

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Síntese de novos compostos planejados como ligantes
de hemoglobina com propriedades de doação
de óxido nítrico**

Guilherme Aguiar Costa

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Síntese de novos compostos planejados como ligantes
de hemoglobina com propriedades de doação
de óxido nítrico**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, Área de
Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Guilherme Aguiar Costa
Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara – SP

2023

C837s Costa, Guilherme Aguiar.
Síntese de novos compostos planejados como ligantes de hemoglobina com propriedades de doação de óxido nítrico / Guilherme Aguiar Costa. – Araraquara, 2023.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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. Doença falciforme. 2. Anemia falciforme. 3. Hibridização molecular. 4. Óxido nítrico. 5. VZHE-039. 6. Núcleos furoxânicos. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPIES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GUILHERME AGUIAR COSTA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CÂMPUS DE ARARAQUARA.

Aos 19 dias do mês de dezembro do ano de 2023, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GUILHERME AGUIAR COSTA, intitulada **Síntese de novos ligantes de hemoglobina para tratamento da anemia falciforme**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp, Prof. Dr. CLEMILSON BERTO JUNIOR (Participação Virtual) do(a) Campus Macaé da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Prof. Dr. CAUÊ BENITO SCARIM (Participação Virtual) do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS



Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, meu pai Admirson Donizete Costa, minha mãe Agda Maria de Aguiar Costa e meu irmão Gustavo Aguiar Costa, por todo apoio durante esses dois anos. Agradeço ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos por todo o apoio durante essa jornada e aos meus amigos que fiz no laboratório. Agradeço também à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

A doença falciforme (DF) é uma expressão abrangente que engloba um conjunto de condições hereditárias, incluindo a anemia falciforme (AF), HbSC e HbS β -talassemia. Essas condições são caracterizadas por mutações no gene que codifica a subunidade β da hemoglobina (HBB). Destas, a anemia falciforme (AF), a variante mais prevalente da doença falciforme (DF), é uma condição crônica marcada por anemia hemolítica persistente, episódios imprevisíveis de dor e danos difusos aos órgãos. A Anemia Falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária homozigótica crônica para o alelo β^S , resultante de uma mutação no gene que codifica a cadeia β da hemoglobina A (HbA). A troca de uma base nitrogenada no gene HBB leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia β^S da hemoglobina. Subsequentemente, os resíduos de valina das cadeias β interagem com outros aminoácidos gerando um agregado celular que deforma a estrutura do eritrócito, processo esse entendido como polimerização da HbS. A polimerização da HbS ocorre mediante baixa concentração de oxigênio devido seu estado conformacional e sua afinidade por um receptor de membrana presente na parte interna do eritrócito, o cdb3. A falcização das hemoglobinas diminui ainda mais sua afinidade por oxigênio, além de provocar mudanças profundas na homeostasia celular, acarretando deformações no citoesqueleto e membrana das células e subsequente enrijecimento, maior grau de desidratação e um aumento na síntese de espécies reativas de oxigênio. Tais mudanças levarão os eritrócitos à morte prematura, como a hemólise extravascular e intravascular. O fármaco hidroxiureia (HU) é ainda uma das principais opções de tratamento no Brasil, e ainda que não esteja esclarecido o mecanismo de ação do fármaco, acredita-se que este atue aumentando a expressão de hemoglobina fetal através da produção de óxido nítrico, entre outros mecanismos. Em 2019 o *Food and Drug Administration* (FDA), agência regulatória norte americana, aprovou o uso do fármaco voxelotor para o tratamento da anemia falciforme. O voxelotor é um modulador covalente da hemoglobina, pois sua função aldeído estabelece uma base de Schiff com um resíduo de valina na cadeia α da HbS, estabilizando a conformação da hemoglobina e aumentando sua afinidade por oxigênio. Tem sido relatado na literatura alguns compostos que possuem a função aldeído que atuam como modificadores alostéricos da hemoglobina, estabelecendo uma ligação covalente reversível com resíduos de valina na posição 1 das cadeias β . Uma dessas substâncias é o VZHE-039, descoberto por Safo e colaboradores. O VZHE-039 possui algumas vantagens comparadas ao voxelotor, impedindo a falcização das hemácias em condições de hipoxia e anoxia. Nesse sentido, este presente trabalho teve como objetivo planejar e sintetizar através da hibridização molecular, três novos derivados do VZHE-039 conjugados com núcleos furoxânicos de diferentes perfis de liberação de óxido nítrico (NO). Os núcleos furoxânicos foram obtidos de acordo com metodologias já descritas na literatura. Os três compostos finais propostos, 13.1 – 13.3, foram obtidos com rendimentos variando entre 12% e 35%, e foram caracterizados por métodos analíticos. Estudos da avaliação da atividade farmacológica serão conduzidos pelo Dr. Clemilson a partir de dezembro. Espera-se que estes novos compostos possam atuar por um mecanismo dual de ação, induzindo hemoglobina fetal e inibindo a polimerização de HbS, representando uma nova alternativa ao tratamento da doença.

Palavras-chave: doença falciforme; anemia falciforme; hibridização molecular; óxido nítrico; VZHE-039; núcleos furoxânicos.

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is a comprehensive term that encompasses a range of inherited conditions, including sickle cell anemia (SCA), HbSC, and HbS β -thalassemia. These conditions are characterized by mutations in the gene encoding the β subunit of hemoglobin (HBB). Among them, sickle cell anemia (SCA), the most prevalent variant of sickle cell disease (SCD), is a chronic condition marked by persistent hemolytic anemia, unpredictable episodes of pain, and widespread organ damage. Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary homozygous hemoglobinopathy for the β S allele, resulting from a mutation in the gene encoding the β chain of hemoglobin A (HbA). The substitution of a nitrogenous base in the HBB gene leads to the replacement of a glutamic acid with a valine at position 6 of the β S chain of hemoglobin. Subsequently, valine residues in the β chains interact with other amino acids, generating a cellular aggregate that deforms the structure of the erythrocyte, a process known as polymerization of HbS. Polymerization of HbS occurs under low oxygen concentration due to its conformational state and its affinity for a membrane receptor present on the inner side of the erythrocyte, cdb3. The sickling of hemoglobin's further reduces their oxygen affinity, causing profound changes in cellular homeostasis, leading to deformations in the cytoskeleton and cell membrane, subsequent stiffening, increased dehydration, and an increase in reactive oxygen species synthesis. These changes will lead erythrocytes to premature death, such as extravascular and intravascular hemolysis. Hydroxyurea (HU) remains one of the main treatment options in Brazil, and although the mechanism of action of the drug is not fully understood, it is believed to increase fetal hemoglobin expression through nitric oxide production, among other mechanisms. In 2019, the Food and Drug Administration (FDA), the US regulatory agency, approved the use of the drug voxelotor for the treatment of sickle cell anemia. Voxelotor is a covalent modulator of hemoglobin, as its aldehyde function forms a Schiff base with a valine residue in the α chain of HbS, stabilizing the conformation of hemoglobin and increasing its oxygen affinity. Some compounds with aldehyde function have been reported in the literature to act as allosteric modifiers of hemoglobin. One of these substances is VZHE-039, discovered by Safo and colleagues. VZHE-039 has some advantages compared to voxelotor, preventing the sickling of red blood cells under conditions of anoxia. In this context, the present study aimed to design and synthesize, through molecular hybridization, three new derivatives of VZHE-039 conjugated with furoxan nuclei with different nitric oxide (NO) release profiles. The furoxan nuclei were obtained according to methodologies already described in the literature. The three proposed final compounds, 13.1 – 13.3, were obtained with yields ranging from 12% to 35% and were characterized by analytical methods.

Pharmacological activity evaluation studies realized by Dr. Clemilson are underway. It is hoped that these new compounds can act through a dual mechanism of action, representing a novel alternative for the treatment of the disease.

Keywords: sickle cell disease; sickle cell anemia; molecular hybridization; nitric oxide; VZHE-039; furoxan rings.

Lista de Figuras

Figura 1 – Troca de aminoácidos no sexto códon do gene HBB.....	18
Figura 2 – Polimerização da Hemoglobina SS.....	19
Figura 3 – Complicações agudas e crônicas decorrentes da anemia falciforme.....	21
Figura 4 – Distribuição global de nascimentos com doença falciforme, prevalência e mortalidade.....	26
Figura 5 – Produção de óxido nítrico endógeno e depleção causados pela hemólise intravascular.....	30
Figura 6 – Adesão celular e vaso-oclusão.....	33
Figura 7 – Fármacos aprovados pelo FDA.....	34
Figura 8 – Interação entre o Voxelotor e o grupo amino presente no resíduo de valina na cadeia α	38
Figura 9 – Estrutura química dos ligantes de hemoglobina.....	40
Figura 10 – Cristalografia de raios-X mostrando a ligação covalente irreversível VZHE-039 com a cadeia α da hemoglobina.....	41
Figura 11 – Estrutura química do composto PF-070509013.....	42
Figura 12 – Derivados de VZHE-039 com diferentes perfis de liberação de NO.....	48
Figura 13 – Mecanismo proposto para liberação de NO pelo anel furoxânico.....	49
Figura 14 – Síntese dos derivados VZHE-039 acoplados com o furoxano como doador de óxido nítrico.....	51
Figura 15 – síntese do furoxano (2).....	52
Figura 16 – Síntese do furoxano (4).....	52
Figura 17 – Rota sintética para obtenção do furoxano (8).....	53
Figura 18 – Síntese dos intermediários híbridos 10.1 – 10.3.....	54
Figura 19 – Reação de bromação utilizando o brometo de tionila para a formação dos haletos de alquila 11.1 – 11.3.....	55
Figura 20 – Síntese dos produtos finais 13.1 – 13.3.....	56
Figura 21 – Mecanismo para formação do núcleo furoxano.....	57
Figura 22 – Ressonância do carbono ligado ao <i>N</i> -óxido.....	58
Figura 23 – Mecanismo reacional SN_2	59
Figura 24 – Mecanismo da substituição nucleofílica aromática para obtenção dos primeiros intermediários.....	60

Figura 25 – Mecanismo de bromação utilizando o brometo de tionila para obtenção dos intermediários 11.1 – 11.3.....	63
Figura 26 – Mecanismo da S_N2 para as moléculas finais.....	65
Figura 27 - Espectrofotometria na região do infravermelho com faixa de frequência entre 4000 e 400 cm^{-1} para (13.1).....	68
Figura 28 - Espectrofotometria na região do infravermelho com faixa de frequência entre 4000 a 400 cm^{-1} para (13.3).....	69

Lista de Quadros

Quadro 1 – Haplotipos da Doença falciforme.....	24
Quadro 2 – Deslocamentos químicos dos primeiros intermediários nos espectros de ^1H e ^{13}C	62
Quadro 3 – deslocamentos químicos para os intermediários halogenados.....	64
Quadro 4 – Deslocamentos químicos dos produtos finais nos espectros de ^1H e ^{13}C	66
Quadro 5 – Bandas no infravermelho para o composto (13.1).....	68
Quadro 6 – Bandas de estiramento no infravermelho para (13.3).....	68

Lista de Abreviaturas

HbA	– Hemoglobina adulta
HbF	– Hemoglobina fetal
HbS	– Hemoglobina falciforme
CO	– Monóxido de carbono
NO	– Óxido nítrico
NOS	– Óxido nítrico sintase
2,3-DPG	– 2,3-difosfoglicerato
DF	– Doenças falciformes
AF	– Anemia falciforme
GTP	– Guanosina trifosfato
cGMP	– Guanilato monofosfato cíclica
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
5-HMF	– 5-hidróximetilfurfural
C.C.D	– Cromatografia em camada delgada
M.M	– Massa molar
v/v	– Volume/volume
RMN	– Ressonância magnética nuclear
DBU	– 1,8-diazobiciclo[5.4.0]undec-7-eno
DMF	– <i>N,N'</i> -dimetilformamida
SNAr	– Substituição nucleofílica aromática
SN ₂	– Substituição nucleofílica alifática bimolecular
HBr	– Ácido bromídrico
HCl	– Ácido clorídrico
HP	– Hipertensão pulmonar
STA	– Síndrome torácica aguda
ROS	– Espécies reativas de oxigênio
TNF- α	– Fator de Necrose Tumoral alfa
SO ₂	– Dióxido de enxofre
eNOS	– Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	– Óxido nítrico sintase induzida
nNOS	– Óxido nítrico sintase neuronal
DAMP	– Moléculas de padrão molecular associadas ao dano

TRL-2 – *Toll-like receptor 2*

TRL-4 – *Toll-like receptor 4*

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule 1*

ICAM-1 – *Intercellular adhesion molecule 1*

ICAM-2 – *Intercellular adhesion molecule 2*

HU - Hidroxiureia

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EMA – *European Medicines Evaluation Agency*

HSC – célula tronco hematopoiética

GBD – *Global Burden of Disease*

GBD21 – *Global Burden of Disease 2021*

ET-1 – Endotelina 1

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1. Aspectos gerais.....	17
1.1.1. Variações genéticas – haplotipos da AF.....	23
1.1.2. Epidemiologia.....	24
1.1.3. Diagnóstico.....	26
1.1.4. Fisiopatologia.....	27
1.1.4.1. Hemólise intravascular e estresse oxidativo.....	29
1.1.4.2. Vasculopatia e vaso-oclusão.....	30
1.1.5. Tratamento.....	33
1.1.5.1. Hidroxiureia.....	34
1.1.5.2. L-glutamina.....	36
1.1.5.3. Crizanlizumabe.....	37
1.1.5.4. Voxelotor.....	38
1.2. Agentes Inibidores de polimerização da HbS.....	39
2. Objetivos.....	44
2.1. Objetivos específicos.....	44
3. Material e Métodos.....	45
3.1. Reagentes e Solventes.....	45
3.2. Equipamentos.....	46
3.3. Metodologias analíticas.....	47
3.3.1. Cromatografia em camada delgada.....	47
3.3.2. Espectrometria de RMN ¹ H e ¹³ C.....	47
3.3.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV).....	47
3.3.4. Determinação da faixa de fusão.....	47
3.4. Planejamento Estrutural.....	48
3.5. Metodologia sintética.....	50
3.6. Procedimentos sintéticos.....	52
4. Resultados e Discussão.....	57
4.1. Síntese dos derivados furoxânicos.....	57
4.1.1. Síntese dos núcleos furoxânicos.....	57
4.1.2. Síntese dos derivados furoxânicos.....	60
4.1.3. Síntese dos compostos finais.....	65

5. Conclusões.....	71
Referencias.....	72
Apêndice A – Espectros de RMN.....	84

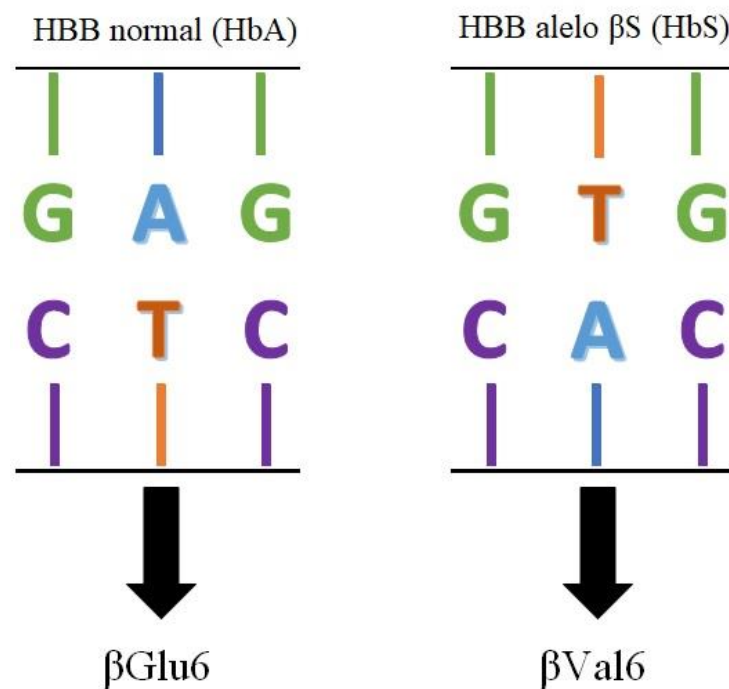
1. Introdução

1.1. Aspectos gerais

A doença falciforme (DF) é uma expressão abrangente que engloba um conjunto de condições hereditárias, incluindo a anemia falciforme (AF), HbSC e HbS β -talassemia. Essas condições são caracterizadas por mutações no gene que codifica a subunidade β da hemoglobina (HBB). A HbSC, oriunda de uma segunda mutação no sexto códon do gene HBB, onde uma citosina é substituída por uma timina (CTC $\rightarrow$ TTC), leva à síntese de uma lisina na posição 6 da β -globina (KATO *et al.*, 2018). Entretanto, dentre as doenças falciformes, a anemia falciforme (AF), a variante mais prevalente da DF, é caracterizada pela homozigose do alelo β^s , dando origem ao genótipo HbSS, onde as hemácias apresentam produção majoritária de hemoglobina S (HbS) (KATO *et al.*, 2009).

Na AF, uma mutação no sexto códon do gene da β -globina (HBB), da origem ao alelo β^s , na qual uma adenina é substituída por uma timina (CTC $\rightarrow$ CAC), como mostra a Figura 1, ocasionando a síntese de uma valina na posição 6 da β -globina ao invés de um ácido glutâmico, originando a HbS (BUNN, 1997). O sexto códon do gene da globina β normal é constituído por citosina-timina-citosina (CTC) e tem a função de codificar um ácido glutâmico (KATO *et al.*, 2009). Este resíduo de aminoácido está localizado na superfície da globina e, em condições fisiológicas de pH, a sua subunidade carboxílica permanece desprotonada, resultando em repulsão quando se aproxima de outras cadeias globínicas. No contexto da AF, a valina que se encontra na posição 6 apresenta uma interação do tipo proteína-proteína estéreo específica com resíduos de leucina na posição 88 e fenilalanina na posição 85 de cadeias β adjacentes, como demonstrado em estudo de cristalografia de raio-X, sendo interações importantes para a estabilização do polímero que surge em decorrência do processo de polimerização. (ADACHI *et al.*, 1987; WARD *et al.*, 1975).

Figura 1 – Troca de aminoácidos no sexto códon do gene HBB.

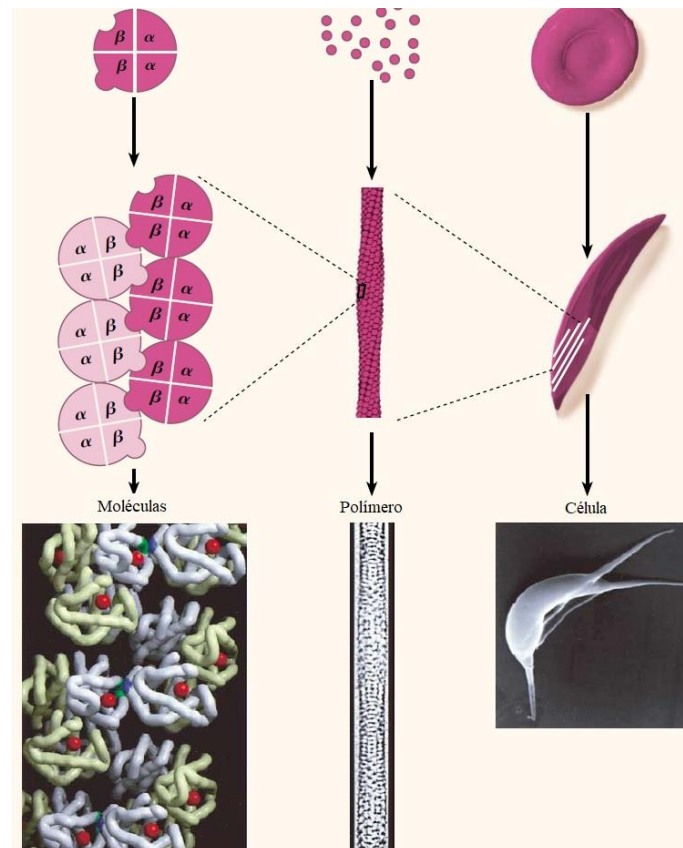


Fonte: próprio autor.

A polimerização das hemoglobinas é um processo que pode ser desencadeado mediante vários fatores como hipoxia, pH, temperatura e a presença de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DFG), um intermediário glicolítico capaz de modular alostéricamente a hemoglobina em ambientes e/ou situações de baixa concentração de oxigênio (KATO *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2015).

Em condições de hipoxia, a hemoglobina assume sua conformação desoxigenada (estado T). Nesse caso, interações hidrofóbicas da cadeia β favorecem a formação de polímeros intracelulares (Figura 2). Episódios repetidos de polimerização e despolimerização acarretam danos profundos na morfologia dos eritrócitos, originando células falciformes permanentes, isto é, incapazes de restaurar sua configuração natural e conferindo à hemácia a característica forma de foice, característico da doença (ABDU; GÓMEZ-MÁRQUEZ; ALDRICH, 2008; BRITTENHAM; SCHECHTER; NOGUCHI, 1985; KATO *et al.*, 2018).

Figura 2 – Polimerização da Hemoglobina SS.



Fonte: retirado e adaptado de (BUNN, 1997).

As alterações do citoesqueleto do eritrócito provocam danos à membrana celular, promovendo a hemólise intra e extravascular. A hemólise extravascular ocorre primariamente no baço, sendo mediada por macrófagos presentes na polpa vermelha que filtram o sangue, retirando materiais indesejados, como hemácias senescentes ou danificadas (BROUSSE; BUFFET; REES, 2014; SESTI-COSTA; COSTA; CONRAN, 2023). O baço é o primeiro órgão afetado pela doença, sendo registrado casos de sequestro agudo esplênico logo nos primeiros meses de vida (NARDO-MARINO, 2022; PEARSON *et al.*, 1985). O sequestre agudo esplênico compreende um extenso acúmulo de eritrócitos falcizados no baço com consequente queda de hemácias circulantes, que, quando não tratado adequadamente, pode levar o paciente à óbito por choque hipovolêmico (EL HOSS; BROUSSE, 2019). Devido ao seu papel biológico de filtrar o tecido sanguíneo, na AF o baço é um dos órgãos mais afetados devido a extensa e recorrente hemólise extravascular. Além do sequestro agudo esplênico, outros problemas referentes ao baço são relatadas, como hiperesplenismo e a esplenomegalia. Com o passar dos anos, a maioria dos pacientes apresentarão autoesplenectomia, isto é, perda da atividade do baço por fibrose do

órgão devido aos danos crônicos causados pela AF. A perda do baço torna os pacientes falciformes mais suscetíveis a infecções, especialmente aquelas causadas por bactérias encapsuladas, como por exemplo a pneumonia causada por *Streptococcus pneumoniae* (EL HOSS; BROUSSE, 2019).

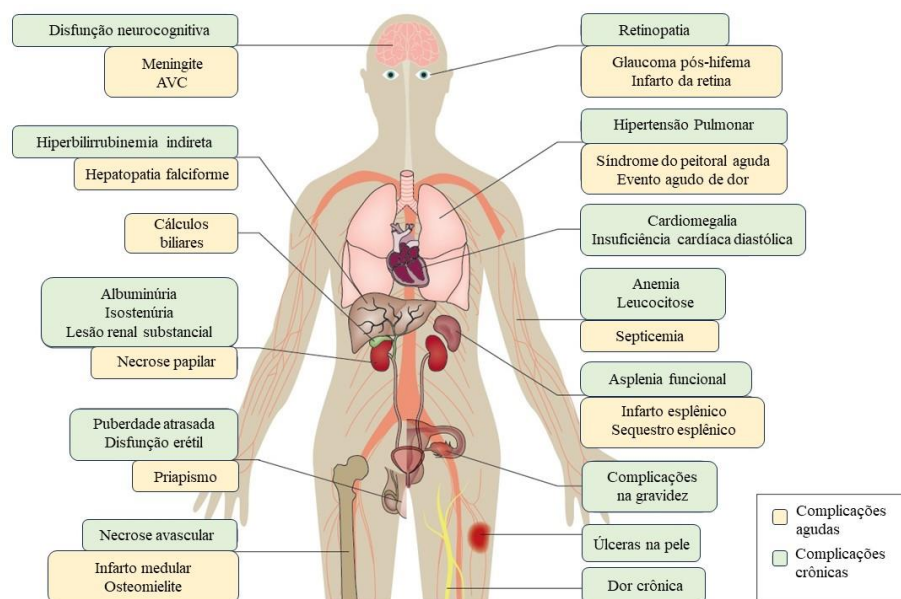
Já a hemólise intravascular compreende na destruição dos eritrócitos na luz dos vasos, havendo liberação do conteúdo intracelular, o que inclui as hemoglobinas e a enzima *l*-arginase. O ferro presente no grupo heme da Hb livre tem a capacidade de se ligar a outros gases além do oxigênio, por exemplo, o monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂) e o óxido nítrico (NO). Os grupos heme livres podem atuar ‘sequestrando’ NO circulante e produzido pelo endotélio vascular pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), reduzindo a concentração desse mediador, capaz de promover vasodilatação e diminuição da agregação plaquetária. Associado a este fato, adiciona-se o efeito da liberação da enzima *l*-arginase. Esta última, converte arginina em ornitina e ureia, reduzindo a concentração plasmática de arginina, que serve como substrato para a enzima NOS, essencial para a produção de NO. Dessa forma, os pacientes apresentam uma maior propensão à vasoconstrição, caracterizada pela depleção do NO assim como uma maior ativação das células endoteliais e ativação plaquetária (KATO *et al.*, 2018).

O quadro de hemólise também contribui com a indução de um quadro inflamatório, que pela característica da própria doença, se caracteriza como um processo inflamatório crônico. A hemoglobina e outras moléculas de padrão molecular associado ao dano (DAMP) – liberadas pelos eritrócitos danificados e produtos da matriz intracelular (ex. ATP, DNA, entre outros) desencadeiam a ativação do sistema imunológico inato. Os receptores *Toll-like* 4 (TLR4) e TLR2, quando ligados a estes ligantes, estimulam monócitos e macrófagos a liberar citocinas inflamatórias, promovendo um estado inflamatório e a ativação de células endoteliais. A ativação do TLR4 em plaquetas favorece sua adesão a neutrófilos. O aumento de diversas citocinas inflamatórias como as interleucinas (IL) IL-1 β e IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), aumenta o quadro inflamatório crônico, e pode entre outras ações, aumentar a expressão de moléculas de adesão (ex. *intercellular adhesion molecule 1*, (ICAM), *vascular cell adhesion molecule*, (VCAM)) e a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular (MALAVÉ *et al.*, 1993; KATO *et al.*, 2018). Adicionalmente, a própria diminuição nas taxas de NO acentua o aumento na produção de endotelina-1 (ET-1) e a expressão de moléculas de adesão, tais como *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), P-selectina, E-selectina, entre outras (CARDILLO *et al.*, 2000).

Esses fenômenos associados contribuem para o quadro de vaso-oclusão devido as interações das células sanguíneas circulantes entre si e com o endotélio ativado. As plaquetas ativadas e eritrócitos falciformes podem aderir a neutrófilos circulantes ou ao próprio endotélio, formando agregados celulares que obstruem o fluxo sanguíneo, principalmente nas vênulas pós-capilares. A vaso-oclusão causada pelos agregados heterocelulares, formado entre eritrócito falciforme, plaquetas ativadas e neutrófilos, resulta em infarto de pequenos e médios vasos, desencadeando dores crônicas, infartos e lesões em órgãos e tecidos, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes (KATO *et al.*, 2018)

Os sintomas da AF são múltiplos, sendo decorrentes da vasta e complexa fisiopatologia da doença. A Figura 3 destaca as principais complicações agudas e crônicas decorrentes da AF. Entre essas complicações podemos citar: dores crônicas, priapismo, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, anemia hemolítica, infartos no baço, medula óssea e retina (AKINSHEYE; KLINGS, 2010; CONNES *et al.*, 2016; FAES; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2018; NOUBOUOSSIE; KEY; ATAGA, 2016; KATO *et al.*, 2018).

Figura 3 – Complicações agudas e crônicas decorrentes da anemia falciforme



Fonte: retirado de (KATO *et al.*, 2018)

Atualmente são poucos os fármacos disponíveis para o tratamento da AF, sendo aprovado pela agência regulatória norte americana *Food and Drug Administration* (FDA), dos quais é possível destacar: a hidroxiureia (HU), o voxelotor (GB-440), o anticorpo monoclonal crizanlizumabe e o aminoácido L-glutamina. No Brasil, a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) aprovou a HU e o crizanlizumabe. Destes fármacos aprovados no país, HU é o tratamento mais

eficaz para doença falciforme até o momento, uma vez que o crizanlizumabe teve seu registro cancelado em 2023 pela ANVISA e pela agência europeia *European Medicines Evaluation Agency* (EMA), devido a falhas na comprovação da eficácia, e ausência de informações robustas em que os benefícios superavam os riscos no uso do medicamento, no estudo clínico STAND2 (ANVISA, Resolução RE Nº 3.959, de 19 de outubro de 2023).

Apesar de aprovado nos Estados Unidos, os dados clínicos obtidos por meio de revisões sistemáticas tem dados clínicos obtidos por meio de revisões sistemáticas têm avaliado criticamente os reais benefícios da *L*-glutamina na redução das complicações agudas da doença (QUINN, 2018).

O voxelotor, um inibidor da polimerização da hemoglobina S que atua aumentando a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e estabilizando o estado oxigenado da hemoglobina, foi aprovado pelo FDA em 2019 e, é apenas comercializado nos Estados Unidos sob o nome Oxbryta®. Em seu estudo de Fase 3, duplo-cego, controlado por placebo (ensaio HOPE), o tratamento com voxelotor resultou em um aumento significativo nos níveis de hemoglobina e na redução dos marcadores de hemólise. Entretanto, estudos de monitoramento de sua eficácia e segurança têm sido conduzidos a fim de avaliar mais amplamente os riscos e os benefícios do tratamento (METCALF *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2022).

Outras abordagens para a cura da doença têm sido exploradas, como a terapia gênica e transplante de células-tronco hematopoiéticas. Os recentes avanços em transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSC) e plataformas de terapia gênica, como vetores lentivirais e estratégias de edição gênica, ampliam as opções potencialmente curativas para pacientes com a doença falciforme. Em 2023, o FDA aprovou dois tratamentos inovadores, Casgevy® e Lyfgenia®, representando as primeiras terapias gênicas baseadas em células para o tratamento da AF (FDA, 2023; WONG, 2023).

