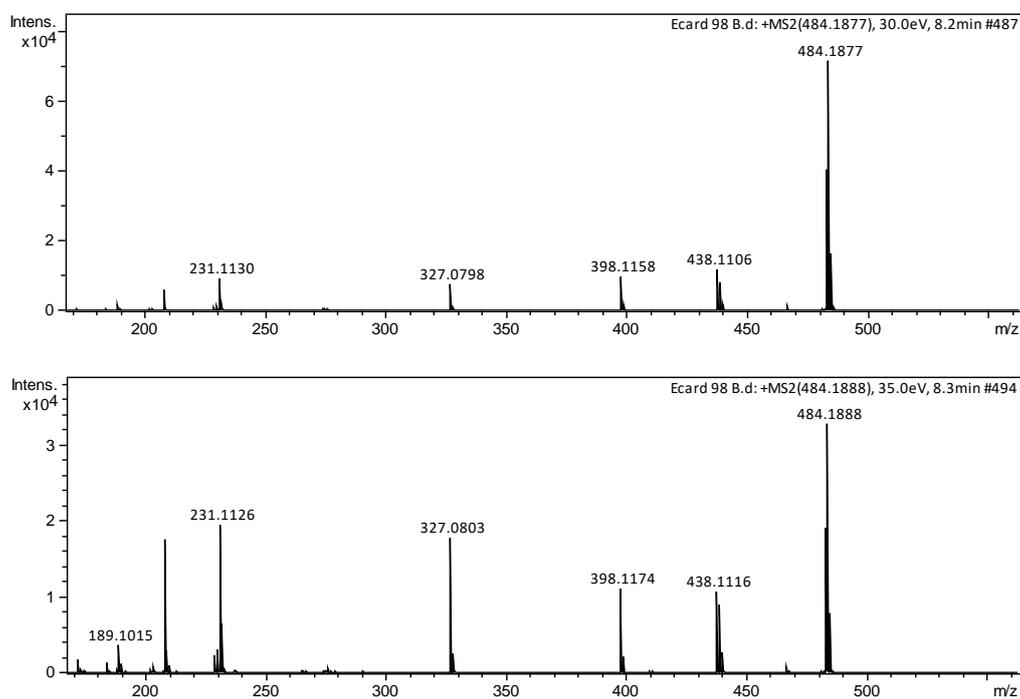
Espectro de RMN ^{13}C do 3-fenil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4a)



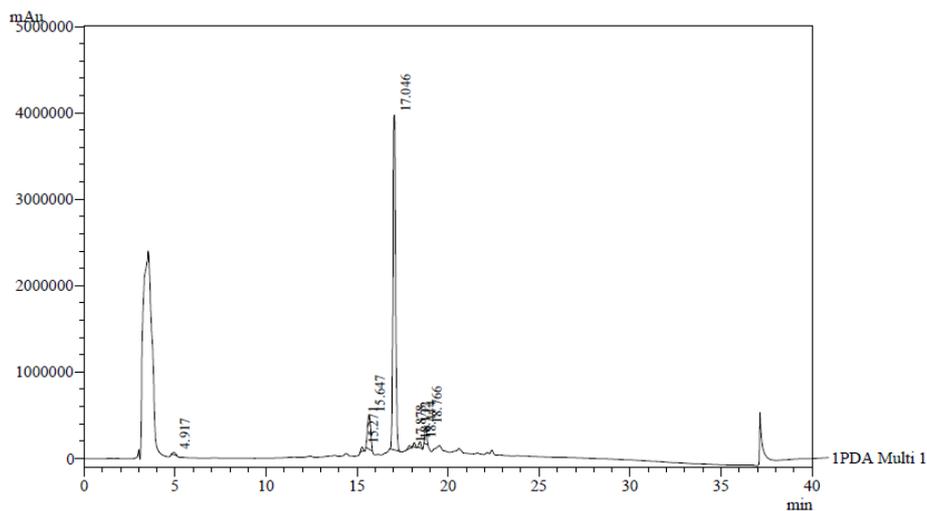
Espectro de infravermelho do 3-fenil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4a)



Espectro de HRMS do 3-fenil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4a)



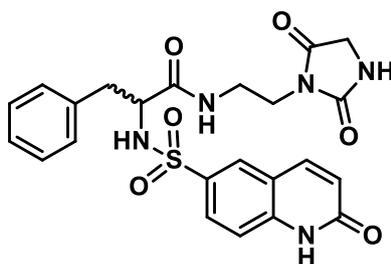
Espectro de CLAE do 3-fenil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4a)



1 PDA Multi 1 / 210nm 4nm

PDA Ch1 210nm 4nm

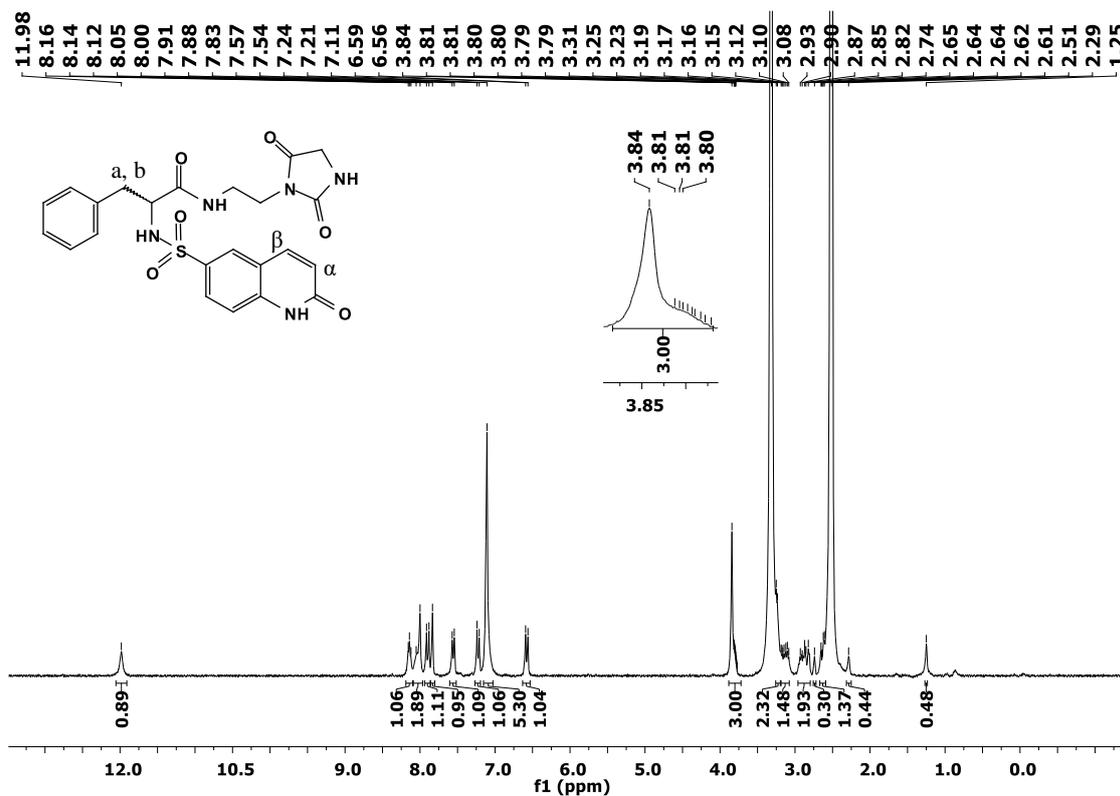
Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Tailing Factor	Area %	Peak Purity Index
1	4.917	294796	0.000	1.312	0.620	0.99999
2	15.271	391291	41.213	0.942	0.823	1.00000
3	15.647	4751756	1.372	1.060	9.989	0.99887
4	17.046	39394843	4.721	1.048	82.818	0.99114
5	17.878	306411	3.401	0.828	0.644	0.98458
6	18.132	352903	1.183	1.192	0.742	0.98384
7	18.444	563430	1.474	1.002	1.184	0.99979
8	18.766	1512626	1.456	1.120	3.180	0.99999
Total		47568057			100.000	



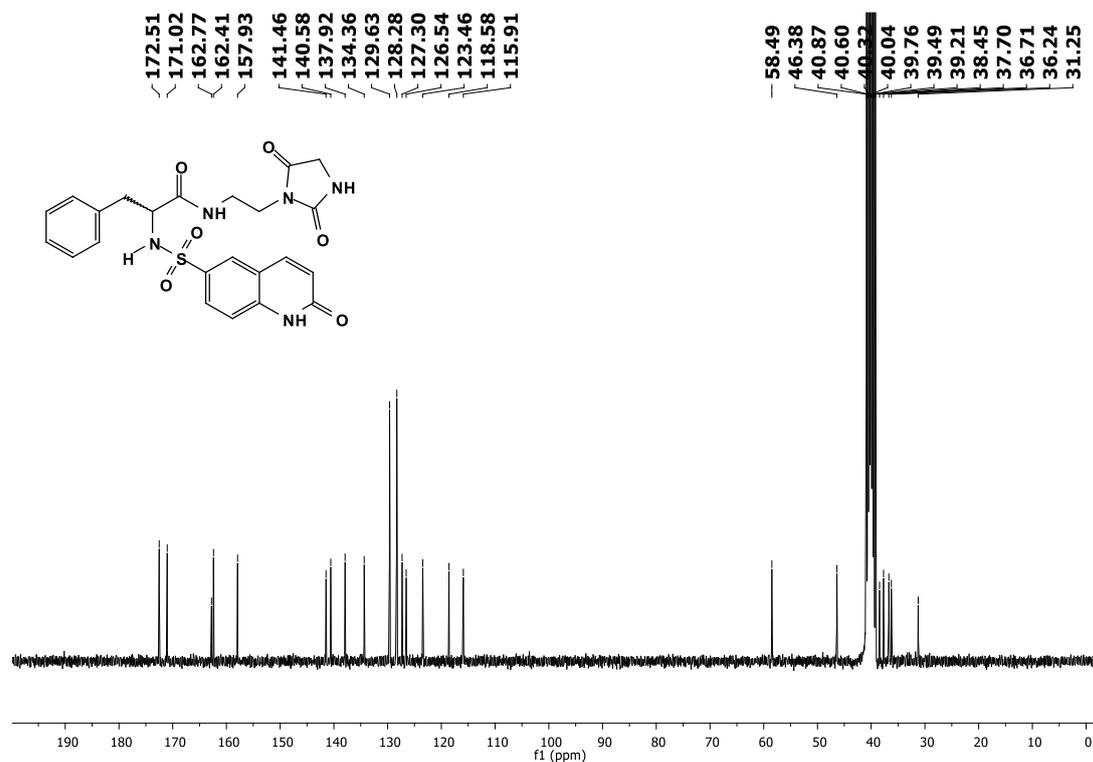
4b

3-fenil-N-(2-(2,5-dioxoimidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4b):RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,98 (s, 1H, C=ONH_q), 8,14 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, C=ONH_h), 8,05 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, ArH), 8,00 (s, 1H, C=ONH), 7,90 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, CH _{β}), 7,83 (s, 1H, SO₂-NH), 7,56 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, ArH), 7,23 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, ArH), 7,11 (s, 5H, ArH_{fenil}), 6,58 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, CH _{α}), 3,84 (s, 2H, CH₂_h), 3,81 – 3,77 (m, 1H, CH_{quiral}), 3,24 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H, CH₂), 3,19-3,08 (m, 1H, CH_a de CH₂), 2,93 – 2,82 (m, 2H, CH₂), 2,65 – 2,61 (m, 1H, CH_b de CH₂), RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172,51, 171,02, 162,41, 157,93, 141,46, 140,58, 137,92, 134,36, 129,63, 128,28, 127,30, 126,54, 123,46, 118,58, 115,91, 58,49, 46,38, 38,45, 37,70, 36,71, (Sinais de DMF residual: 162,77, 36,2, 31,25). FTIR (cm $^{-1}$): 3332, 3268, 1776, 1705, 1659, 1550, 1445, 1319, 1151, 838. ESI HRMS cal, para C₂₃H₂₃N₅O₆S: [M + H] $^{+}$ m/z 497,52, Achado 498,1388. Pureza: 95%. $[\alpha]_{\text{D}^{20}} = -0,5$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão= 160-162 °C. Sólido branco, Rendimento= 57%.

Espectro de RMN ^1H do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfo-namida)propanamida (4b)

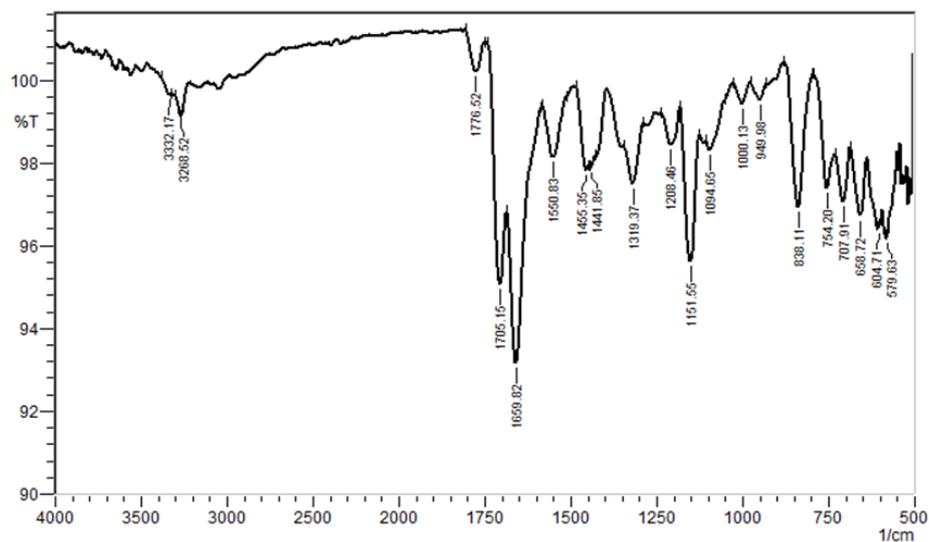


Espectro de RMN ^{13}C do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (4b)

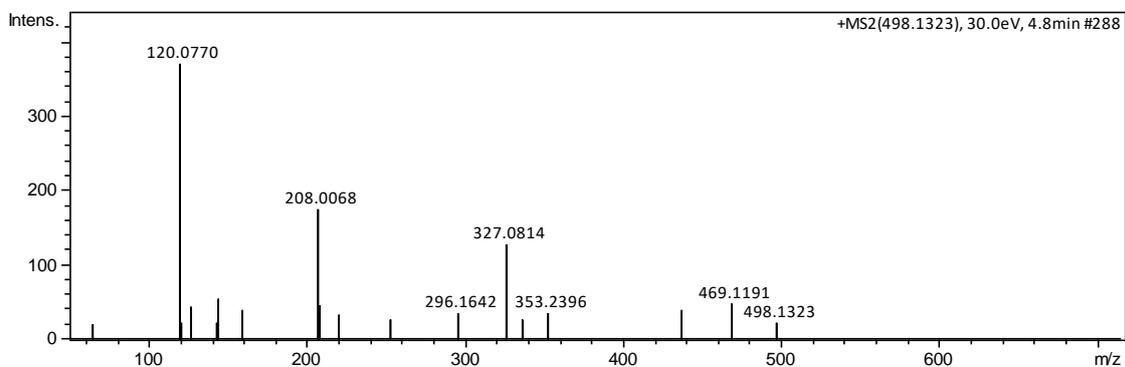
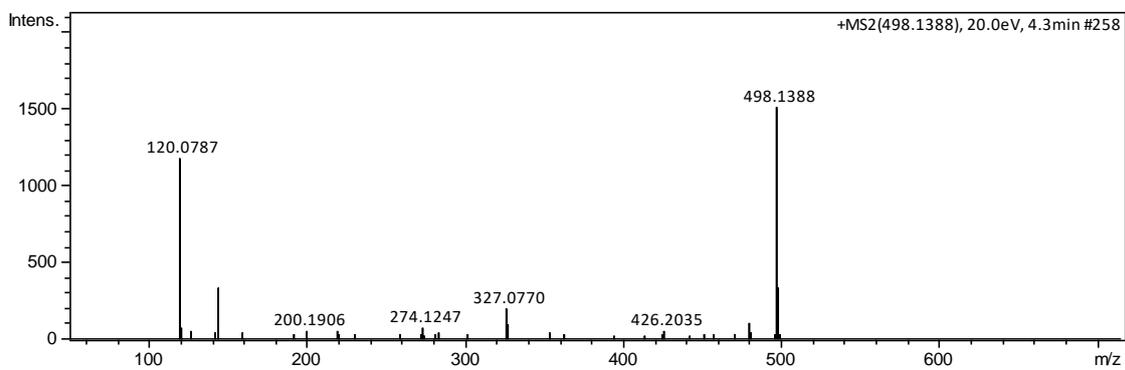


(Sinais de DMF residual: 162,77 ppm, 36,24 ppm, e 31,25 ppm)

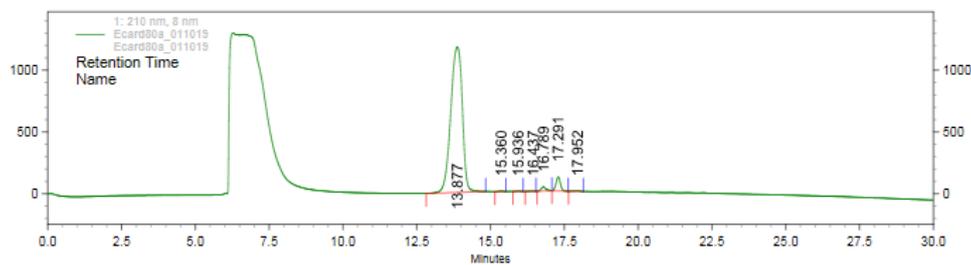
Espectro de infravermelho do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfona-mida)propanamida (4b)



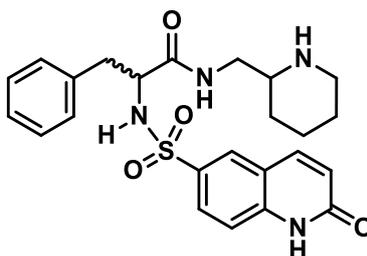
Espectro de HRMS do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfo-namida)propanamida (4b)



Cromatograma de CLAE do 3-fenil-N-(2-(2,5-dioximidazolidin-1-il)etil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfo-namida)propanamida (4b)



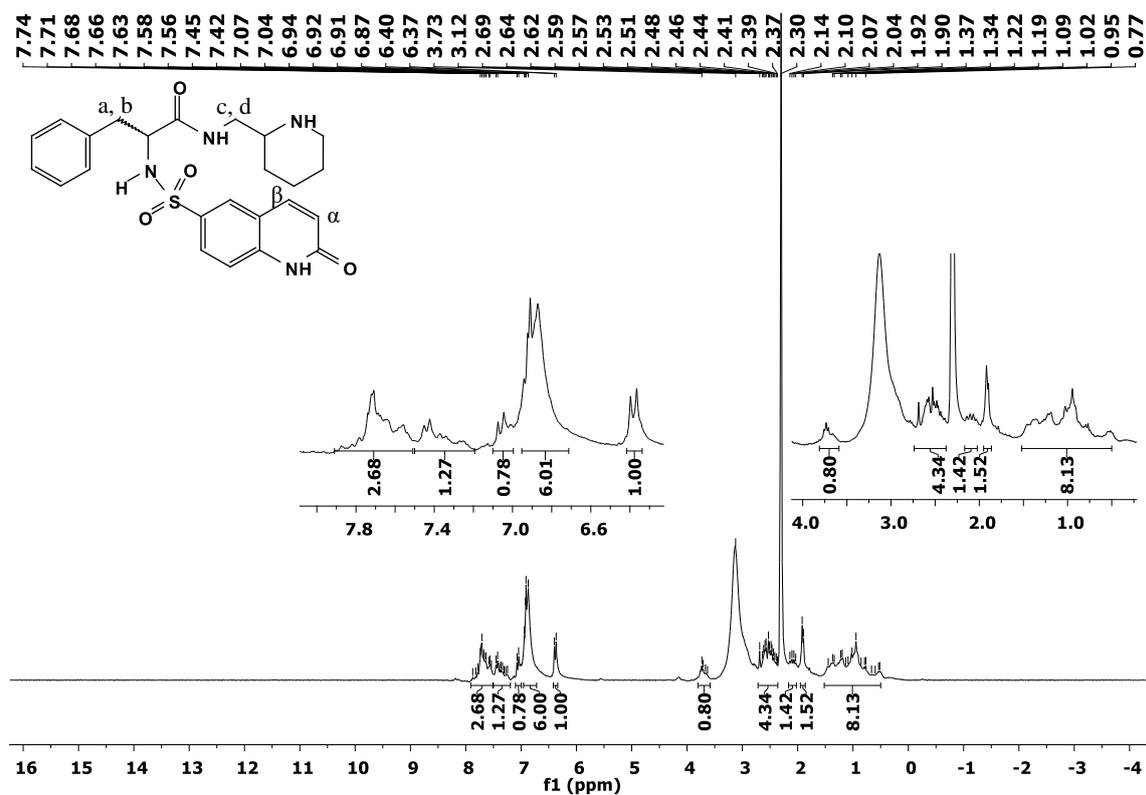
1: 210 nm, 8 nm					
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		13.877	32199896	95.11	88.28
2		15.360	30445	0.09	0.22
3		15.936	23028	0.07	0.17
4		16.437	17644	0.05	0.11
5		16.789	375854	1.11	2.50
6		17.291	1151667	3.40	8.43
7		17.952	55686	0.16	0.29
Totals			33854220	100.00	100.00



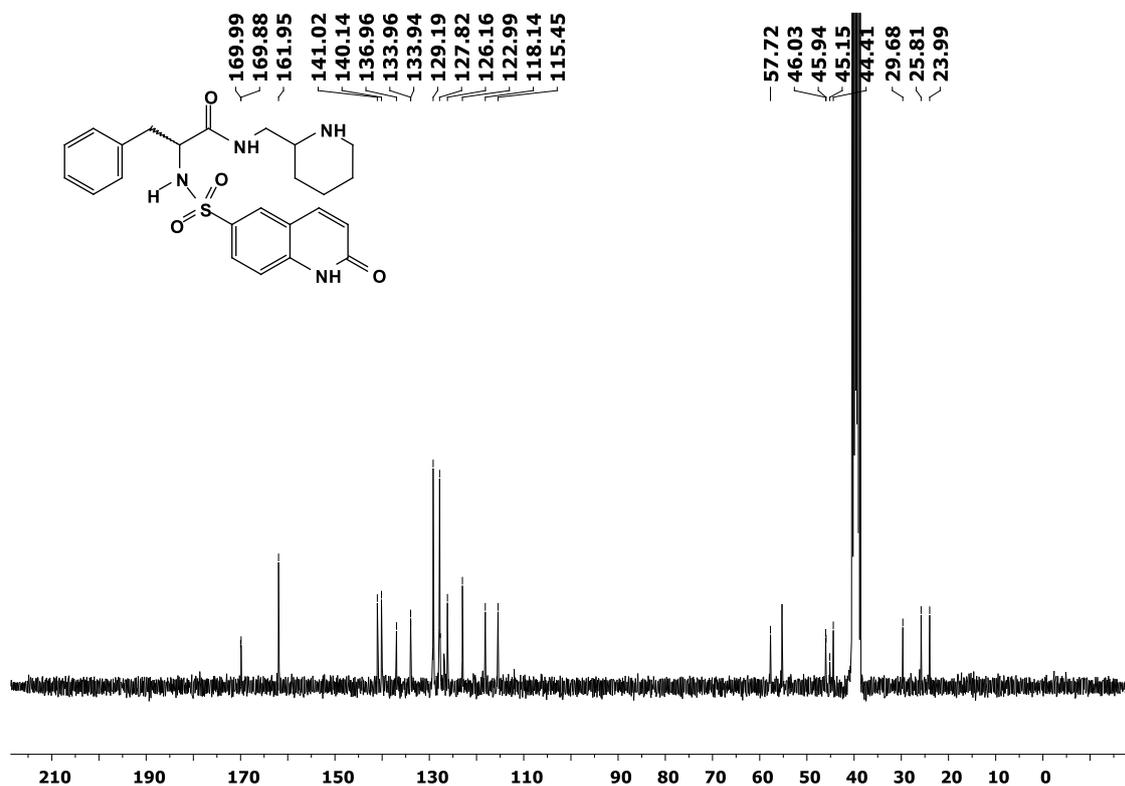
4c

3-fenil-N-(piperidin-2-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4c): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,87 – 7,54 (m, 3H, C=ONH, CH $_{\beta}$, SO $_2$ NH), 7,45 – 7,25 (m, 1H, ArH), 7,06 (d, J = 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,91 (m, 6H, ArH, ArH $_{\text{fenil}}$), 6,38 (d, J = 9,5 Hz, 1H, CH $_{\alpha}$), 3,73 – 3,63 (m, 1H, CH $_{\text{quiral}}$), 2,69 – 2,37 (m, 4H, CH $_a$ e CH $_b$ de CH $_2$), CH $_c$ e CH $_d$ de CH $_2$), 2,09 (dd, J = 20,9, 10,4 Hz, 1H, CH $_{\text{piper}}$), 1,91 (d, J = 7,0 Hz, 1H, C-NH $_{\text{piper}}$), 1,45 – 0,52 (m, 8H, CH $_2$ $_{\text{piper}}$). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169,99, 161,95, 141,02, 140,14, 136,96, 133,96, 133,94, 129,19, 127,82, 126,16, 122,99, 118,14, 115,45, 57,72, 55,27, 46,03, 45,94, 45,15, 44,41, 29,68, 25,81, 23,99. FTIR (cm $^{-1}$): 3147, 3047, 1658,1553, 1319, 1153, 1083, 832, 751. ESI HRMS cal, para C $_{24}$ H $_{28}$ N $_4$ O $_4$ S: [M + H] $^+$ m/z 468,57, Achado 469,1865. Pureza: 85%. $[\alpha]_D^{20}$ = 3,00 (c =0,1, MEOH). Ponto de fusão: 148-150 °C. Sólido branco. Rendimento= 30%.

