

Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO

Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da  
pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme

ARARAQUARA  
2018

THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO

Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA – SP  
2018

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**M528s** Melo, Thais Regina Ferreira de Melo  
Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme / Thais Regina Ferreira de Melo. – Araraquara, 2018.  
ix, 152 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. Anemia Falciforme. 2. Pomalidomida. 3. Doadores de óxido nítrico. 4. Sickle cell anemia.  
I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440  
**CAPES: 40300005**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Síntese e Avaliação Farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme

**AUTORA: THÁIS REGINA FERREIRA DE MELO**

**ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

  
Profa. Dra. CAROLINA LANARO  
Hemocentro da UNICAMP / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

  
Prof. Dr. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS  
Patologia Clínica / Universidade Estadual de Campinas

  
Prof. Dr. RAFAEL VICTORIO CARVALHO GUIDO  
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física - USP - São Carlos

  
Profa. Dra. JEANINE GIROLLA VARGAS  
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP

Araraquara, 02 de fevereiro de 2018

## DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Paulo e Célia e ao meu querido Miller*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e sabedoria e permitido concluir este trabalho.

Aos meus pais, Paulo e Célia por todo o apoio, força, amor e compreensão de sempre e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido parceiro Miller, que sempre me apoiou, incentivou e esteve presente na realização deste trabalho, por toda a ajuda, paciência, amor, carinho e dedicação em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pelo exemplo de dedicação e amor pela pesquisa que sempre me foram transmitidos com amizade, compreensão, apoio e incentivo em todos os momentos da realização desse trabalho.

Aos amigos de laboratório, Daniela Hartmann Jornada, Diego Chiba, Guilherme Fernandes, Aline Pavan, Rafael Chelucci, Gabriela Albuquerque, Beatriz Urias, Mateus Grecco Paulo Renato Yamasaki Priscila Longhin Bosquesi, Marcella Gabrielle, Luiz Dutra, Juliana Reis por toda ajuda e por tornarem os dias de trabalho melhores e mais divertidos.

As minhas queridas amigas: Adriana, Amanda, Camila Cressoni, Camila Dalla Costa e Daniele, pela amizade de todos esses anos e por todo o apoio e incentivo.

A Carolina Lanaro pela ajuda e discussões dos ensaios farmacológicos.

Ao Prof. Lionel Blanc, por ter me dado a oportunidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório e aos colegas de laboratório Brian Dulmovits, Emily Hartman, Jimmy Hom e Julien Papoin do grupo The Feinstein Institute for Medical Research por me ensinarem tudo com muita paciência me proporcionando uma experiência maravilhosa de crescimento pessoal e profissional.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram presentes durante esta jornada.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro para manutenção e desenvolvimento do trabalho. Processo FAPESP: 2014/06755-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

## RESUMO

MELO, T. R. F. **Síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da pomalidomida para o tratamento da anemia falciforme.** 2018. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

A Anemia Falciforme (AF) é uma anemia hemolítica genética caracterizada por uma mutação no gene da globina beta. Além do quadro vaso-oclusivo, os pacientes com AF apresentam processo inflamatório crônico caracterizado pelo aumento de diversas citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Atualmente, a hidroxiureia (HU) é o único fármaco disponível para o tratamento e seus efeitos benéficos estão associados ao óxido nítrico (NO), gerado após biotransformação. O NO desempenha efeitos benéficos na doença tais como: vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e aumento na produção de hemoglobina fetal (HbF). Nesse contexto, foram sintetizados os compostos **3(a-b)**; **4(a-b)** e **5(a-b)** obtidos através da estratégia de hibridação molecular da subunidade inibidora de TNF- $\alpha$  presente na pomalidomida com o núcleo furoxânico (1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido) com propriedades doadores de NO. Os compostos sintetizados foram obtidos em rendimentos que variaram entre 13 e 30%. As moléculas do estudo demonstraram capacidade de liberar NO em níveis que variaram entre 1 e 30%. Em cultura de células CD34<sup>+</sup>, o composto **4b** (2,5  $\mu$ M) foi capaz de induzir globina  $\gamma$ , enquanto HU foi ativa apenas em concentrações 4 vezes superiores (10  $\mu$ M). Estudos preliminares do possível mecanismo de ação mostraram que o composto **4b** não interfere na expressão de fatores de transcrição a exemplo do BCL11A, IKAROS, LRF e nos níveis de acetilação de histona H3. O composto **4b** foi capaz de induzir o aumento dos níveis de monofostato de guanosina cíclico (GMPC) em células HUVEC e diminuir a produção de TNF- $\alpha$  em monócitos. Os resultados aqui obtidos sugerem que o composto **4b** seja um novo protótipo para o desenvolvimento de fármacos para anemia falciforme.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anemia Falciforme, pomalidomida, doadores de óxido nítrico

## ABSTRACT

MELO, T. R. F. **Synthesis and pharmacological evaluation of pomalidomide derivatives for the treatment of sickle cell anemia.** 2018. 161 f. Thesis (PhD in Pharmaceutical Sciences)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited hemolytic anemia characterized by a mutation in the  $\beta$ -globin gene. In addition to the vaso-occlusive condition, there is a chronic inflammatory process in the patients characterized by the increase of several pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ . Currently, hydroxyurea (HU) is the only drug available for treatment and its beneficial effects are associated with nitric oxide (NO), generated after biotransformation. NO has beneficial effects on the disease such as vasodilatation, inhibition of platelet aggregation and fetal hemoglobin (HbF) production. In this context, the compounds **3 (a-b)**, **4(a-b)** and **5(a-b)** were synthesized using molecular hybridization approach of the pomalidomide TNF- $\alpha$  inhibitor subunit with the furoxan ring (1,2,5-oxadiazol-2-*N*-oxide) as NO donor. Compounds were synthesized in yields ranging from 13 to 30%. The compounds demonstrated ability to release NO at levels ranging from 1 to 30%. In CD34+ cellular cultures, compound **4b** at 2.5  $\mu$ M concentration was able to induce  $\gamma$ -globin, while HU was active only at 4-fold higher concentrations (10  $\mu$ M). Preliminary studies of the mechanism of action have shown that compound **4b** does not interfere with transcription factors such as BCL11A, IKAROS, LRF and histone H3 acetylation levels. Our results indicate that, the mechanism of action of this compound differs from the parental drug pomalidomide. Compound **4b** also increased cGMP levels in HUVEC and CD34 + cells. For CD34 + cells, cGMP levels were comparable to that of HU. These results suggest that compound **4b** is a promising lead candidate for the development of drug candidates for treatment of SCA.

**Keywords:** Sickle cell anemia; pomalidomide; nitric oxide donors



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de globinas durante a vida fetal e adulta. ....	7
Figura 2. Fatores de transcrição reguladores da expressão de gama-globina.....	8
Figura 3. Fisiopatologia da anemia falciforme .....	10
Figura 4. Propriedades do NO nos vasos sanguíneos .....	11
Figura 5. Abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento da anemia falciforme.....	13
Figura 6: Equilíbrio tautomérico do furoxano.....	20
Figura 7. Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos. .	21
Figura 8. Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos (3a-b), (4a-b) e (5a-b) .....	26
Figura 9. Obtenção do intermediário furoxânico 4-nitro-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (2a) e intermediário 6.....	30
Figura 10.Obtenção dos intermediários (2b e 12) .....	32
Figura 11.Obtenção do intermediário (19) e do furoxano (2c).....	32
Figura 12.Obtenção dos intermediários 14-19 .....	33
Figura 13. Obtenção dos compostos híbridos finais (3a-b), (4a-b) e (5a-b).....	34
Figura 14: Expressão de proteínas da expressão de globinas em células CD34+ no 14 <sup>o</sup> dia. ....	55
Figura 15. Quantificação de hemoglobinas em células CD34+.....	56
Figura 16: Curvas de crescimento das culturas de precursores eritroides derivados de células CD34+.....	57
Figura 17. Diferenciação terminal dos precursores eritroide derivados de células CD34+.....	58
Figura 18. Citospins corados com May-Grunwald Giemsa mostrando a morfologia celular durante a diferenciação terminal celular das células CD34+.....	59
Figura 19. Western blot da expressão de BCL11A e IKAROS nas células CD34+ no 4 <sup>o</sup> dia tratadas com DMSO (0,1%), pomalidomida (1 µM), HU (10 µM), composto 4b (2,5 µM).....	60
Figura 20. Western blot da expressão de LRF nas células CD34+.....	61
Figura 21. Western blot da expressão de histona H3 total nas células CD34+.....	61
Figura 22: Efeito do DMSO (0,1%), pomalidomida (1 µM), HU (10 µM), composto 4b (2,5 µM) nos níveis de GMPC.....	62
Figura 23. Viabilidade celular em monócitos utilizando DMSO, pomalidomida e diferentes concentrações do composto 4b.....	63
Figura 24. Concentração de TNF-alfa produzido por monócitos em meio contendo LPS (controle positivo), pomalidomida 5µM e composto 4b.....	63

Figura 25. Proposta de formação do derivado furoxânico 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido sugerida por TAKAYAMA; HANASAKI; IJICHI, 1996 .....	64
Figura 26. Mecanismo de formação do intermediário 6 .....	65
Figura 27. Mecanismo da reação de formação dos intermediários 14-19.....	68
Figura 28. Mecanismo de detecção de nitrito utilizando reagente de Griess .....	74
Figura 29. Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos com ataque em C3.....	76
Figura 30. Expressão de gama-globina mediada pela via GMPc-NO .....	80
Figura 31. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (2a) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	92
Figura 32. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (2a) (75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	93
Figura 33: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (6) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	94
Figura 34: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (6) (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	95
Figura 35: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido sulfonilfeniltioacético (9) (400 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	98
Figura 36: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de 3,4-bisaryl-sulfonilfuroxano (2b) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	99
Figura 37: Espectro na região do infravermelho do composto 12 ( pastilha de KBr) .....	101
Figura 38: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 12 (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....	102
Figura 39: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do intermediário 12 (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	103
Figura 40. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol- 2-óxido (2c) (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....	105
Figura 41: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (2c) (300 MHz; $\text{CDCl}_3$ ). .....	106
Figura 42: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (13) (300 MHz; $\text{DMSO}$ ).....	107
Figura 43: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (13) (75MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	108
Figura 44: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(2 aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (14) (300 MHz, $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	111
Figura 45: Espectro de RMN do 4-(4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (14) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). .....	112
Figura 46: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (15) (300 MHz, $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	114

Figura 47: Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (15) (75 MHz, $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	115
Figura 48: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 3a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	118
Figura 49: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 3a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ...	119
Figura 50: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 3b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	121
Figura 51: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 3b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ...	122
Figura 52: Espectro de RMN HSQC do composto 3b (75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	123
Figura 53: Espectro de RMN HMBC do composto 3b (75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	124
Figura 54. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido ...	127
Figura 55: Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (16) (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	128
Figura 56: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (17) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	130
Figura 57: Espectro de RMN $\text{C}^{13}$ 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (17)(75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	131
Figura 58: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (4a) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	134
Figura 59: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do 4-(4-((2-(4-aminobenzoi) hidrazono) .....	135
Figura 60: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 4b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	137
Figura 61: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 4b (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	138
Figura 62: Espectro de massas de alta resolução do composto 4b. ....	139
Figura 63: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (18) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	141
Figura 64: Espectro de RMN $\text{C}^{13}$ 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (18) (75 MHz $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	142
Figura 65: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ -(4-((2-(3-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (19) (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	144
Figura 66: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -(4-((2-(3-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2- <i>N</i> -óxido (19) (75 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	145
Figura 67: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 5a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ) .....	148
Figura 68: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 5a (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	149
Figura 69: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto final 5b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ). ....	150
Figura 70. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto final 5b (300 MHz; $\text{DMSO}_{d6}$ ).....	151
Figura 71: Espectro de massas de alta resolução do composto 5b .....	152

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 14 e 15. ....	42
Tabela 2. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 16 e 17. ....	43
Tabela 3. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 18 e 19. ....	43
Tabela 4. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 3a e 3b. ....	44
Tabela 5. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 4a e 4b. ....	44
Tabela 6. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 5a e 5b. ....	45
Tabela 7: Comparação dos deslocamentos das moléculas 14 e 3a no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	46
Tabela 8: Comparação dos deslocamentos das moléculas 15 e 3b no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	47
Tabela 9. Comparação dos deslocamentos das moléculas 16 e 4a no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	48
Tabela 10: Comparação dos deslocamentos das moléculas 17 e 4b no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	49
Tabela 11: Comparação dos deslocamentos das moléculas 18 e 5a no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	50
Tabela 12. Comparação dos deslocamentos das moléculas 19 e 5b no RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ . ....	51
Tabela 13. Porcentagem de produção de nitrito pelos compostos na presença e ausência de cisteína $\pm$ E.P.M, (n=3). ....	53

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AF	Anemia Falciforme
ADP	Difosfato de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
DBU	1,8-diazabicycloundec-7-eno
DCM	Diclorometano
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
EDC	Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Hb	Hemoglobina
HU	Hidroxiureia
IV	Espectrofotometria na região do infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NO	Óxido nítrico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
THF	Tetrahidrofurano
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b>	<b>I</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>II</b>
<b>Resumo</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>V-VII</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>IX</b>
Introdução	1
Revisão bibliográfica	4
Objetivos	23
Material e Métodos	24
Resultados	41
Discussão	64
Conclusões	82
Referências	84
Apêndice	91

## 1 INTRODUÇÃO

A AF é uma das hemoglobinopatias genéticas mais prevalente no mundo (WEATHERALL, 2008). No Brasil no ano de 2016, foram diagnosticados 1.075 recém-nascidos com a doença falciforme e 60.418 portadores de traço falciforme, segundo dados do relatório anual do Programa Nacional de Triagem Neonatal (BRASIL, 2016).

A doença é caracterizada por uma mutação no sexto códon do gene da globina  $\beta$ , na qual ocorre uma troca de uma adenina por uma timina (GAG para GTG), resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina na cadeia da globina  $\beta$  dando origem a hemoglobina anômala ( $\beta^s$ -globina) (BUNN, 1997).

A hemoglobina mutada (HbS) quando desoxigenada favorece a polimerização destas moléculas de HbS levando a alterações na estrutura e flexibilidade dos eritrócitos, promovendo desidratação celular, estresse físico e oxidativo, o que pode levar a hemólise destas células (STEINBERG, 2006).

A vaso-oclusão é decorrente da obstrução, principalmente da microcirculação, causada pelas células falciformes e pela maior adesão das células sanguíneas ao endotélio vascular. Esse quadro pode levar a isquemia e infarto de diversos tecidos por uma perfusão tissular inadequada e ainda contribui para as crises dolorosas, disfunção dos órgãos, e em alguns casos, morte (MANWANI; FRENETTE, 2013a)

Foi relatado que pacientes com AF apresentam aumento significativo dos níveis circulantes de algumas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (LANARO et al., 2009). O aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  em pacientes com AF contribui com as crises vaso-oclusivas, e pode levar ao aparecimento de episódios inflamatórios (CAJADO et al., 2010).

Assim, compostos que inibam essa citocina poderiam auxiliar na diminuição dos sintomas clínicos da doença.

Os fármacos talidomida, pomalidomida e lenalidomida são imidas imunomodulatórias com capacidade de reduzir os níveis circulantes de TNF- $\alpha$ . Estudos de relação estrutura química versus atividade biológica mostraram diferentes potências para estes fármacos. A pomalidomida, por exemplo, é cerca de 50.000 vezes mais potente que a talidomida na redução do TNF- $\alpha$  (CHAULET et al., 2011; MULLER et al., 1999). Além do controle do processo inflamatório, estudos demonstraram que a pomalidomida também foi capaz de induzir a produção de HbF em camundongos transgênicos para AF (MEILER et al., 2011).

Até o momento, não existe um tratamento específico para AF. Os fármacos disponíveis auxiliam no tratamento dos sintomas e visam melhorar a qualidade de vida do paciente. Além da glutamina, aprovada em 2017 como coadjuvante no tratamento, o único fármaco aprovado pela agência norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) é a hidroxiuréia (HU). Este fármaco tem capacidade de melhorar o fluxo nos vasos sanguíneos, reduzir a adesão celular ao endotélio e aumentar os níveis de HbF (CHARACHE et al., 1992). Além disso, estudos mostram que HU pode atuar como fonte exógena de óxido nítrico (NO) (COKIC et al., 2003; STEINBERG, 2006).

O NO exerce vários efeitos como, por exemplo, vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e da expressão de moléculas de adesão e estimula a produção de hemoglobina fetal (HbF) via guanilato ciclase solúvel (sGC) aumentando expressão de globina  $\gamma$  em células eritroleucêmicas (K562) e eritroblastos humanos primários (COKIC et al., 2003; CONRAN et al., 2004).



O aumento da HbF em pacientes com AF proporciona melhora nos sintomas clínicos e reduz as necessidades transfusionais e internações hospitalares(BAUER; ORKIN, 2015; PERRINE; PACE; FALLER, 2014; PLATT, 1994).

Assim, neste trabalho as estruturas foram planejadas visando à ação sinérgica de modulação da biossíntese de TNF- $\alpha$ , aumento dos níveis de NO e de HbF. Esta estratégia representa uma nova abordagem terapêutica e pode ser útil para desenvolvimento de novos compostos para o tratamento da AF.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### *Anemia Falciforme*

#### *Histórico*

Acredita-se que a AF teve origem há milhares de anos atrás, nos países subsaarianos e do centro-oeste da África, no leste asiático e em algumas regiões da Índia (WEATHERALL, 2008). A distribuição da doença está correlacionada com as regiões endêmicas de malária, devido à hipótese explorada por muitos estudos de que esta confere proteção à infecção pelo plasmódio (TAYLOR; PAROBK; FAIRHURST, 2012).

As hemácias falciformes infectadas com plasmódio sofrem fagocitose mais rapidamente, reduzindo assim a parasitemia (PIEL et al., 2013). É sabido ainda que nas células falciformes a invasão é diminuída e o crescimento do parasita é dificultado devido as condições bioquímicas desfavoráveis como a baixa tensão de oxigênio e de potássio intracelular (AYI et al., 2004). Embora existam muitos estudos sobre estes complexos mecanismos envolvidos na proteção contra a malária, ainda não é totalmente clara a relevância dos mesmos *in vivo* (GONG et al., 2013).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) referentes ao ano de 2011, cerca de 5% da população mundial carrega o gene de hemoglobinopatias sobretudo da anemia falciforme e talassemias (World Health Organization, 2011),

A AF foi durante muito tempo concentrada em países da África, Oriente Médio e partes da Índia, mas atualmente também é comum nas Américas, Caribe e Europa, principalmente por conta da migração e miscigenação racial. Nos Estados Unidos, a anemia falciforme afeta aproximadamente um em cada 500 recém-

nascidos afro-americanos por ano, e entre 70.000 e 100.000 indivíduos no total (HUTTLE et al., 2015)

No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal registrou em 2016, o nascimento de 1.075 recém-nascidos com a doença falciforme e 60.418 portadores de traço falciforme.

A anemia falciforme apresenta padrão autossômico recessivo de transmissão, sendo assim, se manifesta em indivíduos homocigotos do gene HBBS (HbSS). Na heterocigose (HbAS) os indivíduos possuem o traço falciforme que está presente em cerca de 2-8% da população (MURAO; FERRAZ, 2007). Na cidade de Araraquara, por exemplo, no ano de 2009 foi encontrada prevalência do traço para anemia falciforme de 2,15%, abaixo da média nacional, que é de 2,6% (VESPOLI et al., 2009).

Os portadores do traço têm uma expectativa de vida semelhante ao da população em geral, não sendo observado aumento de mortalidade associada especificamente a essa condição (ROBINSON et al., 1994; SERJEANT, 2013) . Entretanto, alguns estudos relatam uma correlação entre a presença do traço e algumas complicações que ocorrem em condições de hipóxia, desidratação e acidose, como a insuficiência renal, necrose tissular, tromboembolia venosa e rabdomiólise (AUSTIN et al., 2007; MURAO; FERRAZ, 2007).

### *Aspectos gerais*

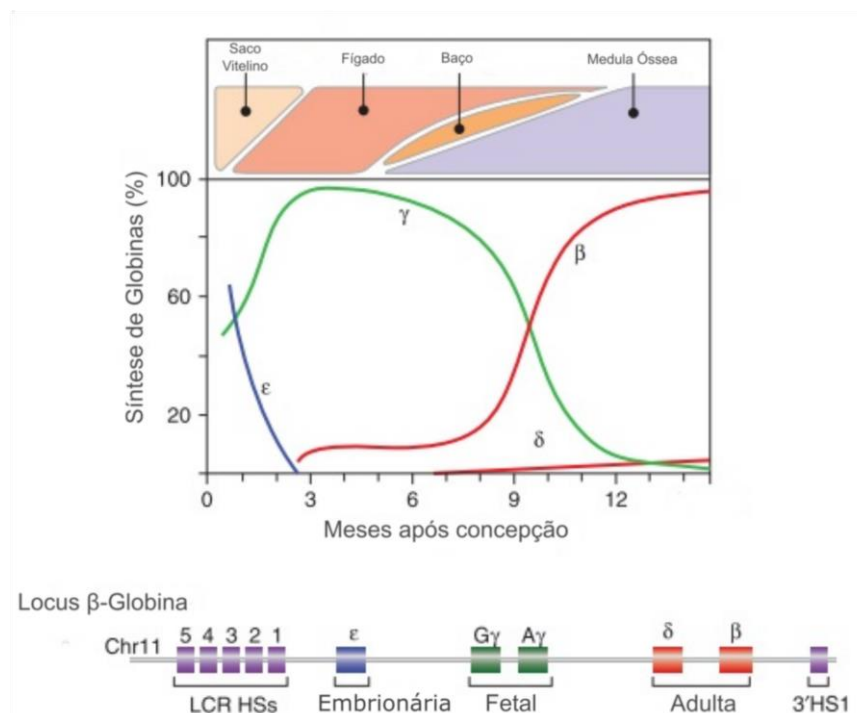
A hemoglobina (Hb) é uma heme-proteína presente nos eritrócitos cuja principal função é o transporte de oxigênio e gás carbônico (PERUTZ, 1990). É um tetrâmero polipeptídico, constituído por cadeias globínicas sendo duas subunidades

$\alpha$  e outras duas não alfa, cada uma contendo um grupo heme. Estruturalmente o grupo heme consiste em um anel porfírinico (protoporfirina IX) formando um complexo central com o átomo de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), onde ocorre a ligação do oxigênio (DICKERSON, 1983).

Uma variedade de cadeias globínicas similar a  $\beta$  são sintetizadas entre o período embrionário e adulto. No primeiro trimestre ocorre a produção da globinas embrionária ( $\epsilon$ ), que são expressas as hemoglobinas Gower1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), deixando de serem expressas na fase fetal em que prevalece a globina gama ( $\gamma$ ) no saco vitelino. Logo após há uma transição dessa produção para o fígado fetal, quando passa a predominar então a produção de globina  $\gamma$  (Figura 1). Duas cadeias de globina  $\gamma$  combinam-se com duas  $\alpha$ -globina formando a hemoglobina fetal (HbF), a qual permanece predominante durante toda a gestação. A HbF é substituída gradativamente pela hemoglobina adulta HbA( $\alpha_2\beta_2$ ) alguns meses após o nascimento (FORGET; BUNN, 2013; MCGRATH; PALIS, 2008; SANKARAN V.G., 2010). A síntese de cadeias delta se inicia por volta do sexto mês de gestação dando origem a hemoglobina (HbA<sub>2</sub>) constituída de duas cadeias alfa e duas delta ( $\alpha_2\delta_2$ ) que representa de 2,5%- 3% das hemoglobinas em indivíduos saudáveis (HUEHNS et al., 1964; MANNING et al., 2007).

A AF é resultado de uma mutação pontual no gene da  $\beta$ -globina, gerada pela troca de uma timina por adenina (GTG para GAG) substituindo o sexto aminoácido que codifica uma valina ao invés de um ácido glutâmico (BUNN, 1997), originando a hemoglobina S (HbS), presente na anemia falciforme. Essa hemoglobina é constituída por duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\beta$  ( $\alpha_2\beta^S_2$ ), como a HbA.

**Figura 1. Produção de globinas durante a vida fetal e adulta.**



Fonte: Adaptado de Sankaran e Orkin, 2013.

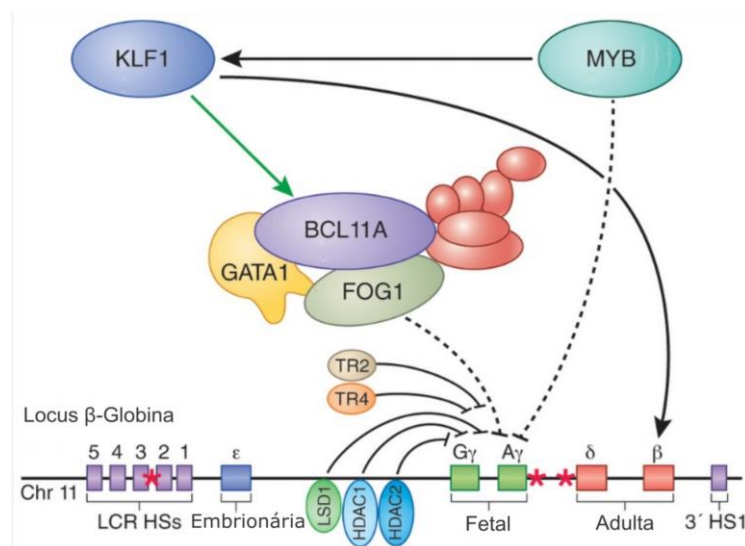
Todo esse processo é regulado no locus gênico da globina  $\alpha$  no cromossomo 16 e da globina  $\beta$  no cromossomo 11. Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos no silenciamento do gene da globina  $\gamma$  nas células eritroides adultas (SANKARAN; ORKIN, 2013). Uma variedade de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica de globina  $\gamma$  tem sido identificados, dentre eles o BCL11-A é reconhecido como o principal repressor, cuja inibição poderia aumentar os níveis de HbF (SANKARAN et al., 2008) (BAUER; ORKIN, 2015).

A expressão de BCL11-A parece ser ativada pelo fator de transcrição eritróide-específico KLF-1, reprimindo indiretamente a expressão do gene da globina  $\gamma$ . KLF-1 também se liga ao gene promotor de  $\beta$ -globina induzindo diretamente sua expressão (SIATECKA; BIEKER; DC, 2011; VINJAMUR et al., 2016; ZHOU et al.,

2010). O BCL11-A interage com SOX-6, GATA-1, FOG-1 e NuRD formando um complexo de silenciamento do gene da globina  $\gamma$  (SANKARAN et al., 2008). SOX-6 atua como repressor da expressão de globina  $\gamma$  no período embrionário se ligando ao gene promotor (YI et al., 2006). BCL11-A e SOX-6 são co-expressas e atuam colaborativamente no silenciamento da transcrição do gene de globina  $\gamma$  nas células eritroides adultas (Figura 2) (XU et al., 2010).

Adicionalmente, mecanismos epigenéticos envolvendo enzimas que modificam a função da cromatina como a histona deacetilase (HDAC), DNA metiltransferase (DNMT) e histona demetilase lisina-específica (LSD-1) também estão envolvidas na regulação do gene da globina  $\gamma$  (GINDER, 2015).

**Figura 2. Fatores de transcrição reguladores da expressão de gama-globina.**



B-cell lymphoma/leukemia 11A (BCL11A) e outras proteínas como GATA binding protein 1 (GATA1), zinc finger protein multi-type 1 (ZFPM1 ou FOG1), e o complexo nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD), se ligam no locus da globina reprimindo a expressão dos genes da globina  $\gamma$ . O fator Kruppel-like (KLF1) interage com este processo regulando positivamente a expressão de BCL11A (seta verde) e também promove transcrição do gene da  $\beta$ -globina de maneira direta -HSs indica sítios hipersensíveis de DNase I ; LCR: Região de controle de locus gênico.

Fonte: Adaptado de Sankaran & Weiss, 2015

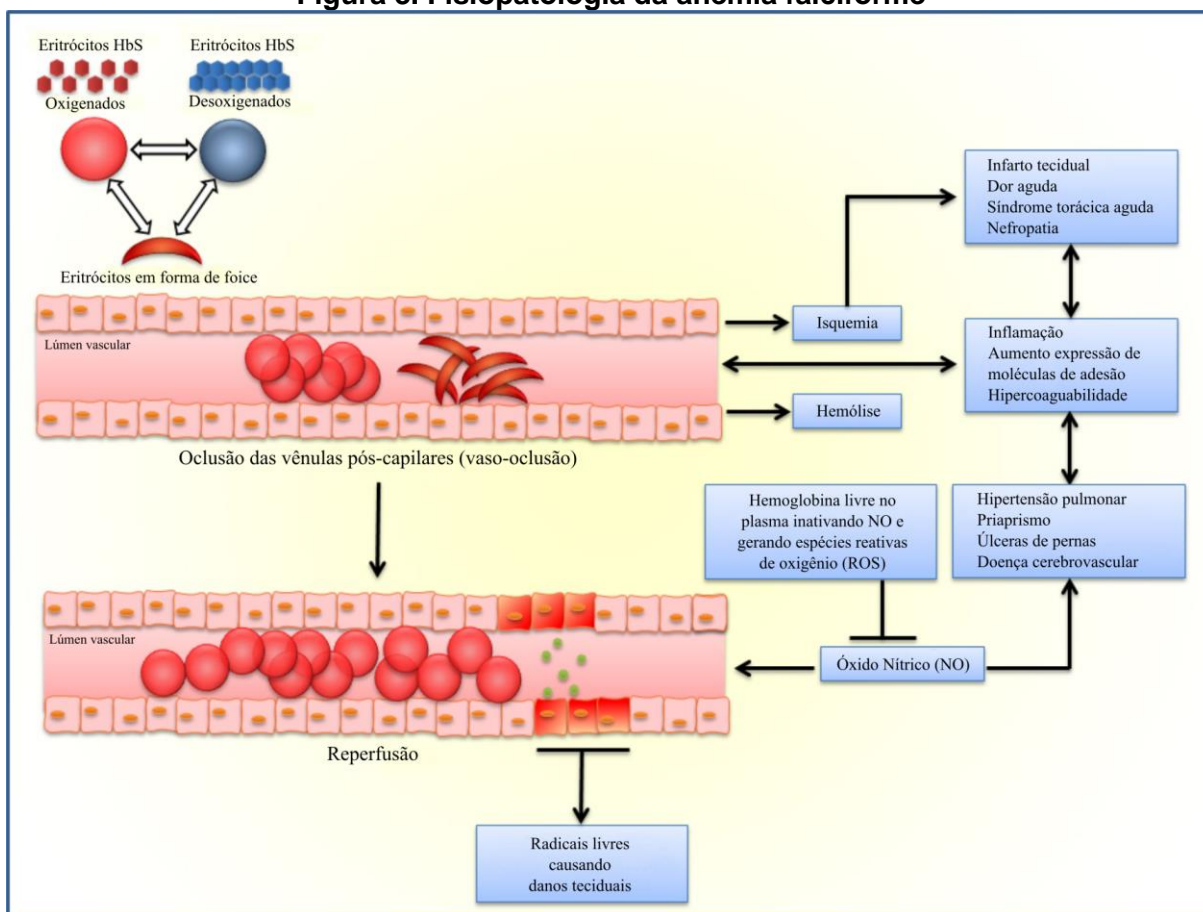
### *Fisiopatologia*

A mutação no gene da cadeia  $\beta$ -globínica altera propriedades físico-químicas da hemoglobina desencadeando os fenômenos fisiopatológicos da doença (BUNN & FORGET, 1986). A substituição das bases nitrogenadas causa modificações na estrutura tridimensional da hemoglobina. A carga neutra da valina na hemoglobina mutada permite interações hidrofóbicas entre as cadeias beta laterais, desencadeando a formação de polímeros em estado desoxigenado (DYKES; CREPEAU; EDELSTEIN, 1979)

A polimerização da HbS representa o evento primário na patogênese molecular da AF e é dependente de alguns fatores como: concentração de HbS e oxigênio, presença de hemoglobinas normais, pH, temperatura, força iônica e pressão (DE FRANCESCHI & CORROCHE, 2004; STUART & NAGEL, 2004). A polimerização gera alterações na estrutura e flexibilidade dos eritrócitos, promove desidratação celular, estresse físico e oxidativo, podendo levar à hemólise das hemácias (BRITTENHAM; SCHECHTER; NOGUCHI, 1985; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010)

O processo vaso-oclusivo é a maior causa de morbidade em pacientes com anemia falciforme. Este processo gera o quadro de isquemia, podendo resultar em infarto tecidual e é o principal responsável pelos sintomas clínicos da doença como as crises álgicas, síndrome torácica aguda e nefropatia. O ciclo de isquemia seguido por reperfusão gera lesão tecidual, estresse oxidativo e inflamatório, e aumenta a expressão de moléculas de adesão e conseqüentemente a produção de citocinas inflamatórias, agravando ainda mais a vaso-oclusão (Figura 3) (BELCHER et al., 2003; MANWANI; FRENETTE, 2013b)

**Figura 3. Fisiopatologia da anemia falciforme**



Fonte: adaptado Melo, 2015

As hemácias falciformes apresentam aumento da interação com endotélio vascular, leucócitos e plaquetas, devido ao aumento da expressão das moléculas de adesão em sua superfície levando a formação de agregados heterocelulares, contribuindo com a vaso-oclusão (SAKAMOTO et al., 2013).

A hemólise é outro processo fisiopatológico importante na AF e também é impulsionada pela polimerização da HbS. Durante a hemólise dos eritrócitos, há liberação da hemoglobina, arginase e difosfato de adenosina (ADP) para o plasma. A hemoglobina livre pode sequestrar o óxido nítrico (NO) endotelial diminuindo os níveis basais dessa molécula. Além disso, a arginase liberada pode metabolizar a arginina plasmática transformando-a em ornitina e uréia. Assim, com a diminuição da

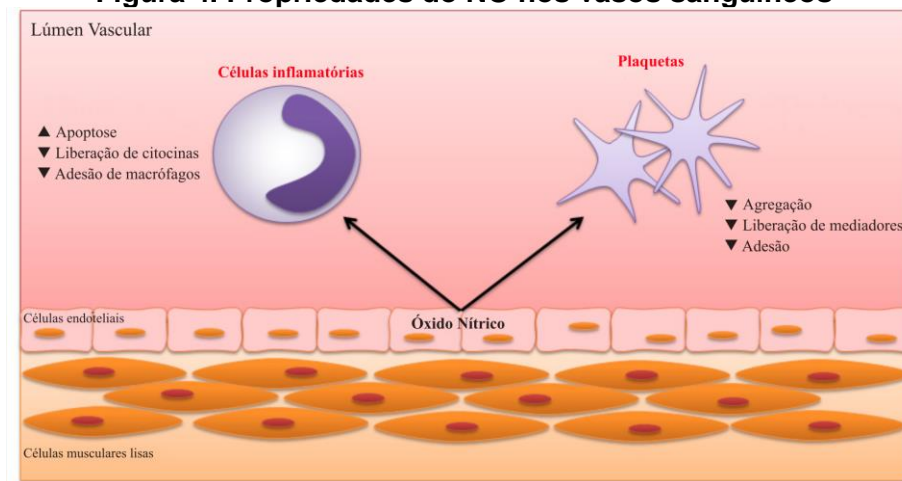


concentração da arginina que atuaria como substrato para síntese de NO, há diminuição dos níveis fisiológicos do mesmo (REITER et al., 2002).

O NO é normalmente produzido pelo endotélio, através da enzima NO-sintase (eNOs), a qual converte L-arginina em NO. É um potente vasodilatador e dentre suas propriedades importantes estão: inibição da expressão de receptores de adesão (VCAM-1 e selectinas) no endotélio vascular e diminuição da ativação de plaquetas e mediação no processo de isquemia-reperfusão (Figura 4) (DE CATERINA et al., 1995; PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988)

Neste contexto, a diminuição dos níveis de NO contribui para a vasculopatia e hipercoagulabilidade da doença e tem sido relacionada às manifestações clínicas como a hipertensão pulmonar, úlcera de pernas, priapismo e doença cerebrovascular (KATO et al., 2006).

**Figura 4. Propriedades do NO nos vasos sanguíneos**



Fonte: próprio autor

A inflamação é um fator central na gravidade da vasculopatia da anemia falciforme. A ativação de leucócitos, juntamente com as células endoteliais danificadas e a maior adesão das células sanguíneas ao endotélio vascular,

aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 que contribuem para o caráter inflamatório crônico da doença, propagando os episódios de dor e as crises vaso-oclusivas (CAJADO et al., 2010).

Uma vez que a polimerização da HbS é o processo inicial da vaso-oclusão, a mesma tem sido um alvo terapêutico importante e muito explorado. Atualmente, a estratégia utilizada de promover o aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF), têm tido um enorme impacto na redução do número e gravidade de episódios vaso-oclusivos e ainda na diminuição da mortalidade de pacientes com A.F. (MANWANI; FRENETTE, 2013b).

### *Tratamento*

A complexidade dos sintomas e a origem genética da AF são barreiras para as descobertas científicas de novas terapias. Estas complicações, associado ao desinteresse da indústria farmacêutica pela pesquisa de novos fármacos para a doença é um dos grandes obstáculos para a descoberta de tratamentos mais efetivos e seguros.

Atualmente algumas estratégias têm sido abordadas na busca de novas terapias, incluindo: indução da expressão de HbF; aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico; modificação das propriedades reológicas do sangue; redução da sobrecarga de ferro e modificação estrutural na cadeia beta da molécula de hemoglobina (Figura 5). (DE MELO et al., 2014)

**Figura 5. Abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento da anemia falciforme**



Fonte: próprio autor

A indução de HbF tem se mostrado um alvo muito promissor em diversos estudos experimentais e clínicos envolvendo pacientes com AF (DAI et al., 2016; PACE; ZEIN, 2006). Os níveis elevados de HbF em pacientes com anemia falciforme tem sido associado com a redução de eventos clínicos e mortalidade precoce dos pacientes. Estes fatos podem ser relacionados à diminuição da polimerização da HbS gerada pelo aumento da HbF e a menor adesividade das hemácias, plaquetas e leucócitos dificultando o processo vaso-oclusivo (AKINSHEYE et al., 2011; PERRINE; PACE; FALLER, 2014).

Atualmente, algumas moléculas são descritas na literatura como indutores de HbF, entre elas: HU, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, decitabina, azacitidina, ácido butírico e derivados e metformina.

### Hidroxiuréia (HU)

A HU é um agente quimioterapêutico, antimetabólito, inibidor seletivo da síntese de ribonucleotídeo difosfato redutase, enzima necessária na conversão de ribonucleotídeos difosfatados em desoxiribonucleotídeos difosfatados. Este fármaco impede que as células saiam da fase G1/S do ciclo celular, sendo usada principalmente em neoplasias do sistema hematopoético (HANFT et al., 2000). Atualmente, é o único fármaco aprovado pela agência regulatória norte americana *Food Drug Administration* (FDA) para uso em pacientes com anemia falciforme.

Além da diminuição da vaso-oclusão, redução do número de episódios de síndrome torácica aguda e necessidade de transfusão sanguínea, estudos demonstraram que a HU tem a capacidade de aumentar a concentração de hemoglobina fetal, bem como diminuir o número de crises dolorosas em pacientes sob tratamento (CHARACHE et al., 1992). Em um estudo que acompanhou durante cinco anos pacientes tratados com o fármaco, foi observada redução de 40% no número de mortes (FERSTER et al., 2001)

O mecanismo exato pelo qual a HU aumenta os níveis de HbF ainda não foi totalmente elucidado, porém alguns estudos descrevem diferentes ações como: 1) modificações epigenéticas e eventos transcricionais mediadas por BCL11A, SOX-6 e Mi-2/NuRD (XU et al., 2010); 2) ativação de vias de sinalização envolvendo a biotransformação da HU em NO ativando GMPc, guanilato ciclase solúvel (GCs), e a via Gi $\alpha$ /JNK/Jun (CONRAN et al., 2004; COKIC et al., 2003); 3) atuação em vias pós transcricionais reguladas por micro-RNAs (miR-15a e miR-16-1), os quais tem como alvo direto MYB, outro regulador importante de globina  $\gamma$  (PULE et al., 2015; SANKARAN et al., 2011).

Dentre os efeitos descritos para HU estão: a diminuição do número de leucócitos, reticulócitos e plaquetas e a diminuição da adesividade dos eritrócitos e leucócitos ao endotélio (HILLERY et al., 2000).

Apesar dos efeitos benéficos, a HU pode causar mielotoxicidade, hiperpigmentação cutânea e lesões ulcerativas em membros inferiores (NAHAVANDI et al., 2002). Estima-se que cerca de um terço dos pacientes tratados não respondem a HU ou necessitam de aumento da dose para tratamento crônico eficaz, aumentando o risco de toxicidade. Mesmo com esses inconvenientes, evidências documentadas da eficácia do uso da HU na redução da morbidade e mortalidade dos pacientes justificam seu uso clínico devido à falta de outras opções terapêuticas mais seguras e eficazes (RAGHUPATHY; BILLET, 2009)

Nesse contexto, torna-se muito importante a introdução de um novo fármaco que agregue os efeitos benéficos da HU sem sua potencial toxicidade.

### Talidomida

A talidomida foi originalmente usada como agente hipnótico/sedativo e antiemético, mas foi retirado do mercado na década de 60 devido aos seus efeitos teratogênicos (WARD, 1962) . Atualmente, a talidomida é usada no tratamento de doenças autoimunes e hematológicas, como o mieloma múltiplo, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (BARTLETT; DREDGE; DALGLEISH, 2004). Estudos demonstraram que o fármaco induz a expressão de mRNA de gama globina de maneira dose dependente. O mecanismo desta indução estaria associado à via de sinalização de p38 MAPK e acetilação de histona H4 (AERBAJINAI et al., 2007). Do ponto de vista mecanístico, o aumento da produção

de ROS atuaria como sinalizador para mediar a fosforilação de tirosinas kinases como a p38 MAPK regulando a expressão gênica de gama globina (HSIAO et al., 2006).

A lenalidomida e a pomalidomida são imidas imunomoduladoras análogos estruturais da talidomida também descritos como inibidores de TNF- $\alpha$ . (BODERA; STANKIEWICZ, 2011) Moutouh-de Parseval e colaboradores (2008) demonstraram que a pomalidomida e a lenalidomida são indutoras da síntese de HbF e moduladoras da diferenciação de eritrócitos em ensaio utilizando células tronco de medula óssea tanto de indivíduos controle quanto de pacientes com doença falciforme. O efeito observado foi ainda maior quando esses fármacos foram associados com HU durante o tratamento, sendo a combinação com pomalidomida mais efetiva que a combinação com lenalidomida. (MOUTOUH-DE PARSEVAL et al., 2008)

Estudos *in vivo* com animais falciformes transgênicos tratados com a pomalidomida demonstraram aumento na expressão da HbF comparável com a HU, porém não apresentou os efeitos mielosupressivos da mesma. Interessantemente, a pomalidomida foi capaz de aumentar a eritropoese, preservando a função medular. (MEILER et al., 2011) Estudos recentes mostraram que o mecanismo de indução de HbF pela pomalidomida está relacionado seletivamente com a repressão dos fatores BCL11A e SOX-6 (Figura 2) (DULMOVITS et al., 2015).

### Decitabina

A decitabina (5-aza-2-deoxicitidina) é um potente indutor de HbF via hipometilação do gene promotor da gama globina, inibindo a enzima

metiltransferase. Apesar da eficácia em aumentar HbF em indivíduos refratários ou intolerantes a hidroxiurea, estudos clínicos demonstraram toxicidade significativa para este fármaco (NARESH et al., 2008). Um outro estudo clínico de fase 1 demonstrou segurança na administração oral da decitabina combinada com tetrahidouridina, um inibidor de citidina deaminase, a qual é responsável por inativar a decitabina rapidamente, e mais estudos serão realizados para verificar a efetividade deste tratamento (MOLOKIE et al., 2017).

### Butiratos

Os butiratos são ésteres de ácidos graxos de cadeia curta inibidores da histona deacetilase (HDAC). A inibição desta enzima induz a transcrição do gene da gama globina e aumento da produção de HbF. Acredita-se que o mecanismo envolvido nesta indução também seja a sinalização via p38 MAPK a qual regula a expressão gênica de gama globina. (MCCAFFREY et al., 1997) Os butiratos têm demonstrado um aumento sustentado da concentração de HbF nos pacientes tratados. Porém, sua meia-vida curta exige uma grande quantidade durante a administração cuja via é exclusivamente parenteral, devido a baixa absorção oral, o que limita sua adesão na clínica. (KUTLAR et al., 2013; PACE et al., 2015) Recentemente o estudo clínico de fase II com o 2,2-dimetilbutirato (HQQ-1001), foi encerrado sem efeitos significativos e novos estudos com ajuste de dose serão realizados. (REID et al., 2014)

## Doadores de NO

Terapias visando o aumento da biodisponibilidade de NO podem proporcionar efeitos benéficos aos pacientes, uma vez que, segundo estudos, 50% dos pacientes possuem disfunção endotelial gerada pela deficiência de NO (MACK; KATO, 2006).

O primeiro uso clínico do NO na doença falciforme foi relatado por Atz e Wessel no tratamento da síndrome torácica aguda. A inalação do NO diminui a pressão e resistência vascular pulmonar e melhora a oxigenação (ATZ ANDREW M.; WESSEL DAVID L., 1997). Dentre as desvantagens do NO inalado está o seu alto custo e a necessidade de profissionais com treinamento para a administração. Neste contexto, as moléculas doadoras de NO apresentam mais vantagens, menos custos e melhor controle do perfil farmacocinético quando comparado ao uso do gás NO.

Dentre os doadores de NO disponíveis na terapêutica, os nitratos orgânicos são os mais comumente utilizados para tratamento de angina e insuficiência cardíaca. No entanto, seu uso prolongado pode levar ao mecanismo de tolerância, o que justifica a falta de eficácia destes fármacos após determinado período de tratamento. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que os nitratos necessitam reagir com grupos tióis para liberação de NO, depletando ou diminuindo o conteúdo de tióis nas células, levando à auto-inibição do seu metabolismo (SCHÖNAFINGER, 1999).

Outras classes de doadores de NO disponíveis são: nitritos, complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas, *N*-nitrosotióis, *N*-hidroxiguanidinas, derivados de ácido hidroxâmico. Alguns desses doadores como complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas e *N*-nitrosotióis apresentam algumas desvantagens como instabilidade química, física e meias-vidas muito curtas. A menos que essa instabilidade seja



resolvida, essas desvantagens os desqualificam como potenciais fármacos doadores de NO (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005).

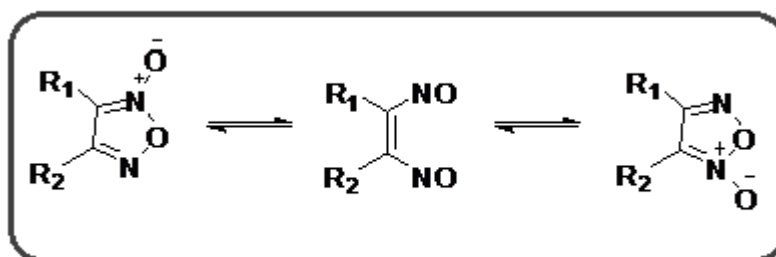
#### Furoxanos como doadores de NO

O furoxano e seus derivados (1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido) representam uma importante classe de compostos heterocíclicos com diferentes propriedades químicas e atividades biológicas. São compostos estáveis em meio ácido e frente a eletrófilos. Apresentam estabilidade térmica, porém são pouco estáveis frente a nucleófilos e bases (WANG, 2002). Comparando-os com os outros doadores de NO, os derivados furoxânicos podem exibir um perfil farmacológico muito desejável: liberação lenta e sem o desenvolvimento de mecanismo de tolerância dos nitratos (SCHONAEFINGER et al., 1999).