O Casgevy® é uma terapia gênica inovadora que consiste no silenciamento do gene BCL11A, gene responsável por inibir a produção de γ -globina. Primeiramente, HSC são coletadas do próprio paciente. Em seguida, o gene BCL11A é editado através da técnica CRISPR/Cas9. O silenciamento desse gene resulta no aumento da produção de hemoglobina fetal (FDA, 2023; WONG, 2023)

A Lyfgenia® é uma terapia gênica que consiste na modificação do genoma de HSC através de vetor lentiviral. O vetor BB305 LVV é usado para modificar o genoma do paciente *ex vivo*, contendo em si um gene de β -globina modificado denominado β^{A-T87Q} , dando origem a hemoglobina adulta modificada HbA^{T87Q}. Tal gene modificado resulta na produção de uma HbA

cuja cadeia β globinica apresenta uma troca de resíduos de aminoácidos na posição 87, onde uma treonina é substituída por uma glutamina. As hemácias contendo HbA^{T87Q} apresentam menor risco de falcização e oclusão dos vasos sanguíneos. Entretanto, é vital ressaltar que a terapia Lyfgenia[®] pode causar desordens sanguínea malignas como a leucemia mieloide aguda e síndrome mielodisplásica. (BLUEBIRDBIO, 2023; WONG, 2023; FDA, 2023).

Embora os avanços atuais em terapia gênica e transplante de células-tronco hematopoiéticas apontem para perspectivas promissoras de alcançar a cura para a doença, essa realidade ainda está distante para os países de baixa renda devido aos altos custos de tais tecnologias. Além disso, a severidade da doença é diferente entre os haplotipos, em que terapias usando fármacos podem melhorar substancialmente a qualidade de vida dos pacientes, reduzindo a morbidade. Neste sentido, a descoberta de novos fármacos ainda se torna necessário, podendo ser um recurso adicional às opções médicas. Neste cenário, é nítido a falta de recursos terapêutico para o tratamento da AF e a necessidade de busca de novos fármacos, assim, a busca por novas estratégias farmacológicas é imprescindível e necessária.

1.1.1. Variações genéticas – haplotipos da AF.

Tem sido relatado que a distribuição geográfica do alelo β^S (Figura 3) seja oriundo de dois fatores: endemicidade da malária e tráfico de pessoas escravizadas. A malária é particularmente endêmica na África Subsaariana, Oriente Médio e Índia. Foi observado na clínica que indivíduos portadores de DF apresentam quadros mais brandos e formas menos severas de infecção por *Plasmodium spp.*, entretanto, os mecanismos por trás desta resistência ainda são desconhecidos (DAAK *et al*, 2016; ESOH; WONKAM, 2021).

Os deslocamentos populacionais oriundos de imigrações e tráfico de pessoas escravizadas no século XVIII, resultaram em uma distribuição mais abrangente do alelo β^S , principalmente nas Américas e na Europa. A forma mais frequente de variabilidade no complexo gênico da globina beta é causada por variações nas sequências que modificam o sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição, possibilitando identificar a constituição das regiões adjacentes ao locus beta (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A determinação do padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é denominada haplótipo. Na AF, o tipo de haplótipo associado ao gene de HbS tem relação com a severidade e gravidade da doença. Por exemplo, o haplótipo Senegal está associado a níveis elevados de HbF (>15%) e a um curso clínico menos severo da doença; o Benin, a níveis médios

de HbF (5% a 15%) e a um curso clínico intermediário; o Bantu ou República Centro-Africana, a níveis reduzidos de HbF (<5%) e a um quadro clínico mais severo (FERTRIN; COSTA, 2010; NASCIMENTO *et al*, 2017).

Estudos genéticos identificaram cinco haplotipos presentes no mundo, classificados em cinco tipos diferentes, de acordo com a origem étnica e geográfica onde predominam (Tabela 1). O haplótipo Benin tem sido vinculado à região da África Ocidental; o Bantu ou República Centro-Africana à região da África Oriental e Centro-Sul; o Senegal à região da África Atlântico-Ocidental; o Árabe-Indiano à Índia e à Península Arábica, e o Camarões à Costa Ocidental Africana (NASCIMENTO *et al*, 2017).

No Brasil, embora se observe heterogeneidade na distribuição dos haplotipos, os mais comumente encontrados são Benin e Bantu (DAAK *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2003; KAN; DOZY, 1978; NASCIMENTO *et al.*, 2017). A Tabela 1 relaciona os cinco haplotipos da DF com suas respectivas origens e características.

Quadro 1 – Haplotipos da Doença falciforme.

Haplotipos	Distribuição geográfica
Benin	Oeste da África – apresenta persistência mediana de HbF (5 a 15%)
Bantu	África Central – apresenta baixa persistência de HbF (<5%)
Senegal	Porção do Atlântico no oeste da África – apresenta alta persistência de HbF (>15%),
Camarão	Costa oeste da África – apresenta baixa persistência de HbF (<5%)
Arábico-Indiano	Índia e Península arábica – apresenta alta persistência de HbF

Fonte: próprio autor (AMBROSE *et al.*, 2020; BITOUNGUI *et al.*, 2015; JASTANIAH, 2011; KAN e DOZY, 1978; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

1.1.2. Epidemiologia

Piel e colaboradores, em 2010, estimou o nascimento de cerca de 312.000 indivíduos com HbS apenas. Em 2019 a *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study* (GBD) estimou o nascimento de cerca de 586.000 indivíduos com traço falciforme, doença falciforme e talassemias. Já em 2021 a GBD estimou um aumento superior a 14% de nascimentos quando comparados com dados do ano 2000, no qual foi observado cerca de 453.000 nascimentos, em contraste com cerca de 515.000 nascimentos em 2021. Desses 515.000, cerca de 394.000

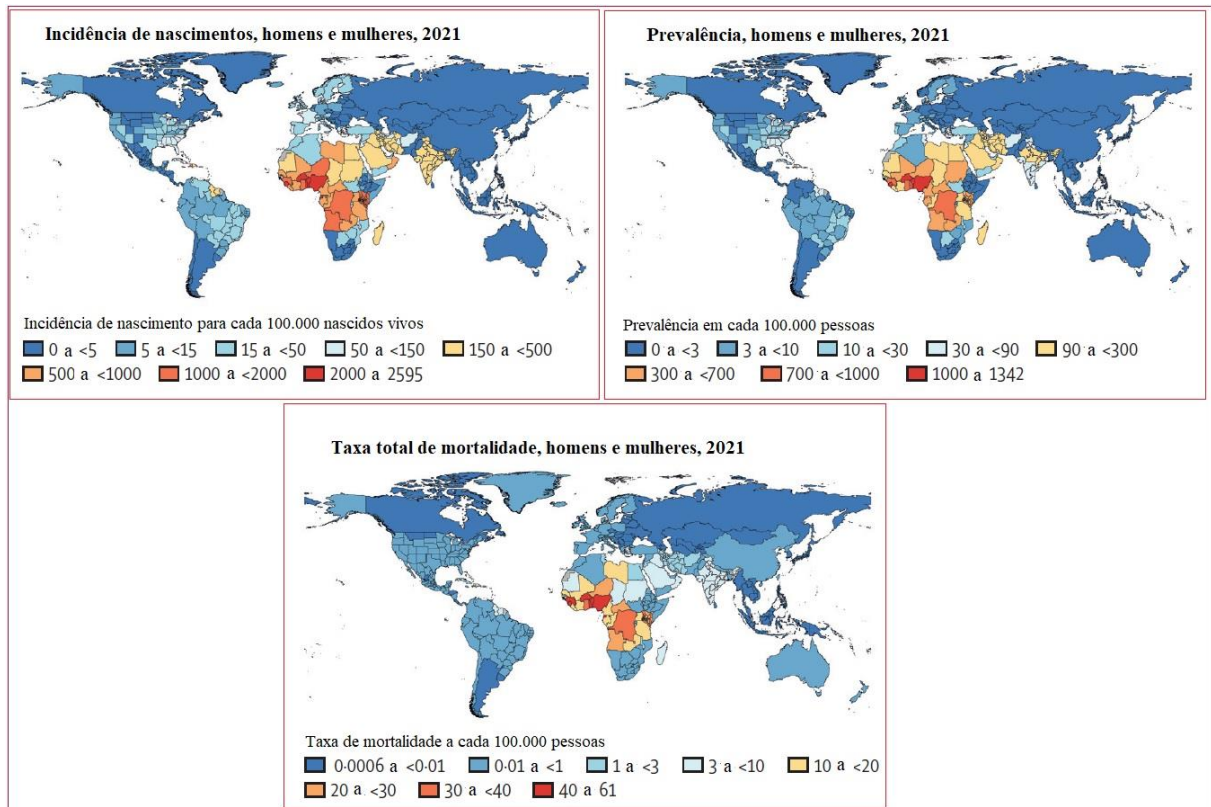
nascimentos são de indivíduos homozigotos para o alelo β^s e β^0 talassemia. Aproximadamente 101.000 nascidos dos 515.000 possuem genótipo HbSC. A África subsaariana apresenta a maior taxa de mortalidade por causa da doença falciforme, tendo sido observado um aumento de aproximadamente 65% de 2000 a 2021, isto é, de 165.000 mortes estimadas em 2000 para 265.000 mortes estimadas em 2021. A GBD21 estimou que em 2021, para cada 100.000 pessoas, de 40 a 61 óbitos eram decorrentes da doença falciforme na África Subsaariana (Figura 4) (THOMSON *et al.*, 2023).

No Brasil, a AF é a doença hematologia hereditária mais comum, ocorrendo principalmente entre afrodescendentes. Dados do Ministério da Saúde estimam que o número de casos (HbSS; homozigotos) alcance cerca de 25-30 mil indivíduos, e que o número de novos casos alcance anualmente 3.500 recém-nascidos (CANÇADO; JESUS, 2007). Os custos associados, diretos e indiretos, em 2018 foram estimados em 1,5 bilhão de reais (PINTO *et al.*, 2020).

A ocorrência da AF em recém-nascidos apresenta variações significativas entre os estados brasileiros. Na Bahia, de acordo com dados de 2014, 1 a cada 650 recém-nascidos eram homozigotos. No mesmo ano no Rio de Janeiro, foram encontrados dados de 1 a cada 1300 recém-nascidos, enquanto em Santa Catarina, esse número foi de 1 a cada 13:500 recém-nascidos (KATO *et al.*, 2018).

Em 2016, dados do programa de triagem neonatal, revelaram que 1071 recém-nascidos eram homozigotos e mais de 60 mil heterozigotos para o alelo β^s . Os indivíduos heterozigotos apresentam o traço falciforme. Nestes os fenômenos vaso-oclusivos não se manifestam em condições fisiológicas, o que permite uma expectativa de vida semelhante àquela da população em geral (ROCHA, 2004). Para estes indivíduos, portadores do traço falciforme, são poucos os relatos de morte súbita, sendo descrito para condições exaustivas e extenuantes como num relato de recrutas americanos submetidos a exercícios físicos intensos (KARK; POSEY, 1987). Condições de hipoxia, acidose e desidratação podem gerar complicações em pacientes vivendo com o traço falciforme (AUSTIN *et al.*, 2007). Uma das maiores relevâncias do traço falciforme é sua ampla distribuição na população, podendo alcançar de 2-8% dos afro descendentes. Essa identificação é importante para fins de aconselhamento genético, uma vez que o filho de pais com traço falciforme apresenta 25% de chances de que seus filhos sejam homozigotos (HbSS) (MURAO; FERRAZ, 2007).

Figura 4 – Distribuição global de nascimentos com doença falciforme, prevalência e mortalidade.



Fonte: retirado e adaptado de (THOMSON *et al.*, 2023).

1.1.3. Diagnóstico

Para fins de diagnóstico existem quatro períodos principais de testagem: preconcepção, pré-natal, neonatal e pós-neonatal. Na primeira (preconcepção), o objetivo é o de identificar potenciais pais assintomáticos cujos descendentes teriam risco de apresentar a doença. Está atrelado ao aconselhamento genético, e do ponto de vista laboratorial utiliza-se técnicas que visam a separação/identificação das hemoglobinas por técnicas como eletroforese de hemoglobina, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e foco isoeletrico (ARASHI; ALHADRAMI; ZOUROB, 2021).

Para os pais que apresentaram testagem positiva na etapa de preconcepção é oferecido o diagnóstico pré-natal que visa analisar amostras de DNA fetal obtidas por meio da análise de vilosidades coriônicas realizada na nona semana de gestação. Já o diagnóstico neonatal é realizado no nascimento antes que os sintomas ocorram, utilizando metodologias de análise da hemoglobina. Essa é uma importante etapa do cuidado com o paciente, pois o tratamento profilático com penicilina e educação para saúde com os pais podem reduzir a mortalidade para níveis inferiores a 3% (GASTON *et al.*, 1986).

No Brasil, o diagnóstico pós-neonatal é parte do programa de triagem neonatal implementado como um programa oficial do governo federal em 2001, sendo realizado pelo ‘teste do pezinho’. Embora seja parte de um programa nacional, tem sido relatado que a abrangência e cobertura pode ser diferente entre os Estados. Um exemplo é o Estado do Amapá com cobertura, em 2017, de apenas 55% dos hospitais. Os programas de triagem neonatal contribuem para identificar as necessidades dos indivíduos e reduzir as principais complicações encontradas nos neonatos como, infecção e sequestro esplênico, reduzindo a mortalidade (KATO *et al.*, 2018).

Como previamente comentado, o diagnóstico da AF neste estágio, é feito laboratorialmente através da caracterização da HbS por eletroforese. Outras metodologias incluem a Eletroforese com Focalização Isoelétrica (FIE) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) seguido de sequenciamento do DNA (ARASHI; ALHADRAMI; ZOUROB, 2021; BALLAS, 1998).

1.1.4. Fisiopatologia

A hemoglobina (Hb) é uma proteína presente no eritrócito responsável pelo transporte de oxigênio. Estruturalmente ela é constituída por quatro subunidades de globinas, associadas a um cofator heme. As diferentes combinações de globinas presentes na Hb resultam em diferentes tipos de tetrâmeros, produzidos em três estágios distintos da vida humana. Para fins deste texto ilustraremos algumas Hb expressas em três estágios distintos da vida humana: embrionária (compreende desde a fertilização e dura oito semanas), fetal (período entre a décima semana de gestação até o parto) e adulta.

A hemoglobina embrionária é formada por duas cadeias alfa (α) e duas cadeias épsilon (ϵ), a HbF consiste em duas cadeias de globina α e duas cadeias de globina gama (γ), sendo produzida predominantemente nos primeiros meses de gestação. Após, ocorre a troca, onde torna-se predominante a HbA. A HbA ($\alpha_2\beta_2$) é constituída por duas cadeias alfa (α) e duas cadeias beta (β), e representa cerca de 96% das Hb totais em adultos saudáveis. A hemoglobina A₂ (HbA₂) também encontrada em adultos é constituída por duas cadeias alfa (α) e duas cadeias delta (SANTOS, 2012).

Conforme, anteriormente comentado, essa troca produz modificações nas propriedades físico-químicas da HbS, uma vez que diferentemente do ácido glutâmico carregado negativamente, a valina é um aminoácido hidrofóbico e que não apresenta carga. No estado oxigenado (estado R), a HbS não se polimeriza no interior da hemácia, mas em condições de hipoxia, a hemoglobina assume sua conformação desoxigenada (estado T) e se polimeriza, formando

fibras helicoidais no interior da célula. A formação de polímeros da HbS apresenta uma correlação exponencial com a concentração de HbS no interior do eritrócito, sendo polimerização da HbS a etapa inicial da fisiopatologia da AF. Conforme as fibras poliméricas se estendem, ocorre a deformação dos eritrócitos, interferindo em sua flexibilidade e propriedades reológicas, podendo levar a conhecida forma de foice – característica na doença. A HbS possui ainda menor afinidade pelo oxigênio e menor afinidade por algumas moléculas como a 2,3-difosfoglicerato (2,3-DFG). O 2,3-DFG é um intermediário glicolítico presente fisiologicamente em níveis muito elevados nos eritrócitos falciformes e, por meio da interação com as subunidades de globina β desoxigenadas, diminui a afinidade da Hb pelo oxigênio (SUN *et al.*, 2016).

Acredita-se que os danos causados à membrana pelos repetidos processos de falcização levam à exposição de algumas moléculas a superfície do eritrócito, como por exemplo, a fosfatidilserina. A fosfatidilserina é um fosfolípido de membrana que se encontra no folheto interno da bicamada lipídica na maioria das células saudáveis. A exposição de fosfatidilserina e outras moléculas que fazem parte da estrutura da membrana celular do eritrócito pode ser fator determinante para a sinalização de fagócitos, ativação do sistema complemento e adesão desses eritrócitos (BOAS; FORMAN; BEUTLER, 1998; CYTLAK *et al.*, 2013; HEBBEL, 1991; KUYPERS, 2008; LI; LIKOTRAFITIS, 2015; LUBIN *et al.*, 1981; WOOD; GIBSON; TAIT, 1996; ZACHOWSKI *et al.*, 1985).

A falcização também está relacionada a maior propensão dessas células sofrerem hemólise intravascular. A hemólise intravascular leva ao extravasamento do conteúdo intracelular na luz dos vasos sanguíneos, liberando hemoglobina e a enzima *L*-arginase. A enzima *L*-arginase converte arginina em ornitina e ureia, diminuindo a concentração plasmática de arginina, que serve como substrato para a NOS na produção de NO. A presença de hemoglobina extracelular, seja no plasma ou em micropartículas, e a presença do grupo heme no plasma induzem um significativo estresse oxidativo, aumentando a auto oxidação da HbS e contribuindo com o dano da membrana celular dos eritrócitos circulantes, piorando o quadro de hemólise. Além disso, o grupo heme da Hb liberada durante a hemólise reduz os níveis de NO, induzindo a disfunção vascular, reduzindo a vasodilatação, alterando o estado de ativação das plaquetas e aumentando a expressão de moléculas de adesão celular e vascular (DE CATERINA *et al.*, 1995; KATO *et al.*, 2018).

Outro ponto relevante da fisiopatologia é a desidratação celular. A desidratação celular é uma consequência da deformação morfológica dos eritrócitos e, é mediada pela disfunção de dois

canais de efluxo, o Canal de Gardos, que realiza o efluxo de íons K^+ mediante ativação de íons Ca^{2+} e os cotransportadores de K^+Cl^- (KCC1, KCC3 e KCC4) (BRUGNARA *et al.*, 1993; WALSH e STEWART, 2010). A severa desidratação celular de eritrócitos contendo HbS resulta na queda da flexibilidade, rigidez e fragilidade da membrana celular, favorecendo a polimerização e tornando-as mais propensas a hemólise intravascular (BRUGNARA *et al.*, 1993; HUISJES *et al.*, 2018).

1.1.4.1. Hemólise intravascular e estresse oxidativo

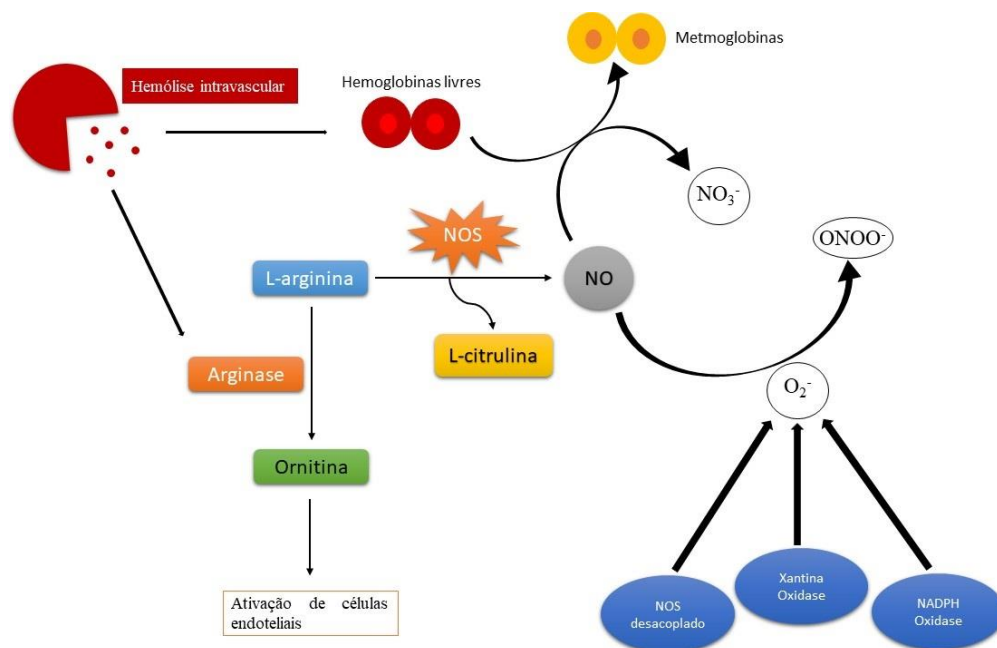
As substâncias liberadas pela hemólise intravascular desencadeiam uma vasta gama de estímulos bioquímicos que podem estar relacionados com os sintomas e complicações da AF. Foi observado por Hebbel e colaboradores que a HbS apresenta um maior nível de auto oxidação do que a HbA, sendo atribuídos a HbS um aumento exacerbado de espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido e radical hidroxil no interior dos eritrócitos (ALAYASH, 2018; CONRAN, 2014; HEBBEL *et al.*, 1988).

Durante a hemólise intravascular são também liberadas duas enzimas que inibem a produção de NO, a arginase e a dimetilarginina assimétrica (MACK e KATO, 2006). NO atua como um vasodilatador endógeno produzido a partir da conversão da L-arginina para L-citrulina pela enzima NOS (Figura 5). Ao ser produzido, o NO se difunde rapidamente nos tecidos adjacentes, onde se liga aos grupos heme de guanilato ciclases solúveis, enzimas responsáveis por converter guanilato trifosfato (GTP) em guanilato monofosfato cíclica (cGMP). Consequentemente, ocorre o sequestro de cálcio que leva ao relaxamento da musculatura lisa perivascular e subsequente vasodilatação (DE CATERINA *et al.*, 1995; CONRAN, 2014; HALLMARK *et al.*, 2021; WOOD; HSU; GLADWIN, 2008).

A arginase compete com as enzimas NOS pelo substrato *l*-arginina. Fisiologicamente as enzimas NOS se apresentam em três tipos: NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), sendo essas duas expressas constitutivamente e a NOS induzida por macrófago (iNOS) (KIM-SHAPIRO; GLADWIN, 2018). Na ausência de NO, a enzima NOS se torna desacoplada e sintetiza preferencialmente superóxido ao invés de NO, levando à produção de peróxido de nitrogênio (FORSTERMANN; MÜNZEL, 2006; WOOD; GRANGER, 2007; XIA *et al.*, 1996). Observa-se também que as hemoglobinas livres interagem com NO culminando em sua oxidação, levando à formação de metemoglobina (MetHb- Fe^{3+}) e anions nitrato (NO_3^-) (HALLMARK *et al.*, 2021; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017).

Outro fato importante é a presença de outras moléculas que geram ROS, como a xantina oxidase e a NADPH oxidase. A xantina oxidase é uma enzima que cataboliza a xantina em ácido úrico e gera ROS como subprodutos. Sua presença está elevada na AF, mas seu contexto ainda não está bem elucidado (HALLMARK *et al.*, 2021; WOOD; GRANDER, 2007; XIA *et al.*, 1996). Freeman e colaboradores propuseram que o aumento de xantina oxidase se deve às injúrias de isquemia-reperfusão. Por outro lado, verifica-se um aumento na atividade da NADPH oxidase, uma enzima presente nos leucócitos e que possui uma série de funções biológicas, assim como a liberação de superóxidos. A depleção acentuada de NO que culmina em vasoconstrição e a produção elevada de ROS na AF tem sido relacionada com injúria celular e ativação de células endoteliais, tendo uma contribuição no surgimento e/ou agravamento dos eventos de adesão celular (FORSTERMANN; MÜNZEL, 2006; KATO *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2023; WOOD; GRANGER, 2007). A Figura 4 esquematiza os mecanismos supracitados.

Figura 5 – Produção de óxido nítrico endógeno e depleção causados pela hemólise intravascular.



Fonte: próprio autor.

1.1.4.2. Vasculopatia e vaso-oclusão

A vasculopatia na AF é evidenciada pelas diversas manifestação de células endoteliais que se encontram ativadas e a liberação de quimosinas e citocinas pró-inflamatórias que ativam essas

células. Acredita-se que a vaso-oclusão seja resultado de múltiplos fatores que se relacionam, a saber, as interações entre hemácias, leucócitos ativados, plaquetas, células endoteliais ativadas e proteínas no plasma (KASSIM; DEBAUN, 2013; KATO *et al.*, 2018). Muito provavelmente, a ativação de células endoteliais seja oriunda da interação direta dessas células com hemácias falciformes, hemoglobinas e grupos heme livres e ROS (SETTY; STUART, 1996).

A ativação das células endoteliais na AF é evidenciada pelo aumento na expressão de receptores de adesão celular como as ICAM-1 e ICAM-2 e a VCAM-1, além de selectinas como a P-selectina e E-selectina. O endotélio ativo também produz citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , além de fatores pró-coagulatórios e vasoconstritores potentes como a ET-1 (HOPPE, 2014; SETTY; STUART, 1996).

Os reticulócitos de pacientes com AF apresentam maior expressão de proteínas de adesão celular como a integrina $\alpha_4\beta_1$, CD36 (*cluster of differentiation 36*) e ICAM-4. Tais proteínas são capazes de interagir com as moléculas de adesão nas células endoteliais como a CD36, P-selectina, VCAM-1 e com proteínas de adesão subendoteliais como a trombospondina, fibronectina e laminina (CARDEN, FASANO, MEIER, 2020). Os leucócitos também são encontrados em grande quantidade (leucocitose) e ativados na AF, talvez por parte da alta produção de ROS e hemoglobina livre (FRANCIS JR, HAYWOOD, 1992; HOPPE, 2014).

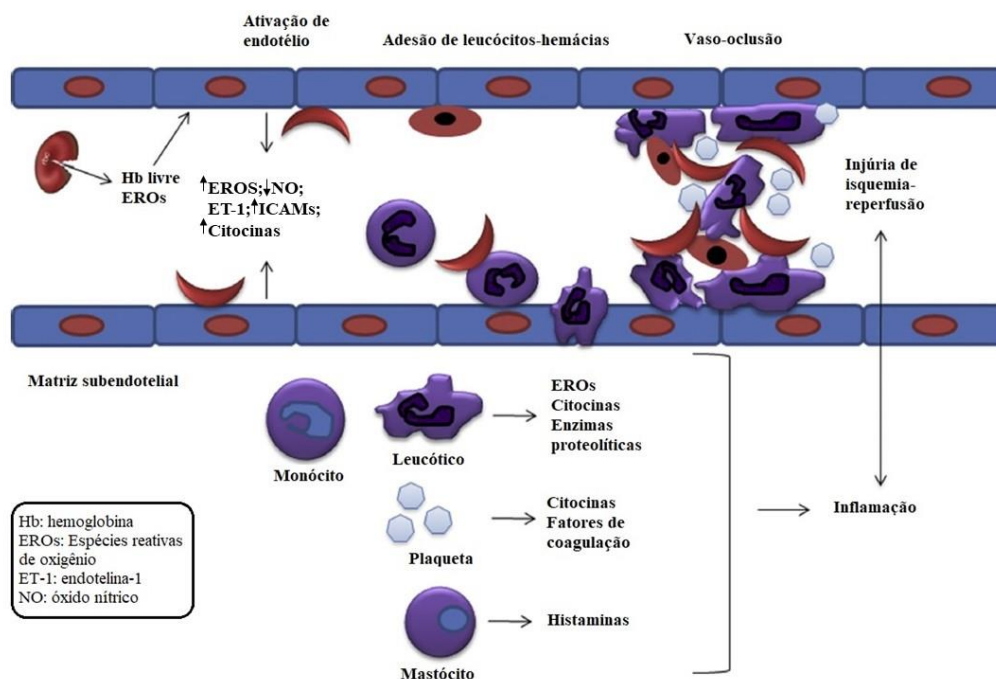
Os leucócitos ativados participam da adesão celular através do intermédio de receptores como a integrina Mac-1 e LFA-1, L-selectina e E-selectina, que interagem com ICAM-1 e selectinas presentes nas células endoteliais, sendo que o processo de adesão celular é natural às funções dos leucócitos. Foi demonstrado que algumas citocinas como o TNF- α e a IL-1 aumentam a capacidade adesiva dos leucócitos. Ambas as citocinas são encontradas em grandes quantidades no plasma de pacientes vivendo com a AF (FRANCIS JR; HAYWOOD, 1992; OKPALA, 2006).

Outro achado clínico importante é a presença exacerbada de plaquetas ativadas e fatores prótrombóticos presentes na AF, tais como trombina-antitrombina (TAT), fator ativador de plaquetas (FAP), fator de von Willebrand (FvW), entre outras moléculas (FAES; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2018; NOUBOUSSIE; KEY; ATAGA, 2016; SETTY; STUART, 1996; PAKBAZ; WUN, 2014). As evidências que demonstram a ativação plaquetária consistem no aumento da presença de algumas moléculas como a β -tromboglobulina trombospondina e ligante CD40 (*cluster of differentiation 40*), sendo estes ainda encontrados em maior quantidade durante crises de dor. Também são encontrados agregados celulares

constituídos por plaquetas e/ou plaquetas e células brancas (Figura 6) (FAES; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2018; PARKBAZ; WUN, 2014; WUN; BRUNSON, 2016). Acredita-se atualmente que a vaso-oclusão seja iniciada pela adesão de leucócitos a parede do endotélio, especialmente os monócitos, que medem cerca de 14 a 20µm, três vezes mais do que um eritrócito (medindo em média cerca de 7,0 µm) (NOUBOUOSSIE; KEY; ATAGA, 2016). A depleção de NO leva a formação de ROS e vasoconstrição, que é exacerbada na presença de vasoconstritores endógenos potentes como a endotelina-1. A endotelina é um peptídeo secretado por células vasculares, sendo composto por 21 aminoácidos e três isoformas, ET-1, ET-2 e ET-3, dos quais a ET-1 é a mais abundante e a mais pesquisada (DAVENPORT *et al.*, 2016; YANAGISAWA *et al.*, 1998). Até o momento sabe-se que a ET-1 se liga aos receptores Endotelina A (ET_A) e Endotelina B (ET_B), ambos sendo da família de receptores acoplados a proteína G (OHLSTEIN *et al.*, 1996; WATTS, 2010).

Tais receptores são amplamente distribuídos pelo corpo, sendo encontradas nas células musculares lisas vasculares, entretanto apenas a ET_B é encontrada em células endoteliais. A ativação desses receptores culmina na vasoconstrição, sendo que a ativação dos receptores ET_B estimula a produção de NO via eNOS culminando na liberação de prostaciclina e subsequente vasodilatação (DAVENPORT *et al.*, 2016; SCHNEIDER; BOESEN; POLLOCK, 2007).

O aumento na expressão de moléculas de adesão bem como a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e a ativação plaquetária são achados clínicos que corroboram a gravidade dos eventos vaso-oclusivos, sendo esse fenômeno responsável pela indução e manutenção de um estado inflamatório crônico (USMANI; MACHADO, 2018).

Figura 6 – Adesão celular e vaso-oclusão.

Fonte: retirado e adaptado de (HOPPE, 2014).