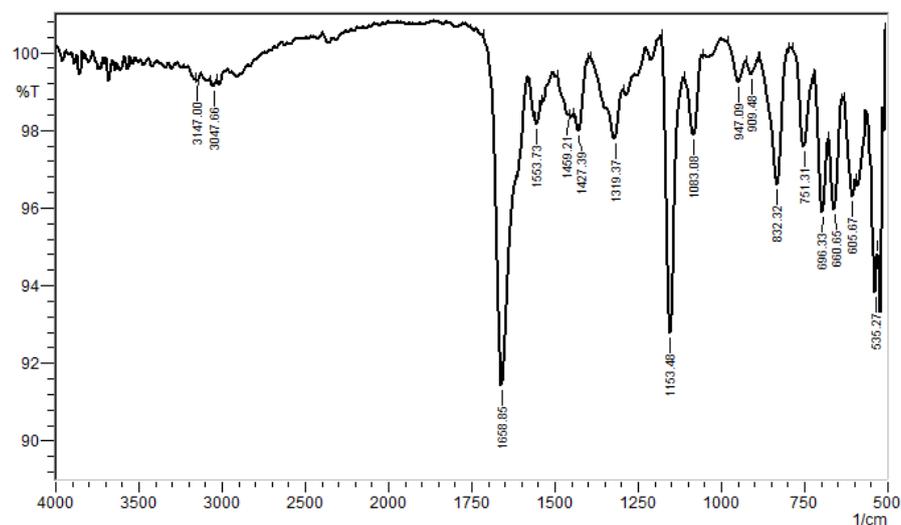
Espectro de RMN ^1H do 3-fenil-N-(piperidin-2-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4c)



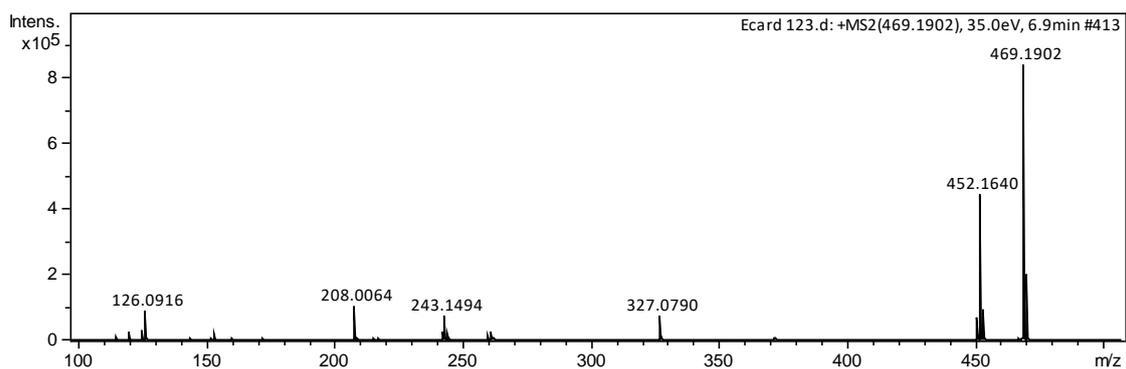
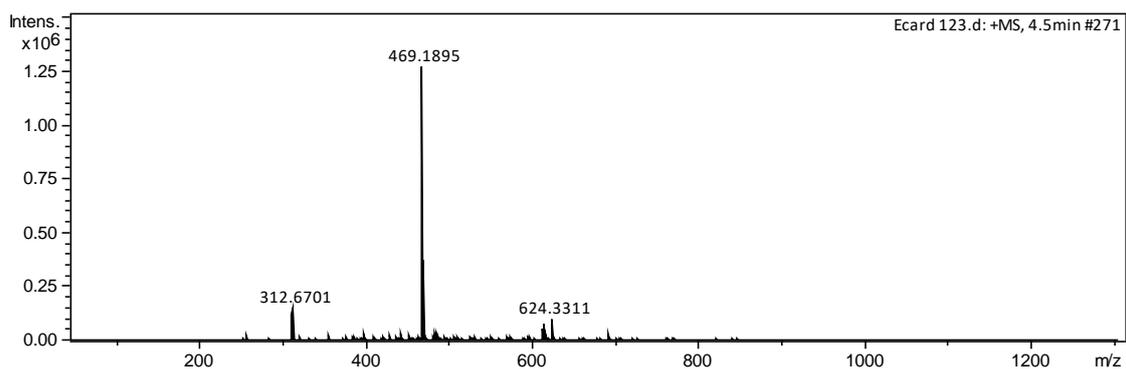
Espectro de RMN ^{13}C do 3-fenil-N-(piperidin-2-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4c)



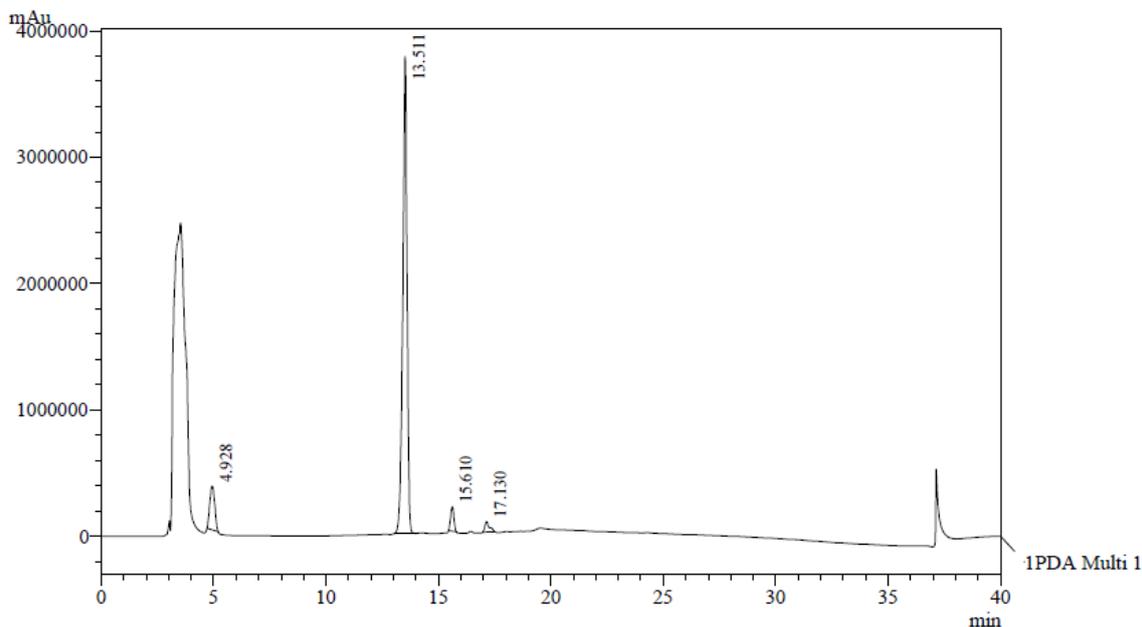
Espectro de infravermelho do 3-fenil-N-(piperidin-2-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidro-quinolina-6-sulfonamida)propanamida (4c)



Espectro de HRMS do 3-fenil-N-(piperidin-2-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidro-quinolina-6-sulfonamida)propanamida (4c)



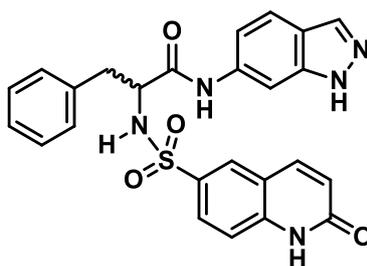
Cromatograma de CLAE do 3-fenil-N-(piperidin-2-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4c)



1 PDA Multi 1 / 210nm 4nm

PDA Ch1 210nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Tailing Factor	Area %	Peak Purity Index
1	4.928	5334128	0.000	1.076	9.213	1.00000
2	13.511	49447116	22.156	0.891	85.402	0.99599
3	15.610	1975117	6.558	1.021	3.411	1.00000
4	17.130	1142954	5.108	1.703	1.974	0.96708
Total		57899314			100.000	



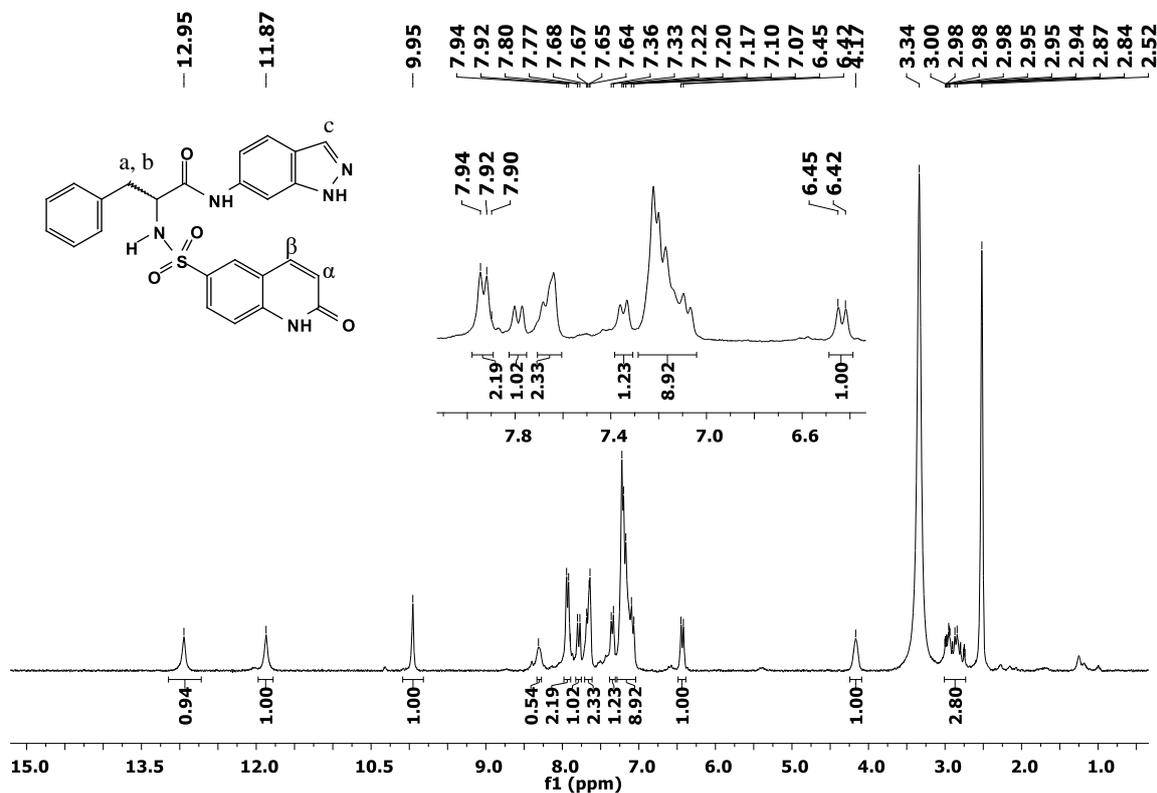
4d

3-fenil-N-(1H-indazol-6-il)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida

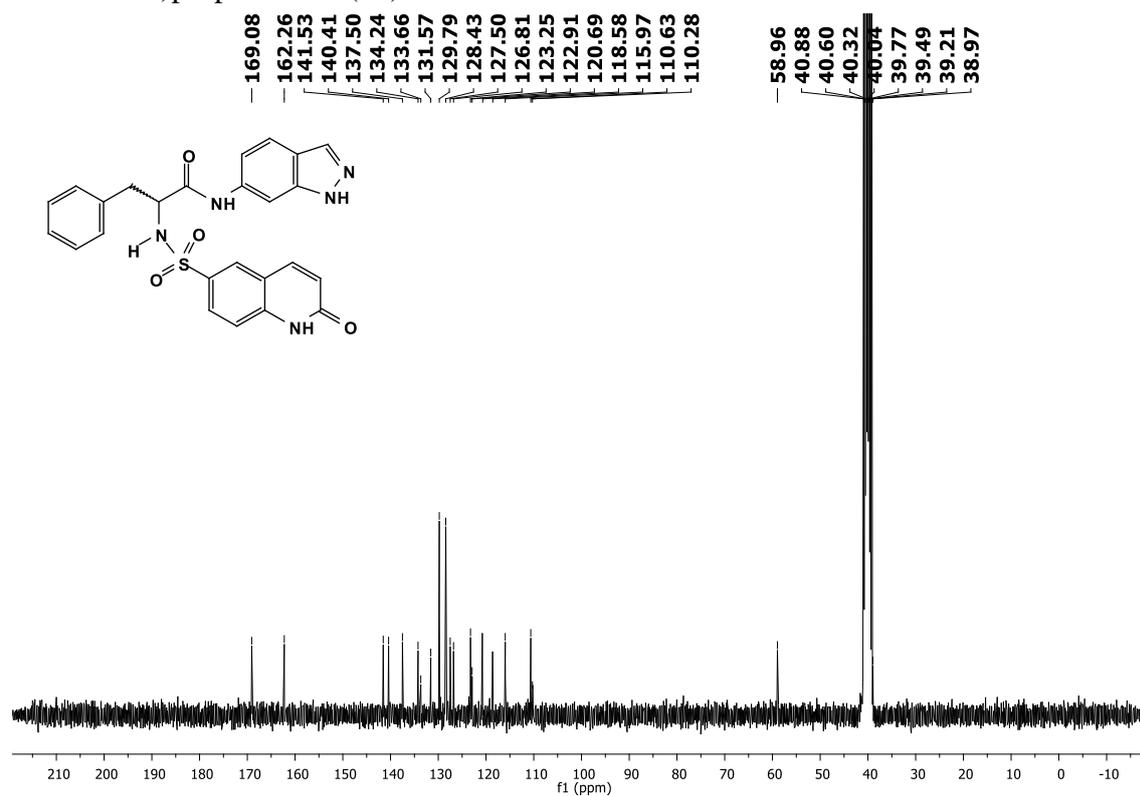
(4d): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,95 (s, 1H, N-NH), 11,87 (s, 1H, C=ONH $_q$), 9,95 (s, 1H, CH $_c$), 7,93 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, ArH), 7,90 (s, 1H, C=ONH) 7,79 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, CH $_b$), 7,68 - 7,64 (m, 2H, ArH, SO $_2$ -NH), 7,35 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, ArH), 7,26 - 7,04 (m,

8H, 5-ArH_{fenil}, 3-ArH_{indazol}), 6,43 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, CH _{α}), 4,17 (s, 1H, CH_{quiral}), 3,00 – 2,74 (m, 2H, CH _{a} e CH _{b} de CH₂). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,08, 162,26, 141,53, 140,41, 137,50, 134,24, 133,66, 131,57, 129,79, 128,43, 127,50, 126,81, 123,25, 122,91 (s), 120,77, 118,62, 115,97, 110,63, 110,22, 58,96, 38,97. FTIR (cm⁻¹): 3368, 3271, 1742, 1675, 1555, 1509, 1317, 1153, 1076, 953. ESI HRMS cal, para C₂₅H₂₁N₅O₄S: [M + H]⁺ m/z 487,53, Achado 488,1360. Pureza: 92%. $[\alpha]_D^{20} = 2,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 163-165 °C. Sólido rosa. Rendimento= 54%.

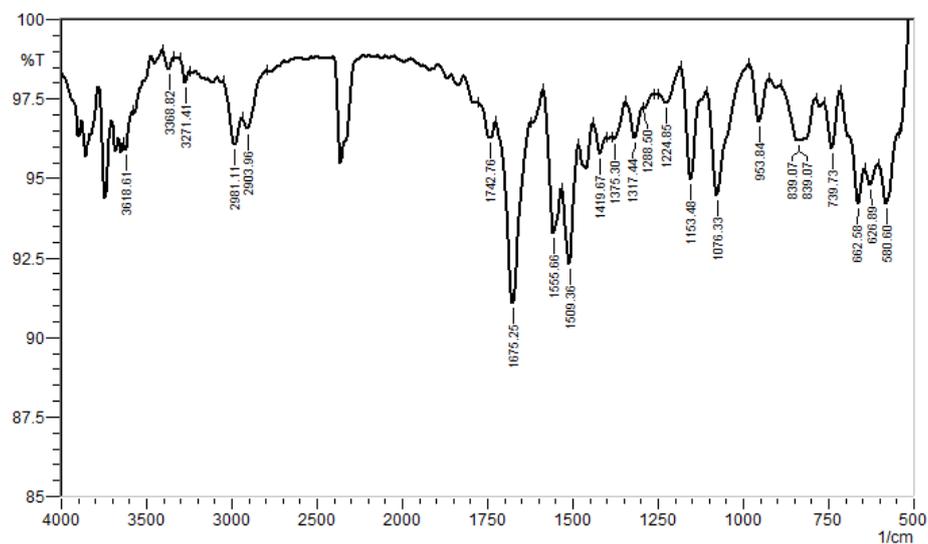
Espectro de RMN ¹H do 3-fenil-N-(1H-indazol-6-il)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4d)



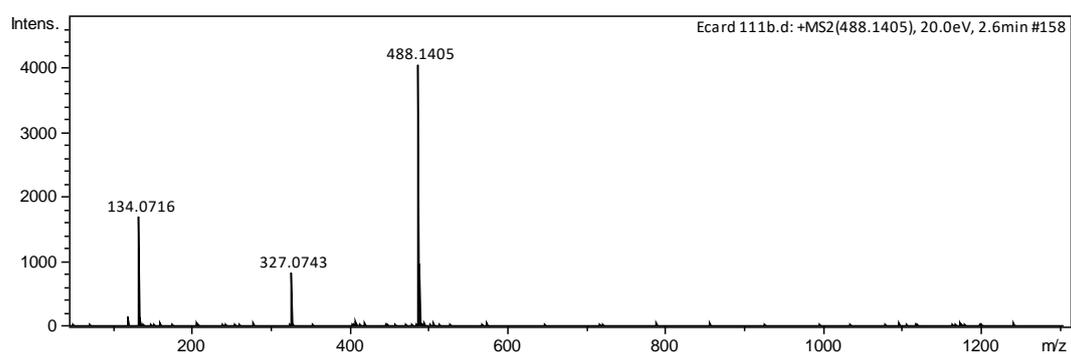
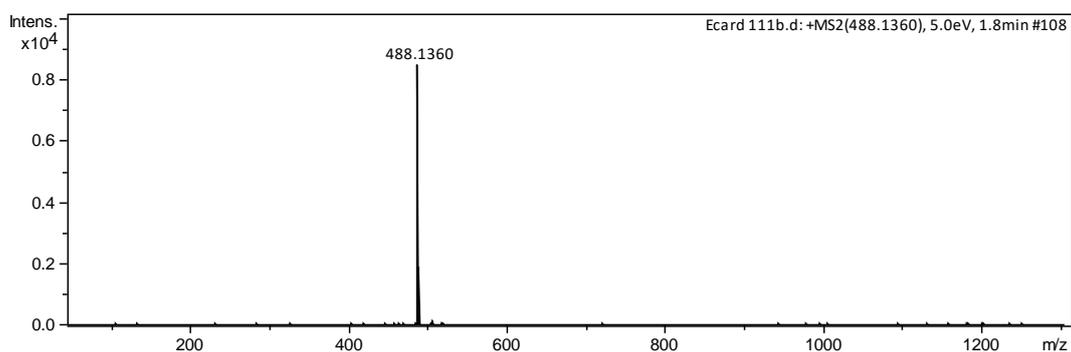
Espectro de RMN ^{13}C do 3-fenil-N-(1H-indazol-6-il)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4d)



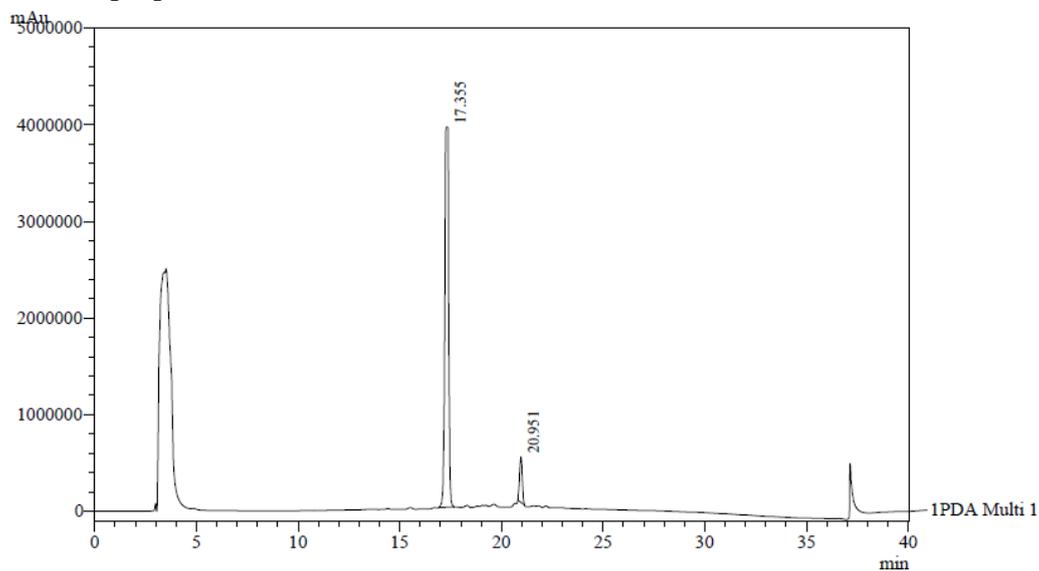
Espectro de infravermelho do 3-fenil-N-(1H-indazol-6-il)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4d)



Espectro de HRMS do 3-fenil-N-(1H-indazol-6-il)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4d)



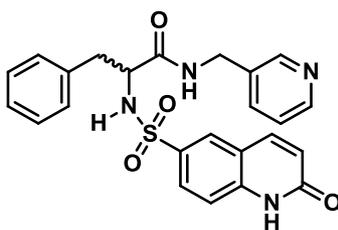
Espectro de CLAE do 3-fenil-N-(1H-indazol-6-il)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4d)



1 PDA Multi 1 / 210nm 4nm

PDA Ch1 210nm 4nm

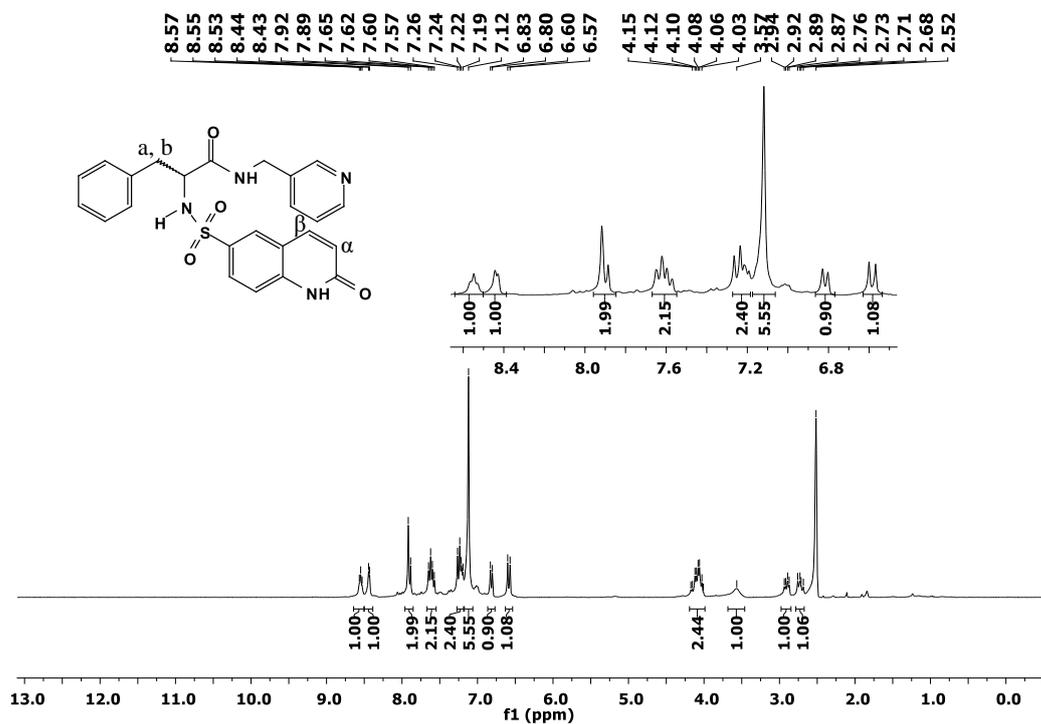
Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Tailing Factor	Area %	Peak Purity Index
1	17.355	51854751	0.000	0.790	92.082	0.98878
2	20.951	4459144	12.783	1.048	7.918	1.00000
Total		56313895			100.000	



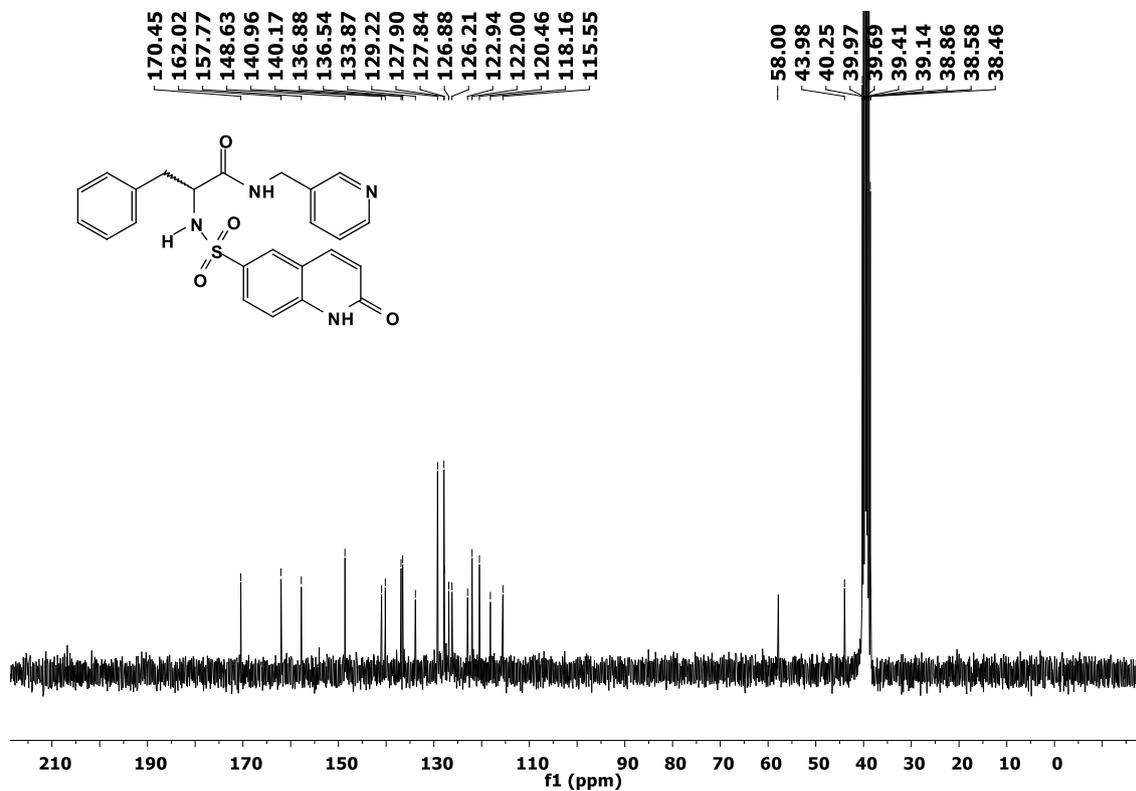
4e

3-fenil-N-(piridina-3-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4e): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,55 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, ArH_{pirid.}), 8,44 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H, ArH_{pirid.}), 7,92 (s, 1H, SO₂-NH), 7,90 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, CH _{β}), 7,61 (dd, $J = 15,0$, 8,0 Hz, 2H, 1H-ArH, 1H-ArH_{pirid.}), 7,23 (dd, $J = 13,8$, 8,0 Hz, 2H, 1H-ArH, 1H-ArH_{pirid.}), 7,12 (s, 5H, ArH_{fenil.}), 6,82 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, CH, ArH), 6,58 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, CH _{α}), 4,25 – 3,92 (m, 2H, CH₂_{pirid.}), 3,57 (s, 1H, CH_{quiral.}), 2,90 (dd, $J = 13,3$, 6,0 Hz, 1H, CH _{a} de CH₂), 2,72 (m, 1H, CH _{b} de CH₂). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170,45, 162,02, 157,77, 148,63, 40,96, 140,17, 136,88, 136,54, 133,87, 129,22, 127,90, 127,84, 126,88, 126,21, 122,94, 122,00, 120,46, 118,16, 115,55, 58,00, 43,98, 38,46. FTIR (cm $^{-1}$): 3282, 3237, 1743, 1684, 1652, 1549, 1512, 1329, 1151, 1059, 832, 751. ESI HRMS cal, para C₂₄H₂₂N₄O₄S: [M + H] $^+$ m/z 462,52, Achado 463,1444. Pureza: 92%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 210-212 °C. Sólido branco. Rendimento= 25%.