Os compostos 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido podem ser obtidos por diversas rotas sintéticas como oxidação de dioximas, termólise de *o*-nitroazidas; dimerização de *N*-óxidos de nitrilas, oxidação de *o*-amino nitroderivados, reação de alcenos com N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (CURINI et al., 2000; SCHONAEFINGER et al., 1999; HWANG et al., 1998; BOHN et al., 1995; GODOVIKOVA et al., 1993; GASCO et al., 1991).

Alguns estudos descrevem que o anel furoxânico substituído pode sofrer tautomerismo (Figura 5). Esta isomerização envolve furoxanos com diferentes substituintes e depende da natureza dos substituintes, bem como dos solventes e temperatura (CERECETTO & PORCAL, 2005; GASCO, 1981).

Figura 6: Equilíbrio tautomérico do furoxano



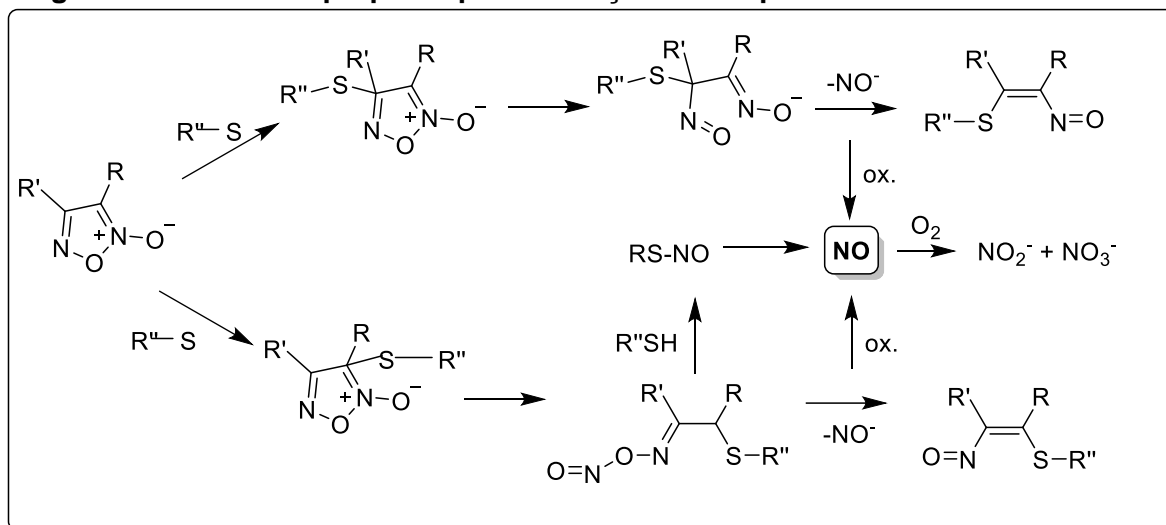
Fonte: próprio autor

As diversas atividades farmacológicas estão relacionadas em parte à capacidade de doação de NO pela subunidade furoxânica. Dentre elas podemos citar: antichagásica (CERECETTO et al., 1999), antiagregante plaquetária (CENA et al. 2004), propriedades vasodilatadoras (DEL GROSSO et al., 2005; FRUTTERO et al., 1995), antineoplásica, (CERECETTO, 2005), neuroprotetora (SCHIEFER et al., 2012), entre outras.

Ainda que a capacidade de doação de NO dos derivados furoxânicos esteja bem fundamentada na literatura, os mecanismos para essa doação ainda não foram totalmente elucidados. Feilish e colaboradores relataram inicialmente, que alguns derivados furoxânicos como a *N,N'*-diisopropilfuroxancarboxamida e seus análogos *N,N'*-dimetil, eram capazes de liberar NO na presença de tióis (Figura 6) (FEELISCH; SCHONAFINGER; NOACK, 1992).

Estudos posteriores com o 4-fenil-3-furoxancarbonitrilo propuseram o mecanismo semelhante ao descrito anteriormente para doação de NO (MEDANA et al., 1994).

**Figura 7. Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos.**



Fonte: retirado e adaptado de FEELISCH; SCHONAFINGER; NOACK, 1992

O ataque do tiolato pode ocorrer no carbono das posições 3 ou 4. No primeiro caso, o intermediário tetraédrico resultante abre o anel levando a um derivado nitroso, que poderia produzir um ânion nitroxil. Esse ânion é então oxidado para óxido nítrico, que por sua vez, na presença de oxigênio em meio aquoso produz nitrito e nitrato. A interação entre espécies de nitrogênio oxigenadas, formadas durante essa etapa, com tióis pode justificar a produção de nitrosotióis. O ataque do íon tiolato na posição 3, produz condições semelhantes. Curiosamente alguns furoxanos também podem produzir NO na ausência de tióis ou ainda por ação enzimática (GASCO et al., 2004).

Atualmente a hibridação molecular dos furoxanos com diversas moléculas tem sido uma abordagem muito utilizada na Química Farmacêutica e Medicinal. A obtenção dos híbridos é realizada ligando-se uma molécula do doador de NO com outra subunidade com atividade farmacológica de interesse, diretamente ou através de um espaçador que contribua nas atividades farmacológicas desejadas. Deste modo é possível se obter na mesma estrutura química dois efeitos farmacológicos,

atingindo diferentes alvos com uma só molécula, melhorando a tolerância, otimizando a farmacocinética, o que pode beneficiar o tratamento de certas doenças multifatoriais como a anemia falciforme (SCATENA, 2010).

Neste contexto, Santos e colaboradores sintetizaram novos compostos híbridos contendo a subunidade estrutural da talidomida e diferentes núcleos furoxânicos a fim de se obter compostos úteis para o tratamento da anemia falciforme, combinando o efeito anti-inflamatório da subunidade ftalimídica e a modulação da doação de NO oriunda dos derivados furoxânicos. Todos os compostos apresentaram atividade anti-inflamatória e analgésica maior que a indometacina e dipirona, usadas como controle. A doação de NO foi variável entre os compostos (9-28%). E estes ainda demonstraram habilidade em induzir a expressão de gama-globina *in vitro* (DOS SANTOS et al., 2012)

Assim, em continuidade com a linha de pesquisa que visa a obtenção de imidas imunomoduladoras foi proposto neste trabalho a hibridação molecular entre a pomalidomida e os derivados furoxânicos visando melhorar as propriedades farmacodinâmicas, previamente identificadas por SANTOS (2012) como sendo benéficas ao tratamento da AF.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Este trabalho visou o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados da pomalidomida com propriedades doadoras de NO para tratamento da anemia falciforme.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Síntezar, isolar, purificar e caracterizar estrutural dos compostos híbridos planejados;
- Avaliar a capacidade de doação de óxido nítrico e produção de GMPc em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) pelos compostos finais;
- Avaliar a capacidade dos compostos em induzir a expressão de gama-globina e HbF em células CD34+;
- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na regulação da expressão de gama-globina induzida pelos compostos finais.
- Avaliar a capacidade dos compostos finais em inibir a produção de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Planejamento estrutural

A identificação do protótipo é a etapa-chave para a descoberta da arquitetura molecular adequada para ação dos fármacos. Neste trabalho pretendeu-se otimizar a atividade dos compostos híbridos identificados previamente por nosso grupo de pesquisa para obtenção de candidatos a fármacos mais potentes e seguros no tratamento da anemia falciforme.

Assim, utilizando a estratégia de hibridação molecular foi planejada uma nova série de estruturas contendo as subunidades farmacofóricas: a) do protótipo pomalidomida (**1**), representadas pela inserção do núcleo 3-amino ftalimídico (**A**); b) do núcleo furoxânico (**B**) contendo diferentes substituintes (**2a-c**), espaçados pelo grupo *N*-acilhidrazona (Figura 7).

A subunidade ftalimídica (**A**), grupo farmacofórico principal para a ação moduladora direta sobre biossíntese de TNF- $\alpha$  da pomalidomida foi selecionada para os derivados planejados (LIMA et al 2001). Recentemente, foi relatado que a pomalidomida, é um inibidor do TNF- $\alpha$  muito mais potente que a talidomida (CHAULET et al., 2011; MULLER et al., 1999) e ainda possui a capacidade de induzir a expressão do gene de gama-globina e aumentar a síntese de HbF. A pomalidomida também aumenta a eritropoiese e preserva a função da medula óssea em animais falciformes transgênicos (MOUTHOUH-DE PARSEVAL, 2008; MEILER et al., 2011). Por outro lado, o grupo glutarimídico não contribui para o efeito de redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e contribui de maneira deletéria a atividade.

Estudos recentes, tem demonstrado que o mecanismo molecular do efeito teratogênico esta diretamente relacionado à subunidade glutarimídica, após esta se

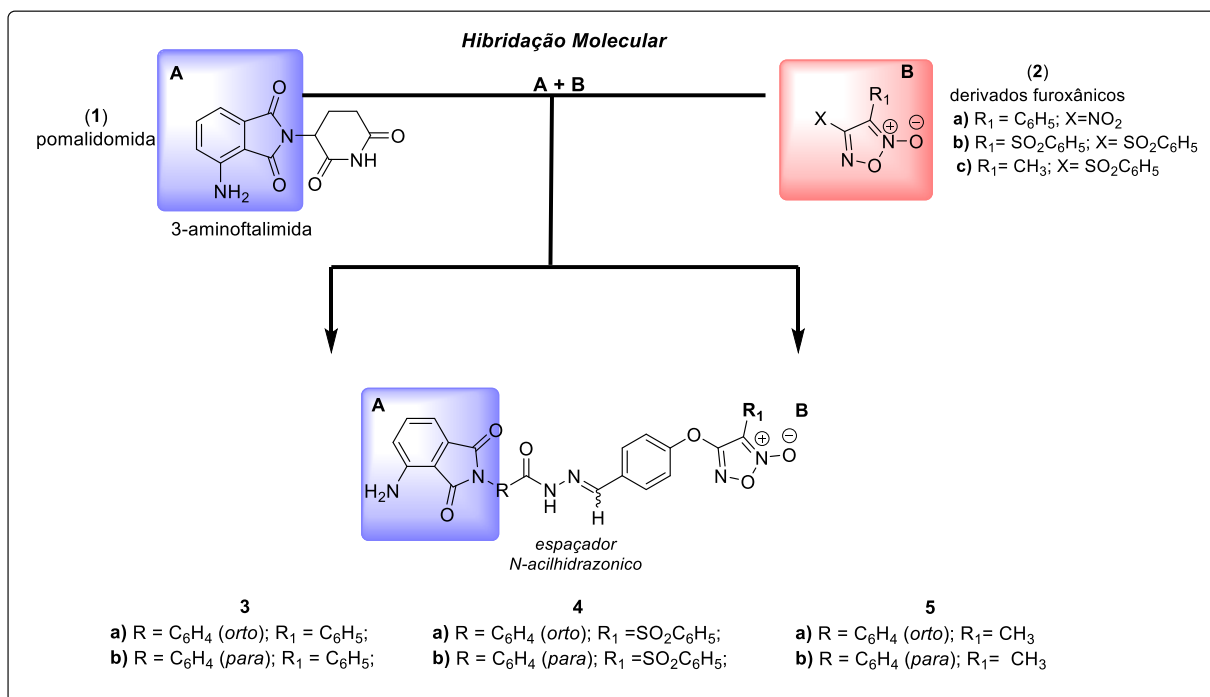
ligar e inibir o cereblon (CRBN). O CRBN é uma proteína humana cujo gene se encontra no cromossomo 3, e que forma com E3 ubiquitina ligase um complexo que danifica a proteína-1 de ligação do DNA (DDB-1), culina-4A (CUL4A) e reguladores de culina-1 (ROC1) levando a alterações no desenvolvimento embrionário (CHAMBERLAIN et al., 2014). Dessa forma, a eliminação desse grupo nos novos derivados poderia abolir o centro assimétrico e diminuir possíveis efeitos tóxicos relacionados com a interação desta subunidade.

A subunidade *N*-acil hidrazona presente nos novos derivados planejados foi utilizada apenas como agente espaçador. Diversos relatos na literatura demonstram a importância dessa subunidade em compostos com atividade analgésica, anti-inflamatória e antiagregante plaquetária (SILVA et al 2010; LIMA et al 2008; SILVA et al 2004; BARREIRO et al 2002; BARREIRO & FRAGA, 1999). No trabalho, essa subunidade espaçadora com possíveis homologações de cadeia lateral, foram desenhadas a fim de otimizar a potencial atividade por vezes inibidora de TNF- $\alpha$  e/ou doadora de óxido nítrico nos novos derivados híbridos.

Os derivados furoxânicos (**2a-c**), foram selecionados neste trabalho por apresentarem diferentes perfis de doação de NO. Derivados contendo grupo metil ligado ao carbono alfa a subunidade N-óxido (**2c**) são fracos doadores de NO, enquanto aqueles contendo o grupo fenil (**2a**) e fenilsulfonil (**2c**) são doadores moderados e fortes, respectivamente. Dessa forma, pode-se avaliar a contribuição e a relação da doação de NO com atividade farmacológica dos novos compostos planejados.

Nossa hipótese é de que a inibição de TNF- $\alpha$  associada à capacidade de doação de óxido nítrico permitirá na doença o controle do processo inflamatório associado ao aumento de produção de HbF.

**Figura 8. Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos (3a-b), (4a-b) e (5a-b)**



Fonte: próprio autor.



*Reagentes*

- 1,8-diazobicycloundec-7-eno (DBU) (Sigma Aldrich);
- 2-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich);
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (Across);
- 3-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich);
- 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (Sigma Aldrich);
- 4-cloro-benzoilacetonitrila (Alfa Aesar);
- 4-fluor-benzoilacetonitrila (Sigma Aldrich);
- 4-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich);
- 4-metil-benzoilacetonitrila (Sigma Aldrich);
- 4-metoxi-benzoilacetonitrila (Sigma Aldrich);
- 4-oxi-trifluormetil-benzoilacetonitrila (Alfa Aesar);
- 6-metilbenzofuroxano (Alfa Aesar);
- acetato de etila P.A. (Quemis);
- acetato de sódio (J.T. Baker);
- acetona (Synth);
- ácido acético glacial P.A. (Synth);
- ácido clorídrico P.A. (HCl) (Synth);
- ácido metacrílico (Sigma Aldrich);
- ácido monocloroacético (Fluka);
- ácido nítrico 98% (Vetec);

- ácido p-toluenossulfônico (Sigma Aldrich)
- ácido sulfúrico 60% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Synth);
- água destilada;
- álcool cinâmico (Fluka);
- azida de sódio (Merck);
- benzoilacetonitrila (Alfa Aesar);
- bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Across);
- carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Vetec);
- cloreto de sódio (NaCl) (Sigma Aldrich);
- clorocromato de piridíno (PCC) (Sigma Aldrich);
- clorofórmio (Quemis);
- crotonaldeído P.A. (Sigma Aldrich);
- diclorometano P.A. (DCM) (Quemis);
- dicloroetano (Sigma Aldrich);
- dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec);
- dióxido de selênio (Sigma Aldrich);
- estireno (Sigma Aldrich);
- etanol P.A. (Synth);
- éter de petróleo P.A. (Synth);
- éter etílico P.A. (Quemis);
- etilenoglicol (Sigma Aldrich);

- hexano P.A. (Synth);
- hidróxido de sódio (Merck);
- isoniazida (Fluka);
- metanol P.A. (Synth);
- nitrito de sódio (Across);
- p-toluenosulfonato de piridina (PPTS) (Sigma Aldrich);
- sílica gel para cromatografia em coluna 40-60  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich);
- sílica gel para cromatografia em coluna 63-200  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich);
- sulfato de sódio anidro (Synth);
- tiofenol (Across);
- tolueno P.A. (Synth);
- trietilamina (J.T. Baker);

#### *Equipamentos*

- Agitador magnético Biovera<sup>®</sup> modelo IKA C-Mag HS4, Rio de Janeiro-Brasil;
- Balança analítica Shimadzu<sup>®</sup> - modelo AUW220D, Kyoto-Japão;
- Balança semi-analítica Gehaka<sup>®</sup> - modelo BG 200, São Paulo-Brasil;
- Cromatógrafo líquido Biotage<sup>®</sup> - modelo Isolera One, Uppsala-Suécia;
- Espectrômetro de massas de ultra resolução Bruker Daltonics<sup>®</sup> - modelo Maxis HD, Bremen-Alemanha;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker<sup>®</sup> - modelo Fourier 300 (7,1 T), operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ , Bremen-Alemanha;

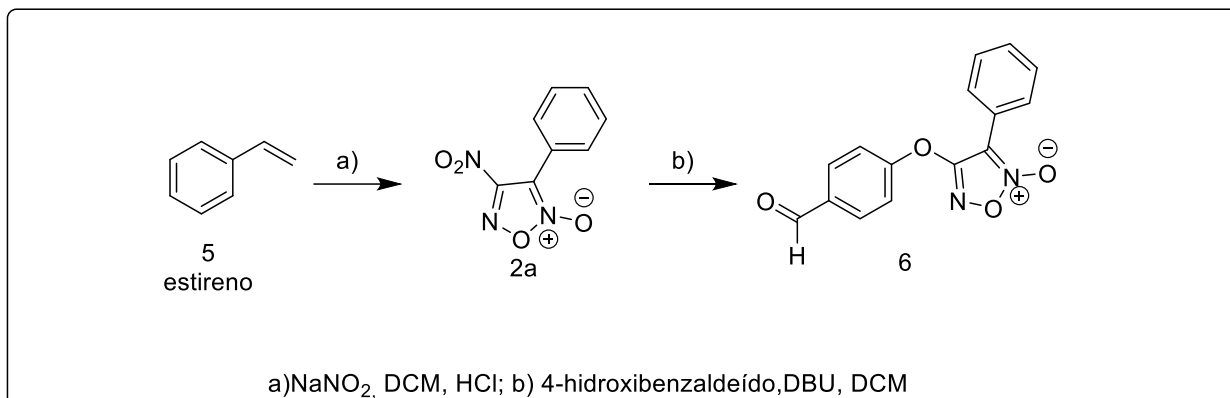
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker® - modelo Avance III HD 600 (14,1 T), operando a 600 MHz para  $^1\text{H}$  e 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ , Bremen-Alemanha;
- Espectrofotômetro UV Shimadzu® - modelo 1800, Kyoto-Japão;
- Espectrofotômetro no infravermelho Shimadzu® - modelo IR Prestige-21, Kyoto-Japão;
- Forno mufla Bravac® - modelo Contemp TCM77, São Paulo-Brasil;
- Leitor de microplacas Biotek® – modelo Epoch 2, Vermont-EUA;
- Rotaevaporador Buchi® - modelo F108, Heerbrugg-Suíça;
- Aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific®- Reino Unido;
- Balança analítica Marte® - modelo AY 220, São Paulo-Brasil

#### 4.2. Metodologia sintética

##### *Preparação dos derivados furoxânicos funcionalizados (2a-c)*

O derivado furoxânico 4-nitro-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**2a**) foi obtido através da reação do estireno (**5**) com nitrito de sódio em meio com ácido acético (Figura 8) (MONGE et al., 1998). Em seguida, o núcleo furoxânico (**2a**) foi funcionalizado através de reações de substituição nucleofílica aromática para obtenção do intermediário **6** (Figura 8). (MONGE et al., 1998; ADAMS & LUZZIO, 1989)

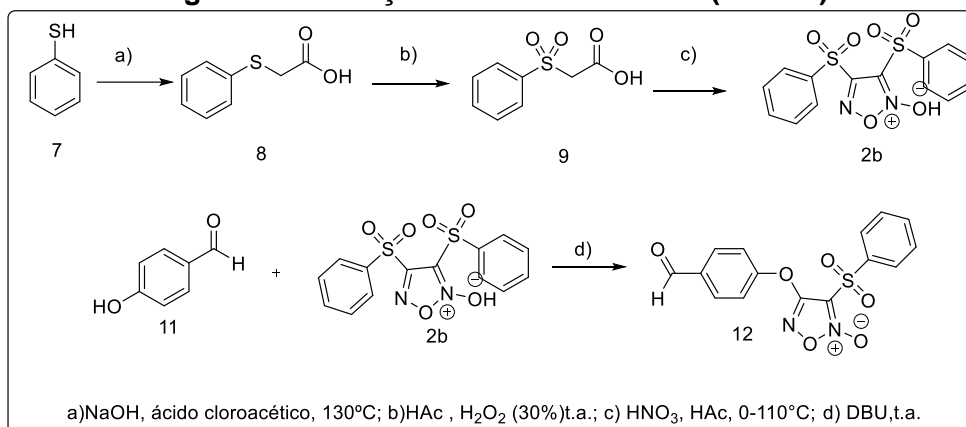
**Figura 9. Obtenção do intermediário furoxânico 4-nitro-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (2a) e intermediário 6**



Fonte: próprio autor

O intermediário bis-aryl-sulfonil 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**2b**) foi obtido através de três etapas sintéticas. Primeiramente o tiofenol (**7**) foi reagido com o ácido monocloroacético e hidróxido de sódio para obtenção do ácido feniltioacético (**8**) (Figura 9). Na segunda etapa o sulfeto foi oxidado à sulfona (**9**) usando como agente oxidante peróxido de hidrogênio 30%. Na etapa seguinte, a sulfona (**9**) foi reagida com ácido nítrico 90% para formação do núcleo bis-aryl-sulfonil furoxânico (**2b**). Em seguida, o núcleo furoxânico (**2b**) foi funcionalizado através de reações de substituição nucleofílica aromática, para obtenção do intermediário **12** (Figura 9) (SANTOS et al., 2012; SANTOS, 2009; FARRAR, 1949).

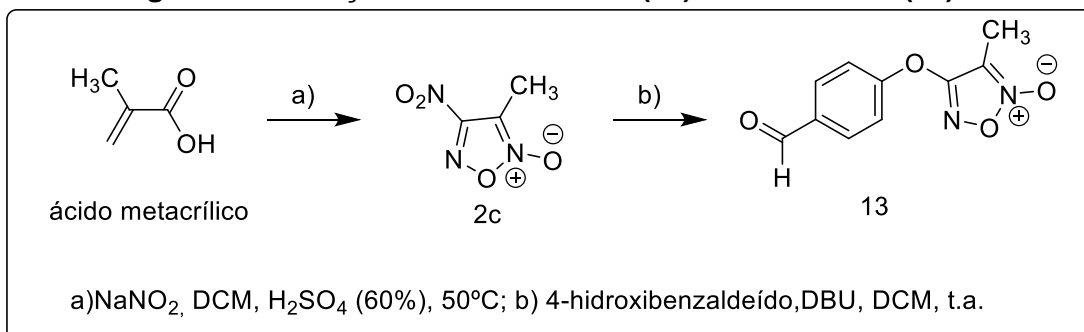
**Figura 10.Obtenção dos intermediários (2b e 12)**



Fonte: Próprio autor

O derivado furoxânico 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**2c**) (Figura 10) foi obtido, a partir do ácido metacrílico (**13**) nitrito de sódio e ácido sulfúrico 60%. Em seguida o furoxano (**2c**) foi reagido com 4-hidroxibenzaldeído utilizando DBU como base (MAKSIMOVIC-IVANIC et al., 2008).

**Figura 11.Obtenção do intermediário (19) e do furoxano (2c).**

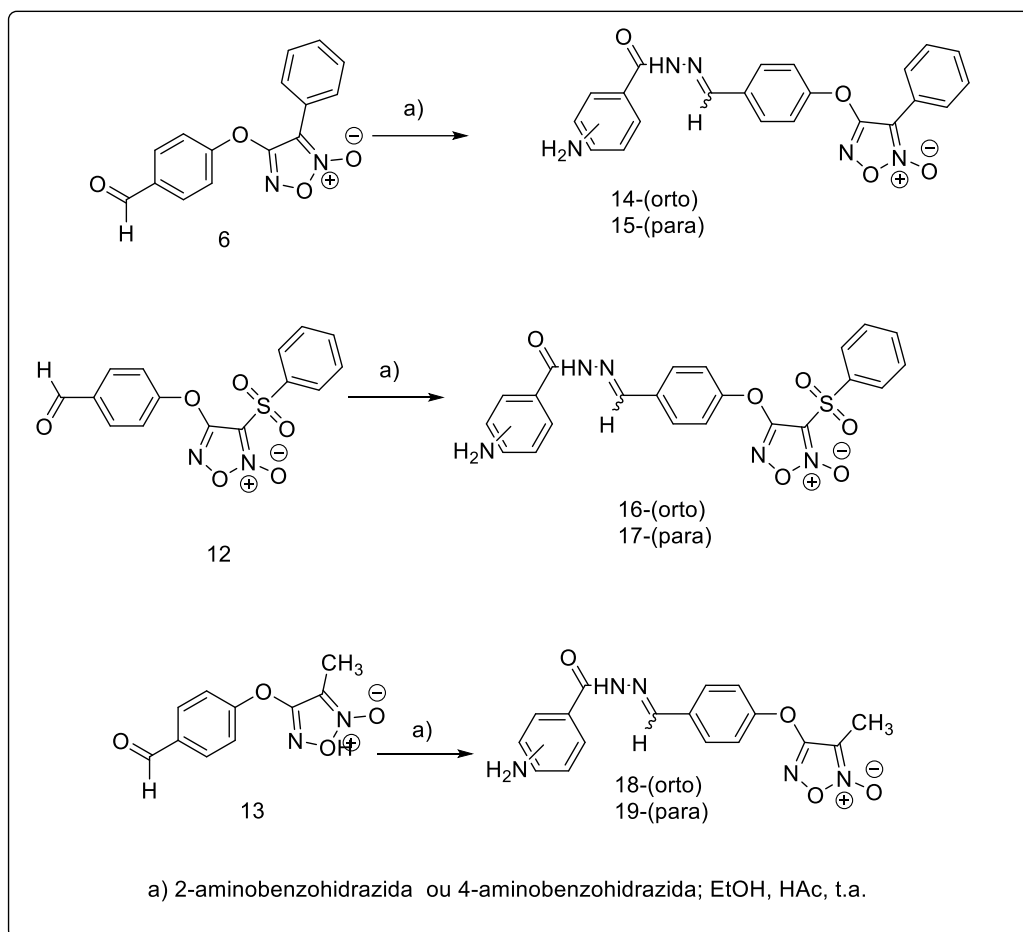


Fonte: Próprio autor

#### *Preparação dos intermediários N-acil-hidrazônicos (14-19)*

A formação dos intermediários *N*-acil-hidrazônicos (**14-19**) foi realizada reagindo-se a função aldeído dos derivados furoxânicos (**6**, **12** e **13**), com as respectivas hidrazidas (2-aminobenzohidrazida ou 4-aminobenzohidrazida) em meio etanólico com catálise ácida (Figura 11) (LIMA et al., 2008).

Figura 12. Obtenção dos intermediários 14-19



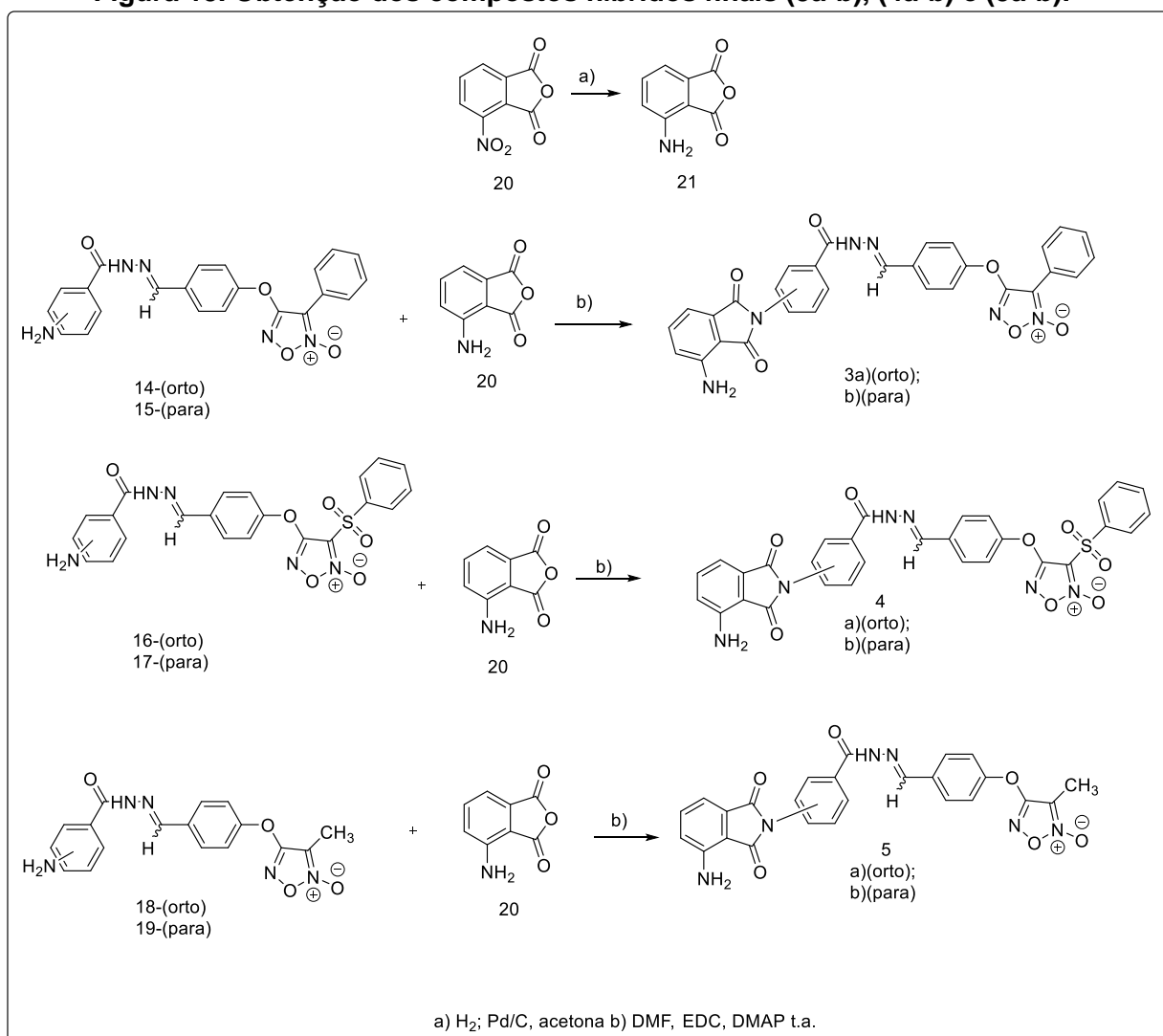
Fonte: próprio autor

### Preparação dos compostos híbridos finais (3a-b), (4a-b) e (5a-b)

Na última etapa reacional de formação dos compostos finais híbridos **(3a-b)**; **(4a-b)**; **(5a-b)** o anidrido 3-aminoftálico (**21**) foi previamente preparado pela redução do anidrido 3-nitroftálico (**20**) utilizando-se hidrogenação e Pd/C como catalisador (Figura 12). Foi então realizado o acoplamento dos intermediários **(14-19)** com o anidrido 3-aminoftálico (**21**) utilizando como agente acoplante 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) e dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador. Esta reação foi realizada em meio contendo dimetilformamida (DMF) como solvente. Não foi necessária a proteção do grupo amino livre (**20**) para esta

reação.

**Figura 13. Obtenção dos compostos híbridos finais (3a-b), (4a-b) e (5a-b).**



Fonte: Próprio autor

### 4.3. Métodos Analíticos

**Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.):** Utilizou-se cromatografia em camada delgada para o acompanhamento das reações em cromatoplas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 Sigma® ou Merck®. A revelação foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm), seguido pela exposição ao iodo.

**Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C:** Os espectros de RMN foram obtidos a 300 ou 600 MHz para <sup>1</sup>H e a 75 MHz para <sup>13</sup>C. As análises foram realizadas na Central



Analítica do Instituto de Química da UNESP Araraquara, utilizando um espectrômetro de 300 MHz (7.0 Tesla;  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) Fourier com Dual probe  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  – Bruker® e espectrômetro de 600 MHz (14.0 Tesla;  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) Ascend –Bruker®. Os deslocamentos químicos são reportados em partes por milhão ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (J) são mostrados em Hertz (Hz). Os deslocamentos são representados por s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete).

*Ponto de Fusão:* As faixas de fusão dos compostos foram determinadas, sem correção, em aparelho de Ponto de fusão capilar Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific.

#### **4.4. Ensaio Farmacológicos**

##### *Detecção quantitativa de nitrito*

O NO em solução rapidamente se oxida a nitritos e nitratos, por isso a quantificação da concentração de nitrito é uma forma indireta de mensurar a capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos. Uma solução do respectivo derivado furoxânico e padrões (20  $\mu\text{L}$ ) em DMSO foi adicionado a tubo contendo 2 mL de tampão fosfato 50mM (pH 7,4) e 5 mM de cisteína. A concentração final de cada composto no tubo foi  $10^{-4}\text{M}$ . Após 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , 1 mL dessa solução foi tratada com 250  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro UV/visível. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) mol/mol  $\pm$  E.P.M.

### *Quantificação de GMPc*

A produção de óxido nítrico a partir de células HUVEC foi avaliada pela acumulação intracelular de GMPc. As células foram tratadas e incubadas durante um período de 4 h. As células HUVEC foram cultivadas em placas de 60 mm e utilizadas quando em confluência. A incubação com os compostos testados foi interrompida pela remoção do sobrenadante da cultura e as células foram então cobertas imediatamente com tampão de lise e raspadas. O extrato foi coletado, centrifugado por 5 min a 5000 x g e armazenado a -20 °C até ser analisado. Para normalizar os valores de cGMP, o teor de proteína em cada poço foi medido pelo ensaio de Bradford e os resultados foram apresentados na ordem de fmol cGMP / µg de proteína. Os níveis intracelulares de GMPc foram medidos utilizando-se o kit GMPc EIA (R & D Systems), de acordo com as instruções do fabricante.

### *Produção de gama globina e HbF em células CD34+ induzida pelos compostos obtidos*

As células sanguíneas maduras são originadas a partir de uma pequena população de células tronco hematopoéticas na medula óssea que são caracterizadas por uma extensa capacidade de proliferação e diferenciação. A identificação e purificação dessas células são focadas em antígenos presentes na superfície celular. O marcador mais usado para isolamento, purificação e manipulação das células-tronco e progenitoras é o antígeno CD34. O antígeno CD34<sup>+</sup> é uma glicoproteína de membrana expressa em células progenitoras hematopoiéticas humanas, células progenitoras endoteliais, células endoteliais vasculares e em algumas células do tecido fetal. As células progenitoras apresentam

uma prevalência de aproximadamente 0,05-0,2% no sangue periférico, 0,1-0,5% no cordão umbilical e de 0,5-3% na medula óssea (DE WYNTER et al., 1998).

As células CD34+ foram isoladas de sangue periférico proveniente de 10 filtros de leucorredução para cada cada experimento. Primeiramente os componentes do sangue foram separados utilizando Ficoll-Paque® e essas células foram separadas através da utilização de beads imunomagnéticas associadas a anticorpo anti-CD34+ (Indirect CD34 Micro Bead Kit Human, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), conforme orientações do fabricante. Após o tempo de incubação com o anticorpo, as células foram passadas por uma coluna LS (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) presa a um suporte magnético, onde as células CD34+ ficaram retidas, enquanto as outras (monócitos e linfócitos) foram coletadas em um tubo “Falcon”. Para a obtenção das células CD34+, a coluna foi retirada do suporte magnético e com uma leve pressão no êmbolo, as células marcadas se soltaram da coluna e foram coletadas em um novo tubo. As células CD34+ isoladas foram expandidas em meio H3000 suplementado com CC100 (Stem Cell Technologies) durante 4 dias com densidade de  $10^5$  células/mL. Estas, foram então diferenciadas em eritrócitos utilizando o sistema de cultura de 3 fases (DULMOVITS et al., 2015).

As células CD34+ foram cultivadas em 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C CD34+ em meio Iscoves's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; GIBCO™, Invitrogen Corporation, USA) suplementado com 3% (vol/vol) AB sêrum (Atlanta Bio), 2% (vol/vol) plasma humano (Stem Cell Technologies), 10 µg/mL insulina (Sigma Aldrich), 3U/mL heparina (Sigma Aldrich) 200µg/mL transferrina (Sigma Aldrich), 10 ng/mL stem cell factor (SCF), 1ng/mL IL-3 (R&D) and 3IU/mL eritropoetina (EPO) (Vetter Pharma,

Ravensburg, Germany) (Fase I; 0 a 7º Dia) ou 10ng/mL SCF e 3IU/mL EPO (Fase II; 7º a 11º Dia) ou 1mg/mL transferrina e 3IU/mL EPO (Fase III; 11º a 14º Dia). Os tratamentos (0,1- 10 µM pomalidomida, 1-10 µM dos compostos 3b, 4b, 5b, 10 µM de hidroxureia ou dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado as culturas no dia 0 e nos dias 4, 7, 11 e 14 quando foram realizadas as trocas do meio de cultura.

Western Blot: As células diferenciadas a partir de CD34+ foram lisadas com tampão 1X RIPA (Thermo Scientific) suplementada com inibidor de protease (1:100) (Sigma Aldrich) em banho de gelo, e então centrifugadas em máxima rotação. Os sobrenadantes foram então misturados 1:1 com tampão 2X Laemmli (BioRad) e aquecidos a 95°C durante 5 min. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese no gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) por 1.5 horas a 110V, e transferido para membrana de nitrocelulose por 1 h a 90V. As membranas foram bloqueadas com 4% (massa/vol) leite desnatado (Blotting grade blocker, BioRad); 1% (massa/vol) BSA; 1X PBS 0.1% (vol/vol) Tween20 (PBS-T), e incubados com o anticorpo primário overnight a 4°C: BCL11-A (Abcam, MA), KLF-1 (Santa Cruz Biotechnologies, CA), GATA-1 (Santa Cruz Biotechnologies, CA), GATA-2 (Santa Cruz Biotechnologies, CA), IKAROS (Santa Cruz Biotechnologies, CA), SOX-6 (Abcam, MA), CoREST (Millipore, Germany), JUN, p38 MAPK and 2,  $\alpha$ -globin (Santa Cruz Biotechnologies, CA),  $\beta$ - globin (Santa Cruz Biotechnologies, CA),  $\gamma$ -globin (Santa Cruz Biotechnologies, CA), and GAPDH (Millipore, Germany). As membranas foram lavadas 3 vezes com PBST, e incubadas com o respectivo anticorpo secundário durante 1h a temperatura ambiente. As bandas foram detectadas por quimioluminescência (ECL) (Thermo Scientific). Os dados foram normalizados com o controle de carregamento utilizando o programa ImageJ e

avaliados aplicando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) no GraphPad Prisma. Nos casos em que  $p < 0,05$ , as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para  $\alpha = 0,05$ .

Quantificação de HbF: No 14º dia da diferenciação  $5 \times 10^5$  células, foram isoladas e lisadas com 100  $\mu\text{L}$  de água destilada a  $-20^\circ\text{C}$  durante 2h. Em seguida, foi realizada centrifugação em rotação máxima e os hemolisados coletados para a quantificação das moléculas de hemoglobina usando coluna polyCAT HPLC (100x4.6-mm, 3 $\mu\text{m}$ , 1000Å) (PolyLC inc., MD) e absorvância de 415 e 690 nm. A quantificação das hemoglobinas foi calculada integrando a área da curva dos cromatogramas, que foram expressos em porcentagem de hemoglobina total (HbA + HbF)

*Viabilidade celular em monócitos doseamento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )*

Ensaio de viabilidade celular com Kit Live/Dead (Thermo Scientific): Monócitos de indivíduos controles foram adicionados à uma placa de 24 poços e incubados overnight com meio RPMI e soro fetal bovino, tempo necessário para diferenciação e adesão dessas células à placa. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados meio+soro novos à placa, bem como o volume de DMSO, pomalidomida, HU e composto 4b na concentração desejada. Foi realizada novamente uma incubação de 24h. Após esse período, o sobrenadante foi removido e as células aderidas foram lavadas por 3x com PBS 1X. Foram adicionados sob as células 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X, 2  $\mu\text{L}$  de calceína 10  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{L}$  de Brometo de Etídeo 10  $\mu\text{M}$ . A placa foi incubada por 20 min e a emissão de fluorescência foi avaliada em

microscópio eletrônico de fluorescência com os filtros Alexa488 e Alexa555. A contagem do percentual de células vivas e células mortas foi realizada através do software ImageJ.

Cultura de Monócitos: Células mononucleares de indivíduos controle foram separadas através de gradiente de Ficoll e, posteriormente, Percoll 45%, a fim de obter apenas os monócitos. As células foram adicionadas a uma placa de 24 poços com meio RPMI e soro fetal bovino e incubadas *overnight* a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Os compostos DMSO, pomalidomida, HU e composto 4b foram adicionados aos poços e a placa foi novamente incubada por 30 minutos à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram estimuladas com LPS (2 µg/mL) e a placa foi incubada por 24 horas. Após, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -80°C.

Quantificação de Citocinas: A dosagem de TNF-α foi realizada através de Kit de ELISA seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (R&D Systems).

## 5 RESULTADOS

Os procedimentos experimentais e as respectivas identificações estruturais, juntamente com seus espectros são apresentados no Apêndice I. A interpretação dos espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) dos compostos obtidos foi realizada baseando-se nas referências de SILVERSTEIN et al., 2000 e PAVIA et al., 1996. Para auxílio na interpretação dos deslocamentos químicos por RMN dos derivados furoxânicos foram utilizados os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas análogas (CERECETTO et al., 1999; FERSHTAT et al., 2014; MELO, 2014; SANTOS, 2009)

### 5.1. Síntese dos derivados furoxânicos (2a-c) e intermediários 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (6), (12) e (13)

A síntese do derivado furoxânico (2a) foi realizada através reação entre estireno (5) com nitrito de sódio em meio contendo ácido acético. Este composto foi obtido com rendimento de aproximadamente 68%. Posteriormente, o furoxano (2a) foi reagido com o 4-hidroxibenzaldeído para formação do derivado furoxânico 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (6) com rendimento de 57% (Figura 8).

O intermediário 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (2b) foi obtido através de três etapas sintéticas: Primeiramente o tiofenol (7) foi reagido com o ácido monocloroacético para obtenção do ácido feniltioacético (8) (Figura 9). Na segunda etapa o sulfeto (8) foi oxidado à sulfona (9) usando como agente oxidante peróxido de hidrogênio 30%. Na etapa seguinte, a sulfona (9) foi reagida com ácido nítrico fumegante para formação do núcleo bis-aril-sulfonil furoxânico (2b). Este foi

obtido como sólido de cor branca com rendimento de global de 41% e faixa de fusão entre 140 – 142°C (FARRAR, 1949).

Em seguida, o núcleo furoxânico (**2b**) foi funcionalizado através da reação de substituição nucleofílica aromática usando 4-hidroxibenzaldeído (**11**) como reagente, para obtenção do intermediário **12** como um sólido branco, com rendimento de 30% e faixa de fusão de 121,0 – 123,0 °C (DUTRA et al., 2014).

A reação para obtenção do derivado furoxânico (**2c**) se deu através da reação do ácido metacrílico e nitrito de sódio em meio contendo ácido sulfúrico 60% (NIKOLAEVA et al., 1972) (Figura 10). A reação de substituição nucleofílica aromática entre 4-hidroxibenzaldeído (**11**) e o furoxano (**2c**) levou a formação do intermediário (**13**) em rendimentos de 35%. Este composto (**13**) foi obtido como um sólido branco, com rendimento de 50% e faixa de fusão de 59,0 – 61,0 °C.

Realizou-se o acoplamento da função aldeído dos intermediários (**6**), (**12**) e (**13**) com as 2- ou 4-benzhidrazidas em meio etanólico catalisado por ácido para formar as hidrazonas (**14-19**) em rendimentos que variaram de 55-75% (Tabelas 1,2 e 3).

**Tabela 1. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 14 e 15.**

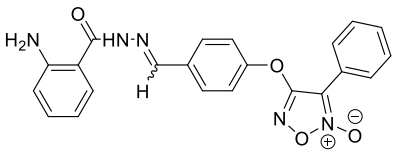
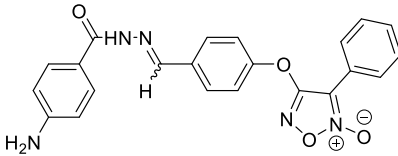
	 14	 15
<b>Rendimento (%)</b>	55	63
<b>Faixa de Fusão (°C)</b>	201-203	217-219



Tabela 2. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 16 e 17.

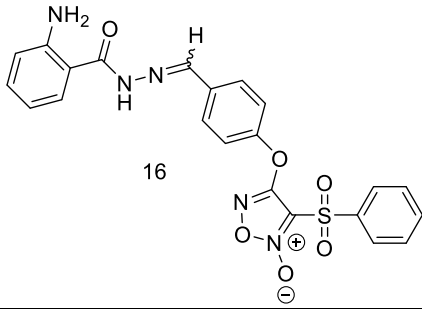
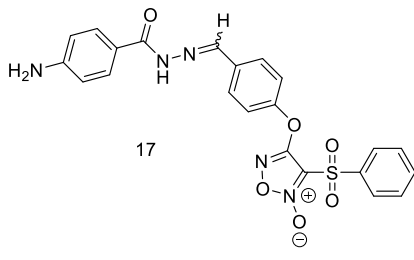
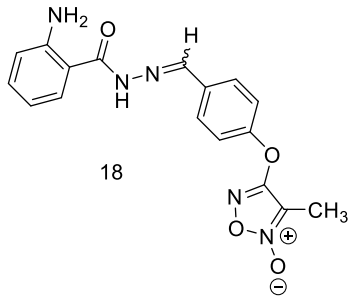
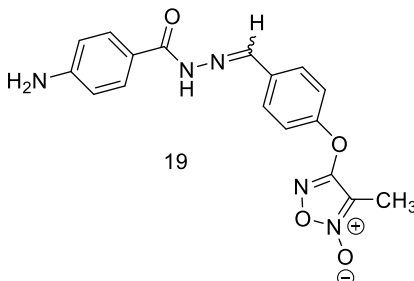
	 16	 17
Rendimento (%)	59	75
Faixa de Fusão (°C)	175-178	173-175

Tabela 3. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 18 e 19.

	 18	 19
Rendimento (%)	65	66
Faixa de Fusão (°C)	165-168°C	160-162°C

A última etapa reacional envolveu a reação de condensação dos intermediários hidrazônicos (**14-19**) com o anidrido 3-aminoftálico utilizando EDC como agente acoplante e DMAP como catalisador para formar o anel ftalimídico desejado (**3a-b**; **4a-b** e **5a-b**). As tabelas 4, 5 e 6 apresentam os rendimentos e faixa de fusão destes compostos.

Tabela 4. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 3a e 3b.

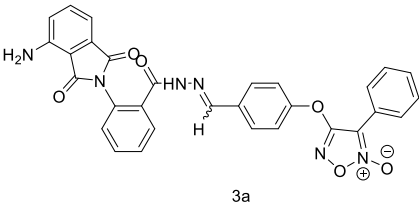
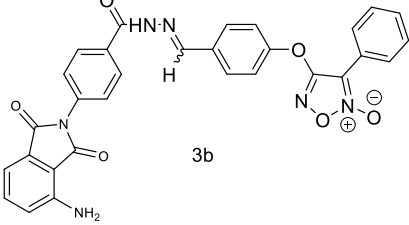
	 3a	 3b
Rendimento (%)	32	43
Faixa de Fusão (°C)	250-252	205-208

Tabela 5. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 4a e 4b.