1.1.5. Tratamento

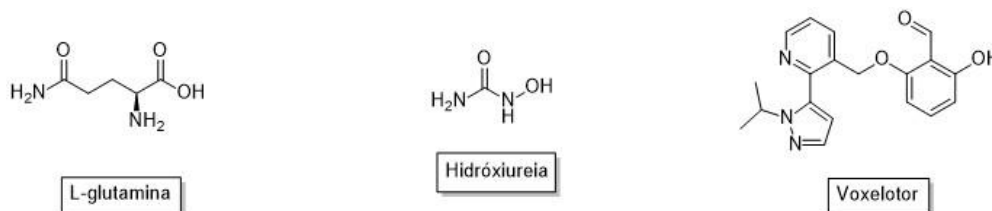
Uma das faces mais cruéis da AF é a escassez de novos fármacos para o tratamento da doença, considerada pelo Centro de informações de doenças genéticas e raras do *National Institute of Health* (Estados Unidos) como uma doença rara. Como são poucas as opções terapêuticas para o tratamento da AF, o tratamento comumente é sintomático e/ou baseado em medidas preventivas (NIH, 2023).

O avanço de novas tecnologias como a terapia gênica e o transplante de células-tronco hematopoiéticas emergem como estratégias promissoras, mas ainda estão distantes da realidade de países em desenvolvimento, em que há uma maior prevalência da doença. Até o momento, a hidroxiureia destaca-se como a terapia modificadora de doença mais eficaz no tratamento da anemia falciforme. Preocupações relacionadas a eficácia e segurança dos novos medicamentos aprovados pelo FDA, a partir de 2017, colocam em ‘xeque’ as aplicabilidades das novas opções terapêuticas na prática clínica (SALINAS CISNEROS; THEIN, 2020).

Nos Estados Unidos, o FDA aprovou a HU, o voxelotor (GB-440), o anticorpo monoclonal crizanlizumabe e o aminoácido l-glutamina (Figura 7). Nesta seção abordaremos esses fármacos aprovados pela agência norte americana, destacando as ações desses fármacos na doença. Nosso grupo de pesquisa tem publicado diversos artigos sobre as diversas novas abordagens para o tratamento da AF, que estarão fora do escopo desse texto (DOS SANTOS *et*

al., 2011; FERREIRA DE MELO *et al.*, 2014; PAVAN; DOS SANTOS, 2021; PAVAN *et al.*, 2022a; PAVAN *et al.*, 2022b).

Figura 7 – Fármacos aprovados pelo FDA.



Fonte: próprio autor.

1.1.5.1. Hidroxiureia

A hidroxiureia (HU) é um hidroxycarbamato, inibidor seletivo da síntese de ribonucleotideo redutase, enzima responsável pela conversão de ribonucleotideo difosfatados em deoxiribonucleotideo difosfatado, impedindo que as células saiam da fase G1/S do ciclo celular. Usada para neoplasias do sistema hematológico, como leucemia mieloide crônica; seu uso na AF se origina de estudos clínicos multicêntricos realizados nos Estados Unidos e Canadá em 1994. Neste estudo, foi observado que pacientes vivendo com AF, quando tratados com HU, apresentavam aumento da concentração de hemoglobina fetal e redução do número de crises vaso-oclusivas (MCGANN; WARE, 2015; NEVITT; JONES; HOWARD, 2017).

O principal efeito da terapia com hidroxiureia está associado ao aumento da produção de HbF, resultando na redução dos níveis de HbS e, por conseguinte, na diminuição da falcização de hemácias e na ocorrência de vaso-oclusão (CHARACHE *et al.*, 1995). Estudos prospectivos ao longo de nove anos mostraram que pacientes tratados com HU apresentavam uma redução de 40% no número de mortes. Além disso, HU reduz em cerca de 50% as necessidades transfusionais e os episódios de síndrome torácica aguda (MCGANN; WARE, 2015; NEVITT; JONES; HOWARD, 2017; STEINBERG *et al.*, 2003).

Acredita-se que parte dos benefícios do tratamento com HU sejam oriundos do óxido nítrico, originado após metabolização *in vivo* (KING *et al.*, 2003). O NO produzido também parece ter um efeito na indução da produção de HbF por meio da estimulação da via de guanilato ciclase solúvel. Estudos *in vitro* mostraram que a ativação da guanilato ciclase aumenta a expressão

gênica de gama-globina em células eritroleucêmicas K562 e células progenitoras humanas (COKIC *et al.*, 2003; CONRAN *et al.*, 2004).

O tratamento com HU diminui a expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular e reduz a ativação e agregação plaquetária, contribuindo com a manutenção do equilíbrio homeostático. Diversos estudos mostram que o NO possui ainda papel importante na redução da adesão celular ao endotélio vascular. Estudos *in vitro* com doadores de NO, por exemplo, mostraram que após tratamento de neutrófilos oriundos de pacientes falciformes com esses compostos ocorre diminuição da adesão à fibronectina/ICAM-1 (CANALLI *et al.*, 2008; CARTON; ELION, 2008; CONRAN *et al.*, 2004; GAMBERO *et al.*, 2007).

Inclusive em pacientes pediátricos, estudos mostram que os benefícios podem superar os riscos, quando o medicamento for bem tolerado, na prevenção de infarto esplênico, manifestações neurológicas (ex. convulsões, cegueira transitória etc.) (DE MONTALEMBERT *et al.*, 2006; GUILBIS *et al.*, 2005; HANKINS *et al.*, 2008; ZIMMERMAN *et al.*, 2004; ZIMMERMAN *et al.*, 2007).

A indicação clínica para utilização de HU deve obedecer aos critérios de inclusão preconizados pelo protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da doença falciforme (Portaria conjunta n.5, de 19 de fevereiro de 2018). Entre esses critérios é possível citar: “1) *eletroforese de hemoglobina compatível com o diagnóstico de DF: Hb SS, SC, SD ou SBetaTal*; 2) *idade igual ou maior que 2 anos (ou a partir de 9 meses)*; 3) *possibilidade de comparecer às reavaliações periódicas*; 4) *beta-HCG sérico negativo para mulheres em idade reprodutiva*; e 5) *ter apresentado pelo menos uma das complicações abaixo nos últimos 12 meses (- três ou mais episódios de crises vasclusivas com necessidade de atendimento médico; dois episódios de síndrome torácica aguda (definida como dor torácica aguda com infiltrado pulmonar novo, febre de 37,5 °C ou superior, taquipneia, sibilos pulmonares ou tosse); um episódio de priapismo grave ou priapismo recorrente; necrose isquêmica óssea; insuficiência renal; proteinúria de 24 h maior ou igual a 1 g; anemia grave e persistente (Hb menor que 6 g/dL em três dosagens no período de 3 meses); desidrogenase láctica (DHL) elevada duas vezes acima do limite superior nas crianças ou adolescentes e acima de três vezes do limite superior no adulto; alterações no eco-Doppler transcraniano acima de 160 e até 200 cm/s; retinopatia proliferativa; ou quaisquer outras situações em que haja comprovação de lesão crônica de órgão(s).*” (Portaria conjunta n.5, de 19 de fevereiro de 2018).

O nível de evidência dos benefícios da HU na AF é elevado, entretanto, efeitos adversos graves devem ser monitorados durante o uso, como por exemplo, mielossupressão e alterações na

espermatogênese com atrofia testicular, lesões ulcerativas em membros inferiores, manifestações cutâneas, entre outros (JONES *et al.*, 2009; AMMAD *et al.*, 2021) (AMMAD *et al.*, 2021; JONES *et al.*, 2009; YAWN *et al.*, 2014). Estudos de mutagenicidade conduzidos em nosso grupo de pesquisa usando o teste de AMES mostraram que a exposição aguda a HU não induziu mutagenicidade (SANTOS *et al.*, 2010). Além disso, o fármaco não demonstrou efeitos genotóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2019; WARE *et al.*, 2021).

Um maior número de estudos populacionais a longo prazo precisa ser conduzido a fim de verificar segurança de HU em tratamentos prolongados, embora alguns estudos sugiram que o fármaco seja seguro e não está associado ao desenvolvimento de câncer. Em um estudo de Steinberg e colaboradores (2010) em que pacientes foram acompanhados por 17,5 anos, sugeriu que o uso de HU em tratamento prolongado é seguro e reduz a mortalidade dos pacientes. Outro estudo conduzido por Karimi e colaboradores (2021), em que os pacientes foram acompanhados por um período médio de 18 anos, apontam para as mesmas conclusões obtidas por Steinberg (2019), de que o fármaco seja seguro em tratamentos prolongados

1.1.5.2. *L-glutamina*

Em 2017 o FDA aprovou o uso da *l*-glutamina como adjuvante no tratamento da anemia falciforme, baseado em observações clínicas de que os pacientes suplementados experimentaram uma redução nas taxas de hospitalização e na frequência de crises dolorosas. Durante ensaios clínicos, observou-se que a *l*-glutamina promoveu uma redução de 33% nas taxas de hospitalização, além de diminuir o tempo médio de internação de 11 para 7 dias em comparação com o grupo que recebeu placebo. (KAVANAGH *et al.*, 2022). Estudos multicêntricos de fase 3 (NCT01179214), randomizados, duplo-cego e placebo controlados avaliaram o efeito da *l*-glutamina em cerca de 230 pacientes, e observaram uma redução no número de crises dolorosas e menor número de hospitalizações, quando os pacientes eram suplementados com doses de 0,3 g/Kg/dia durante 48 semanas (NIIHARA *et al.*, 2018).

A *l*-glutamina é um aminoácido essencial que desempenha um papel crucial como precursor na síntese de glutatona, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e arginina - substâncias que oferecem proteção aos eritrócitos contra danos oxidativos. O principal mecanismo terapêutico da suplementação de glutamina na AF é considerado ser seus efeitos antioxidantes (SADAF e QUINN, 2020). No organismo, o NAD se encontra em uma forma oxidada (NAD⁺) e reduzida

(NADH). Trata-se de um cofator presente no processo de oxirredução (redox) das hemácias, desempenhando um papel central na manutenção do equilíbrio redox (JAFRI *et al.*, 2022). Embora o aminoácido venha sendo estudado desde 1970, somente em 2017 consegue a aprovação do FDA, entretanto, agência regulatória europeia *European Medicines Agency* (EMA) negou o registro deste por entender que os estudos conduzidos apresentavam muitas limitações, como elevado número de desistências durante o estudo, e que os desfechos encontrados não demonstravam uma melhoria realmente significativa na redução do número de crises dolorosas. Nos estudos avaliados pela agência europeia (NCT01179217 e NCT00125788) foram encontradas taxas de abandono do estudo de 36,2% no tratamento e 24,4% no grupo placebo, sendo para agência difícil avaliar o efeito potencial do tratamento. No Brasil, a CONITEC avaliou em 2022 a inclusão da *l*-glutamina como nova tecnologia no SUS, assim como a EMA, não encontrou benefícios reais que justificassem a inclusão desse aminoácido no tratamento (BORTOLUZZI *et al.*, 2022).

1.1.5.3. Crizanlizumabe

O crizanlizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado seletivo da classe IgG₂ κ, demonstrando eficácia na redução da frequência de crises vaso-oclusivas (CVOs) e na inibição de interações multicelulares adesivas mediadas pela P-selectina. Um estudo clínico de fase 2 conduzido por ATAGA e colaboradores (2017) (estudo SUSTAIN, NCT01895361) caracterizado por ser multicêntrico, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, com 198 pacientes por um período de 52 semanas observou doses de 5mg/kg de crizanlizumabe apresentava a capacidade de reduzir em até 45,3% a taxa média de crises dolorosas. Foram observados no estudo poucos efeitos adversos que incluem: dor de cabeça, febre, reações infusionais, hemorragias e imunogenicidade (ATAGA *et al.*, 2017).

Em outro braço do estudo clínico denominado SENTRY foi avaliado o efeito do crizanlizumabe em pacientes pediátricos. Neste estudo (NCT03474965) de fase 2 realizado com pacientes de 6 meses a menos de 18 anos diagnosticados com AF e com histórico de crises vaso-oclusivas durante 26 semanas foi observada uma redução no número de crises comparado ao início do tratamento e ao número de hospitalizações. Neste estudo a dose de 5 mg/kg foi considerada segura e bem tolerada para pacientes pediátricos entre 12-18 anos, sem presença de efeitos adversos graves (HEENEY *et al.*, 2022).

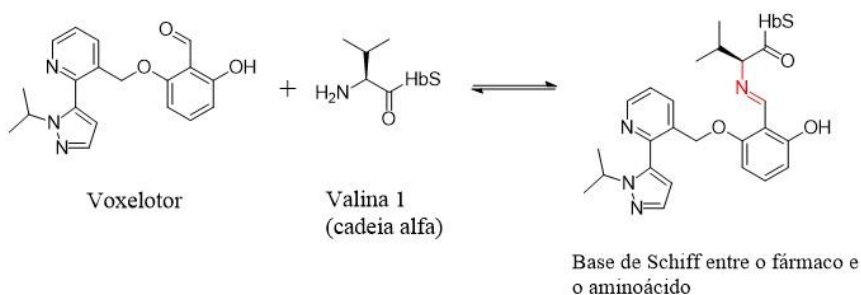
Na contramão, dados recentes obtidos pelo próprio estudo STAND de fase 3, não permitiram verificar a superioridade do crizanlizumabe sobre o placebo na AF (ABBOUD *et al.*, 2023). No Brasil, a ANVISA cancelou o registro do crizanlizumabe em outubro de 2023, devido a falhas na comprovação da eficácia, e ausência de informações robustas em que os benefícios superavam os riscos no uso do medicamento, no estudo clínico STAND Fase 3 (ANVISA, Resolução RE Nº 3.959, de 19 de outubro de 2023).

1.1.5.4. Voxelotor (GB440)

O voxelotor (Figura 8), é um fármaco oral aprovado pelo FDA em 2019 e comercializado nos Estados Unidos como Oxbryta®, um modulador e ligante covalente de hemoglobina. No FDA, o fármaco é recomendado para crianças com idades entre 4 e 11 anos, enquanto na EMEA é considerado uma opção terapêutica para pacientes a partir de 12 anos de idade (METCALF *et al.*, 2017).

O voxelotor é capaz de se ligar à HbS por meio do resíduo de valina (Valina 1) da cadeia α globina, onde a porção aldeídica forma uma base de Schiff com o grupo amino (Figura 8), aumentando sua afinidade por oxigênio através de modificação alostérica, inibindo assim a polimerização da hemoglobina (METCALF *et al.*, 2017). Entretanto, foi demonstrado que em condições de anoxia (ausência total de oxigênio) o voxelotor não exerce efeito. (ABDULMALIK *et al.*, 2020).

Figura 8 – Interação entre o Voxelotor e o grupo amino presente no resíduo de valina na cadeia α .



Fonte: próprio autor.

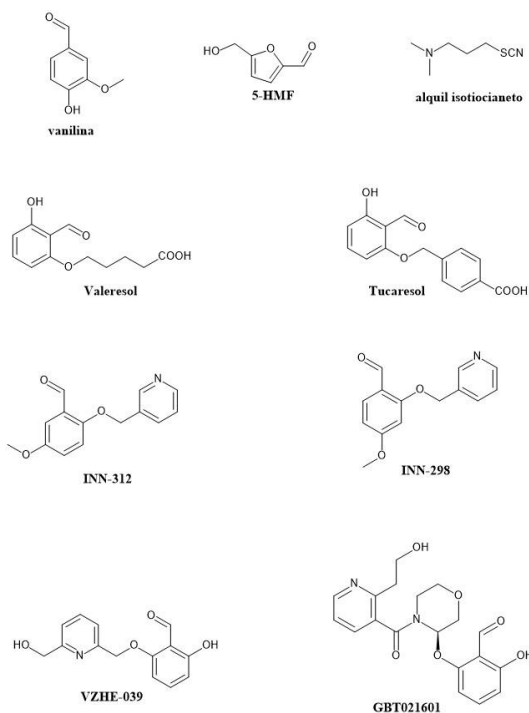
O estudo HOPE (NCT03036813) foi o que fundamentou as aprovações das agências EMEA e FDA. Este estudo clínico de fase 3 multicêntrica, duplo-cego, randomizada e controlada por placebo contou com 274 participantes (12-65 anos) e teve como objetivo é avaliar a eficácia e segurança do voxelotor, analisando como desfechos clínicos o aumento de Hb em mais de 1

g/dL após 24 semanas de tratamento (VICHINSKY *et al.*, 2019). Foi observado uma diferença significativa entre o grupo tratado com voxelotor (900 e 1500 mg) e o grupo placebo em relação ao aumento da Hb e redução da hemólise. O fármaco parece ser seguro, e poucos efeitos adversos foram observados, destacando a náusea e a cefaleia, sendo que a incidência desses efeitos não foi diferente entre os grupos tratados e o grupo controle (VICHINSKY *et al.*, 2019). O estudo clínico conduzido com pacientes pediátricos (HOPE-Kids, NCT042118084) está em andamento.

1.2. Agentes inibidores da polimerização de HbS

Já foi descrito na literatura outros agentes moduladores de hemoglobina capazes de aumentar sua afinidade por oxigênio *in vitro*, como os isotiocianetos, o tucaresol, a vanilina, entre outros (Figura 9) (ABRAHAM *et al.*, 1991; ARYA *et al.*, 1996). Park e colaboradores demonstraram que os isotiocianetos são capazes de se ligarem com a amina terminal da cadeia α globínicas ou com o resíduo Cys β 93 da cadeia β globínica. Utilizando HbA $\cdot$ co-cristalizado com a substância (*N,N*-dimetilamino)etil isotiocianeto e através de técnicas como *Electrospray mass spectrometry*, cristalografia de raios-X e reações químicas com proteínas, eles demonstraram que a porção tiocianeto foi capaz de estabelecer uma ligação covalente com o resíduo 93 de cisteína da cadeia β (PARK *et al.*, 2003).

O valeresol e o tucaresol demonstraram atividade antifalcizante *in vitro* e foram testados *in vivo*, sendo que o valeresol, apesar de demonstrar potente atividade, não apresentou biodisponibilidade oral e apresentou um tempo de atividade de três a quatro horas quando administrado via intravascular. Já o tucaresol apresentou biodisponibilidade, entretanto, os ensaios clínicos de fase II tiveram de ser interrompidos devido a imunotoxicidade apresentada pelo composto (FITZHARRIS *et al.*, 1985; KEIDAN *et al.*, 1986; ROLAN *et al.*, 1995). A Figura 8 ilustra todos os ligantes covalentes de hemoglobina.

Figura 9 – Estrutura química dos ligantes de hemoglobina.

Fonte: próprio autor.

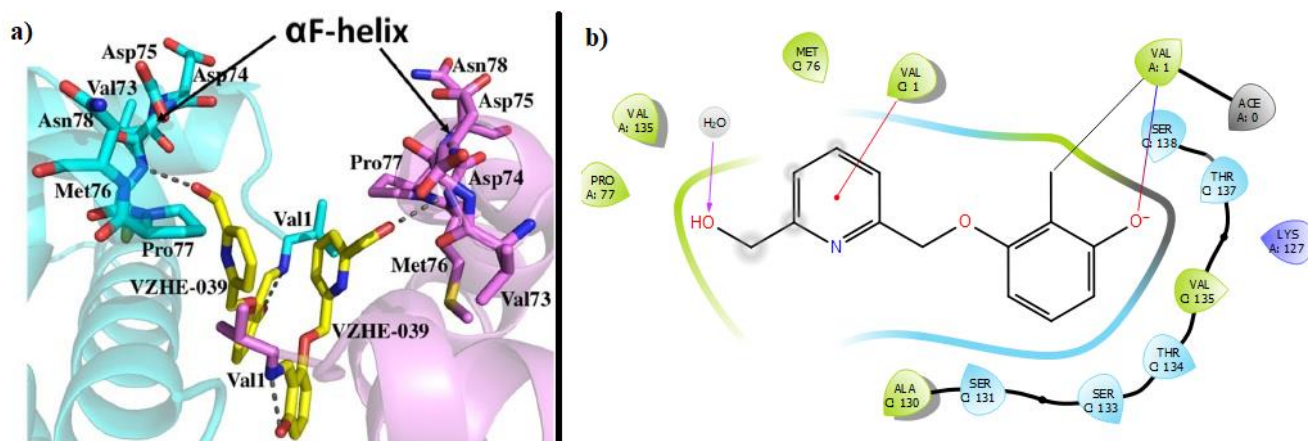
Safo e colaboradores demonstraram através de cristalografias de raios-X e HPLC a atividade antifalcizante *in vitro* dos compostos vanilina e 5-hidróximetilfurfural (5-HMF) (SAFO *et al.*, 2004). Abdulmalik e colaboradores demonstraram, mais tarde, a atividade do antifalcizante do 5-HMF em camundongos Townes. Eles observaram que uma única dose de 100 mg/kg de 5-HMF foi capaz de proteger os camundongos da morte por sequestro agudo pulmonar de eritrócitos falciformes (ABDULMALIK *et al.*, 2005).

Posteriormente, em 2011, Abdulmalik e colaboradores exploraram novos compostos (INN-298 e INN-312) para atividade antifalcizante. Baseando-se nos estudos cristalográficos feitos anteriormente com a vanilina e o 5-HMF, os compostos INN-298 e INN-312 apresentam uma maior atividade antifalcizante em relação a vanilina e o 5-HMF, sendo que o composto INN-312 também foi capaz de inibir a polimerização (ABDULMALIK *et al.*, 2011).

Em 2020, Abdulmalik e colaboradores descreveram um outro aldeído aromático, denominado VZHE-039, que apresentou ampla atividade de inibição da falcização da hemácia tanto nas condições dependente quanto independente da ligação do oxigênio. Por cristalografia de raios-X foi determinado que a forma de ligação na condição independente de oxigênio, decorre da interrupção de contatos intermoleculares fundamentais necessários para a formação estável de polímeros de HbS. O VZHE-039 (Figura 10) não apresentou inibição significativa de várias CYPs, demonstrou uma partição eficiente nas células vermelhas do sangue (RBC) e alta

permeabilidade de membrana, além de não ser substrato do transportador de efluxo (P-gp) (ABDULMALIK *et al.*, 2020). Apesar desses efeitos promissores, o efeito de inibição da polimerização foi menor do que o voxelotor, apesar de apresentar a vantagem de ser ativo em condições de anoxia (Figura 10).

Figura 10 – Cristalografia de raios-X mostrando a ligação covalente irreversível VZHE-039 com a cadeia α da hemoglobina.



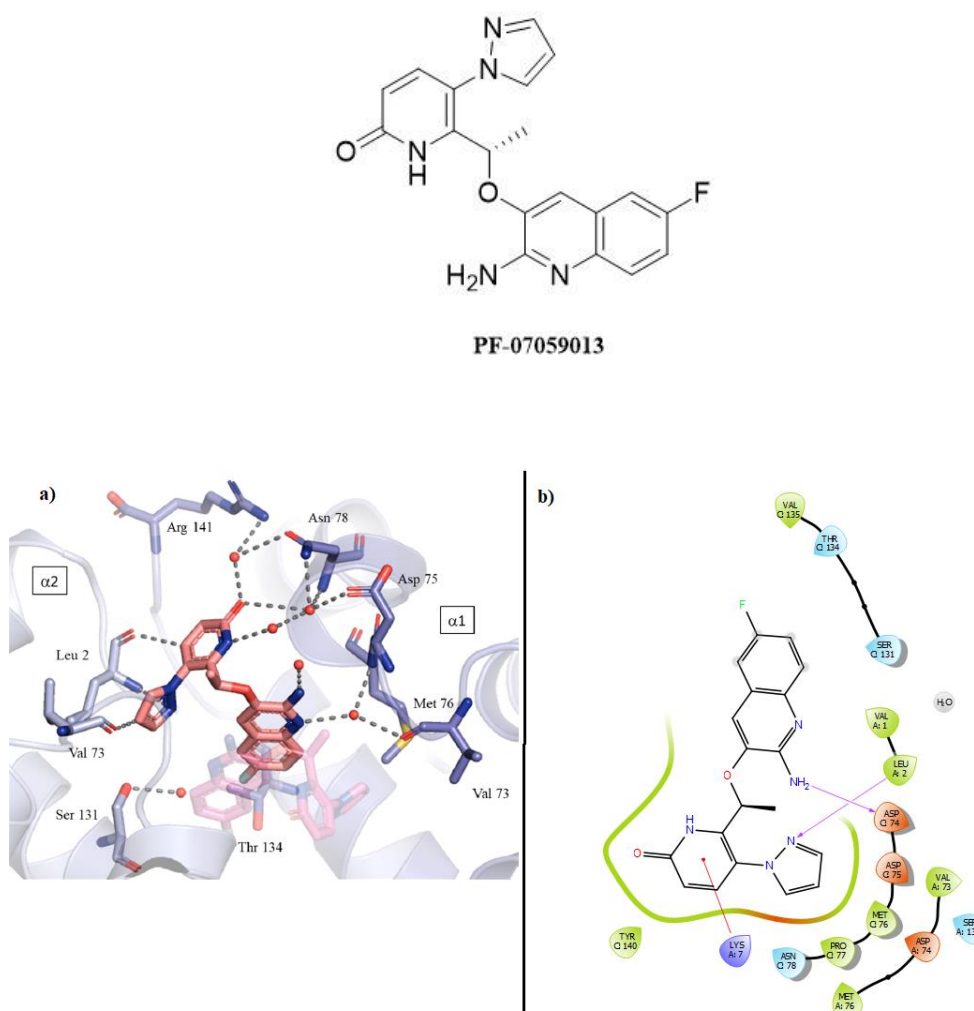
Em a) observa-se que duas moléculas de VZHE-039 interagem com as alfa-hélices. Em b) destaca-se as interações que o VZHE-039 faz com o sítio de ligação. Fonte: retirado e adaptado de (ABDULMALIK *et al.*, 2020).

Em 2023, Dufu e colaboradores descreveram os efeitos do composto (2- hidroxí- 6- [[(3*S*)- 4- [2- (2- hidroxietil)piridina-3-carbonil]morfolin-3-il]metoxi]benzaldeído), denominado GBT021601 como sendo capaz de se ligar covalentemente a HbS, aumentando a afinidade do oxigênio pela HbS, inibindo a polimerização da HbS e impedindo a falcização dos eritrócitos em sangue de pacientes com AF. Em um modelo murino de anemia falciforme (SCD), especificamente em camundongos SS, o GBT021601 demonstra redução da falcização das células vermelhas do sangue (RBC), melhoria na deformabilidade das RBC, extensão da meia-vida das RBC e restauração dos níveis de hemoglobina à faixa normal. Simultaneamente, a substância otimiza a entrega de oxigênio e amplia a tolerância à hipóxia severa. É digno de nota que a administração oral de GBT021601 em animais resulta em níveis mais elevados de ocupação da hemoglobina do que o voxelotor, indicando a viabilidade de uma administração diária em seres humanos (DUFU *et al.*, 2023).

Gopalmas e colaboradores (2021) descreveram que ligantes não covalentes da HbS também podem atuar como moduladores da hemoglobina para a AF. Diferentemente dos estudos anteriores, estes compostos não apresentaram a função aldeído em sua estrutura química. Dos

compostos mais ativos se destaca o PF07059013 (Figura 11) descoberta por meio de triagem virtual, e posteriormente otimizada. O PF07059013 se liga de maneira específica à hemoglobina com afinidade na faixa de nanomolar (Figura 11) e apresenta uma marcada distribuição nos eritrócitos. Em um estudo de doses múltiplas com duração de duas semanas utilizando camundongos SCD Townes, o composto demonstrou uma redução de 37,8% na falcização em comparação com os camundongos tratados com o veículo. Segundo relatado pelos autores, esse composto está sendo avaliado em estudos de fase clínica 1 (GOPALSAMY *et al.*, 2021).

Figura 11 – Estrutura química do composto PF-07059013 e cristalografia de raios-X para o composto PF-07059013.



Em a) observa-se por cristalografia de raios-X que cada molécula interage com um sítio na alfa-hélice. Em b) destaca-se as interações que o composto realiza com o sítio de ligação. Fonte: retirado e adaptado de (GOPALSAMY *et al.*, 2021).

Dos ligantes de HbS conhecidos, o VZHE-039 mostrou interessantes propriedades, sendo capaz de se ligar tanto ao estado 'T' quanto ao estado 'S', além de demonstrar farmacocinética favorável. Baseado nos promissores efeitos, este composto se mostra um interessante protótipo para futuras otimizações moleculares. Por isso, neste estudo desenvolvemos novos derivados do VZHE-039 que pudessem agregar os efeitos benéficos da doação de nítrico, possibilitando atuação dual em diferentes frentes a saber: indução de HbF e inibição da polimerização de HbS.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo sintetizar derivados do VZHE-039 conjugados a furoxanos para atuarem como ligantes covalentes de HbS capazes de liberar NO.