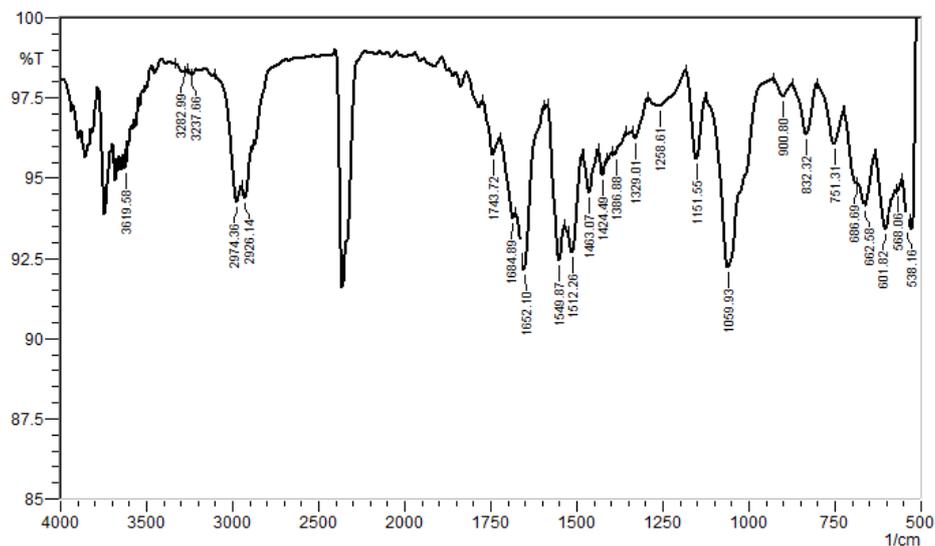
Espectro de RMN ^1H do 3-fenil-N-(piridina-3-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4e)



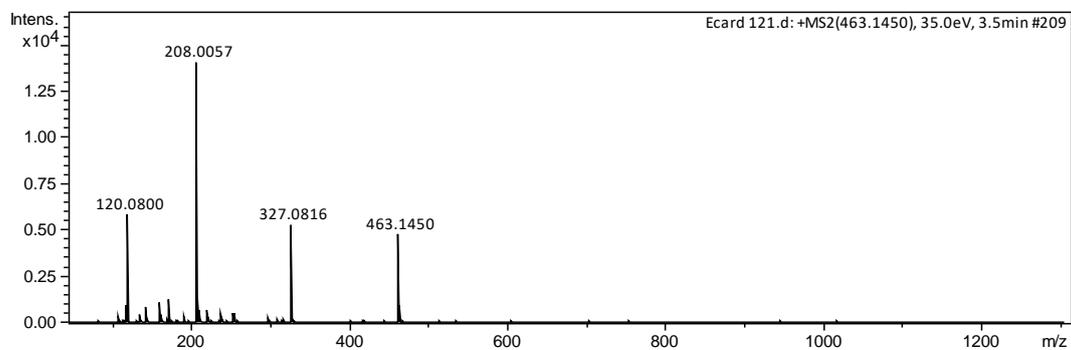
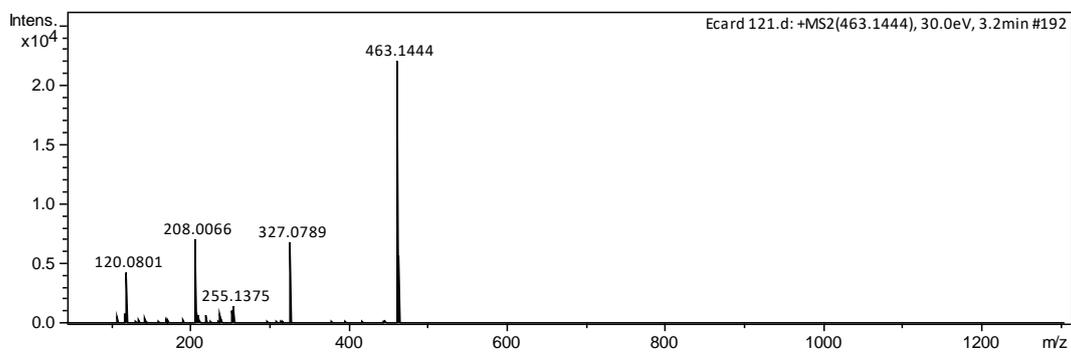
Espectro de RMN ^{13}C do 3-fenil-N-(piridina-3-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4e)



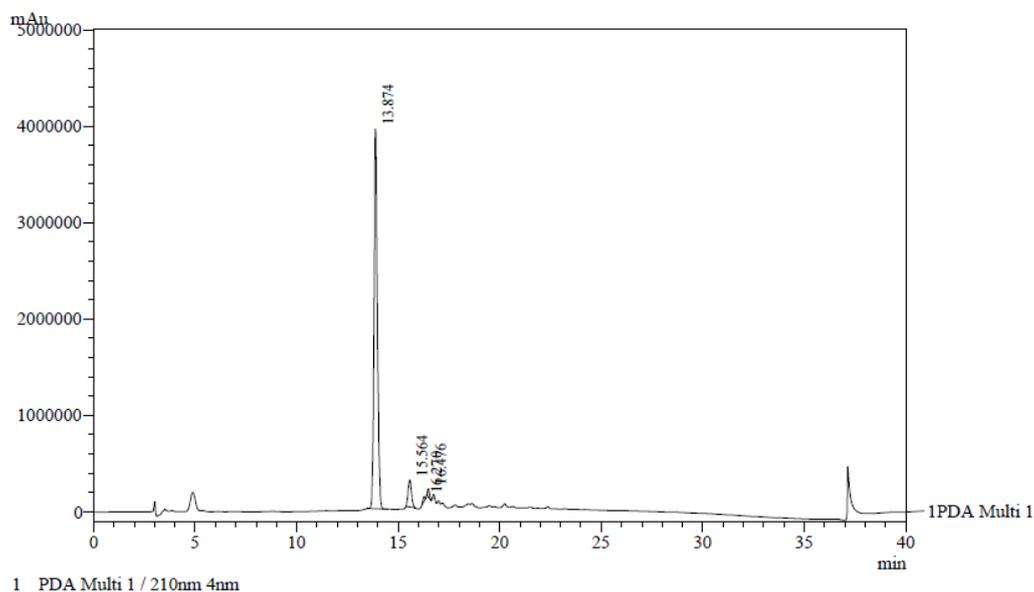
Espectro de infravermelho do 3-fenil-N-(piridina-3-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4e)



Espectro de HRMS do 3-fenil-N-(piridina-3-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4e)

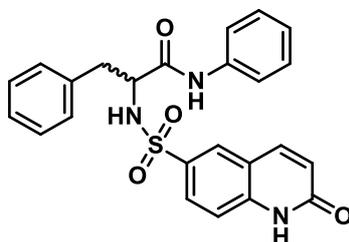


Cromatograma de CLAE do 3-fenil-N-(piridina-3-ilmetil)-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4e)



PDA Ch1 210nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Heigh	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	13.874	44956724	3936705	0.165	0.000	1.217	91.561	0.000
2	15.564	3244553	281225	0.181	5.503	1.149	6.608	0.000
3	16.270	340703	46519	0.114	2.771	0.877	0.694	0.000
4	16.476	558320	83880	0.115	1.081	1.344	1.137	0.000
Total		49100300	4348328				100.000	

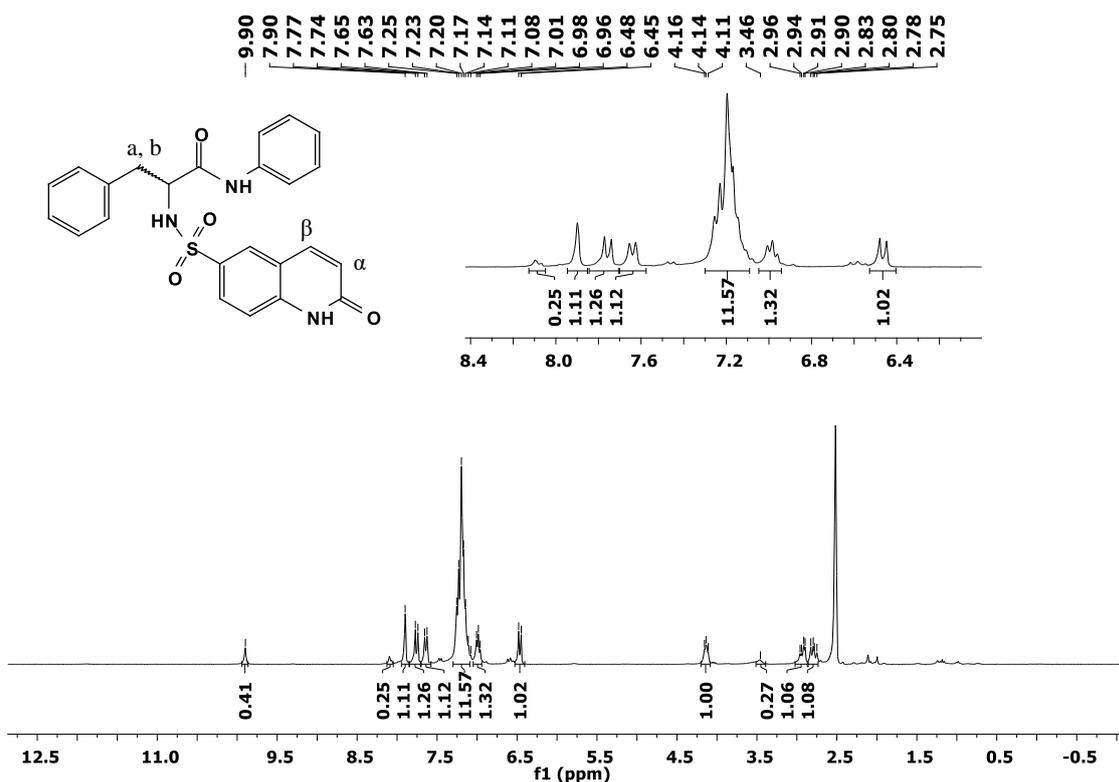


4f

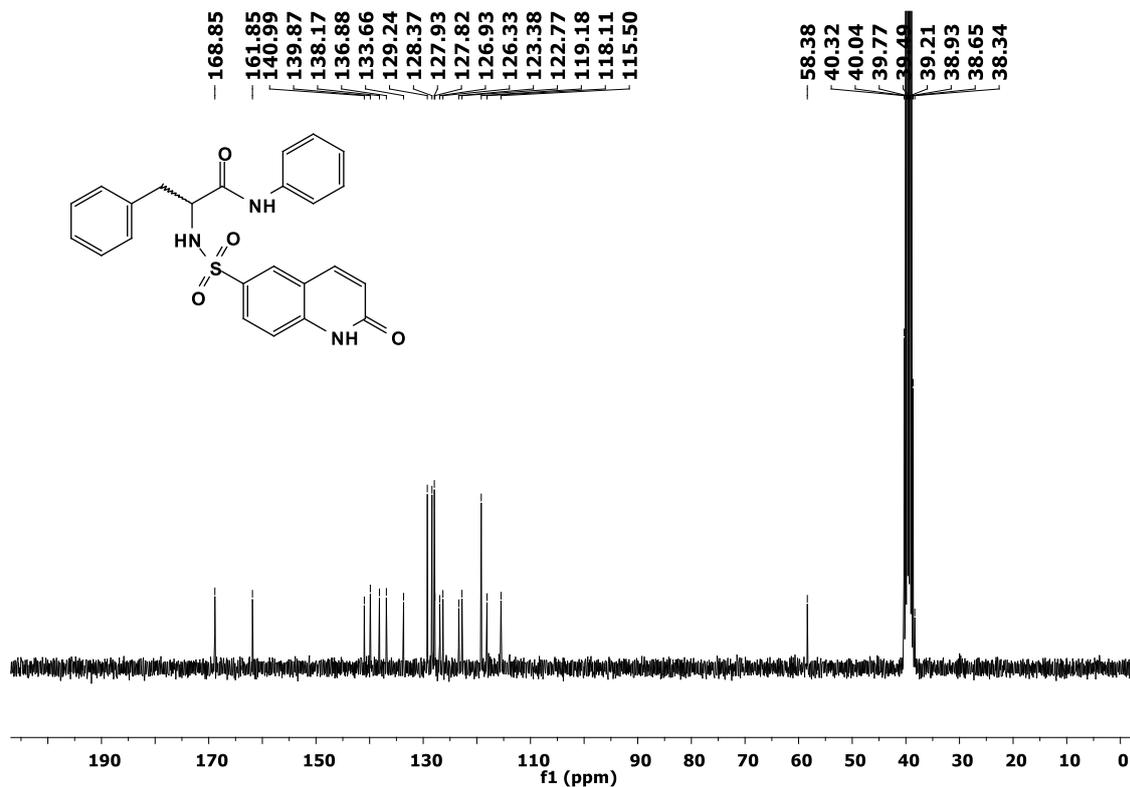
N,3-difenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4f): RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,90 (s, 1H, $\text{SO}_2\text{-NH}$), 7,76 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, CH_β), 7,64 (d, J

= 8,6 Hz, 1H, ArH), 7,31 – 7,07 (m, 11H, 1H-ArH, 5H-ArH_{fenil}, 5H-ArH_{anilina}), 6,98 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H, ArH), 6,46 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, CH_α), 4,16 – 4,11 (m, 1H, CH_{quiral}), 2,93 (dd, $J = 13,3, 5,4$ Hz, 1H, CH_a de CH₂), 2,79 (dd, $J = 13,6, 5,4$ Hz, 1H, CH_b de CH₂). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,85, 161,85, 140,99, 139,87, 138,17, 136,88, 133,66, 129,24, 128,37, 127,93, 127,82, 126,93, 126,33, 123,38, 122,77, 119,18, 118,11, 115,50, 58,38, 38,34. FTIR (cm⁻¹): 3313, 3262, 1744, 1674, 1659, 1548, 1512, 1324, 1151, 1064, 831, 744. ESI HRMS cal, para C₂₄H₂₁N₃O₄S: [M + H]⁺ m/z 447,51, Achado 448,1321, Pureza: 96%. [α]_D²⁰ = 6,00 ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 161-163°C. Sólido branco. Rendimento= 56%.

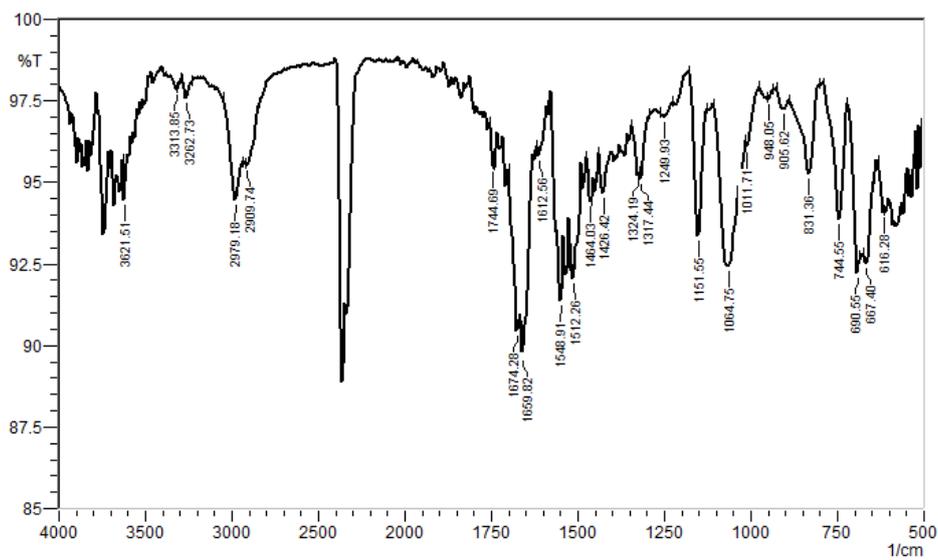
Espectro de RMN ¹H do N,3-difenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanamida (4f)



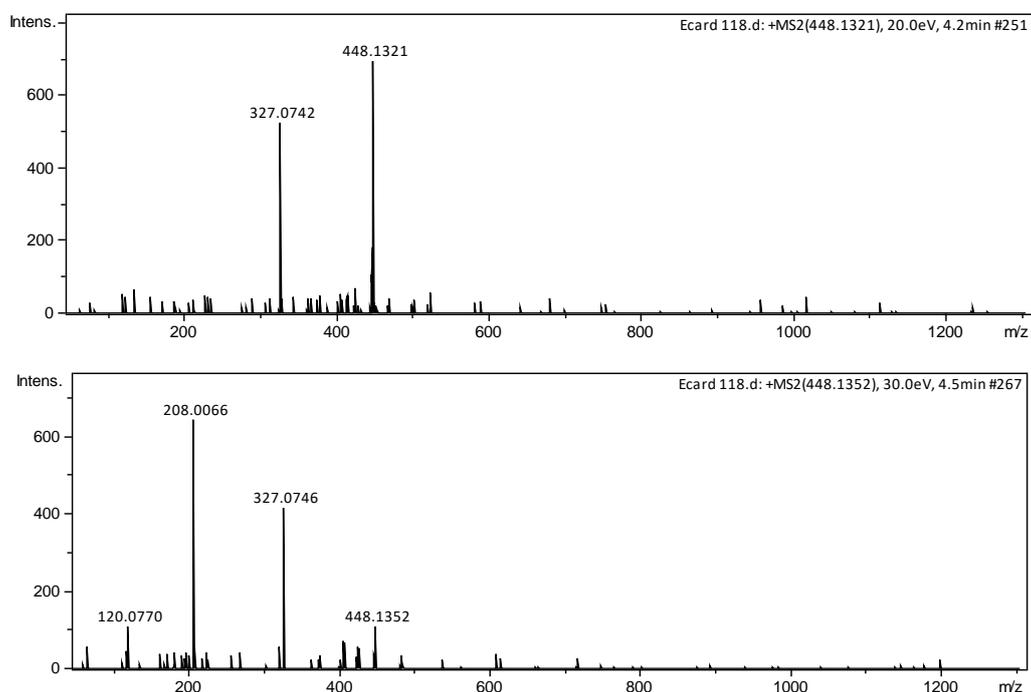
Espectro de RMN ^{13}C do N,3-difenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanamida (4f)



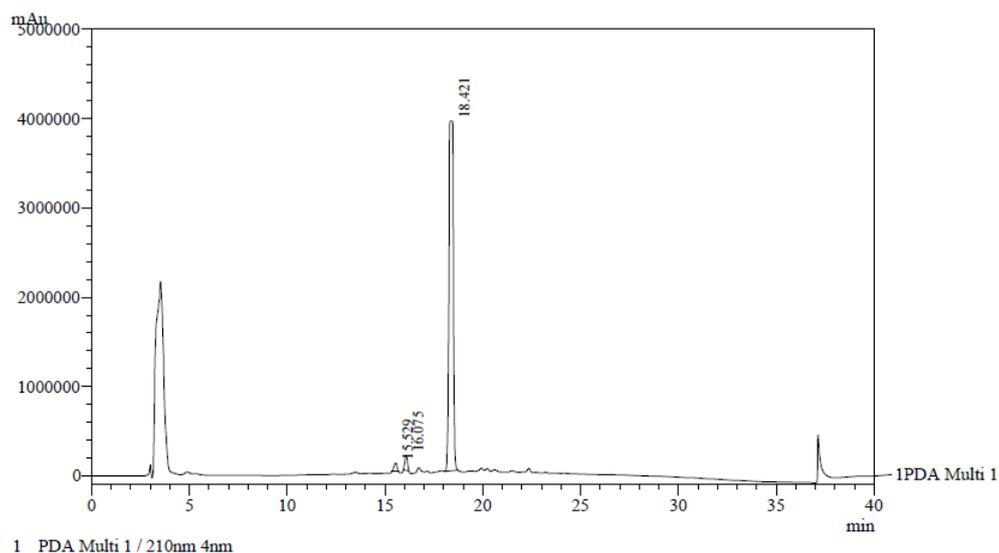
Espectro de infravermelho do N,3-difenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanamida (4f)



Espectro de HRMS do N,3-difenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanamida (4f)

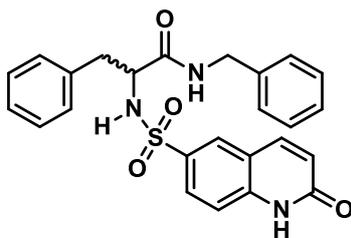


Espectro de CLAE do N,3-difenil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida) propanamida (4f)



PDA Ch1 210nm 4nm

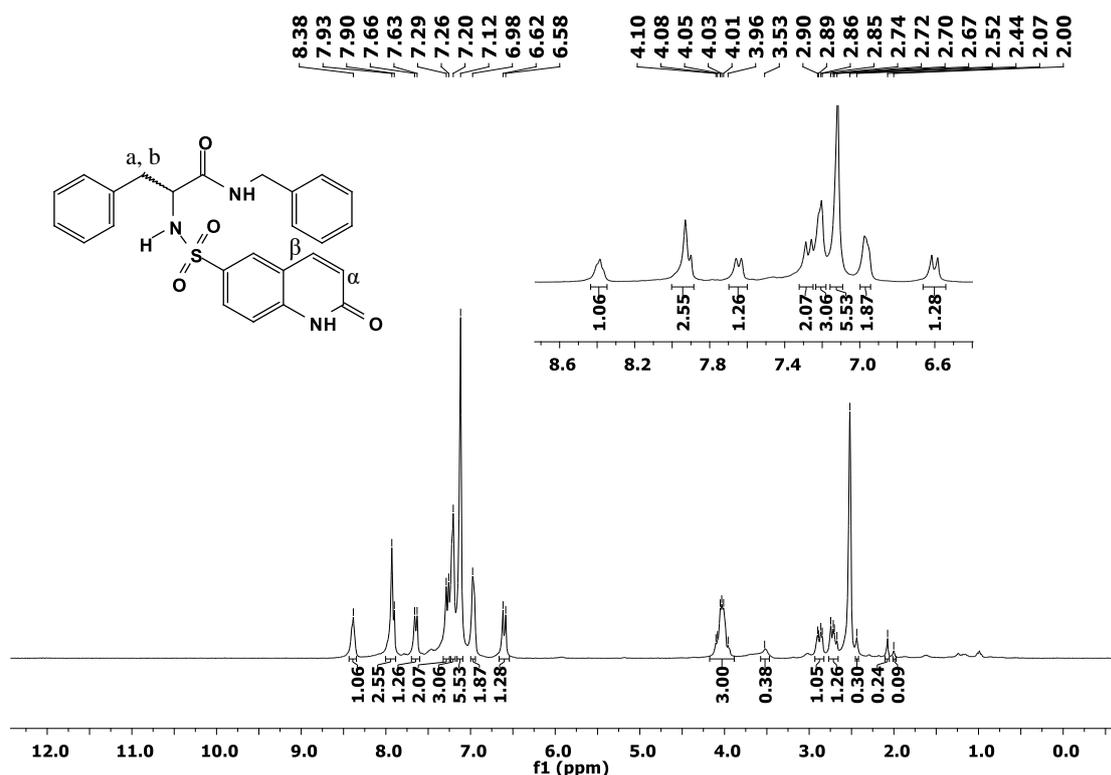
Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Tailing Factor	Area %	Peak Purity Index
1	15.529	1052196	0.000	0.980	1.665	0.99999
2	16.075	1525194	1.924	0.999	2.413	1.00000
3	18.421	60623342	7.917	0.811	95.922	0.97718
Total		63200733			100.000	



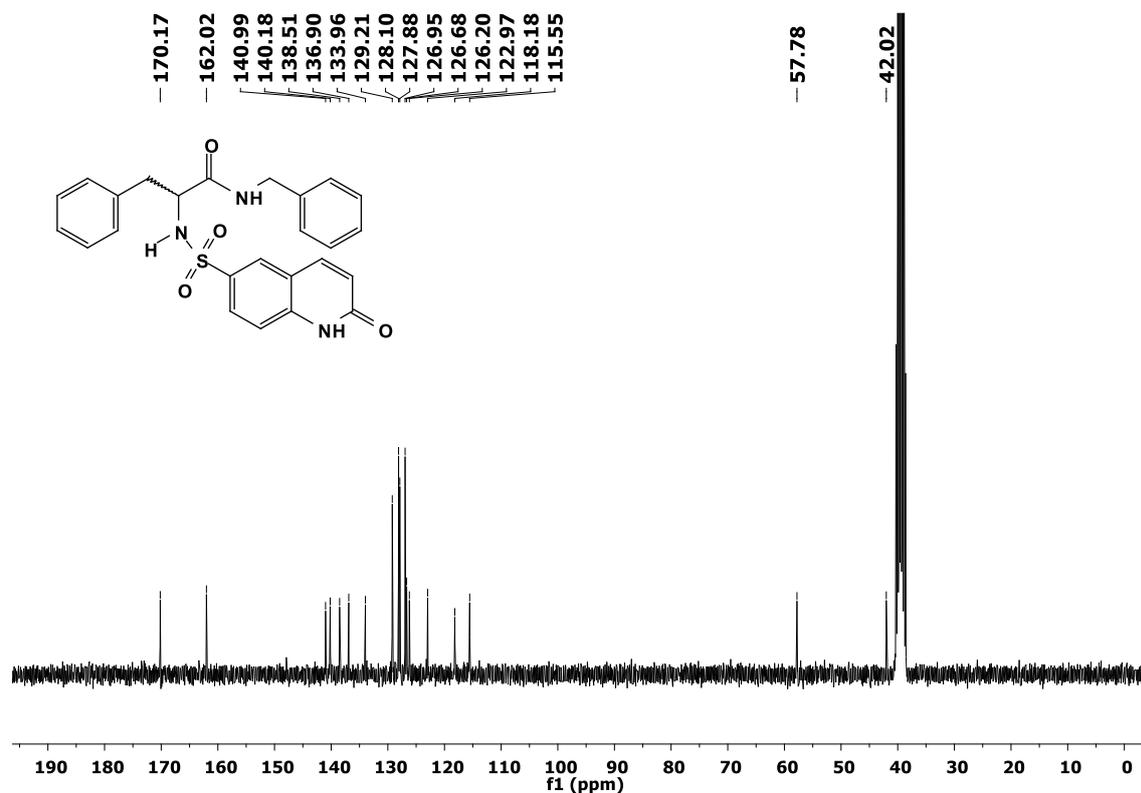
4g

3-fenil-N-benzil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida(4g): RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,38 (s, 1H, C=ONH), 7,93 (s, 1H, $\text{SO}_2\text{-NH}$), 7,90 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, CH_β), 7,65 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, ArH), 7,27 (d, $J = 8,9$, 2H, ArH), 7,20 (s, 3H, ArH_{benz}), 7,12 (s, 5H, ArH_{fenil}), 6,98 (s, 2H, ArH_{benz}), 6,60 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, 1H, CH_α), 4,18 – 3,90 (m, 3H, 2H- CH_2 benzil, , 1H- $\text{CH}_{\text{quiral}}$), 2,87 (dd, $J = 12,2, 4,3$ Hz, 1H, CH_α de CH_2), 2,71 (dd, $J = 12,9, 9,0$ Hz, 1H, CH_β de CH_2). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 170,17, 162,02, 140,99, 140,18, 138,51, 136,90, 133,96, 129,21, 128,10, 127,88, 126,95, 126,68, 126,20, 122,97, 118,18, 115,55, 57,78, 42,02. FTIR (cm^{-1}): 3310, 3255, 1734, 1655, 1542, 1338, 1153, 1058, 832, 746. ESI HRMS cal, para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 461,53, Achado 462,1468. Pureza: 95%. $[\alpha]_{\text{D}^{20}} = 2,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 168-170°C. Sólido amarelo. Rendimento= 50%.