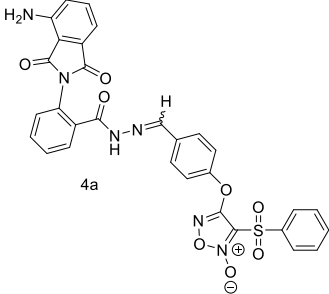
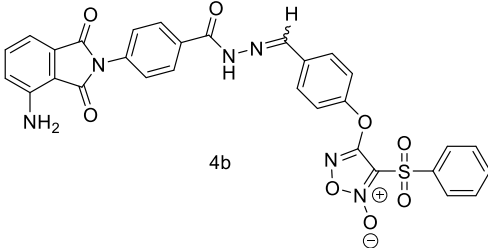
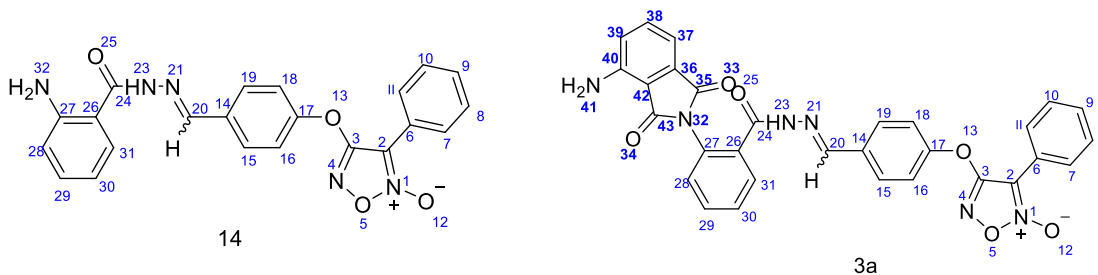
	 4a	 4b
Rendimento (%)	13	20
Faixa de Fusão (°C)	216-218	221-223

Tabela 6. Rendimentos e faixa de fusão das moléculas 5a e 5b.

	5a	5b
<b>Rendimento (%)</b>	15	19
<b>Faixa de Fusão (°C)</b>	217-220	218-222

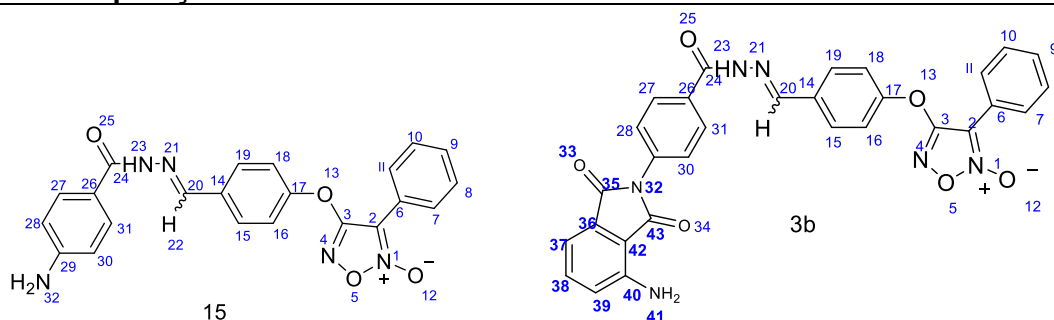
Nas Tabelas 7-12 serão apresentados os deslocamentos dos intermediários hidrazônicos (**14-19**) e dos produtos finais (**3a-b**; **4a-b** e **5a-b**). A Tabela 7 apresenta os dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN dos compostos (**14**) e (**3a**).

**Tabela 7: Comparação dos deslocamentos das moléculas 14 e 3a no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .**

Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
2	-	114,69	-	111,06
3	-	153,64	-	153,82
7 e 11	8,07 (dd)	132,85	8,07(dd)	132,67
8	7,55-7,65(m)	126,73	7,58-7,63(m)	126,71
9	7,55-7,65(m)	121,71	7,58-7,63(m)	121,61
10	7,55-7,65(m)	126,73	7,58-7,63(m)	126,71
15 e 19	7,82(dd)	129,17	7,78-7,83(m)	129,15
16 e 18	7,55-7,65(m)	128,67	7,47-7,53(m)	128,88
20	8,41	150,13	8,36 (s)	146,91
23	11,69	-	12,11(s)	-
24	-	161,92	-	161,85
28	6,77(dd)	108,41	7,58-7,63(m)	109,4
29	6,55(ddd)	116,44	7,58-7,63(m)	120,54
30	7,21(ddd)	120,6	7,58-7,63(m)	135,43
31	7,55-7,65(m)	131,00	7,47-7,53(m)	132,36
32	6,39	-	-	-
35	-	-	-	168,34
37	-	-	7,78-7,83(m)	132,36
38	-	-	7,78-7,83(m)	130,97
39	-	-	7,02-7,06(m)	108,4
41	-	-	6,53 (s)	-
43	-	-	-	167,12

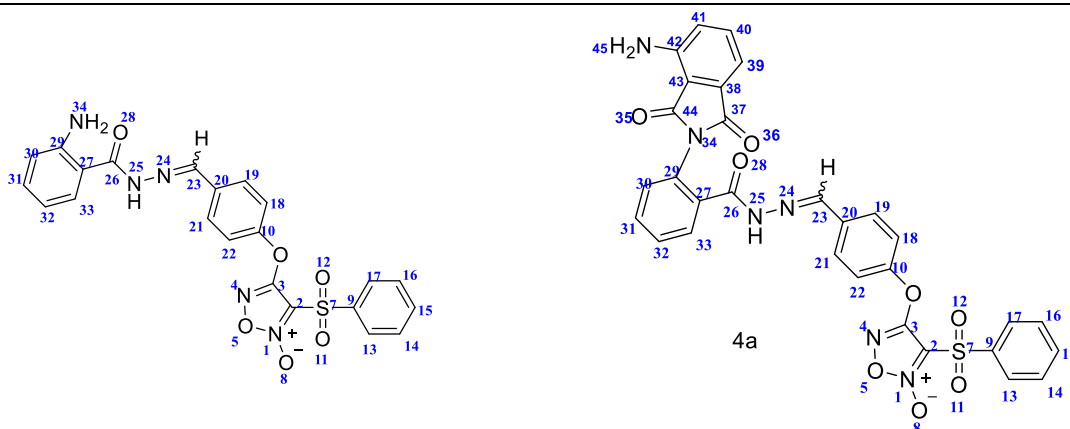
A Tabela 8 apresenta os dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN dos compostos (**15**) e (**3b**).

**Tabela 8: Comparação dos deslocamentos das moléculas 15 e 3b no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$**



Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
2	-	112,69	-	111,73
3	-	153,51	-	154,27
7 e 11	8,08 (dd)	129,17	8,07-8,10(m)	127,33
8 e 10	7,58-7,63(m)	121,7	7,57 -7,70 (m)	121,78
9	7,58-7,63(m)	120,58	7,57 -7,70 (m)	121,00
15 e 19	7,6(dd)	128,55	7,57 -7,70 (m)	129,59
16 e 18	7,58-7,63(m)	126,73	7,57 -7,70 (m)	121,05
20	8,42(s)	152,42	8,52 (s)	147,46
23	11,54(s)	-	12,10(s)	-
24	-	161,92	-	162,30
27 e 31	7,82(dd)	131,00	-	129,37
28 e 30	6,60(dd)	119,43	7,57 -7,70 (m)	131,45
32	5,81(s)	-	-	-
35	-	-	-	168,54
37	-	-	7,9(dd)	147,37
38	-	-	7,52(ddd)	136,14
39	-	-	7,06(dd)	122,03
40	-	-	-	108,84
41	-	-	6,58(s)	-
42	-	-	-	128,64
43	-	-	-	167,33

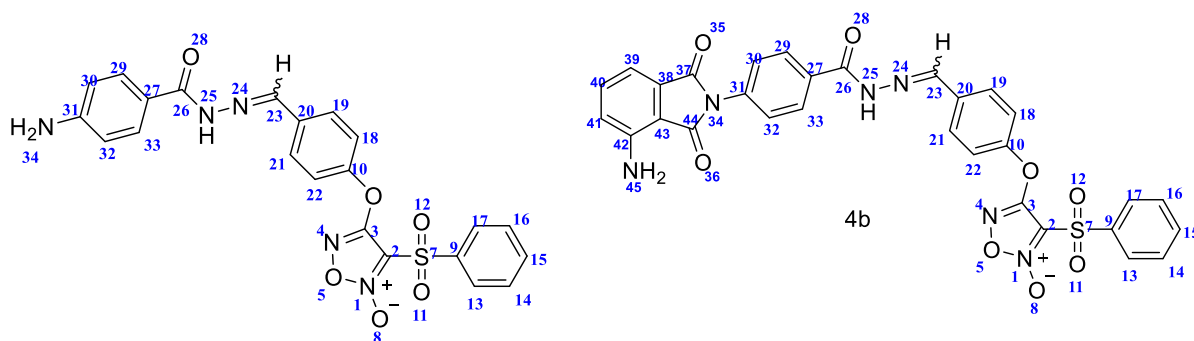
A Tabela 9 apresenta os dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN dos compostos (16) e (4a).

Tabela 9. Comparação dos deslocamentos das moléculas 16 e 4a no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
2	-	111,37	-	111,78
3	-	153,59	-	162,30
10	-	-	-	-
13 e 17	8,06(dd)	136,35	8,06(dd)	136,17
14 e 16	7,59-7,51 (m)	120,15	7,63-7,59(m)	121,05
15	7,59-7,51 (m)	132,40	7,63-7,59(m)	132,43
18 e 22	7,84-7,75(m)	130,10	7,63-7,59(m)	129,60
19 e 21	7,84-7,75(m)	132,94	7,89(dd)	132,58
20	-	-	-	-
23	8,42(s)	145,46	8,48(s)	147,44
25	11,7(s)	-	12,06(s)	-
26	-	158,23	-	163,36
30	6,76(dd)	114,68	7,63-7,59(m)	127,16
31	6,58(ddd)		7,63-7,59(m)	122,24
32	7,21(ddd)	116,43	7,63-7,59(m)	122,00
33	7,93(dd)	136,35	8,02(m)	135,52
37	-	-	-	168,54
39	-	-	7,09(dd)	129,40
40	-	-	7,52(dd)	127,36
41	-	-	7,05(dd)	109,05
42	-	-	-	108,85
44	-	-	-	167,35
45	-	-	6,58(s)	-

A Tabela 10 apresenta os dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN dos compostos (16) e (4a).

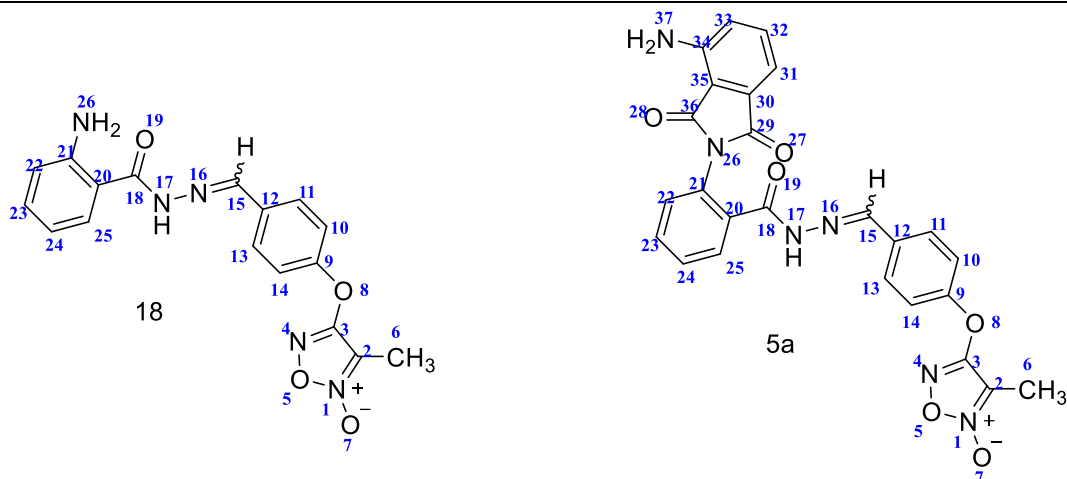
**Tabela 10: Comparação dos deslocamentos das moléculas 17 e 4b no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .**



Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
2	-	111,75	-	111,00
3	-	153,83	-	153,46
10	-	-	-	136,63
13 e 17	7,77-7,94(m)	129,98	7,74-7,94(m)	129,81
14	7,77-7,94(m)	120,54	7,74-7,94(m)	121,68
15	7,77-7,94(m)	128,75	7,74-7,94(m)	128,65
16	7,77-7,94(m)	120,54	7,74-7,94(m)	121,68
18 e 22	7,51(dd)	130,51	7,49-7,62(m)	131,91
19 e 21	7,67(dd)	129,91	7,49-7,62 (m)	129,81
23	8,42(s)	144,96	8,49(s)	146,80
25	11,52(s)	-	12,02(s)	-
26	-	158,65	-	162,42
27	-	152,82	-	157,96
29 e 33	8,06(dd)	136,75	8,02-8,07(m)	136,91
30e 32	6,60(dd)	119,65	8,02-8,07(m)	126,59
37	-	-	-	167,82
38	-	-	-	162,42
39	-	-	7,03-7,09(m)	146,39
40	-	-	7,49-7,62 (m)	136,63
41	-	-	7,03-7,09(m)	110,90
42	-	-	-	108,39
43	-	-	-	-
44	-	-	-	166,58
45	-	-	6,61	-

A Tabela 11 apresenta os dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN dos compostos (18) e (5a)

**Tabela 11: Comparação dos deslocamentos das moléculas 18 e 5a no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$**

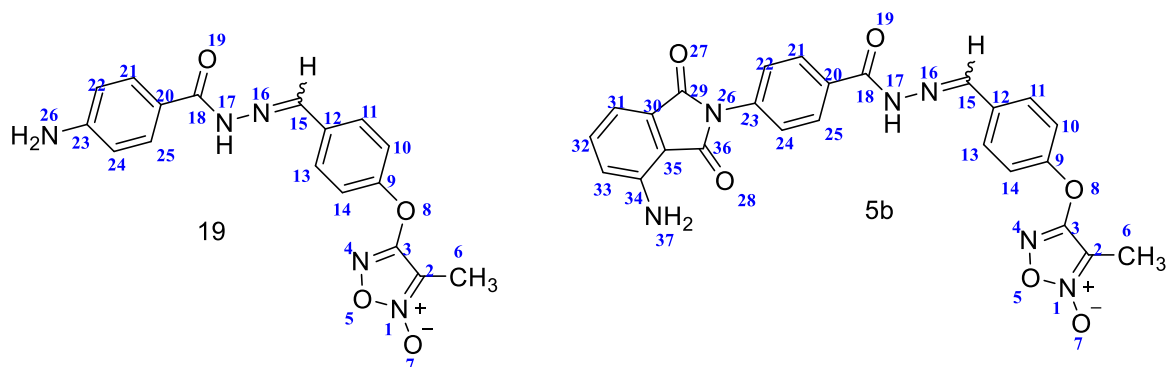


Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
2	-	113,64	-	111,21
3	-	154,02	-	153,90
6	2,13 (s)	7,29	2,11(s)	7,02
10 e 14	7,48-7,57(m)	132,64	7,47-7,52(m)	132,64
11 e 13	7,497,8(dd)	120,48	7,62(dd)	121,68
15	8,41(s)	150,4	8,35(s)	151,51
17	11,67(s)	-	12,1(s)	-
18	-	165,73	-	162,87
22	6,75(dd)	114,91	7,77-7,81(m)	125,01
23	6,57(ddd)	116,68	7,47-7,52(m)	128,16
24	7,2(ddd)	129,05	7,47-7,52(m)	135,64
25	7,48-7,57(m)	145,70	7,77-7,81(m)	146,4
26	6,39(s)	-	-	-
29	-	-	-	168,4
31	-	-	7,02-7,06(m)	139,3
32	-	-	7,02-7,06(m)	128,16
33	-	-	6,87(dd)	108,67
34	-	-	-	107,75
35	-	-	-	125,01
36	-	-	-	167,18
37	-	-	6,57(s)	-



A Tabela 12 apresenta os dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN dos compostos (19) e (5b).

**Tabela 12. Comparação dos deslocamentos das moléculas 19 e 5b no RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$**



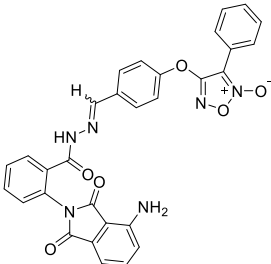
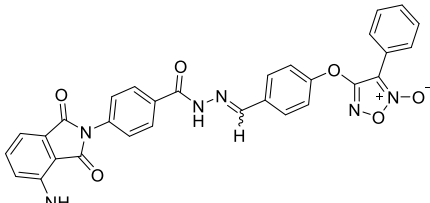
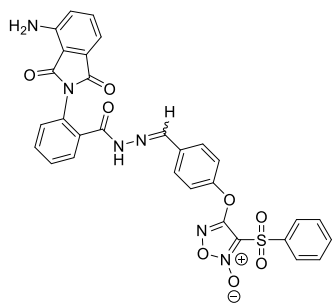
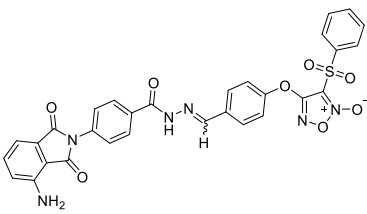
Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
2	-	112,71	-	111,18
3	-	153,58	-	153,90
6	2,13(s)	7,14	2,13(s)	7,02
10 e 14	7,50(dd)	128,64	7,5(dd)	128,92
11 e 13	7,67(dd)	120,04	7,63(dd)	119,97
15	8,41(s)	152,47	8,49(s)	151,51
17	11,51(s)	-	12,01(s)	-
18	-	162,98	-	162,77
21 e 25	7,8(dd)	144,75	8,05(dd)	146,75
22 e 24	6,6(dd)	119,40	7,88(dd)	121,75
23	-	107,74	-	124,96
26	5,80(s)	-	-	-
29	-	-	-	168,1
30	-	-	-	139,24
31	-	-	7,06-7,10(m)	147,08
32	-	-	7,06-7,10(m)	128,14
33	-	-	6,87(dd)	108,67
34	-	-	-	107,68
35	-	-	-	-
36	-	-	-	166,86
37	-	-	6,6(s)	-

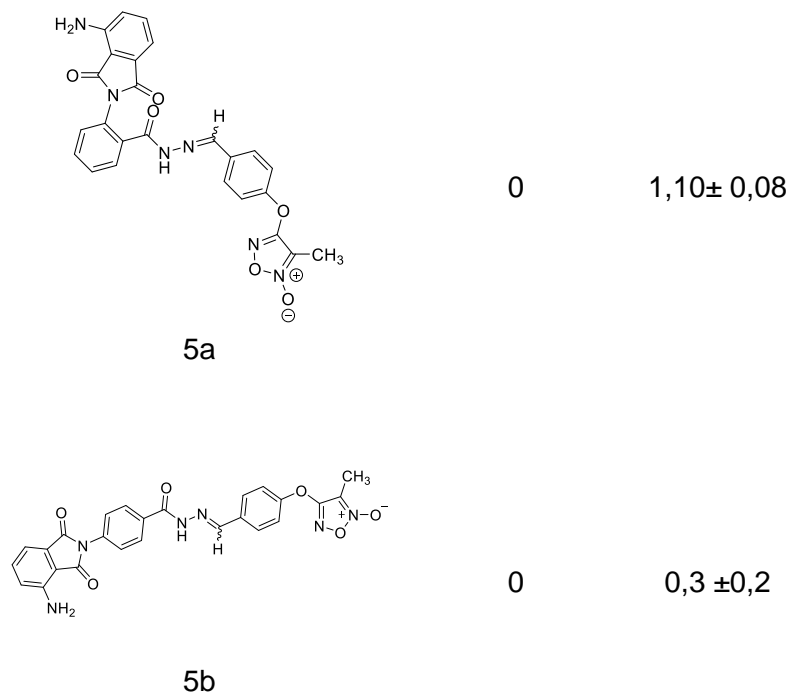
## 5.1. *Ensaio farmacológico*

### 5.1.1. *Deteção quantitativa de nitrito*

As concentrações de nitrito foram determinadas através de curva analítica, usando espectrofotômetro UV/visível na concentração compreendida entre 10-80 nM, utilizando o reagente de Griess. Os resultados, expressos em porcentagem de nitrito ( $\pm$  E.P.M), são representados para cada composto final na Tabela 13.

Tabela 13. Porcentagem de produção de nitrito pelos compostos na presença e ausência de cisteína  $\pm$  E.P.M, (n=3).

COMPOSTOS	% de $\text{NO}_2^-$ (mol/mol)	
	Sem L-cisteína	Com L-cisteína
Dinitrato de isossorbida (Controle positivo)	0	12 $\pm$ 1
DMSO (Controle negativo)	0	0,4 $\pm$ 0,2
 3a	0	5 $\pm$ 1
 3b	0	6,3 $\pm$ 0,1
 4a	0	28 $\pm$ 1
 4b	0	30 $\pm$ 3




---

Fonte:dados da pesquisa

### 5.1.2. Avaliação da produção de gama-globina e HbF em células CD34+

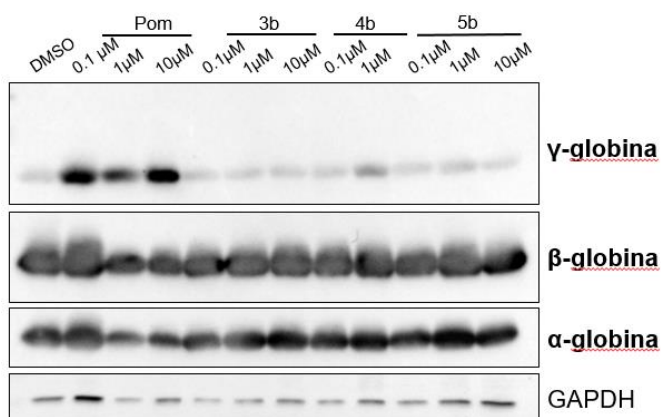
Para este ensaio foram selecionados os produtos finais **3b**, **4b** e **5b**. Estes compostos foram selecionados devido ao padrão de substituição do C3 do núcleo furoxano, que confere perfis de doação moderado (**3b**); forte (**4b**); fraco (**5b**) (Tabela 13).

Após o isolamento das células, estas foram expandidas por um período de 4 dias para que se obtivesse o maior número de células possível para realização do ensaio. Após esse período, o DMSO (0,1%) (veículo), pomalidomida e os compostos **3b**, **4b**, **5b** foram então adicionados à cultura de células em concentrações de 0,1µM, 1 µM e 10 µM, a fim de se estabelecer a melhor dose para indução de gama globina. O meio de cultura foi trocado e os compostos adicionados novamente no 4º,

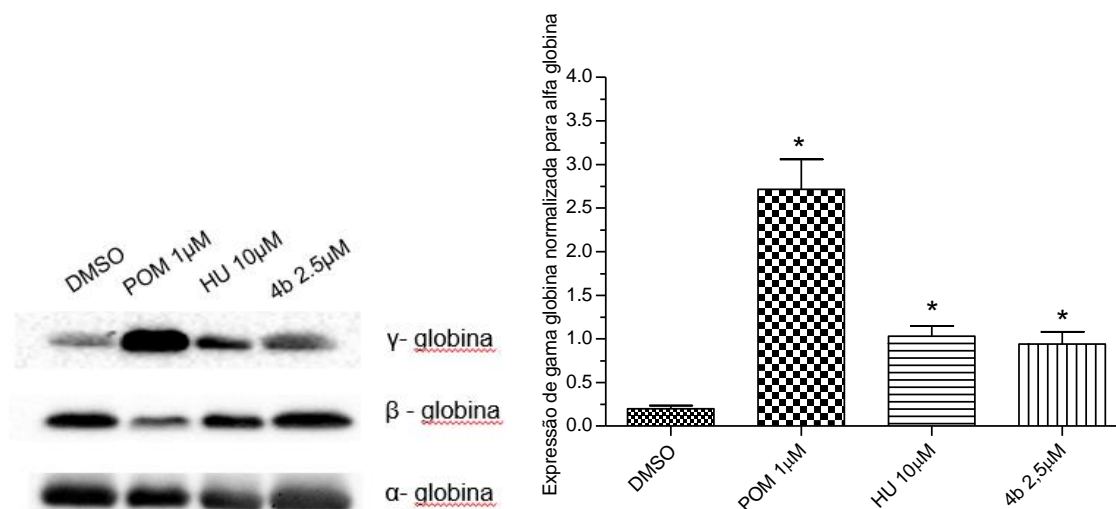
7<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dias obedecendo o protocolo de diferenciação de 3 fases (DULMOVITS et al., 2015). No 14<sup>o</sup> dia as células foram isoladas para quantificação de gama globina e após a normalização foi possível notar um aumento significativo de globina  $\gamma$  pelo composto **4b** (1  $\mu$ M) (Figura 14A). Uma vez que o composto **4b** mostrou-se o mais promissor, diversas concentrações foram testadas e a concentração de 2,5  $\mu$ M foi escolhida considerando a toxicidade deste composto (Figura 14B). Foi realizada ainda a quantificação de hemoglobinas conforme mostrado na Figura 15.

**Figura 14: Expressão de proteínas da expressão de globinas em células CD34+ no 14<sup>o</sup> dia.**

**(A)**



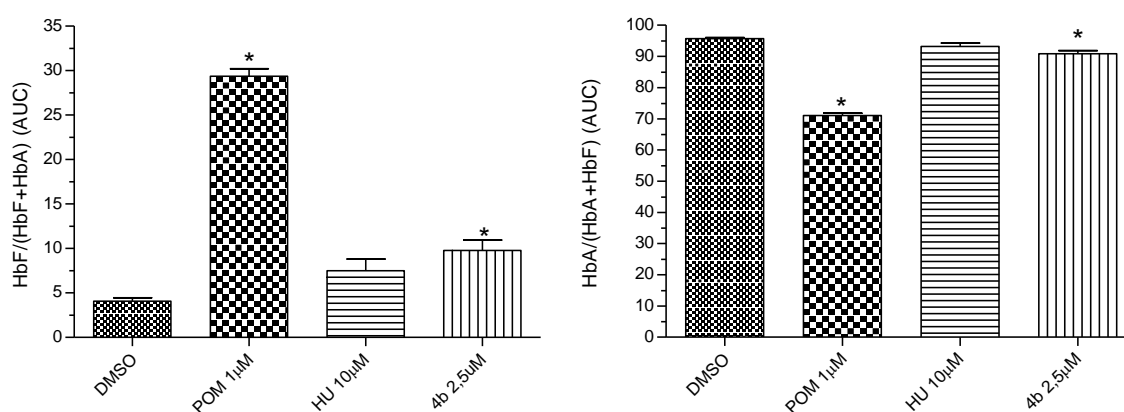
(B)



(A) Células CD34<sup>+</sup> foram tratadas com diferentes concentrações de pomalidomida, compostos 3b, 4b, 5b e 0,1% DMSO durante 14 dias cultura. (B) Células CD34<sup>+</sup> foram tratadas com pomalidomida (1  $\mu$ M), HU (10  $\mu$ M), composto 4b (2,5  $\mu$ M) e 0.1% (DMSO) durante 14 dias de cultura. Lisados celulares foram analisados por Western blot usando anticorpos: anti-  $\gamma$ -globin, anti-  $\beta$ -globin ou anti- $\alpha$ -globin. Resultados nos gráficos apresentados em U.A. com normalização para alfa-globina EPM; \*  $p < 0,05$ , comparado ao controle DMSO (ANOVA seguido de teste de Dunnet) (N=3).

Fonte: dados da pesquisa

**Figura 15. Quantificação de hemoglobinas em células CD34<sup>+</sup>**



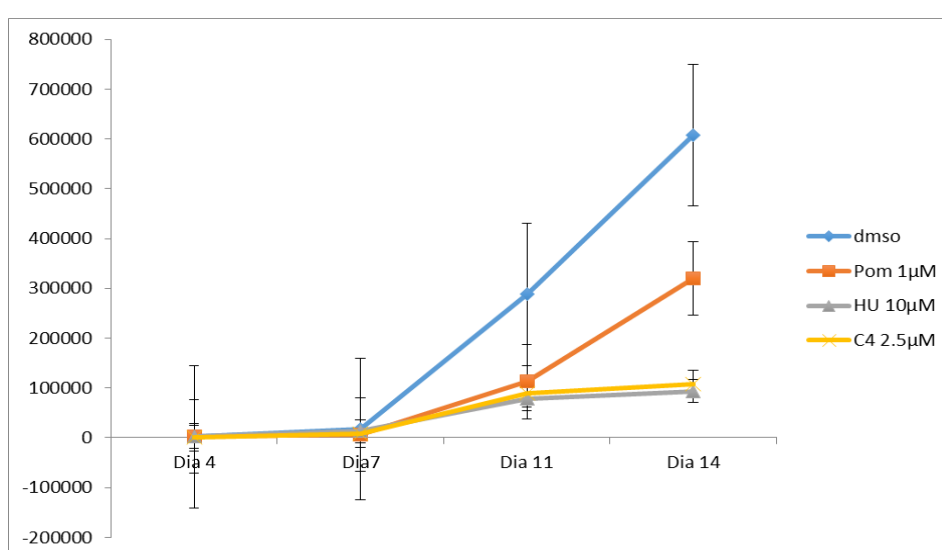
Células CD34<sup>+</sup> foram tratadas com pomalidomida (1  $\mu$ M), HU (10  $\mu$ M), composto 4b (2,5  $\mu$ M) e 0.1% (DMSO) durante 14 dias de cultura. Produção de hemoglobina quantificada por HPLC utilizando sobrenadante dos lisados celulares. As quantidades relativas de hemoglobina foram expressas como porcentagem média HbF/(HbF + HbA)  $\pm$  EPM e

HbA/(HbA + HbF)  $\pm$ EPM. \*  $p < 0,05$ , comparado ao controle DMSO (ANOVA seguido de teste de Tukey) (N=3).

Fonte: dados da pesquisa

A figura 16 mostra a curva de crescimento dos precursores eritroides derivados de células CD34<sup>+</sup> tratadas com DMSO, pomalidomida, HU e 4b durante 14 dias de cultura. Nota-se toxicidade do composto 4b semelhante a HU.

**Figura 16: Curvas de crescimento das culturas de precursores eritroides derivados de células CD34<sup>+</sup>.**



Células tratadas com DMSO (0,1%), pomalidomida (1 µM), HU (10 µM) e composto 4b (2,5 µM) (n=3) durante 14 dias.

Fonte: dados da pesquisa

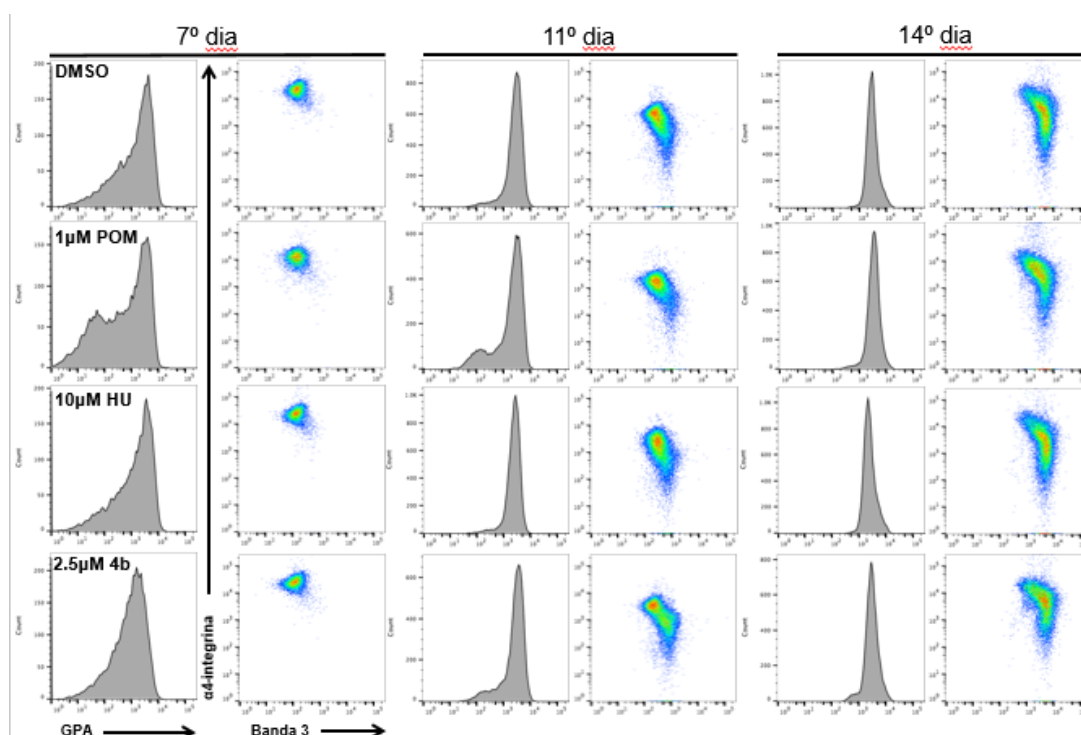
### *Citometria de Fluxo*

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para a análise qualitativa ou quantitativa de células ou partículas (uma a uma) em suspensão através de um fluxo. O reconhecimento dessas células é feito por meio de anticorpos marcados com fluorocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocianato (FITC), que ao serem estimulados por um feixe de laser emitem um fóton que é captado por sensores do equipamento (SHAPIRO, 2003). O processo de diferenciação eritróide

foi acompanhado através dessa técnica utilizando-se anticorpos de superfície celular (anti- $\alpha$ -integrina, anti-glicoforina A (GPA) e Banda-3). A  $\alpha$ -integrina é expressa no início da diferenciação, enquanto o aumento da expressão de banda 3 é verificado durante a diferenciação terminal, deste modo é possível observar na Figura 17 um maior aumento da expressão de banda 3 nas culturas tratadas com HU e 4b no 11<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia quando comparado ao DMSO.

Além disso, a morfologia celular foi verificada utilizando corante May-Grunwald Giemsa (Figura 18), onde observa-se o predomínio de eritroblastos poli e ortocromáticos nas células tratadas com composto **4b** enquanto no controle (DMSO) observam-se proeritroblastos e eritroblastos basofílicos.

**Figura 17. Diferenciação terminal dos precursores eritroide derivados de células CD34+.**

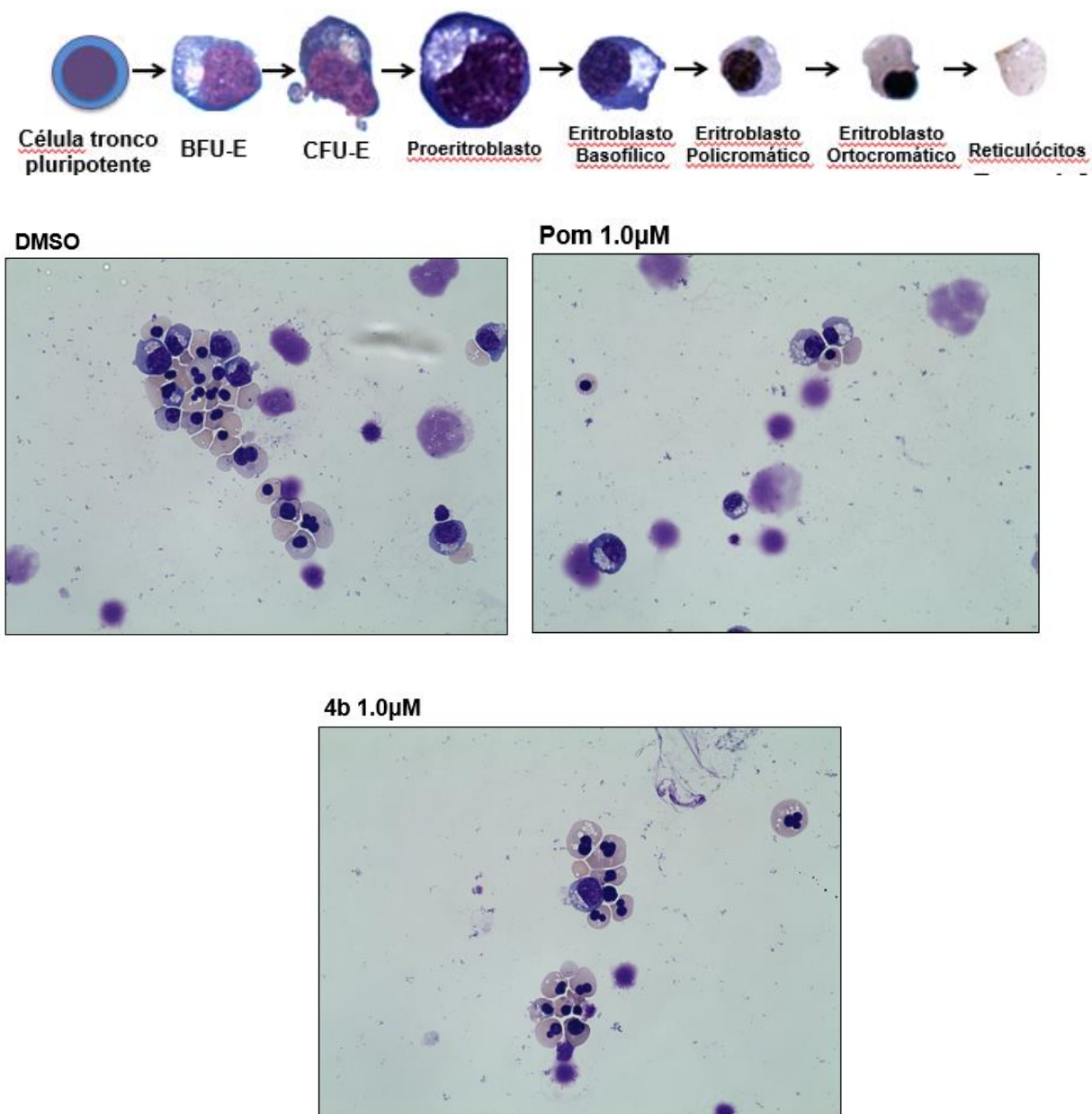


Células foram tratadas com DMSO (0,1%), pomalidomida (1  $\mu$ M), HU (10  $\mu$ M), composto 4b (2,5  $\mu$ M) monitorada por citometria de fluxo pelos níveis de  $\alpha$ -integrina e banda-3 das células GPA positivas nos dias 7, 11, 14 da cultura.

Fonte: Dados da pesquisa



**Figura 18. Citospins corados com May-Grunwald Giemsa mostrando a morfologia celular durante a diferenciação terminal celular das células CD34+ tratadas com DMSO, pomalidomida e composto 4b no 14º dia.**

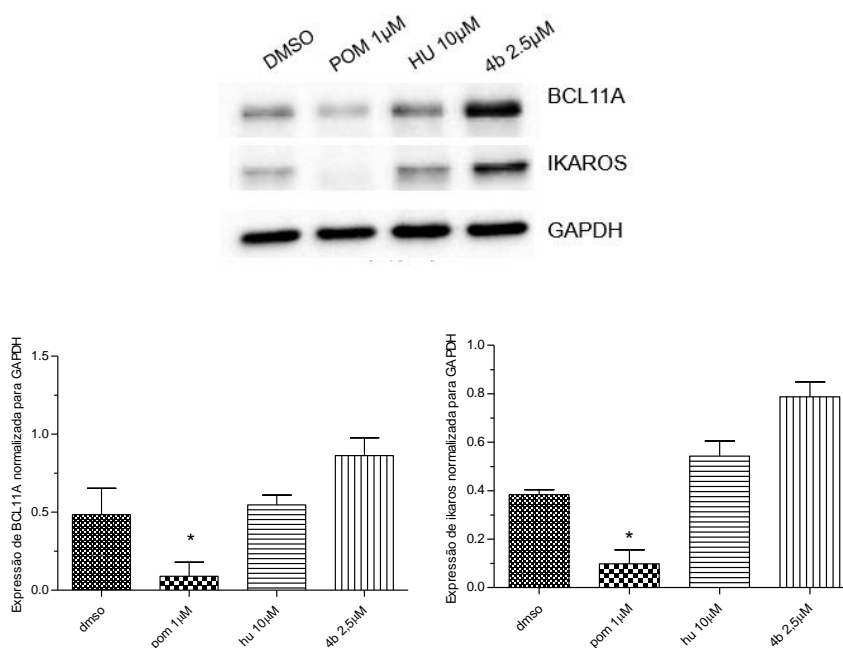


Fonte: Dados da pesquisa

### Estudos de mecanismo de ação

Alguns fatores como BCL11A, SOX-6, GATA-1, KLF-1 e LSD estão envolvidos na inibição da expressão da globina  $\gamma$ . Neste contexto, foi então investigado o envolvimento dessas proteínas no mecanismo de indução de globina  $\gamma$  pelo composto **4b** nas células CD34<sup>+</sup>. Após 4 dias de diferenciação, o composto **4b** (2,5  $\mu$ M) e a HU (10  $\mu$ M) não afetaram a expressão de BCL11A e IKZF1 sendo estatisticamente iguais ao DMSO (Figura 19). Foi ainda investigado os níveis de LRF, outro dentre estes fatores de transcrição e nenhuma alteração foi observada (Figura 20).

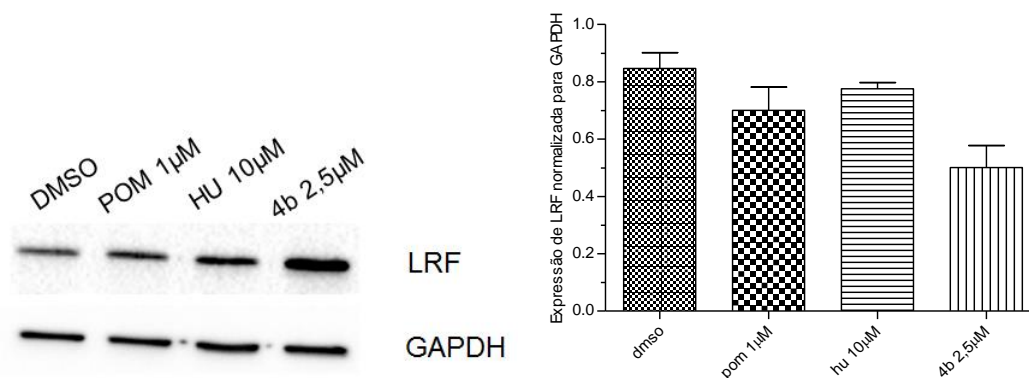
**Figura 19. Western blot da expressão de BCL11A e IKAROS nas células CD34<sup>+</sup> no 4<sup>o</sup> dia tratadas com DMSO (0,1%), pomalidomida (1  $\mu$ M), HU (10  $\mu$ M), composto 4b (2,5  $\mu$ M).**



GAPDH foi usado como controle interno. Resultados apresentados em U.A. EPM, \*  $p < 0.05$ , comparado ao controle DMSO (ANOVA seguido de teste de Tukey) (N=3)

Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 20. Western blot da expressão de LRF nas células CD34+ no 4º dia tratadas com DMSO (0,1%), pomalidomida (1 µM), HU (10 µM), composto 4b (2,5 µM).**

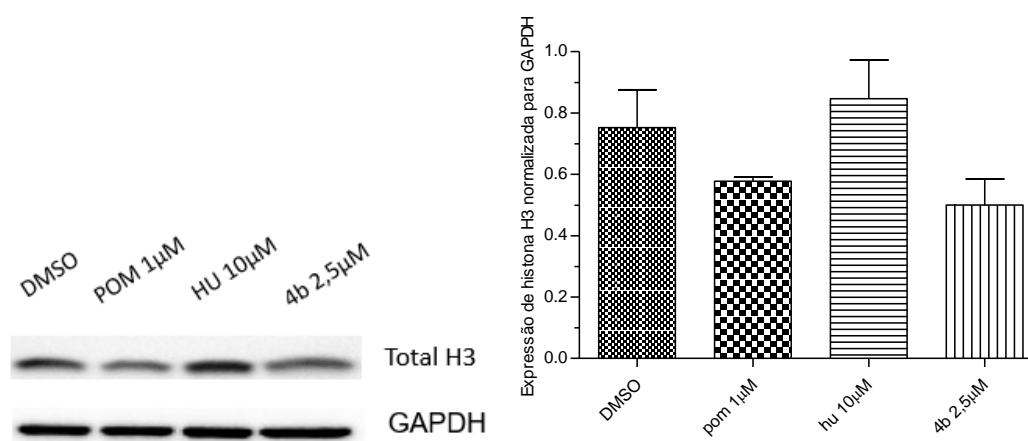


GAPDH foi usado como controle interno. Resultados apresentados em U.A. EPM, \*  $p < 0.05$ , comparado ao controle DMSO (ANOVA seguido de teste de Tukey) (N=3)

Fonte: dados da pesquisa

Outra via de silenciamento são as modificações epigenéticas e dentre elas está a acetilação de histonas. Deste modo, foram avaliados os níveis de histona (H3) nas células tratadas, porém serão necessárias um maior número de replicatas biológicas para que o resultado seja conclusivo (Figura 21).

**Figura 21. Western blot da expressão de histona H3 total nas células CD34+ no 4º dia tratadas com DMSO (0,1%), pomalidomida (1 µM), HU (10 µM), composto 4b (2,5 µM).**



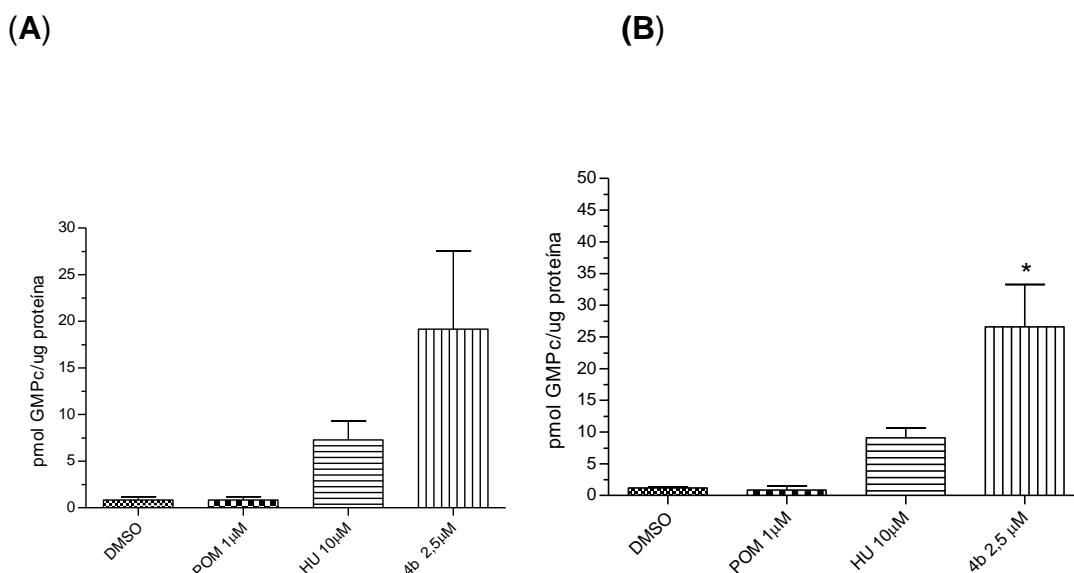
GAPDH foi usado como controle interno. Resultados apresentados em U.A. EPM, \* $p < 0.05$ , comparado ao controle DMSO (ANOVA seguido de teste de Tukey) (N=2).

Fonte: Dados da pesquisa

### 5.1.3. Quantificação de GMPc

A produção de guanosina monofosfato cíclica solúvel (GMPc) foi quantificada a fim de avaliar o efeito do composto **4b** e HU em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e células CD34<sup>+</sup>. O composto 4b mostrou aumento significativo de GMPc (Figura 22).