2.1. *Objetivos específicos*

- Desenvolver os métodos sintéticos para preparação dos compostos GI0F, GP0F e GS0F;
- Isolar e purificar os compostos GI0F, GP0F e GS0F;
- Caracterizar estruturalmente, por métodos analíticos de ressonância magnética nuclear e espectrofotometria na região do infravermelho, os compostos GI0F, GP0F e GS0F;

3. Material e métodos

3.1. Reagentes e solventes

- Nitrito de sódio (NaNO_2) - Labsynth[®]
- Ácido metacrílico – Sigma-Aldrich[®]
- Estireno – Sigma-Aldrich[®]
- Tiofenol – Sigma-Aldrich[®]
- Ácido monocloroacético – Sigma-Aldrich[®]
- Peróxido de hidrogênio 30% - Labsynth[®]
- Ácido clorídrico concentrado (35%) – Vetec Química[®]
- Ácido acético glacial - Labsynth[®]
- Ácido sulfúrico concentrado – Exôdo Química[®]
- Hidróxido de sódio – Sigma-Aldrich[®]
- 2,6-dihidroximetilpiridina - AmBeed[®]
- Brometo de tionila – Sigma-Aldrich[®]
- 2,6-dihidroxibenzaldeído – ChemScene LLC
- Tetraidrofurano (THF) - Labsynth[®]
- *N,N*-dimetilformamida (DMF) - Labsynth[®]
- Diclorometano - Labsynth[®]
- Hexano - Labsynth[®]
- Acetato de etila - Labsynth[®]
- Clorofórmio - Labsynth[®]
- 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) – Start BioScience[®]
- Carbonato de potássio – Start BioScience[®]
- Água destilada
- Ácido nítrico fumegante (98%) – Sigma-Aldrich[®]

3.2. Equipamentos

- Balança analítica Marte[®] - modelo AY 220;
- Agitador magnética Ika[®] modelo C-Mag HS4;
- Balança semi-analítica Gehaka[®] modelo BG 200;
- Evaporador rotativo Ika[®] modelo RV10;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker[®] modelo DPX-300, operando a 300MHz para ^1H e 75MHz para ^{13}C .
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker[®] modelo Avance III HD 600, operando a 600MHz para ^1H e 150MHz para ^{13}C .
- Espectrofotometria na região do infravermelho Shimadzu[®] 4.2.4

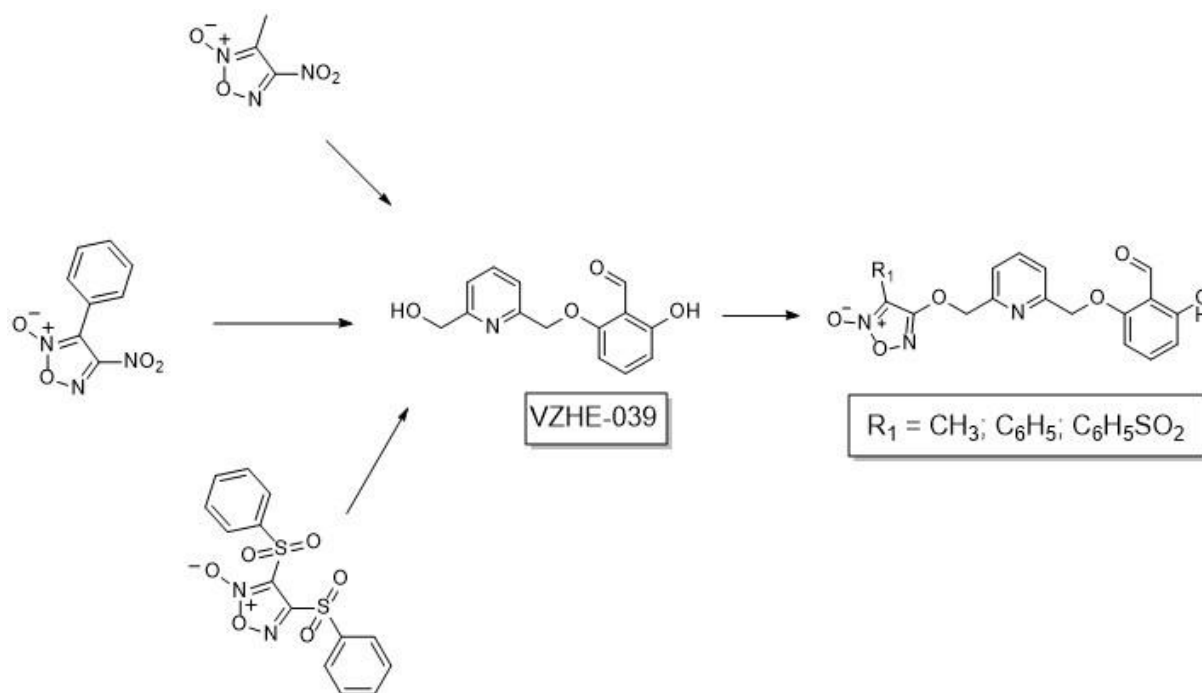
3.3. Metodologias analíticas

- 3.3.1. Cromatografia em camada delgada (C.C.D): a C.C.D é feita em placa de sílica gel para o acompanhamento das reações. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) para o acompanhamento das reações de obtenção das moléculas sintetizadas foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica gel 60 F254 Sigma[®]. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).;
- 3.3.2. Espectrometria de RMN ¹H e ¹³C: Os espectros de RMN serão 300 ou 600 MHz para ¹H e a 75 MHz para ¹³C. As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da UNESP Araraquara, utilizando um espectrômetro de 300 MHz (7.0 Tesla; ¹H e ¹³C) Fourier com Dual Probe ¹³C/¹H – Bunker[®] e espectrômetro de 600 MHz (14.0 Tesla; ¹H e ¹³C) Ascend-Bunker[®]. Os deslocamentos químicos são reportados em partes por milhão (δ) e as constantes de acoplamento (J) são mostrados em Hertz (Hz). Os deslocamentos são representados por s (singleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto), t (triplete) e m (multiplete);
- 3.3.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV): Os espectros de absorção no IV, na região de 4.000 a 400 cm⁻¹, serão obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro Shimadzu; 4.2.4.
- 3.3.4. Determinação da faixa de fusão: As faixas de fusão das moléculas foram determinadas em um aparelho capilar *Melting Point Apparatus* SMP3, Stuart Scientific[®].

3.4.Planejamento Estrutural

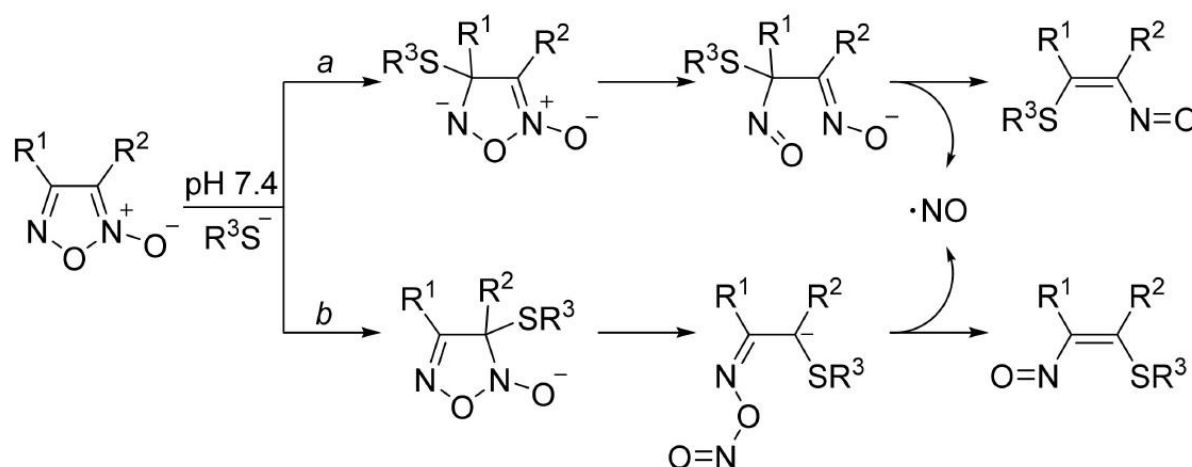
O planejamento estrutural explorou a estratégia da hibridação molecular para planejar novos análogos do composto VZHE-039 conjugados à subunidade furoxano a fim de obter análogos com diferentes perfis de liberação de óxido nítrico (Figura 12). Os furoxanos são amplamente utilizados como doadores de NO devido sua relativa estabilidade no ambiente biológico quando comparados aos ésteres de nitrato orgânicos. Gasco e colaboradores revelaram a possibilidade de diferentes substituintes ligados ao carbono *N*-óxido que apresentaram diferentes perfis de liberação de NO. É amplamente aceito que a liberação de NO é dependente de cisteína (Figura 13), entretanto, os mecanismos não foram totalmente elucidados.

Figura 12 – Derivados de VZHE-039 com diferentes perfis de liberação de NO.



Fonte: próprio autor.

Figura 13 – Mecanismo proposto para liberação de NO pelo anel furoxânico.



Fonte: retirado e adaptado de (FERSHTAT e ZHILIN, 2021).

Fershtat e Zhilin propuseram, em 2021, duas vias para a liberação de NO. Na presença de ânions tiolato, o anel furoxânico é passível de sofrer um ataque nucleofílico nos carbonos 3 e 4. Na via, o ânion tiolato ataca o carbono 4, que apresenta menor densidade eletrônica pois não participa da ressonância proveniente no nitrogênio oxidado, levando à abertura do anel, rearranjo eletrônico com consequente liberação de NO. Já a via b descreve o ataque acontecendo ao carbono 3, rompendo o anel e liberando NO. Gasco e colaboradores demonstraram que a força de liberação de NO é dependente do tipo de substituinte no carbono 3. Substituintes alifáticos como a metila levam a uma pequena liberação de NO. Substituintes mais eletroatratores como o fenilsulfonil, geram uma maior produção de NO. (FERSHTAT; ZHILIN, 2021; GASCO *et al.*, 2004)

A estratégia de acoplar doadores de óxido nítrico visa explorar o efeito de ligantes covalentes de hemoglobina com perfis distintos de liberação de NO (fraco, moderado e forte). Assim, além de evitar a polimerização por estabilizar a conformação da hemoglobina, a liberação de NO apresentaria diversos efeitos que poderiam ser benéficos ao tratamento da doença como os efeitos vasculares (vasodilatação), antiagregante plaquetário e capacidade de induzir a produção a hemoglobina fetal. Dessa forma, os novos derivados de VZHE-039 poderiam atuar por mecanismos múltiplos de ação beneficiando de forma distinta o tratamento atual da anemia falciforme.

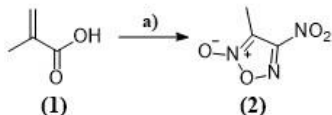
3.5. Metodologia sintética

O esquema geral para obtenção dos compostos está representado na Figura 14. Primeiramente foram sintetizados todos os furoxanos (metil (2), fenil (4) e fenilsulfonil (8)) necessários para posterior funcionalização. Explorando reações de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) foi realizado o tratamento dos furoxanos (2, 4 e 8) com 2,6-dihidroxi metilpiridina usando como base 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) e solvente tetraidrofurano anidro. Em seguida, foi realizado a interconversão de grupos funcionais da função álcool para o haleto (brometo) de alquila usando como reagente o brometo de tionila para obter os compostos 11.1, 11.2 e 11.3. A última etapa envolveu a reação de acoplamento entre o haleto de alquila e 2,6-dihidroxibenzaldeído em meio contendo N,N-dimetilformamida (DMF) anidro como solvente e carbonato de potássio como base para formar os produtos finais desejados.

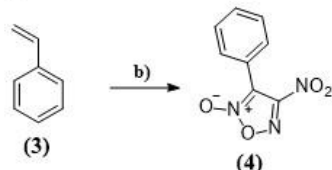
Figura 14 – Síntese dos derivados VZHE-039 acoplados com o furoxano como doador de óxido nítrico.

1) Síntese dos núcleos furoxânicos

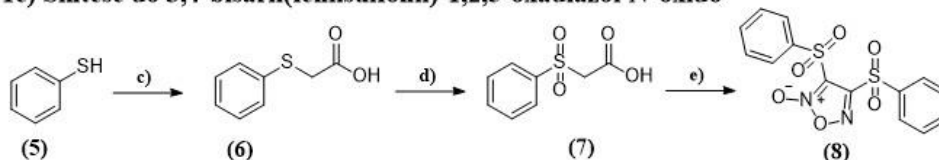
1a) Síntese do 3-nitro-4-metil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido



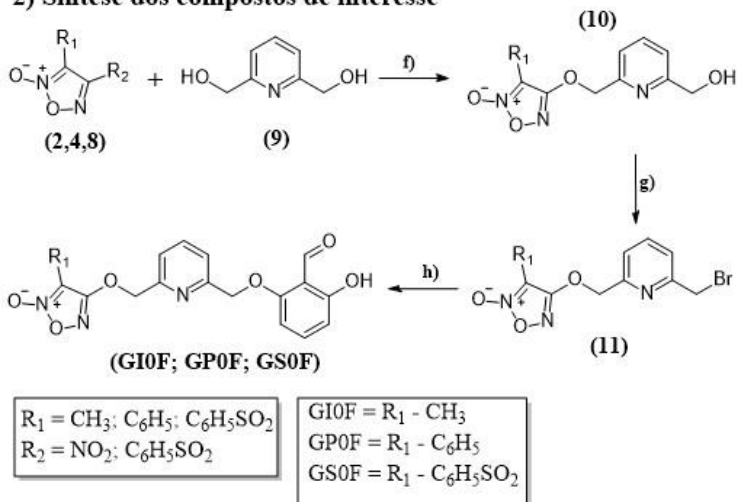
1b) Síntese do 3-nitro-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido



1c) Síntese do 3,4-bisartil(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-N-óxido



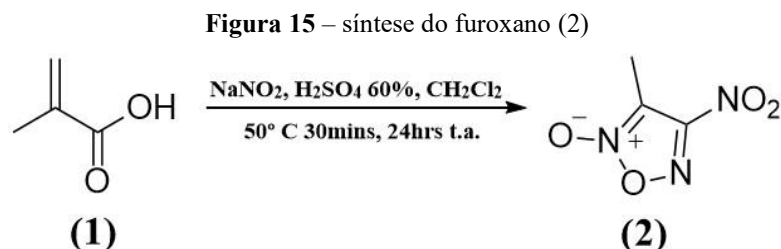
2) Síntese dos compostos de interesse



Condições: a) NaNO_2 , H_2SO_4 60%, CH_2Cl_2 , 50°C 30 minutos, 24 horas; b) NaNO_2 , HCl , AcOH , CH_2Cl_2 , *overnight*; c) NaOH , ácido monocloraacético, H_2O ; d) H_2O_2 30%, AcOH , 24 horas; e) HNO_3 99,5%, AcOH , 110°C 1 hora; f) THF anidro, DBU , 4 horas; g) Brometo de tionila, diclorometano anidro, DMF anidro, 1 hora; h) DMF anidro, 2,6-dihidróxibenzaldeído, K_2CO_3 , *overnight*.

3.6. Procedimentos sintéticos

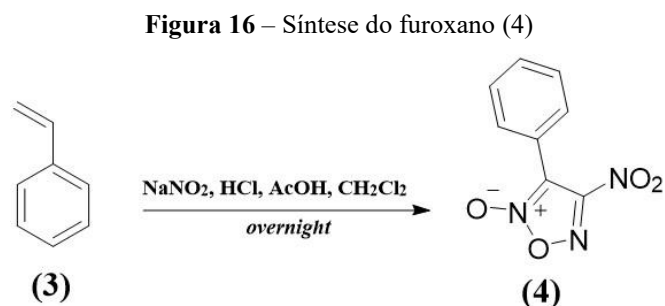
Síntese de 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (2) (adaptado de: Nikolaeva *et al.*, 1972 e Fernandes, 2016).



Fonte: próprio autor.

Em um balão de 500 mL contendo 200 mL de diclorometano e 70 mL de ácido sulfúrico 60%, adicionou-se 19,6 mL (0,23 mol) de ácido metacrílico (1). A reação foi agitada e aquecida a 50°C. Após atingida a temperatura, adicionou-se, lentamente, 56 g (0,82 mol) de nitrito de sódio e manteve-se a reação sob agitação, a 50°C, por 30 minutos. Completada a reação, as duas fases formadas no meio reacional foram separadas e a fase aquosa foi extraída com 1,2-dicloroetano. Posteriormente, juntou-se as fases orgânicas que foram então lavadas com água (3 porções de 70 mL), solução de bicarbonato de sódio 3% (2 porções de 70 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (2 porções de 70 mL).

Síntese da molécula 4-nitro-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (3) (adaptado de: Kunai *et al.*, 1990 e Fernandes, 2016).



Fonte: próprio autor.

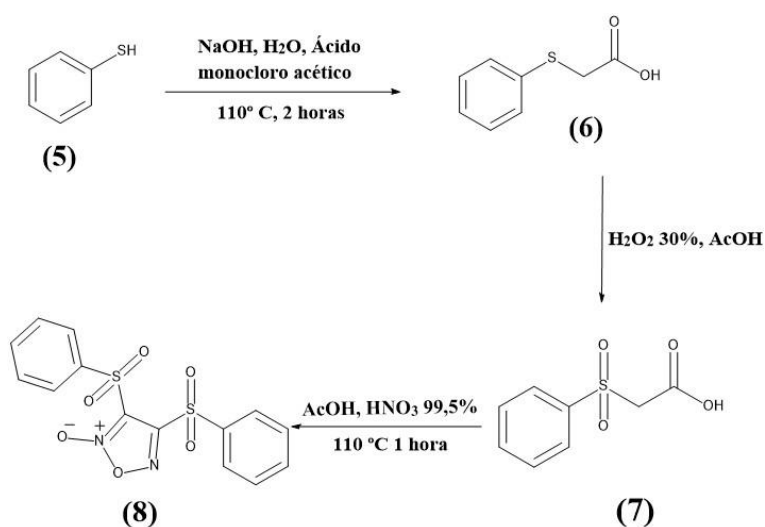
A uma mistura contendo 2,2 mL (0,019 mol) de estireno (3) e 11 g (0,16 mol) de nitrito de sódio em 100 mL de diclorometano foram adicionados, gota a gota, 9,15 mL de ácido acético glacial.

Após 2 horas, adicionou-se, gota a gota, 8 mL de ácido clorídrico concentrado. A reação foi mantida sob agitação *overnight* à temperatura ambiente. Ao final da reação pôde-se observar a formação de duas fases: orgânica e inorgânica. O isolamento do produto foi realizado através da lavagem da fase orgânica com água destilada (5 porções de 50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio, e em seguida foi adicionado o agente secante sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida. A purificação da molécula foi realizada por cromatografia em coluna (fase estacionária: sílica gel; fase móvel: hexano:diclorometano 7:3 (v/v)).

Síntese da molécula 3,4-bis(fenilsulfonyl)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (8) (adaptado de Fernandes, 2016).

O furoxano molécula 3,4-bis(fenilsulfonyl)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido foi obtido em 3 etapas sintéticas, descritas a seguir:

Figura 17 – Rota sintética para obtenção do furoxano (8).



Fonte: próprio autor.

Etapa 1: Síntese da molécula ácido 2-(feniltio) acético (6)

Uma mistura contendo 9,3 mL (90,7 mmol) de tiófenol (1), 7,62 g (90,7 mmol) de hidróxido de sódio e 40 mL de água destilada foi mantida sob agitação por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se lentamente 9,44 g (99,84 mmol) de ácido monocloroacético (5) e a reação foi mantida sob agitação, a 110 °C, por aproximadamente 2 horas. Completada a reação, o meio

reacional foi resfriado em banho de gelo para formação de precipitado branco que foi filtrado e lavado com água destilada gelada.

Etapa 2: Síntese da molécula ácido 2-(fenilsulfonyl) acético (3)

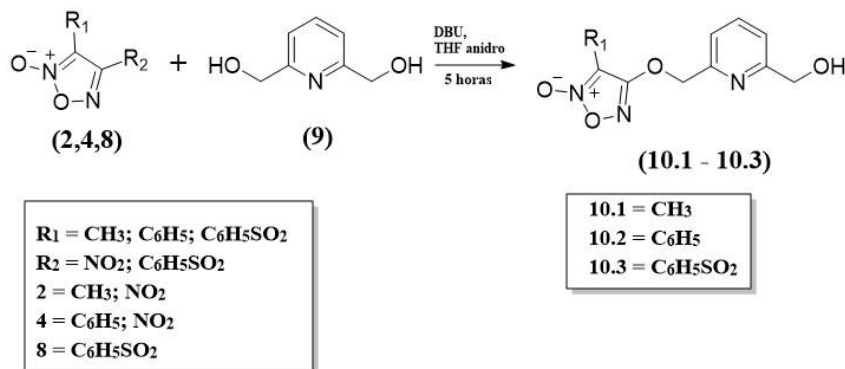
A um balão de 250 mL contendo 40 mL de ácido acético glacial adicionou-se 5 g (29,7 mmol) de ácido 2-(feniltio) acético (2) sob agitação. Após completa solubilização do ácido, a reação foi deixada em banho de gelo até completo congelamento do meio reacional e então adicionou-se 15 mL de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 48 horas. O isolamento do produto foi realizado adicionando-se 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio e extraíndo-se a fase aquosa com acetato de etila (6 porções de 15 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à pressão reduzida.

Etapa 3: Síntese da molécula 3,4-bis(fenilsulfonyl)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (4)

Uma mistura contendo 3,21 g (16,03 mmol) de ácido 2-(fenilsulfonyl) acético (3) e 10 mL de ácido acético glacial foi mantida sob agitação a 4 °C, em banho de gelo. Posteriormente, adicionou-se, gota a gota, 5 mL de ácido nítrico 98%. A mistura foi mantida sob agitação, em banho de gelo, por 5 minutos e depois mantida a 110 °C por 45 minutos. Após esse período, o meio reacional foi resfriado em banho de gelo e adicionou-se, lentamente, água destilada gelada. Houve formação de precipitado que foi filtrado e lavado com água destilada gelada.

Síntese dos intermediários híbridos 10.1 – 10.3

Figura 18 – Síntese dos intermediários híbridos 10.1 – 10.3.

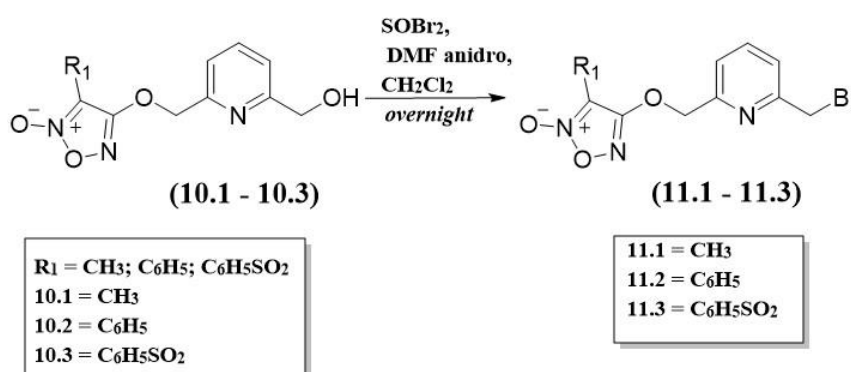


Fonte: próprio autor.

Em três balões de 50 mL foram postos 166 mg (1,2 mmols) de (9) e 5 mL de THF anidro. Então foram pipetados 180 μ L (1,2 mmols) de 1,8-diazobiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). Após 5 minutos, foram adicionados, isoladamente, 145 mg (1 mmol) de (2), 208 mg (1 mmol) de (4) e 366 mg (1 mmol) de (8). As reações transcorreram em 4 horas em temperatura ambiente. Decorridos esse tempo, foi adicionado em cada meio reacional 15 mL de água destilada e foram transferidos, separadamente, para um funil de separação de 125 mL. A fase aquosa de cada balão foi extraída cinco vezes com 30 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio e evaporada. A purificação foi realizada no Biotage® com coluna de 25 g SNAP ULTRA e fase móvel hexano:acetato 6:4, taxa de fluxo 20 mL/min, tempo de corrida de 35 minutos para o composto 10.1, 50 minutos para o composto 10.2 e 30 minutos para o composto 10.3.

Reação de bromação dos intermediários 10.1 – 10.3

Figura 19 – Reação de bromação utilizando o brometo de tionila para a formação dos haletos de alquila 11.1 – 11.3.

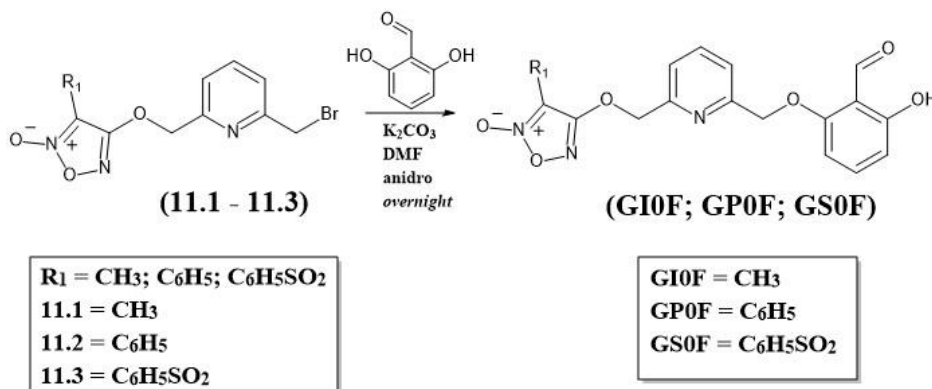


Fonte: próprio autor.

Em balões de 50 mL foram solubilizados, isoladamente, 1 mmol de 10.1, 10.2 e 10.3 em 10 mL de diclorometano anidro e três gotas de DMF anidro. Após 5 minutos, foram pipetados cuidadosamente 500 μ L (6,47 mmols) de brometo de tionila em cada balão. As reações transcorreram por 1 hora. Após esse tempo, foram adicionados nos meios 15 mL de água destilada. Os meios reacionais foram então transferidos, separadamente, para um funil de separação de 250 mL. Os balões reacionais foram lavados seis vezes com 30 mL de acetato de etila e a fase orgânica foi coletada no funil de separação. As duas fases foram separadas e a fase orgânica foi lavada duas vezes com 15 mL de água destilada e secada com sulfato de sódio anidro.

Síntese dos produtos finais 13.1 – 13.3

Figura 20 – Síntese dos produtos finais 13.1 – 13.3.



Fonte: próprio autor.

Em três balões reacionais de 25mL foram adicionados em cada 10 mL de DMF anidro, 138 mg (1mmol) de (12) e 138 mg (1mmol) de K₂CO₃. Depois de cinco minutos, adicionou-se, isoladamente, 130 mg (0,43 mmol) de (11.1), 160 mg (0,44 mmol) de (11.2) e 180 mg (0,42 mmol) de (11.3). As reações transcorreram por aproximadamente 12 horas. Após o término das reações, os meios reacionais foram transferidos para um funil de separação de 250 mL, separadamente. A fase aquosa foi lavada de oito a dez vezes com 30 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi coletada e secada com sulfato de sódio anidro e posteriormente evaporada. A purificação foi realizada no Biotage® em coluna de 10g SNAP ULTRA na fase móvel hexano:acetato 6:4 com taxa de fluxo de 10 mL/s e tempo de corrido de 15 minutos para o composto (13.1). Para o composto (13.2) e (13.3) a fase móvel foi ajustada para hexano:acetato 7:3 e tempo de corrido foi de 13 minutos e 15 minutos, respectivamente.

O produto final (13.1) foi obtido como um sólido rosa claro com rendimento de 35% (M.M. = 357,096 g/mol; C₁₇H₁₅N₃O₆; R_f = 0,14 utilizando hexano:acetato 6:4 (v/v) como fase móvel). O produto final (13.2) foi obtido como um sólido marrom com rendimento de 12% (M.M. = 419,11 g/mol; C₂₂H₁₇N₃O₆; R_f = 0,19 utilizando hexano:acetato 7:3 (v/v) como fase móvel). O produto final (13.3) foi obtido como um sólido amarelo claro com rendimento de 41% (M.M. = 483,07 g/mol; C₂₂H₁₇N₃O₈S; R_f = 0,16 utilizando hexano:acetato 7:3 (v/v) como fase móvel).

4. Resultados e Discussão

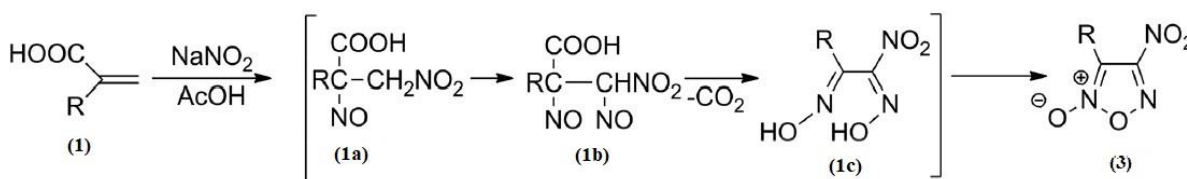
As rotas sintéticas dos derivados furoxânicos foram realizadas de acordo com a literatura. A interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono foi baseada nas referências de Silverstein et al., 2006 e Pavia et al., 2001.

4.1. Síntese dos furoxânicos e derivados

4.1.1. Síntese dos núcleos furoxânicos

A rota sintética escolhida para a síntese de (3) foi adaptada de Nikolaeva e colaboradores, 1972 e Fernandes, 2016. A formação do furoxano se dá pela reação do ácido metacrílico com nitrito de sódio em meio ácido (ácido sulfúrico 60%). O mecanismo da reação ainda não foi completamente elucidado, mas Fershtat e colaboradores, 2014, propõem a via ilustrada na figura abaixo.

Figura 21 – Mecanismo para formação do núcleo furoxano



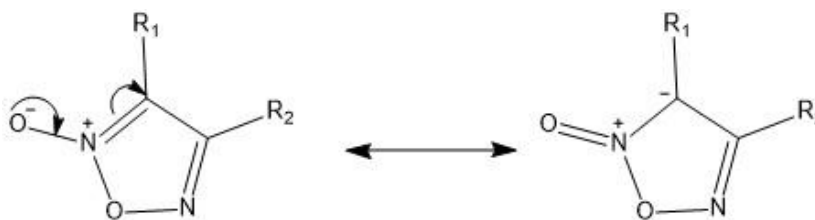
Fonte: retirado e adaptado de Fershtat et al., 2014.

Acredita-se que a reação ocorra em várias etapas mediadas pelo trióxido de dinitrogênio (N_2NO_3) gerado a partir do nitrito de sódio em meio ácido. O trióxido de dinitrogênio é adicionado à dupla ligação $\text{C}=\text{C}$ de (1) dando origem a (1a). Posteriormente, o grupo metilênico é nitrosado formando o composto (1b). Então, ocorre uma descarboxilação de (1b) e simultânea isomerização dos grupos nitroso, originando o composto (1c). Por fim, o composto (1c) é oxidado pelos óxidos de nitrogênio presentes no meio dando origem ao composto (3). O produto foi purificado por recristalização utilizando-se uma solução de etanol e água (60%/40%), apresentando-se como um sólido amarelo-alaranjado (rendimento de 35%) com faixa de fusão entre $63,9^\circ\text{C}$ e 67°C (M.M. = 145,07 g/mol; $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_4$; $R_f = 0,85$ utilizando diclorometano como fase móvel).

Observa-se no espectro de RMN de ^1H um único deslocamento na forma de singlete com deslocamento químico em δ 2,36, que integra para três hidrogênios, sendo, portanto, os hidrogênios da metila ligada no carbono 3 do furoxano. Como não está presente os deslocamentos dos hidrogênios do ácido metacrílico, a presença de um único sinal sugere a formação do 3-metil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-óxido.

Observa-se também apenas três deslocamentos no espectro de ^{13}C . Em δ 9,15 observa-se o deslocamento do carbono metílico, e em δ 107,6 e δ 159,0 os deslocamentos referentes aos carbonos 4 e 3 do núcleo furoxânico, respectivamente. A diferença entre os deslocamentos dos carbonos 3 e 4 se deve ao fato de que o carbono ligado à função *N*-óxido está mais blindado devido à ressonância deste com o *N*-óxido (Figura 22)

Figura 22 – Ressonância do carbono ligado ao *N*-óxido.



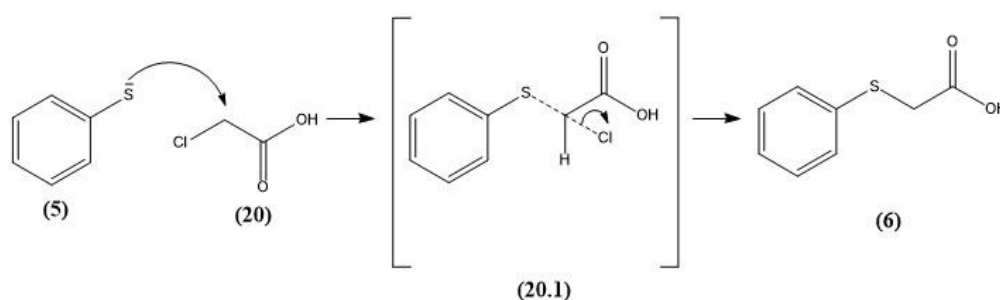
Fonte: próprio autor.