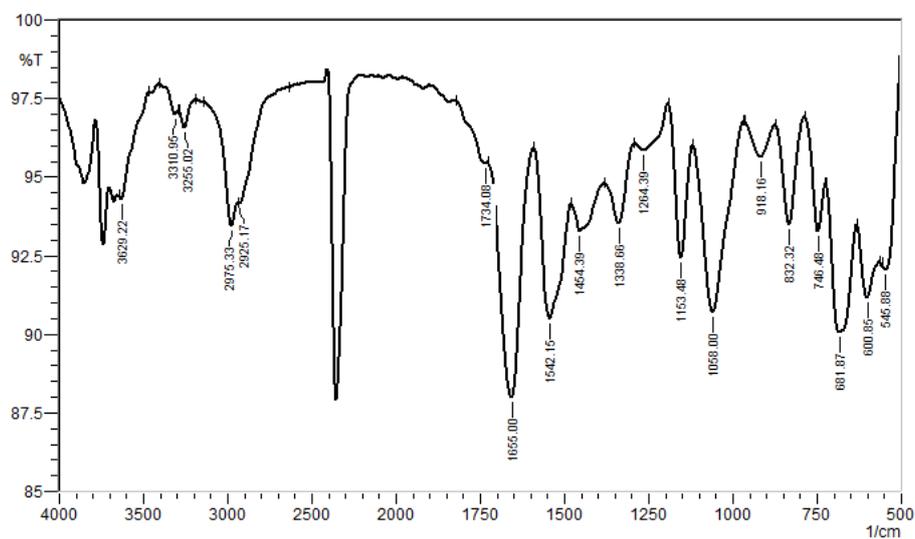
Espectro de RMN ^1H do 3-fenil-N-benzil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4g)



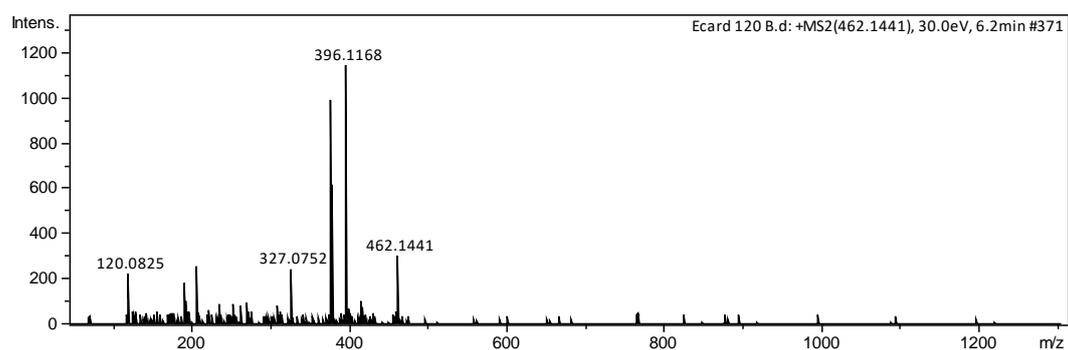
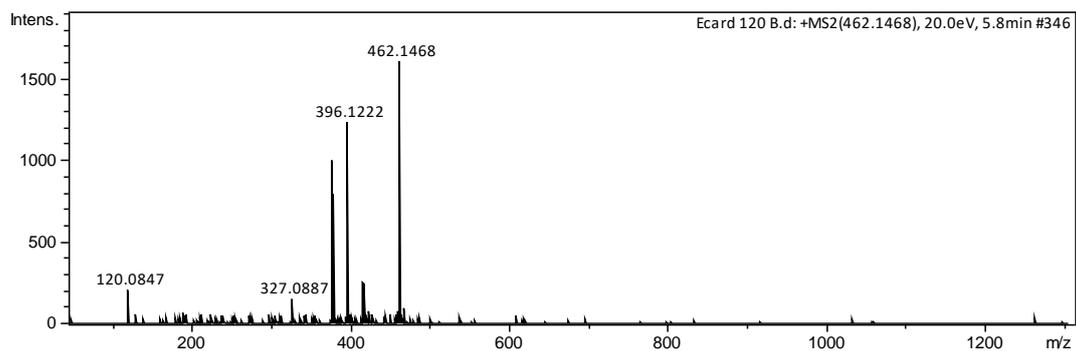
Espectro de RMN ^{13}C do 3-fenil-N-benzil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4g)



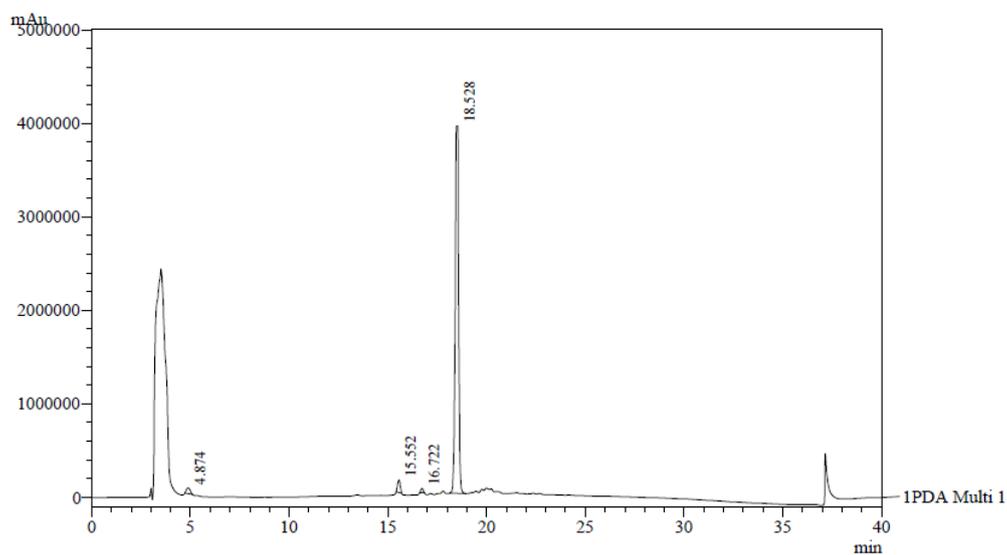
Espectro de infravermelho do 3-fenil-N-benzil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4g)



Espectro de HRMS do 3-fenil-N-benzil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4g)

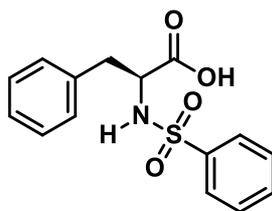


Espectro de CLAE do 3-fenil-N-benzil-2-(2-oxo-1,2-dihidroquinolina-6-sulfonamida)propanamida (4g)



PDA Ch1 210nm 4nm

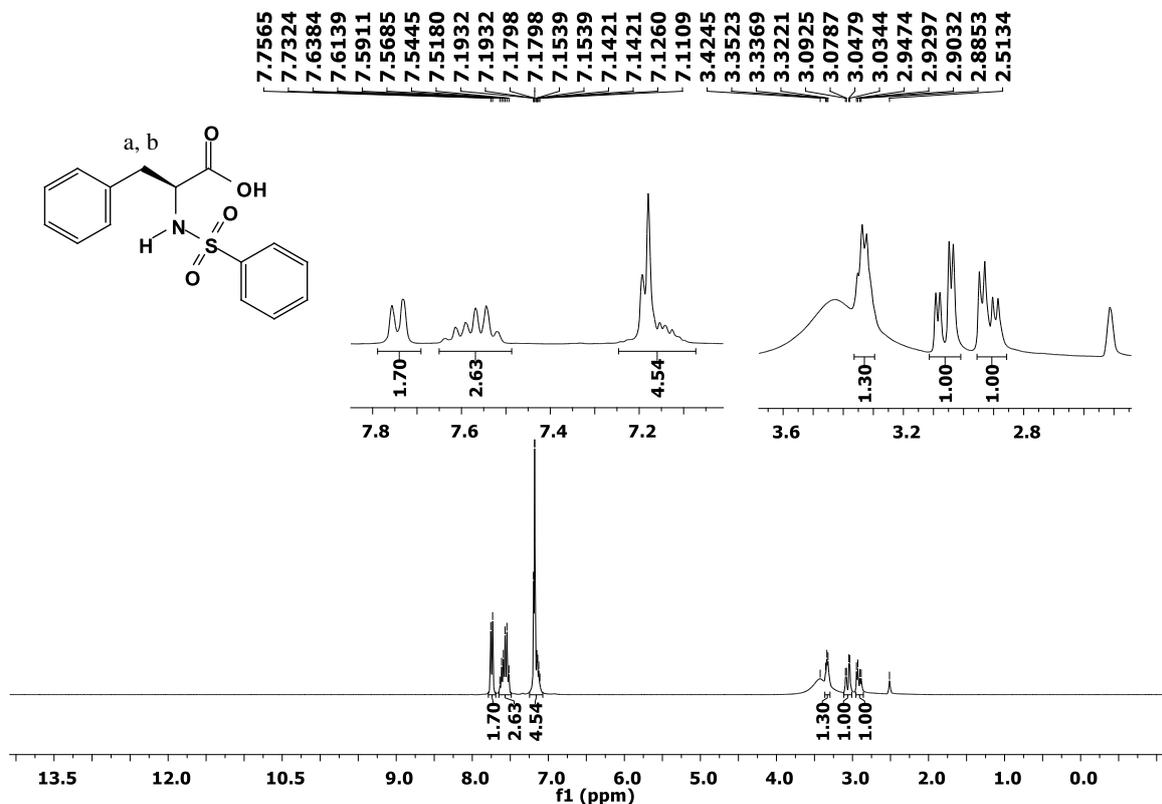
Peak#	Ret. Time	Area	Resolution	Tailing Factor	Area %	Peak Purity Index
1	4.874	799859	0.000	1.158	1.628	1.00000
2	15.552	1275277	33.985	1.033	2.595	1.00000
3	16.722	362333	4.770	0.985	0.737	1.00000
4	18.528	46703267	7.190	0.831	95.040	0.99897
Total		49140736			100.000	

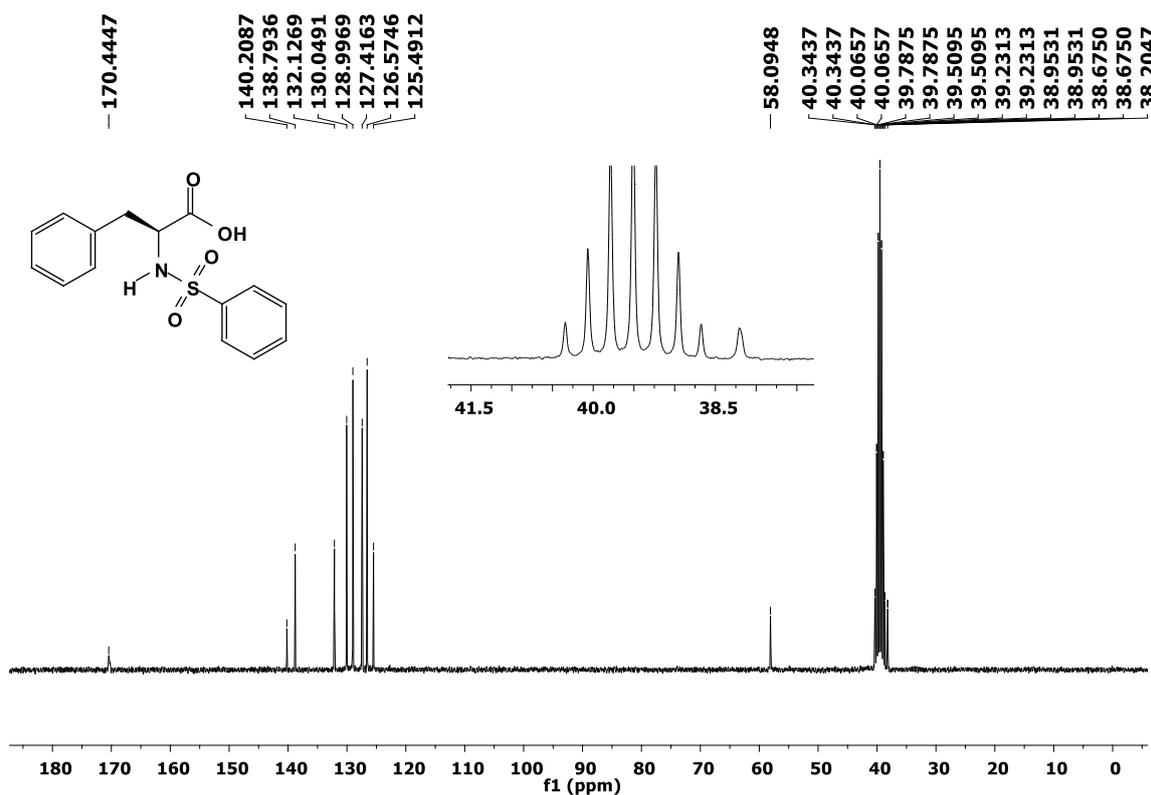
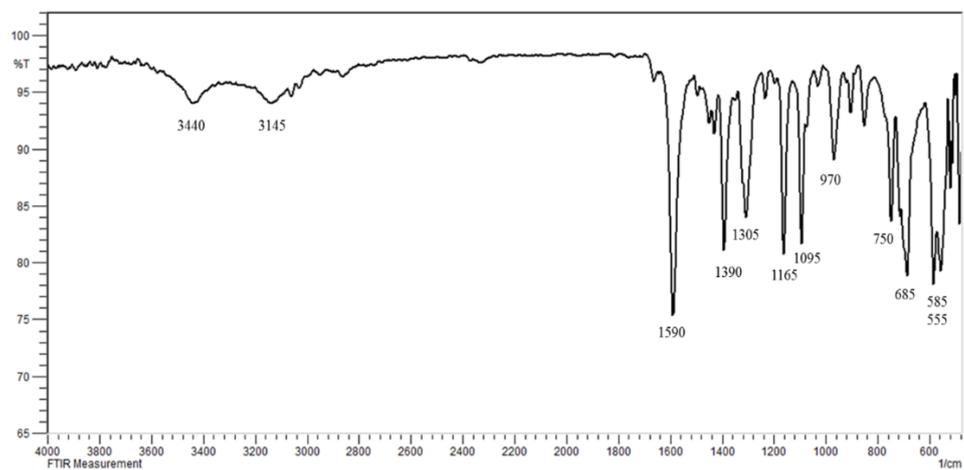


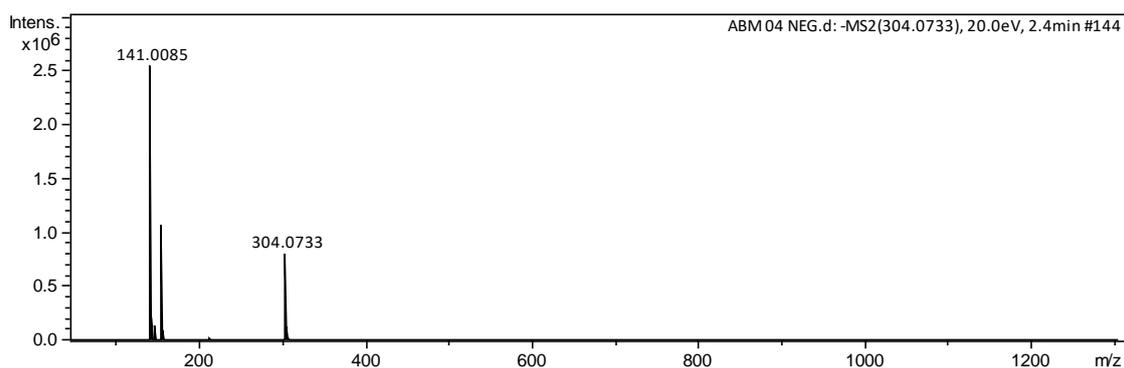
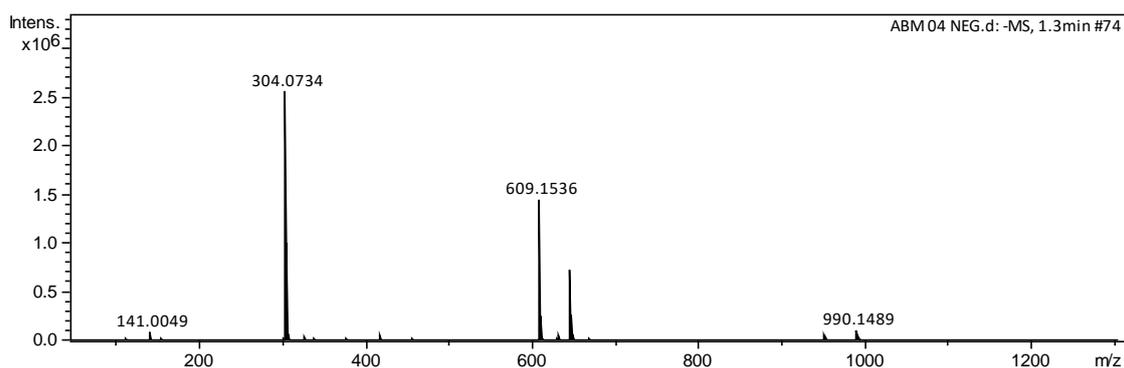
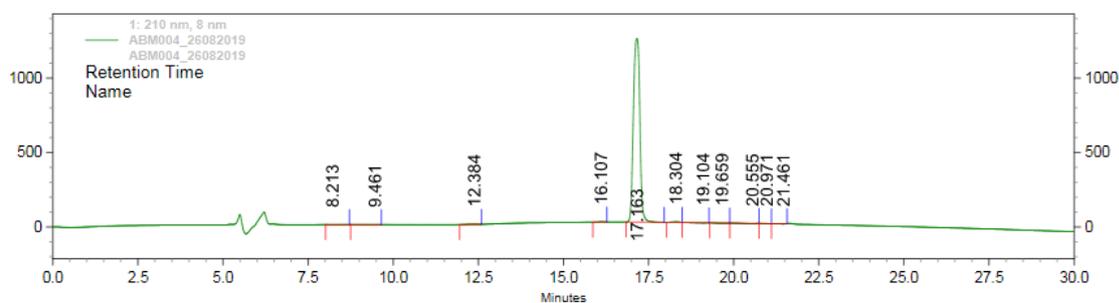
5a

(S)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-fenilpropanóico (5a): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,74 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, ArH), 7,66 – 7,51 (m, 2H, ArH), 7,19 – 7,11 (m, 5H, ArH_{fenil}), 3,35 – 3,32 (m, 1H, CH_{quiral}), 3,06 (dd, $J = 13,3, 4,1$ Hz, 1H, CH_a de CH₂), 2,92 (dd, $J = 13,3, 5,3$ Hz, 1H, CH_b de CH₂). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170,44, 140,21, 138,79, 132,13, 130,05, 129,00, 127,42, 126,57, 125,49, 58,09, 38,20. FTIR (cm^{-1}): 3440, 3145, 1590, 1390, 1305, 1165, 1095, 970, 750, 685. ESI HRMS cal, para C₁₅H₁₅NO₄S: [M - H]⁻ m/z 304,35, Achado 304,0734. Pureza: 98%. $[\alpha]_D^{20} = 43,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 100-102 °C. Sólido branco. Rendimento= 65%.