**Figura 22: Efeito do DMSO (0,1%), pomalidomida (1  $\mu$ M), HU (10  $\mu$ M), composto 4b (2,5  $\mu$ M) nos níveis de GMPc.**



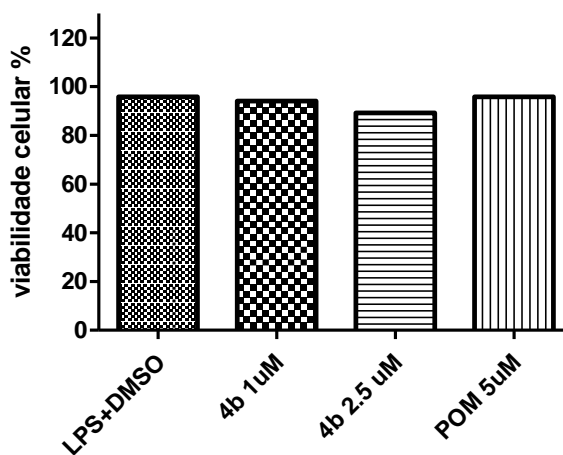
(A) O tratamento foi realizado com células HUVEC em confluência e os níveis intracelulares de GMPc foram mensurados após 4h (B). O tratamento foi realizado no 4<sup>o</sup> dia da cultura de células CD34<sup>+</sup> e os níveis intracelulares de GMPc foram mensurados após 48h. (N=3)

### 5.1.4. Viabilidade celular em monócitos e quantificação de TNF- $\alpha$

Para a avaliação da viabilidade dos compostos sintetizados, foi utilizado o kit Live/Dead (Thermo Scientific), o qual possibilita a contagem de monócitos viáveis de indivíduos controles incubados durante 24h com DMSO, pomalidomida, HU e composto 4B utilizando fluorescência. Os resultados foram expressos em

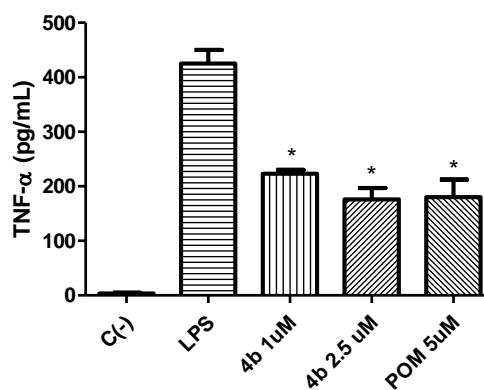
porcentagem de células viáveis (Figura 23). A citocina TNF- $\alpha$  foi quantificada no sobrenadante obtido da cultura de monócitos através do teste imunoenzimático ELISA. A pomalidomida e o composto 4b apresentaram viabilidade celular superiores a 90% nas concentrações utilizadas. O composto 4b apresentou diminuição significativa de TNF- $\alpha$ , sendo comparável a pomalidomida (Figura 24).

**Figura 23. Viabilidade celular em monócitos utilizando DMSO, pomalidomida e diferentes concentrações do composto 4b.**



Fonte: dados da pesquisa

**Figura 24. Concentração de TNF-alfa produzido por monócitos em meio contendo LPS (controle positivo), pomalidomida 5uM e composto 4b.**



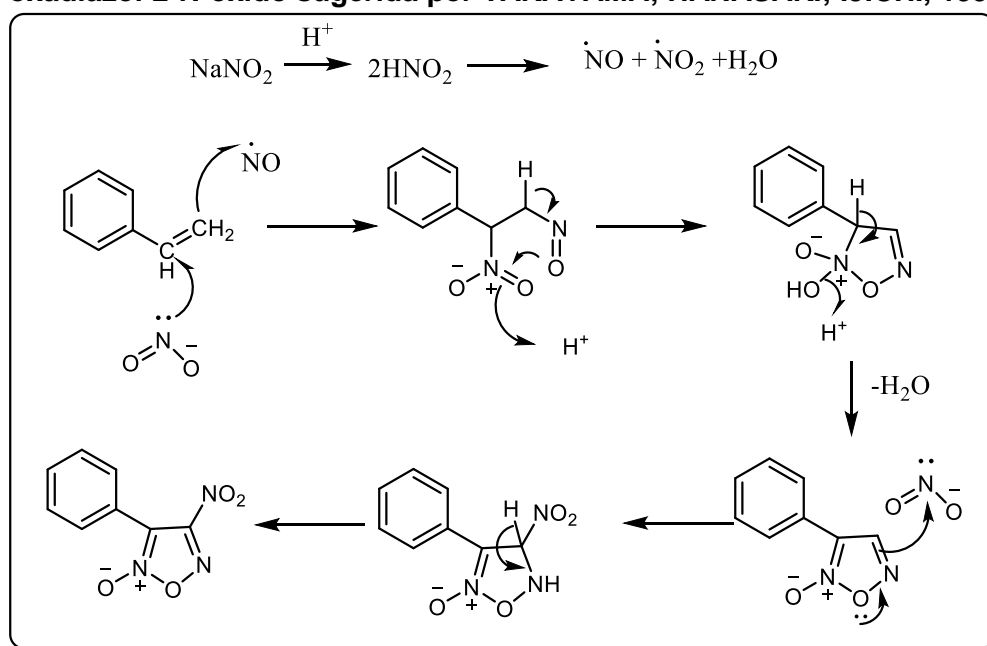
\* $p < 0,05$  comparado ao controle LPS (ANOVA seguido de teste de Tukey) (N=3)

Fonte: dados da pesquisa

## 6 DISCUSSÃO

Embora o mecanismo reacional exato para formação derivado furoxânico (**2a**) não seja completamente elucidado, há algumas hipóteses descritas na literatura. Em uma dessas, descrevendo a obtenção do derivado 4-nitro-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**2a**) (Figura 25), foi proposto que o mecanismo reacional ocorre em múltiplas etapas mediadas por reações radiculares envolvendo o dióxido e óxido de nitrogênio resultantes da reação do nitrito em solução ácida (FERSHTAT et al., 2014; TAKAYAMA; HANASAKI; IJICHI, 1996).

**Figura 25. Proposta de formação do derivado furoxânico 4-nitro-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido sugerida por TAKAYAMA; HANASAKI; IJICHI, 1996**



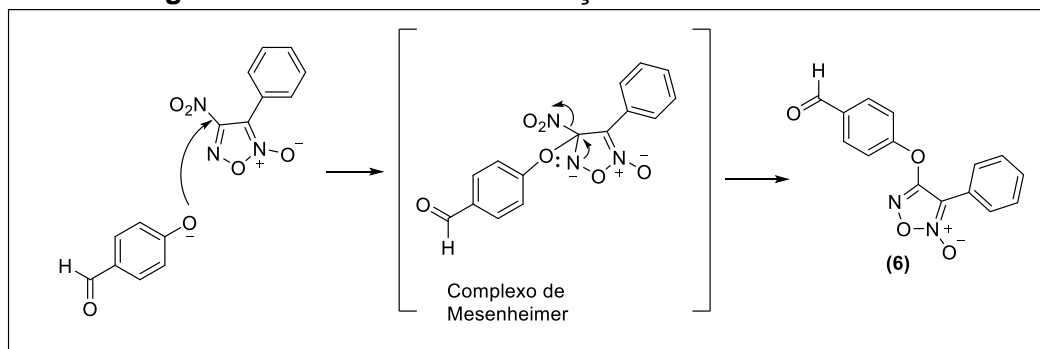
Fonte: retirado e adaptado de (TAKAYAMA; HANASAKI; IJICHI, 1996)

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 31) do derivado furoxânico **2a** destacam-se a presença multipletos dos hidrogênios aromáticos entre  $\delta$  7,75 e 7,59. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) é possível visualizar a diferença dos deslocamentos entre os carbonos do núcleo furoxânico em  $\delta$  111 e  $\delta$  167. O espectro também apresenta os

sinais de deslocamentos químicos referentes aos carbonos da fenila em  $\delta$  131,61 (C6);  $\delta$  130,08 (C8 e C12);  $\delta$  128,85 (C9 e C11);  $\delta$  120,68 (C10). Estes dados sugerem a formação deste derivado furoxânico.

Posteriormente, o furoxano (**2a**) foi reagido com o 4-hidroxibenzaldeído para formação do derivado furoxânico 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**6**). Na primeira etapa desta reação ocorre a desprotonação da hidroxila presente no aldeído pela ação da base DBU, transformando-o em ânion fenóxido que atua como nucleófilo. A reação ocorre por um mecanismo de substituição nucleofílica aromática bimolecular e envolve a formação de um carbânion com elétrons delocalizados (complexo de Meisenheimer) (Figura 25).

**Figura 26. Mecanismo de formação do intermediário 6**



Fonte: elaborado pelo autor

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 32) destaca-se o hidrogênio da função aldeído com deslocamento de  $\delta$  10,02. Além disso, é possível observar os sinais dos hidrogênios aromáticos entre  $\delta$  8,06 e  $\delta$  7,55. Os carbonos do anel furoxânico estão deslocados em  $\delta$  157 e  $\delta$  107 e a carbonila do aldeído se encontra no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 33) deslocada em  $\delta$  190,63 sugerindo a formação da molécula desejada (**6**).

**6.1.1. Síntese do derivado furoxânico 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (2b) e 4-(4-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (12)**

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 35) é possível visualizar sinais na região dos hidrogênios aromáticos do derivado **2b** em  $\delta$  8,11,  $\delta$  7,92 (H17 e 22) e  $\delta$  7,77 (H16, 18, 21 e 23).

Em seguida, houve a funcionalização do núcleo furoxânico **2b** para obtenção do intermediário 12. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do intermediário 12 apresentou onze sinais, para os quais se destacam  $\delta$  114,4 e  $\delta$  157,4 atribuídos aos carbonos C-3 e C-4 do anel furoxânico (Figura 38). Esses dois sinais juntamente com o simpleto em  $\delta$  10,03 (Figura 37) referente ao hidrogênio do aldeído e a respectiva carbonila em  $\delta$  119 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  sugerem a presença da função aldeído. No espectro de absorção na região do infravermelho os estiramentos axiais da ligação C-H do aldeído podem ser visualizados em  $2.852\text{ cm}^{-1}$  e  $2.922\text{ cm}^{-1}$  (Figura 36).

**6.1.2. Síntese do derivado furoxânico 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (2c) e 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-N-óxido (13)**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 39) do derivado **2c** observa-se o deslocamento da metila em 2,71 ppm, como um simpleto integrando para três hidrogênios. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 40) é possível visualizar o deslocamento do carbono metilênico em 7,0 ppm e os carbonos do núcleo furoxânico em 107 ppm e 159 ppm atribuídos aos carbonos C-3 e C-4, respectivamente.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 41) do intermediário **13** mostra o hidrogênio da função aldeído com deslocamento de  $\delta$  10,01, integrando para um



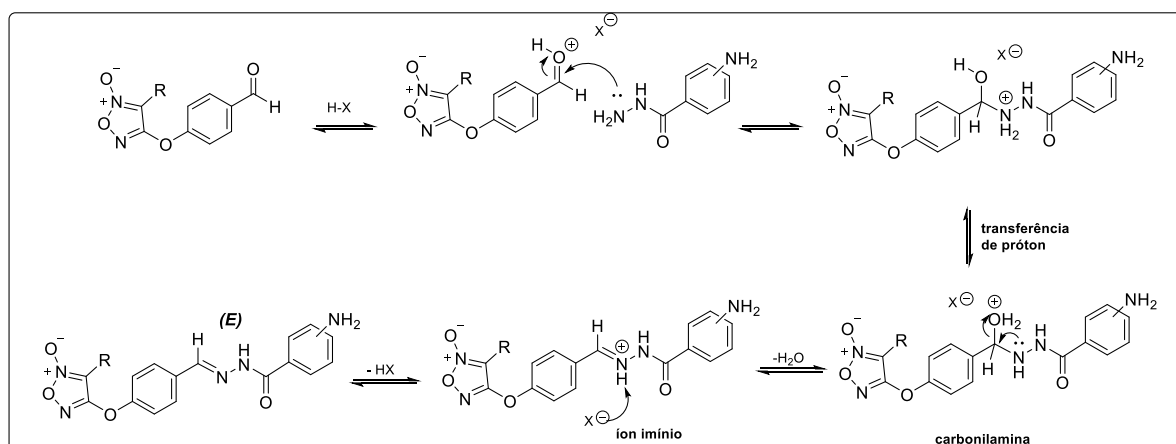
hidrogênio. Também é possível observar os hidrogênios metílicos em  $\delta$  2,12 e os dubletos dos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,04 e  $\delta$  7,65. Os carbonos do anel furoxânico se encontram delocados em  $\delta$  157 e  $\delta$  107 e a carbonila do aldeído se encontra no espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 42) em  $\delta$  191,8 e sugerindo a presença deste grupo funcional na molécula desejada (**13**).

## 6.2. Síntese dos intermediários N-acilhidrazônicos e produtos finais

A síntese de todas as *N*-acilhidrazonas deve seguir o mecanismo proposto para formação de imina ilustrado na Figura 27.

Após protonação da carbonila do aldeído em meio ácido, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons livre do grupo amino da hidrazida à carbonila do aldeído, levando a formação do intermediário tetraédrico neutro, chamado de carbonilamina. Na etapa seguinte a transferência do próton do nitrogênio para o oxigênio via solvente, permite a eliminação subsequente de uma molécula de água. O par de elétrons do nitrogênio forma uma ligação  $\pi$  com o carbono, originando o íon imínio. A etapa final consiste na desprotonação deste íon, resultando na imina (COSTA et al., 2003; BRUICE, 2014 ).

**Figura 27. Mecanismo da reação de formação dos intermediários 14-19.**

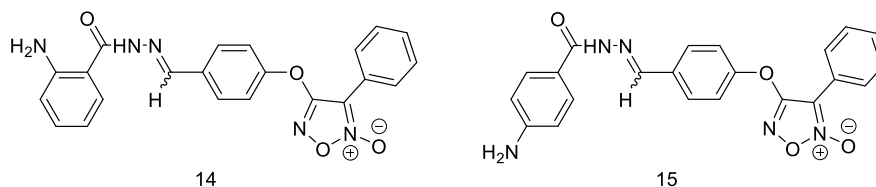


Fonte: próprio autor

De acordo com dados descritos na literatura, baseados em estudos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de *N*-acilidrazonas, a condensação de hidrazidas com aldeídos, utilizando catálise ácida leva a formação preferencial de *N*-acilidrazonas com configuração diastereoisomérica (*E*). Foi ainda descrito que o favorecimento da formação do distereoisômero (*Z*) só foi observado em derivados orto-piridínicos, provavelmente devido à formação de ligação-H intramolecular entre o átomo de nitrogênio piridínico e o hidrogênio da função amida do grupo *N*-acilidrazona. Desta forma, com base nos deslocamentos químicos característicos dos prótons imínicos de derivados *N*-acilidrazônicos descritos por Palla (PALLA et al., 1982; PALLA, GERARDO et al., 1986) e outros trabalhos (CUNHA et al., 2002; LIMA et al., 2000; pôde-se supor que os sinais referentes aos hidrogênios imínicos de todos os intermediários e compostos finais sintetizados neste trabalho eram referentes aos diastereoisômeros com a configuração relativa (*E*), uma vez que se encontram deslocados para campo mais baixo do que  $\delta$  8,10 nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e a

presença de um único deslocamento químico referente ao hidrogênio imínico em todas as moléculas contendo a subunidade *N*-acilhidrazona.

### 6.2.1. Síntese dos intermediários (14) e (15)

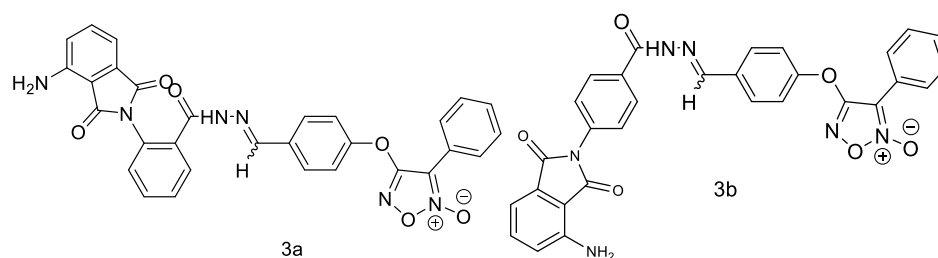


Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 43 e 45) dos intermediários (14) e (15), é possível visualizar os sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático dissubstituídos vizinhos ao grupo amino da amina primária; estes mais protegidos pelo efeito elétron-doador da mesma são visualizados  $\delta$  6,55 (2H) e  $\delta$  6,60 (2H). Os simpletos dos hidrogênios amídicos das *N*-acilhidrazonas são visualizados em  $\delta$  11,69 (1H) e  $\delta$  11,54 (1H) para os compostos 14 e 15, respectivamente. Além disso, para os mesmos compostos se pode observar os simpletos em  $\delta$  8,41 (1H) e  $\delta$  8,42 (1H) da imina. Já os outros hidrogênios mais desprotegidos, devido ao efeito elétron-retirador do grupo carbonila, estão na região entre  $\delta$  7,55-7,65 e  $\delta$  7,58-7,63, apresentando-se como um multipeto juntamente com os hidrogênios do anel aromático ligado ao furoxano.

Os sinais dos carbonos do anel furoxânico estão apresentados em  $\delta$  114 e  $\delta$  153 (intermediário 14) no espectro 15, e em  $\delta$  112 e  $\delta$  153 (intermediário 15) no espectro 17. Já o sinal das carbonilas das *N*-acilhidrazonas estão em  $\delta$  161,92 e  $\delta$  161,94. Os carbonos das iminas das *N*-acilhidrazonas podem ser visualizadas em  $\delta$  150,13 e  $\delta$  146,91 para os compostos 14 e 15, respectivamente. Todos os espectros permitiram evidenciar para ambos os compostos a formação de um único diastereoisômero devido à presença de apenas um único sinal (simpleto), nos

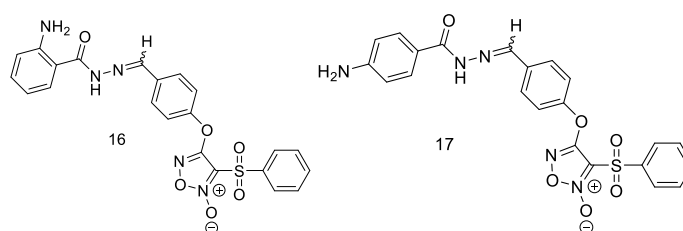
espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , referente ao hidrogênio imínico ( $\text{N}=\text{CH}$ ) da subunidade N-acilidrazona.

### 6.2.1.1. Síntese dos produtos finais (**3a**) e (**3b**)



É possível observar o desaparecimento do sinal da amina primária dos intermediários **14** e **15** respectivamente em:  $\delta$  6,39 (Figura 43) e  $\delta$  5,81 (Figura 45) e o aparecimento dos hidrogênios da amina primária ligada ao anel ftalimídico nos produtos finais **3a** e **3b** em:  $\delta$  6,53 (Figura 78) e  $\delta$  6,58 (Figura 49). Além disso, se pode visualizar as duas carbonilas dos anéis 3-amino-ftalimídicos com deslocamento em  $\delta$  168 ,  $\delta$  167 nas Figura 49 e 51, sugerindo a obtenção das moléculas desejadas.

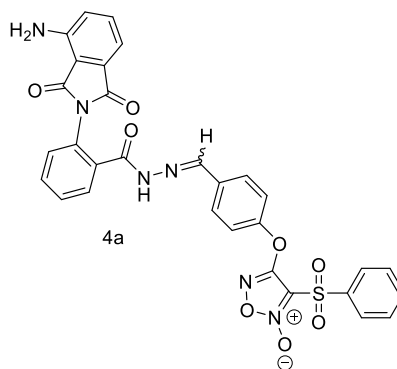
### 6.2.1.2. Sínteses dos intermediários (**16**) e (**17**)



No RMN de  $^1\text{H}$  do intermediário **16** (Figura 53) é possível observar o simpleto da amina primária integrando para dois hidrogênios em  $\delta$  6,40 e para **17** (Figura 55) em  $\delta$  5,81. O simpleto mais deslocado em  $\delta$  11,70 e  $\delta$  11,54 correspondente a amida dos compostos **16** e **17**, respectivamente. Para ambos compostos é possível

visualizar o simpleto referente ao hidrogênio da função imina com deslocamento em  $\delta$  8,42. Para os espectros de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 54 e 56) é possível visualizar em  $\delta$  158,23 e  $\delta$  158,65 a presença dos carbonos carbonílicos e em  $\delta$  150,13 e  $\delta$  152,82 os carbonos imínicos para os intermediários **16** e **17**, respectivamente. Os carbonos do núcleo furoxânico apresentam seus deslocamentos em  $\delta$  153,59 e  $\delta$  111,37 para o intermediário **16** e  $\delta$  153,83;  $\delta$  111,75 para o intermediário **17**. Este conjunto de dados dos métodos analíticos sugerem a formação dos intermediários **16** e **17**.

#### 6.2.1.3. Síntese dos compostos finais (**4a**) e (**4b**)

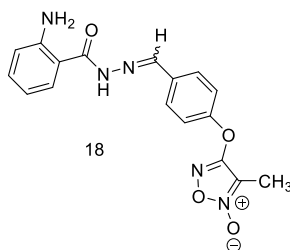


No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 57) do produto final **4a** observa-se o deslocamento do hidrogênio da amida em  $\delta$  12,06, da imina em  $\delta$  8,48 e da amina em  $\delta$  6,58. Já para o produto final **4b** estes hidrogênios se encontram deslocados em  $\delta$  12,02,  $\delta$  8,49 e  $\delta$  6,61, respectivamente. Estes mesmos hidrogênios para o intermediário **17** são visualizados em  $\delta$  11,54,  $\delta$  8,33 e  $\delta$  5,81 (Figura 55). Observa-se deslocamentos químicos desses hidrogênios, devido ao efeito de desblindagem causado pela introdução da subunidade ftalimídica nos produtos finais. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 58 e 60) é possível observar o deslocamento químico das carbonilas do anel 3-amino-ftalimídico em  $\delta$  168,54 e 167,35 para o composto **4a** e  $\delta$  167,82 e  $\delta$  166,58 para o **4b**. Pode-se visualizar ainda a presença

do deslocamento químico do carbono da carbonila e da imina da função *N*-acilhidrazona em  $\delta$  162,42 e  $\delta$  146,8, respectivamente (Figura 59).

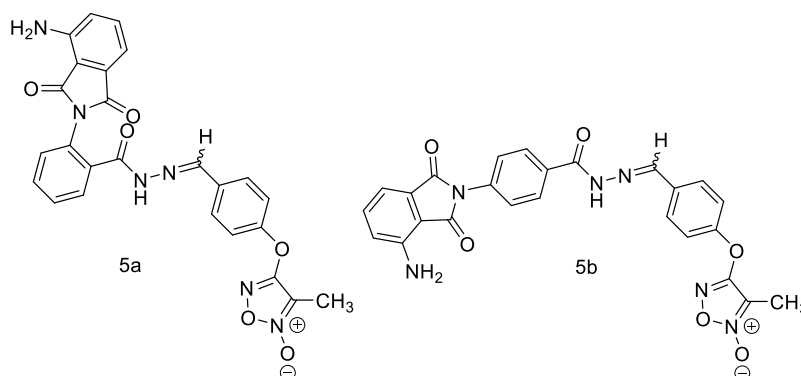
O espectro de massas de alta resolução (Figura 61) (ESI-TOF), apresentou o pico do íon molecular  $[M+H]^+$  com valor de  $m/z$  de 625,1123, concordante com o valor calculado de sua massa monoisotópica 624,1063 com base na fórmula empírica  $C_{30}H_{20}N_6O_8S$  para o íon molecular do composto (**4b**).

### 6.2.2. Sínteses dos intermediários (**18**) e (**19**)



O hidrogênio da função amida para os intermediários **18** e **19** são visualizados em  $\delta$  11,67 e  $\delta$  11,51 (Figuras 62 e 64). Já o hidrogênio da imina aparece como um singlete integrando para um hidrogênio em  $\delta$  8,4 para ambos intermediários. Estes sinais juntamente com os sinais das carbonilas (Figuras 63 e 65) em  $\delta$  165 e  $\delta$  162 e dos carbonos da imina em  $\delta$  150 e  $\delta$  152 permitem caracterizar nos intermediários a presença da subunidade *N*-acilhidrazona nos intermediários **18** e **19**, respectivamente.

### 6.2.2.1. Síntese dos compostos finais (**5a**) e (**5b**)



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 66) do composto **5a** é possível observar o hidrogênio pertencente à imina com deslocamento de  $\delta$  8,35 e da amida em  $\delta$  12,01. O deslocamento da amina primária se encontra em  $\delta$  6,52 como um singleto integrando para um hidrogênio. Os deslocamentos dos hidrogênios dos anéis aromáticos aparecem como multipletos na região compreendida entre  $\delta$  7,04 -  $\delta$  8,02.

As carbonilas do anel 3-amino-ftalimídico apresentam deslocamentos químicos em  $\delta$  168 e  $\delta$  166 (Figura 67). Estes sinais estavam ausentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do intermediário **18**. A carbonila da amida apresenta deslocamento químico em  $\delta$  162,87 e a imina em  $\delta$  151,1. Os deslocamentos dos carbonos do núcleo furoxânico podem ser visualizados em  $\delta$  153 e  $\delta$  111.

A Tabela 12 compara os deslocamentos do intermediário **19** com o produto final **5b**. É possível observar o do sinal dos hidrogênios da amina primária do intermediário **19** em  $\delta$  5,80 (Figura 65) enquanto no composto **5b** é possível visualizar os hidrogênios da amina primária mais deslocados em  $\delta$  6,61 por estarem ligados ao aromático pertencente ao núcleo ftalimídico (Figura 68). Para o composto final **5b** é ainda possível visualizar as duas carbonilas pertencentes ao anel 3-

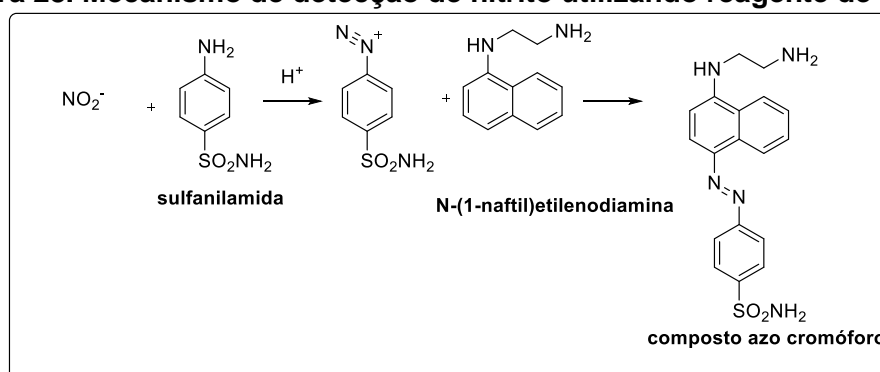
aminoftalimídico com deslocamento em  $\delta$  168 e  $\delta$  166 (Figura 70). O espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF), apresentou o pico do íon molecular  $[M+H]^+$  com valor de  $m/z$  de 499,1367, concordante com o valor calculado de sua massa monoisotópica 498,1288 com base na fórmula empírica  $C_{25}H_{18}N_6O_6$  para o íon molecular (Figura 71) do composto (**5b**). Assim, este conjunto de dados dos métodos analíticos sugerem a formação dos produtos finais **5a-b** desejados.

### 6.3. Ensaios farmacológicos

#### 6.3.1. Detecção quantitativa de nitrito

Em temperatura ambiente, o NO é gás com baixa estabilidade, possuindo meia vida extremamente curta. Em meio aquoso, o NO reage formando íons nitrito e nitrato (DUSSE et al., 2003). Portanto, uma das formas indiretas de avaliar a capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos é através da quantificação de nitrito presente em solução conforme mostra a Figura 28 (GIUSTARINI et al., 2008). O método de quantificação de nitrito para derivados furoxânicos descrito por Sorba e colaboradores (1997) é um método prático e rápido utilizando reagente de Griess, e por esta razão, foi utilizado para avaliação dos compostos deste trabalho.

**Figura 28. Mecanismo de detecção de nitrito utilizando reagente de Griess**



Fonte: próprio autor



De acordo com os dados da Tabela 1, pode-se observar que na ausência de cisteína nenhum composto foi capaz de doar óxido nítrico após 1 hora, mostrando que a doação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos é dependente da presença de grupos tióis, presentes, por exemplo na cisteína conforme é descrito na literatura (QING ZOU et al., 2011; MEDANA et al., 1999).

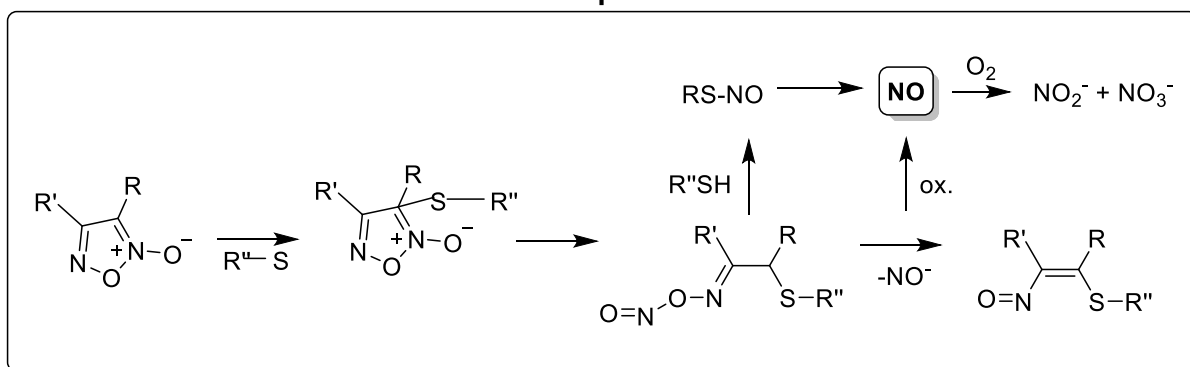
O dinitrato de isossorbida (DNS) foi usado como padrão apresentando capacidade de doação de óxido nítrico de 12,6 %. A capacidade representativa do DNS em doar NO deve-se ao fato dele possuir grupos ésteres de nitrato em sua molécula passíveis de doação.

O composto **4b** apresentou maior perfil de geração de nitrito com valor de 30%. Esta molécula apresenta a subunidade aril-sulfonila ligada ao carbono (C-3) alfa ao *N*-óxido, o qual é um grupo elétron-retirador, tornando esse átomo de carbono mais deficiente do ponto de vista eletrônico e mais suscetível ao ataque do nucleófilo (enxofre resíduo de cisteína). É possível observar ainda que para os compostos contendo o grupo metil ligado ao carbono (C-3) alfa ao *N*-óxido, como é o caso dos compostos **5a-b**, nos quais a doação de NO foi praticamente nula mesmo na presença de cisteína. Esses resultados sugerem que a capacidade de doação de NO se relaciona ao substituinte ligado ao carbono alfa *N*-óxido conforme havia sido observado em resultados prévios do nosso grupo (SANTOS, 2009).

Desta forma, pode-se sugerir que a maior doação de NO está diretamente relacionada à presença de grupos eletroatratores ligados ao carbono C-3 como ocorre no caso do 4-fenil-3-furoxancarboxitrilo 3. Segundo os autores, isso acontece devido a deficiência de elétrons do carbono na posição 3, gerada pelo efeito elétron-retirador do grupamento ciano (Figura 23) . De fato, observa-se que a maior doação

de NO está relacionada à presença de grupos elétron-retiradores ligados a este carbono quando se relaciona a capacidade de doação de NO com o substituinte do carbono ligado ao *N*-óxido (SORBA et al., 1997). Assim, os compostos obtidos neste trabalho apresentam diferentes perfis de doação de NO e permitirão estudar a contribuição deste mediador na atividade biológica desejada.

**Figura 29. Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos com ataque em C3**



Fonte: retirado e adaptado de FEELISCH; SCHONAFINGER; NOACK, 1992

### 6.3.2. Avaliação da produção de gama-globina e HbF em células CD34+

Para este ensaio foram selecionados os produtos finais **3b**, **4b** e **5b**. A seleção destes compostos visa comparar o mesmo padrão estrutural de substituição regioisomérica, com a principal diferença relacionada ao tipo de furoxano (metil, fenil ou fenilsulfonil). Desta forma, é possível avaliar a contribuição da doação de NO à capacidade dos compostos em induzir a produção de gama-globina.

Foi possível notar um aumento significativo de globina  $\gamma$  e somente pelo composto **4b** (2,5  $\mu$ M) em relação ao controle DMSO (Figura 14). Além disso, o aumento de HbF deste mesmo composto também se mostrou significativo (Figura 14).

Todos os tratamentos exibiram uma diminuição na proliferação celular quando comparadas ao DMSO durante os 14 dias de tratamento, entretanto a diminuição do número de células tratadas com **4b** foi comparável à hidroxiureia (Figura 15).

O processo de diferenciação eritroide foi acompanhado através dessa técnica utilizando-se anticorpos de superfície celular (anti- $\alpha$ -integrina, anti-glicoforina A (GPA) e Banda-3). A  $\alpha$ -integrina diminui progressivamente durante os estágios tardios da diferenciação terminal eritroide humana, enquanto que a expressão da Banda 3 aumenta progressivamente durante toda a extensão dessa diferenciação, sendo então úteis como marcadores para monitorar a progressão da diferenciação terminal eritroide humana (HU et al., 2013).

No 14<sup>o</sup> dia, não foi observado diferença na diferenciação terminal das células GPA-positivas (Figura 16). A análise de citometria de fluxo nos dias 7, 11 e 14 indicou que o composto **4b** e HU aceleram a diferenciação terminal nos dias 11 e 14 em comparação com DMSO e pomalidomida, uma vez que houve um aumento nas células GPA-positivas que expressam a banda 3 (Figura 16). A aceleração da eritropoese pode aumentar a chance de comprometimento prematuro da linhagem e a indução da formação de células F (BLAU, 1993). De fato, estudos revelam que a HU poderia efetivamente estimular a eritropoese e a produção de Hb F (TANG et al., 2005; WANG et al., 2002) deste modo, o composto **4b** poderia ter essas mesmas propriedades.

Além disso, a morfologia celular foi verificada utilizando corante May-Grunwald Giemsa e notou-se a predominância de eritroblastos poli e ortocromáticos nas células tratadas com composto **4b**, enquanto no tratamento com DMSO ainda estão presentes pró-eritroblastos, sendo evidente a aceleração da diferenciação das

células tratadas com essa molécula teste. Ademais, as células apresentaram morfologia normal para todos os tratamentos (Figura 17).

A repressão da expressão *gobina*  $\gamma$  é regulada por uma série de fatores. Entre estes, o BCL11A é reconhecido como o regulador principal e pode interagir com diversos outros fatores como SOX-6, GATA-1, KLF-1 e LSD. Todos estes cooperam no silenciamento do gene da *gobina*  $\gamma$  (BAUER; ORKIN, 2015). A capacidade da pomalidomida induzir HbF está relacionada com a redução dos fatores transcricionais BCL11-A e SOX-6 durante a eritropoese (DULMOVITS et al., 2015). A pomalidomida também se liga ao cereblon, levando a ubiquitinação e degradação proteasomal de Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKZF3), resultando na citotoxicidade para tratamento do mieloma (ZHU et al., 2011). Neste contexto, foi então investigado o envolvimento dessas proteínas no mecanismo de indução de *gobina*  $\gamma$  pelo composto **4b** nas células CD34<sup>+</sup>. Após 4 dias de diferenciação, o composto **4b** (2,5  $\mu$ M) e a HU (10  $\mu$ M) não afetaram a expressão de BCL11A e IKAROS sendo igual estatisticamente iguais ao DMSO, sugerindo que o mecanismo de indução de *gobina*  $\gamma$  para esta molécula difere daquele da pomalidomida, sendo mais semelhante ao da HU (Figura 10).

Estudos recentes mostraram que o fator relacionado a leucemia/linfoma (LRF) reprime a expressão de *gobina*  $\gamma$  independentemente de BCL11A. LRF é codificado pelo gene ZBTB7A, sendo um fator de transcrição de ZBTB que se liga ao DNA no C2H2-terminal do dedo de zinco, recrutando um complexo de repressão (MASUDA et al., 2016).

Os níveis de expressão de LRF nas células tratadas foram verificados por Western Blot (Figura 19), porém nenhuma alteração foi observada nas células tratadas com pomalidomida, HU ou composto **4b**.

As modificações epigenéticas também desempenham um papel importante no silenciamento de genes da expressão de globina  $\gamma$ . Este mecanismo pode estar associado ao aumento da acetilação de histonas e à diminuição da metilação do DNA do gene para  $\gamma$ - globina (GINDER, 2015). De fato, os inibidores da histona deacetilase, como o butirato de sódio, mostraram induzir HbF *in vivo* em pacientes com anemia falciforme (WITT et al., 2003). A fim de avaliar se esses mecanismos estão envolvidos na expressão de globina  $\gamma$  pelo composto **4b**, foram avaliados os níveis de histona nas células tratadas. No entanto, nossos dados com a modificação das histonas pelo composto **4b** não foram conclusivos e serão re-avaliados.

### 6.3.3. Quantificação de GMPc

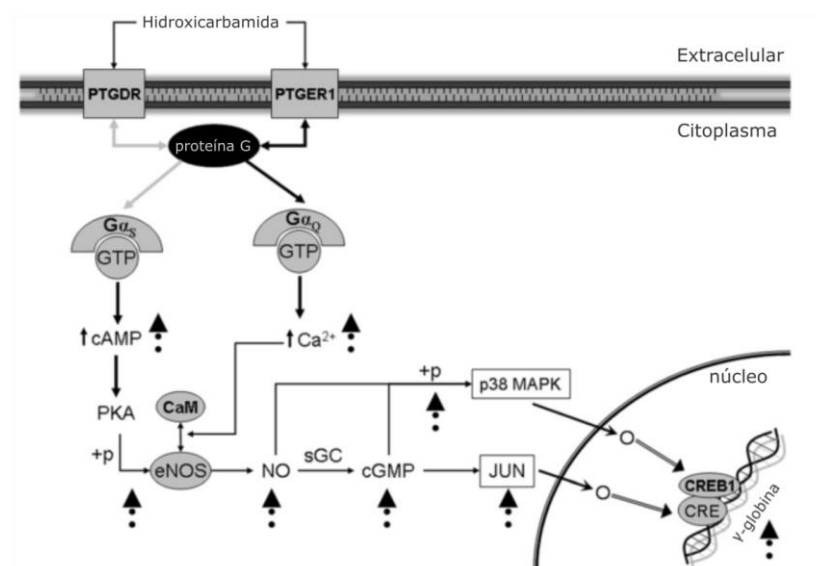
O NO é responsável por ativar guanilato ciclase (GC) levando ao aumento da síntese de GMPc. Este atua como mediador para diversas atividades cardiovasculares tais como antiplaquetária e vasodilatadora. Além disso, é responsável por aumentar a expressão de globina  $\gamma$  em células eritroleucêmicas e eritroblastos primários (ČOKIĆ et al., 2013; CONRAN et al., 2004).

A produção de GMPc foi quantificada a fim de avaliar o efeito do composto **4b** e da HU em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e células CD34<sup>+</sup>. As células HUVEC se mostraram mais responsivas que as CD34<sup>+</sup>, apresentando

resultados na quantificação mais homogêneos. O composto **4b** aumentou significativamente a formação de GMPc nas células HUVEC comparado com o controle.

A pomalidomida não afetou os níveis de GMPc, conforme esperado. A via do NO/GMPc possui um importante papel na expressão gobina  $\gamma$ , ativando os fatores de transcrição c-Jun e c-Fos que se ligam na região controladora de locus do gene da gama-globina, sendo uma via interessante a ser estudada (Figura 30).

**Figura 30. Expressão de gama-globina mediada pela via GMPc-NO**



Fonte: Retirado e adaptado de Cokic et al, 2013.

#### 6.3.4. Viabilidade celular em monócitos doseamento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é uma das citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo vasculoso da AF participando na ativação de leucócitos, estimulação de macrófagos e quimiotaxia de células inflamatórias aumentando de crises dolorosas na anemia

falciforme, contribuindo com o caráter inflamatório crônico da doença (CAJADO et al., 2010).

A fim de avaliar a inibição desta citocina pelos compostos sintetizados, primeiramente foi realizado o teste de viabilidade celular com objetivo de determinar as concentrações que seriam utilizadas no teste de doseamento do TNF- $\alpha$ .

Foram testados no ensaio de viabilidade os compostos 4b, nas concentrações de 1 $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M e pomalidomida 5  $\mu$ M. A viabilidade celular variou entre 89 a 95%, sendo considerada satisfatória para todas as concentrações.

Após a definição da viabilidade celular dos compostos sintetizados foi possível realizar o teste imunológico para determinação de TNF- $\alpha$ . O composto **4b** foi testado em duas concentrações diferentes e mostrou uma diminuição significativa na produção de TNF- $\alpha$  em relação ao controle positivo (LPS), sendo esta inibição comparável à pomalidomida. Estes dados são consistentes com a literatura, que têm demonstrado que a subunidade ftalimidica seria responsável por inibir TNF- $\alpha$ (SHARMA; KUMAR; SINGH, 2010).

## 7 CONCLUSÕES

Até presente momento, foram sintetizados 16 intermediários sintéticos com rendimentos variando entre 21% e 75%. Todos os compostos foram caracterizados por métodos analíticas que sugerem a obtenção desses compostos. Foram obtidos 6 produtos finais com rendimentos variando entre 13 e 30%.

No ensaio de doação de óxido nítrico foi possível observar que o mecanismo de doação para todos os compostos é cisteíno-dependente, uma vez que na ausência deste aminoácido a doação foi nula. Os compostos **4a-b** apresentaram maior capacidade de geração de nitrito entre os compostos da série, com valores variando entre 28 e 30%.

Os compostos finais **3b**, **4b**, e **5b** foram avaliados quanto a capacidade de induzir o aumento de produção de gobina  $\gamma$ . O composto **4b** foi o mais promissor, aumentando a expressão de gobina  $\gamma$  de maneira comparável a HU, porém com menor dose (2,5  $\mu$ M).

O mecanismo de indução de gobina  $\gamma$  pelo composto **4b** também foi investigado e aparentemente o mesmo atua por um mecanismo diferente da pomalidomida, uma vez que não está relacionado com BCL11A e IKAROS. Além disso, os níveis de LRF, um repressor do gene da gobina  $\gamma$  independente de BCL11A, também não foram alterados. Estudos envolvendo mecanismos epigenéticos com histonas foram iniciados, porém os dados não foram conclusivos.

O composto **4b** também foi capaz de aumentar a produção de GMPc nas células HUVEC e CD34<sup>+</sup> em quantidade comparável a HU, porém em menor dose.



Adicionalmente, o composto **4b** diminuiu significativamente a produção de TNF- $\alpha$  em monócitos estimulados com LPS.

Os resultados obtidos até o presente momento caracterizam o novo composto **4b** sintetizados como protótipo potencialmente útil ao tratamento da anemia falciforme.

## REFERÊNCIAS

- AERBAJINAI, W. et al. Thalidomide induces gamma-globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 2864–2871, 2007.
- AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19–27, 2011.
- ATZ A. M.; WESSEL D. L. Inhaled Nitric Oxide in Sickle Cell Disease with Acute Chest Syndrome . **Anesthesiology**, v. 87, n. 4, p. 988–990, 1 out. 1997.
- AUSTIN, H. et al. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 908 LP-912, 1 ago. 2007.
- AYI, K. et al. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3364 LP-3371, 15 nov. 2004.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos **Química Nova** scielo , , 2005.
- BARTLETT, J. B.; DREDGE, K.; DALGLEISH, A. G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 314–322, 2004.
- BAUER, D. E.; ORKIN, S. H. Hemoglobin switching's surprise: The versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 33, p. 62–70, 2015.
- BELCHER, J. D. et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3953–3959, 2003.
- BLAU, C. et al. Fetal Hemoglobin in Acute and Chronic States of Erythroid Expansion. **Blood**, v. 1, n. 1, p. 227–233, 1993.
- BODERA, P.; STANKIEWICZ, W. Immunomodulatory Properties of Thalidomide Analogs: Pomalidomide and Lenalidomide, Experimental and Therapeutic Applications. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 5, p. 192–196, 2011.
- BRITTENHAM, G. M.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**, v. 65, n. 1, p. 183–9, 1985.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 762–769, 1997.
- CAJADO, C. S. et al. IL-8 E Tnf Alfa : Falciforme II - Alfa : Marcadores Imunológicos No Prognóstico Da Anemia. **Lancet, The**, v. 3, n. 12 31, p. 56–61, 2010.

CERECETTO, H. et al. 1, 2, 5-Oxadiazole N -Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs : Structure - Activity Relationships. p. 1941–1950, 1999.

CHAMBERLAIN, P. P. et al. Structure of the human Cereblon – DDB1 – lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. **Nature Structural & Molecular Biology**, n. August, p. 1–8, 2014.

CHARACHE, S. et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, n. 1, p. 2555–2565, 1992.

CHAULET, C. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- $\alpha$  and IL-6 production inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 3, p. 1019–1022, 2011.

COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide – dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231–239, 2003.

ČOKIĆ, V. P. et al. Globin gene expression in correlation with G protein-related genes during erythroid differentiation. **BMC genomics**, v. 14, p. 116, 2013.

CONRAN, N. et al. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **British Journal of Haematology**, v. 124, n. 4, p. 547–554, 2004.

DAI, Y. et al. Therapeutic fetal-globin inducers reduce transcriptional repression in hemoglobinopathy erythroid progenitors through distinct mechanisms. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 56, n. 1, p. 62–9, 2016.

DE CATERINA, R. et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 1, p. 60–68, jul. 1995.

DE MELO, T. R. F. et al. Pharmacological evaluation and preparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing an N-acyl hydrazone subunit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, 2014.

DE WYNTER, E. A. et al. CD34+AC133+ Cells Isolated from Cord Blood are Highly Enriched in Long-Term Culture-Initiating Cells, NOD/SCID-Repopulating Cells and Dendritic Cell Progenitors. **STEM CELLS**, v. 16, n. 6, p. 387–396, 1 nov. 1998.

DOS SANTOS, J. L. et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. part II: furoxan derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7583–7592, 2012.

DULMOVITS, B. M. et al. Pomalidomide reverses  $\gamma$ -globin silencing through the transcriptional reprogramming of adult hematopoietic progenitors. **Blood**, 2015.

- DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837–4847, 2014.
- DYKES, G. W.; CREPEAU, R. H.; EDELSTEIN, S. J. Three-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of hemoglobin S. **Journal of Molecular Biology**, v. 130, n. 4, p. 451–472, 1979.
- FERSHTAT, L. L. et al. Dinitrogen Trioxide–Mediated Domino Process for the Regioselective Construction of 4-Nitrofuroxans from Acrylic Acids. **Heteroatom Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 226–237, 2014.
- FERSTER, A. et al. Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3628 LP-3632, 1 jun. 2001.
- FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 2, 2013.
- GASCO, A. et al. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973–981, 2004.
- GINDER, G. D. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. **Translational Research**, v. 165, n. 1, p. 115–125, 2015.
- GIUSTARINI, D. et al. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. In: **Nitric Oxide, Part F**. [s.l.] Academic Press, 2008. v. 440p. 361–380.
- GONG, L. et al. Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 317, 2013.
- HANFT, V. N. et al. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3589 LP-3593, 1 jun. 2000.
- HILLERY, C. A. et al. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **British Journal of Haematology**, v. 109, n. 2, p. 322–327, 1 maio 2000.
- HSIAO, C.-H. et al. Fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves generation of reactive oxygen species. **Experimental hematology**, v. 34, n. 3, p. 264–73, 2006.
- HU, J. et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3246–3253, 2013.
- HUEHNS, E. R. . et al. Human Embryonic Hemoglobins. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, n. 29, p. 327–331, 1964.
- HUTTLE, A. et al. Sickle cell in sickle cell disease in Latin America and the United

- States. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 7, p. 1131–1136, 1 jul. 2015.
- KATO, G. J. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279–2285, 2006.
- KUTLAR, A. et al. A dose-escalation phase IIa study of 2,2-dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 11, p. E255–E260, 1 nov. 2013.
- LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 2, p. 235–242, 1 fev. 2009.
- MACK, A. K.; KATO, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 8, p. 1237–1243, 17 fev. 2006.
- MANNING, L. R. et al. Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 16, n. 8, p. 1641–1658, 21 ago. 2007.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, 2013a.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-Occlusion in sickle cell disease: Pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, 2013b.
- MASUDA, T. et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. **Science**, v. 351, n. 6270, p. 285–289, 2016.
- MCCAFFREY, P. G. et al. Induction of  $\gamma$ -Globin by Histone Deacetylase Inhibitors. **Blood**, v. 90, n. 5, p. 2075 LP-2083, 1 set. 1997.
- MCGRATH, K.; PALIS, J. Chapter 1 Ontogeny of Erythropoiesis in the Mammalian Embryo. In: **Current Topics in Developmental Biology**.v.82, p. 1–22, 2008.
- MEILER, S. E. et al. Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. **Blood**, v. 118, n. 4, p. 1109–1112, 2011.
- MOLOKIE, R. et al. Oral tetrahydrouridine and decitabine for non-cytotoxic epigenetic gene regulation in sickle cell disease : A randomized phase 1 study. **PLOS Medicine**, p. 1–28, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002382>.
- MOUTOUH-DE PARSEVAL, L. A. et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. **Journal of**

**Clinical Investigation**, v. 118, n. 1, p. 248–258, 2008.

MULLER, G. W. et al. Amino-substituted thalidomide analogs: Potent inhibitors of TNF-alfa production. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 11, p. 1625–1630, 1999.

MURAO, M.; FERRAZ, M. H. C. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto , v. 29, n. 3, p. 223-225, 2007.

NAHAVANDI, M. et al. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **British Journal of Haematology**, v. 119, n. 3, p. 855–857, 1 dez. 2002.

NARESH, K. N. et al. Clinical effectiveness of decitabine in severe sickle cell disease. **British Journal of Haematology**. v.141, n.1, p.126-129, 2008.

PACE, B. S. et al. Cell signaling pathways involved in drug-mediated fetal hemoglobin induction: Strategies to treat sickle cell disease. **Experimental biology and medicine**, v. 240, n. 8, p. 1050–1064, 2015.

PACE, B. S.; ZEIN, S. Understanding mechanisms of  $\gamma$ -globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 7, p. 1727–1737, 2006.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664, 1988.

PERRINE, S. P.; PACE, B. S.; FALLER, D. V. Targeted fetal hemoglobin induction for treatment of beta hemoglobinopathies. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 233–248, 2014.

PERUTZ, M. F. Mechanisms Regulating the Reactions of Human Hemoglobin With Oxygen and Carbon Monoxide. **Annual Review of Physiology**, v. 52, n. 1, p. 1–26, 1990.

PIEL, F. B. et al. Online Biomedical Resources for Malaria-Related Red Cell Disorders. **Human Mutation**, v. 34, n. 7, p. 937–944, 2013.

PLATT, ET AL. Mortality in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 9, p. 1639–1644, 1994.

PULE, G. D. et al. A Systematic Review of Known Mechanisms of Hydroxyurea-induced Foetal Haemoglobin for Treatment of Sickle Cell Disease. **Expert review of hematology**, v. 8, n. 5, p. 669–679, 2015.

RAGHUPATHY, R.; BILLETT, H. H. Promising therapies in sickle cell disease. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2009.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v.

376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.

REID, M. E. et al. A double-blind, placebo-controlled phase II study of the efficacy and safety of 2,2-dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 7, p. 709–713, 2014.

REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature medicine**, v. 8, n. Table 1, p. 1383–1389, 2002.

ROBINSON, R. D. et al. Textural differences between AA and SS blood specimens as detected by image analysis. **Cytometry**, v. 17, n. 2, p. 167–172, 1994.

SAKAMOTO, T. M. et al. Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. **Microvascular Research**, v. 90, p. 173–179, 2013.

SANKARAN, V. G. et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science** New York, N.Y., v. 322, n. 5909, p. 1839–1842, 2008.

SANKARAN, V. G. et al. A Functional Element Necessary for Fetal Hemoglobin Silencing. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 9, p. 807–814, 2011.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, 2013.

SANKARAN V.G., AND N. D. G. . Reversing the Hemoglobin Switch. **New England Journal of Medicine.**, v. 363, n. 23, p. 2258–60, 2010.

SCHÖNAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **Farmaco**, v. 54, n. 5, p. 316–320, 1999.

SERJEANT, G. R. The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v.3, n.10, p. 1–12, 2013.

SHARMA, U.; KUMAR, P.; SINGH, N. K. AND B. Recent Advances in the Chemistry of Phthalimide Analogues and their Therapeutic Potential. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10, n.8, p.678-704, 2010.

SIATECKA, M.; BIEKER, J. J.; DC, W. The multifunctional role of EKLF / KLF1 during erythropoiesis. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2044–2054, 2011.

STEINBERG, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 4, p. 204–210, 2006.

TAKAYAMA, H.; HANASAKI, Y.; IJICHI, K. Utilization of Wieland Furoxan synthesis for preparation of 4-aryl-1,2,5-oxadiazole-3-yl carbamate derivatives having potent anti-HIV activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 6, n. 16, p. 1993–1996.

TANG, D. C. et al. The hydroxyurea-induced small GTP-binding protein SAR

modulates gamma-globin gene expression in human erythroid cells. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3256–3263, 2005.

TAYLOR, S. M.; PAROBK, C. M.; FAIRHURST, R. M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 457–468, 2012.

VESPOLI, S. ; MARQUES, M. ; MARANE, S.S.G.; SANTOS, V.F.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J.L. Análise das prevalências de doenças detectadas pelo programa nacional de triagem neonatal no município de Araraquara no ano de 2009 **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**.v. 32, n.2, p.269-273, 2011.

VINJAMUR, D. S. et al. Krüppel-Like Transcription Factor KLF1 Is Required for Optimal  $\gamma$  - and  $\beta$  -Globin Expression in Human Fetal Erythroblasts. **PLoS One**. v.3, n.11, p. 1–12, 2016.

WANG, M. et al. Hydroxyurea exerts bi-modal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. **British Journal of Haematology**, v. 119, n. 4, p. 1098–1105, 2002.

WARD, S. P. Thalidomide and Congenital Abnormalities. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5305, p. 646–647, 1962.

WEATHERALL, D. J. Genetic variation and susceptibility to infection: The red cell and malaria. **British Journal of Haematology**, v. 141, n. 3, p. 276–286, 2008.

XU, J. et al. Transcriptional silencing of gamma-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. **Genes and Development**, v. 24, n. 8, p. 783–789, 2010.

YI, Z. et al. Sox6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 2, p. 129–139, 2006.

ZHOU, D. et al. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. **Nature genetics**, v. 42, n. 9, p. 742–4, 2010.

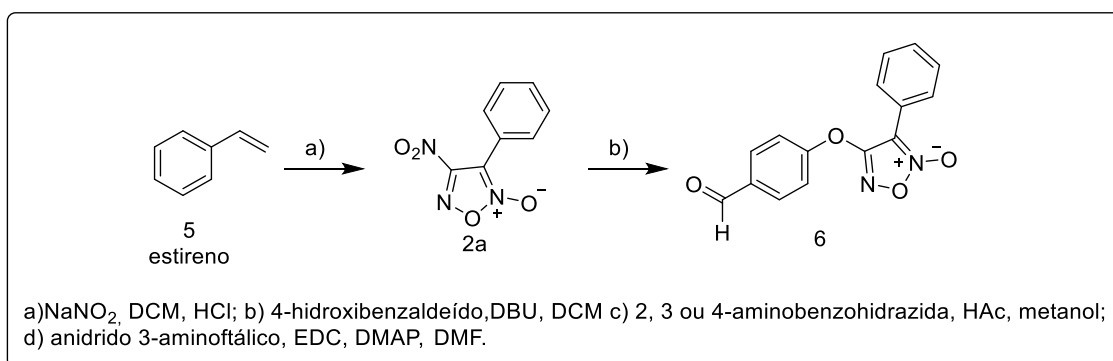
ZHU, Y. X. et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4771–9, 3 2011.



## Apêndice I

### 1 SÍNTESE DOS DERIVADOS FUROXÂNICOS FUNCIONALIZADOS

#### 1.1 Intermediário 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (2a) e 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (6)



#### *Procedimento experimental*

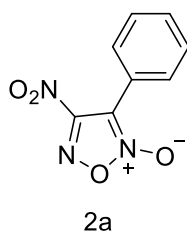
Em balão de fundo redondo de 125 mL adicionou-se 2,2 mL do estireno(5) em 100 mL de diclorometano. Em seguida, adicionou-se lentamente 11g de nitrito de sódio. Após a completa adição do nitrito de sódio, foram adicionados 9,15 mL de ácido acético. A reação foi mantida em temperatura ambiente e agitação por período de 2 horas. Em seguida, foram adicionados 3 mL de HCl (37%) e a reação foi deixada a temperatura ambiente overnight.

O isolamento da reação foi realizado lavando-se a fase orgânica com água (4 x 30 mL) em seguida foi adicionado o agente secante sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. O volume do conteúdo foi reduzido sob pressão reduzida e a purificação do produto foi realizada por recristalização em mistura de 50%etanol/50%água.

O rendimento da reação foi de 67% e na análise por Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D) , fase móvel 70% diclorometano e 30%hexano , foi obtido Fator de Retenção de 0,71 (Rf), faixa de fusão 88,0 – 90,0°C.

Caraterização estrutural:

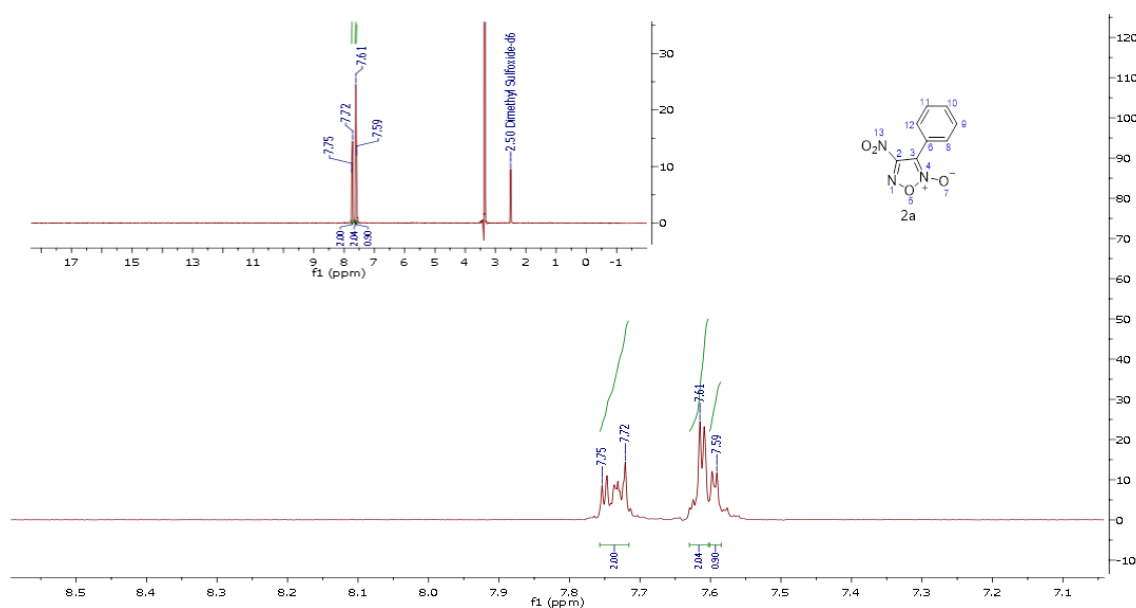
4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (**2a**)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ): 7,75 - 7,72 (m; 2H); 7,61-7,59 (m; 3H) ppm.

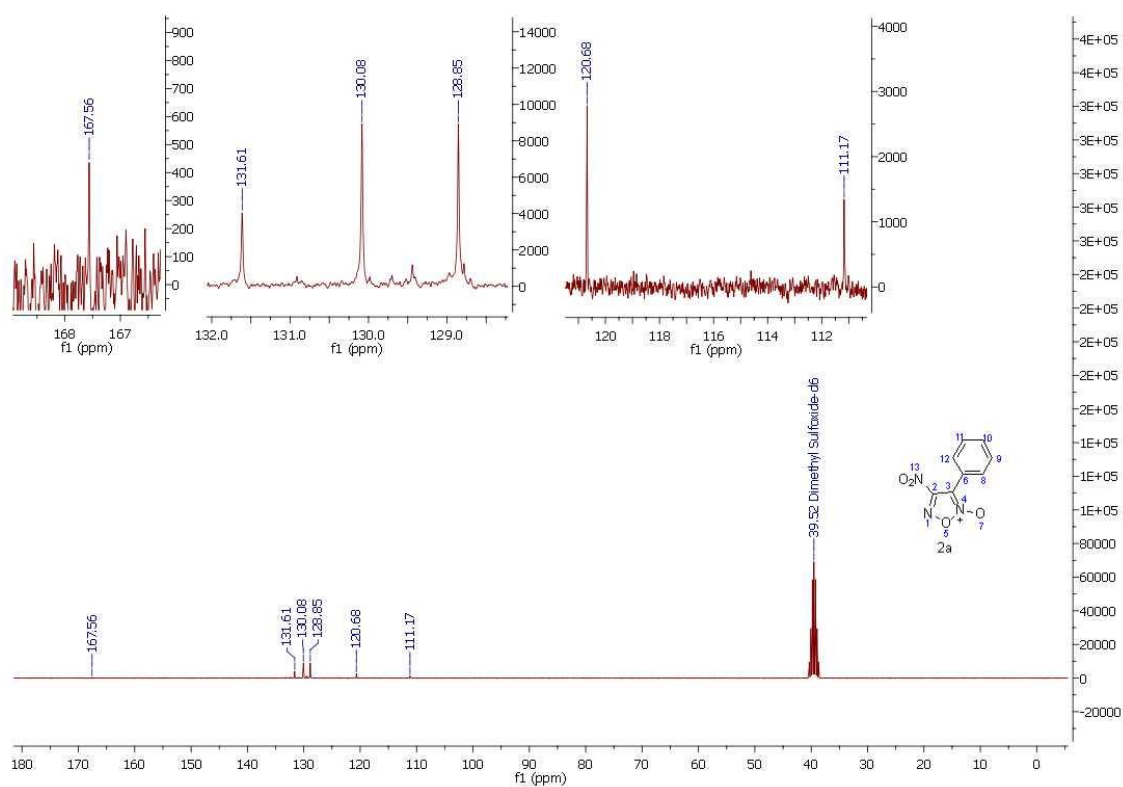
RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz;  $\text{acetona-}d_6$ ): 167,56 (C3); 131,61(C6); 130,08 (C8 e C12); 128,85 (C9 e C11); 120,68 (C10); 111,17 (C2) ppm.

Figura 31. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (**2a**) (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ )



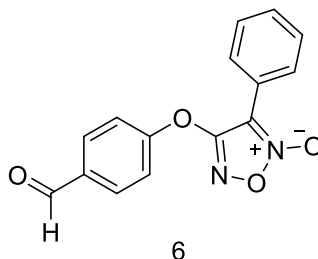
Fonte: dados da pesquisa

Figura 32. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 4-nitro-3 fenil-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido (2a) (75 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )



Fonte: dados da pesquisa

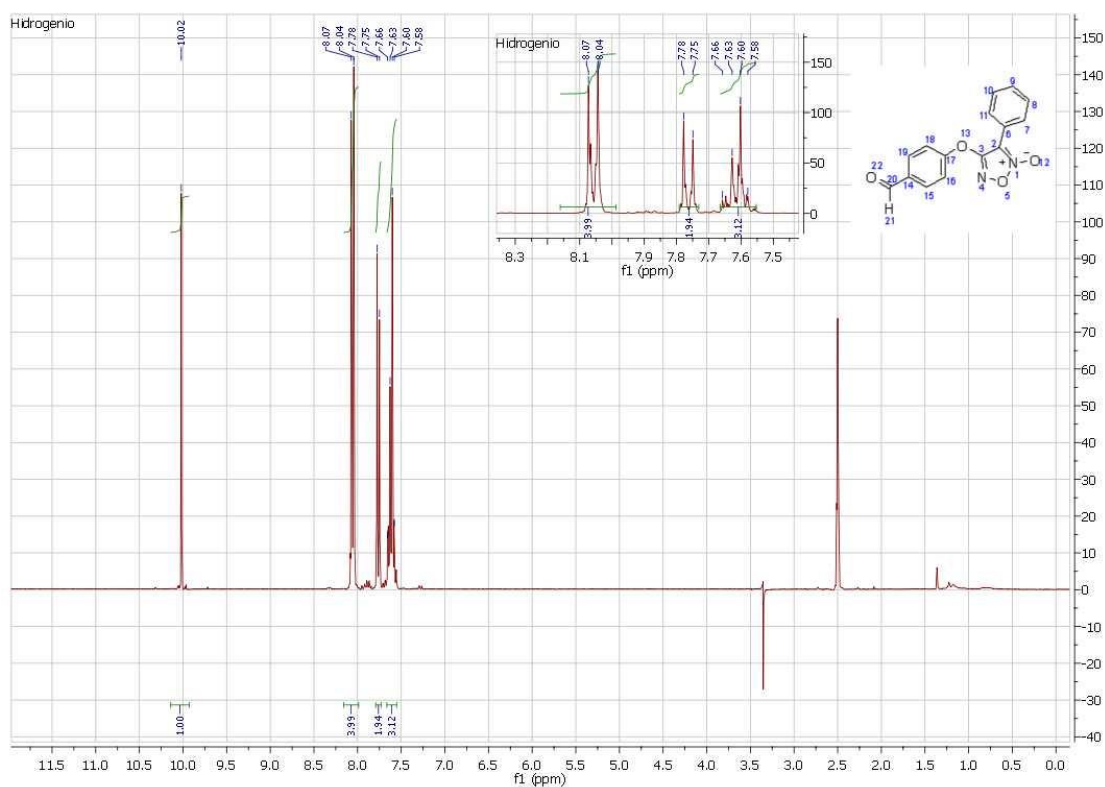
#### 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (6)



RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) 10,02 (H-C=O, s, 1H), 8,06 (m, 4H), 7,76 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7,66 – 7,55 (m, 3H) ppm

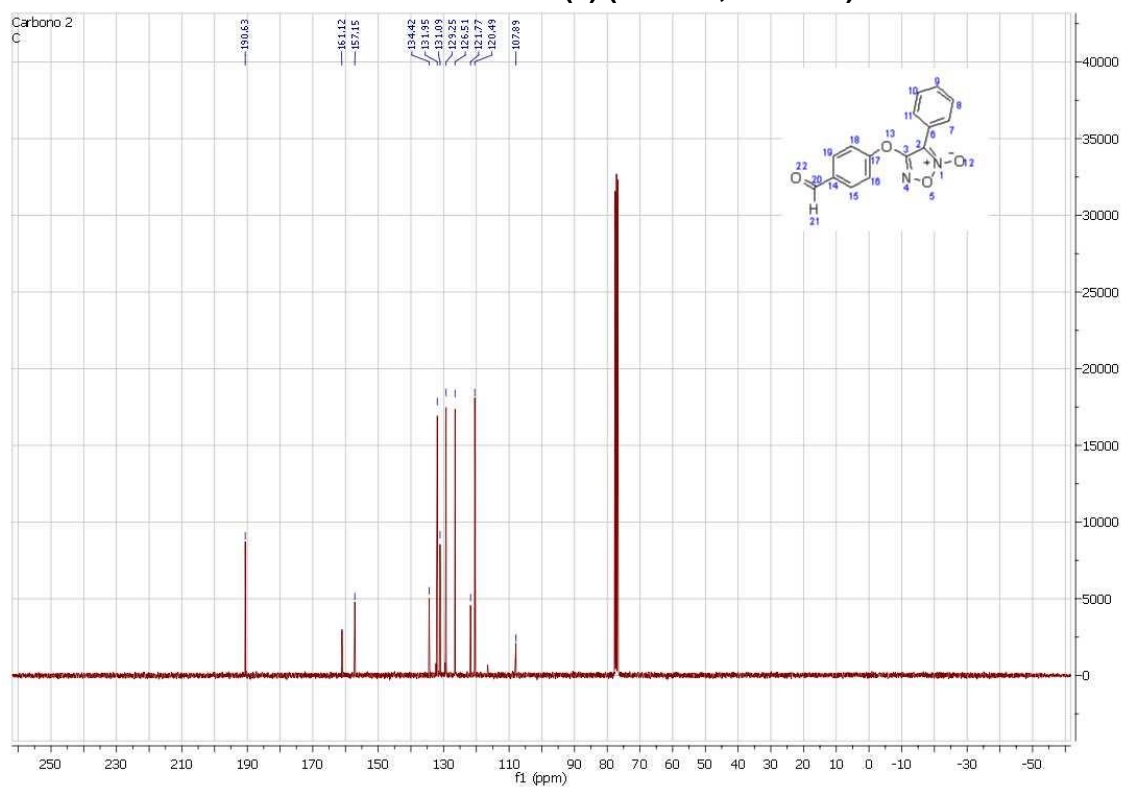
RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 190,63 (C20); 161,05 (C17); 157,15 (C3); 134,42 (C14), 131,95 (C15 e C19), 131,09 (C16 e C18), 129,25 (C7 e C11), 126,51 (C8 e C10), 120,49 (C9), 107,89 (C2).

Figura 33: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 4-(4-formilfenoxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-oxido (6) (300 MHz;  $\text{DMSO}_{d6}$ ).



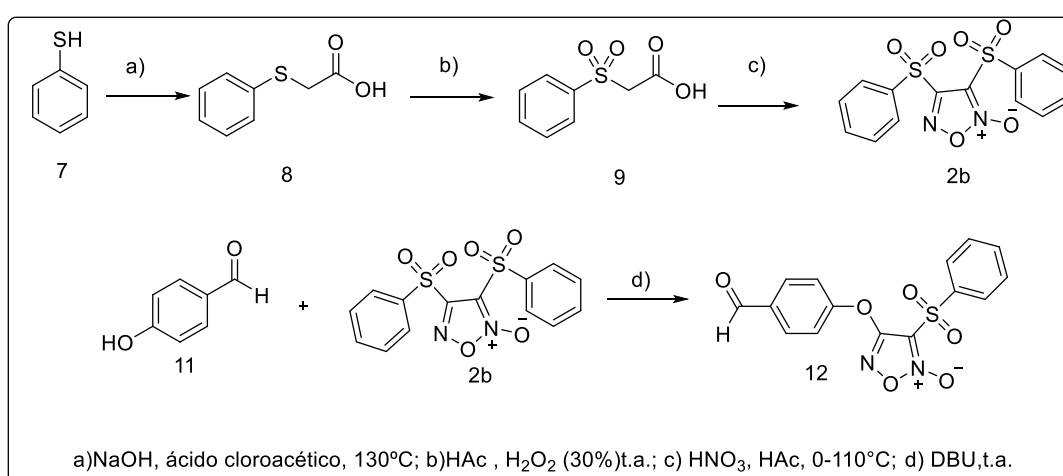
Fonte: dados da pesquisa

Figura 34: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (6) (75 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).



Fonte: dados da pesquisa

### 7.1. Síntese do 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (2b) e intermediário 12



#### Procedimento experimental

Na primeira etapa, adicionou-se 9,3 mL de tiofenol (7) (90,70 mmol; d = 1,073 g/mL) em 40 mL de água destilada em balão de 250 mL. Adicionou-se então, 7,62 g de hidróxido de sódio (190,60 mmol) e agitou-se por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 9,44g de ácido monocloroacético (99,84 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação e aquecimento a 110°C por duas horas. O produto (8) foi recristalizado em etanol para fornecer 12,65 g de um sólido branco (83% rendimento), com faixa de fusão entre 60°C-61°C (PM = 168,21; C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S).

Para obtenção do ácido fenilsulfonilacético (9), foi adicionado em balão de 250 mL a quantidade de 5 g de ácido feniltioacético (8) (1 equivalente em mol) em 40 mL de ácido acético glacial e 12 mL (4 equivalentes em mol) de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por dois dias (48 horas). O isolamento foi realizado adicionando-se cerca de 10 mL de

solução saturada de cloreto de sódio. Em seguida realizaram-se extrações (4 x 15 mL) com acetato de etila. Foi adicionado à fase orgânica sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se a fase orgânica a pressão reduzida. O produto (9) obtido com rendimento de 76% como um sólido branco (PM = 200,21; C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S).

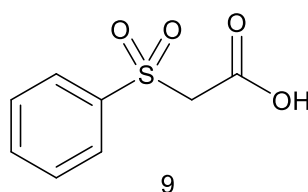
Em seguida, em balão de 100 mL, adicionou-se 3,21 g do ácido fenilsulfonilacético (10) e 10 mL de ácido acético glacial mantendo a temperatura a 0°C. Adicionou-se gota a gota 5 mL de ácido nítrico fumegante a 0°C. A mistura resultante permaneceu sob agitação a 0°C por 5 minutos e depois a reação foi mantida sob agitação e refluxo a 110°C por 45 minutos. Após esse tempo a mistura reacional foi resfriada e adicionou-se lentamente água gelada. Houve formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com água gelada. O produto obtido (10) foi cristalizado com uma mistura de acetato de etila/diclorometano/hexano (1:1:1) para fornecer de 2,54 g de um sólido branco com 65% de rendimento e faixa de fusão =140°C-142°C (PM = 366,38; C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>).

Para obtenção do intermediário 12, solubilizou-se 1 g de bisarisulfonilfuroxano (10) (5,53 mmol) em 20 mL de THF, em um balão de 50 mL. Em seguida adicionou-se 0,83 mL de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU) e a reação foi mantida a sobre agitação por 15 minutos e então foi adicionado 0,67 g de salicilaldeído (5,53 mmol) e reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 1,5 horas. O acompanhamento da reação foi realizado utilizando cromatografia em camada delgada utilizando como fase móvel: 1:1 de DCM e hexano.

O isolamento dos produtos foi realizado adicionando cerca de 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio e extração da fase aquosa com acetato de etila (4 x 30 mL). A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: Fase móvel: 50% DCM: 50% hexano). O intermediário 12 foi obtido com rendimento de 30% (PM = 285,04; C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S).

Caracterização estrutural:

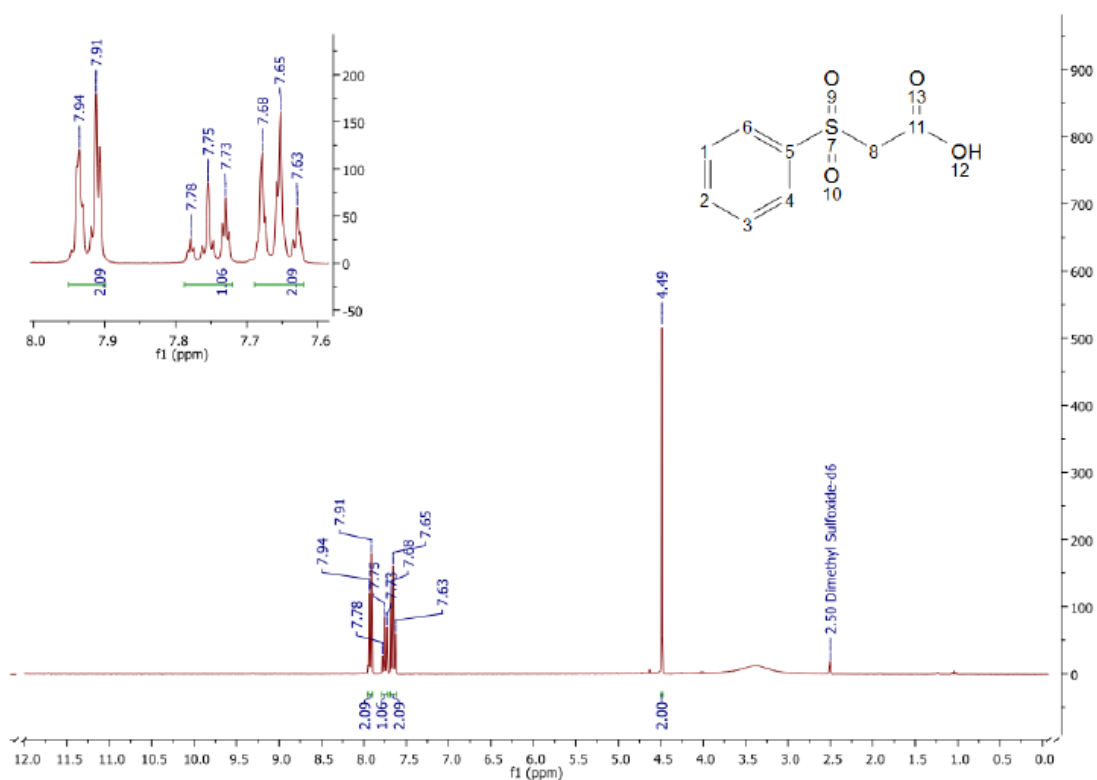
ácido fenilsulfonilacético (10)



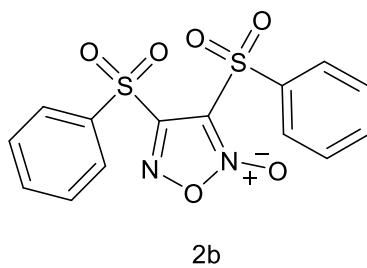
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz; DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.92 (2H; m), 7.75 (1H; m), 7.65 (2H; m), 4.49(1H; s) ppm.

**Figura 35: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido sulfonilfeniltioacético (9) (400 MHz; DMSO $_d_6$ ).**





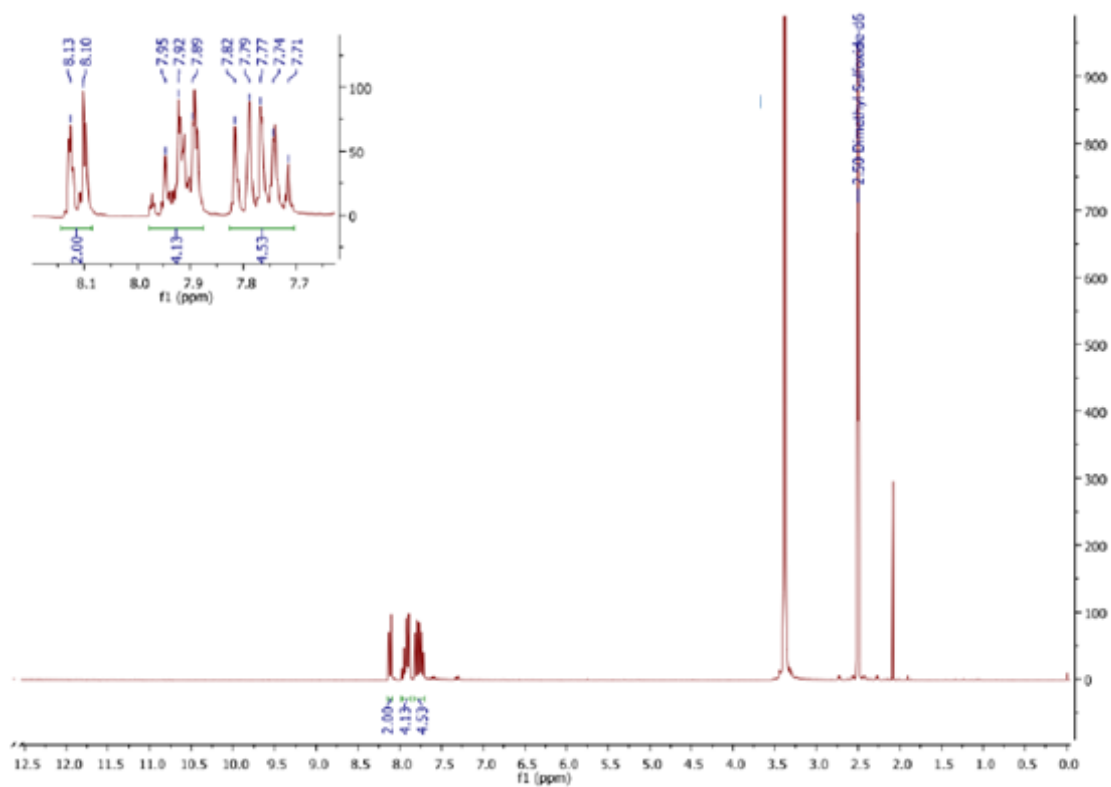
Fonte: dados da pesquisa



2b

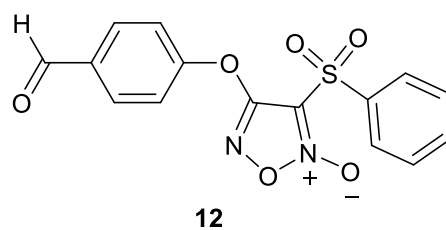
RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$ : 8.11 (4H; m), 7.92 (2H; m), 7.77 (4H; m) ppm.

Figura 36: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 3,4-bis(phenylsulfonyl)furoxano (2b) (300 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ).



Fonte: dados da pesquisa

4-(4-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol- 2-óxido (**12**)

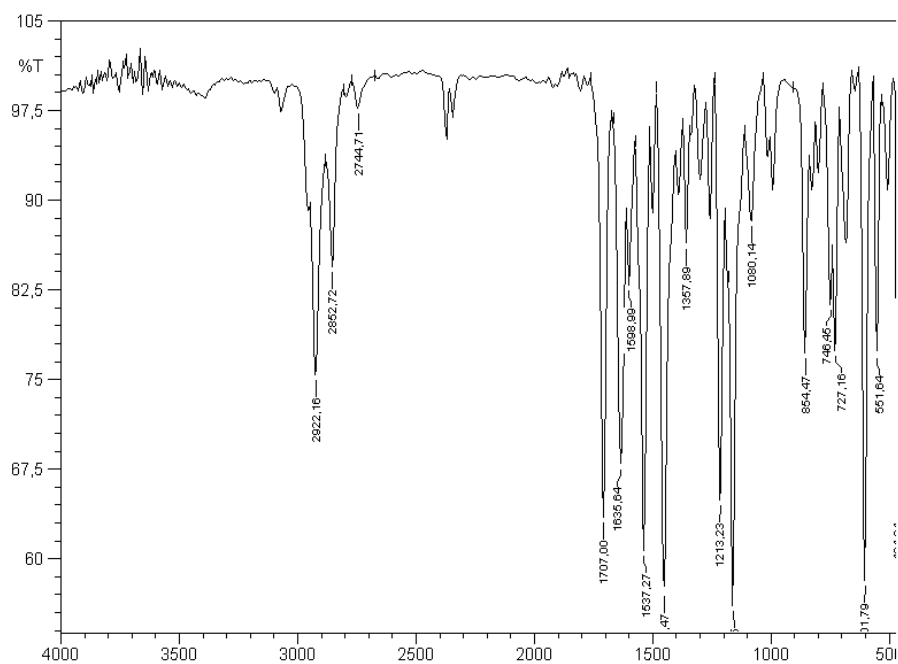


**IV (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ :** 2922 e 2859 ( $\text{CH}_{\text{aldeído}}$ ), 1707 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{aldeído}}$ ), 3130 (C-H), 1623 (N-O), 1420 (C-H), 1395 ( $\text{s N-H}$ )

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz; DMSO-*d*6):**  $\delta$ : 10.03 (1H; s), 8.03 (4H; m), 7.92 (1H; t), 7.75 (2H; t), 7.66 (2H; d) ppm.

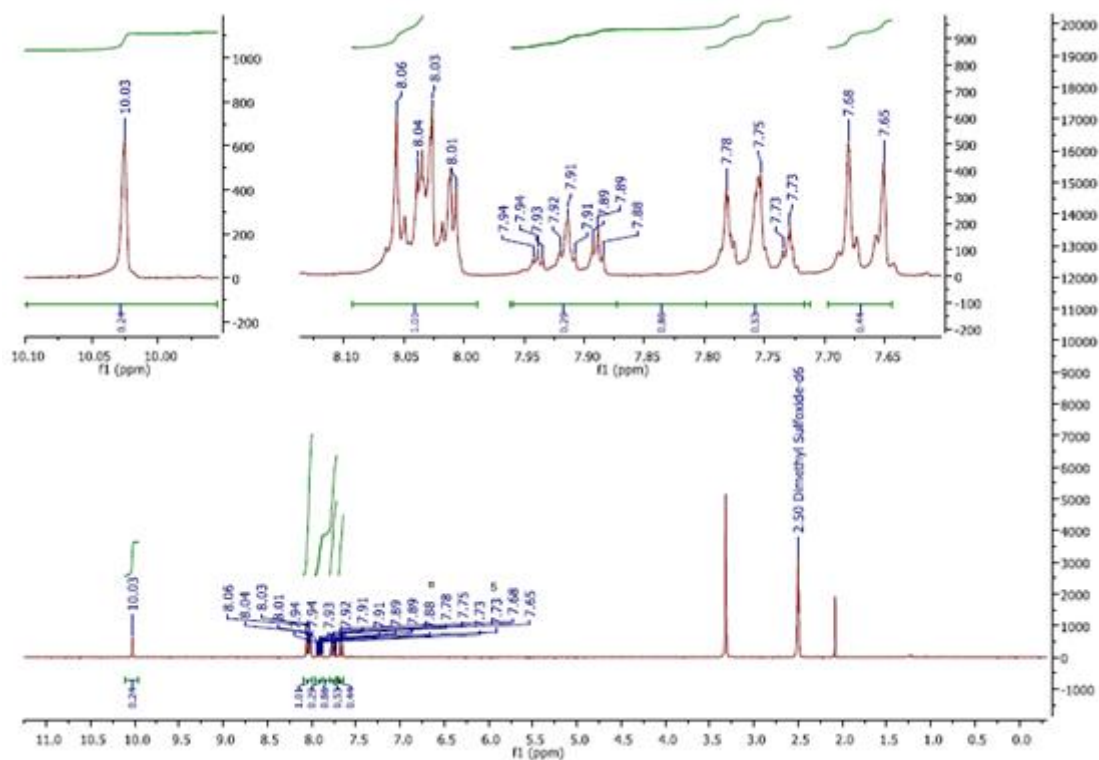
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz; DMSO-*d*6):**  $\delta$ : 191.7, 157.4, 157.12, 136.2; 136.7; 134.1; 131.7; 130.0; 128,56; 119,8; 114.4 ppm.

**Figura 37: Espectro na região do infravermelho do composto 12 ( pastilha de KBr)**



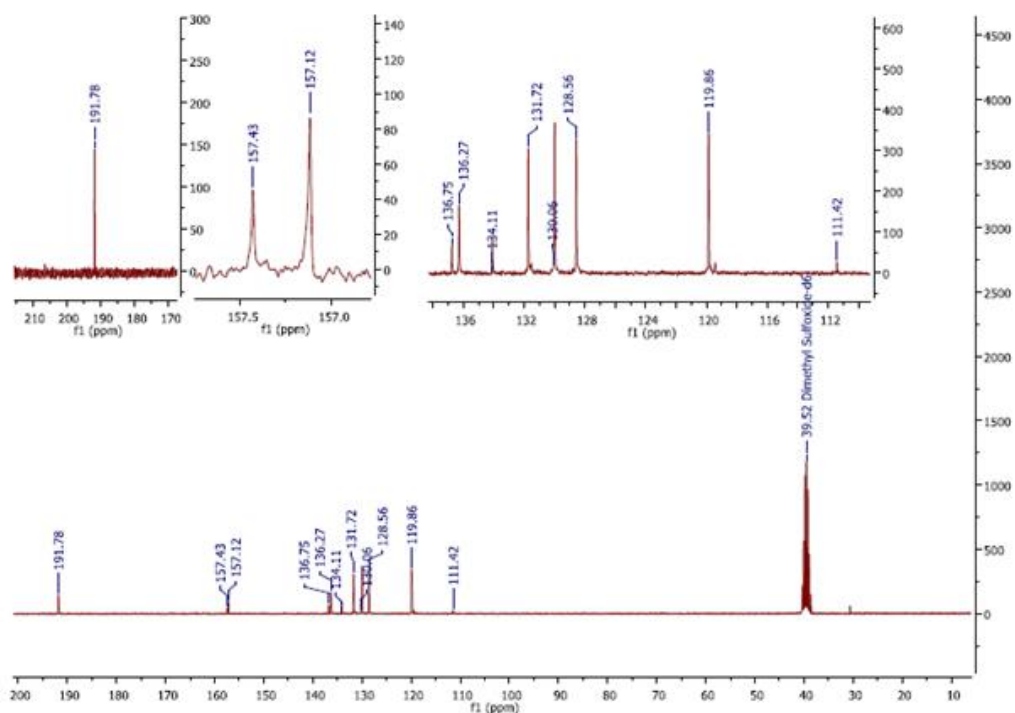
Fonte: dados da pesquisa

Figura 38: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 12 (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



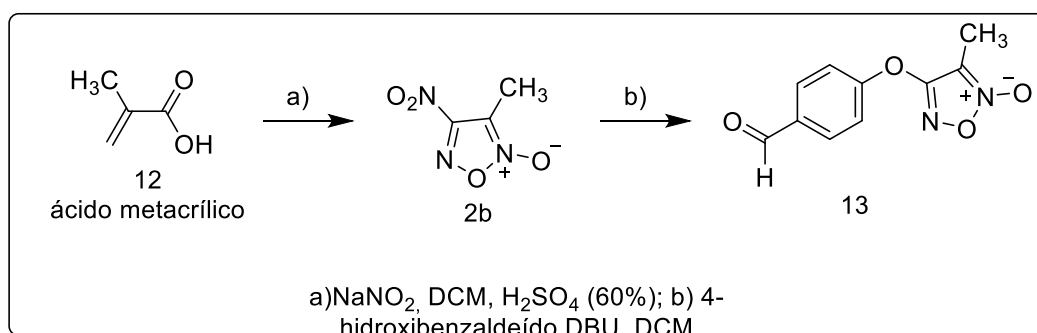
Fonte: dados da pesquisa

Figura 39: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do intermediário 12 (75 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).



Fonte: dados da pesquisa

## 1.2 Síntese do derivado furoxânico 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (2b) e 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (13)



### *Procedimento experimental*

Na primeira etapa o ácido metacrílico (3,3 mL, 0,039mol) foi solubilizado em 35 mL de 1,2-dicloroetano, e posteriormente foi adicionado lentamente cerca 11,6 mL de ácido sulfúrico (60%). A mistura reacional foi agitada vigorosamente e aquecida a 50°C. Ao atingir essa temperatura, foi adicionado 9,3g (0,13 mol) de nitrito de sódio, vagarosamente e em pequenas porções. Observou-se a formação de um vapor castanho, caracterizado pela liberação de dióxido de nitrogênio. Em seguida, a reação foi mantida em aquecimento e agitação por uma hora. Após o término da reação a mesma foi resfriada à temperatura ambiente e então foram adicionados 40 mL de água, seguida da separação das fases. A fase orgânica foi lavada com água (2x 40 mL). Posteriormente foi adicionado sulfato de sódio anidro à fase orgânica para secagem da água. Esta fase foi então filtrada e o solvente evaporado à pressão reduzida. A purificação foi realizada por recristalização utilizando-se uma mistura de etanol-água (60:40, v/v) à quente. Foi realizada uma filtração a vácuo para isolamento dos cristais obtidos. O produto 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido foi obtido como um sólido de coloração branca, com rendimento de 35% e faixa de fusão entre 59-64°C.

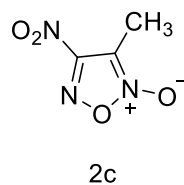
Para obtenção do intermediário **13**, solubilizou-se 1 g 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**2c**) (5,53 mmol) em 20 mL de diclorometano, em um balão de 50 mL. Em seguida adicionou-se 0,83 mL de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU) e a reação foi mantida a sobre agitação por 15 minutos. Após foi adicionado 0,67 g de 4-hidroxibenzaldeído (5,53 mmol) e reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente durante duas horas. O acompanhamento da reação foi realizado utilizando cromatografia em camada delgada utilizando como fase móvel 1:1 DCM:éter de petróleo.

O isolamento do produto foi realizado adicionando cerca de 20 mL de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 x 30 mL). A purificação foi realizada por coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel diclorometano:éter de petróleo (80:20, v/v) em modo isocrático cromatográfica (fase estacionária: sílica flash; fase móvel: 50% diclorometano: 50% éter de petróleo). O

intermediário **13** foi obtido com rendimento de 30% e faixa de fusão entre 172-175°C.

### Caracterização estrutural

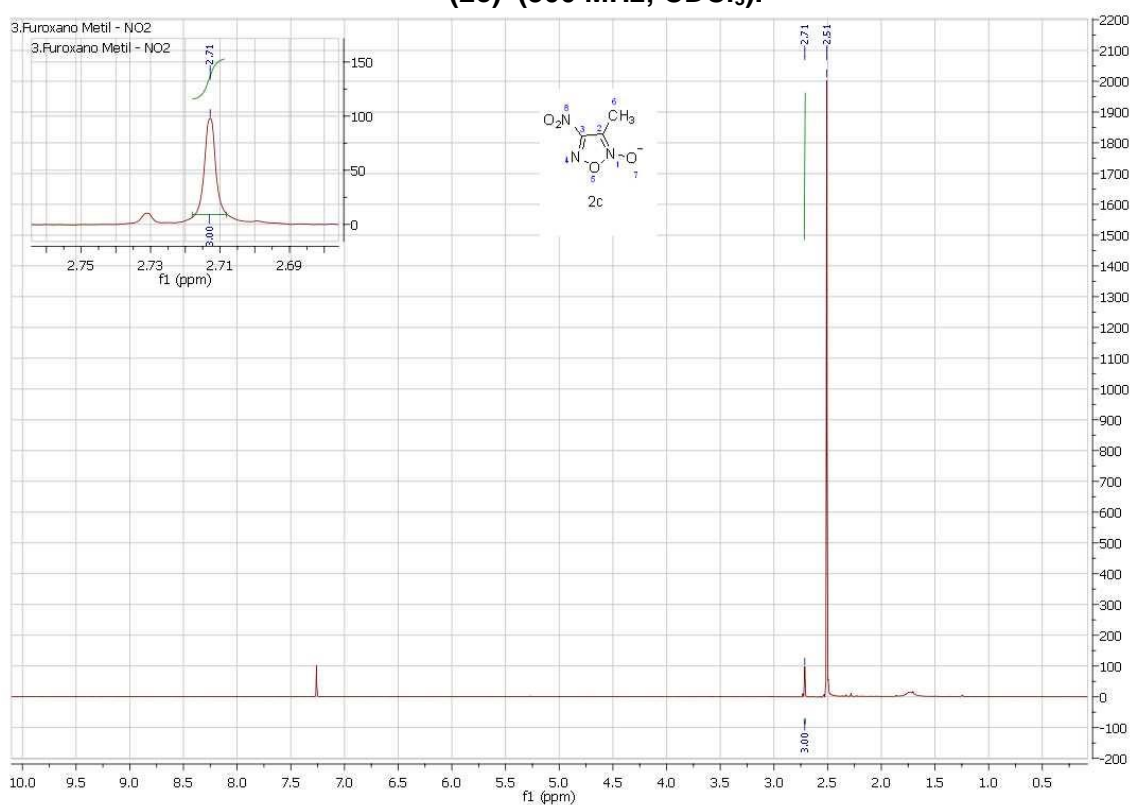
#### 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol- 2-oxido (**2c**)



$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.71 (s, 3H) ppm.