Para a síntese de 3-fenil-4-nitro-1,2,5-oxadiazol-2-óxido foi empregada metodologia descrita por Kunai e colaboradores, 1990 e Fernandes, 2016. A reação começa com estireno e nitrito de sódio em meio contendo ácido acético glacial e ácido clorídrico. O mecanismo reacional não foi totalmente esclarecido, entretanto, pode-se presumir que seja semelhante ao proposto por Fershtat et al., 2014, para a síntese do furoxano metilado (3). A purificação da molécula foi realizada por cromatografia em coluna (fase estacionária: sílica gel; fase móvel: hexano:diclorometano 7:3 (v/v)) fornecendo 1,4 g (rendimento de 35%) de um sólido amarelo ouro (4) com faixa de fusão entre 99,2 °C e 101,3 °C (M.M.= 207,14 g/mol; $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_4$; R_f = 0,38 utilizando hexano:diclorometano 7:3 (v/v) como fase móvel).

No espectro de RMN ^1H é possível visualizar os sinais dos hidrogênios aromáticos com deslocamentos em δ 7,60 e 7,73. A ausência dos deslocamentos dos hidrogênios metilênicos e metínico da dupla ligação do estireno sugerem a formação da molécula 4. No espectro de RMN ^{13}C nota-se os deslocamentos dos carbonos fenílicos em δ 120,6, 128,8, 130,8 e 131,6 e dos carbonos do núcleo furoxânico, com deslocamentos em δ 111,1 e 167,5.

Por último, a síntese do 3,4-bisartil(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido se deu em três etapas. A primeira etapa consiste na reação entre o tiofenol e o ácido monocloraacético em meio contendo hidróxido de sódio. O hidróxido de sódio desprotona o enxofre formando o ânion tiofenóxido (5). Posteriormente, o ânion ataca o carbono ligado ao cloro do ácido monocloraacético (20), dando origem ao intermediário (20.1). Através do mecanismo da S_N2 , ocorre a saída do átomo de cloro, levando a formação da molécula 6, que se apresentou como um sólido branco com rendimento de aproximadamente 87% (Figura 23).

Figura 23 – Mecanismo reacional S_N2 .



Fonte: próprio autor.

A molécula (6) foi caracterizada por RMN 1H no qual foi possível visualizar os deslocamentos dos hidrogênios aromáticos em δ 7,20 e 7,32 e também o deslocamento dos hidrogênios metilênicos em δ 3,79. Na sequência, a molécula 6 foi tratada com peróxido de hidrogênio 30% em meio contendo ácido acético glacial a fim de se obter o derivado (20.1). O produto foi obtido como um sólido branco, com rendimento de 79% (4,7 g) e faixa de fusão de 112 °C (M.M. = 200,21 g/mol; $C_8H_8O_4S$). No espectro de RMN 1H observa-se o aumento no deslocamento dos hidrogênios metilênicos para δ 4,49. Isso se deve a presença dos oxigênios do grupo sulfona na molécula, que exercem efeito de desproteção. O produto (6), caracterizado como um sólido branco, foi obtido com rendimento de 81% (12,4 g) e faixa de fusão entre 59 °C e 61 °C (M.M. = 168,21 g/mol; $C_8H_8O_2S$).

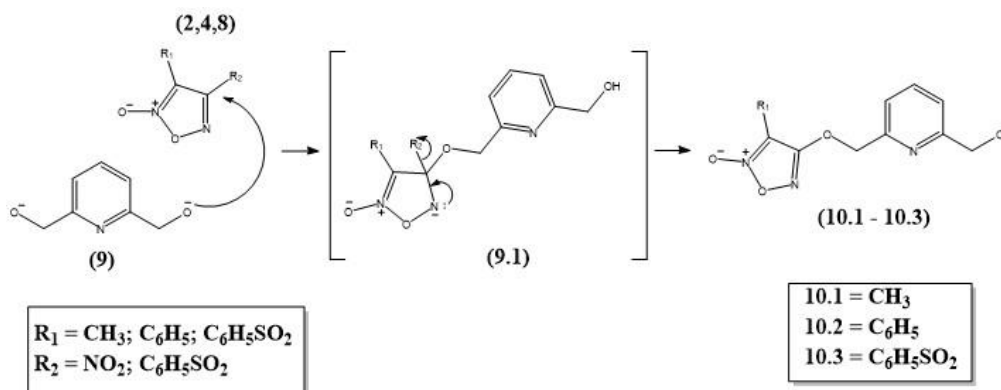
Por último, a molécula (7) foi reagida com ácido acético glacial e ácido nítrico fumegante para obter-se a molécula 8. O 3,4-bisartil(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido obtido foi recristalizado com uma mistura de acetato de etila:diclorometano:hexano (1:1:1), fornecendo 2,4 g (rendimento de 41%) de um sólido amarelo palha que apresentou faixa de fusão entre 140°C e 142°C (M.M. = 366,37 g/mol; $C_{14}H_{10}N_2O_6S_2$; R_f = 0,7 utilizando hexano:diclorometano 5:5 (v/v) como fase móvel).

Não há relatos na literatura do mecanismo reacional para a molécula 8. No espectro de RMN ^1H , observa-se apenas a presença dos hidrogênios aromáticos com deslocamentos entre δ 7,71 – 8,11. Isso sugere a formação da molécula 8 já que os deslocamentos dos hidrogênios metilênicos não estão presentes.

4.1.2. Síntese dos derivados furoxânicos

Na sequência, os núcleos furoxânicos (2, 4 e 8) foram tratados com 2,6-dihidróximetilpiridina, em meio básico, para obter os derivados (10.1), (10.2) e (10.3). Primeiramente, utilizou-se a base DBU para desprotonação dos álcoois, transformando-os em ânions fenóxido, mais nucleofílico. Em seguida, o ânion fenóxido atuando como nucleófilo forte, ataca o carbono 4 do furoxano, para posteriormente eliminar o grupo nitro. Trata-se de uma substituição nucleofílica aromática na qual há a formação de um carbono com elétrons delocalizados (Complexo de Meisenheimer), e se caracteriza por uma reação do tipo de substituição. O mecanismo está representado na (Figura 24).

Figura 24 – Mecanismo da substituição nucleofílica aromática para obtenção dos primeiros intermediários.



Fonte: próprio autor.

A molécula (10.1) apresentou-se como um sólido branco, com rendimento (η) de aproximadamente 65%. Este derivado foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C (Apêndice A- Espectro 1). O produto 10.1 foi obtido como um sólido branco com rendimento de aproximadamente 65% (M.M. = 237,07 g/mol; $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$; $R_f = 0,14$ utilizando hexano:acetato 6:4 (v/v) como fase móvel).

Pelo espectro de ^1H é possível observar os hidrogênios metilênicos em δ 4,57 e 5,43, cada um integrando para dois hidrogênios. O deslocamento em δ 4,57 apresenta-se como um duplete

devido à proximidade com o hidrogênio da hidroxila. Nota-se em δ 5,48 um tripleto integrando para 1, correspondendo ao hidrogênio da hidroxila. Observa-se também a presença dos hidrogênios metílicos em δ 2,09 como um singlete integrando para três hidrogênios.

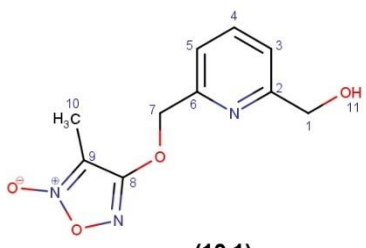
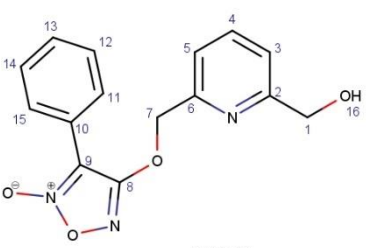
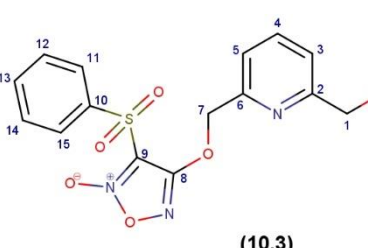
Observou-se no espectro de RMN ^{13}C (Apêndice A - Espectro 2) a presença do carbono metílico em δ 6,72. Nota-se também a presença dos dois carbonos metilênicos em δ 64,08 e 71,83, além dos carbonos do núcleo furoxânico em δ 106,91 e 153,1. Essa diferença para os carbonos no núcleo furoxânico se deve ao fato de que o carbono 3 apresentar ressonância com o *N*-óxido, tornando-o mais protegido.

O produto (10.2) foi obtido como um sólido branco com rendimento de aproximadamente 63% (M.M. = 299,09 g/mol; $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$; $R_f = 0,17$ utilizando hexano:acetato 6:4 (v/v) como fase móvel). No espectro de RMN ^1H (Apêndice A - Espectro 3) observa-se os hidrogênios metilênicos em δ 4,58 e 5,59. Observa-se também os hidrogênios aromáticos da fenila, destacando-se os hidrogênios equivalentes 11 e 15 e 12 e 14. Os hidrogênios 11 e 15 apresentam-se com um mesmo sinal na forma de duplete integrando para dois hidrogênios com deslocamento em δ 7,6. Os hidrogênios 12 e 14 apresentam um único sinal na forma de tripleto integrando para dois hidrogênios com deslocamento em δ 7,49.

No espectro de RMN ^{13}C (Apêndice A - Espectro 4) é possível visualizar os carbonos metilênicos 1 e 7 com deslocamentos em δ 64,10 e δ 72,42, respectivamente. Observa-se também os carbonos 8 e 9 do núcleo furoxânico com deslocamentos em δ 153,09 e 107,71. Destaca-se também os carbonos do grupo fenil, sendo alguns o carbono 13 com deslocamento em δ 129,06.

O produto (10.3) foi obtido com um sólido branco com rendimento de aproximadamente 63% (M.M. = 363,05 g/mol; $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$; $R_f = 0,13$ utilizando hexano:acetato 6:4 (v/v) como fase móvel). No espectro de RMN ^1H (Apêndice A - Espectro 5) observa-se os hidrogênios metilênicos 1 e 7 com deslocamentos em δ 4,56 e 5,51, respectivamente. Nota-se também os hidrogênios aromáticos do grupo fenilsulfonil, que apresentaram um deslocamento maior comparados aos deslocamentos dos hidrogênios da molécula anterior. É possível visualizar os hidrogênios equivalentes 12 e 14 com um único sinal na forma de tripleto (t) integrando para dois hidrogênios com deslocamento δ 7,74. No espectro de ^{13}C (Anexo 6) nota-se a presença dos carbonos equivalentes 12 e 14 em δ 128,81 e os carbonos 11 e 15 em δ 130,51

Quadro 2 – Deslocamentos químicos dos primeiros intermediários nos espectros de ^1H e ^{13}C .

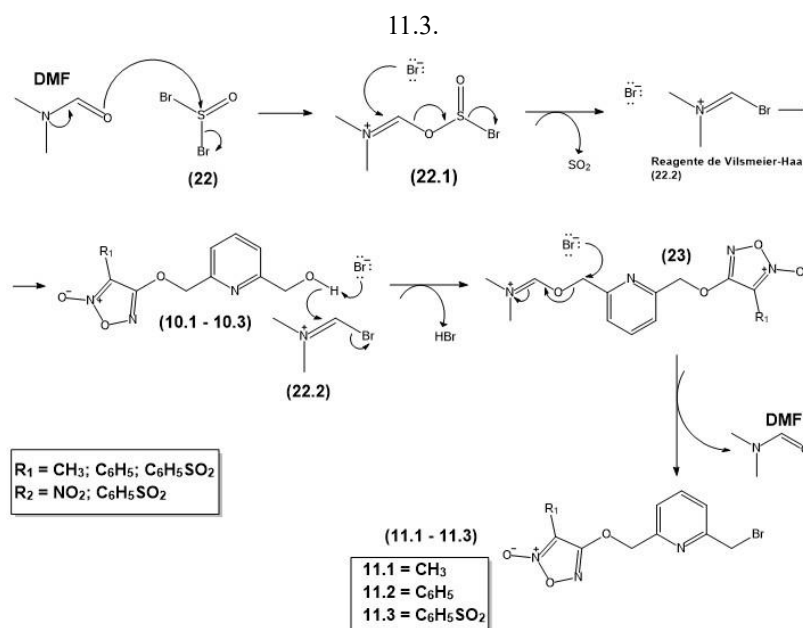
 (10.1)	 (10.2)	 (10.3)						
Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
1	4,58(d), <i>J</i> =5,7Hz	64,08	1	4,58(d), <i>J</i> =5,8Hz	64,10	1	4,57(s)	64,55
2	-	161,99	2	-	162,00	2	-	162,42
3	7,45(d), <i>J</i> =7,7Hz	120,26	3	8,07(d), <i>J</i> =1,5Hz	137,75	3	7,38(d), <i>J</i> =7,6Hz	136,65
4	7,88(t), <i>J</i> =7,7Hz	119,96	4	7,90(t), <i>J</i> =7,7Hz	120,16	4	7,90(q), <i>J</i> =7,7Hz	120,41
5	7,48(d), <i>J</i> =7,8Hz	137,31	5	8,08(m)	138,43	5	7,50(d), <i>J</i> =7,7Hz	138,18
6	-	163,31	6	-	162,05	6	-	159,14
7	5,43(s)	71,83	7	5,59(s)	72,42	7	5,51(s)	73,05
8	-	153,1	8	-	153,09	8	-	153,17
9	-	106,91	9	-	107,71	9	-	111,12
10	2,03(s)	6,57	10	-	121,94	10	-	137,59
11	5,48(t)	-	11	7,60(d), <i>J</i> =7,6Hz	129,06	11	8,03(d), <i>J</i> =7,4Hz	130,51
	-	-	12	7,49(t), <i>J</i> =7,5Hz	126,35	12	7,74(t), <i>J</i> =7,9Hz	128,81
	-	-	13	7,59(t), <i>J</i> =7,3Hz	119,94	13	7,90(q), <i>J</i> =7,7Hz	120,44
	-	-	14	7,49(t), <i>J</i> =7,5Hz	126,35	14	7,74(t), <i>J</i> =7,9Hz	128,81
	-	-	15	7,60(d), <i>J</i> =7,6Hz	129,06	15	8,03(d), <i>J</i> =7,4Hz	130,51
	-	-	16	5,49(t), <i>J</i> =5,9Hz	-	16	-	-

Fonte: dados da pesquisa.

Posteriormente, as moléculas (10.1 – 10.3) foram tratadas, individualmente, com brometo de tionila para se obter os intermediários (11.1 – 11.3). O composto (11.1) foi obtido como um sólido bege com rendimento de aproximadamente 91% (M.M. = 298,99 g/mol; $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_3$; $R_f = 0,68$ utilizando hexano:acetato 6:4 como fase móvel). O composto 11.2 foi obtido como um sólido bege claro com rendimento de aproximadamente 87% (M.M. = 361 g/mol; $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrN}_3\text{O}_3$; $R_f = 0,69$ utilizando hexano:acetato 6:4 (v/v) como fase móvel). O composto

(11.3) foi obtido como um sólido beje com rendimento de aproximadamente 90% (M.M. = 424,96 g/mol; $C_{15}H_{12}BrN_3O_5S$; $R_f = 0,71$ utilizando hexano:acetato 6:4 (v/v) como fase móvel). Os compostos halogênicos apresentaram-se como sólidos beje e foram caracterizados por RMN 1H e ^{13}C .

Figura 25 – Mecanismo de bromação utilizando o brometo de tionila para obtenção dos intermediários 11.1 –



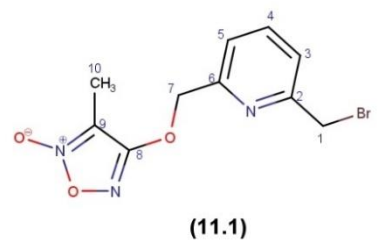
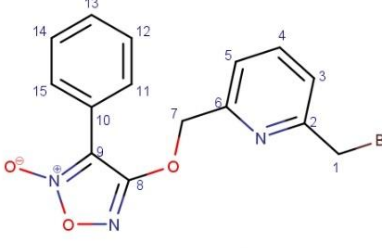
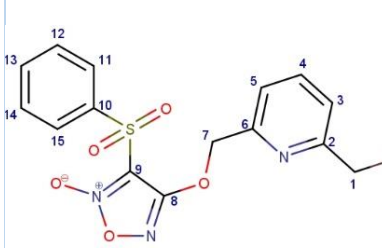
Fonte: próprio autor.

Os deslocamentos químicos estão organizados na Quadro 3. Nota-se pelos espectros de 1H (Apêndice A - Espectros 7, 9 e 11, respectivamente) a ausência do sinal em δ 5,48 como um tripleto que representa o deslocamento do hidrogênio da hidroxila no carbono 1. Percebe-se também o aumento de todos os sinais de hidrogênio nos carbonos 1 dos intermediários (11.1 – 11.3). Anteriormente, os deslocamentos dos hidrogênios do carbono metilênico 1 estavam em δ 4,58, 4,58 e 4,59, respectivamente. Nos intermediários bromados os deslocamentos se apresentaram mais à esquerda do gráfico, em δ 4,71 para o composto (11.1), δ 4,72 para (11.2) e δ 4,69 para (11.3). Estes sinais também deixaram de se apresentar como dupletos pois não estão mais próximos ao hidrogênio da hidroxila, indicando que houve a interconversão de grupo funcional.

No espectro de ^{13}C (Apêndice A – Espectros 8, 10 e 12) a maior mudança ocorreu nos carbonos ligados ao bromo devido à menor eletronegatividade dele. Anteriormente, o carbono 1 apresentava-se em δ 64,08 para a (10.1), δ 64,10 para (10.2) e δ 64,55 para (10.3). O bromo por possuir menor eletronegatividade que o oxigênio, não desblinda o carbono tanto quanto o

oxigênio. Desta forma, os carbonos ligados ao bromo apresentaram deslocamentos em δ 34,88 para (11.1), δ 34,95 para (11.2) e δ 34,89 para (11.3).

Quadro 3 – deslocamentos químicos para os intermediários halogenados.

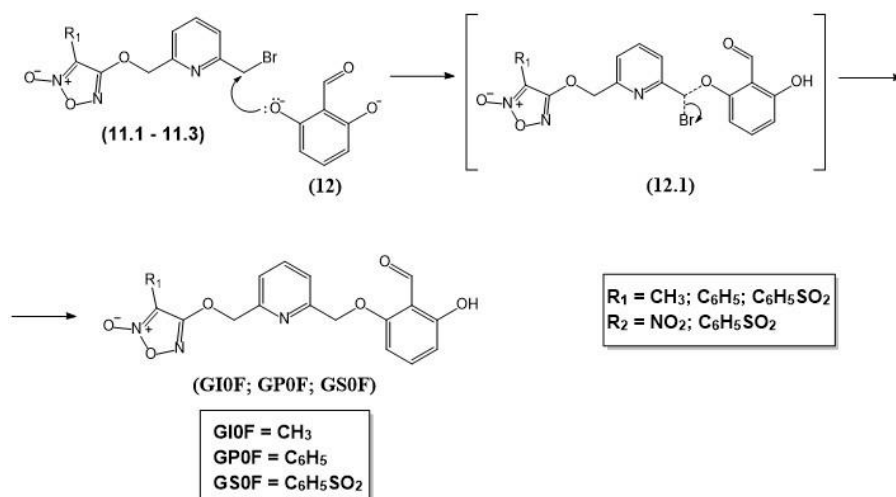
 (11.1)			 (11.2)			 (11.3)		
Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
1	4,71(s)	34,88	1	4,72(s)	34,95	1	4,69(s)	34,89
2	-	157,0 5	2	-	157,09	2	-	157,02
3	7,54(d) $J=7,7\text{H}$ z	122,0 7	3	8,08(d) $J=7,3\text{Hz}$	122,01	3	7,47(d) $J=7,7\text{Hz}$	121,78
4	7,91(t) $J=7,7\text{H}$ z	138,9 1	4	7,93(t) $J=7,7\text{Hz}$	138,96	4	7,90(t) $J=7,4\text{Hz}$	138,95
5	7,57(d) $J=7,7\text{H}$ z	123,9 8	5	8,08(d) $J=7,3\text{Hz}$	123,92	5	7,58(d) $J=7,7\text{Hz}$	123,96
6	-	163,7 4	6	-	162,49	6	-	159,10
7	5,47(s)	72,02	7	5,62(s)	72,55	7	5,55(s)	72,75
8	-	154,6 5	8	-	154,64	8	-	154,72
9	-	107,4	9	-	108,20	9	-	111,13
10	2,1(s)	7,19	10	-	122,40	10	-	137,59
-	-	-	11	7,59(m)	129,53	11	8,04(d) $J=8,1\text{Hz}$	130,51
-	-	-	12	7,59(m)	126,85	12	7,74(t) $J=7,9\text{Hz}$	128,83
-	-	-	13	7,59(m)	131,25	13	7,94(t) $J=7,7\text{Hz}$	136,67
-	-	-	14	7,59(m)	126,85	14	7,74(t) $J=7,9\text{Hz}$	128,83
-	-	-	15	7,59(m)	129,53	15	8,04(d) $J=8,1\text{Hz}$	130,51

Fonte: dados da pesquisa.

4.1.3. Síntese dos compostos finais

Para a obtenção das moléculas finais, tratou-se os compostos (11.1 – 11.3) com 2,6-dihidróxibenzaldeído em meio básico. Iniciou-se a desprotonação do 2,6-dihidróxibenzaldeído utilizando a base carbonato de potássio (K_2CO_3) para a formação do ânion fenóxido (12). O ânion atuando como nucleófilo, através do mecanismo de uma substituição nucleofílica alifática bimolecular (SN_2), ataca o carbono ligado ao bromo, formando um complexo com duas ligações parciais (12.1). A saída do bromo resulta na formação de ácido bromídrico (HBr) e do composto final 13.

Figura 26 – Mecanismo da SN_2 para as moléculas finais.



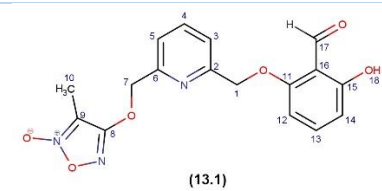
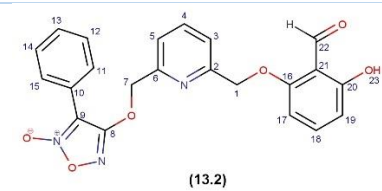
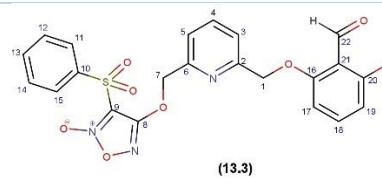
Fonte: próprio autor.

O produto final (13.1) foi obtido como um sólido rosa claro com rendimento de 35% (M.M. = 357,096 g/mol; $C_{17}H_{15}N_3O_6$; $R_f = 0,14$ utilizando hexano:acetato 6:4 (v/v) como fase móvel). O produto final (13.2) foi obtido como um sólido marrom com rendimento de 12% (M.M. = 419,11 g/mol; $C_{22}H_{17}N_3O_6$; $R_f = 0,19$ utilizando hexano:acetato 7:3 (v/v) como fase móvel). O produto final (13.3) foi obtido como um sólido amarelo claro com rendimento de 41% (M.M. = 483,07 g/mol; $C_{22}H_{17}N_3O_8S$; $R_f = 0,16$ utilizando hexano:acetato 7:3 (v/v) como fase móvel). Todas as três moléculas finais foram caracterizadas por RMN de 1H e ^{13}C , como é mostrado na Tabela 3. Nota-se nos espectros de 1H dos três produtos finais a presença do hidrogênio carbonílico na forma de singleto com deslocamentos em δ 10,41 para 13.1, δ 10,41 para 13.2 e δ 10,41 para 13.3, todos na forma de simpleto integrando para um hidrogênio. Pode-se perceber também novos sinais para hidrogênios aromáticos para as três moléculas – no composto (13.1)

(Apêndice A – Espectro 13) destacam-se os hidrogênios 12 e 14, na forma de duplete, com deslocamentos em δ 6,70 e δ 6,56, respectivamente. No composto (13.2) (Apêndice A – Espectro 15) esses hidrogênios estão nas posições 17 e 19, apresentam-se como duplete com deslocamentos em δ 6,68 e δ 6,55. Já para a molécula (13.3) (Apêndice A – Espectro 17) esses hidrogênios tiveram deslocamentos em δ 6,68 e δ 6,56.

No espectro de ^{13}C observa-se para os três compostos a presença do carbono carbonílico do aldeído em δ 194,35 para 13.1, δ 194,33 para 13.2 e δ 193,89 para 13.3. Na molécula (13.1) (Apêndice A – Espectro 14) destaca-se os carbonos 12 e 14 com deslocamentos em δ 103,93 e δ 110,15, respectivamente. No composto (13.2) (Apêndice A - Espectro 16) nota-se os carbonos 17 e 19 com deslocamentos em δ 110,14 e δ 103,91, respectivamente. No composto (13.3) (Apêndice A - Espectro 18) os mesmos carbonos encontram-se com os deslocamentos em δ 109,72 e 103,44.

Quadro 4 – Deslocamentos químicos dos produtos finais nos espectros de ^1H e ^{13}C .

 (13.1)			 (13.2)			 (13.3)		
Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
1	5,33(s)	71,17	1	5,34(s)	71,20	1	5,30(s)	70,76
2	-	156,43	2	-	156,47	2	-	155,87
3	7,57(d) $J=7,7\text{H}$ z	121,93	3	8,07(d), $J=7,8\text{Hz}$	121,84	3	7,67(d) $J=7,8\text{Hz}$	121,47
4	7,95(t) $J=7,8\text{H}$ z	138,72	4	7,96(dt), $J=7,7\text{Hz}$	138,81	4	7,98(t) $J=7,8\text{Hz}$	138,35
5	7,67(d) $J=7,8\text{H}$ z	121,81	5	8,07(d), $J=7,8\text{Hz}$	121,87	5	7,51(d) $J=8,4\text{Hz}$	121,18
6	-	154,30	6	-	162,49	6	-	153,45
7	5,50(s)	72,06	7	5,64(s)	72,67	7	5,57(s)	72,39
8	-	163,74	8	-	154,43	8	-	158,62
9	-	107,36	9	-	108,17	9	-	110,77
10	2,09(s)	7,16	10	-	122,39	10	-	137,15
11	-	161,30	11	7,60(d) $J=7,3\text{Hz}$	129,53	11	8,03(m)	128,36
12	6,70(d) $J=8,4\text{H}$ z	103,93	12	7,48(m)	126,83	12	7,73(m)	130,06

13	7,51(t) $J=8,4H$ z	139,19	13	7,57(d) $J=7,2Hz$	131,25	13	7,51(t) $J=8,4Hz$	138,73
14	6,56(d) $J=8,4H$ z	110,15	14	7,48(m)	126,83	14	7,73(m)	130,06
15	-	111,22	15	7,60(d) $J=7,3Hz$	129,53	15	8,03(m)	128,36
16	-	162,82	16	-	162,89	16	-	160,84
17	10,41(s)	194,35	17	6,68(d) $J=8,3Hz$	110,14	17	6,56(dd) $J=8,4,$ $0,7 Hz$	109,72
18	11,75(s)	-	18	7,68(d) $J=7,7Hz$	139,16	18	7,87(m)	136,20
-	-	-	19	6,55(d) $J=8,4Hz$	103,91	19	6,68(m)	103,44
-	-	-	20	-	161,30	20	-	161,10
-	-	-	21	-	111,21	21	-	162,42
-	-	-	22	10,41(s)	194,33	22	10,41(s)	193,89
-	-	-	23	11,73(s)	-	23	11,74(s)	-

Fonte: dados da pesquisa.

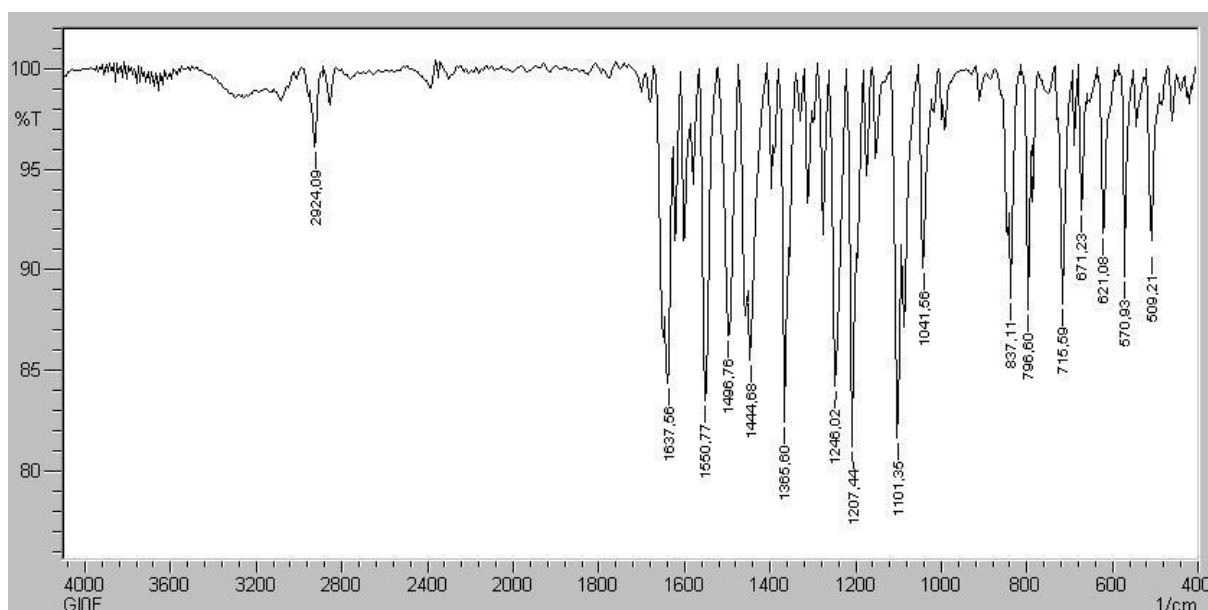
A interpretação dos espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais sugerem a formação dos produtos de interesse, destacando-se mudanças em determinados sinais indicativos como dois novos deslocamentos em δ 6,56 – 6,70, referentes aos hidrogênios aromáticos do benzaldeído, além do deslocamento de δ = 10,42 referente ao hidrogênio do aldeído e δ 194,33 no espectro de ^{13}C referente ao carbono aldeídico.

A espectroscopia na região do infravermelho para a molécula (13.1) mostrou uma banda de estiramento forte com valor $1550,77\text{ cm}^{-1}$ que se refere ao grupo N-O do anel furoxano. Nota-se também um estiramento em $1637,56\text{ cm}^{-1}$ referente ao C=O do aldeído. Observa-se também o estiramento do aldeído C-H em $2924,09\text{ cm}^{-1}$ enquanto o dobramento C-H é observado em $1365,60\text{ cm}^{-1}$. O grupo metila apresenta banda em $1444,68\text{ cm}^{-1}$ enquanto os carbonos metilênicos apresentam uma banda em $1496,76\text{ cm}^{-1}$.

Quadro 5 – Bandas no infravermelho para o composto (13.1).