Espectro de RMN ^1H do (S)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-fenilpropanóico (5a)



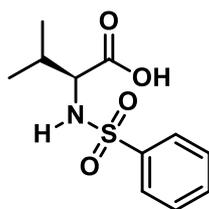
Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-fenilpropanóico (5a)Espectro de infravermelho do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-fenilpropanóico (5a)

Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-fenilpropanóico (5a)Espectro de CLAE do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-fenilpropanóico (5a)

1: 210 nm, 8 nm

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		8.213	19872	0.12	0.07
2		9.461	12760	0.08	0.04
3		12.384	31350	0.19	0.11
4		16.107	23281	0.14	0.18
5		17.163	16266442	97.96	98.57
6		18.304	42004	0.25	0.25
7		19.104	53866	0.32	0.14
8		19.659	34449	0.21	0.12
9		20.555	66404	0.40	0.21
10		20.971	17789	0.11	0.10
11		21.461	36750	0.22	0.20

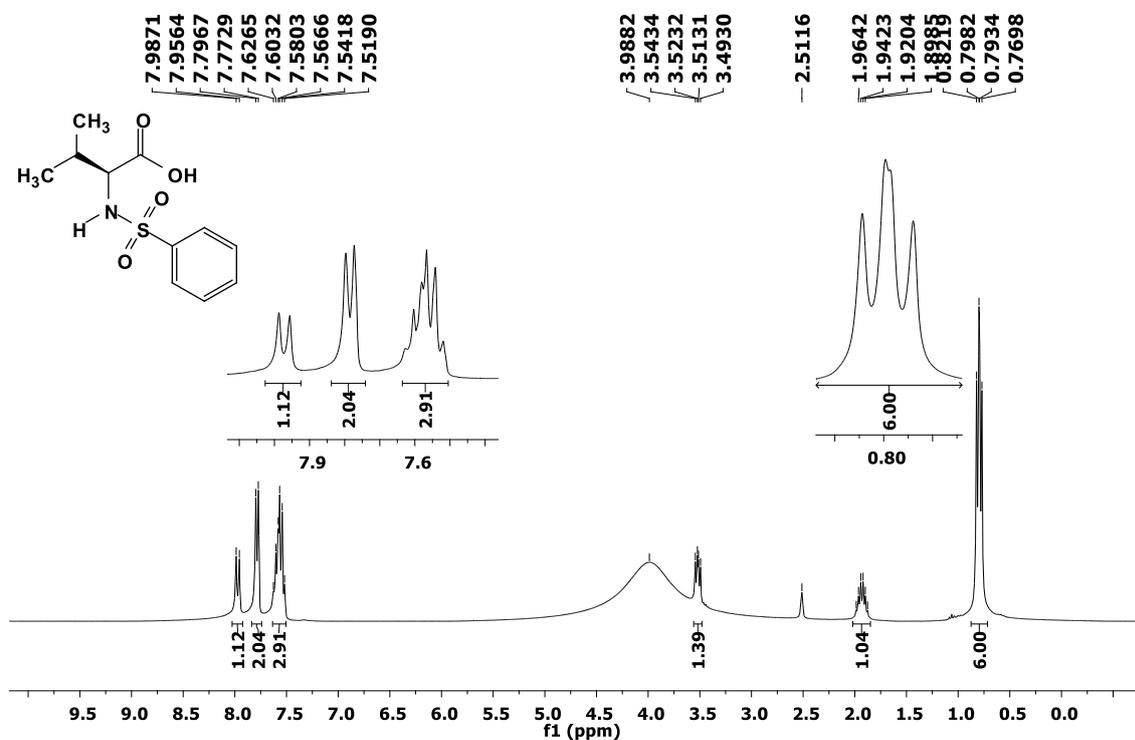
Totals			16604967	100.00	100.00
--------	--	--	----------	--------	--------

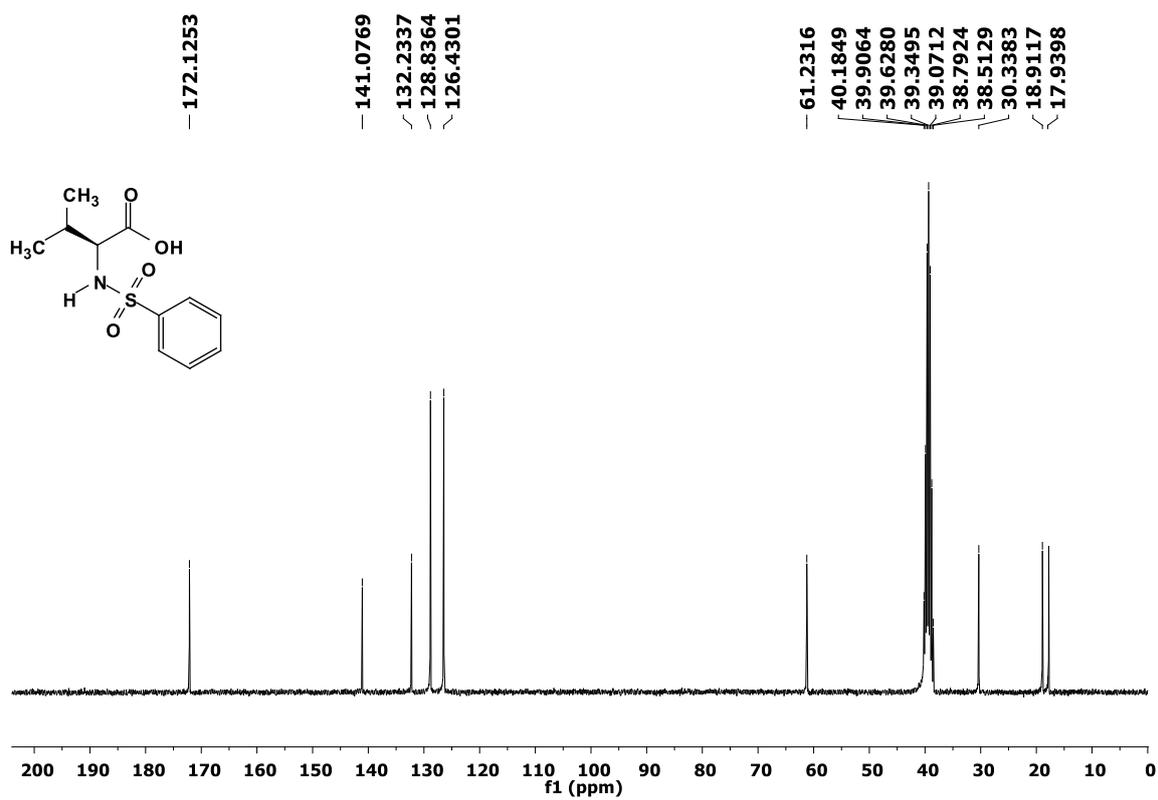
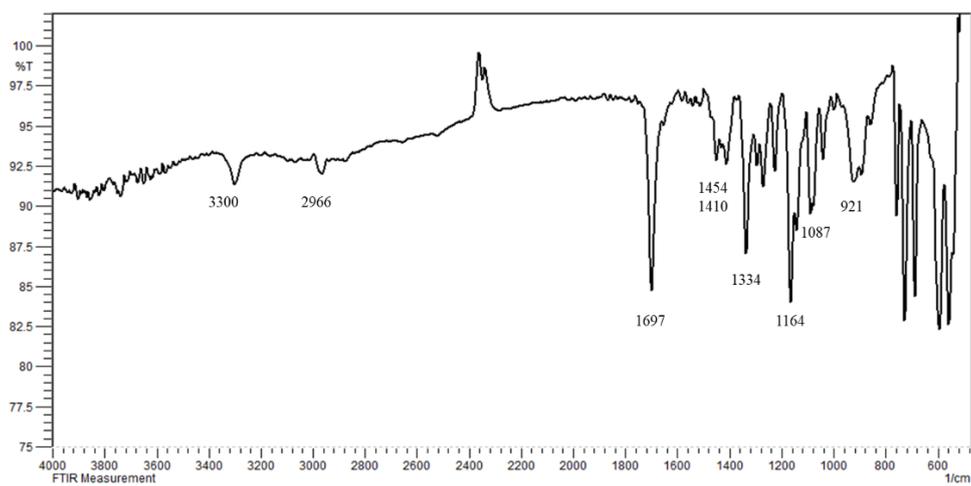


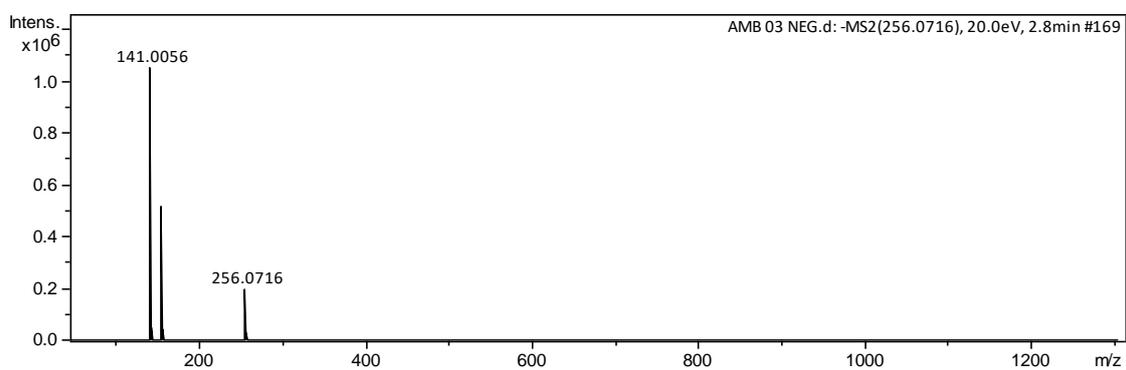
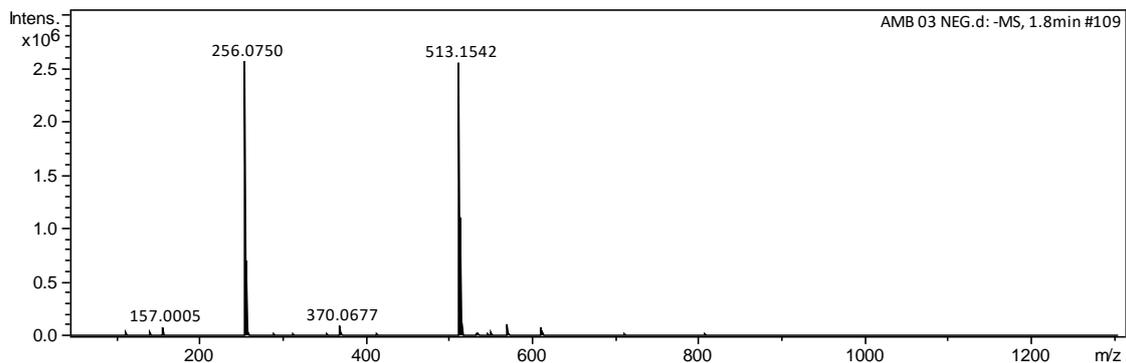
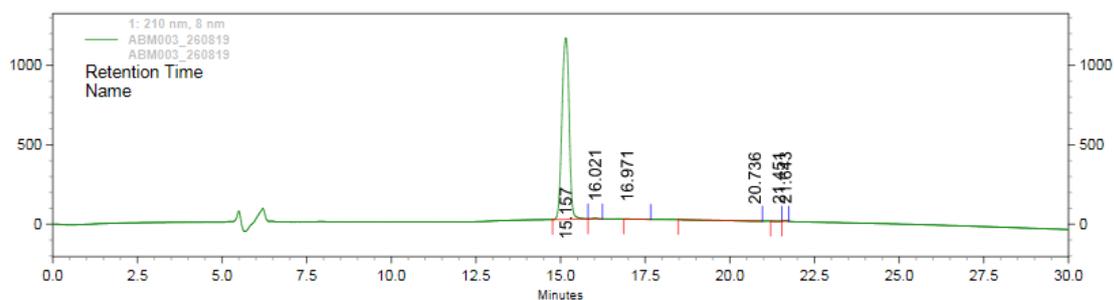
5b

(S)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-metilbutanoico (5b): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,97 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, SO $_2$ -NH), 7,78 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, ArH), 7,62 – 7,51 (m, 3H, ArH), 3,52 (dd, $J = 9,1, 6,0$ Hz, 1H, CH $_{\text{quiral}}$), 1,93 (dq, $J = 13,2, 6,6$ Hz, 1H, CH $_{\text{isobut}}$), 0,80 (dd, $J = 8,5, 7,1$ Hz, 6H, CH $_3$). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172,13, 141,08, 132,23, 128,84, 126,43, 61,23, 30,34, 18,91, 17,94. FTIR (cm $^{-1}$): 3300, 1697, 1454, 1410, 1334, 1164, 1087, 921. ESI HRMS cal, para C $_{11}$ H $_{15}$ NO $_4$ S: [M - H] $^-$ m/z 256,31, Achado 256,0750. Pureza: 98,5%. $[\alpha]_D^{20} = 28,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 180-182 °C. Sólido branco. Rendimento= 80%.

Espectro de RMN ^1H do (S)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-metilbutanoico (5b)



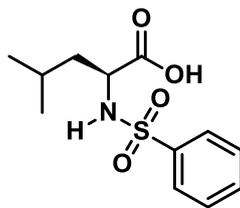
Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-metilbutanóico (5b)Espectro de infravermelho do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-metilbutanóico (5b)

Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-metilbutanóico (5b)Espectro de CLAE do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-metilbutanóico (5b)

1: 210 nm, 8 nm

PK #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		15.157	16841255	98.51	99.07
2		16.021	46424	0.27	0.38
3		16.971	15182	0.09	0.06
4		20.736	154425	0.90	0.11
5		21.451	17431	0.10	0.14
6		21.643	22053	0.13	0.25

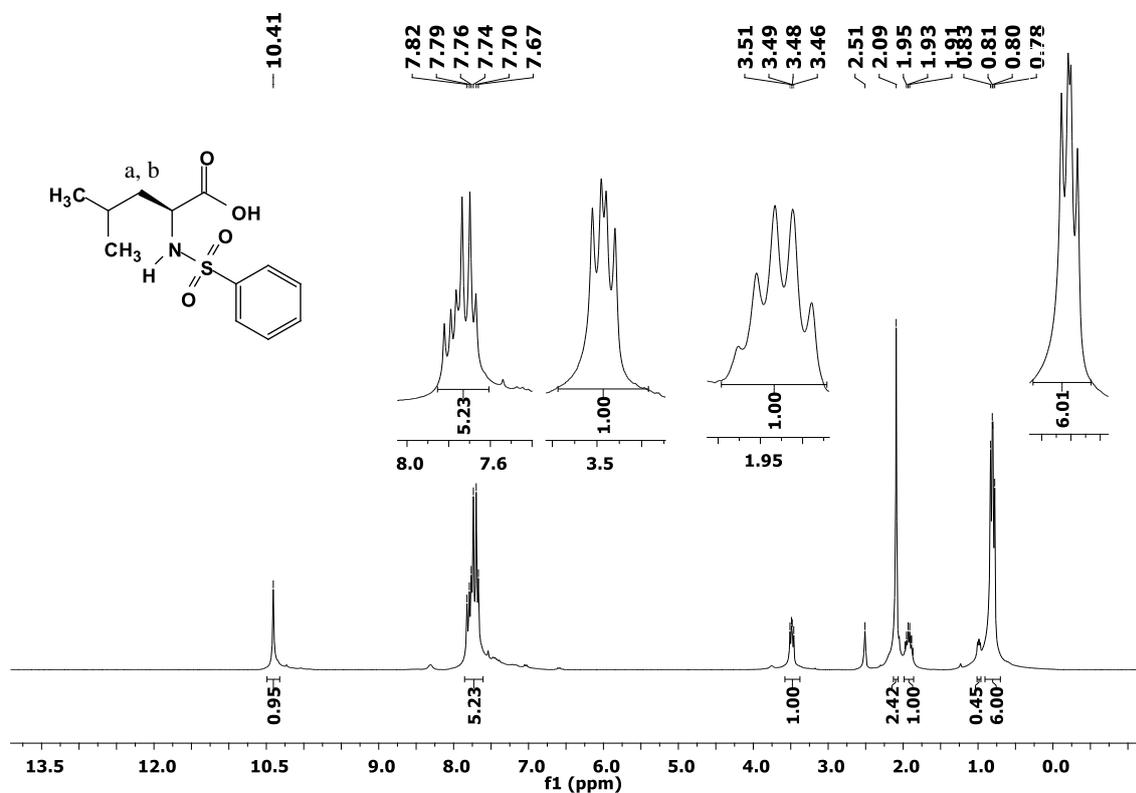
Totals			17096770	100.00	100.00
--------	--	--	----------	--------	--------

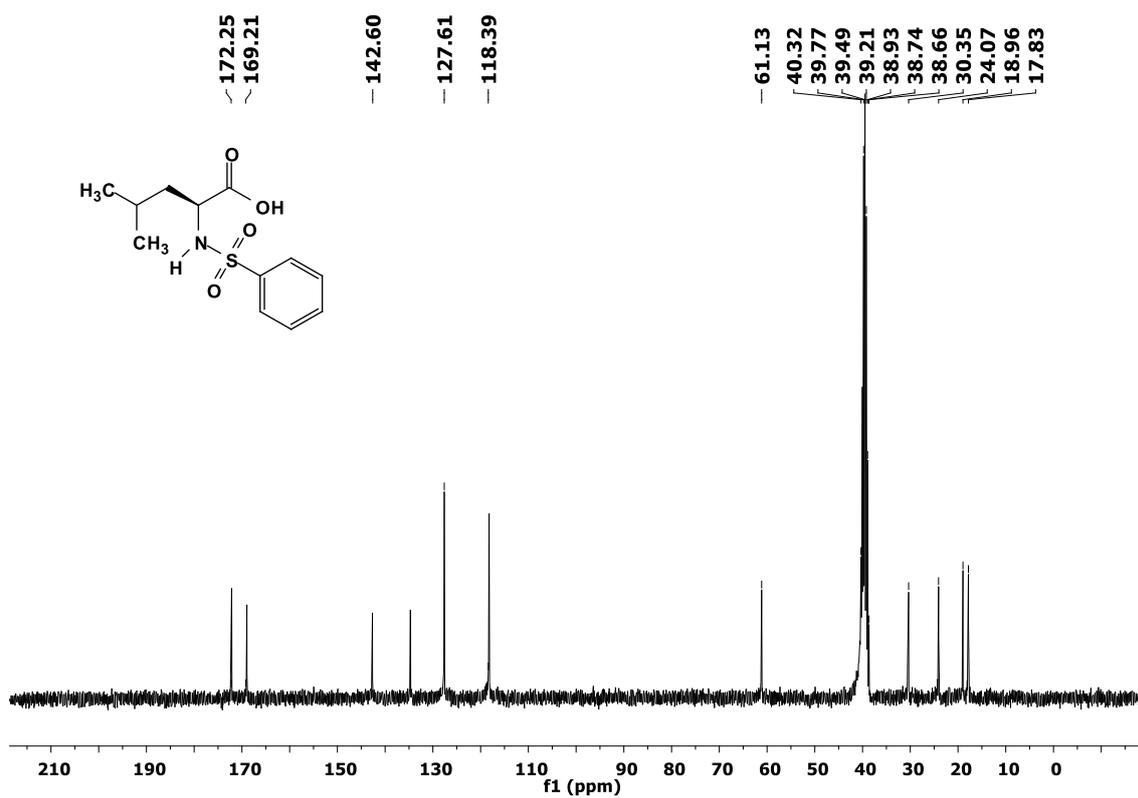
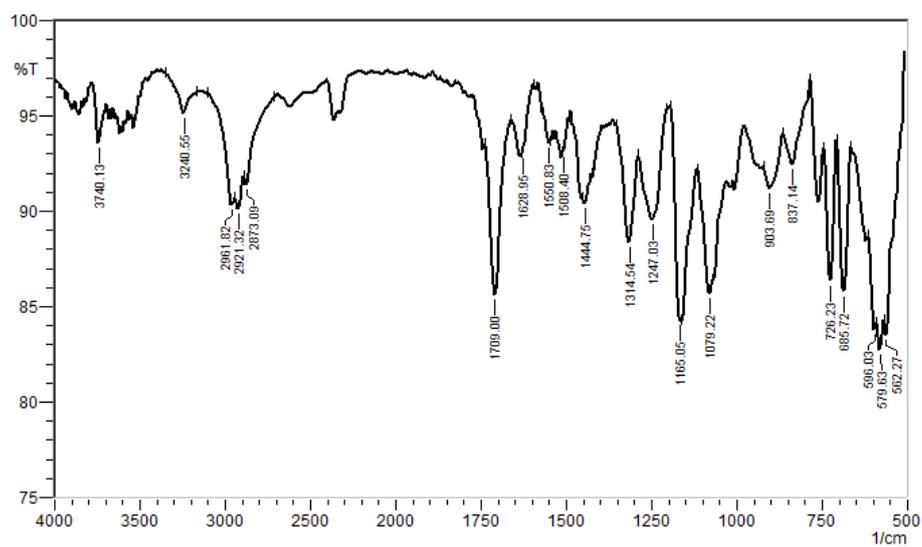


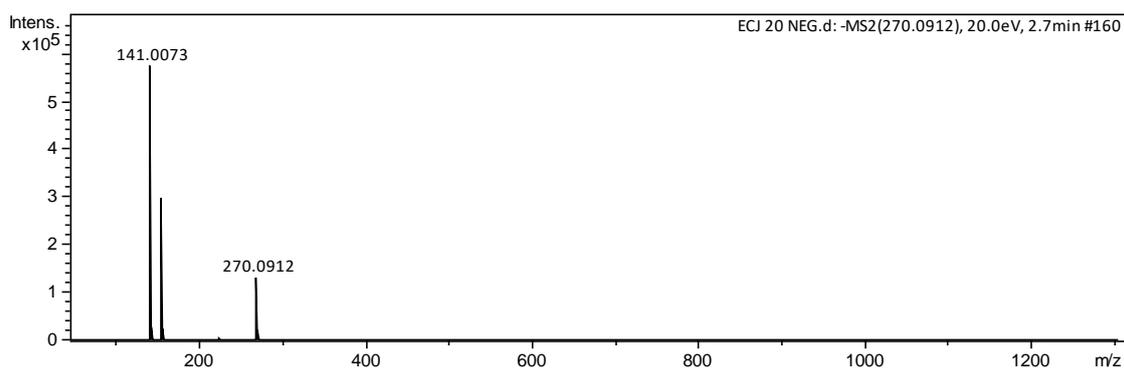
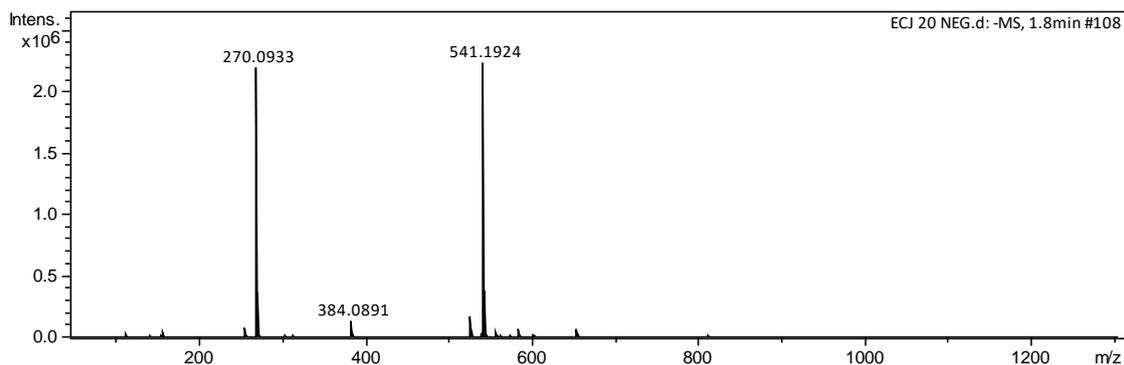
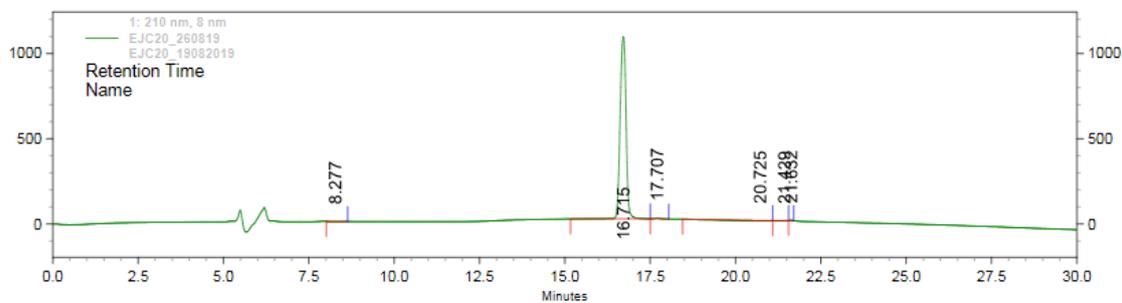
5c

(S)-ácido 2-benzenosulfonamida-4-metilpentanoico (5c): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,41 (s, 1H, OH), 7,82-7,67 (m, 5H, ArH), 3,49 (dd, $J = 9,2, 6,0$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{quiral}}$), 2,09 (s, 2H, CH_a e CH_b de CH_2), 1,92 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{isobut}}$), 0,81 (dd, $J = 9,6, 6,9$ Hz, 6H, CH_3). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172,25, 169,21, 142,66, 134,71, 127,61, 118,39, 61,13, 30,35, 24,07, 18,96, 17,83. FTIR (cm^{-1}): 3240, 1709, 1628, 1550, 1444, 1314, 1247, 1165, 1079, 903, 837, 726. ESI HRMS cal, para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$: $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 270,33, Achado 270,0933. Pureza: 97%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 139-140 $^\circ\text{C}$. Sólido branco. Rendimento= 75%.

Espectro de RMN ^1H do (S)-ácido 2-benzenosulfonamida-4-metilpentanoico (5c)

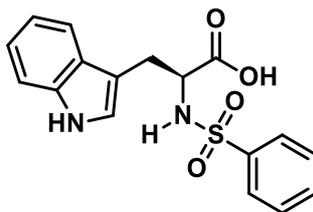


Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-4-metilpentanóico (5c)Espectro de infravermelho do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-4-metilpentanóico (5c)

Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-4-metilpentanóico (5c)Espectro de CLAE do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-4-metilpentanóico (5c)

1: 210 nm, 8 nm					
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		8.277	35590	0.27	0.14
2		16.715	12824264	97.00	98.84
3		17.707	50405	0.38	0.38
4		20.725	258396	1.95	0.22
5		21.429	41598	0.31	0.25
6		21.632	10188	0.08	0.17

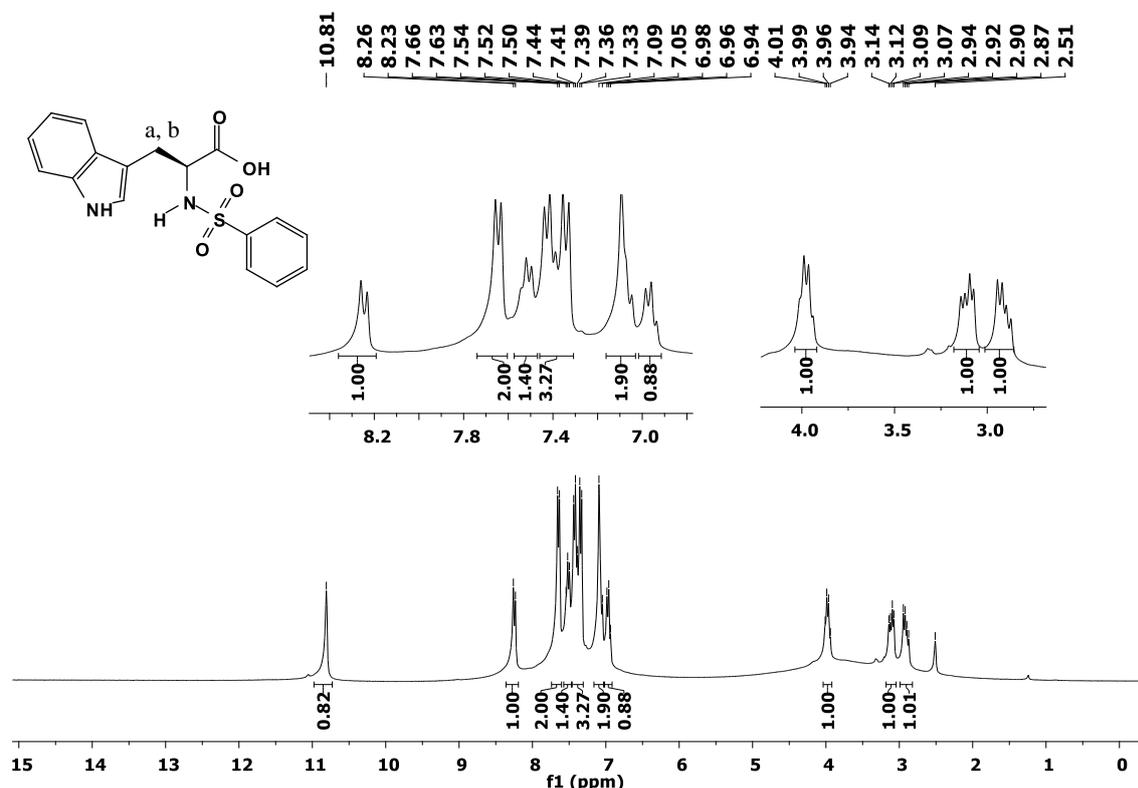
Totals			13220441	100.00	100.00
--------	--	--	----------	--------	--------



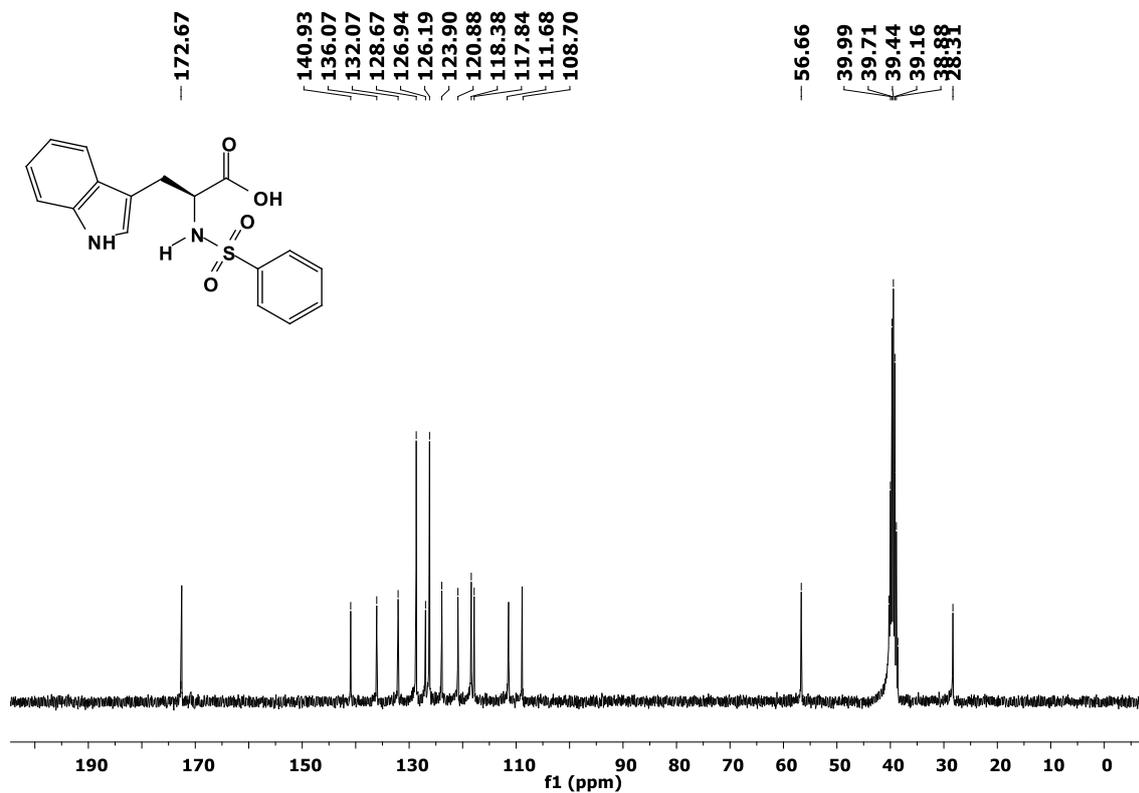
5d

(S)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-(1H-indol-3-il)propanoico (5d): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,81 (s, 1H, OH), 8,25 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 1H, SO $_2$ -NH), 7,64 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, ArH), 7,54 – 7,50 (t, $J = 6$ Hz, 2H, ArH_{indol}), 7,44 – 7,33 (m, 3H, ArH), 7,07 (m, 2H, ArH_{indol}), 6,98 – 6,94 (t, $J = 6$ Hz, 1H, ArH_{indol}), 3,98 (dd, $J = 14,3, 6,9$ Hz, 1H, CH_{quiral}), 3,11 (dd, $J = 14,1, 6,4$ Hz, 1H, CH_a de CH $_2$), 2,91 (dd, $J = 14,1, 7,5$ Hz, 1H, CH_b de CH $_2$). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172,67, 140,93, 136,07, 132,07, 128,67, 126,94, 126,19, 123,90, 120,88, 118,38, 117,84, 111,68, 108,70, 56,66, 28,31. FTIR (cm $^{-1}$): 3385, 3300, 1743, 1453, 1319, 1160, 1131, 1080, 932, 725. ESI HRMS cal, para C $_{17}$ H $_{16}$ N $_2$ O $_4$ S: [M - H] $^-$ m/z 343,38, Achado 343,0925. Pureza: 96%. $[\alpha]_D^{20} = -82,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 226 - 227 °C. Sólido cinza. Rendimento= 55%.