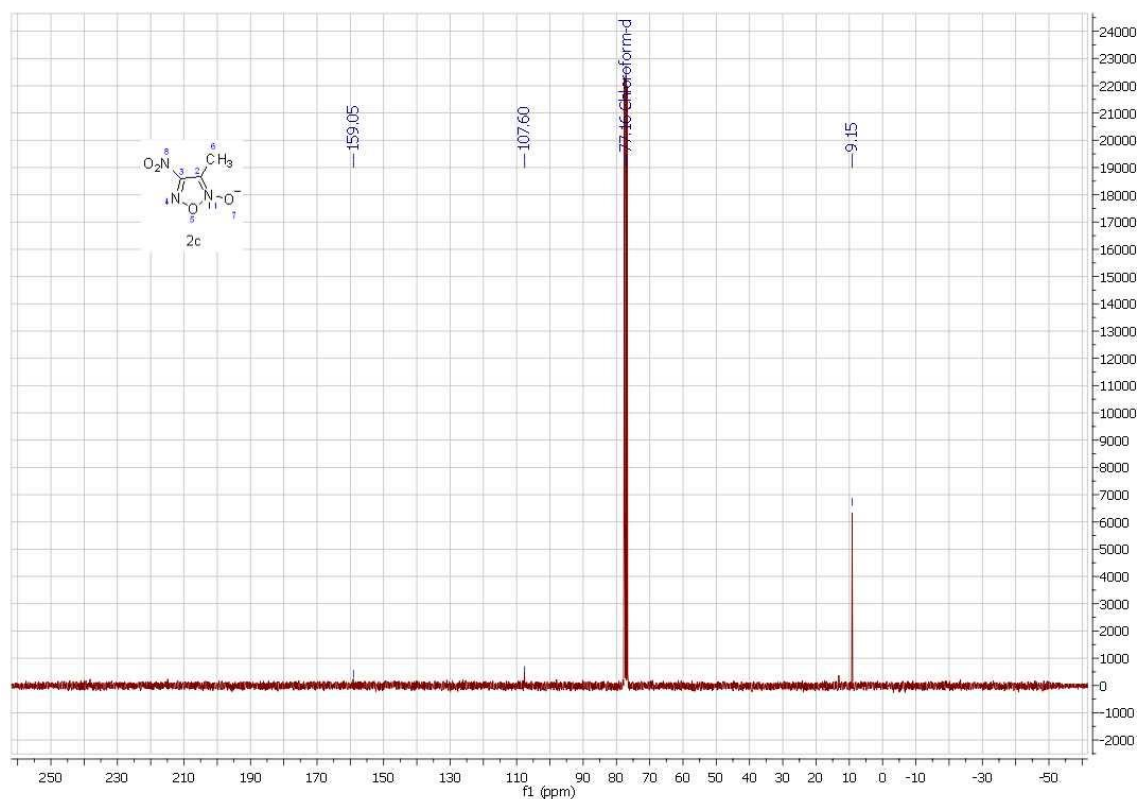
$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 159,05 (C3); 107,60 (C2); 9,15 (C6).

Figura 40. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol- 2-oxido (**2c**) (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



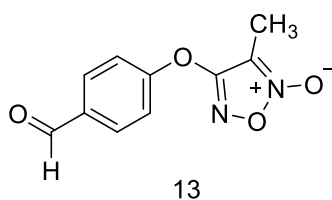
Fonte: dados da pesquisa

Figura 41: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol- 2-*N*-óxido (2c) (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ).



Fonte: dados da pesquisa

#### 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-*N*-óxido (13)

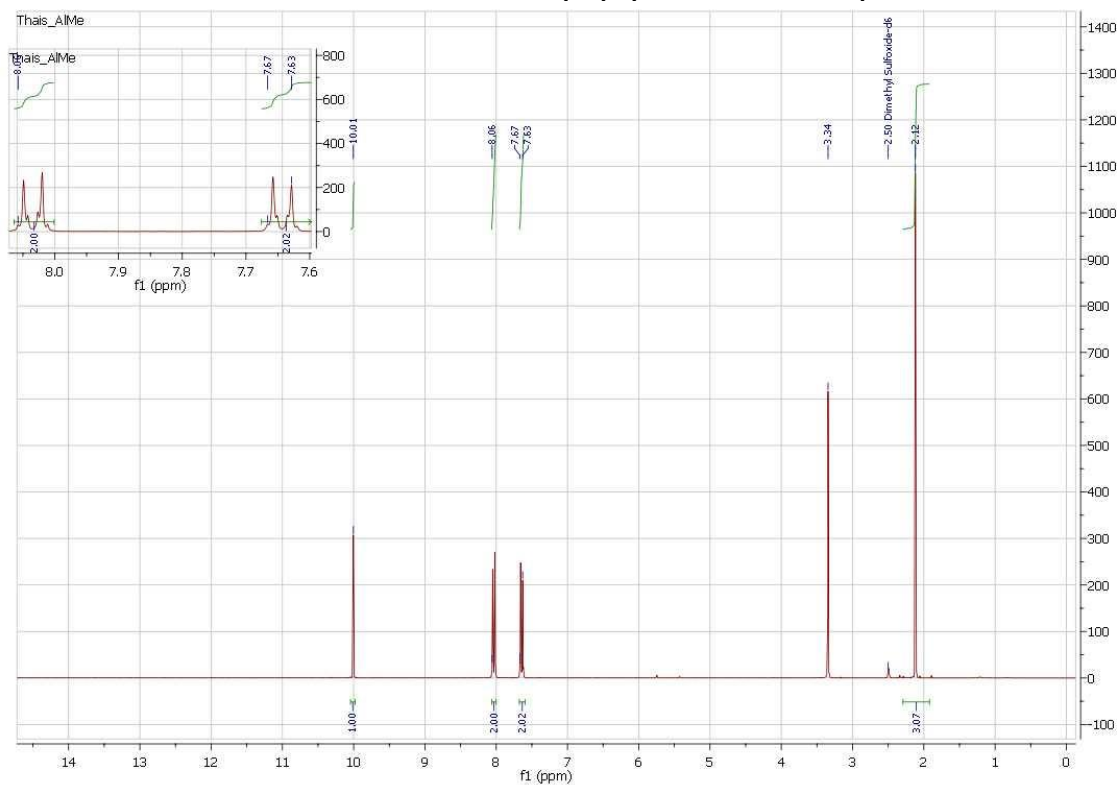


**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$ : 10,01 (1H; s;  $\text{H}_{17}$ ); 8,04 (2H; d;  $\text{H}_{11}$ ); 7,65 (2H; d;  $\text{H}_{10}$ ); 2,12 (3H; s;  $\text{H}_6$ ) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ):**  $\delta$ : 191,8; 162,3; 157,1; 133,8; 131,8; 119,9; 107,7; 6,7 ppm.

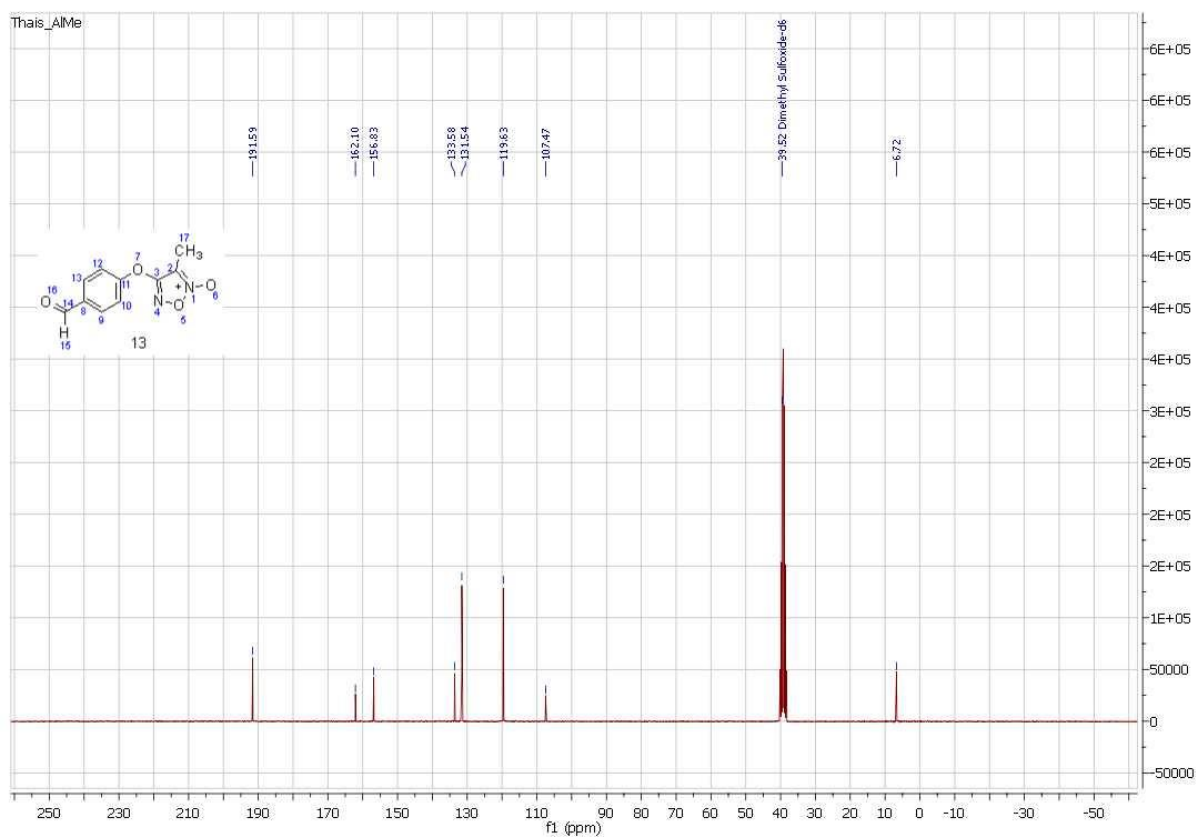


Figura 42: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-*N*-óxido (13) (300 MHz; DMSO).



Fonte: dados da pesquisa

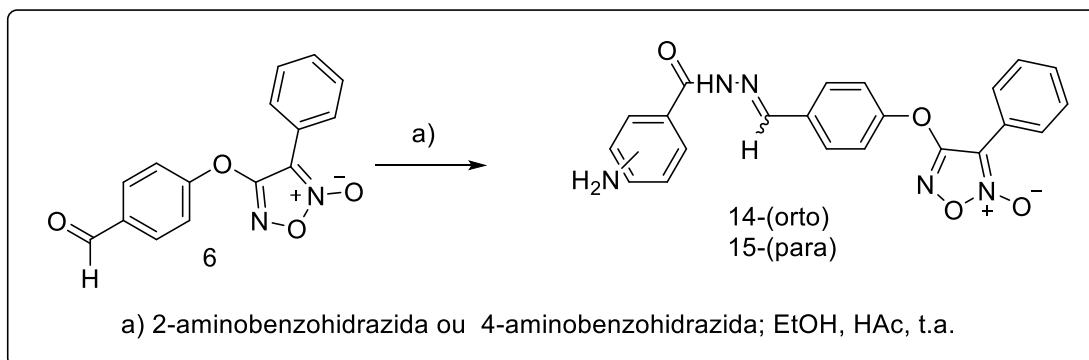
Figura 43: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol- 2-*N*-óxido (13) (75MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).



Fonte: dados da pesquisa

## 2 SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS N-ACILHIDRAZÔNICOS

### 2.1 Sínteses dos intermediários N-acilhidrazônicos derivados do furoxano fenilado (14-15)



#### *Procedimento experimental*

A reação de formação dos intermediários (**14-15**) foi realizada em metanol com catálise ácida. Para tanto, foram adicionados em balão de fundo redondo de 50 mL 4-(4-formilfenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**6**) (0,423 g; 1,5mmol), seguido de 3 gotas de ácido acético glacial e de 2-aminobenzohidrazida ou 4-aminobenzohidrazida (0,504 g; 1,5 mmol) em 15 mL de metanol. A mistura reacional foi colocada sob agitação constante à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 8 horas.

O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel: 1:1 hexano:acetato de etila. As placas cromatográficas também foram reveladas com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (Revelador de Brady) que cora em amarelo os compostos contendo carbonila de aldeído. Os resultados mostraram que essa função não estava presente nos produtos desejados (**14-15**), sugerindo a formação destes compostos.

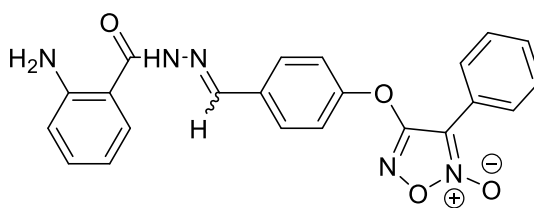
Ao término da reação, realizou-se a filtração sob pressão reduzida e lavagem do produto obtido com 10 mL de água fria e 15 mL de metanol gelado, para a remoção de reagente residual.

Foi necessária uma etapa adicional de purificação para o intermediário **15**, realizada por cromatografia de coluna executada no equipamento Isolera Biotage, utilizando-se coluna de sílica Sphere 20 $\mu$ m (25g), com fluxo de 25 ml/min e fase móvel 50% acetato de etila / 50% hexano.

A hidrazona em orientação em orientação orto (**14**), 4-(4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazono)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido), caracteriza-se por ser um sólido branco de PM = 415,141g/mol, faixa de fusão entre 201-203°C, fator de retenção ( $R_f = 0,27$ ) e rendimento de 55%. Já a hidrazona (**15**), 4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido) de PM = 415,141g/mol, apresentou faixa de fusão entre 217-219°C, fator de retenção ( $R_f = 0,30$ ) e rendimento de 63%.

#### Caracterização estrutural

4-(4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (**14**)

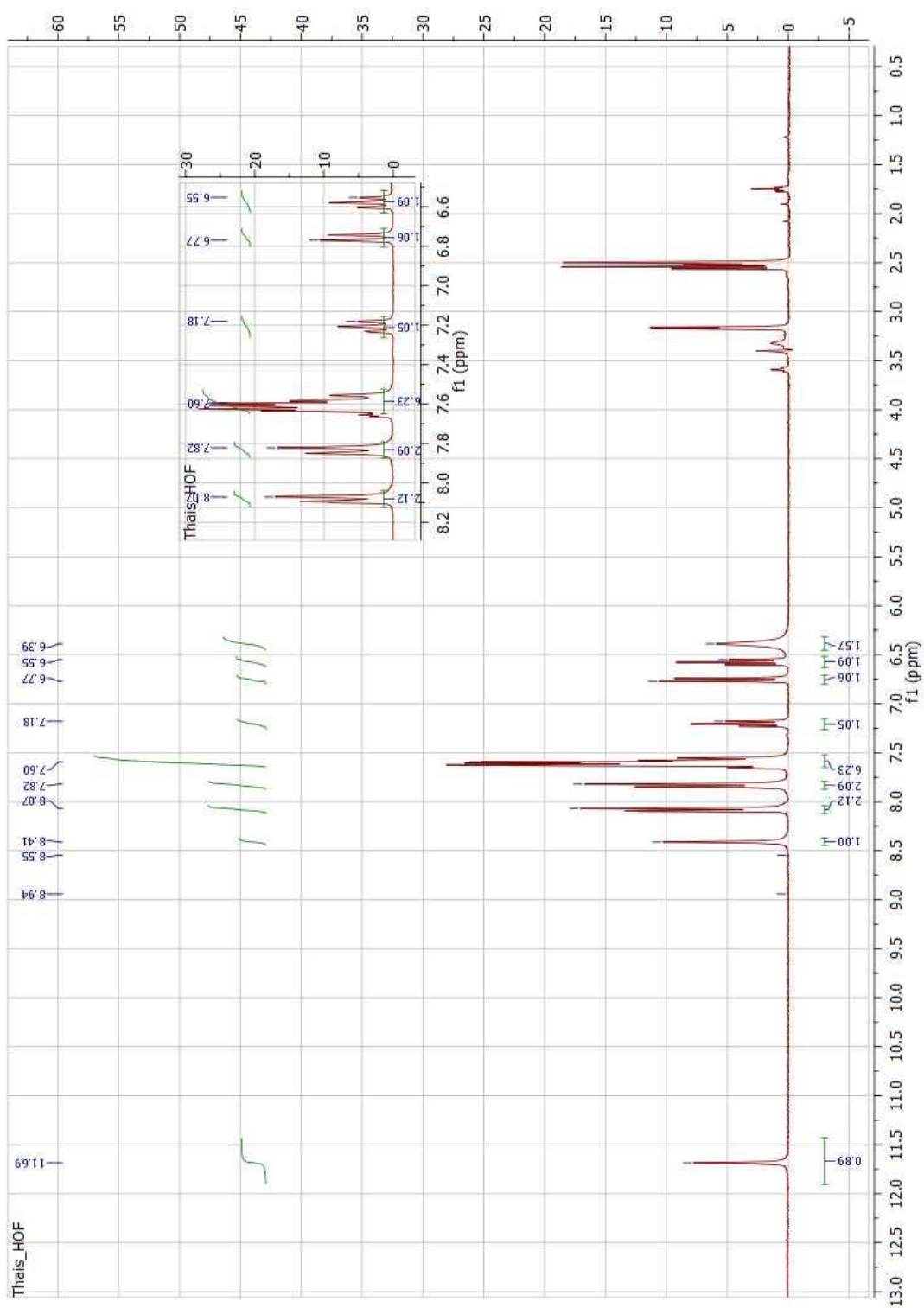


14

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz; DMSO):** 11,69 (s, 1H); 8,41 (s, 1H,); 8,07 (dd, 2H); 7,8 (dd, 2H,  $J=7,8\text{Hz}$ ); 7,55-7,65 (m, 6H); 7,18 (t, 1H,  $J= 8,0\text{Hz}$  e  $J=1,7\text{Hz}$  ); 6,77 (dd, 2H,  $J= 7,0\text{Hz}$ ); 6,55 (ddd, 1H,  $J= 7,0\text{Hz}$ ); 6,39 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ) ppm.

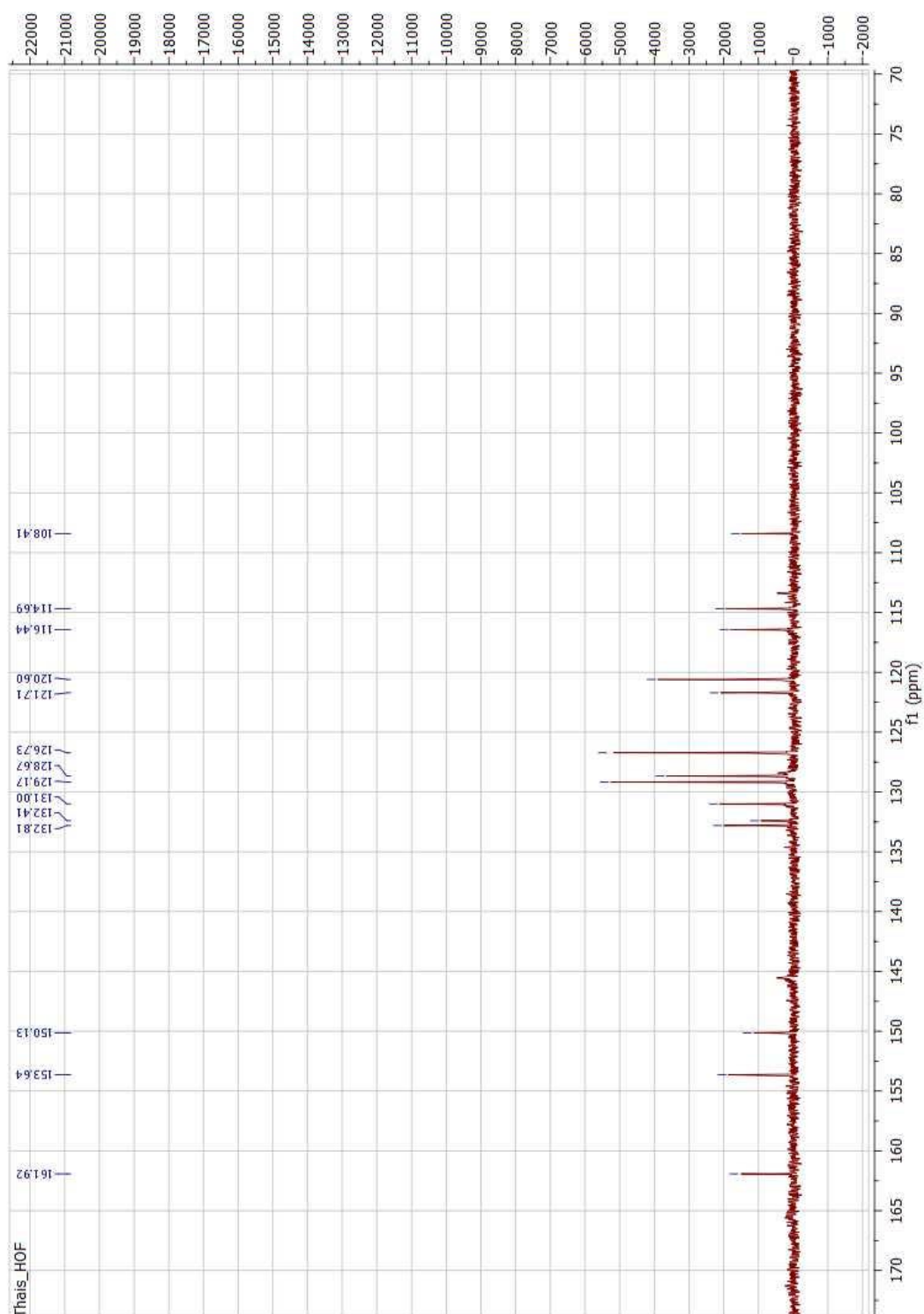
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO):**  $\delta$  161,92; 153,64; 150,13; 132,95; 132,85; 131,00; 129,17; 128,67 ; 126,73; 121,71; 120,60; 116,44, 114,69, 108,41.

Figura 44: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 4-(4-((2-(2 aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (14) (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



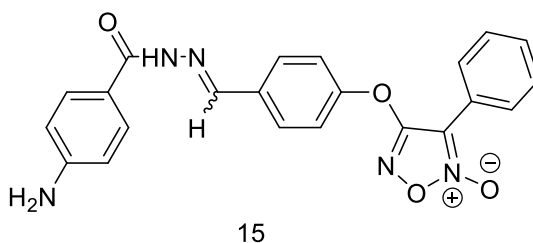
Fonte: dados da pesquisa

Figura 45: Espectro de RMN do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (14) (300 MHz; DMSO *d*<sub>6</sub>).



Fonte: dados da pesquisa

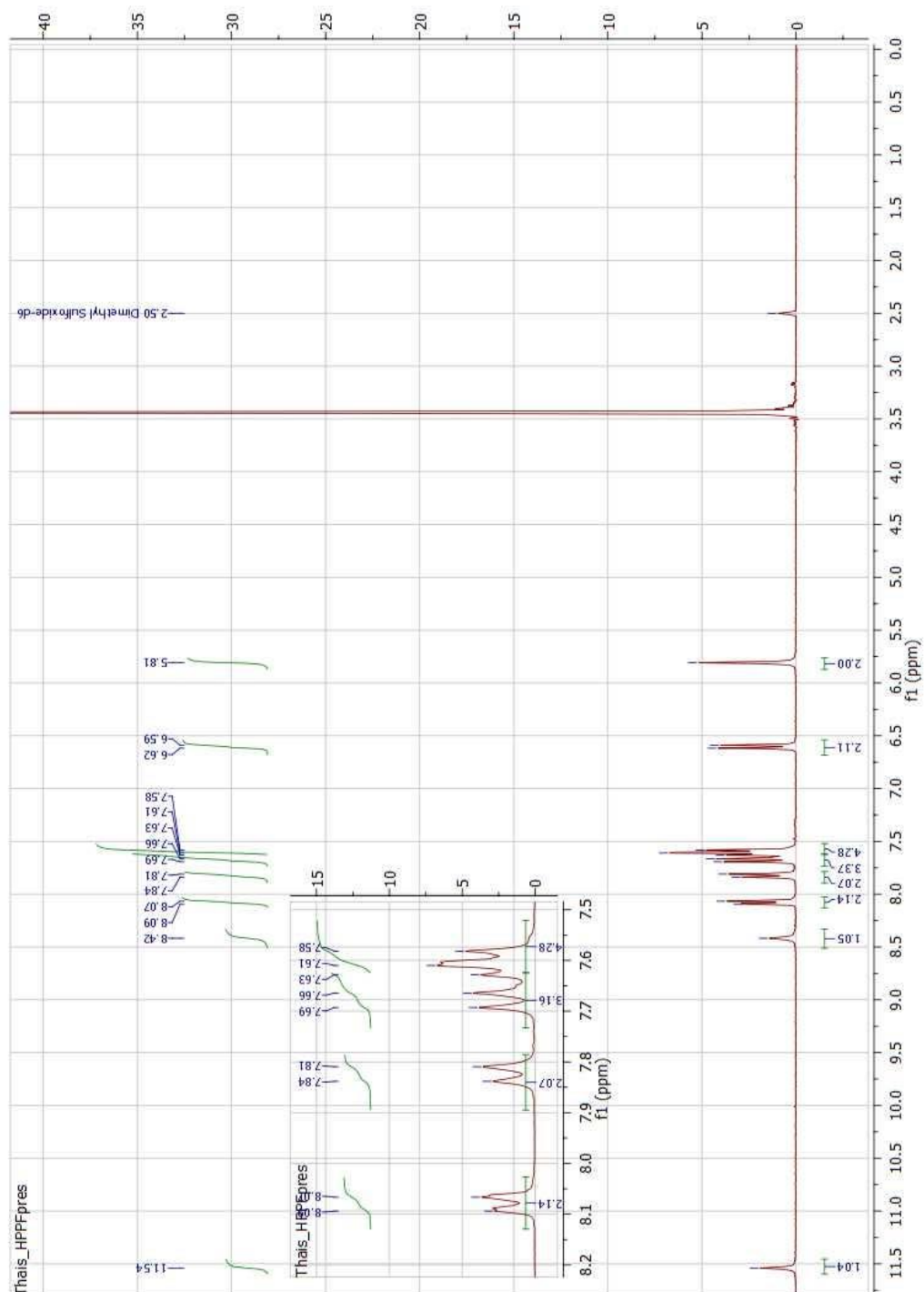
4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido  
(15)



**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO<sub>d6</sub>):** 11,54 (s, 1H); 8,42 (s, 1H), 8,08 (dd, *J* = 8.2 Hz, 2H); 7,82 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H); 7,58 – 7,63 (m, 3H); 7,60 (m, 4H); 6,60 (dd, *J* = 7.6 Hz, 2H); 5,81 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO<sub>d6</sub>):** 161,94; 153,51; 152,42, 133,03, 131,00; 129,17; 128,55; 126,73; 121,71; 120,58; 119,43; 112,69; 108,40.

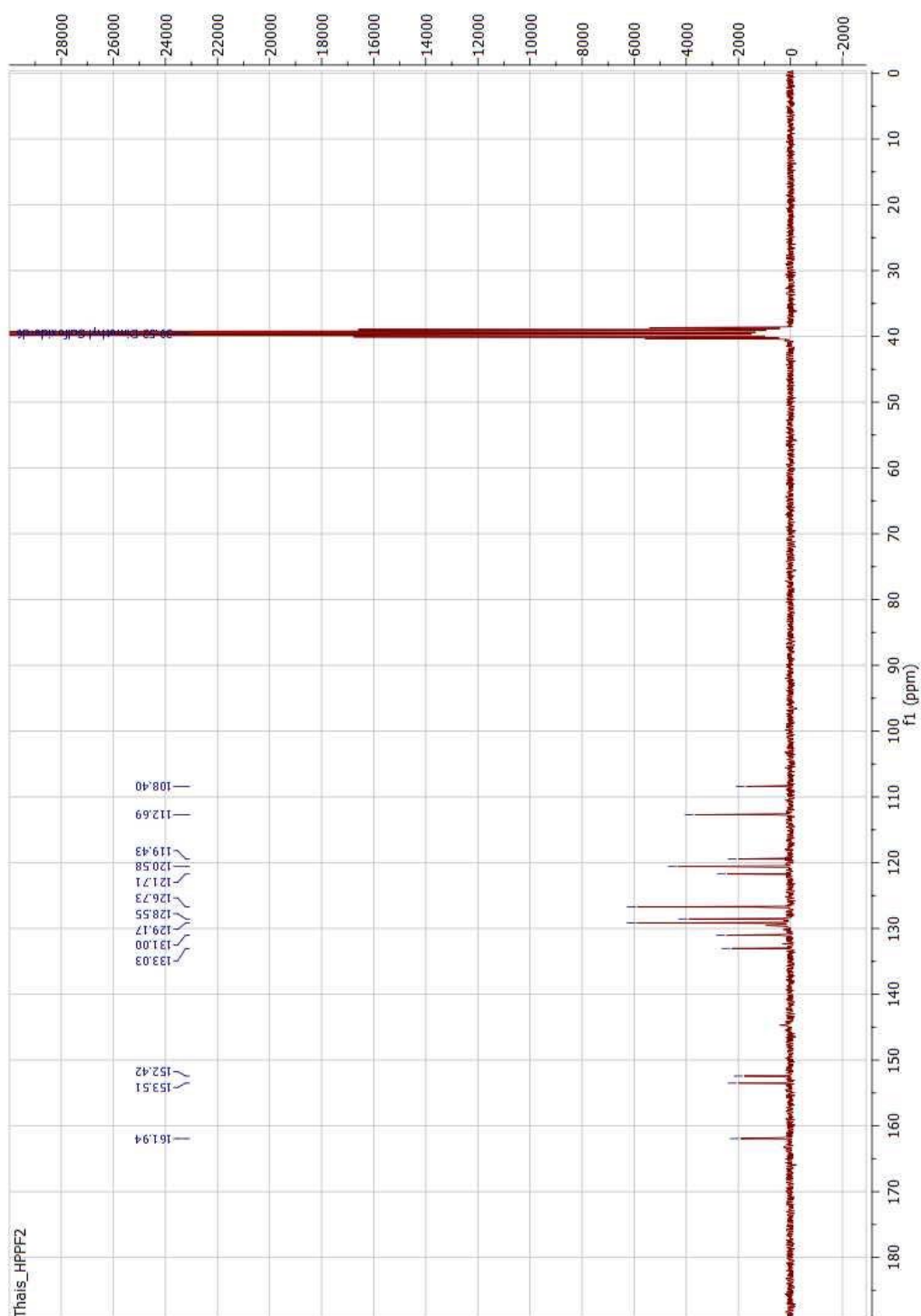
Figura 46: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (15) (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )



Fonte: dados da pesquisa

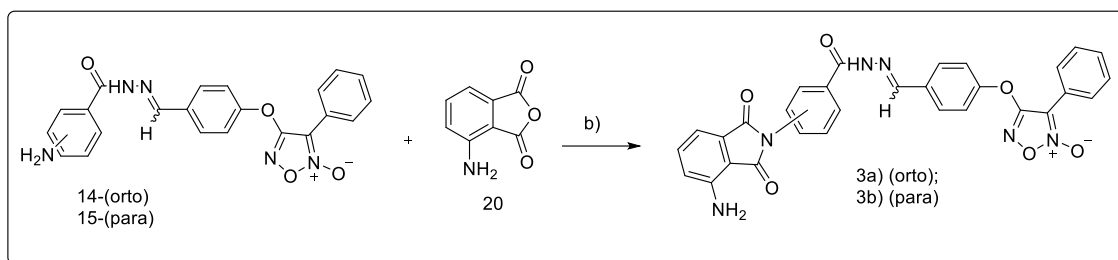


Figura 47: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (15) (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )



Fonte: dados da pesquisa

## 2.2 Sínteses dos compostos finais (3a-b)



### Procedimento experimental

A reação de formação do composto final (**3a**) foi realizada em um balão de 50 mL, onde foram adicionados 0,2 g (0,001 mol) de anidrido 3-aminoftálico (**20**) e 0,287 g (0,0015 mol) de EDC (agente acoplante), seguidos de 0,648 g; (0,002 mol) do intermediário 4-((2-(2-aminobenzoyl)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**14**) e 0,05 g de DMAP, como agente catalisador em 20,0 mL de dimetilformamida anidra. O sistema foi mantido sob agitação constante e à temperatura ambiente por 48 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção produto final (**3b**), utilizando-se 0,648 g (0,001 mol) do intermediário 4-((2-(4-aminobenzoyl)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**15**). Ao término da reação, foi adicionado ao meio cerca de 10 mL de água destilada gelada e deixada em banho de gelo para que ocorra a precipitação. O isolamento da mistura reacional foi feito por filtração simples, lavando-se o precipitado com água gelada e deixado secar a temperatura ambiente.

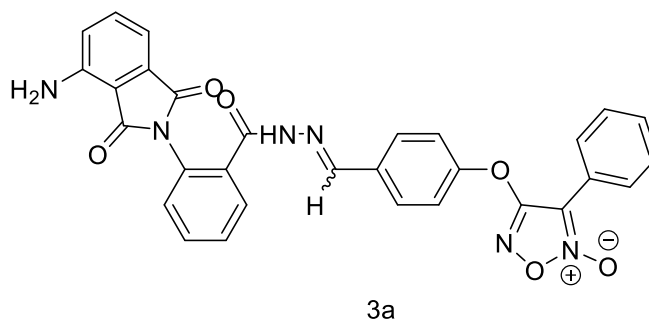
O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel 1:1 hexano:acetato de etila. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna, no equipamento Isolera (Biotage®) utilizando coluna de sílica gel Sphere 20 µm, como fase estacionária e gradiente isocrático com fase móvel 45%acetato de etila a 55% éter de petróleo.

O composto final híbrido obtido (**3a**), foi caracterizado como sólido amarelo, com faixa de fusão entre 250-252° C, PM = 559,52 g/mol, fator de retenção ( $R_f = 0,10$ ) e rendimento de 32%. Já o composto final (**3b**), foi caracterizado por um sólido

amarelo, com faixa de fusão entre 205-208°C, PM = 559,52 g/mol, fator de retenção (R<sub>f</sub> = 0,32) e rendimento de 43 %.

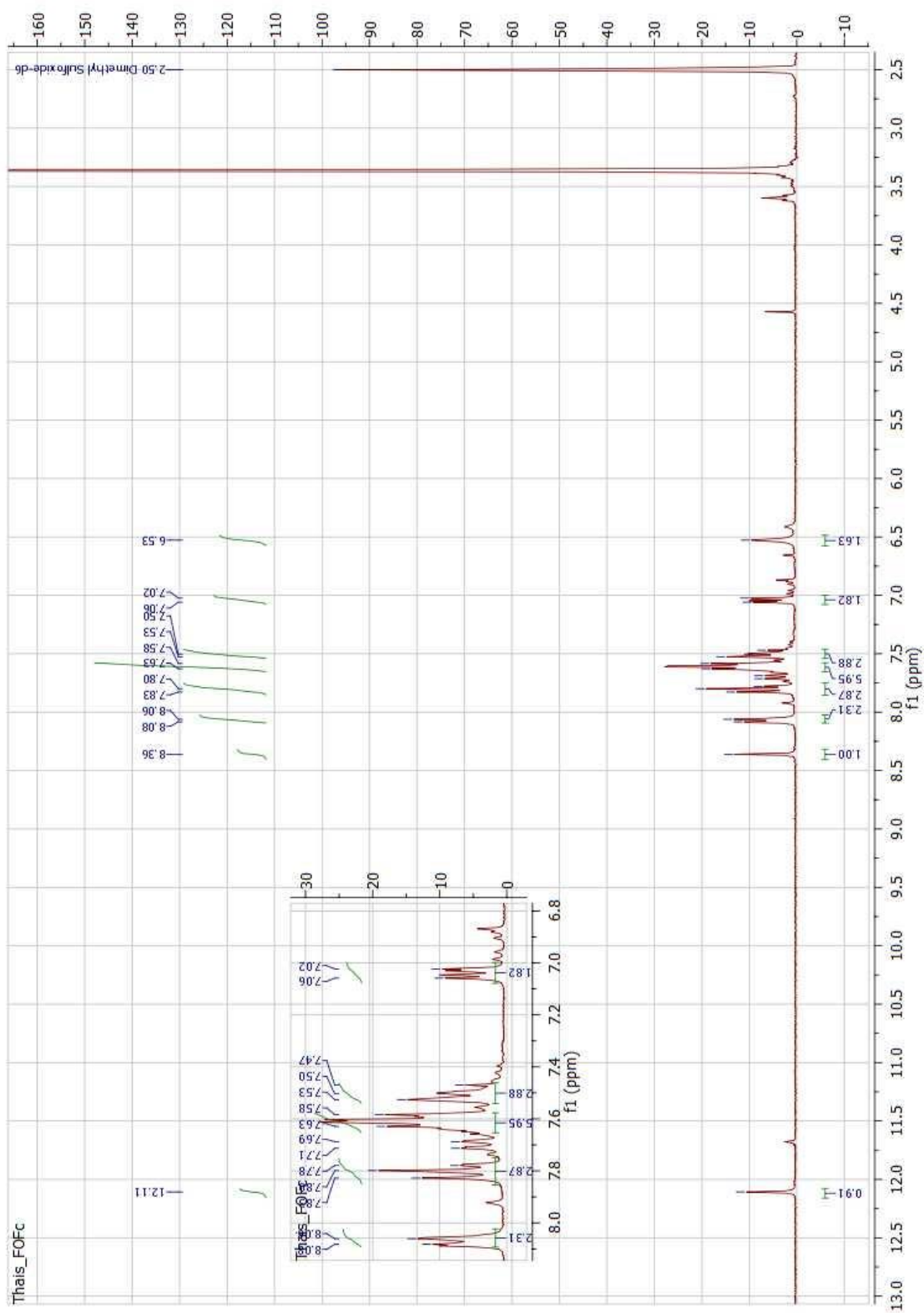
*Caracterização estrutural*

4-(4-((2-(2-(4-amino-1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**3a**)

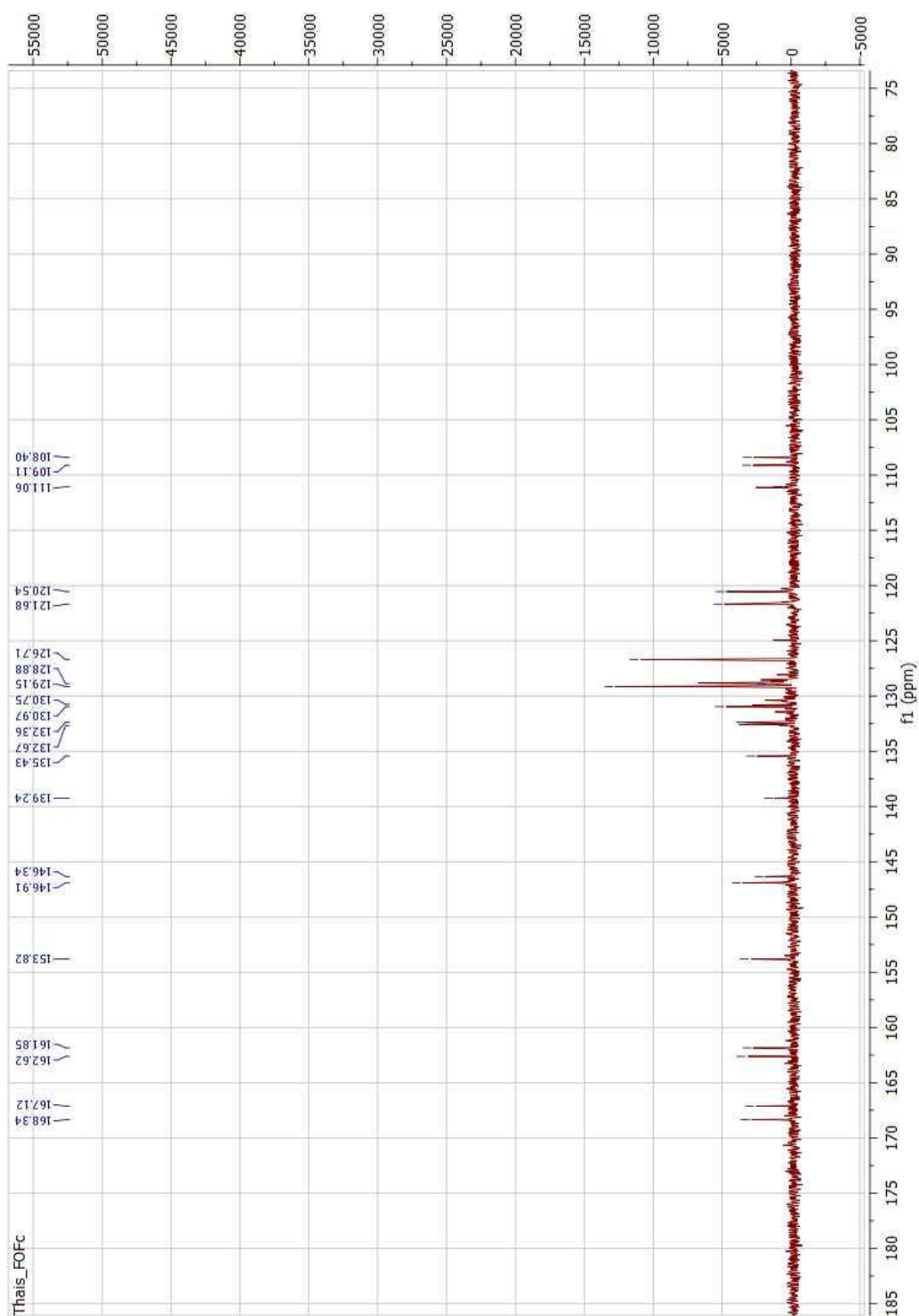


**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; DMSO<sub>d6</sub>) ppm:** 12,11 (s, 1H); 8,36 (s, 1H); 8,07 (dd, *J* = 8,0 Hz, 2H); 7,78- 7,83 (m, 3H); 7,58-7,56 (m, 6H), 7,54 – 7,47 (m, 3H), 7,02 -7,06 (m, 2H); 6,53 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO<sub>d6</sub>)** 168,34; 167,12; 162,62; 161,85; 153,82; 146,91; 146,34; 135,43; 132,67; 132,36; 130,97; 129,15, 128,88; 126,71; 121,68; 120,54; 111,06; 109,11; 108,40

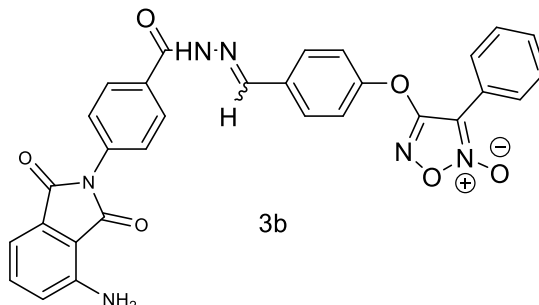
Figura 48: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final 3a (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa

Figura 49: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final 3a (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa

4-(4-((2-(4-(4-amino-1,3-dioxisoindolin-2-il)benzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**3b**)



**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; DMSO<sub>d6</sub>) ppm:** 12.04 (s, 3H), 8.48 (s, 5H), 8.04 (d, *J* = 19.7 Hz, 23H), 7.90 (dd, 10H), 7.52 (d, *J* = 7,5 Hz, 8H), 7.08 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.06 (dd *J* = 7,0 Hz, 1H), 6.58 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO<sub>d6</sub>) δ** 168.54, 167.33, 163.29, 162.30, 154.27, 147.46, 147.37, 136.14, 132.45, 131.45, 129.59, 129.37, 128.65, 127.33, 127.15, 122.16, 122.03, 121.05, 111.73, 109.06, 108.84, 40.16, 40.02, 39.88, 39.74, 39.60, 39.46, 39.32, 30.85..