Grupo químico	Aspecto da banda	Absorção (cm^{-1})
C-H; aldeído	Dobramento	1365,60
C-C; metila	Dobramento	1444,68
C-C; metileno	Dobramento	1496,76
N-O; grupo nitro	Estiramento	1550,77
C=O; aldeído	Estiramento	1637,56
C-H; aldeído	Estiramento	2924,09

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 27 – Espectrofotometria na região do infravermelho com faixa de frequência entre 4000 e 400 cm^{-1} para (13.1).

Fonte: dados da pesquisa.

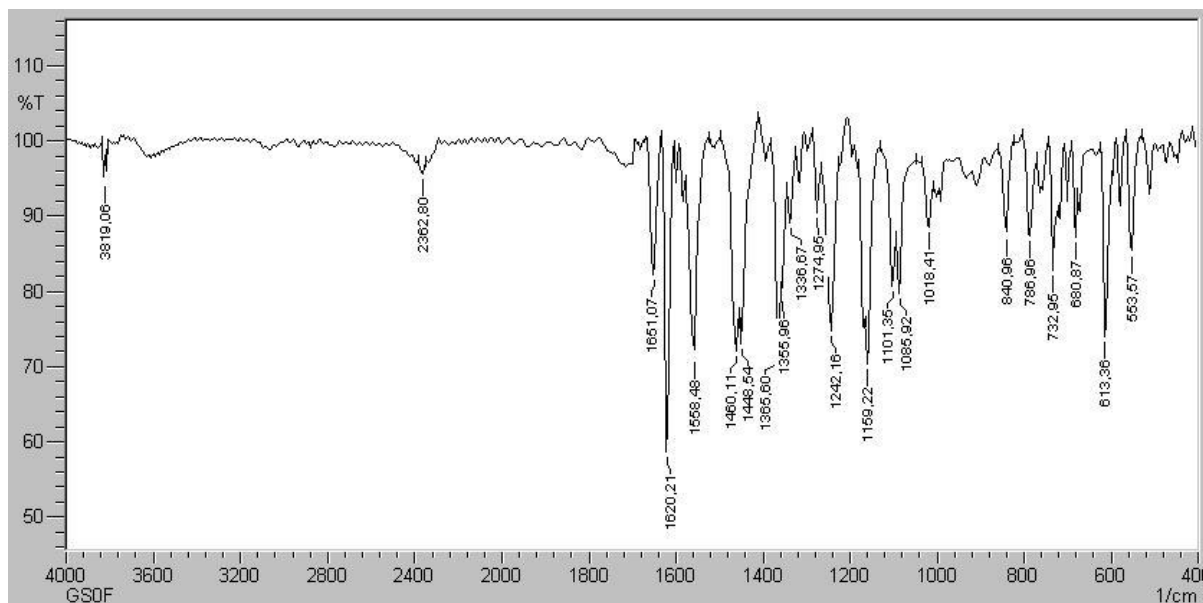
A espectrofotometria na região do infravermelho (IR) para a molécula (13.3) mostrou uma banda de estiramento forte com valor 1558,48 cm^{-1} que se refere ao grupo N-O do anel furoxano. Nota-se também um estiramento em 1620,21 cm^{-1} referente ao C=O do aldeído. Observa-se o dobramento C-H do aldeído é em 1365,60 cm^{-1} . Os carbonos metilênicos apresentaram uma banda em 1460,11 cm^{-1} .

Quadro 6 – Bandas de estiramento no infravermelho para (13.3).

Grupo Químico	Aspecto da banda	Absorção (cm^{-1})
C-H; aldeído	Dobramento	1365,60
C-C; metilênicos	Dobramento	1460,11
N-O; grupo nitro	Estiramento	1558,48
C=O; aldeído	Estiramento	1620,21

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 28 – Espectrofotometria na região do infravermelho com faixa de frequência entre 4000 a 400 cm^{-1} para (13.3).



Fonte: dados da pesquisa.

As metodologias de síntese para os núcleos furoxânicos são amplamente descritas na literatura. Algumas reações para a formação dos furoxanos, como o furoxano nitro metilado e nitro fenilado, utilizam o reagente nitrito de sódio como agente químico responsável por introduzir espécies de nitrogênio. Assim como descritos na literatura, os furoxanos (2) e (4) foram obtidos como sólidos amarelos com rendimentos de 35%. O furoxano (8) foi obtido como um sólido branco com rendimento de 41%. As sínteses de acoplamento com a substância (9) foram realizadas em banho de gelo com excesso de (9) para deslocar a reação para a formação dos produtos desejados, minimizando a formação de produtos disubstituídos.

Na sequência, os produtos obtidos na etapa anterior supracitada foram tratados com SOBr_2 e quantidades catalíticas de *N,N*-dimetilformamida anidra e solvente anidro para formação dos haletos de alquila (11.1), (11.2) e (11.3) em meios reacionais acoplados a condensadores ligeiramente tampados com algodão. A escolha do catalisador e do solvente anidros assim como os condensadores se deve ao fato da instabilidade das tionilas em meio aquoso ou em contato com o ar atmosférico, que são hidrolisados prontamente, liberando $\text{SO}_{2(g)}$ e $\text{HBr}_{(g)}$, gases extremamente nocivos. Deve-se ressaltar também a influência do solvente usado, o diclorometano, que evapora com facilidade em temperatura ambiente.

Por fim, os haletos foram tratados em meio básico e solvente anidro para obtenção dos produtos finais. Apenas os produtos finais (13.1) e (13.3) foram obtidos com rendimentos entre 40 e 50%, o que permitiu serem submetidos as análises químicas de RMN de ^1H e ^{13}C assim como os

experimentos HSQC e HMBC e a espectrofotometria na região do infravermelho. O produto final 13.2 foi obtido em quantidades suficientes para uma análise de RMN, com rendimento de aproximadamente 12%, tendo apresentado impurezas, o que inviabilizou seu uso em análises posteriores.

5. Conclusões

Os núcleos furoxanos foram obtidos com rendimentos variando entre 35% e 40%, sendo o 3,4-bisartil(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido o mais trabalhoso de ser obtido. As sínteses de acoplamento com a 2,6-dihidroxi metilpiridina teve rendimentos de 65% e 70%. A bromação dos primeiros intermediários é uma etapa delicada devido à instabilidade do brometo de tionila, entretanto, os rendimentos foram superiores a 80%.

Foram obtidos dois compostos finais com rendimentos maiores que 30% (13.1 e 13.3). O composto final fenilado (13.2) foi obtido com rendimento de 12%. A série do furoxano metilado apresentou um rendimento global de 56,5%. A série do furoxano fenilado apresentou rendimento global de 50,75%. E a série do furoxano fenilsulfonado apresentou um rendimento global de 60,75%. Os métodos analíticos utilizaram sugerem a formação do produto, permitindo concluir que a rota sintética utilizada permitiu a obtenção dos produtos desejados.

Referências

- ABBOUD, M. R. *et al.* Efficacy, Safety, and Biomarker Analysis of 5 Mg and 7.5 Mg Doses of Crizanlizumab in Patients with Sickle Cell Disease: Primary Analyses from the Phase III STAND Study. **Blood**, v. 142, p. 272, 2023.
- ABDU, A.; GÓMEZ-MÁRQUEZ, J.; ALDRICH, T. K. The oxygen affinity of sickle hemoglobin. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 161, n. 1, p. 92-94, 2008.
- ABDULMALIK, O. *et al.* 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. **British journal of haematology**, v. 128, n. 4, p. 552-561, 2005.
- ABDULMALIK, O. *et al.* Crystallographic analysis of human hemoglobin elucidates the structural basis of the potent and dual antisickling activity of pyridyl derivatives of vanillin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 11, p. 920-928, 2011.
- ABDULMALIK, O. *et al.* VZHE-039, a novel antisickling agent that prevents erythrocyte sickling under both hypoxic and anoxic conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20277, 2020.
- ABRAHAM, D. J. *et al.* Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. 1991.
- ABRAMOWSKI, S. W. Hemolysis: Mechanism and clinico-biological consequences. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 28, n. 4, p. 364-366, 2021.
- ADACHI, K. *et al.* Effect of amino acid at the beta 6 position on surface hydrophobicity, stability, solubility, and the kinetics of polymerization of hemoglobin. Comparisons among Hb A (Glu beta 6), Hb C (Lys beta 6), Hb Machida (Gln beta 6), and Hb S (Val beta 6). **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 27, p. 12920-12925, 1987.
- AHMED, M. H.; GHATGE, M. S.; SAFO, M. K. Hemoglobin: structure, function and allostery. **Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins**, p. 345-382, 2020.
- AKINSHEYE, I.; KLINGS, E. S. Sickle cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. **Journal of cellular physiology**, v. 224, n. 3, p. 620-625, 2010.
- AKINSHEYE, I. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 118, n. 1, p. 19-27, 2011.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 78-86, 2018.

- AMBROSE, E. E. *et al.* Surveillance for sickle cell disease, **United Republic of Tanzania. Bulletin of the World Health Organization**, v. 98, n. 12, p. 859, 2020.
- AMMAD UD DIN, M.; HUSSAIN, S. A.; JAMSHED, S. Leg ulcer with long-term hydroxyurea use. **Clinical Case Reports**, v. 9, n. 4, p. 2487-2488, 2021.
- ANVISA cancela registro do medicamento Adakveo®. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA, Ministério da Saúde**. Brasília, 30 de set. de 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-cancela-registro-do-medicamento-adakveo>. Acesso em: 12 de dezembro de 2023.
- ARYA, R. *et al.* Tucasol increases oxygen affinity and reduces haemolysis in subjects with sickle cell anaemia. **British journal of haematology**, v. 93, n. 4, p. 817-821, 1996.
- ARISHI, W. A.; ALHADRAMI, H. A.; ZOUROB, M. Techniques for the detection of sickle cell disease: a review. **Micromachines**, v. 12, n. 5, p. 519, 2021.
- ATAGA, K. I. *et al.* Crizanlizumab for the prevention of pain crises in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 5, p. 429-439, 2017.
- BALLAS, S. K. 7 Sickle cell disease: clinical management. **Bailliere's clinical haematology**, v. 11, n. 1, p. 185-214, 1998.
- BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle cell biomechanics. **Annual review of biomedical engineering**, v. 12, p. 345-367, 2010.
- BITOUNGUI, V. J. N. *et al.* Beta-globin gene haplotypes among cameroonians and review of the global distribution: is there a case for a single sickle mutation origin in Africa?. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 19, n. 3, p. 171-179, 2015.
- BLUEBIRDBIO. **LYFGENIA Prescribing Information**. Massachusetts, dezembro de 2023. Disponível em: https://www.bluebirdbio.com/-/media/bluebirdbio/Corporate%20COM/Files/Lyfgenia/LYFGENIA_Prescribing_Information.pdf. Acesso em: 13 de dezembro de 2023.
- 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. 183-189, 1985.
- BOAS, F. E.; FORMAN, L.; BEUTLER, E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3077-3081, 1998.
- BORTOLUZZI, A. F. R. *et al.* Medicamentos para o tratamento da Doença Falciforme. **Monitoramento do Horizonte Tecnológico (CONITEC)**, Brasília, setembro de 2022.

Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/radar/2022/20221011_mht_doenca-falciforme.pdf. Acesso em: 11 de dezembro de 2023.

BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: the sick (led) spleen.

British journal of haematology, v. 166, n. 2, p. 165-176, 2014.

BRUGNARA, C. *et al.* Inhibition of Ca (2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 520-526, 1993.

BUNN, H. F. *et al.* Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 5, p. 687-692, 2010.

CANALLI, A. A. *et al.* Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 605-609, 2008.

CARDEN, M. A.; FASANO, R. M.; MEIER, E. R. Not all red cells sickle the same: contributions of the reticulocyte to disease pathology in sickle cell anemia. **Blood reviews**, v. 40, p. 100637, 2020

CARDILLO, C. *et al.* Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. **Hypertension**, v. 35, n. 6, p. 1237-1241, 2000.

CARTRON, J. P.; ELION, J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. **Transfusion clinique et biologique**, v. 15, n. 1-2, p. 39-50, 2008.

CONNES, P. *et al.* The role of blood rheology in sickle cell disease. **Blood reviews**, v. 30, n. 2, p. 111-118, 20

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.

CONRAN, N. *et al.* Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. **American journal of hematology**, v. 76, n. 4, p. 343-347, 2004.

CONRAN, N. Intravascular hemolysis: a disease mechanism not to be ignored. **Acta haematologica**, v. 132, n. 1, p. 97-99, 2014.

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

- CYTLLAK, U. M. *et al.* Identification of the Ca²⁺ entry pathway involved in deoxygenation-induced phosphatidylserine exposure in red blood cells from patients with sickle cell disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 465, p. 1651-1660, 2013.
- DAAK, A. A. *et al.* Sickle cell disease in western Sudan: genetic epidemiology and predictors of knowledge attitude and practices. **Tropical Medicine & International Health**, v. 21, n. 5, p. 642-653, 2016.
- DAVENPORT, A. P. *et al.* Endothelin. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 2, p. 357-418, 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. **The Journal of clinical investigation**, v. 96, n. 1, p. 60-68, 1995.
- DE MONTALEMBERT, M. *et al.* Long-term hydroxyurea treatment in children with sickle cell disease: tolerance and clinical outcomes. **Haematologica**, v. 91, n. 1, p. 125-128, 2006.
- DOS SANTOS, J. L. *et al.* Mutagenicity of new lead compounds to treat sickle cell disease symptoms in a Salmonella/microsome assay. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 779-788, 2010.
- DOS SANTOS FERNANDES, G. F. *et al.* Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 523-531, 2016.
- DUFU, K. *et al.* GBT021601 improves red blood cell health and the pathophysiology of sickle cell disease in a murine model. **British Journal of Haematology**, 2023.
- EL HOSS, S.; BROUSSE, V. Considering the spleen in sickle cell disease. **Expert Rev Hematol**. 2019; 12 (7): 563-73.
- ESOH, K.; WONKAM, A. Evolutionary history of sickle-cell mutation: implications for global genetic medicine. **Human molecular genetics**, v. 30, n. R1, p. R119-R128, 2021.
- FAES, C.; SPARKENBAUGH, E. M.; PAWLINSKI, R. Hypercoagulable state in sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 301-318, 2018.
- FERTRIN, K. Y.; COSTA, F. F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert review of hematology**, v. 3, n. 4, p. 443-458, 2010.
- FERREIRA DE MELO, T. R.; CHIN, C. M.; DOS SANTOS, J. L. What are the most promising emerging therapies for sickle cell disease?. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 979-982, 2014.

- FRANCIS JR, R. B.; HAYWOOD, L. J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **Journal of the National Medical Association**, v. 84, n. 7, p. 611, 1992.
- 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.
- FERSHTAT, L. L.; ZHILIN, E. S. Recent advances in the synthesis and biomedical applications of heterocyclic NO-donors. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5705, 2021.
- FITZHARRIS, P. *et al.* The effects in volunteers of BW12C, a compound designed to left-shift the blood-oxygen saturation curve. **British journal of clinical pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 471-481, 1985.
- FORSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, 2006.
- GAMBERO, S. *et al.* Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. **European journal of haematology**, v. 78, n. 2, p. 144-151, 2007.
- GASCO, A. *et al.* NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973-981, 2004.
- GASTON, M. H. *et al.* Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 25, p. 1593-1599, 1986.
- GLADWIN, M. T. *et al.* Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 9, p. 886-895, 2004.
- GONÇALVES, M. S. *et al.* β^s -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1283-1288, 2003.
- GULBIS, B. *et al.* Hydroxyurea for sickle cell disease in children and for prevention of cerebrovascular events: the Belgian experience. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2685-2690, 2005.
- HALLMARK, L. *et al.* Nitric oxide and sickle cell disease—Is there a painful connection? **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 3, p. 332-341, 2021.
- HANKINS, J. S. *et al.* Preservation of spleen and brain function in children with sickle cell anemia treated with hydroxyurea. **Pediatric blood & cancer**, v. 50, n. 2, p. 293-297, 2008.
- HEBBEL, R. P. *et al.* Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 1, p. 237-241, 1988.

- HEBBEL, R. P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. 1991.
- HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. The endothelial biology of sickle cell disease. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 129, n. 3, p. 288-293, 1997.
- HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, n. 2, p. 129-151, 2004.
- HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Multiple inducers of endothelial NOS (eNOS) dysfunction in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 96, n. 11, p. 1505-1517, 2021.
- HEENEY, M. *et al.* S122: safety and efficacy of crizanlizumab in adolescents with sickle cell disease (SCD): initial data from the phase ii, multicenter, open-label solace-kids trial. **HemaSphere**, v. 6, n. Suppl, 2022.
- HOPPE, C. C. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 28, n. 2, p. 265-286, 2014.
- HUISJES, R. *et al.* Squeezing for life—properties of red blood cell deformability. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 656, 2018.
- JAFRI, F. *et al.* L-glutamine for sickle cell disease: more than reducing redox. **Annals of Hematology**, v. 101, n. 8, p. 1645-1654, 2022.
- JASTANIAH, W. Epidemiology of sickle cell disease in Saudi Arabia. **Annals of Saudi medicine**, v. 31, n. 3, p. 289-293, 2011.
- JONES, K. M. *et al.* Adverse effects of a clinically relevant dose of hydroxyurea used for the treatment of sickle cell disease on male fertility endpoints. **International journal of environmental research and public health**, v. 6, n. 3, p. 1124-1144, 2009.
- KAN, Y. W.; DOZY, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 11, p. 5631-5635, 1978.
- KARIMI, M. *et al.* Long-term Safety and Efficacy of Hydroxyurea in Patients with Non-transfusion-dependent β -thalassemia: a Comprehensive Single-center Experience. **Annals of Hematology**, v. 100, n. 12, p. 2901-2907, 2021.
- KASSIM, A. A.; DEBAUN, M. R. Sickle cell disease, vasculopathy, and therapeutics. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 451-466, 2013.

- KATO, G. J. *et al.* Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine and new research directions. **American journal of hematology**, v. 84, n. 9, p. 618, 2009.
- KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. **Nature reviews Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 2018.
- KATO, G. J. *et al.* Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 750-760, 2017.
- KAVANAGH, P. L.; FASIPE, T. A.; WUN, T. Sickle cell disease: a review. **Jama**, v. 328, n. 1, p. 57-68, 2022.
- KEIDAN, A. J. *et al.* Effect of BW12C on oxygen affinity of haemoglobin in sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 327, n. 8485, p. 831-834, 1986.
- KIM-SHAPIO, D. B.; GLADWIN, M. T. Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 223-237, 2018.
- KING, S. The nitric oxide producing reactions of hydroxyurea. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 437-452, 2003.
- KOWALCZYK, A. *et al.* The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 63, p. 41-52, 2015.
- KUNAI, A. *et al.* Stereoselective synthesis of (E)-2-hydroxyimino-2-phenylacetonitrile by photolysis of 4-azido-3-phenylfurazan 2-oxide. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 63, n. 6, p. 1843-1844, 1990.
- KUYPERS, F. A. Red cell membrane lipids in hemoglobinopathies. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 633-638, 2008.
- LANKHORST, S. *et al.* Mechanism of hypertension and proteinuria during angiogenesis inhibition: evolving role of endothelin-1. **Journal of hypertension**, v. 31, n. 3, p. 444-454, 2013.
- LEANDRO DOS SANTOS, J.; LANARO, C.; MAN CHIN, C. Advances in sickle cell disease treatment: from drug discovery until the patient monitoring. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry** (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents), v. 9, n. 2, p. 113-127, 2011.
- LI, H.; LYKOTRAFITIS, G. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. **Biophysical journal**, v. 107, n. 3, p. 642-653, 2014.

- LI, X. *et al.* Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. **Journal of biomechanics**, v. 50, p. 34-41, 2017.
- LYFGENIA, Package Insert. **Food and Drug Administration (FDA)**, Washington DC, dezembro de 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/174610/download>. Acesso em: 11 de dezembro de 2023
- LUBIN, B. *et al.* Abnormalities in membrane phospholipid organization in sickled erythrocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 67, n. 6, p. 1643-1649, 1981.
- 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, 2006.
- MAHER, A. D.; KUCHEL, P. W. The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 8, p. 1182-1197, 2003.
- MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert opinion on drug safety**, v. 14, n. 11, p. 1749-1758, 2015.
- METCALF, B. *et al.* Discovery of GBT440, an orally bioavailable R-state stabilizer of sickle cell hemoglobin. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 8, n. 3, p. 321-326, 2017.
- MOERDLER, S.; MANWANI, D. New insights into the pathophysiology and development of novel therapies for sickle cell disease. **Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book**, v. 2018, n. 1, p. 493-506, 2018.
- NADER, E.; ROMANA, M.; CONNES, P. The red blood cell—inflammation vicious circle in sickle cell disease. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 454, 2020.
- NARDO-MARINO, A. *et al.* The significance of spleen size in children with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 97, n. 12, p. 1520-1528, 2022.
- NASCIMENTO, A. F. *et al.* Haplotypes and polymorphism in the CCR5 gene in sickle cell disease. **Genet Mol Res**, v. 16, n. 2, 2017.
- NEVITT, S. J.; JONES, A. P.; HOWARD, J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2017.
- NIIHARA, Y. *et al.* A phase 3 trial of l-glutamine in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 3, p. 226-235, 2018.
- NIKOLAEVA, A. D. *et al.* Synthesis and study of detonation properties of 3-methyl-4-nitrofuroxan. **Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science**, v. 21, p. 927-928, 1972.

- NOUBOUOSSIE, D.; KEY, N. S.; ATAGA, K. I. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. **Blood reviews**, v. 30, n. 4, p. 245-256, 2016.
- OHLSTEIN, E. H. *et al.* Endothelin receptors: receptor classification, novel receptor antagonists, and potential therapeutic targets. **Medicinal research reviews**, v. 16, n. 4, p. 365-390, 1996.
- OKSENBERG, D. *et al.* GBT 440 increases haemoglobin oxygen affinity, reduces sickling and prolongs RBC half-life in a murine model of sickle cell disease. **British journal of haematology**, v. 175, n. 1, p. 141-153, 2016.
- OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Current opinion in hematology**, v. 13, n. 1, p. 40-44, 2006.
- PARK, S. *et al.* Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 6, p. 936-953, 2003.
- PAKBAZ, Z.; WUN, T. Role of the hemostatic system on sickle cell disease pathophysiology and potential therapeutics. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 28, n. 2, p. 355-374, 2014.
- PAVAN, A. R.; DOS SANTOS, J. L. Advances in sickle cell disease treatments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2008-2032, 2021.
- PAVAN, A. R.; LOPES, J. R.; DOS SANTOS, J. L. The state of the art of fetal hemoglobin-inducing agents. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, n. 11, p. 1279-1293, 2022.
- PAVAN, A. R. *et al.* Perspectives and challenges to discovering hemoglobin-inducing agents in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1002063, 2022.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. L., KRIS, G. S. **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**. 3rd edition. Boston: Thomson Learning, 2001.
- PEARSON, H. A. *et al.* Developmental pattern of splenic dysfunction in sickle cell disorders. **Pediatrics**, v. 76, n. 3, p. 392-397, 1985.
- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561-1573, 2017.
- PINTO, A. C. S. *et al.* Burden of Sickle Cell Disease: A Brazilian Societal Perspective Analysis. **Blood**, v. 136, p. 10-11, 2020.
- QUINN, C. T. l-Glutamine for sickle cell anemia: more questions than answers. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 132, n. 7, p. 689-693, 2018.
- RADOMSKI, M. W.; MONCADA, S. The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. **Mechanisms of Platelet Activation and Control**, p. 251-264, 1993.

- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sick cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.
- REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sick cell disease. **British journal of haematology**, v. 156, n. 4, p. 433-445, 2012.
- RIDDELL, D. R.; OWEN, J. S. Nitric oxide and platelet aggregation. **Vitamins & Hormones**, v. 57, p. 25-48, 1997.
- ROLAN, P. E. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tucaresol, an antisickling agent, in healthy volunteers. **British journal of clinical pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 375-380, 1995.
- SADAF, A.; QUINN, C. T. L-glutamine for sick cell disease: Knight or pawn?. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 2, p. 146-154, 2020.
- SAFO, M. K. *et al.* Structural basis for the potent antisickling effect of a novel class of five-membered heterocyclic aldehydic compounds. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 19, p. 4665-4676, 2004.6
- SAFO, M. K. *et al.* Hemoglobin–ligand binding: Understanding Hb function and allostery on atomic level. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 6, p. 797-809, 2011.
- SALINAS CISNEROS, G.; THEIN, S. L. Recent advances in the treatment of sick cell disease. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 435, 2020.
- SAKURAI, T. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, v. 348, n. 6303, p. 732-735, 1990.
- SCHMIDT, H. M. *et al.* Release of hepatic xanthine oxidase (XO) to the circulation is protective in intravascular hemolytic crisis. **Redox Biology**, v. 62, p. 102636, 2023.
- SCHNEIDER, M. P.; BOESEN, E. I.; POLLOCK, D. M. Contrasting actions of endothelin ETA and ETB receptors in cardiovascular disease. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 731-759, 2007.
- SESTI-COSTA, R.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. Role of Macrophages in Sick Cell Disease Erythrophagocytosis and Erythropoiesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6333, 2023.
- SHAH, N. *et al.* Real-world effectiveness of voxelotor for treating sick cell disease in the US: a large claims data analysis. **Expert review of hematology**, v. 15, n. 2, p. 167-173, 2022.

- SETTY, B. N.; STUART, M. J. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. 1996.
- SIDDON, A. J.; TORMEY, C. A. The chemical and laboratory investigation of hemolysis. **Advances in clinical chemistry**, v. 89, p. 215-258, 2019.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6ª. ed. LTC Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 2000.
- STEINBERG, M. H. *et al.* The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5-year follow-up. **American journal of hematology**, v. 85, n. 6, p. 403-408, 2010.
- SUN, K. *et al.* Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 12086, 2016.
- THOMSON, A. M. *et al.* Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet Haematology**, 2023.
- USMANI, A.; MACHADO, R. F. Vascular complications of sickle cell disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 205-221, 2018.
- VICHINSKY, E. *et al.* A phase 3 randomized trial of voxelotor in sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 6, p. 509-519, 2019.
- WALSH, S. B.; STEWART, G. W. Anion exchanger 1: Protean function and associations. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 12, p. 1919-1922, 2010.
- WARD, K. B. *et al.* Structure of deoxyhemoglobin A crystals grown from polyethylene glycol solutions. **Journal of molecular biology**, v. 98, n. 1, p. 161-177, 1975.
- WATTS, S. W. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know?. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 2, p. R254-R260, 2010.
- WONG, C. UK first to approve CRISPR treatment for diseases: what you need to know. **Nature**, v. 623, n. 7988, p. 676-677, 2023.
- WOOD, B. L.; GIBSON, Donald F.; TAIT, Jonathan F. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. 1996.
- WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 34, n. 9, p. 926-932, 2007.

WOOD, K. C.; HSU, L. L.; GLADWIN, M. T. Sick cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. **Free radical biology and medicine**, v. 44, n. 8, p. 1506-1528, 2008.

WUN, T.; BRUNSON, A. Sick cell disease: an inherited thrombophilia. **Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book**, v. 2016, n. 1, p. 640-647, 2016.

XIA, Y. *et al.* Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 13, p. 6770-6774, 1996.

ZACHOWSKI, A. *et al.* Abnormality of phospholipid transverse diffusion in sickle erythrocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 75, n. 5, p. 1713-1717, 1985.

ZIMMERMAN, S. A. *et al.* Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2039-2045, 2004.

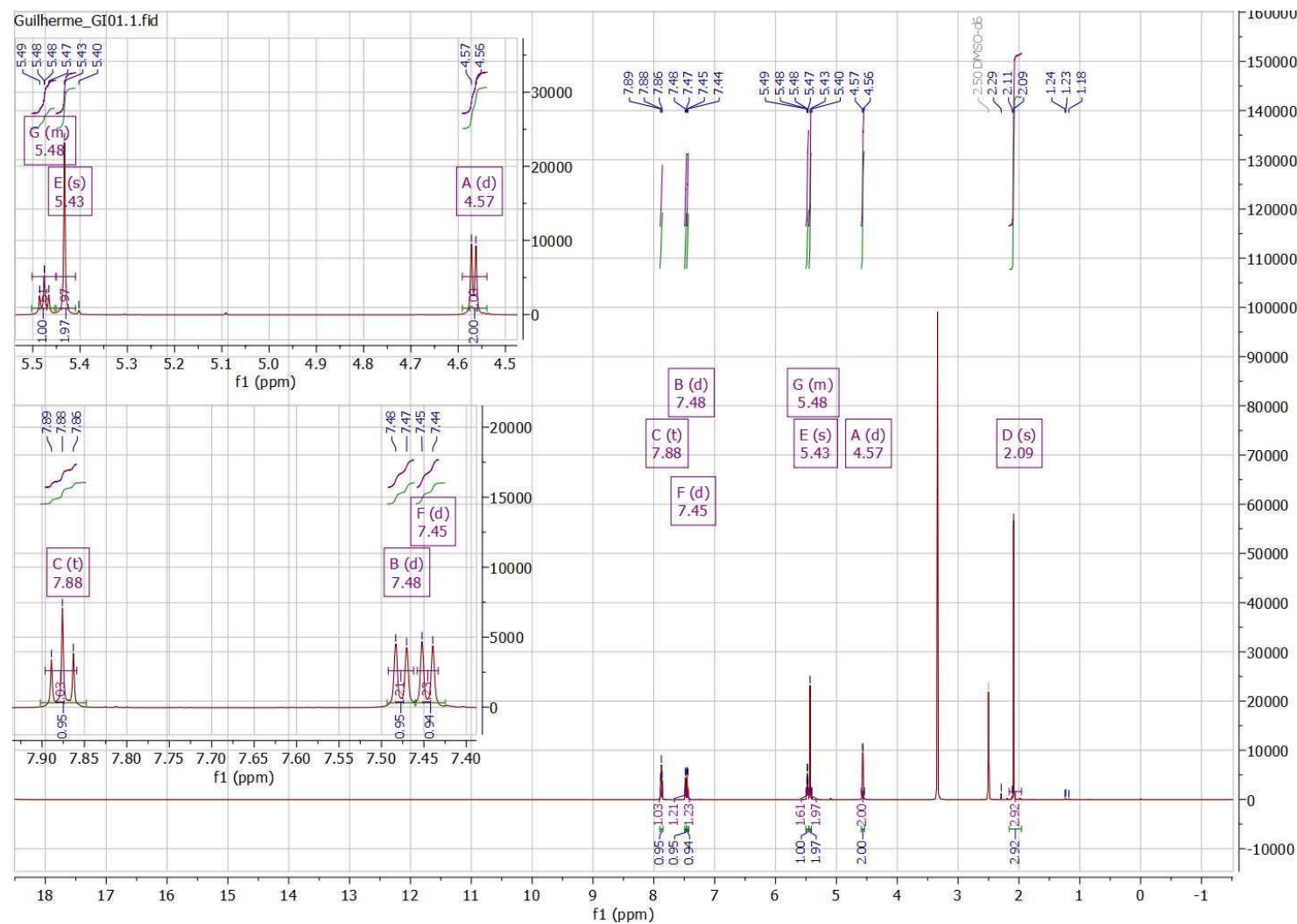
ZIMMERMAN, S. A. *et al.* Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 110, n. 3, p. 1043-1047, 2007.