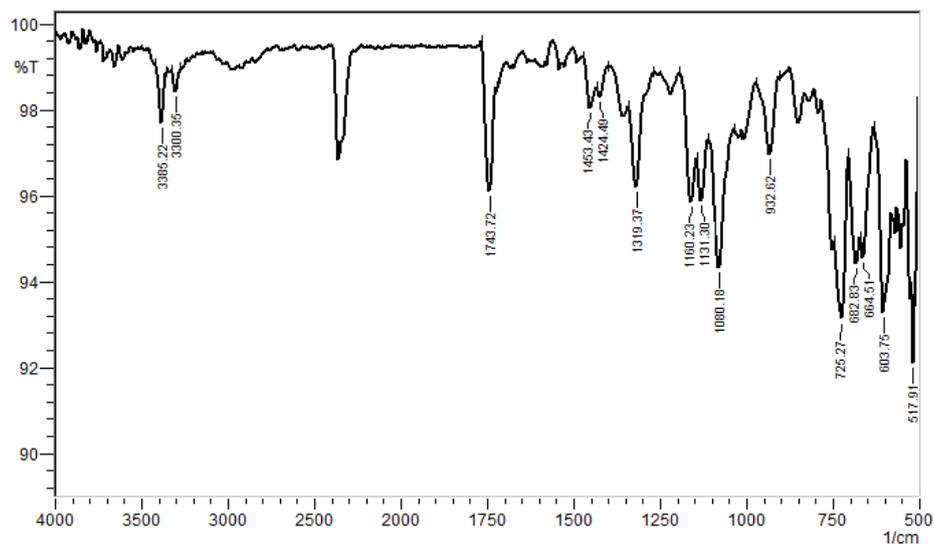
Espectro de RMN ^1H do (S)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-(1H-indol-3-il)propanoico (5d)

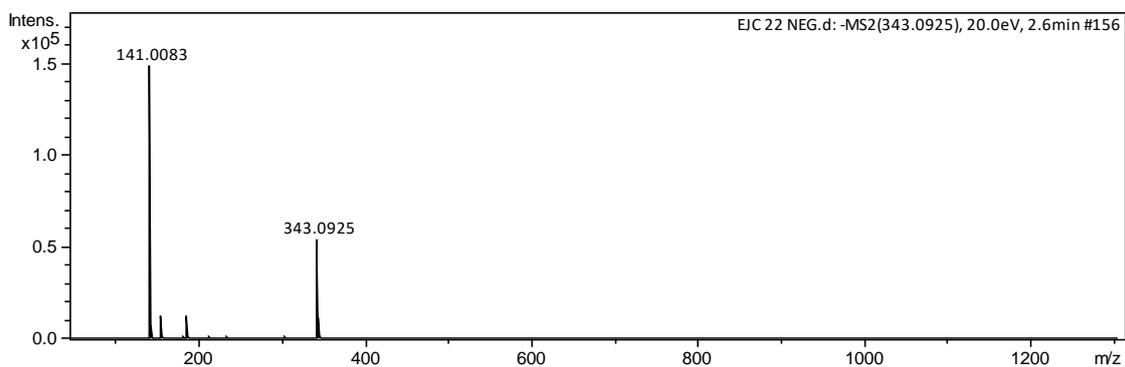
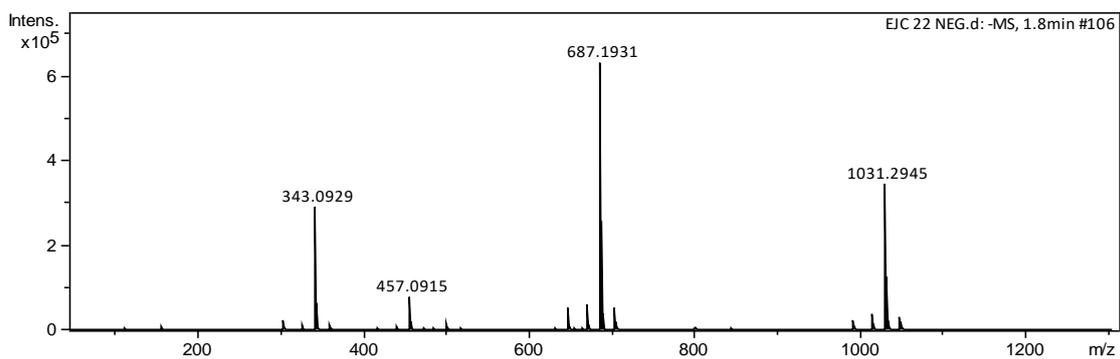
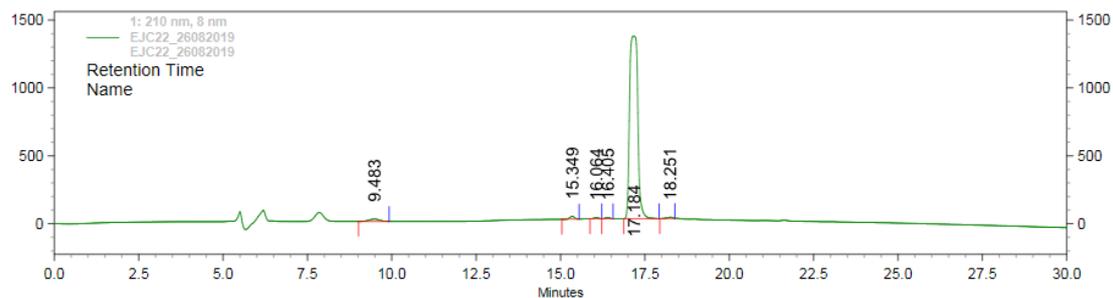


Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-(1*H*-indol-3-il)propanóico (5d)



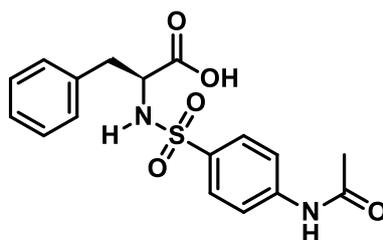
Espectro de infravermelho do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-(1*H*-indol-3-il)propanóico (5d)



Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-(1*H*-indol-3-il)propanóico (5d)Espectro de CLAE do (*S*)-ácido 2-benzenosulfonamida-3-(1*H*-indol-3-il)propanóico (5d)

1: 210 nm, 8 nm					
PK #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		9.483	369333	1.57	1.21
2		15.349	206466	0.88	1.45
3		16.064	90172	0.38	0.70
4		16.405	84659	0.36	0.67
5		17.184	22716967	96.38	95.31
6		18.251	102714	0.44	0.66

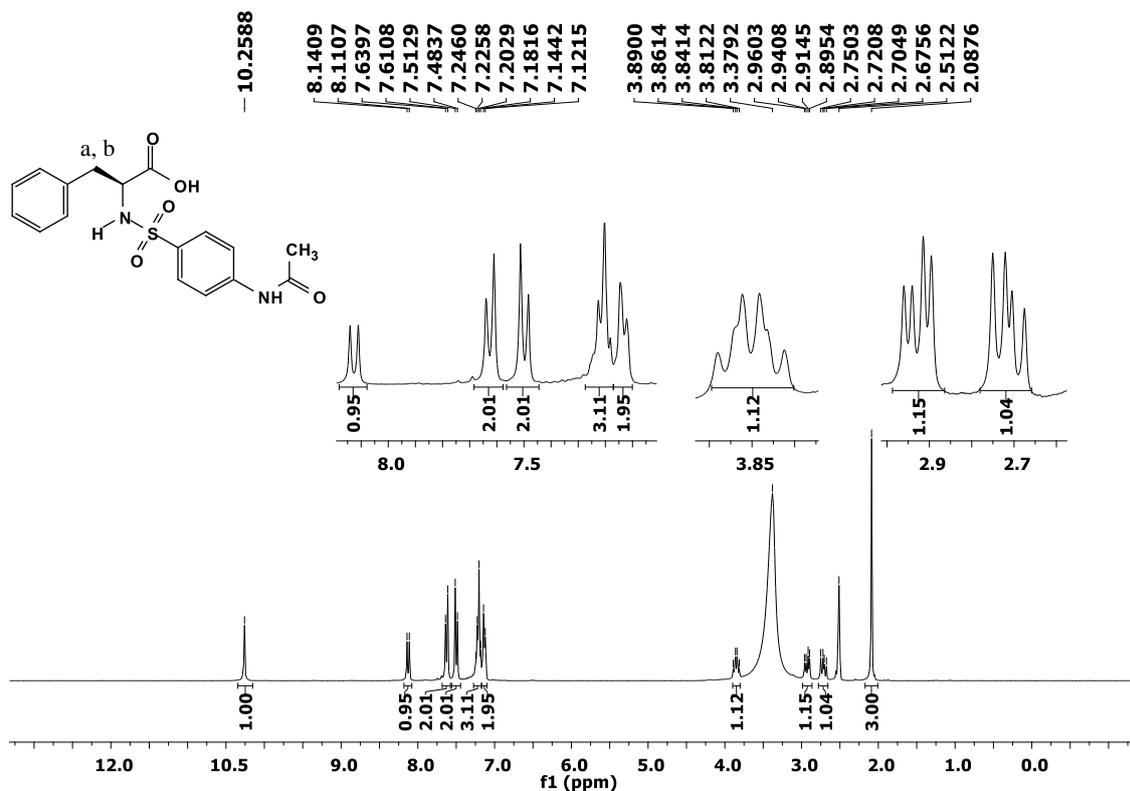
Totals			23570311	100.00	100.00
--------	--	--	----------	--------	--------



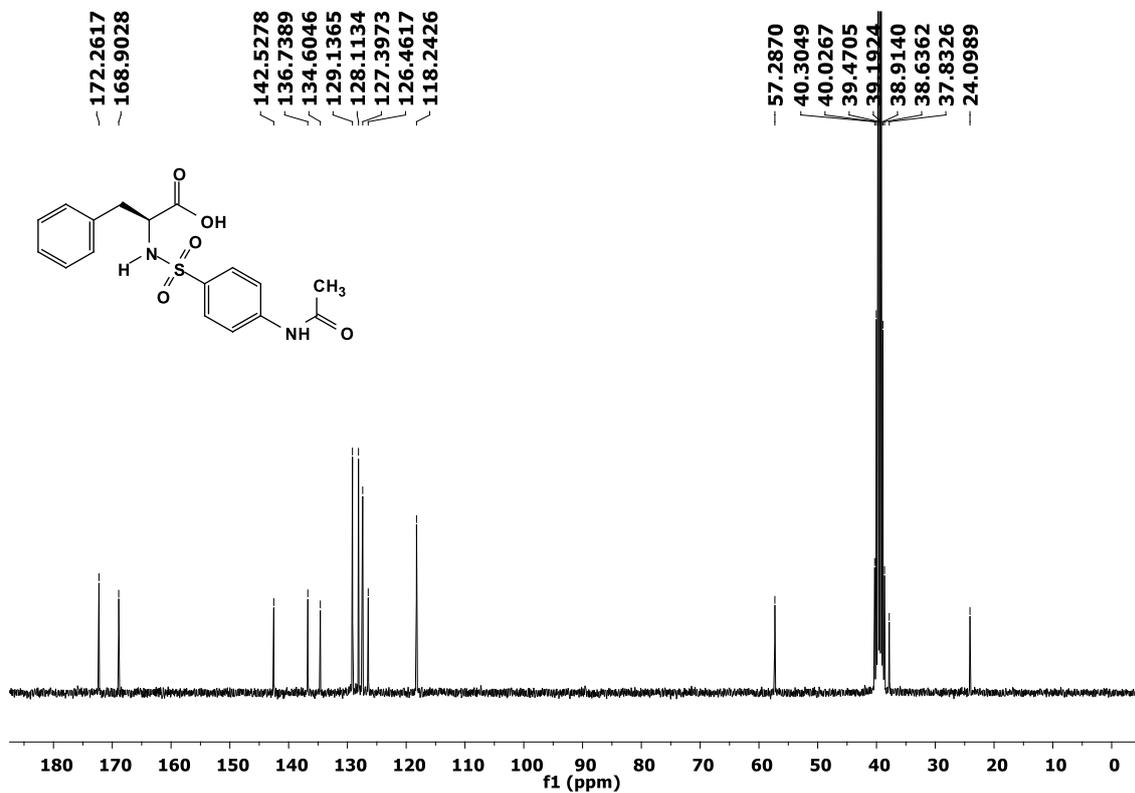
6a

(S)-ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoico (6a): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,25 (s, 1H, C=O-NH), 8,13 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, SO $_2$ -NH), 7,63 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, ArH), 7,50 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,24-7,18 (m, 3H, ArH_{fenil}), 7,13 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H, ArH_{fenil}), 3,85 (td, $J = 8,7, 6,2$ Hz, 1H, CH_{quiral}), 2,93 (dd, $J = 13,7, 5,8$ Hz, 1H, CH_a de CH $_2$), 2,71 (dd, $J = 13,6, 8,8$ Hz, 1H, CH_b de CH $_2$), 2,09 (s, 3H, CH $_3$). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 172,26, 168,90, 142,53, 136,74, 134,60, 129,14, 128,11, 127,40, 126,46, 118,24, 57,29, 24,10. FTIR (cm $^{-1}$): 3360, 3290, 1730, 1660, 1590, 1535, 1325, 1160, 1100, 975, 850, 835. ESI HRMS cal, para C $_{17}$ H $_{18}$ N $_2$ O $_5$ S: [M - H] $^-$ m/z 361,40, Achado 361,1008. Pureza: 96%. $[\alpha]_D^{20} = 3,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 199 - 201 °C. Sólido branco. Rendimento= 65%.

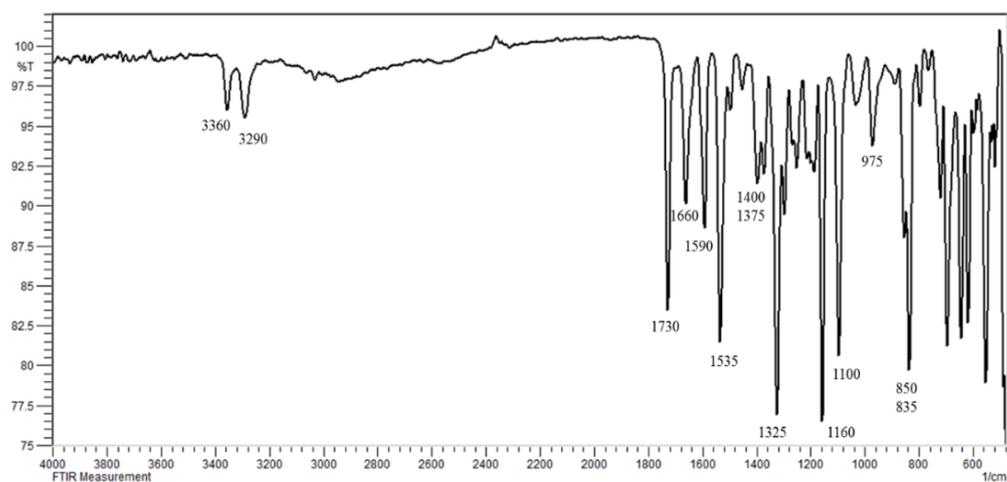
Espectro de RMN ^1H do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoico (6a)



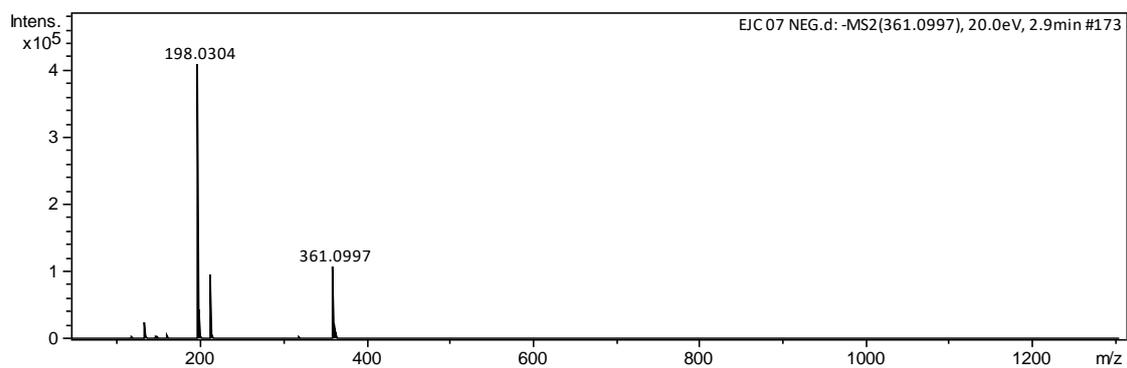
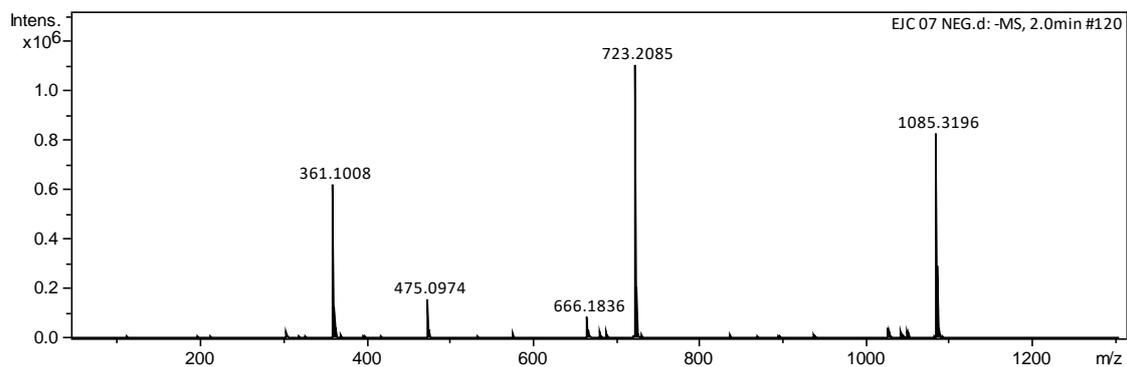
Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenilpropanoico (6a)

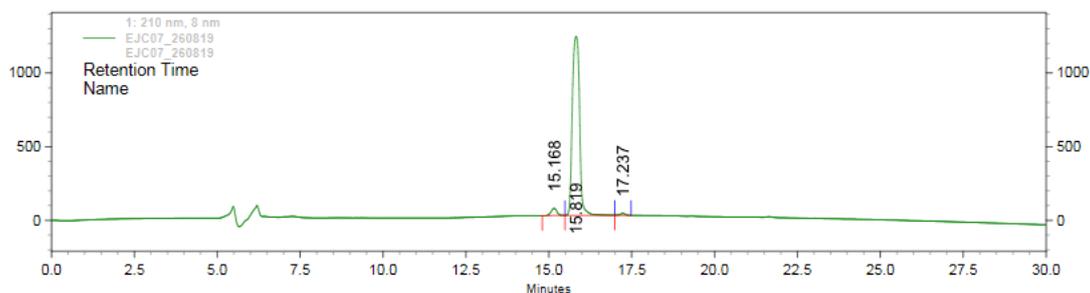


Espectro de infravermelho do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenil-propanoico (6a)

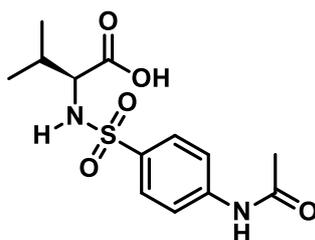


Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenil-propanoico (6a)



Espectro de CLAE do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidofenilsulfonamida)-3-fenil-propanóico (6a)

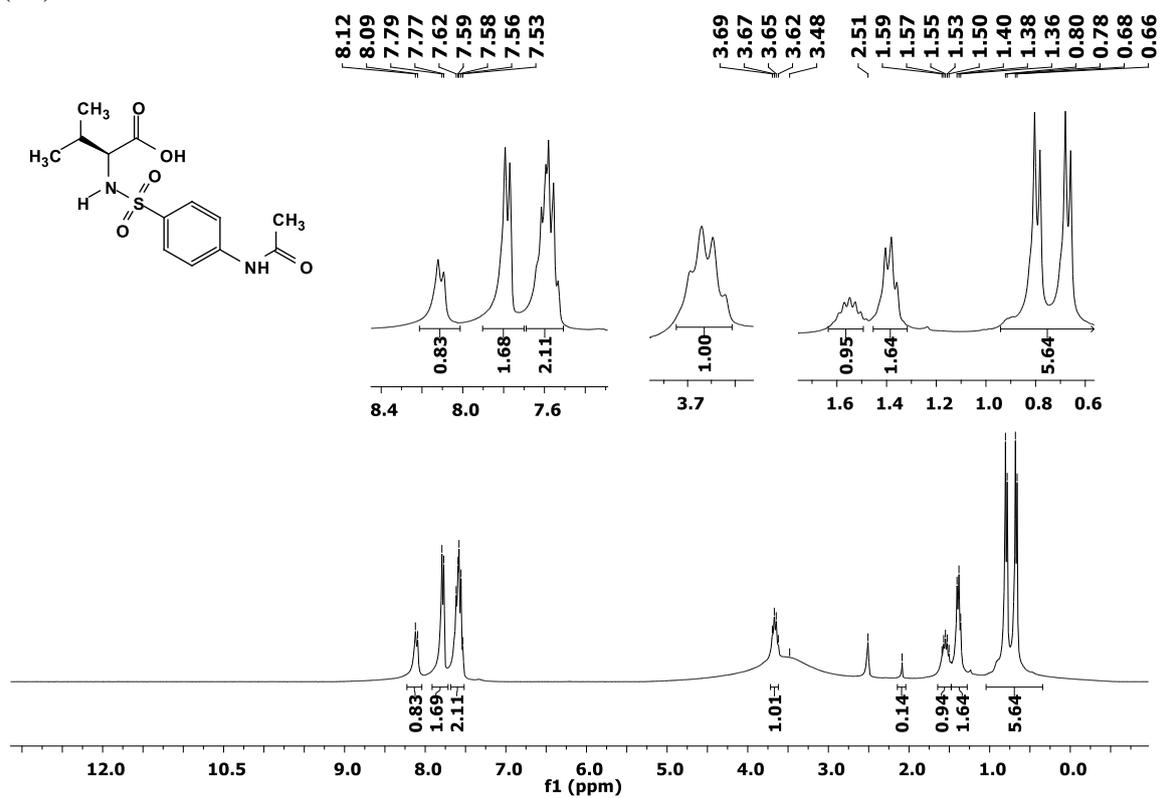
1: 210 nm, 8 nm					
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		15.168	583564	3.07	3.79
2		15.819	18313616	96.24	95.22
3		17.237	132535	0.70	0.99
Totals			19029715	100.00	100.00



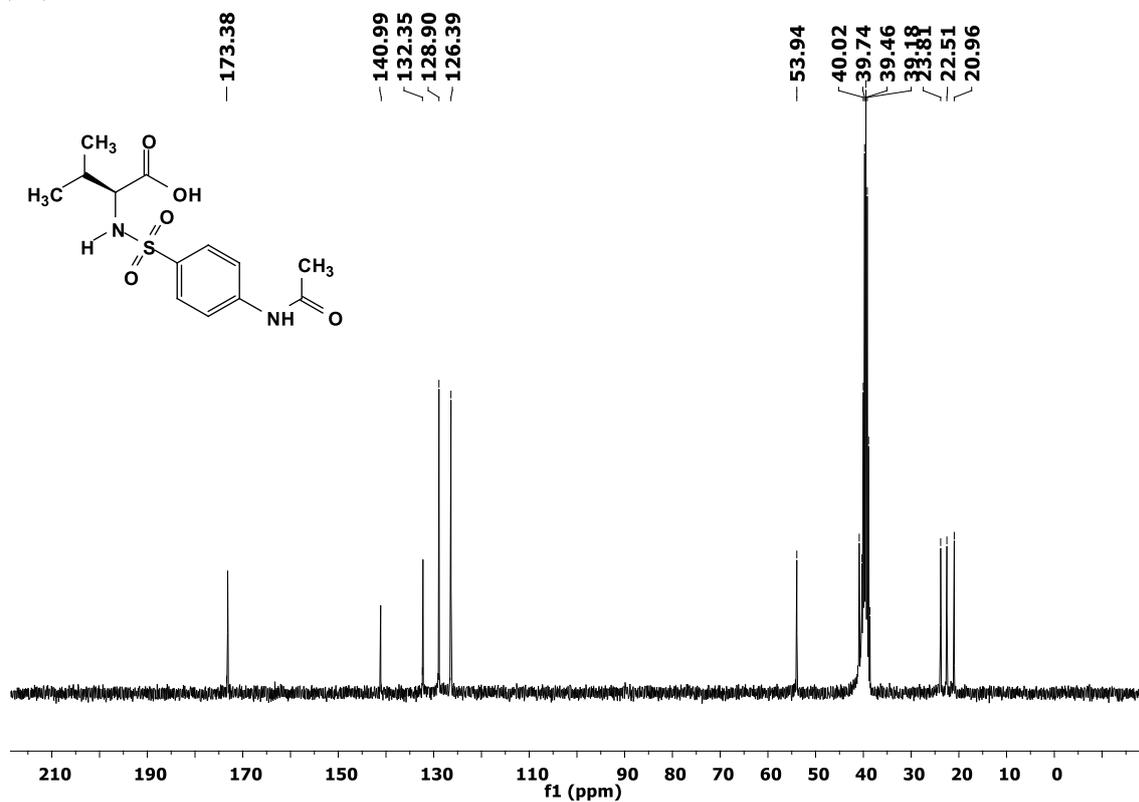
6b

(*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3metilbutanóico (6b): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,11 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, SO $_2$ -NH), 7,78 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, ArH), 7,70 – 7,47 (m, 2H, ArH), 3,66 (dd, $J = 14,6, 7,6$ Hz, 1H, CH $_{\text{quiral}}$), 1,70 – 1,47 (m, 1H, CH $_{\text{isobut}}$), 1,46 – 1,27 (m, 1,5H, CH $_3$ -C=O), 0,73 (dd, $J = 37,0, 6,5$ Hz, 6H, CH $_3$). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 173,38, 141,11, 132,35, 128,90, 126,39, 53,94, 40,87, 23,81, 22,51, 20,96. FTIR (cm $^{-1}$): 3363, 3249, 1714, 1590, 1543, 1330, 1158, 733, 690. ESI HRMS cal, para C $_{13}$ H $_{18}$ N $_2$ O $_5$ S: [M - H] $^-$ m/z 313,36, Achado 313,0889. Pureza: 96,5%. $[\alpha]_D^{20} = 59,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 114 - 116 °C. Sólido branco. Rendimento= 82%.