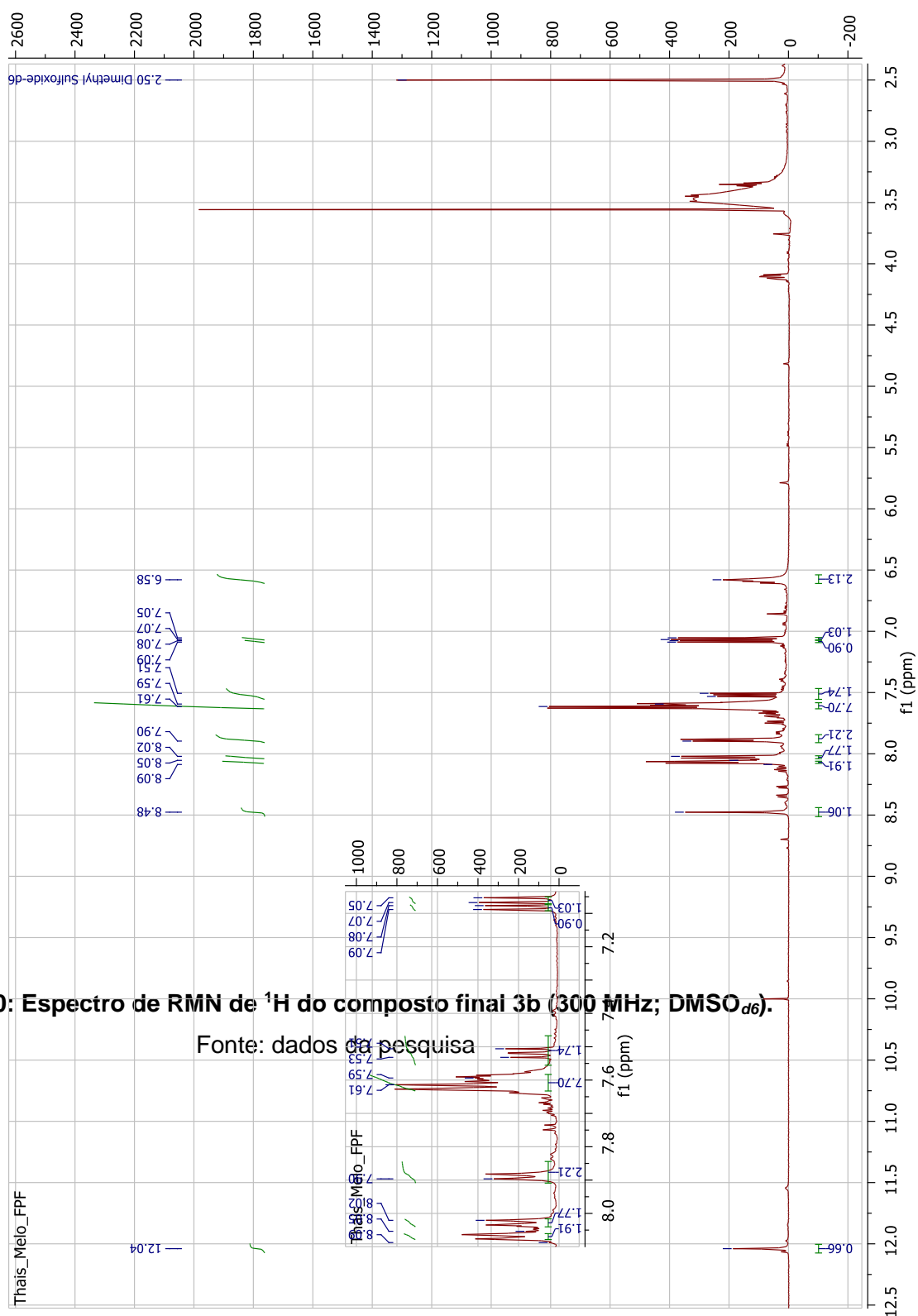


Figura 50: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final 3b (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa

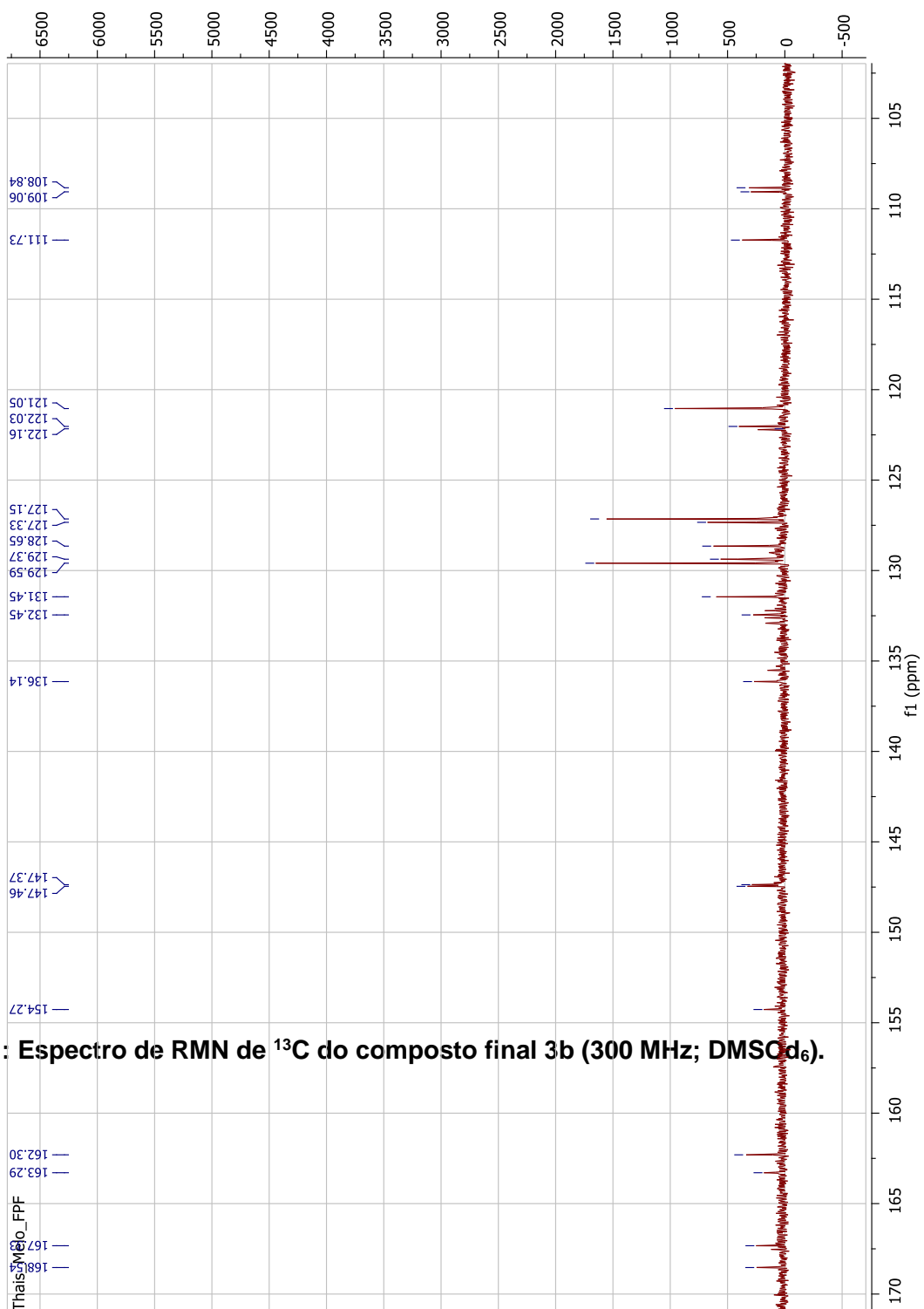
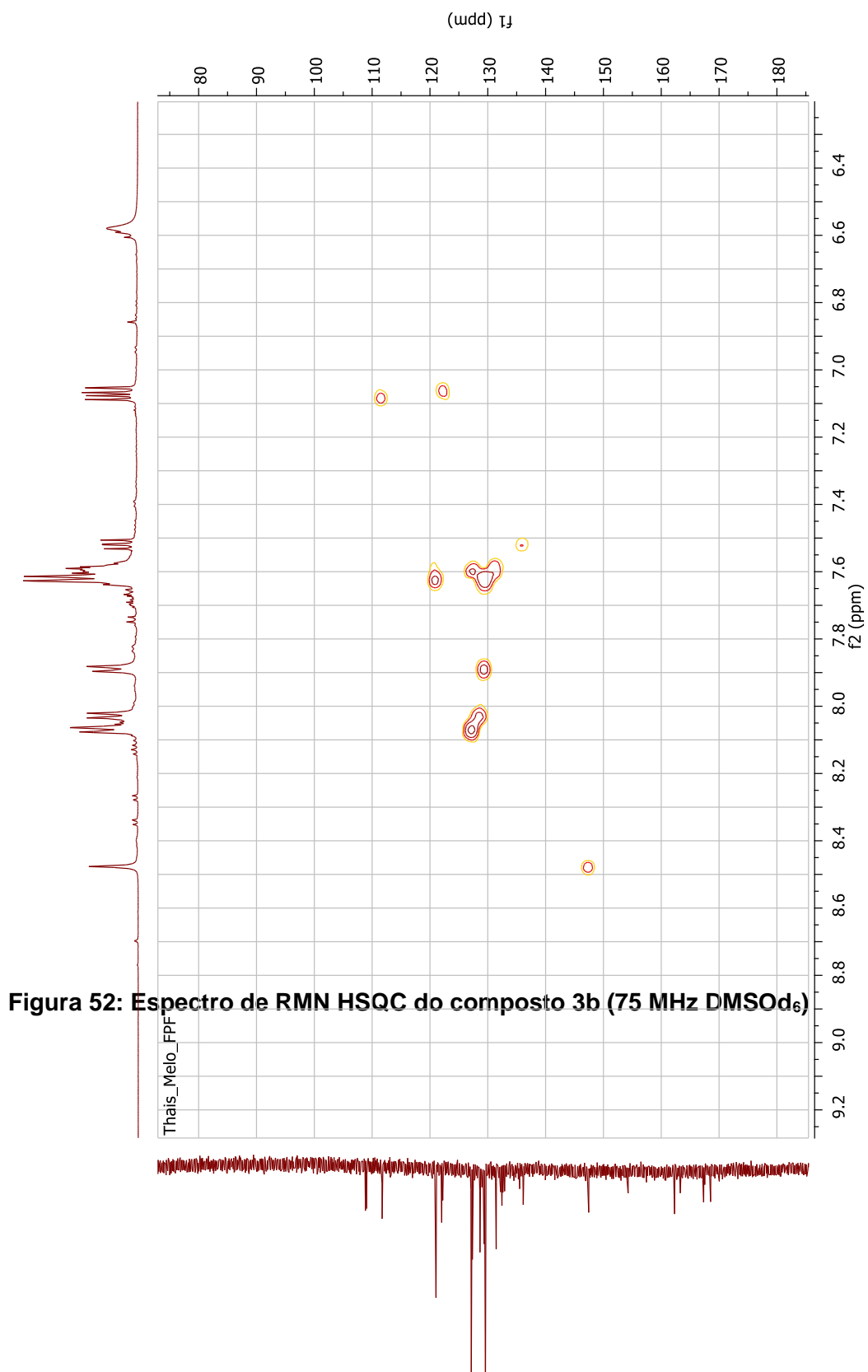
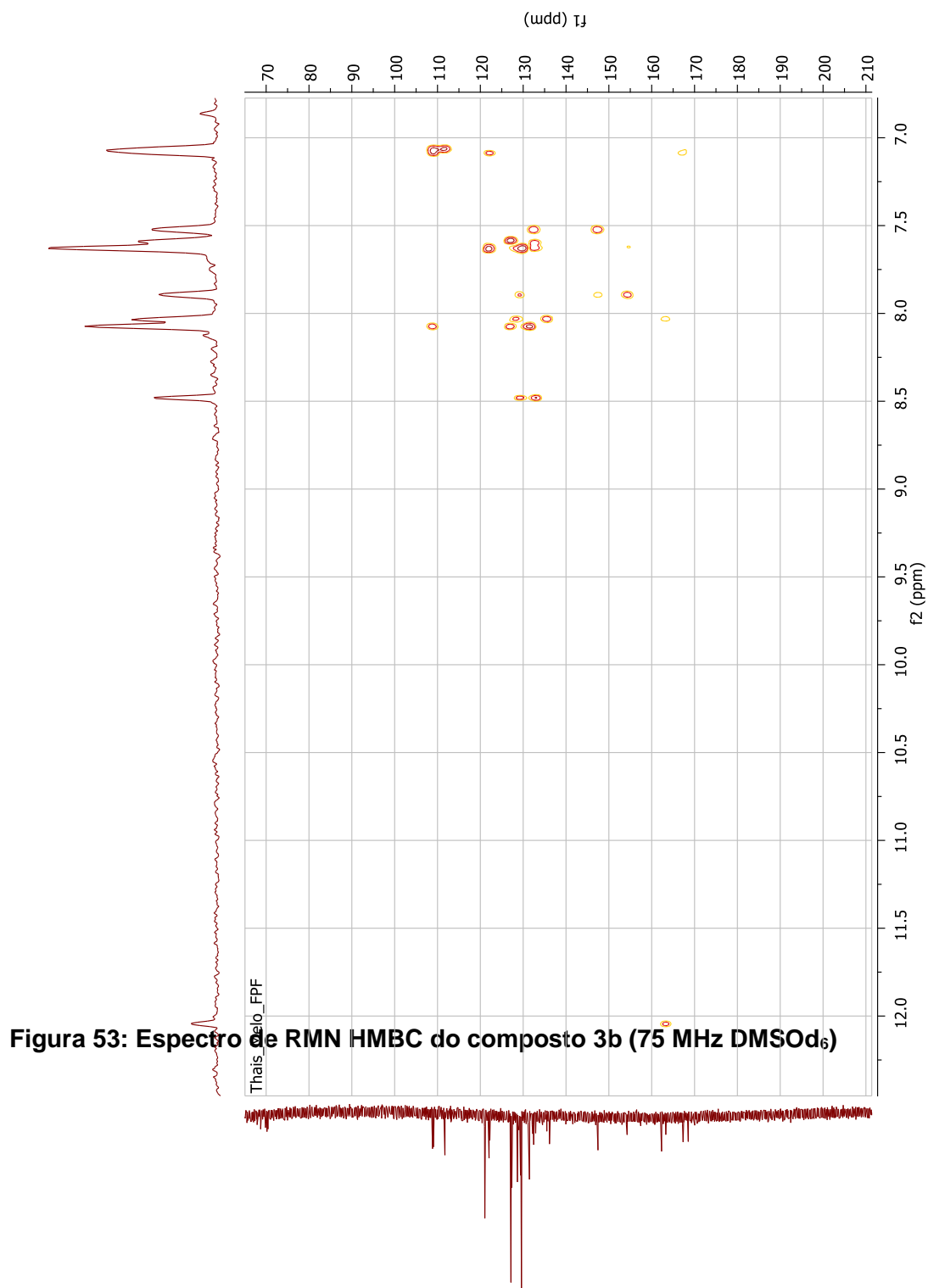


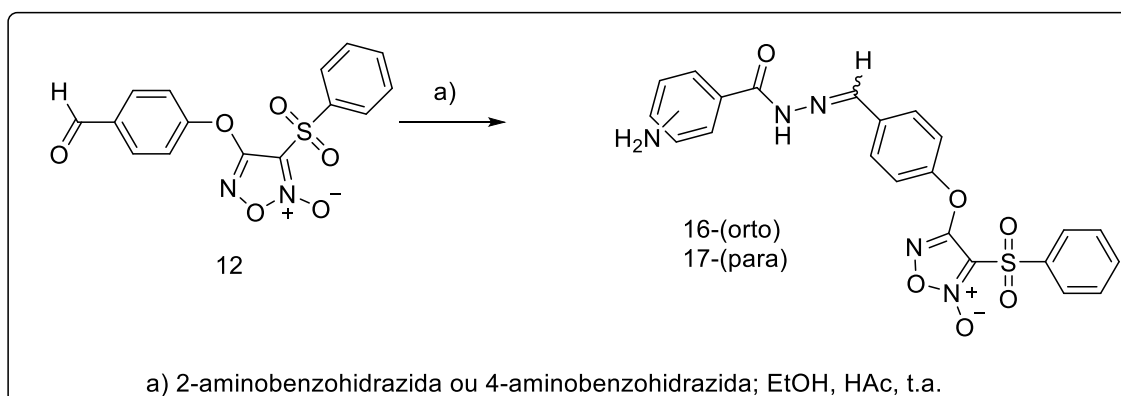
Figura 51: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final 3b (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).







### 2.3 Sínteses dos intermediários N-acilhidrazônicos derivados do fenilsulfonil furoxano (16-17)



#### *Procedimento experimental*

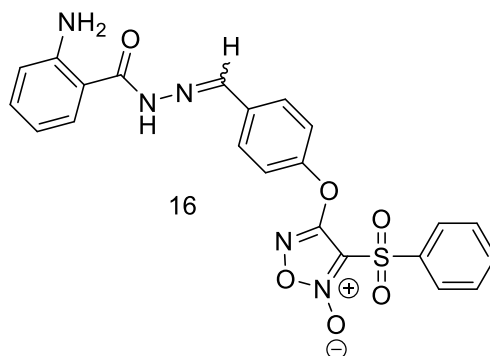
Em balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,3 g (1,5 mmol) do 4-(2-formil)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (17), seguido de 3 gotas de ácido acético glacial e de 2-aminobenzohidrazida (0,504 g; 1,5 mmol) ou em 4-aminobenzohidrazida (0,504 g; 1,5 mmol) em 15,0 mL de metanol. Posteriormente, a mistura reacional foi colocada sob agitação constante à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 24 horas. O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel: 1:1 hexano:acetato de etila.

Ao término da reação, realizou-se filtração sob pressão reduzida e lavagem do produto obtido com 10 mL de água e 15 mL de etanol gelado. O sólido obtido foi seco em dessecador à temperatura ambiente.

O intermediário 4-(4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**16**), foi caracterizado como um sólido branco, de PM = 479,47 g/mol, faixa de fusão entre 175-178°C, fator de retenção ( $R_f = 0,15$ ) e rendimento de 59%. Já o intermediário 4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (**17**) foi obtido como um sólido branco com rendimento de 75%, de PM = 479,47 g/mol ( $C_{22}H_{17}N_5O_6S$ ), faixa de fusão entre 173-175°C e fator de retenção ( $R_f = 0,22$ ).

*Caracterização estrutural*

4-(4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-  
 óxido (**16**)



**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO):** 11,70 (s, 1H); 8,42 (s, 1H), 8,06 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7,93 (t, *J* = 7.5 Hz e *J*=1,2, 1H); 7,87 – 7,73 (m, 4H); 7,55 (m, 3H, 7,21 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H); 6,76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H); 6,58 (t, *J* = 7.5 Hz e *J*=1,5, 1H); 6,40 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO):** 158,23; 153,59 ; 150,13 ; 136,92; 136,35; 132,94; 132,40; 130,10; 128,69; 120,15; 116,43; 114,68; 111,37.

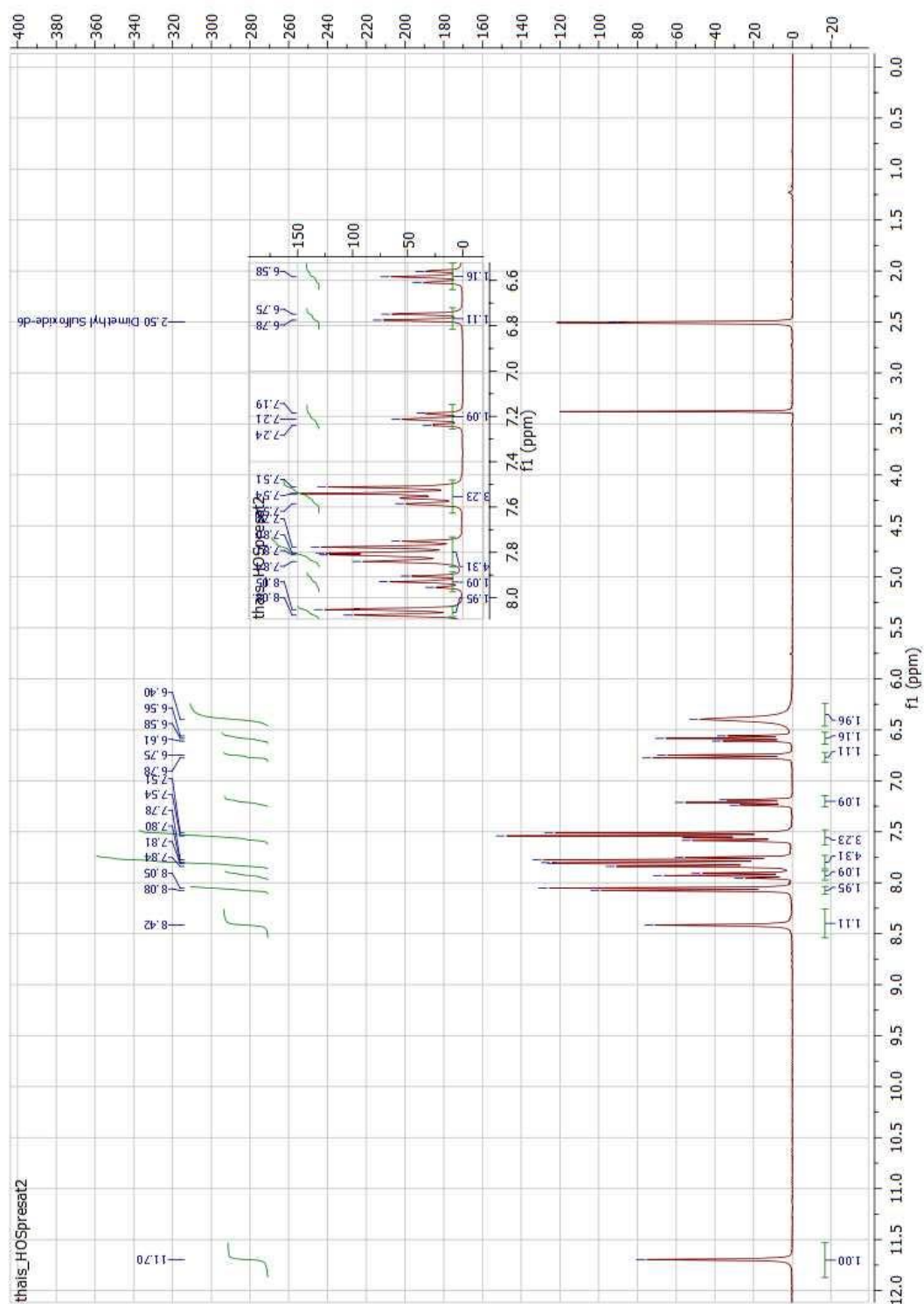


Figura 54. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do 4-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (16) (300 MHz; DMSO<sub>d6</sub>).

Fonte: dados da pesquisa

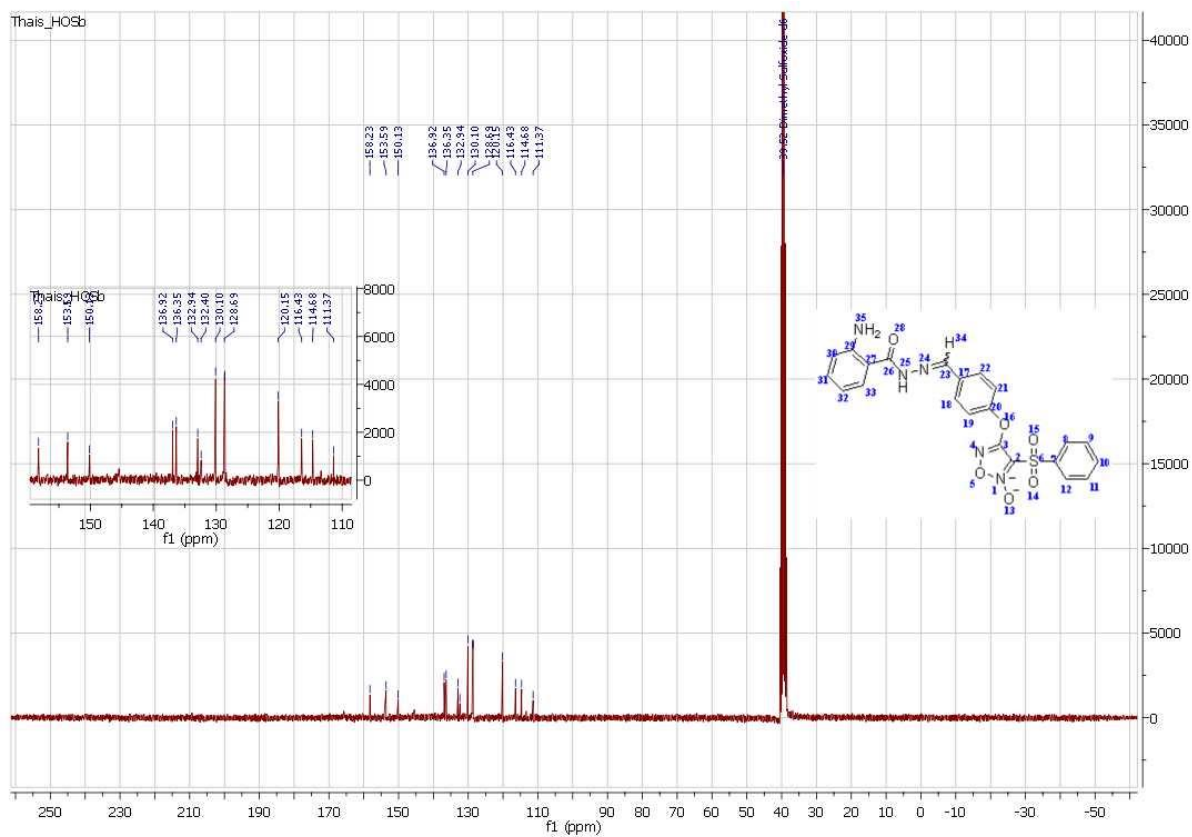
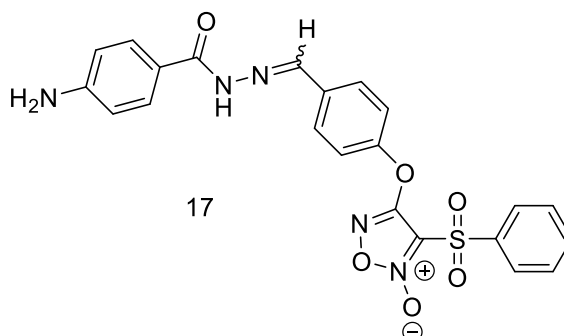


Figura 55: Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  do 4-(4-((2-(2-aminobenzoyl)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (16) (75 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa

4-(4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-  
óxido (**17**)



**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 11,52 (s,1H); 8,42 (s,1H); 8,06(dd 2H, J=8 Hz)  
7,77-7,94 (m, 5H); 7,67(dd, 2H J=7,5Hz); 7,51(dd, 2H, J=7,5Hz); 6,6 (dd, 2H,  
J=8,0Hz); 5,8 (2H, s, NH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 158,65; 153,83; 152,82 ; 144,96; 136,75;  
130,51; 129,98; 129,91; 128,57 ; 120,54; 119,65; 113,07; 111,75.

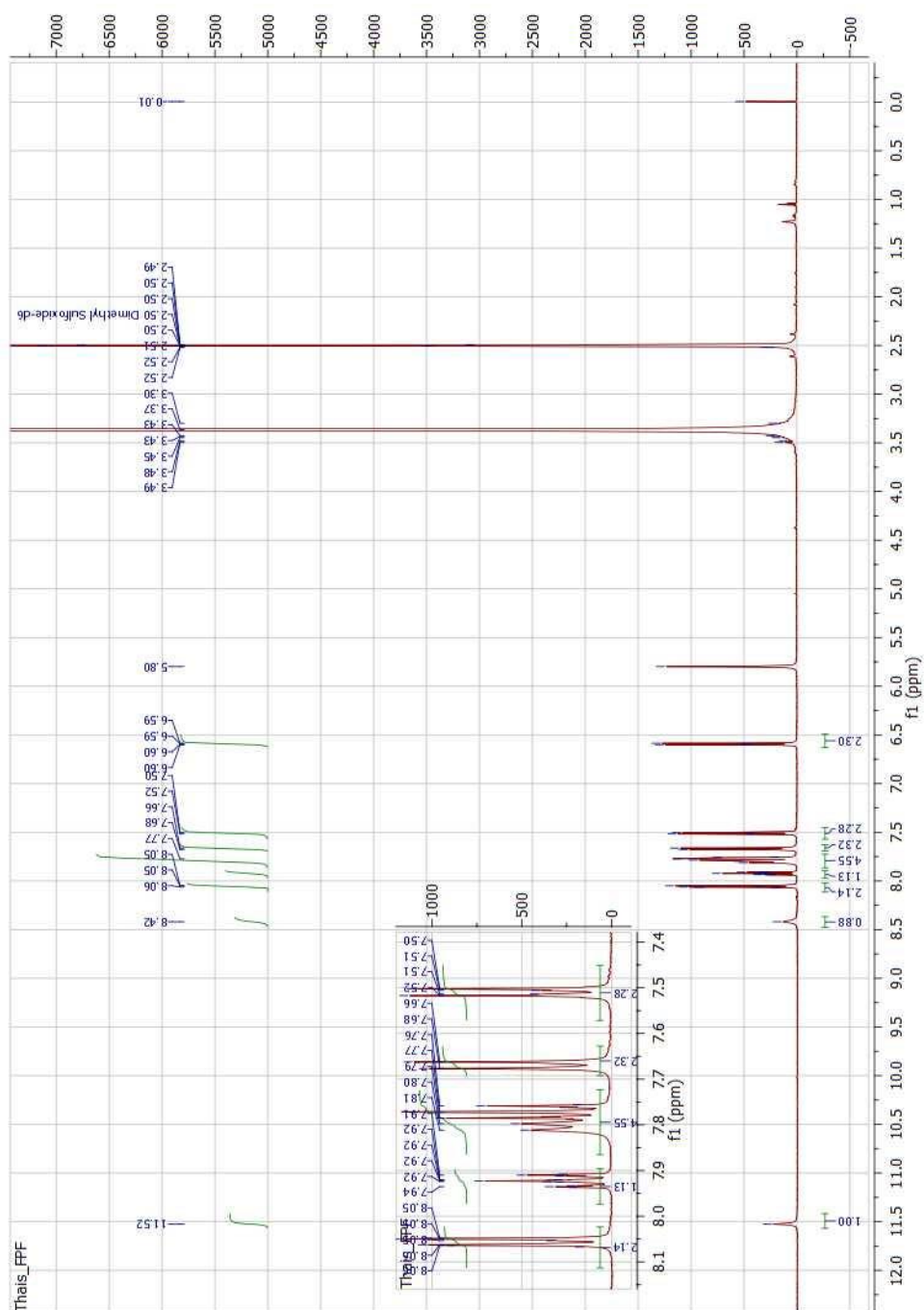


Figura 56: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonyl)-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (17) (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa



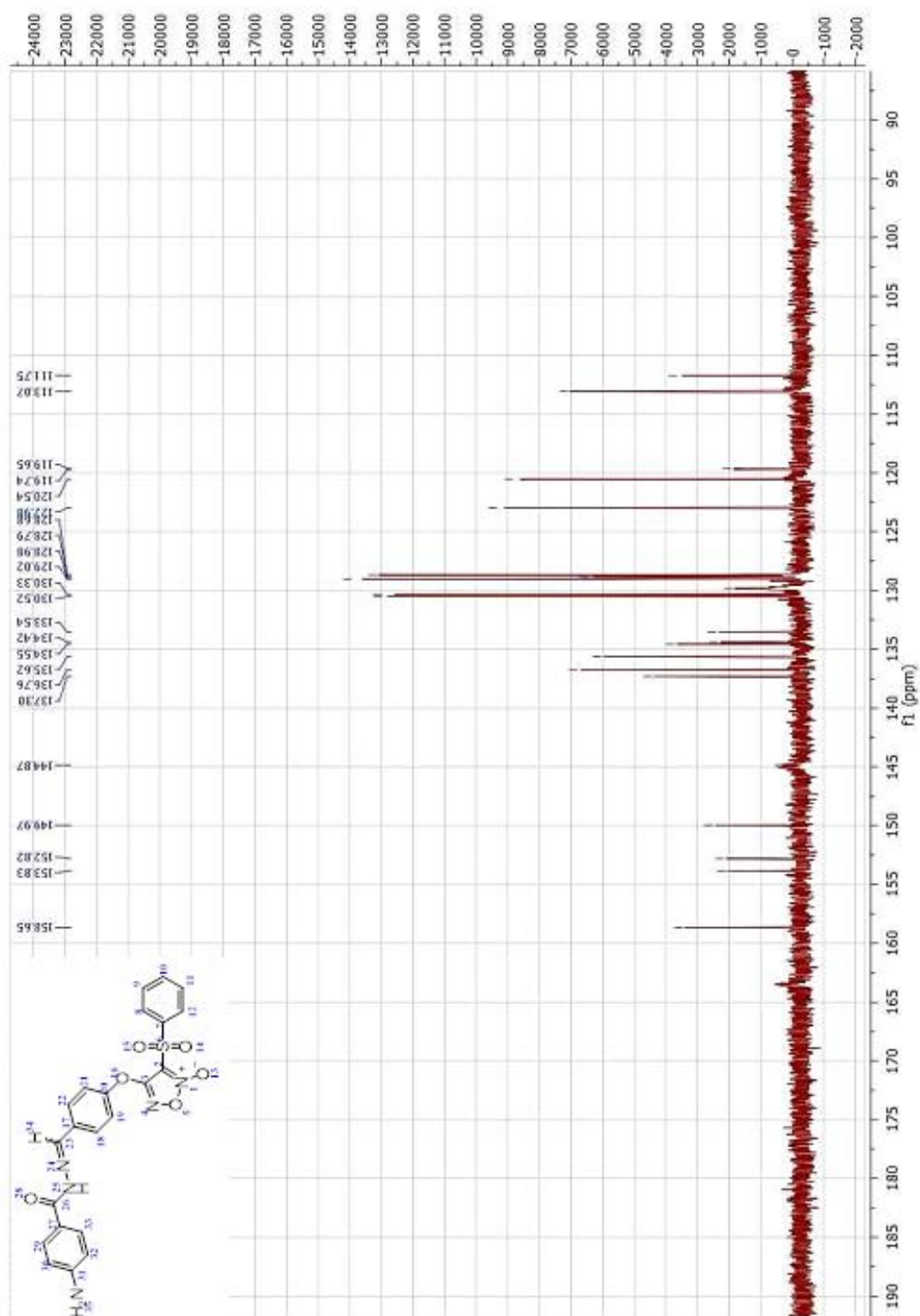


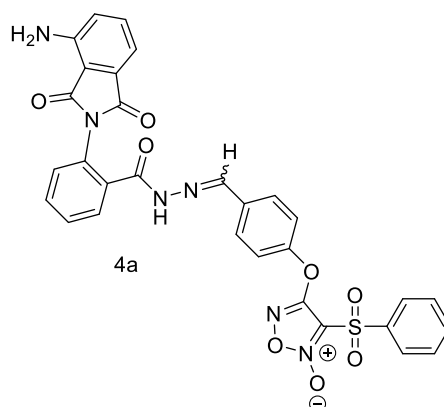
Figura 57: Espectro de RMN  $C^{13}$  4-(4-((2-(4-aminobenzil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (17)(75 MHz  $DMSO_{d6}$ )

Fonte: dados da pesquisa

## 2.4 Síntese dos compostos finais híbridos derivados do fenilsulfonil furoxano (4a-b)

A reação de formação do composto final híbridos (**4a-b**) foi realizada em um balão de 125 mL, onde foram adicionados, 0,2 g (0,001 mol) de anidrido 3-aminoftálico e 0,287 g (0,0015 mol) de EDC (agente acoplante), seguidos de 0,959 g da hidrazona (**16 ou 17**) (0,002 mol) e 20,0 mL de dimetilformamida anidro e ainda 0,05 g de DMAP, como agente catalisador. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante e a temperatura ambiente por 48 horas. O isolamento da mistura reacional foi feito adicionando-se água em banho de gelo para que houvesse precipitação. Posteriormente foi realizada a filtração, lavando-se o precipitado com água e deixado secar a temperatura ambiente.

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel 1:1 hexano:acetato de etila. O composto foi purificado por cromatografia em coluna, no equipamento Isolera Biotage, utilizando coluna de sílica gel Sphere 20 µm (10g), como fase estacionária e fase móvel de com concentração de 45% éter de petróleo/55% acetato de etila, fluxo de 12 mL/min. Rendimento: composto 4a: 13% ; 4b: 20% . Faixa de fusão 4a: 216-218; 4b: 221-223,5°C.

*Caracterização estrutural*

**RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz;  $\text{DMSO}_{d6}$ ) ppm:** 12.06 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.06 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 8.02 (dd, 1H,  $J=8,0$ ), 7,89(dd, 2H7.63-7.59 (m, 7H), 7,52 (ddd,1H, $J=7,0$ ), 7.09 (dd, 1H, $J=7,08$ ), 7.05 (dd,1H, $J=7,07$ ), 6.58 (s, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ ) ppm:** 168.54, 167.35, 163.36, 162.30, 147.44, 136.17, 135.52, 132.58, 132.43, 131.47, 129.60, 129.40, 128.66, 127.36, 127.16, 122.24, 122.00, 121.05, 111.78, 109.05, 108.85.

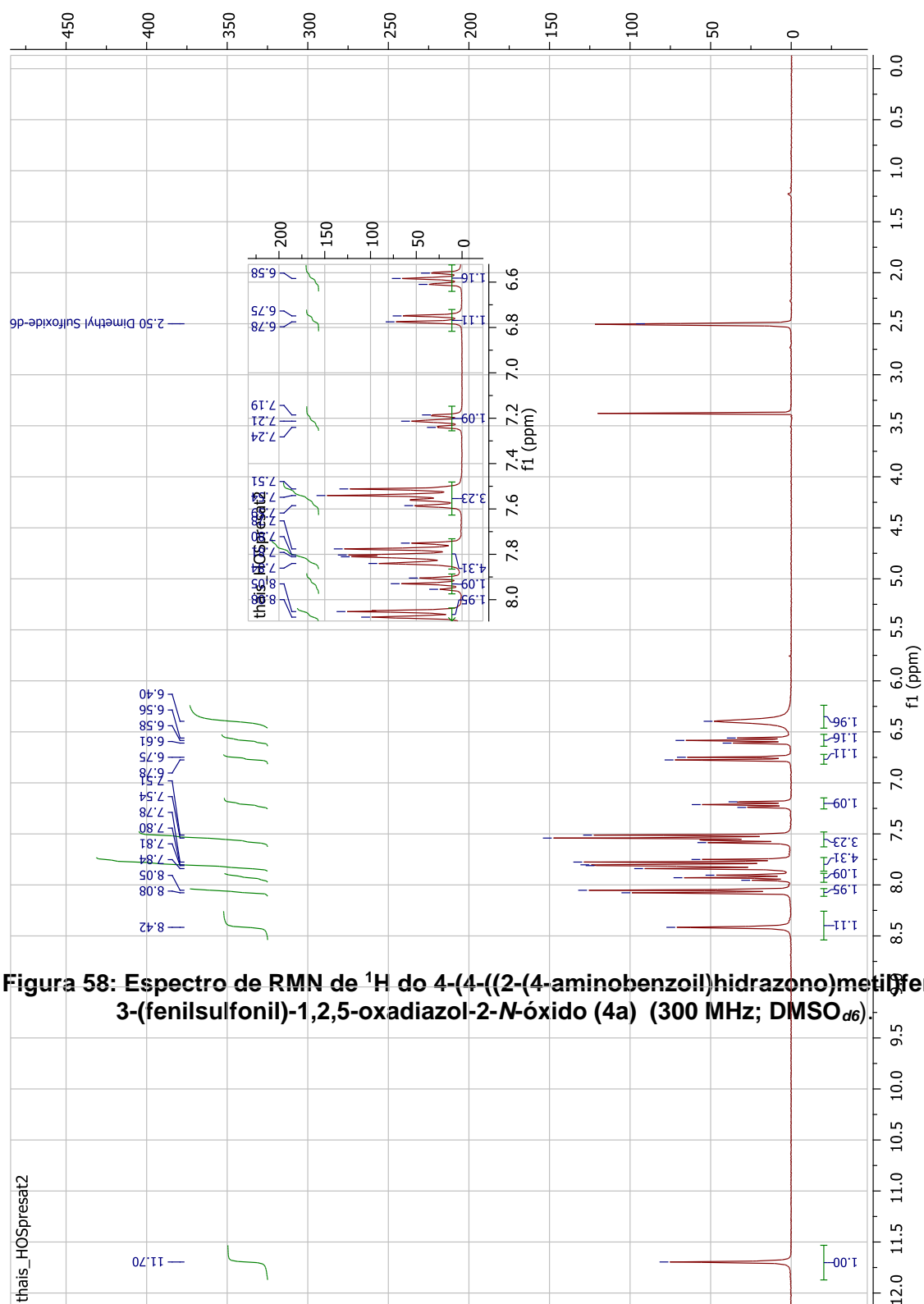
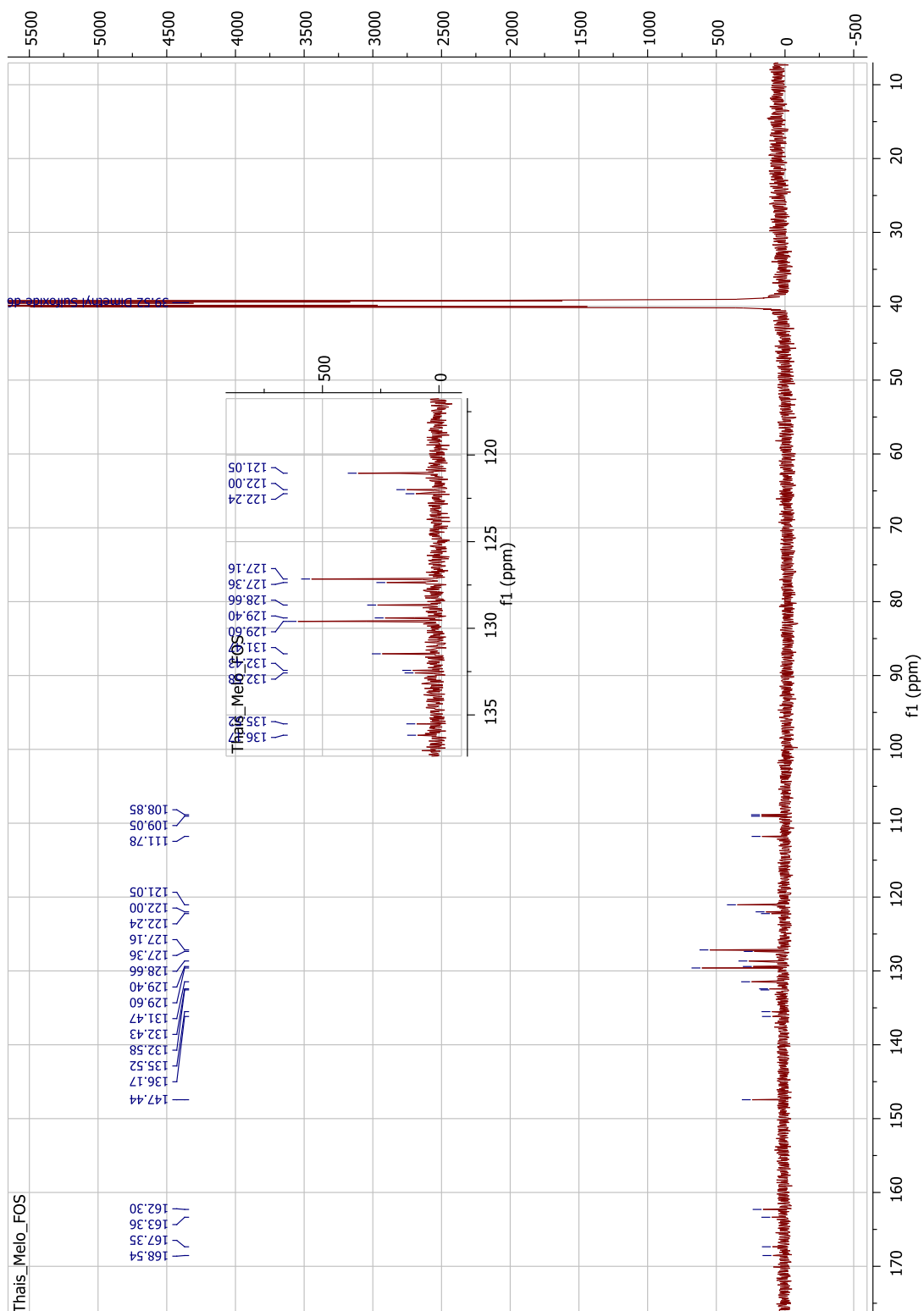
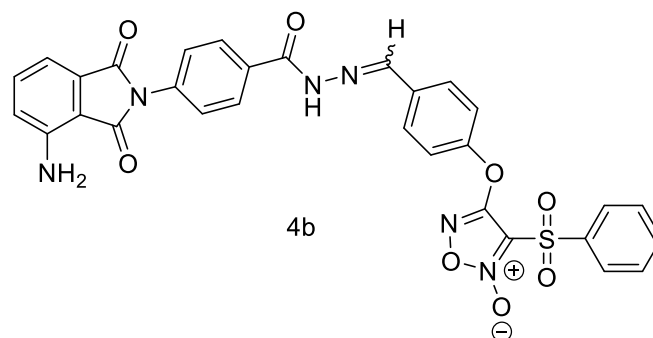


Figura 58: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonyl)-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (4a) (300 MHz;  $\text{DMSO}_{d6}$ )

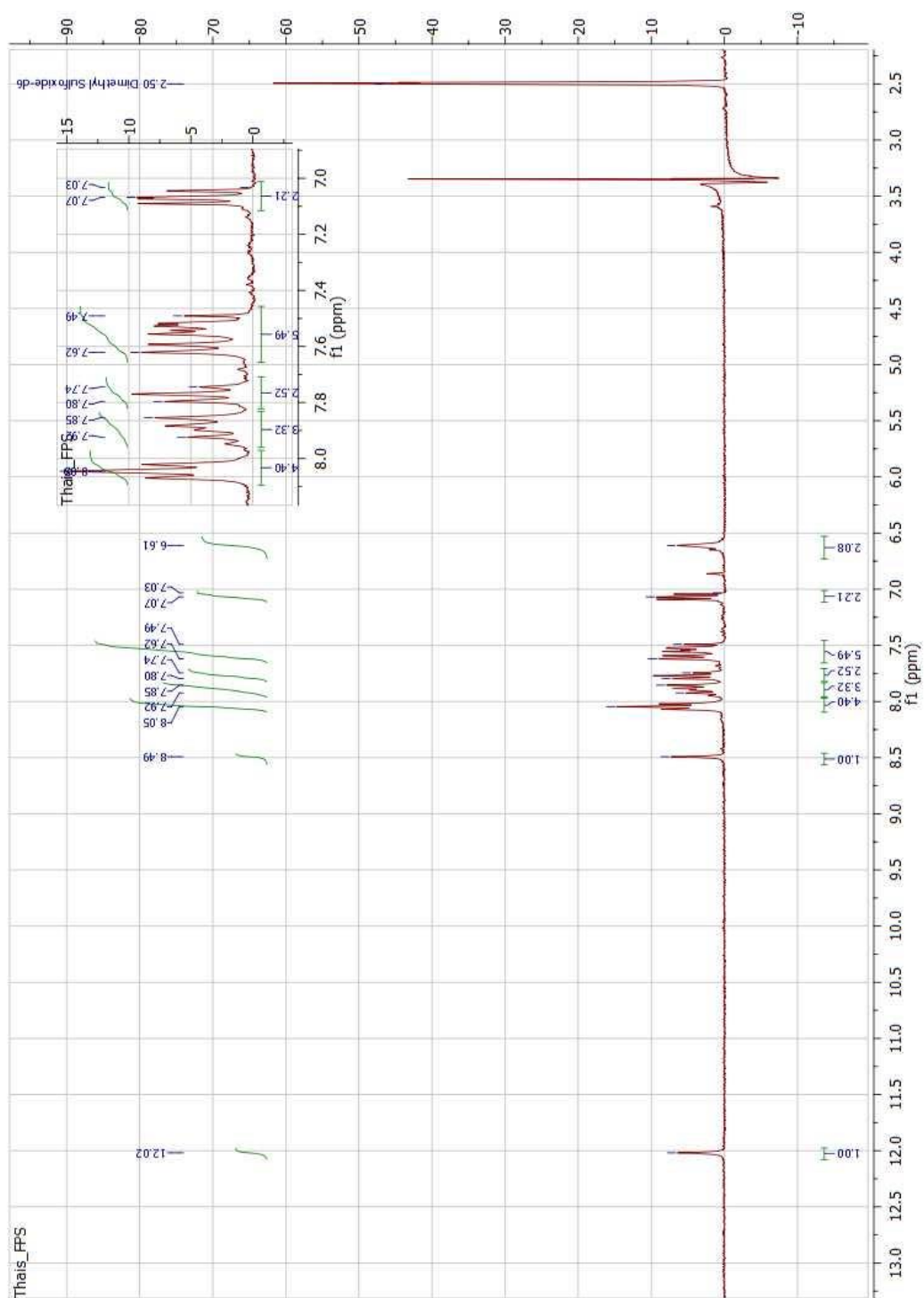
Figura 59: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 4-(4-((2-(4-aminobenzoi) hidrazono) metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonyl)-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (4a) (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).





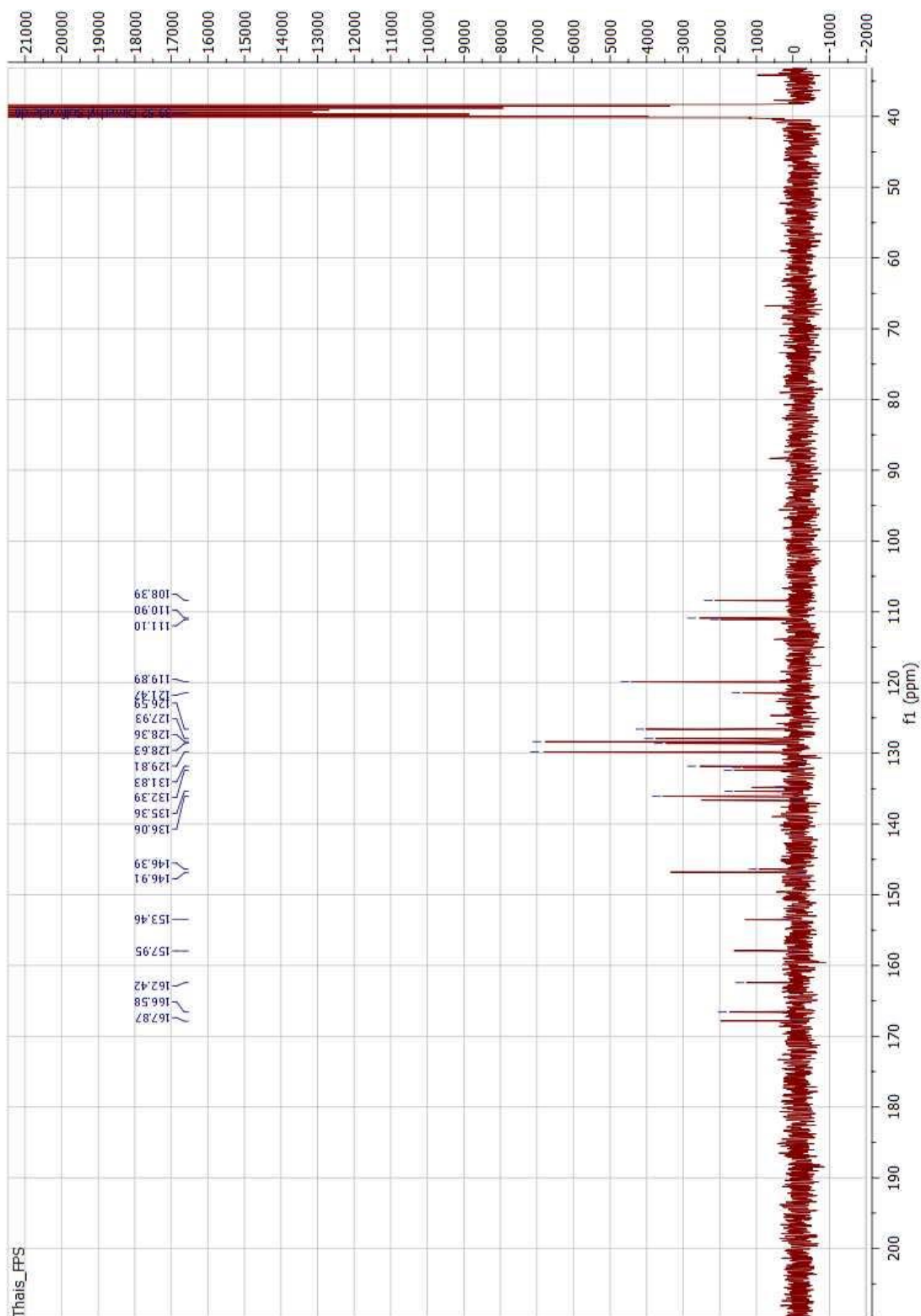
**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{DMSO}_{d6}$ ) ppm:** 12,02 (s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,02-8,07(m, 4H); 7,74-7,94 (m, 5H); 7,49-7,62 (m, 5H); 7,03-7,09 (m, 2H);; 6,61 (s, 2H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ ) ppm:** 167,82; 166,58; 162,42; 157,96; 153,46; 146,80;146,39; 136,63; 136,06; 135,36; 134,75; 132,39; 131,91; 129,81; 128,63; 128,36; 127,93 ;126,59; 121,68; 119,89; 111,00; 110,90; 108,39.