ZHOU, Z.; LYEE, D.; GUCHHAIT, P. Molecular link between intravascular hemolysis and vascular occlusion in sickle cell disease. **Current vascular pharmacology**, v. 10, n. 6, p. 756-761, 2012.

YANAGISAWA, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411-415, 1988.

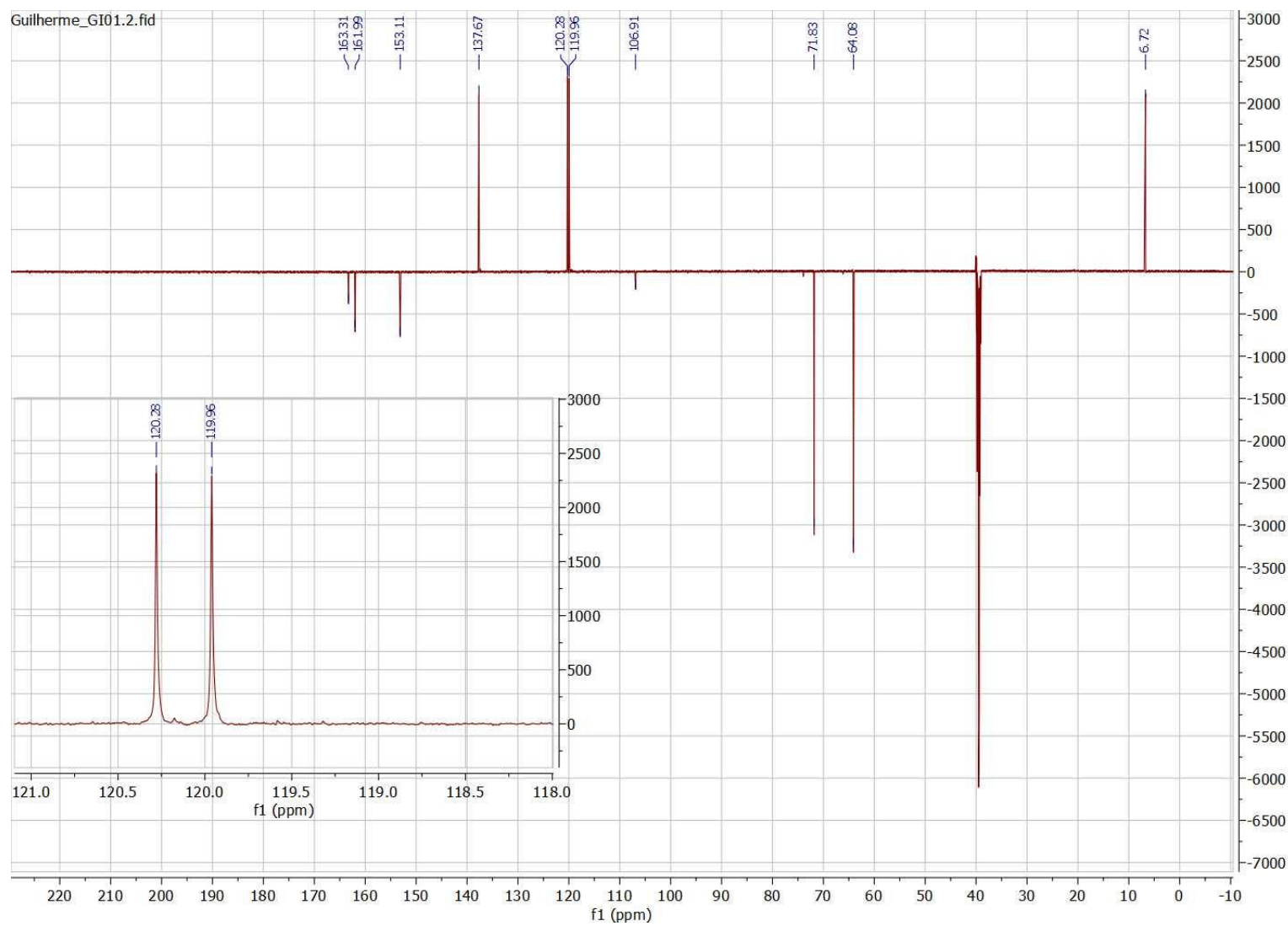
APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN

Espectro 1 - Espectro de RMN de ^1H (600MHz) da molécula 10.1.



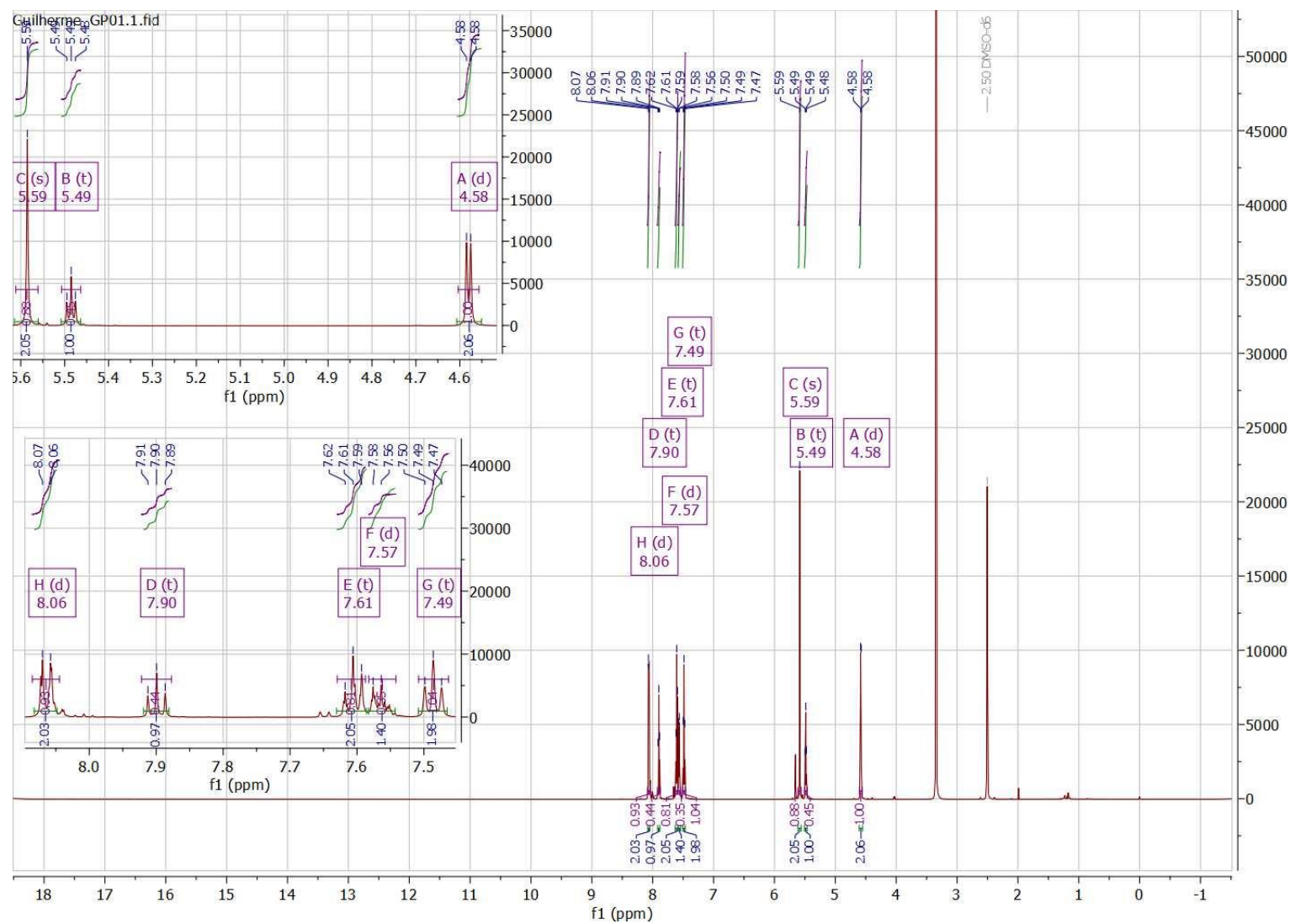
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 2 - Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ135, 150MHz) da molécula 10.1.



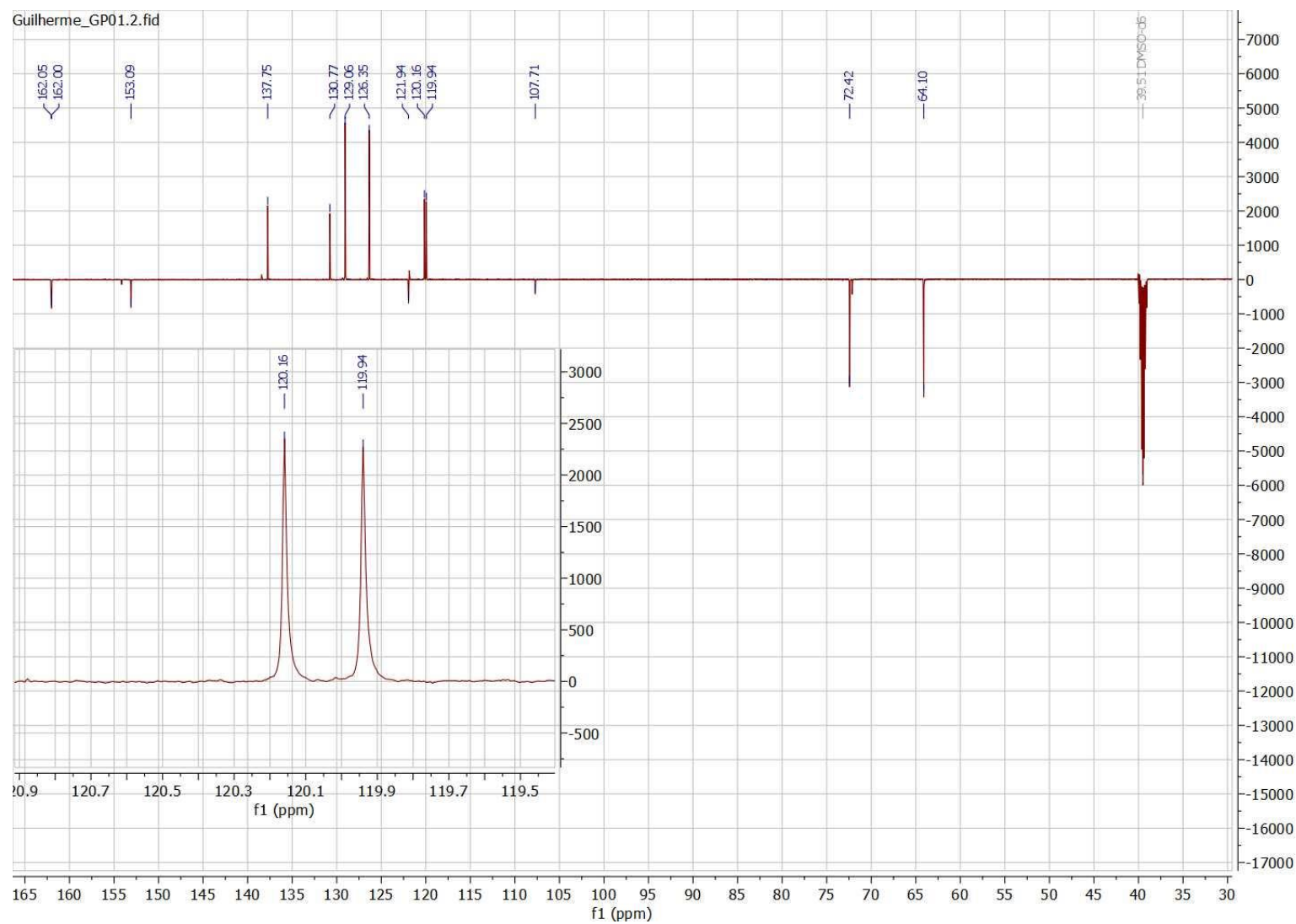
Fonte: dados da pesquisa

Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H (600MHz) da molécula 10.2.



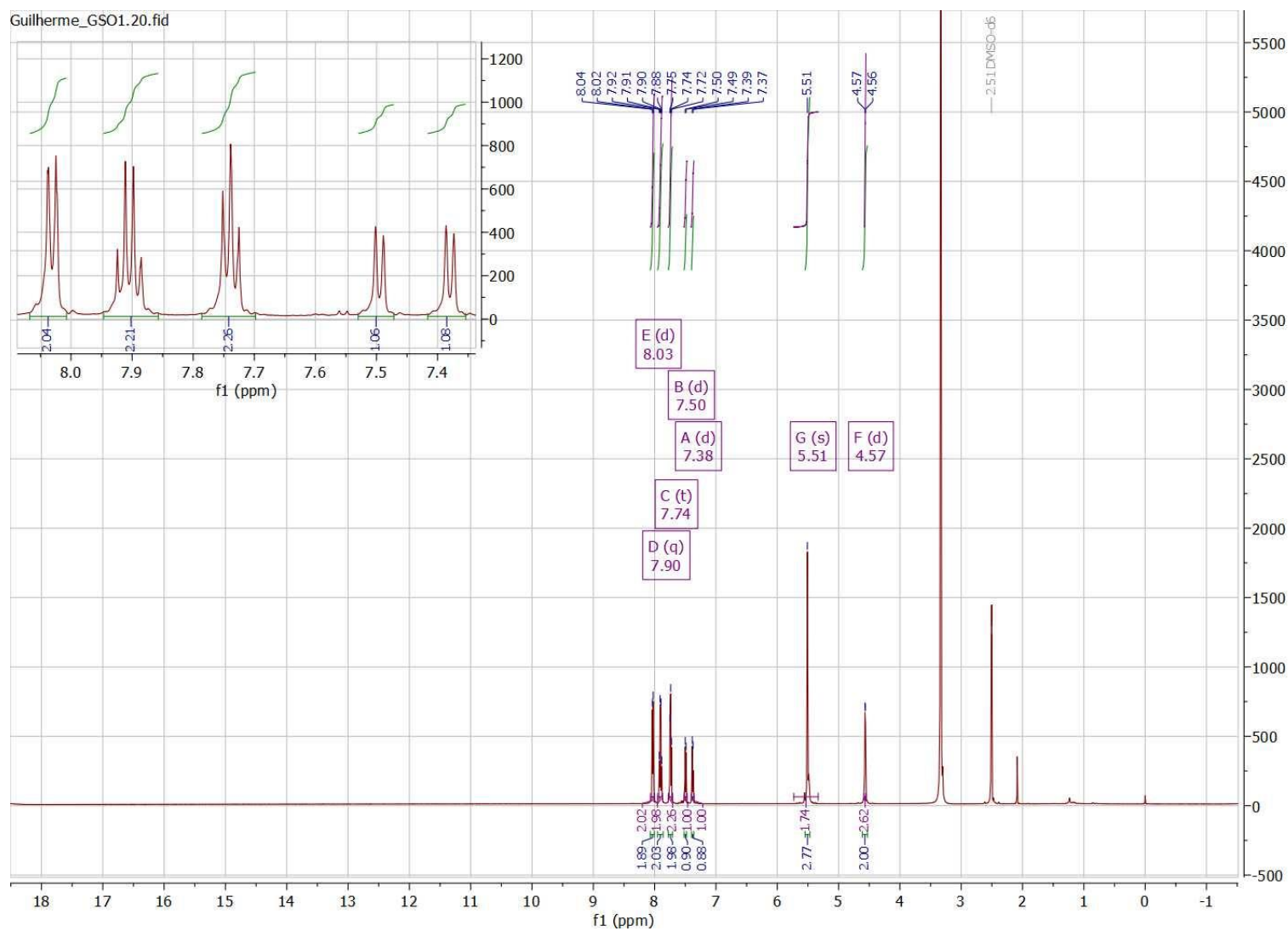
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 4 - Espectro de RMN de ^{13}C (DEPTQ, 150Mhz) da molécula 10.2.



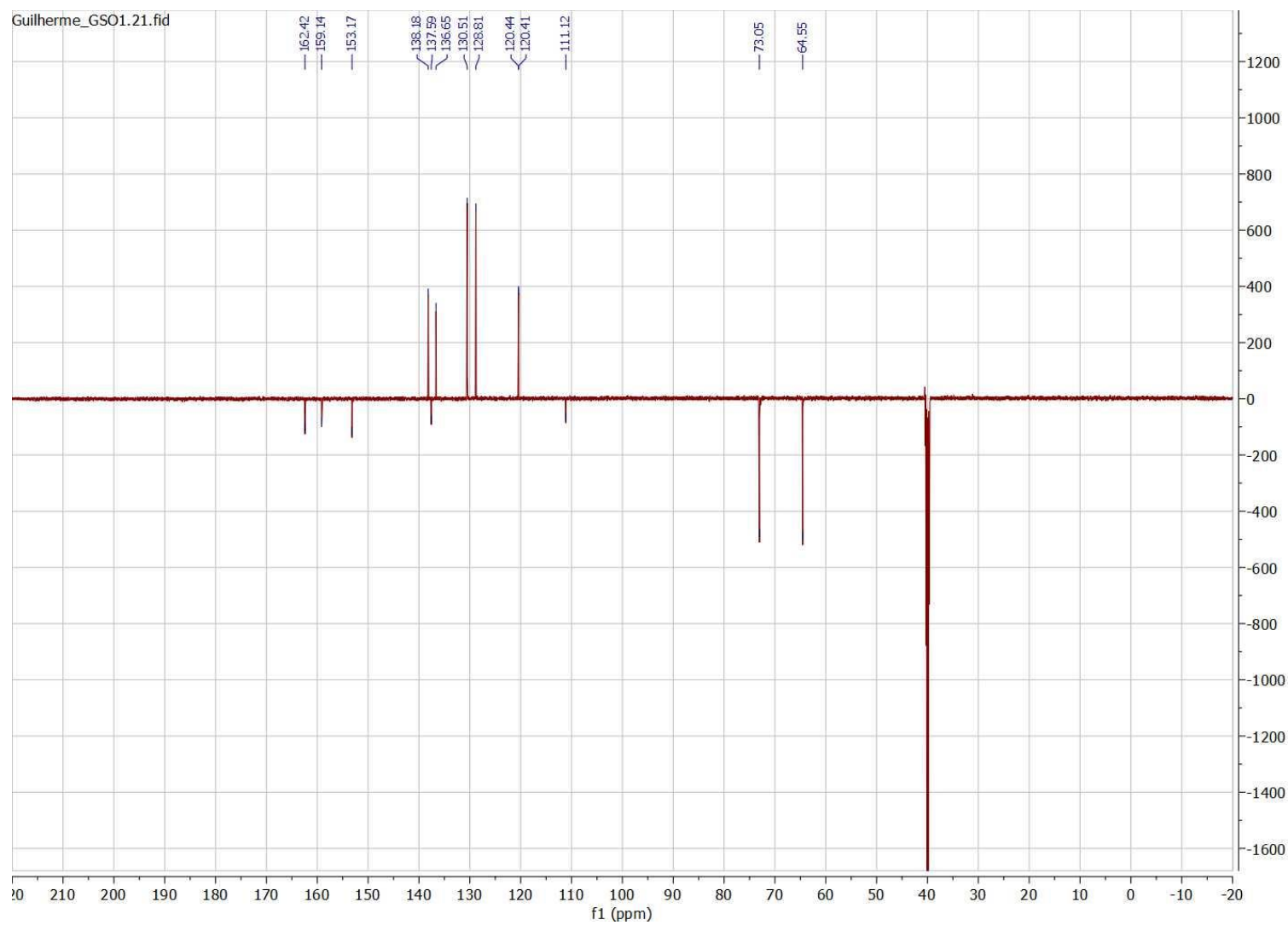
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 5 - Espectro de RMN de ^1H (600MHz) da molécula 10.3.



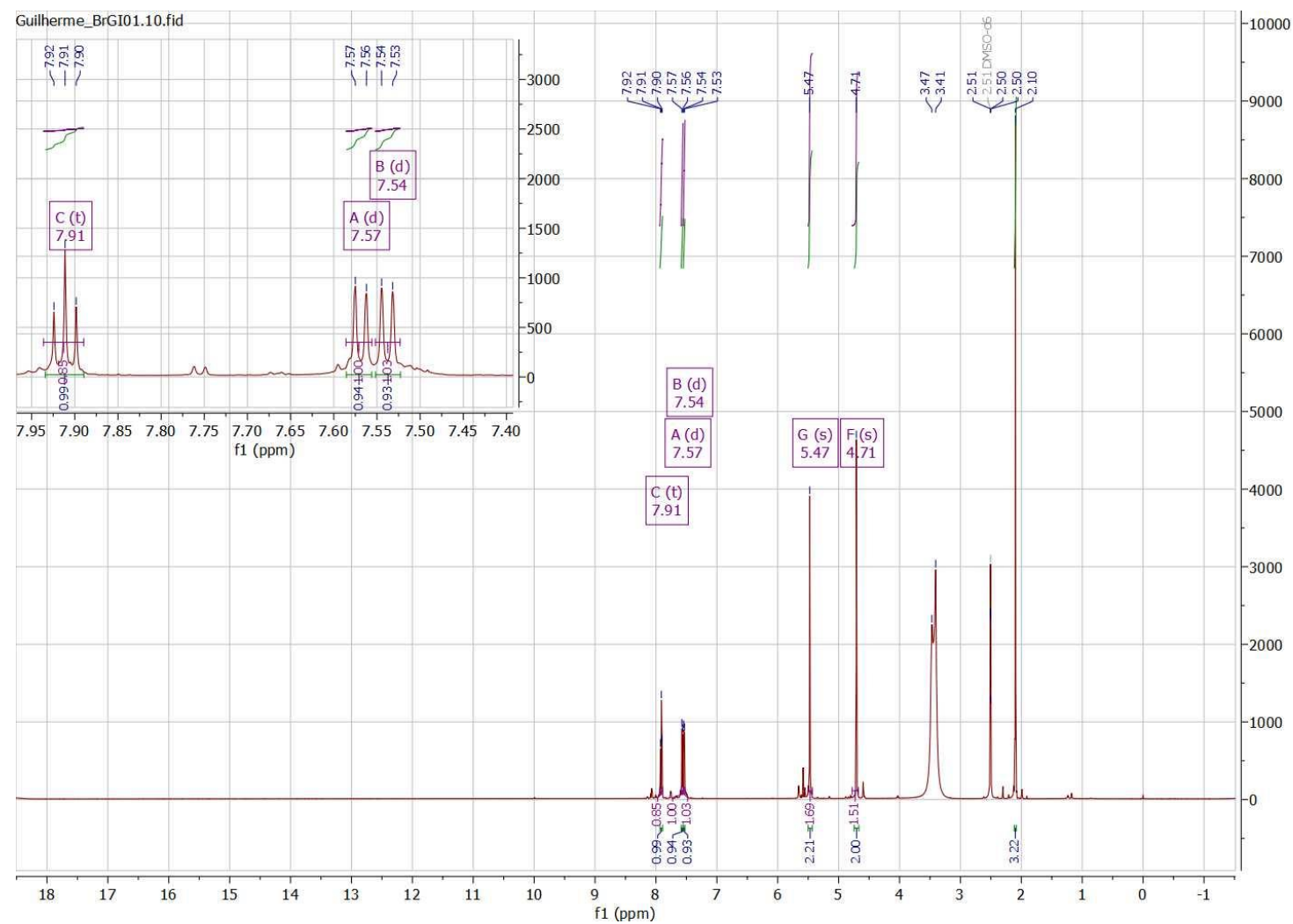
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 6 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ, 150MHz) da molécula 10.3.

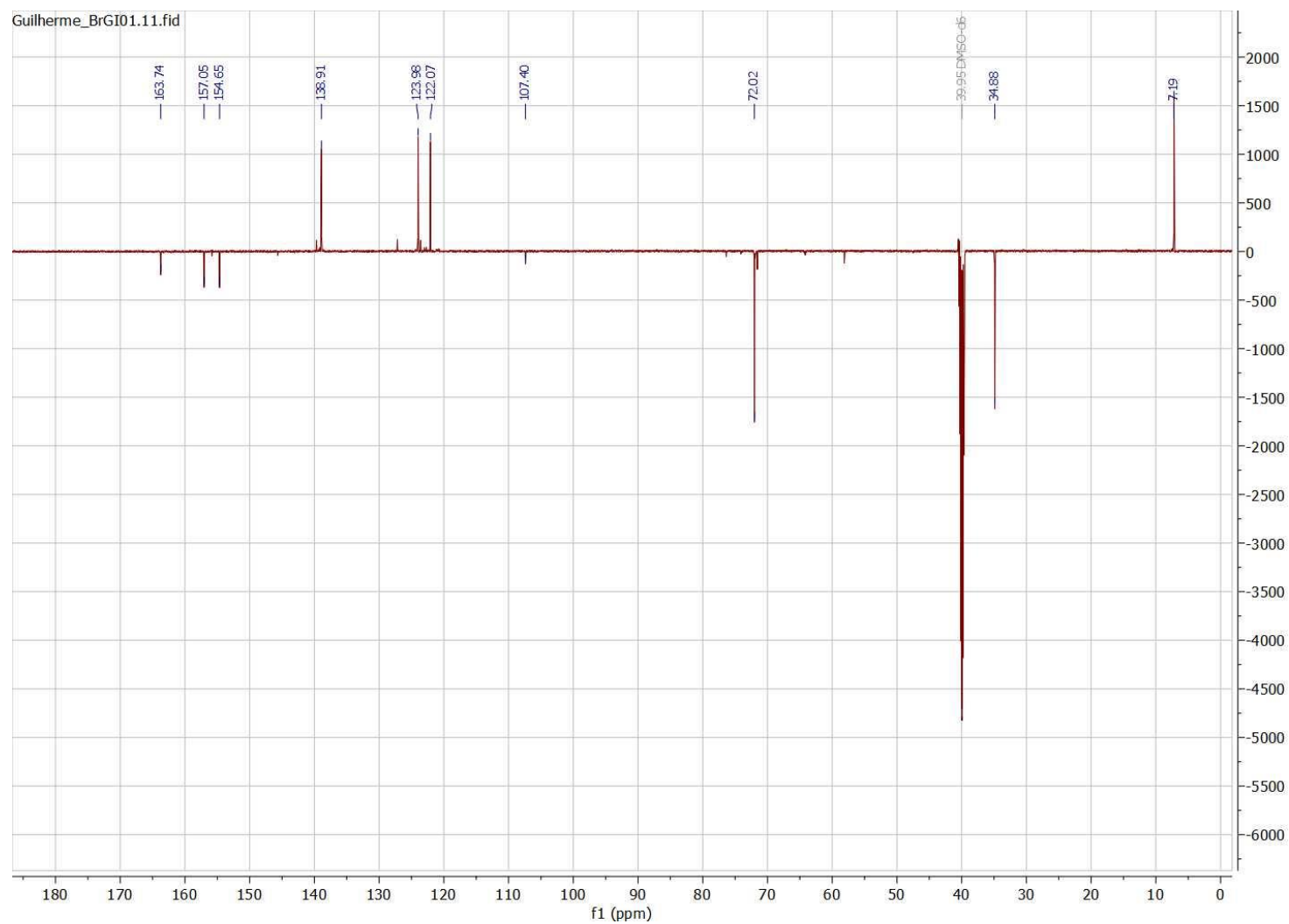


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 7 - Espectro de RMN ^1H (600MHz) da molécula 11.1.

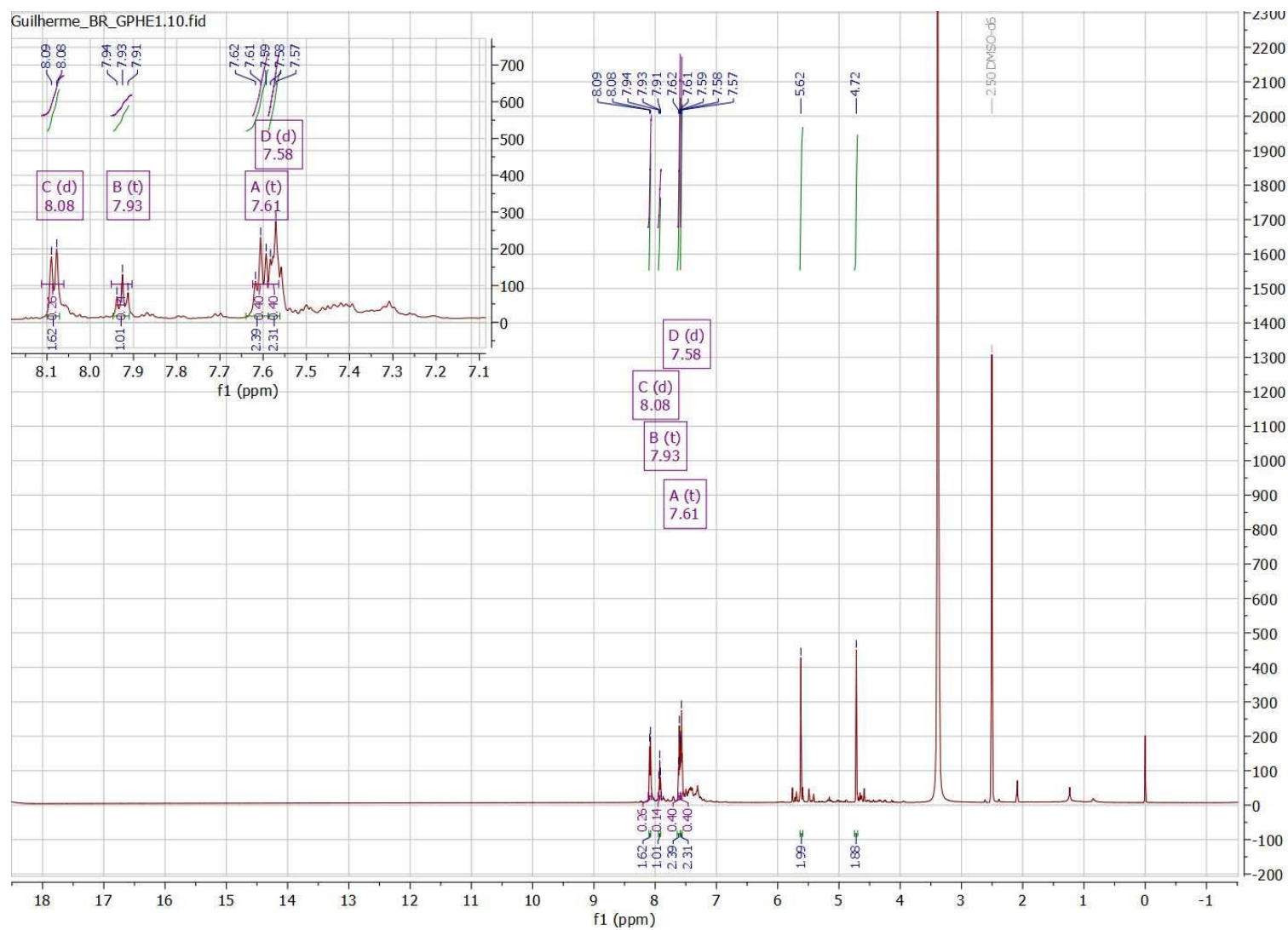


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 8 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ, 150MHz) da molécula 11.1.