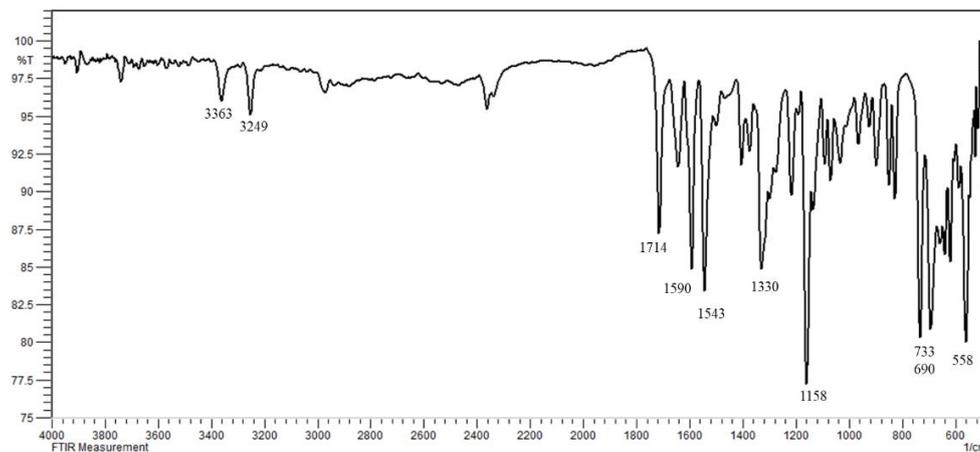
Espectro de RMN ^1H do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzosulfonamida)-3metilbutanóico (6b)



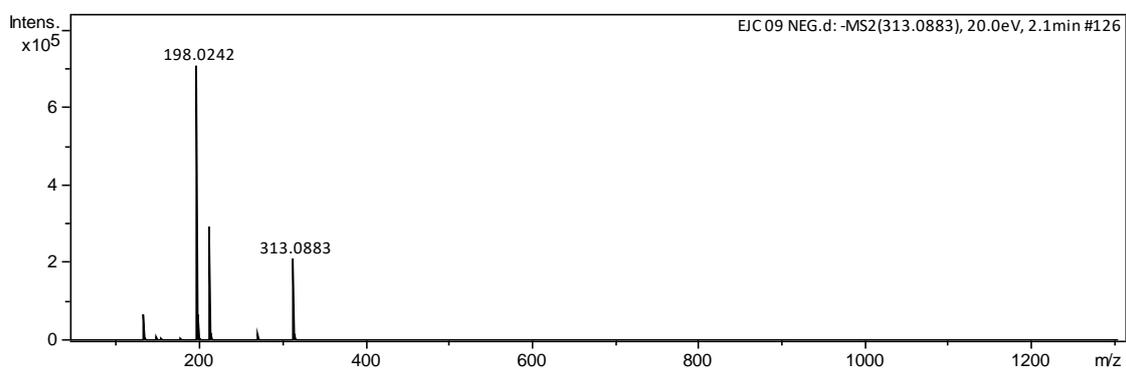
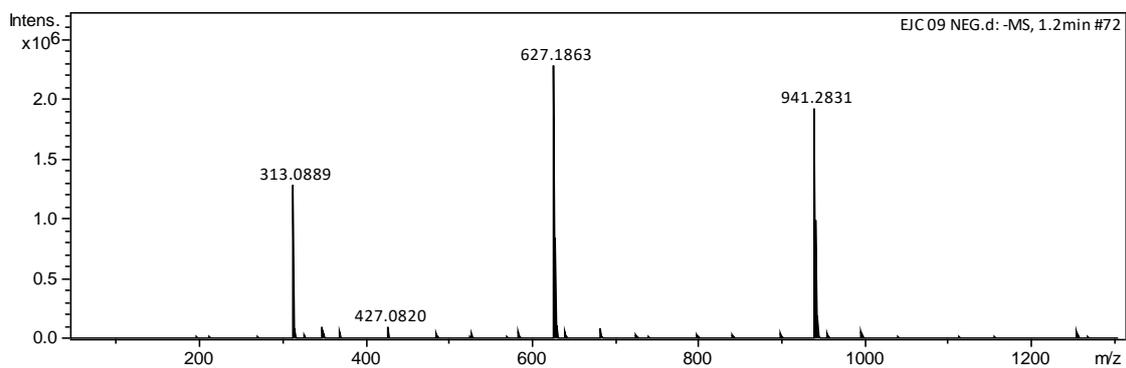
Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzosulfonamida)-3metilbutanóico (6b)



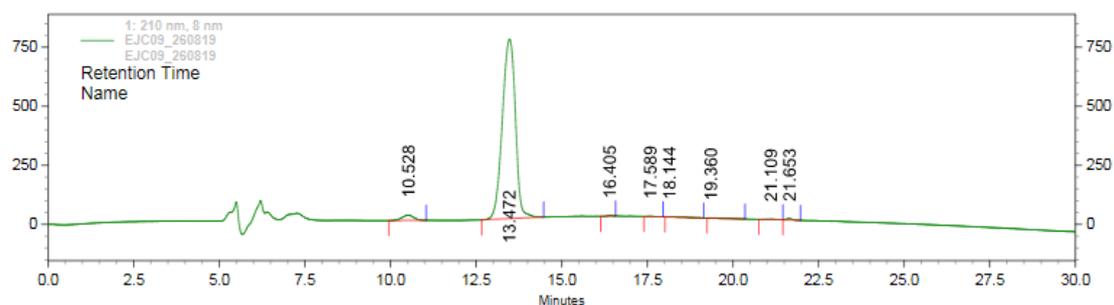
Espectro de infravermelho do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3metilbutanóico (6b)



Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3metilbutanóico (6b)

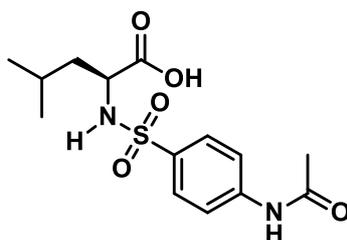


Espectro de CLAE do (S)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3metilbutanoico (6b)



1: 210 nm, 8 nm					
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		10.528	531775	2.54	2.75
2		13.472	20173249	96.45	95.66
3		16.405	17336	0.08	0.22
4		17.589	24375	0.12	0.22
5		18.144	48922	0.23	0.16
6		19.360	18796	0.09	0.09
7		21.109	35252	0.17	0.23
8		21.653	65531	0.31	0.67

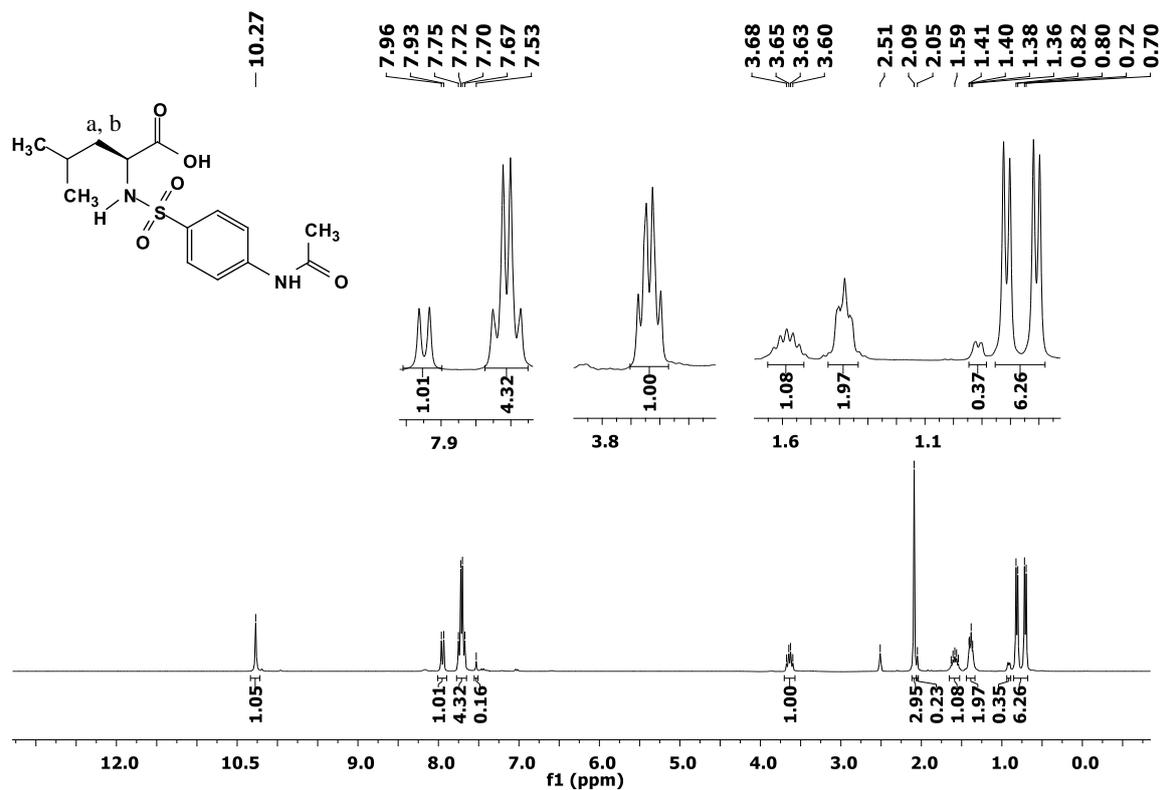
Totals					
			20915236	100.00	100.00



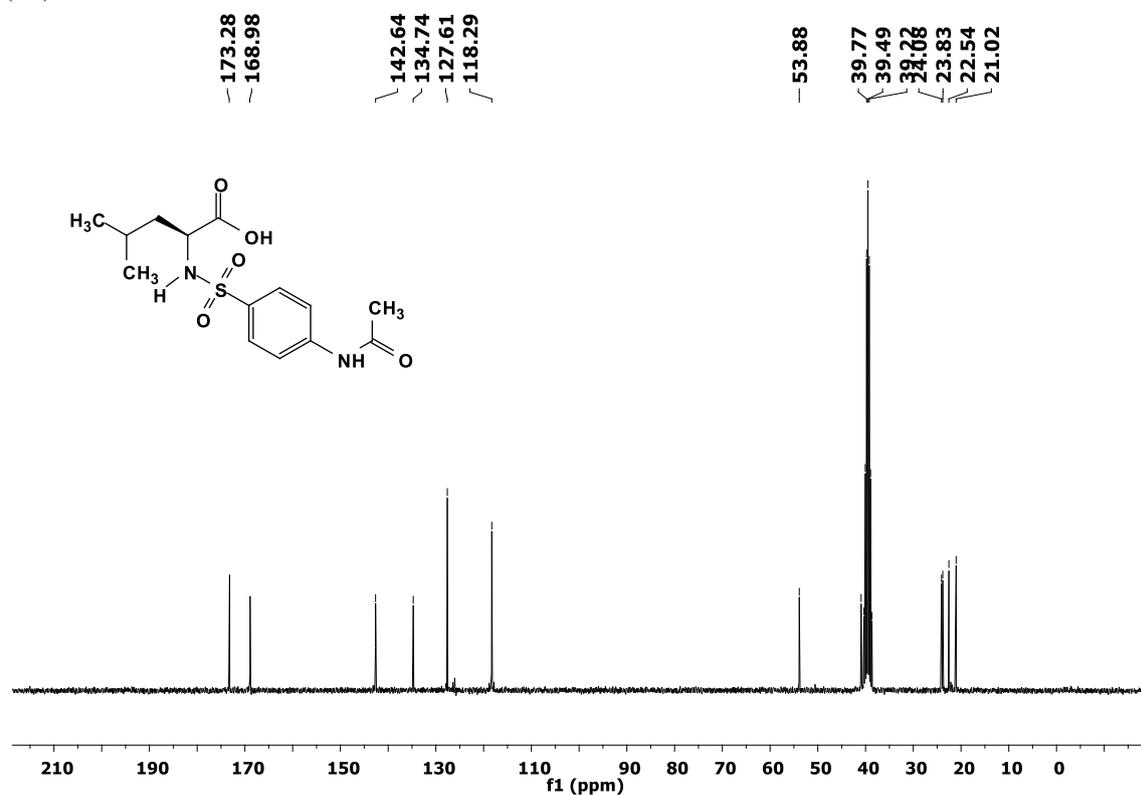
6c

Ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-4metilpentanoico (6c): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,27 (s, 1H, C=O-NH), 7,95 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, SO $_2$ -NH), 7,71 (q, $J = 8,8$ Hz, 4H, ArH), 3,64 (dd, $J = 15,0, 8,5$ Hz, 1H, CH $_{\text{quiral}}$), 2,09 (s, 3H, CH $_3$, CH $_3$ -C=O), 1,59 (dt, $J = 13,2, 6,7$ Hz, 1H, CH $_{\text{isobut}}$), 1,38 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, CH $_a$, CH $_b$ de CH $_2$), 0,76 (dd, $J = 31,5, 6,5$ Hz, 6H, CH $_3$). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 173,28, 168,98, 142,64, 134,74, 127,61, 118,29, 53,88, 40,92, 24,08 (s), 23,83 (s), 22,54, 21,02. FTIR (cm $^{-1}$): 3329, 3153, 1725, 1677, 1589, 1523, 1318, 1303, 1138, 1090, 830. ESI HRMS cal, para C $_{14}$ H $_{20}$ N $_2$ O $_5$ S: [M - H] $^-$ m/z 327,38, Achado 327,1037. Pureza: 96%. $[\alpha]_D^{20} = 22,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 105 - 106 °C. Sólido branco. Rendimento= 75%.

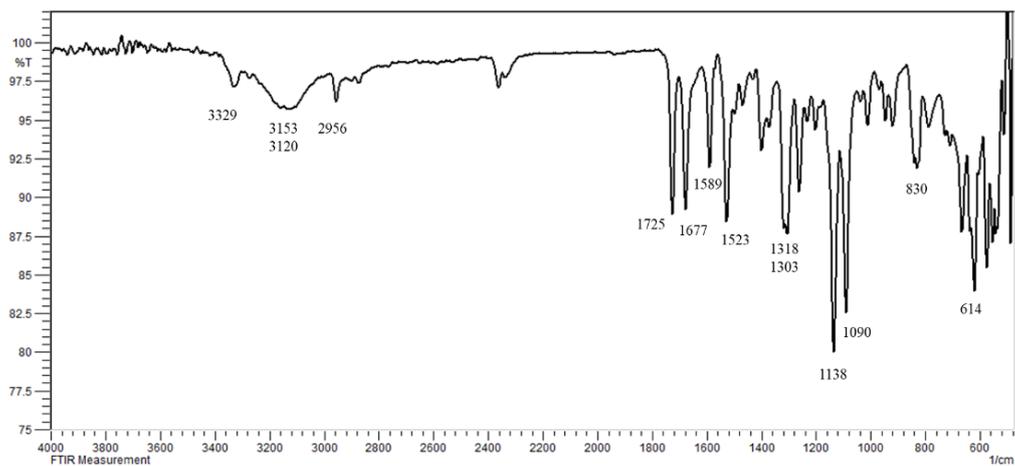
Espectro de RMN ^1H do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-4metilpentanoíco (6c)



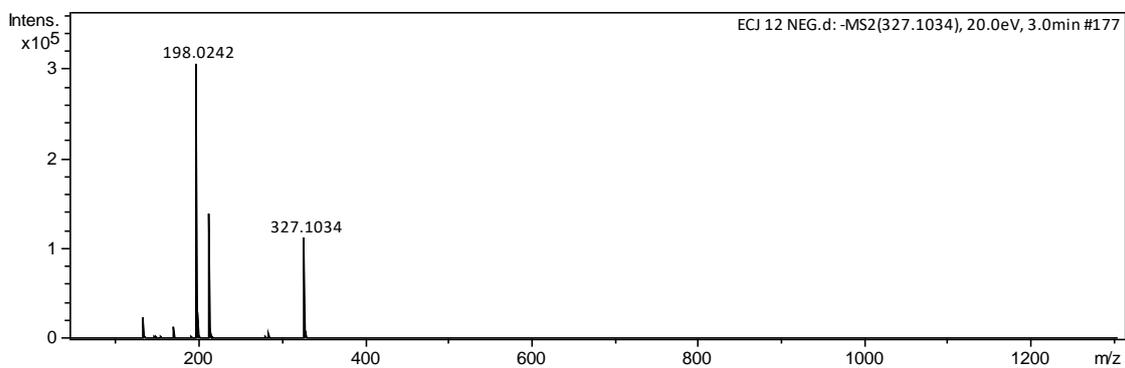
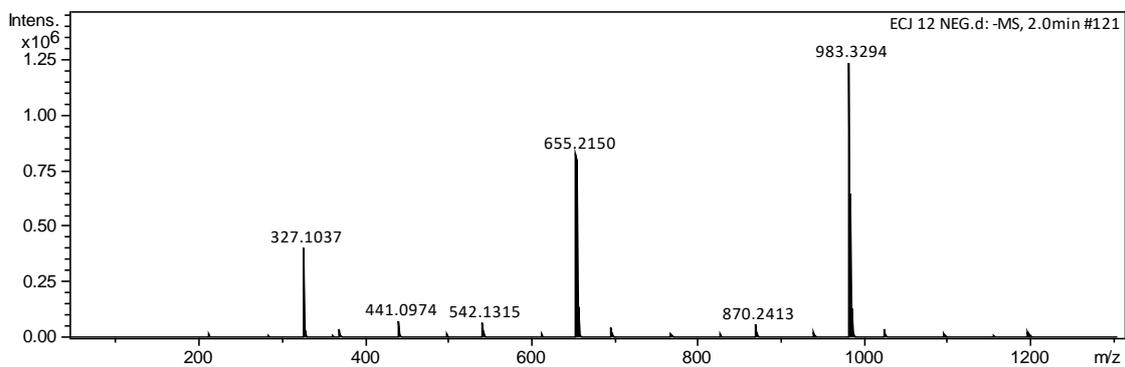
Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-4metilpentanoíco (6c)



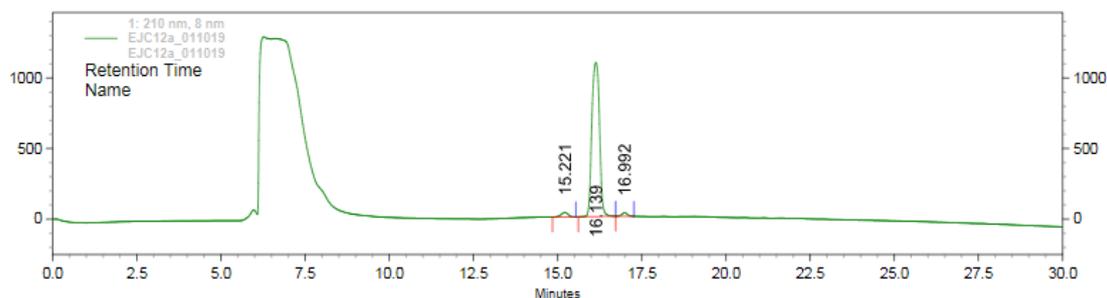
Espectro de infravermelho RMN do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-4metilpentanoico (6c)



Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-4metilpentanoico (6c)



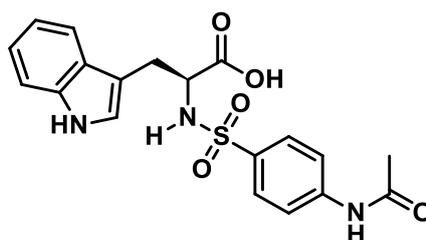
Espectro de CLAE do (S)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-4metilpentanoíco (6c)



1: 210 nm, 8 nm

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		15.221	447449	2.49	2.76
2		16.139	17260063	95.97	95.08
3		16.992	277706	1.54	2.16

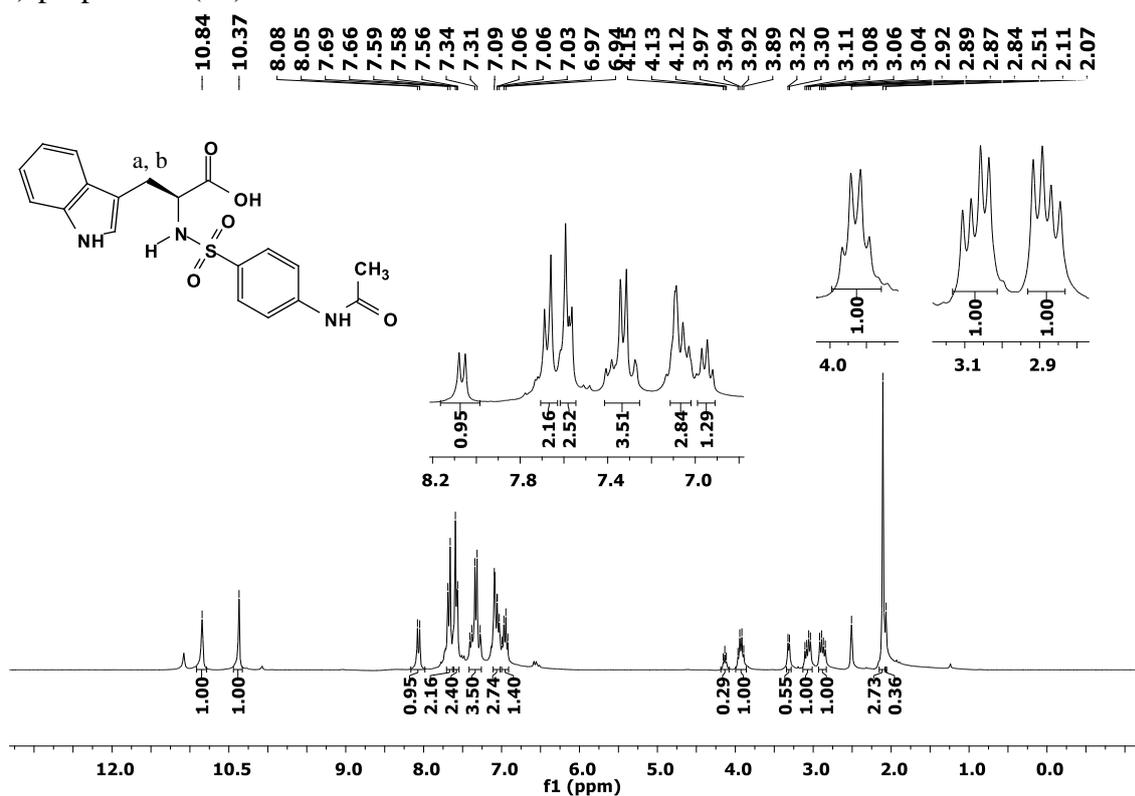
Totals			17985218	100.00	100.00
--------	--	--	----------	--------	--------