Figura 60: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final 4b (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa

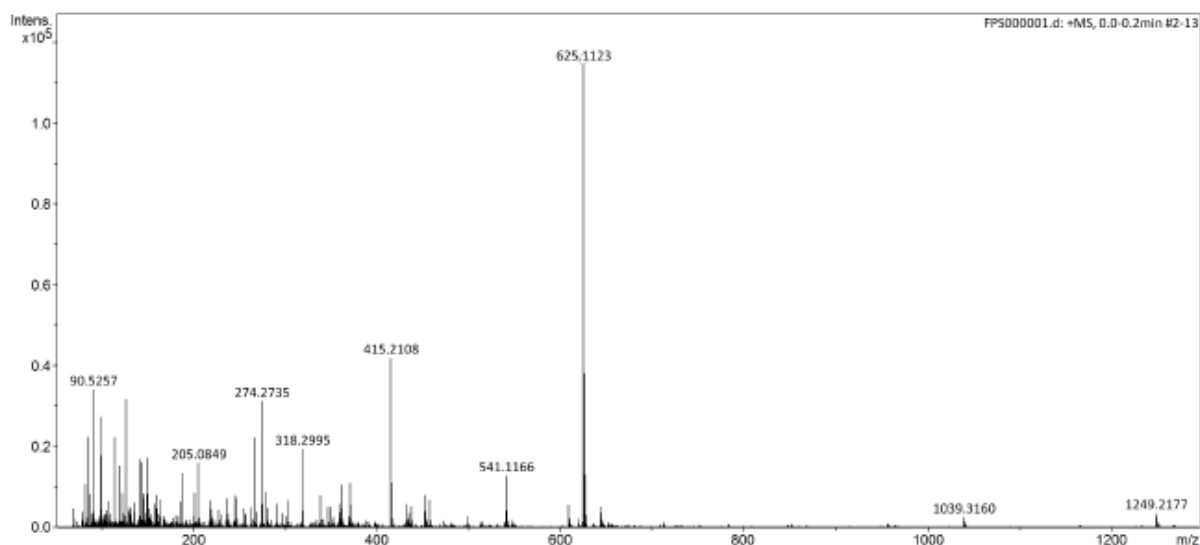
Figura 61: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final 4b (75 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).



Fonte: dados da pesquisa

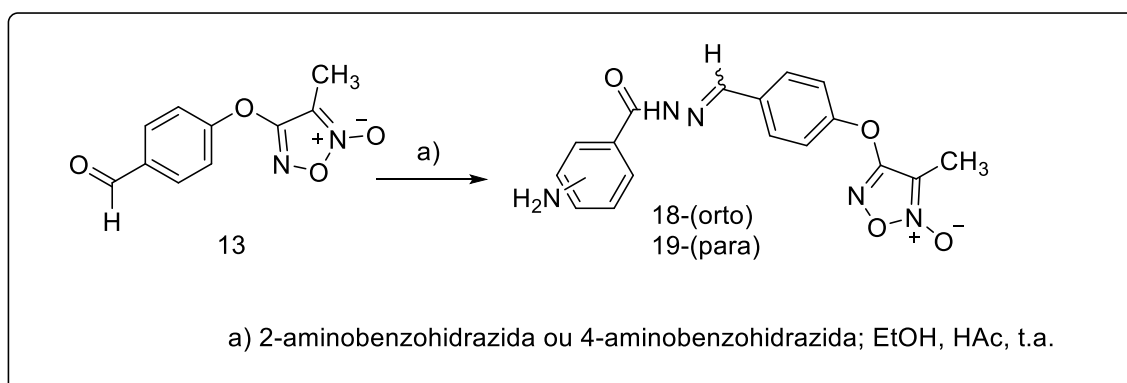


Figura 62: Espectro de massas de alta resolução do composto 4b.



Fonte: dados da pesquisa

## 2.5 Sínteses dos intermediários N-acilhidrazônicos derivados do 3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (18-19)



### Procedimento experimental

O intermediário 4-(4-formilfenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (**13**) (0,23g, 0,874 mmol) foi suspenso em 20 mL de metanol e então foi adicionada a 2-aminobenzohidrazida (0,132g, 0,874 mmol) e 3 gotas de ácido acético glacial para

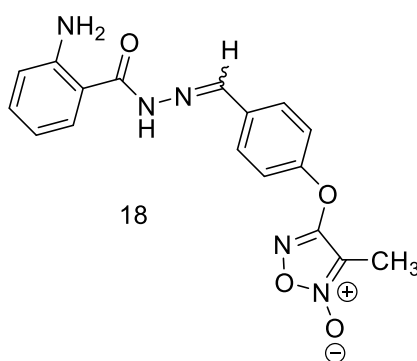
obtenção do intermediário **(18)**. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 4 horas até o final da reação confirmado pela C.C.D. (Fase móvel: 95% diclorometano/ 5% metanol). Foi adicionada água à mistura e esta colocada em banho de gelo para favorecer a precipitação. O precipitado foi filtrado à pressão reduzida e lavado com água gelada. O composto **(18)** foi obtido como um sólido branco com rendimento de 64% e faixa de fusão compreendida entre 234,6 - 235,7°C.

Para o intermediário **19** utilizou-se o mesmo procedimento sintético, entretanto, para este caso utilizou-se 4-aminobezohidrazida.

O intermediário (4-(4-((2-(2-aminobenzil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido **(18)**, caracterizou-se por um sólido branco, de PM = 353,33 g/mol, faixa de fusão entre 165-168°C, fator de retenção ( $R_f = 0,22$ ) e rendimento de 65%. Já o intermediário 4-(4-((2-(3-aminobenzil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido **(19)**, caracterizou-se por ser um sólido branco, faixa de fusão entre 160-162°C, fator de retenção ( $R_f = 0,15$ ) e rendimento de 66%.

#### Caracterização estrutural

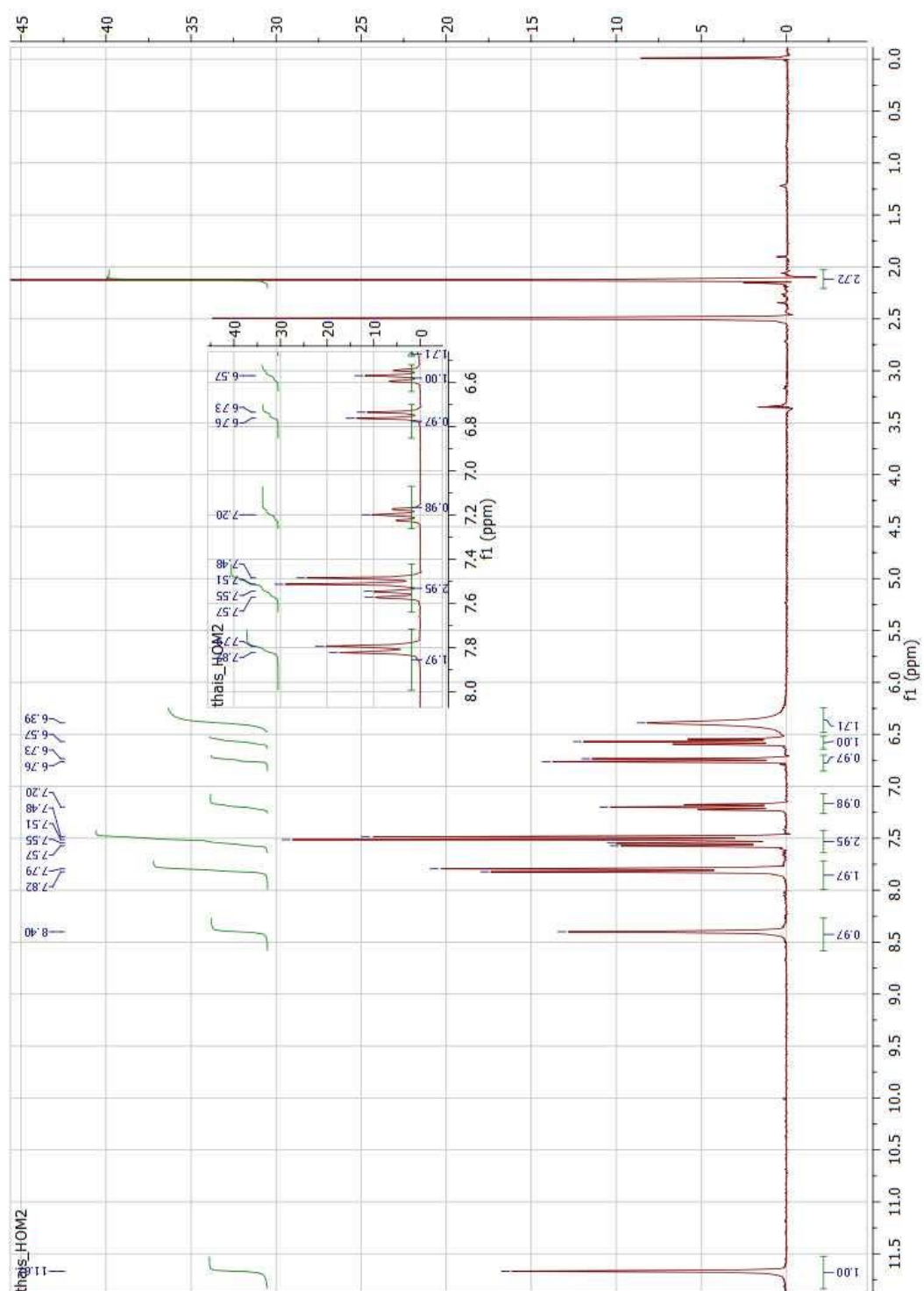
4-(4-((2-(2-aminobenzil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido **(18)**



**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ) ppm:** 11,67 (1H, s); 8,41 (1H, s); 7,80 (2H, dd,  $J = 8\text{Hz}$ ); 7,48-7,57 (3H,m); 7,2 (1H,ddd,  $J = 7\text{Hz}$ ); 6,75 (1H, dd,  $J = 7\text{Hz}$ ); 6,57 (1H,  $J = 8\text{Hz}$ ); 6,39 (s, 2H,); 2,13 (s, 3H).

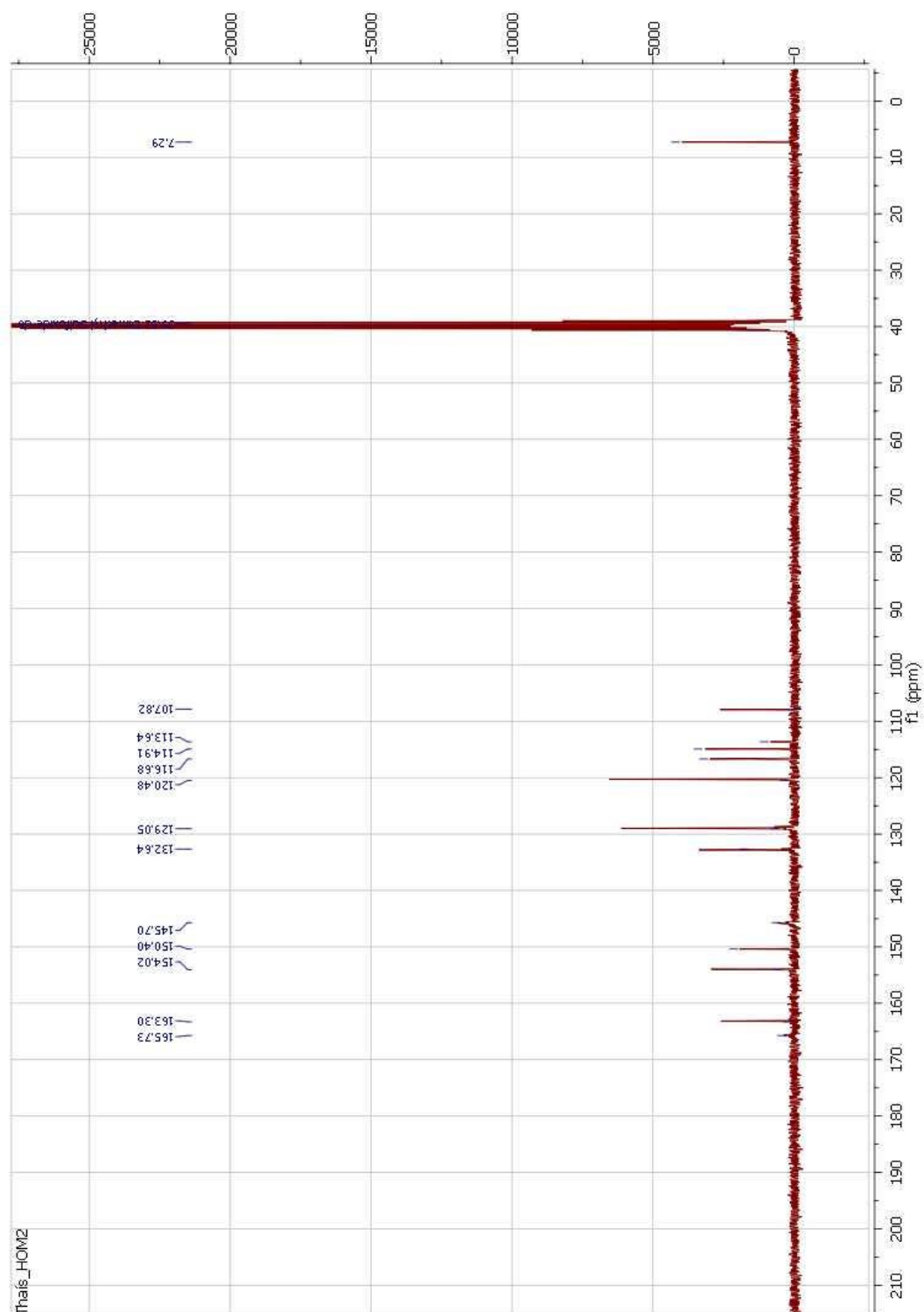
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):** 165,73, 163,3, 154,02; 150,40; 145,70; 132,64; 129,05; 120,48; 116,68; 114,91; 113,64; 107,94; 7,29.

Figura 63: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 4-(4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (18) (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).



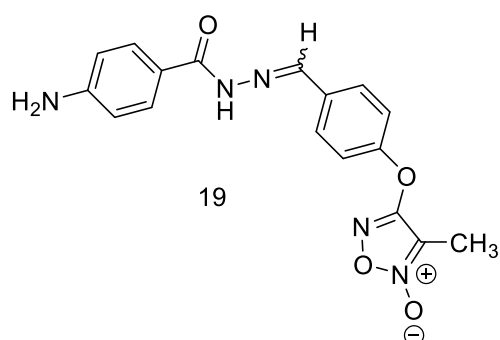
Fonte: dados da pesquisa

Figura 64: Espectro de RMN  $C^{13}$  44-(4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (18) (75 MHz  $DMSO-d_6$ )



Fonte: dados da pesquisa

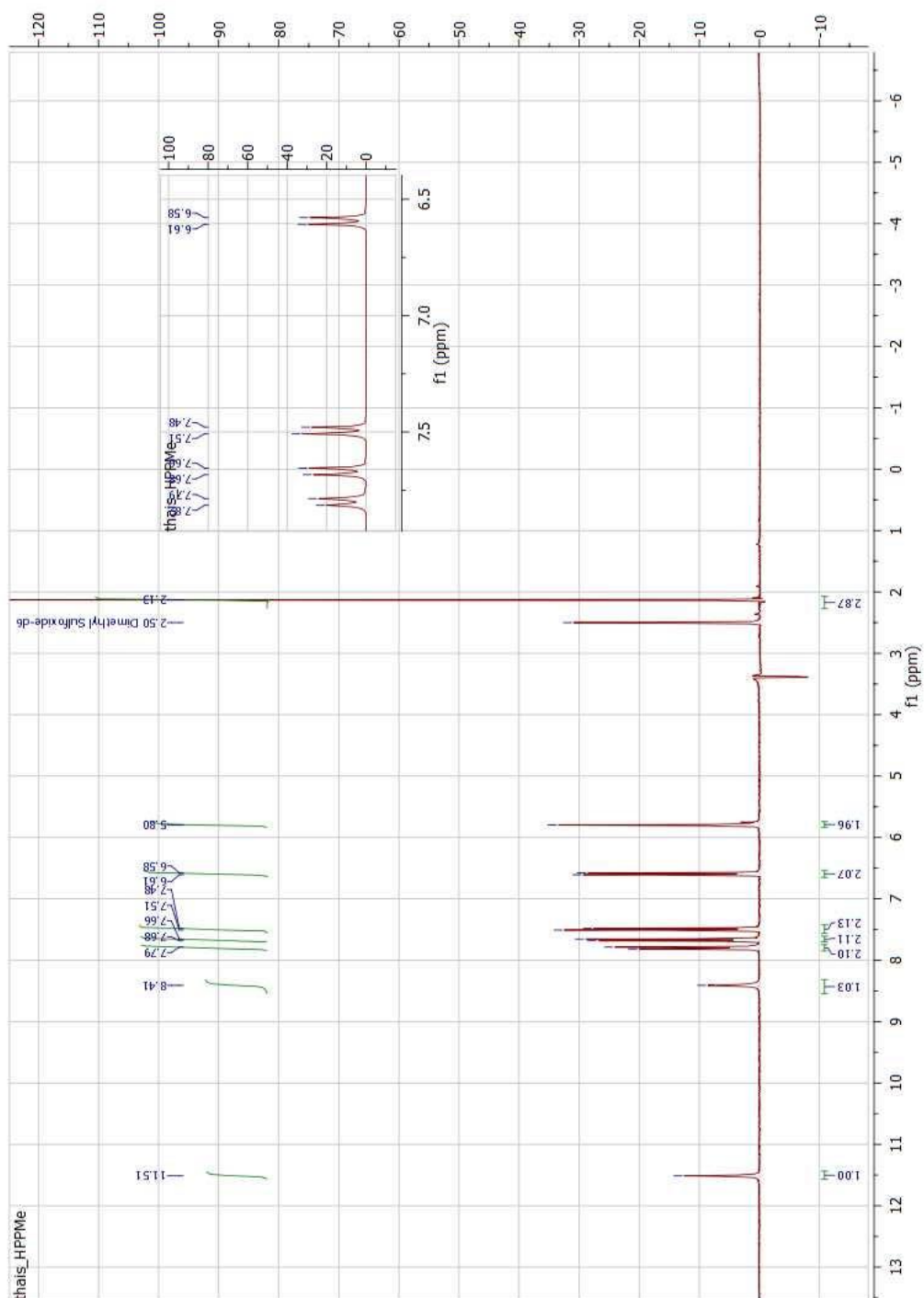
4-(4-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido  
(19)



**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO<sub>d6</sub>)** 11,51 (s, 1H); 8,41 (s, 1H); 7,80 (dd, 2H, *J* = 8 Hz), 7,67 (dd, 2H, *J* = 7,5Hz), 7,50 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz); 6,60 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz); 5,80 (s, 2H), 2,13 (s, 3H) ppm.

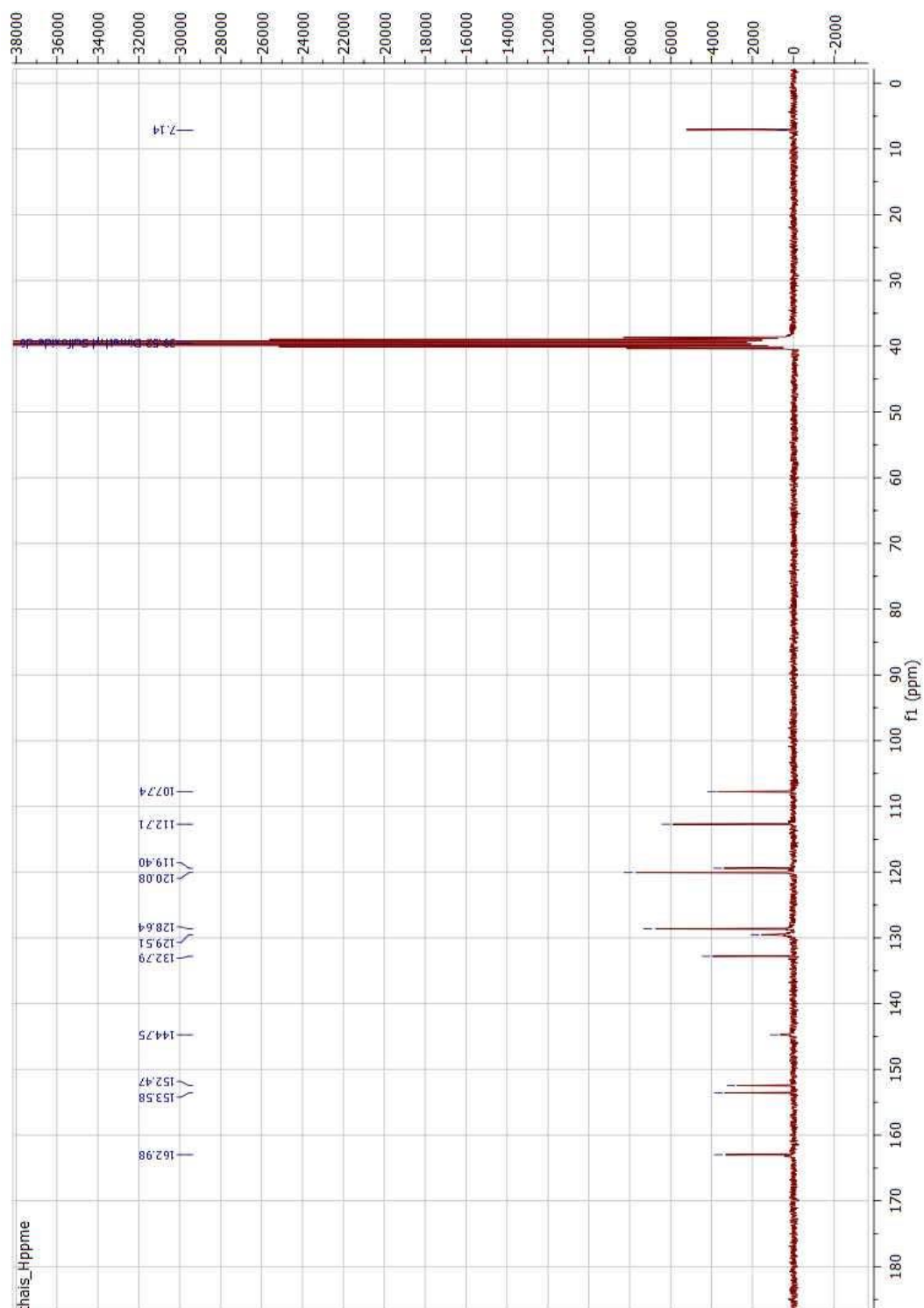
**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO<sub>d6</sub>)** 162,98; 153,58; 152,47; 144,75; 132,79; 129,08; 128,64; 120,08; 119,40; 112,71; 107,74; 7,14.

Figura 65: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  -(4-((2-(3-aminobenzil)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido (19) (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).



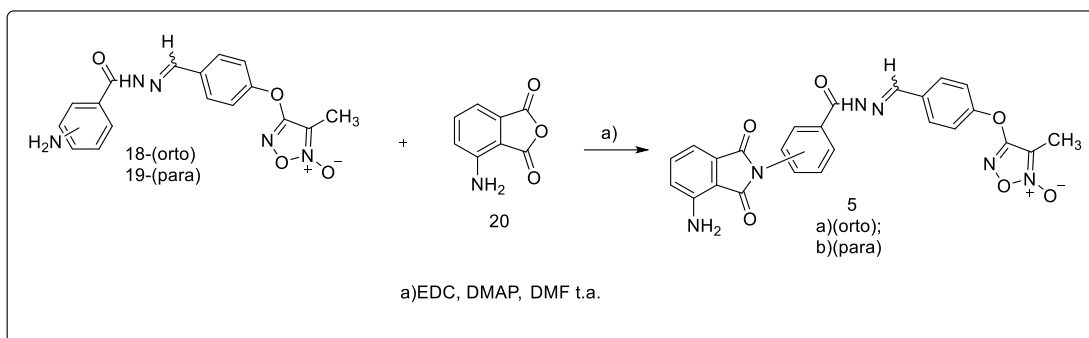
Fonte: dados da pesquisa

Figura 66: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  -(4-((2-(3-aminobenzoi)hidrazono)metil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido (19) (75 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).



Fonte: dados da pesquisa

## 2.6 Síntese dos compostos finais híbridos derivados do metil-1,2,5-oxadiazol 2-N-óxido (5a-b)



### Procedimento experimental

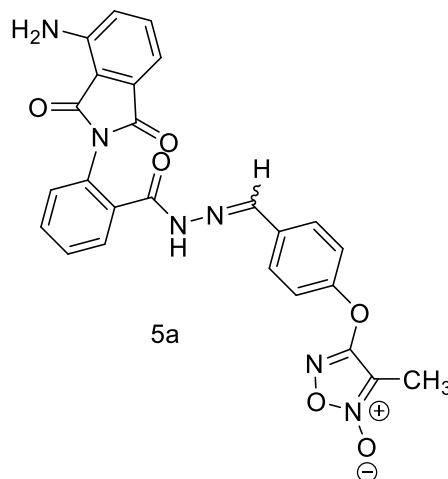
A reação de formação do composto final híbrido (**5a**) foi realizada em um balão de 125 mL, onde foram adicionados, 0,2 g (0,001 mol) de anidrido 3-aminoftálico e 0,287 g (0,0015 mol) de EDC (agente acoplante), seguidos de 0,706 g da hidrazona (**18**) (0,002 mol) e 20,0 mL de dimetilformamida anidro e ainda 0,05 g de DMAP, como agente catalisador. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante e a temperatura ambiente por 48 horas. O isolamento da mistura reacional foi feito adicionando-se água em banho de gelo para que houvesse precipitação. Posteriormente foi realizada a filtração, lavando-se o precipitado com água gelada e deixado secar a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção do produto final **5b** utilizando-se o intermediário **19**. Rendimento **5a**: 15%, faixa de fusão: 217-220°C. Rendimento **5b**: 19%. Faixa de fusão: 218-222°C;

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel 1:1 hexano:acetato de etila.

Os compostos foram purificados por cromatografia em coluna, no equipamento Isolera Biotage, utilizando coluna de sílica gel Sphere 20  $\mu\text{m}$  (10g), como fase estacionária e fase móvel de com concentração de 55% éter de petróleo/45% acetato de etila, fluxo de 13 mL/min.

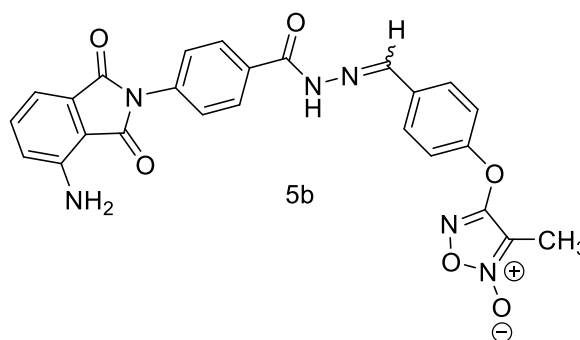


Caracterização estrutural



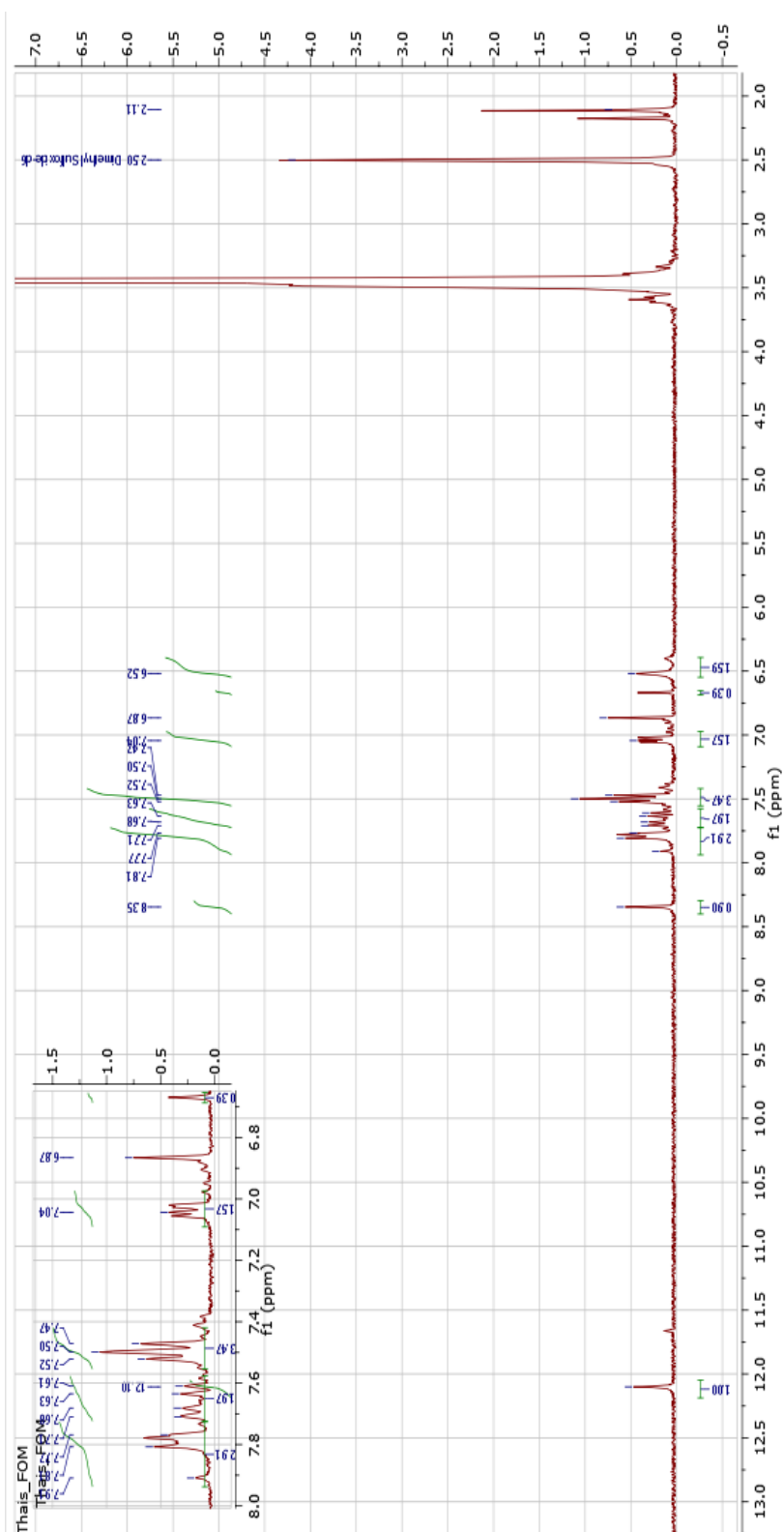
**RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ )ppm:** 12,1 (s, 1H); 8,35 (s, 1H); 7,77-7,81 (m, 2H); 7,71-7,62 (dd, 2H,  $J=7\text{Hz}$ ); 7,547-7,52 (m, 4H), 7,02-7,06 (m, 2H); 6,87 (dd, 1H); 6,57 (s, 2H), 2,11 (s, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ ) ppm:** 168,4; 167,18; 162,87; 153,90; 151,51; 146,9; 146,4 ; 139,3; 135,64 ;132,6; 132,17; 130,44; 128,16; 125,01; 128,16; 125,01; 121,68; 120,01 ;111,21; 108,67 ; 107,75 ; 7,02 .

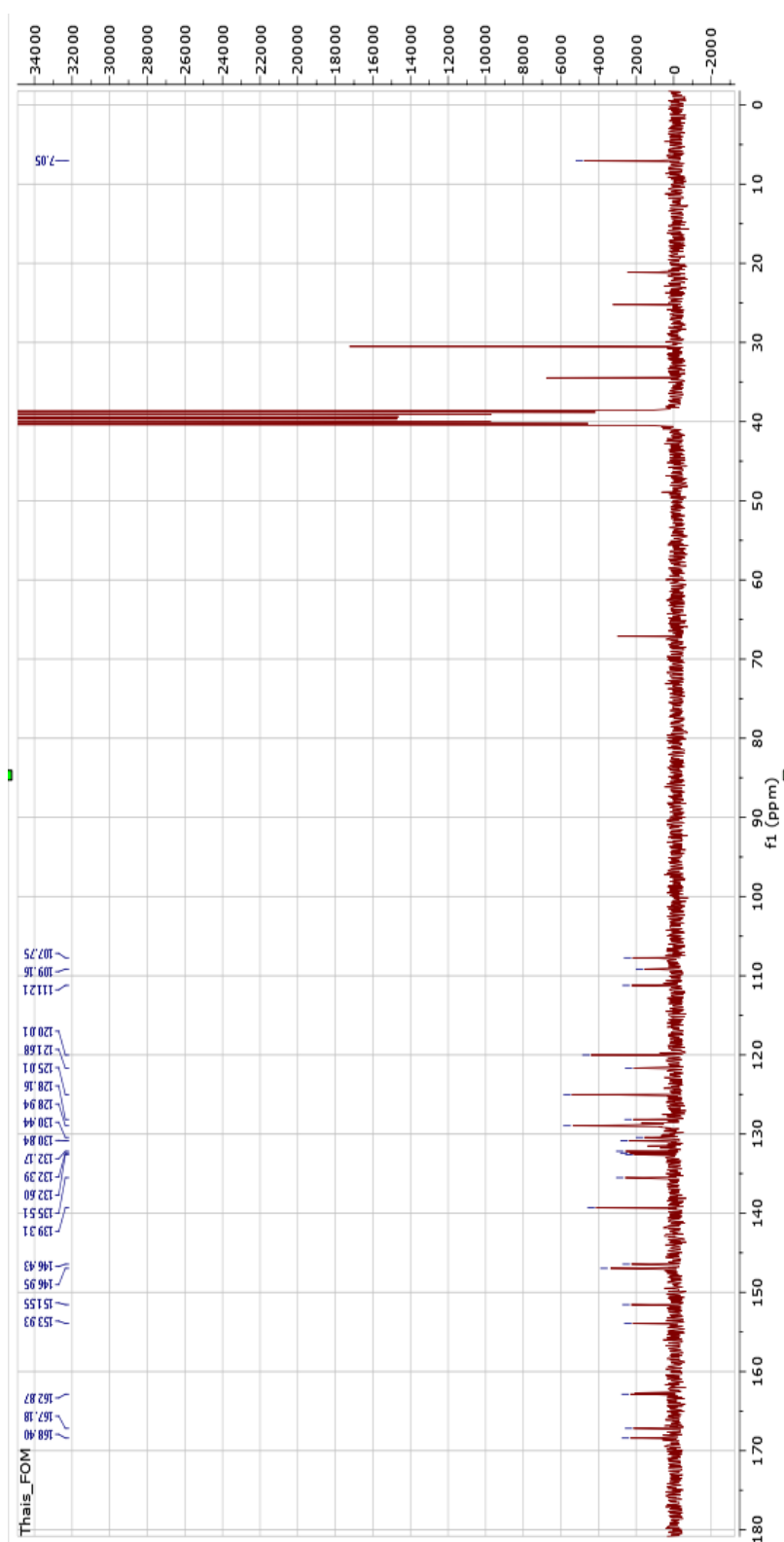


**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ ) ppm:** 12,02 (s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,02 (dd,  $J=8,0\text{Hz}$ , 2H); 7,88 (dd,  $J=8\text{Hz}$ , 2H); 7,63 (d, 2H,  $J=7,5\text{Hz}$ ); 7,5 (dd, 2H,  $J=7,5\text{Hz}$ ), 7,06-7,10 (m, 2H); 6,87(m,1H 6,61 (s, 2H), 2,13 (s, 3H).

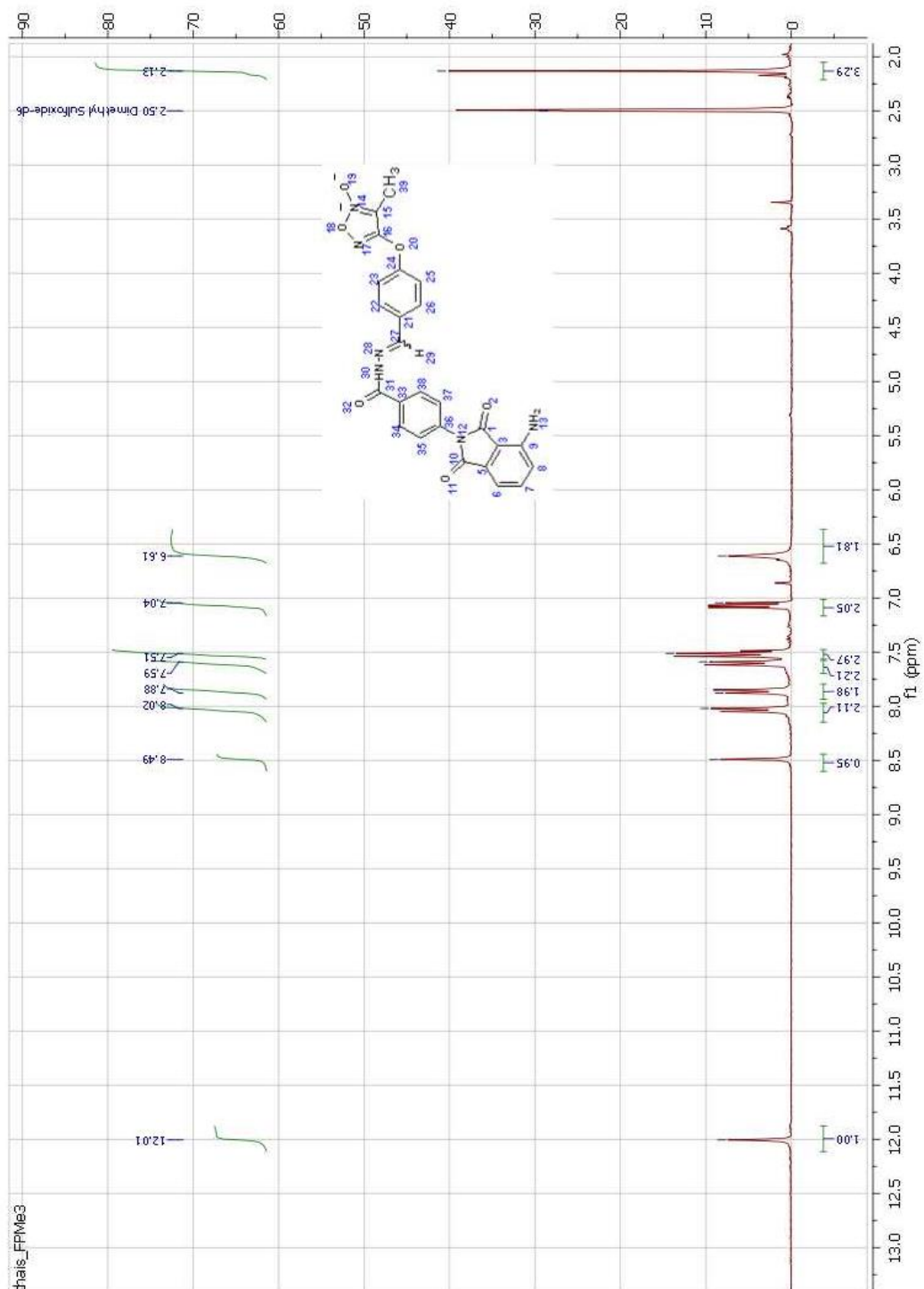
**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ ) ppm:** 168,10; 166,86 ; 162,77 ; 153,90; 151,51; 147,08 ; 146,75; 139,24; 135,64; 135,10 ; 132,19 ; 130,88 ; 128,92 ; 128,14 ; 126,86 ; 124,96 ; 121,75 ; 119,97; 111,18 ; 108,67 ; 107,68; 7,02.

Figura 67: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final 5a (300 MHz;  $\text{DMSO}_{d6}$ )

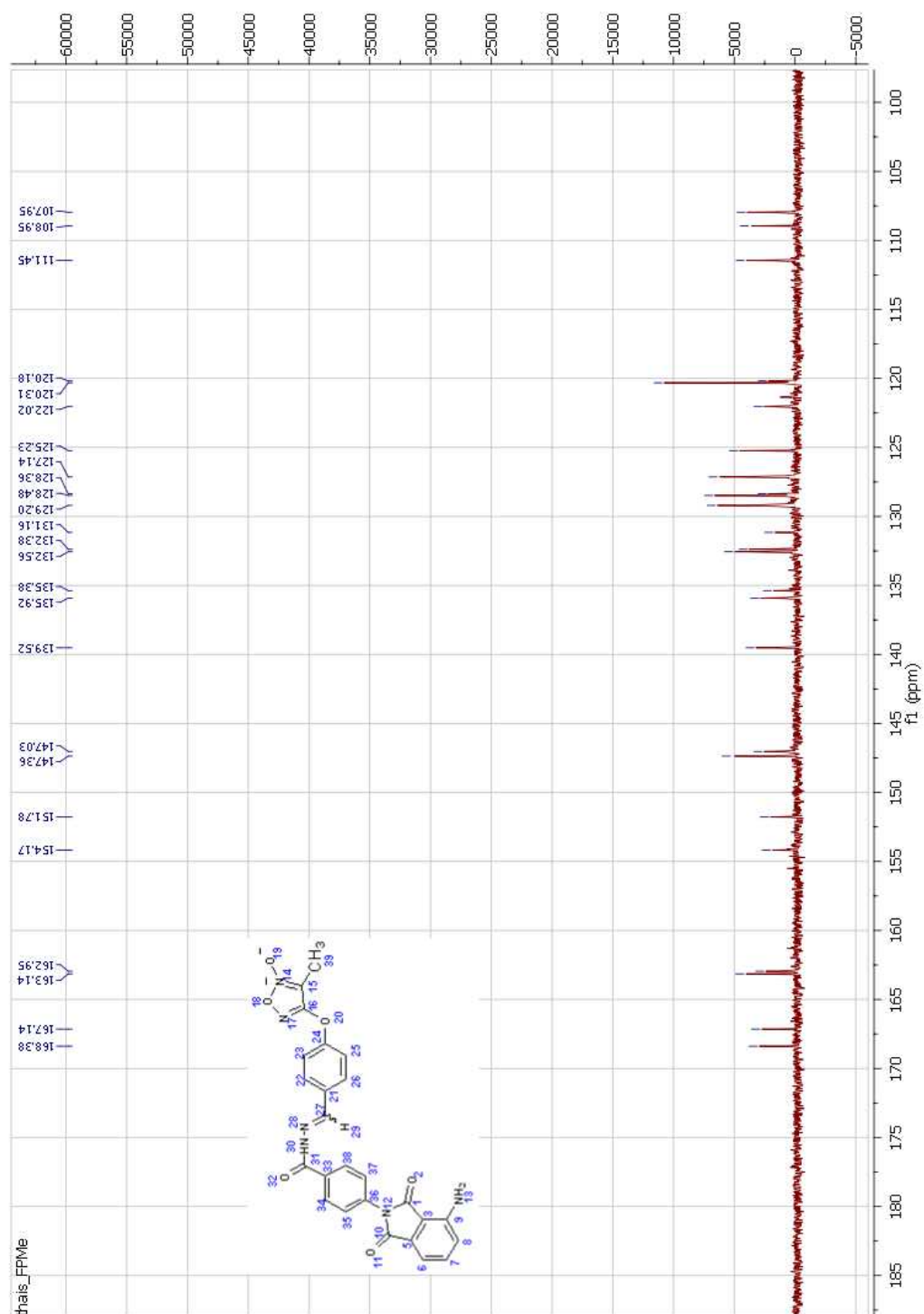
Fonte: dados da pesquisa

Figura 68: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final 5a (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

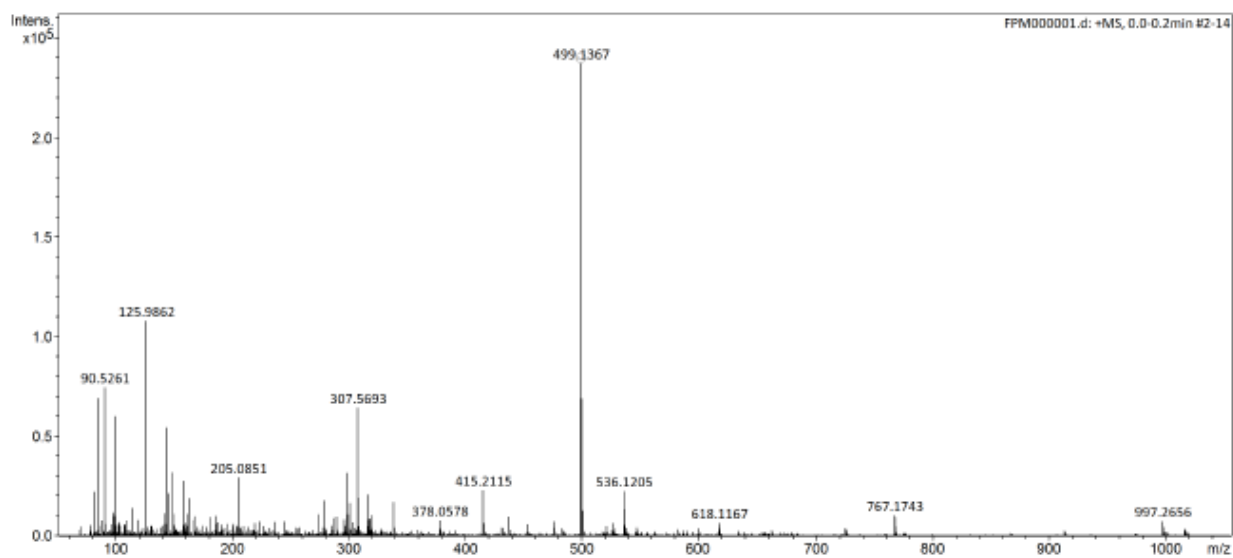
Fonte: dados da pesquisa

Figura 69: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto final 5b (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa

Figura 70. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto final 5b (300 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Fonte: dados da pesquisa

**Figura 71: Espectro de massas de alta resolução do composto 5b**

Fonte: dados da pesquisa