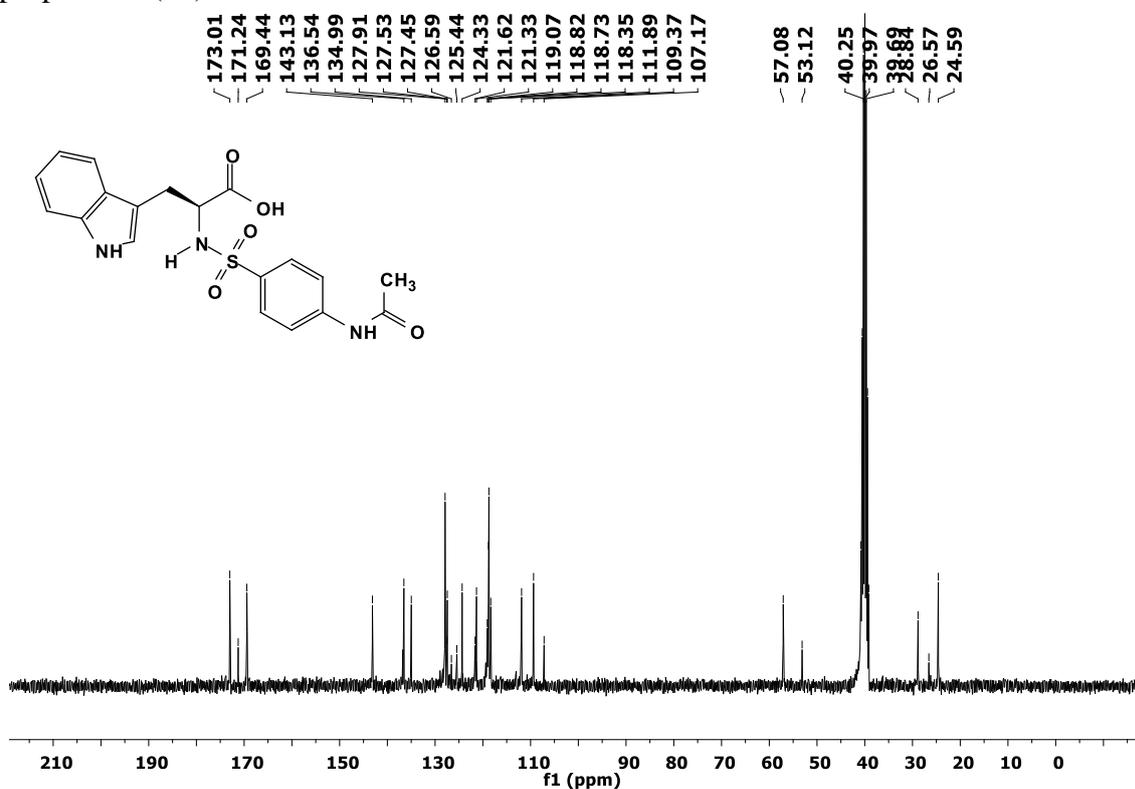
6d

Ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3-(1H-indol-3-il)-propanoíco (6d): RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,84 (s, 1H, OH), 10,37 (s, 1H, C=ONH), 8,06 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, SO $_2$ -NH), 7,67 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, ArH), 7,63 – 7,53 (m, 2H, ArH), 7,42 – 7,23 (m, 2H, ArH_{indol}), 7,12 – 7,01 (m, 2H, ArH_{indol}), 7,00 – 6,89 (m, 1H, ArH_{indol}), 3,93 (dd, $J = 15,2, 7,2$ Hz, 1H, CH_{quiral}), 3,07 (dd, $J = 14,3, 6,8$ Hz, 1H, CH_a de CH $_2$), 2,88 (dd, $J = 14,4, 7,3$ Hz, 1H, CH_b de CH $_2$), 2,11 (s, 3H, CH $_3$, CH $_3$ -C=O). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 173,01, 171,24, 169,44, 143,13, 136,54, 134,99, 127,91, 127,49, 126,59, 125,44, 124,33, 121,62, 121,33, 119,07, 118,82, 118,73, 118,35, 111,89, 109,37, 107,17, 57,08, 53,12, 28,84, 26,57, 24,59. FTIR (cm $^{-1}$): 1681, 1589, 1529, 1398, 1317, 1152, 1089, 834, 740. ESI HRMS cal, para C $_{19}$ H $_{19}$ N $_3$ O $_5$ S: [M - H] $^-$ m/z 400,44, Achado 400,1203. Pureza: 86%. $[\alpha]_D^{20} = -142,00$ ($c=0,1$, MEOH). Ponto de fusão: 106 - 108 °C. Sólido cinza. Rendimento= 50%.

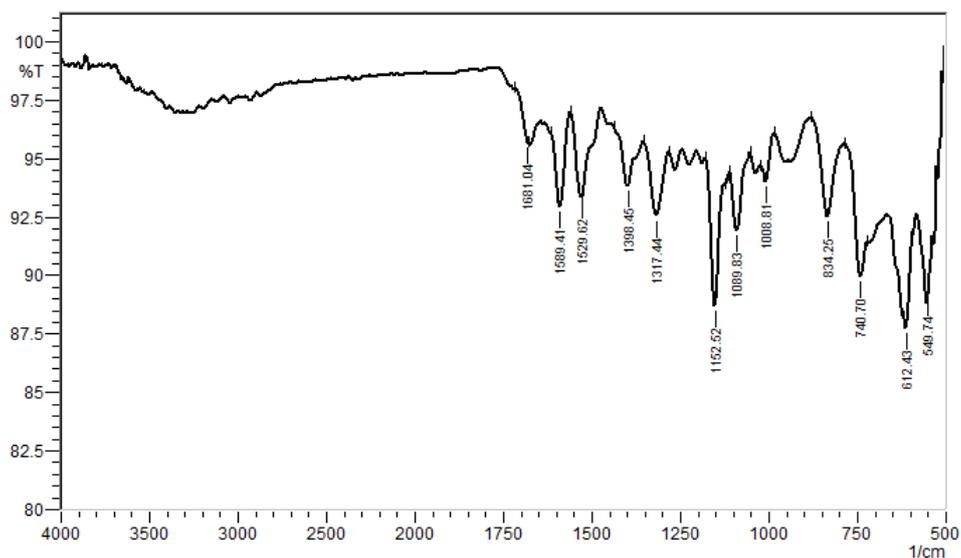
Espectro de RMN ^1H do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3-(1*H*-indol-3-il)-propanoico (6d)



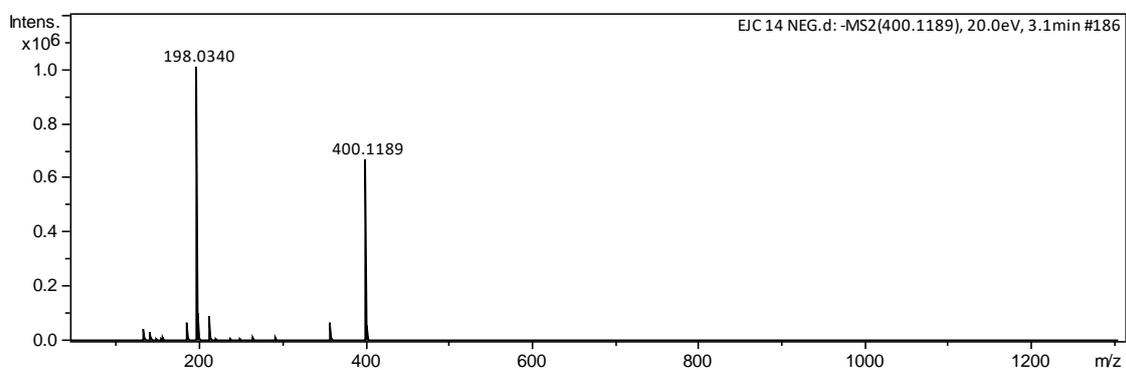
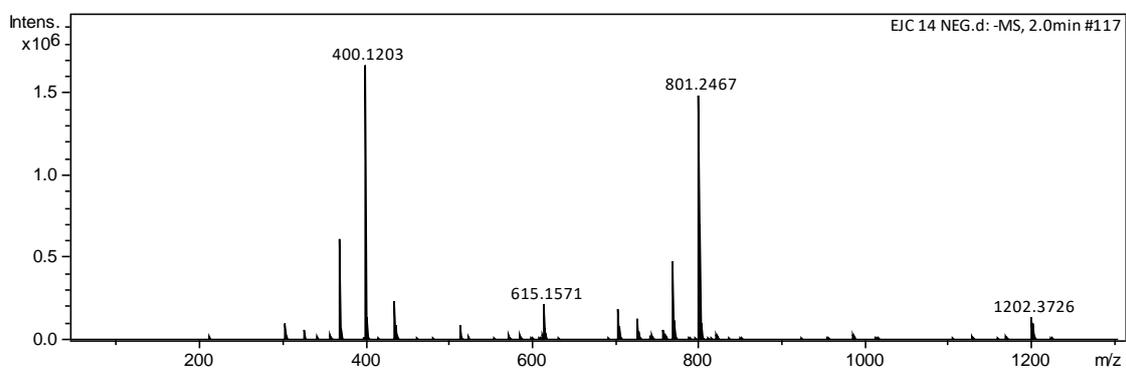
Espectro de RMN ^{13}C do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3-(1*H*-indol-3-il)-propanoico (6d)



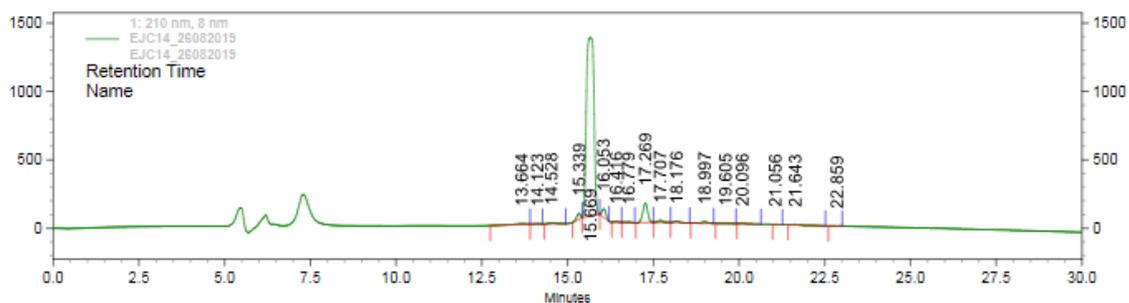
Espectro de infravermelho do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3-(1*H*-indol-3-il)-propanoico (6d)



Espectro de HRMS do (*S*)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3-(1*H*-indol-3-il)-propanoico (6d)



Espectro de CLAE do (S)-ácido 2-(4-acetamidabenzenosulfonamida)-3-(1H-indol-3-il)-propanoico (6d)



1: 210 nm, 8 nm

Pk #	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Height Percent
1		13.664	103644	0.45	0.26
2		14.123	14176	0.06	0.08
3		14.528	110854	0.48	0.52
4		15.339	323578	1.41	2.48
5		15.669	19781248	86.48	80.80
6		16.053	515677	2.25	3.81
7		16.416	31925	0.14	0.25
8		16.779	40951	0.18	0.24
9		17.269	1405076	6.14	8.82
10		17.707	138973	0.61	0.85
11		18.176	112424	0.49	0.58
12		18.997	143496	0.63	0.63
13		19.605	19373	0.08	0.09
14		20.096	44357	0.19	0.18
15		21.056	11530	0.05	0.06
16		21.643	67121	0.29	0.29
17		22.859	10395	0.05	0.05

Totals			22874798	100.00	100.00
--------	--	--	----------	--------	--------



Elys Juliane Cardoso Lima

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7661150950530103>

ID Lattes: **7661150950530103**

Última atualização do currículo em 27/01/2021

Doutorado em andamento na área de Fisiopatologia e Toxicologia (USP) com período sanduíche na University of Münster- Germany sob orientação do Prof. Dr. Bernhard Wünsch . Mestrado em Síntese de Fármacos e Medicamentos na Universidade de São Paulo-USP (2014). Graduada no curso de Farmácia pela Universidade Federal do Pará-UFPA (2009). Habilitada em Bioquímica pela Universidade Federal do Pará-UFPA (2011). Tem experiência em Biologia molecular e Síntese de alquilfosfolinas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Elys Juliane Cardoso Lima

Nome em citações bibliográficas

LIMA, E. J. C.;CARDOSO LIMA, ELYS JULIANE

Lattes iD

 <http://lattes.cnpq.br/7661150950530103>

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2016

Doutorado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com **período sanduíche** em University of Münster (Orientador: Prof. Dr. Bernhard Wünsch).
Título: Inibidores de Desmetilase Lisina-Específica 1 (LSD1) como candidatos a agentes antineoplásicos.,

Orientador:  Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2012 - 2014

Mestrado em Programa Fármacos e Medicamentos.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas- (USP), FCF- USP, Brasil.

Título: Síntese e Estudo da Atividade Antitumoral de Análogos Alcxicloalquílicos da Miltefosina, Ano de Obtenção: 2014.

Orientador:  Carlota de Oliveira Ranguel Yagui.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2009 - 2011

Graduação em Habilitação em Bioquímica.

Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.

2005 - 2009

Graduação em Farmácia.

Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.

Título: Caracterização Genética das Espécies de Micobactérias não Causadoras da Tuberculose identificadas no Laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará..

Orientador: Ana Roberta Fusco da Costa..

Formação Complementar

2019 - 2019

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino-PAE. (Carga horária: 120h).

Faculdade de Ciências Farmacêuticas- (USP), FCF- USP, Brasil.

2013 - 2013

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino-PAE. (Carga horária: 120h).

Faculdade de Ciências Farmacêuticas- (USP), FCF- USP, Brasil.

2008 - 2008	Introdução ao Programa Bionumerics.. (Carga horária: 12h). Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.
2006 - 2006	Segurança no Trabalho visando a saúde do trabalhado. (Carga horária: 3h). Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.
2004 - 2004	III Curso de Injetáveis do CESUPA. (Carga horária: 20h). Centro Universitário do Pará, CESUPA, Brasil.

Atuação Profissional

Westfälische Wilhelms- Universität Münster, WWU, Alemanha.

Vínculo institucional

2018 - 2019 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutorando sanduíche, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas- (USP), FCF- USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Aluna de mestrado, Enquadramento Funcional: Aluna de pós-graduação, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Instituto Evandro Chagas, IEC, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Bolsista PIBIC/CNPq, Carga horária: 20

Laboratório Nacional Agropecuário no Pará, Lanagro-PA, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2008 Vínculo: Bolsista CIEE, Enquadramento Funcional: Estagiária do Laboratório de Físico-Química, Carga horária: 20

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional:

Projetos de pesquisa

2016 - Atual	Síntese de Inibidores de Desmetilase Lisina-Específica 1 (LSD1) como candidatas a agentes antineoplásicos. Descrição: Sintética de compostos inéditos que possuam maior interação com a LSD1 buscando melhorar a atividade biológica e seletividade de futuros fármacos no tratamento do câncer.. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .
2012 - 2014	Integrantes: Elys Juliane Cardoso Lima - Integrante / Hernani Pinto Junior - Coordenador. Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Bolsa. Síntese e Estudo da Atividade Antitumoral de Análogos Alcóxícicloalquílicos da Miltefosina Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .
2008 - 2009	Integrantes: Elys Juliane Cardoso Lima - Coordenador / Drª Carlota de Oliveira Rangel Yagui - Integrante. Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa. Caracterização genética das espécies de micobactérias não causadoras de tuberculose identificadas no laboratório de micobactérias do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
	Integrantes: Elys Juliane Cardoso Lima - Coordenador / Maria Luiza Lopes - Integrante / Karla

Valéria Batista de Lima - Integrante / Ana Roberta Fusco - Integrante / Emily Conceição - Integrante / Maysa Souza - Integrante.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa. Número de produções C, T & A: 1

2007 - 2008

Avaliação de Possíveis Rotas de Transmissão da Tuberculose no Pará
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Elys Juliane Cardoso Lima - Integrante / Priscila Braga - Integrante / Ismari Furlaneto - Integrante / Micheli Brito - Integrante / Maria Luiza Lopes - Integrante / Karla Valéria Batista de Lima - Coordenador.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa. Número de produções C, T & A: 1

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Química medicinal.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Biologia Molecular.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Bioquímica.

Idiomas

- | | |
|----------|--|
| Inglês | Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente. |
| Espanhol | Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Pouco. |

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. MOURA GATTI, FERNANDO DE ; GOMES, RENAN AUGUSTO ; DA FONSECA, AMANDA LUISA ; **CARDOSO LIMA, ELYS JULIANE** ; VITAL-FUJII, DRIELLI GOMES ; TARANTO, ALEX GUTERRES ; PILLA VAROTTI, FERNANDO DE ; GOULART TROSSINI, GUSTAVO HENRIQUE . Antiplasmodial activity of sulfonylhydrazones: in vitro and in silico approaches. Future Medicinal Chemistry **JCR**, v. 12, p. 1756-8927, 2020.
2. PACHIONI, J. A. ; MAGALHAES, J. G. ; **LIMA, E. J. C.** ; BUENO, L. M. ; BARBOSA, J. F. ; Sá, M.M. ; Rangel- Yagui, C.O . Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences **JCR**, v. 16, p. 742, 2013.

Citações: **WEB OF SCIENCE™** 40

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. ★ FUSCO, A. R. ; LOPES, M. L. ; BAHIA, J. R. C. ; CONCEIÇÃO, E. C. ; **LIMA, E. J. C.** ; LIMA, K. V. B. . Genotipagem de membros do complexo Mycobacterium avium isolados de infecções pulmonares no estado do Pará. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. Genotipagem de membros do complexo Mycobacterium avium isolados de infecções pulmonares no estado do Pará, 2009.
2. LIMA, K. V. B. ; CARVALHO, RGC ; COSTA, S. ; **LIMA, E. J. C.** ; LOPES, M. L. ; RAMOS, F. L. P. ; CARNEIRO, I. C. R. S. . Caracterização fenotípica e genotípica de Serratia marcescens provenientes de unidade neonatal de referência em Belém-Pará. In: 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. Caracterização fenotípica e genotípica de Serratia marcescens provenientes de unidade neonatal de referência em Belém-Pará, 2009.
3. LIMA, K. V. B. ; FURLANETO, I. P. ; **LIMA, E. J. C.** ; CONCEIÇÃO, E. C. ; SOUZA, M. ; FUSCO, A. R. . Nontuberculous mycobacteria infections in the state of Pará, Amazon Region, Brazil. In: 30th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 2009, Porto de Galinhas. Nontuberculous mycobacteria infections in the state of Pará, Amazon Region, Brazil, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1.

- LIMA, E. J. C.;** MALTAROLLO, V. G. ; GANESAN, A. ; EMERY, F. ; WUNSCH, B. ; TROSSINI, G. H. G. . Synthesis and docking study for compounds analogs of LSD1 inhibitor.. In: 9º BrazMedChem, 2019, Pirinópolis. The 9th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2019.
- LIMA, E. J. C.;** Tanabe, C.A.Y. ; Sá, M.M. ; Rangel- Yagui, C.O . Syntesis of Cyclohexylethylphosphocholine- A Novel Miltefosine Analogue.. In: 6º BrazMedChem 2012, 2012, Canela- RS. The 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2012.
- ★ **LIMA, E. J. C.;** FUSCO, A. R. ; LIMA, K. V. B. . Caracterização Genética das Espécies de Micobactérias Não Tuberculosas Identificadas no Laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas, Belém-Pará. In: XIV PIBIC/IEC Comunicação Científica em Saúde: Um Desafio na Amazônia, 2009, Ananindeua. Caracterização Genética das Espécies de Micobactérias Não Tuberculosas Identificadas no Laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas, Belém-Pará, 2009.
- ★ **LIMA, E. J. C.;** BRAGA, P.G.S. ; FURLANETO, I. P. ; BRITO, M. L. ; LOPES, M. L. ; LIMA, K. V. B. . Avaliação de Possíveis Rotas de Transmissão da Tuberculose no Pará. In: I Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2008, Gramado. Avaliação de Possíveis Rotas de Transmissão da Tuberculose no Pará, 2008.
- ★ **LIMA, E. J. C.;** BRAGA, P.G.S. ; FURLANETO, I. P. ; BRITO, M. L. ; LOPES, M. L. ; LIMA, K. V. B. . Avaliação de Rotas de Transmissão da Tuberculose no Pará. In: XIII Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, 2008, Ananindeua. Avaliação de Rotas de Transmissão da Tuberculose no Pará, 2008.

Apresentações de Trabalho

- LIMA, E. J. C.;** MALTAROLLO, V. G. ; GANESAN, A. ; EMERY, F. ; WUNSCH, B. ; TROSSINI, G. H. G. . Synthesis and docking study for compounds analogs of LSD1 inhibitor.. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- LIMA, E. J. C.;** MAGALHAES, J. G. ; Rangel- Yagui, C.O . Synthesis of benzyloxydecylphosphocholine- A novel miltefosine analog. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- LIMA, E. J. C.;** Tanabe, C.A.Y. ; Sá, M.M. ; Rangel- Yagui, C.O . Synthesis of cyclohexylethylphosphocholine- A novel miltefosine analague. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- LIMA, E. J. C.;** FUSCO, A. R. ; CONCEIÇÃO, E. C. ; LOPES, M. L. ; LIMA, K. V. B. ; SOUZA, M. . Caracterização Genética das Espécies de Micobactérias não causadoras de Tuberculose identificadas no laboratório de Micobactérias do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.. 2009. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
- LIMA, E. J. C.;** BRAGA, P.G.S. ; FURLANETO, I. P. ; BRITO, M. L. ; LOPES, M. L. ; LIMA, K. V. B. . Avaliação de Possíveis Rotas de Transmissão da Tuberculose no Pará. 2008. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Demais tipos de produção técnica

- LIMA, E. J. C.;** CONCEIÇÃO, E. C. ; FUSCO, A. R. ; LOPES, M. L. ; LIMA, K. V. B. . Caracterização genética das espécies de micobactérias não causadores de tuberculose identificadas no Laboratório de micobactérias do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.. 2009. (Relatório de pesquisa).
- ★ **LIMA, E. J. C.;** Rotas de Transmissão da Tuberculose no Pará. 2008. (Relatório de pesquisa).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

- LIMA, E. J. C.;** Participação em banca de Carla Ribeiro e Talita Carvalho. Uso de anticoncepcional hormonal e o aumento da incidência de trombose. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.
- LIMA, E. J. C.;** Participação em banca de Erika Yumi Kohari. Desenvolvimento de embalagem na indústria farmacêutica. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.
- LIMA, E. J. C.;** Participação em banca de Fernanda Ferreira. Caracterização do Cluster biossintético da fenazina em *Streptomyces* sp. CCMA CAAT 52. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.
- LIMA, E. J. C.;** Participação em banca de Nathalia dos Santos. Pêfigo bolhoso/ vulgar. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Seminários da Comissão de Pesquisa- "Desafios e Oportunidades no Planejamento de novos Fármacos. 2013. (Seminário).
2. Simpósio de Dendrímeros: Importância no contexto da nanotecnologia. 2012. (Simpósio).
3. I CONGRESSO PAN-AMAZÔNICO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. 2006. (Congresso).
4. MESA REDONDA SOBRE SEGURANÇA DO TRABALHO, VISANDO A SAÚDE DO TRABALHADOR. 2006. (Outra).
5. V CICLO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. 2006. (Congresso).

Orientações

Orientações e supervisões concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Ediane Patricia P.C. Passos e Sandra Lucia G. Vasconcelos. Septicemia nas unidades de terapia intensiva. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Elys Juliane Cardoso Lima.
2. Mayara Cristina C. de Toledo e Tatiana M.C. Rodrigues. LSD1: Alvo epigenético para o tratamento do Câncer. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Elys Juliane Cardoso Lima.
3. Rodrigo Eduardo de Campos. Principais receptores e fatores de risco no Câncer. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Elys Juliane Cardoso Lima.
4. Dayane Mello Santos e Risoneide Ferreira. A qualidade e importância do uso de protetores solares no Brasil. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Elys Juliane Cardoso Lima.
5. Daiane Figueiredo Lopes e Daniela Conceição Santos. Influência dos alimentos no processo de absorção de fármacos. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Elys Juliane Cardoso Lima.
6. Emily Holey Rodrigues. Atenção Farmacêutica no Sistema Único de Saúde (SUS): Da Filosofia à Prática. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Elys Juliane Cardoso Lima.
7. Camila Spachi Aiello e Márcia Maria de Souza. A Importância do Farmacêutico na Gestão das Farmácias de Manipulação Veterinária. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Elys Juliane Cardoso Lima.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 27/01/2021 às 14:10:19

[Imprimir currículo](#)



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9143 - 7717986/1 - Elys Juliane Cardoso Lima

Email: elyslima@usp.br
Data de Nascimento: 03/03/1986
Cédula de Identidade: RG - 4098827 - PA
Local de Nascimento: Estado do Pará
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Pará - Brasil - 2009
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Insumos Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Toxicologia
Data de Matrícula: 15/02/2016
Início da Contagem de Prazo: 15/02/2016
Data Limite para o Depósito: 09/06/2021
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 07/03/2018 até 07/08/2018. Email: ernani@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Goulart Trossini - 08/08/2018 até o presente. Email: trossini@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 15/02/2016
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 09/02/2021 até 09/06/2021
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 08/12/2017
Estágio no Exterior: Fachhochschule Münster, Alemanha - Período de 01/04/2018 até 31/03/2019
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 15/02/2016
 Prorrogação em 18/11/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Mudança de Regulamento em 18/11/2020

Impresso em: 25/01/2021 10:02:37



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9143 - 7717986/1 - Elys Juliane Cardoso Lima

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-12/3	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2016	20/06/2016	15	1	100	A	N	Concluída
QFL5933-10/1	Fundamentos da Química Orgânica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	14/03/2016	26/06/2016	150	10	100	C	N	Concluída
FBF5824-1/1	Introdução à Modelagem Molecular como Ferramenta no Estudo e Desenvolvimento de Moléculas Bioativas	04/07/2016	24/07/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-7/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5792-4/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	07/03/2017	19/06/2017	15	1	89	B	N	Concluída
QFL5925-6/3	Prática de Ensino de Química (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	20/03/2017	02/07/2017	45	3	90	A	N	Concluída
FBC5766-6/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV	15/08/2017	27/11/2017	15	1	85	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Mudança de Regulamento em 18/11/2020

Impresso em: 25/01/2021 10:02:38