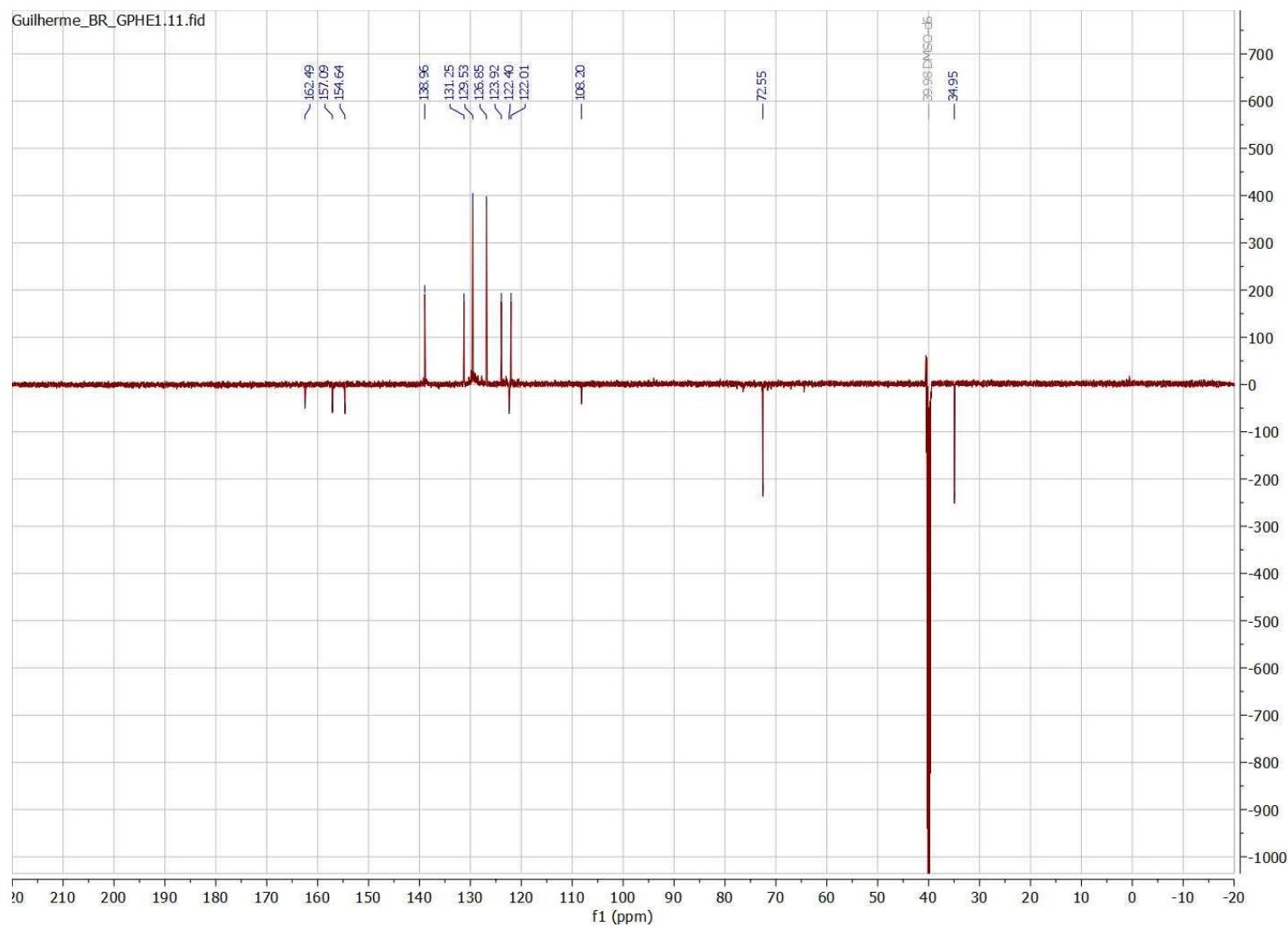
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 9 - espectro de RMN ^1H (600MHz) da molécula 11.2.



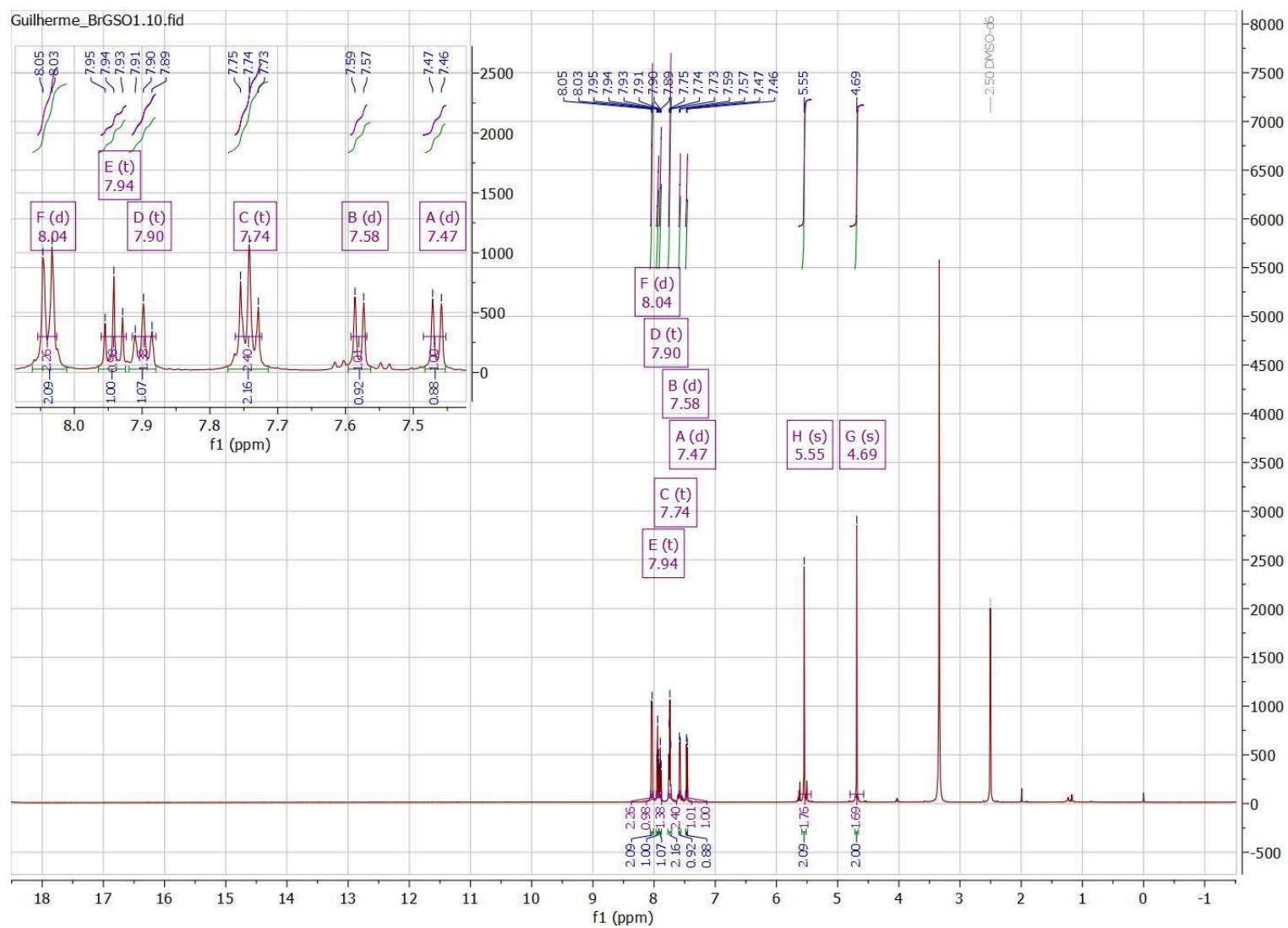
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 10 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ, 150MHz) da molécula 11.2.

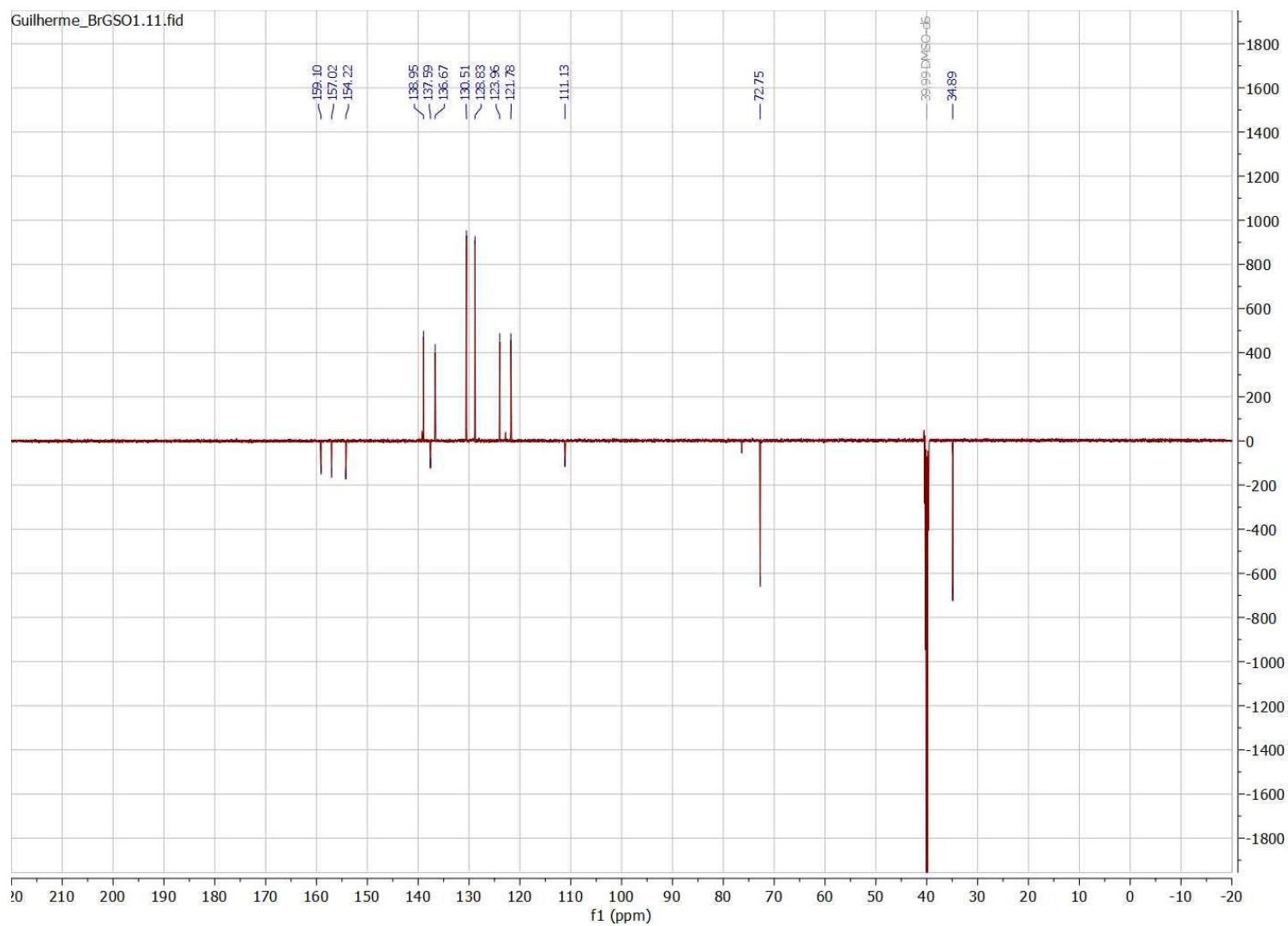


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 11 - Espectro de RMN ^1H (600MHz) da molécula 11.3.

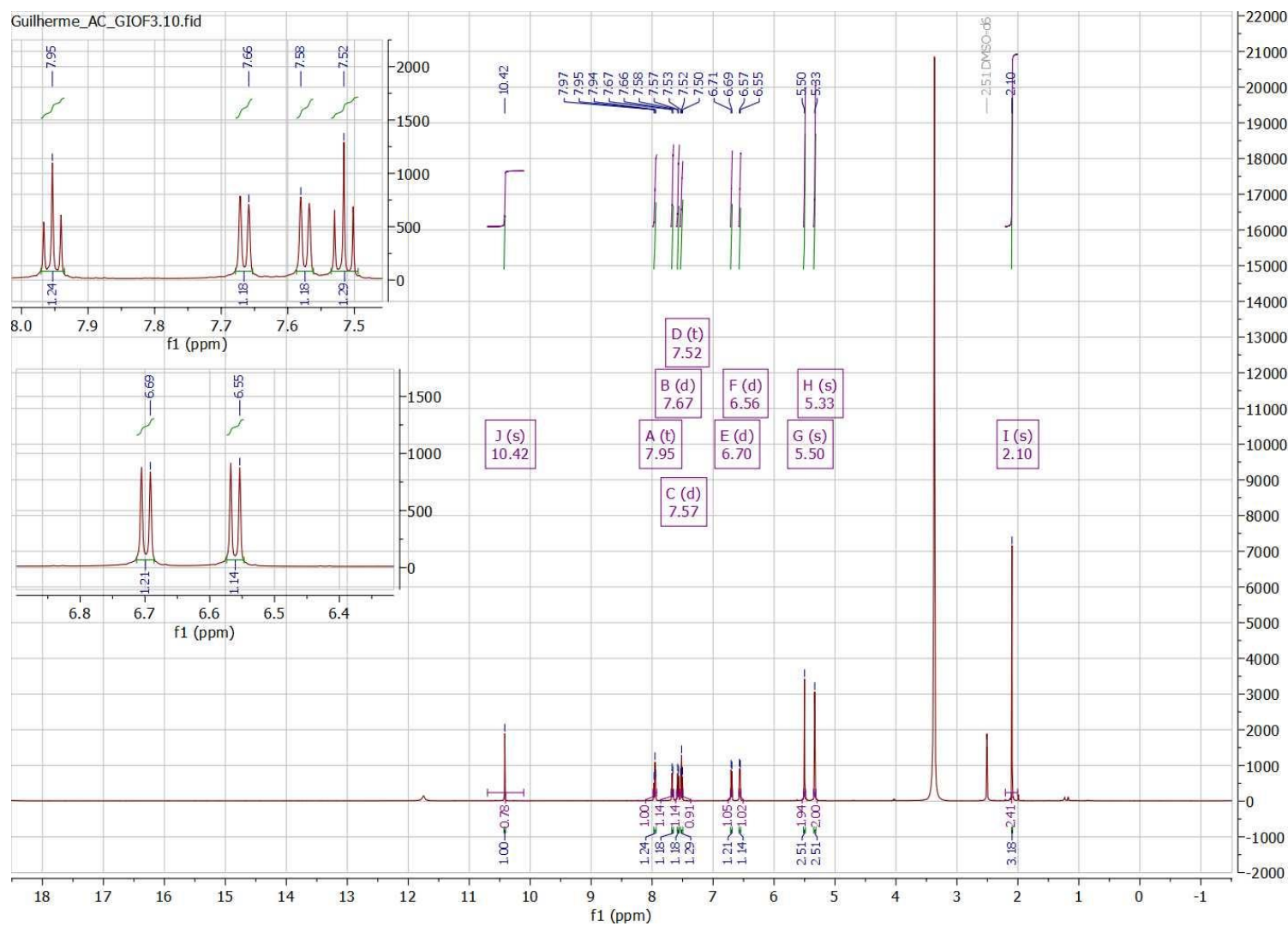


Fonte: dados da pesquisa.

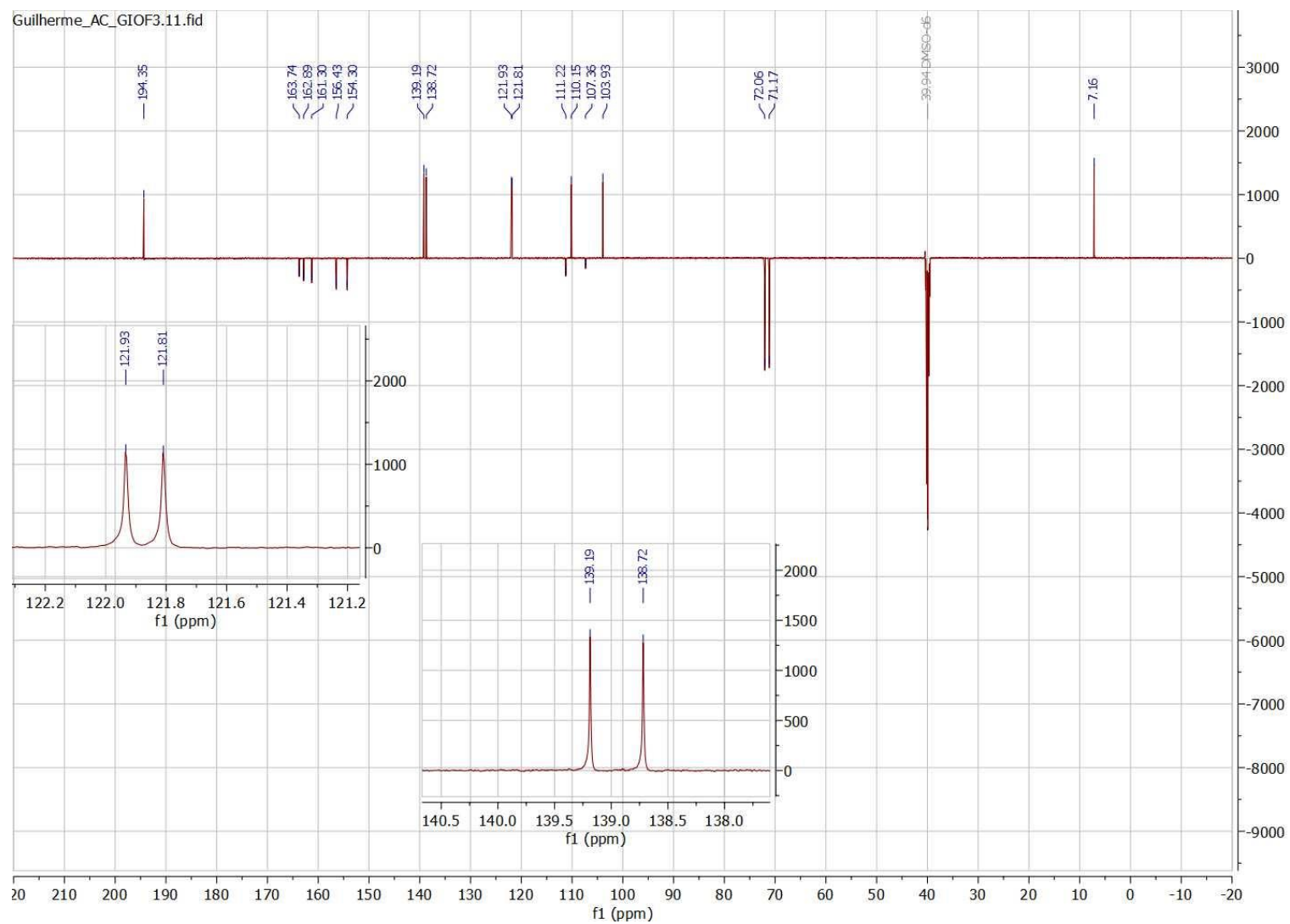
Espectro 12 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ, 150MHz) da molécula 11.3.

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 13 - Espectro de RMN ^1H (600MHz) da molécula GI0F.

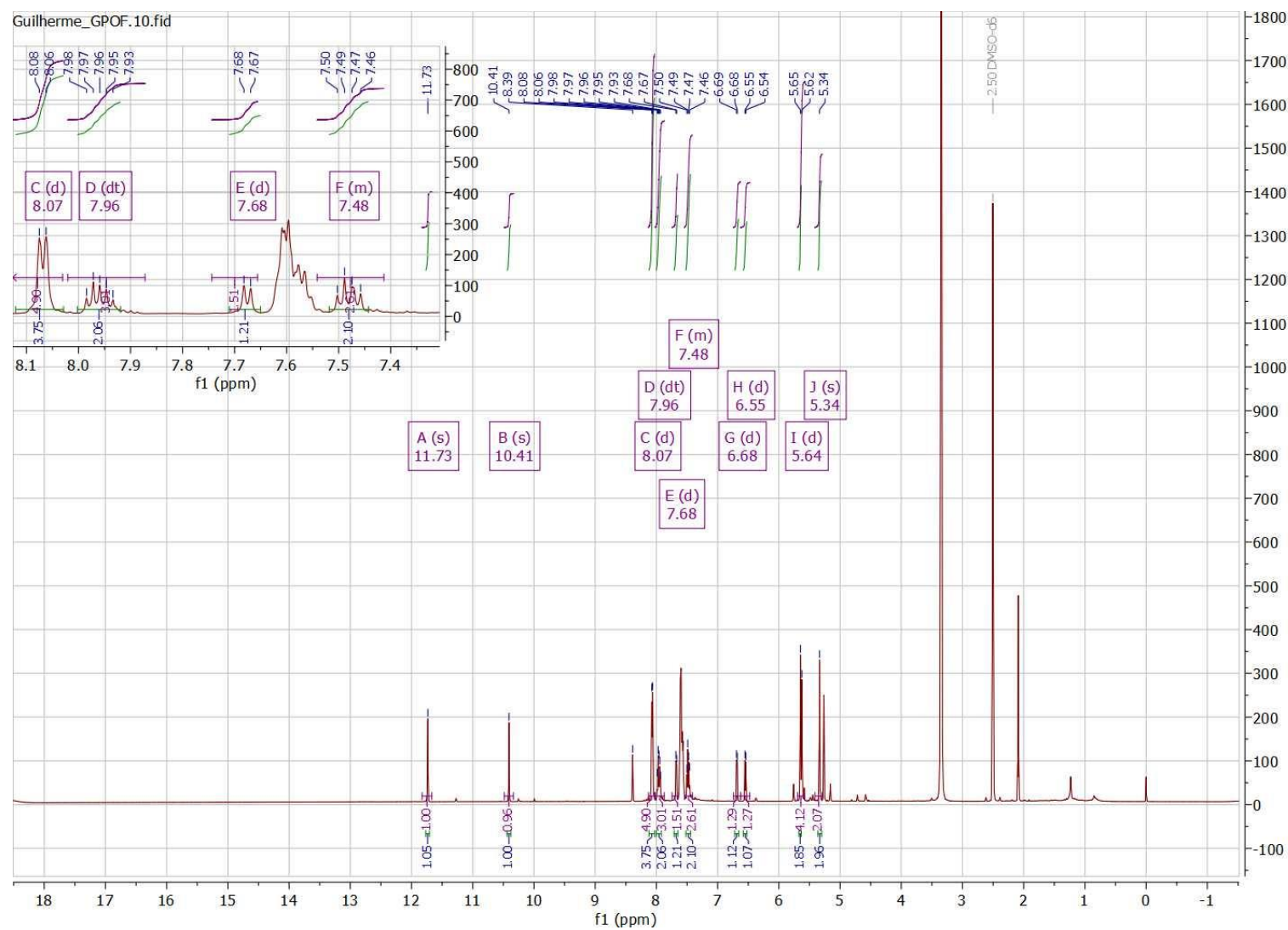


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 14 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ, 150MHz) da molécula GI0F.

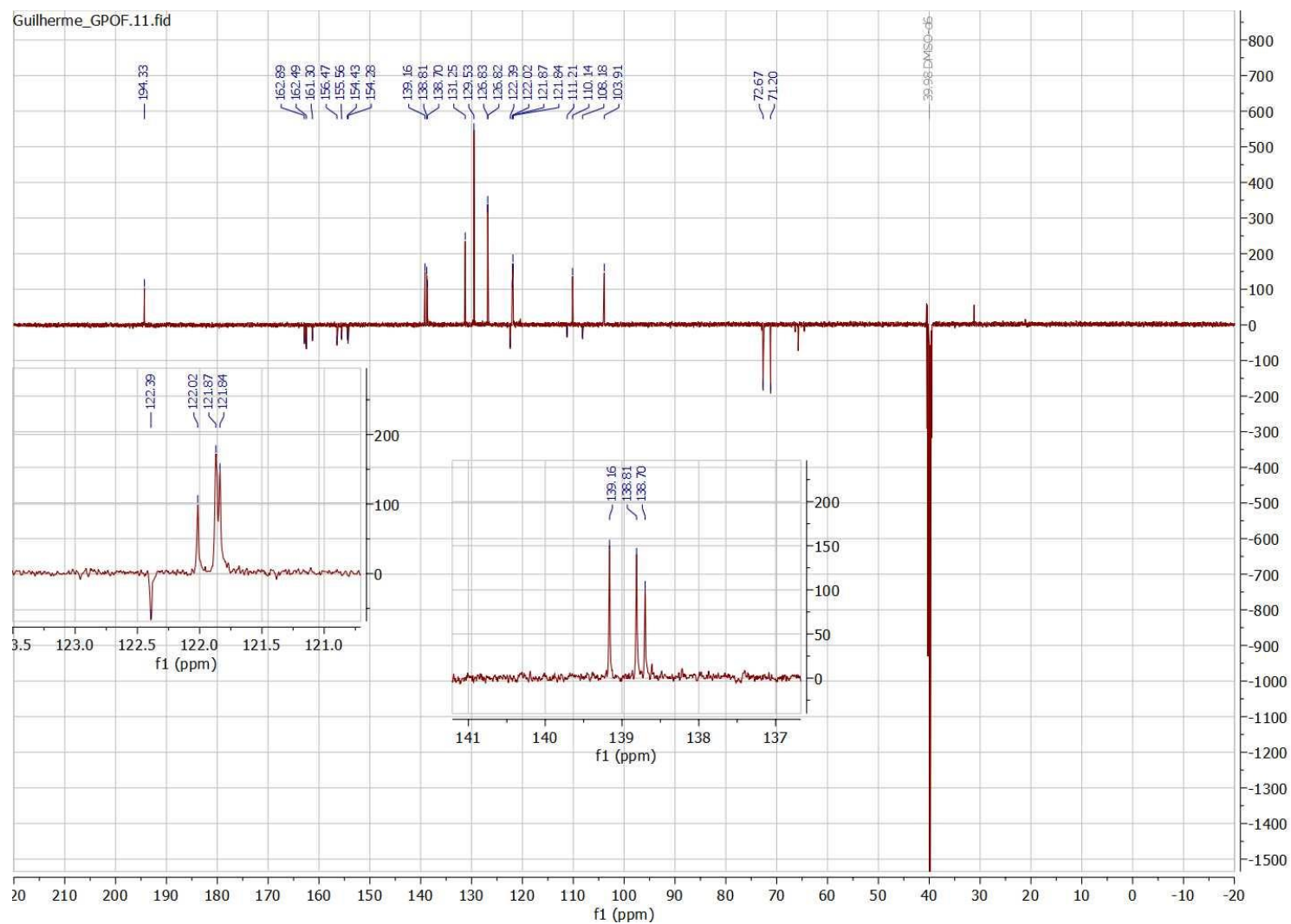
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 15 - Espectro de RMN ^1H (600MHz) da molécula GP0F.



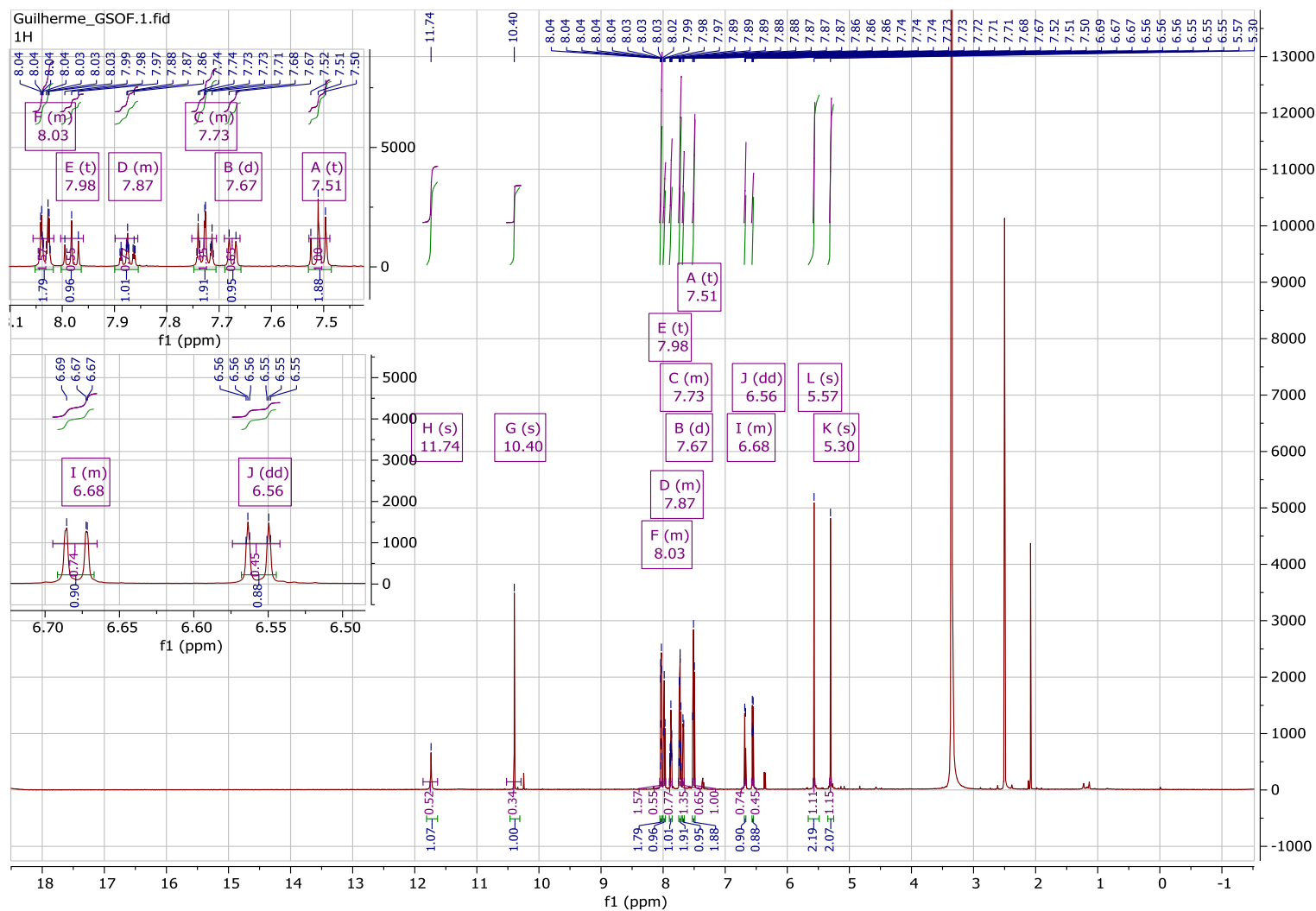
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 16 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ, 150MHz) da molécula GP0F.

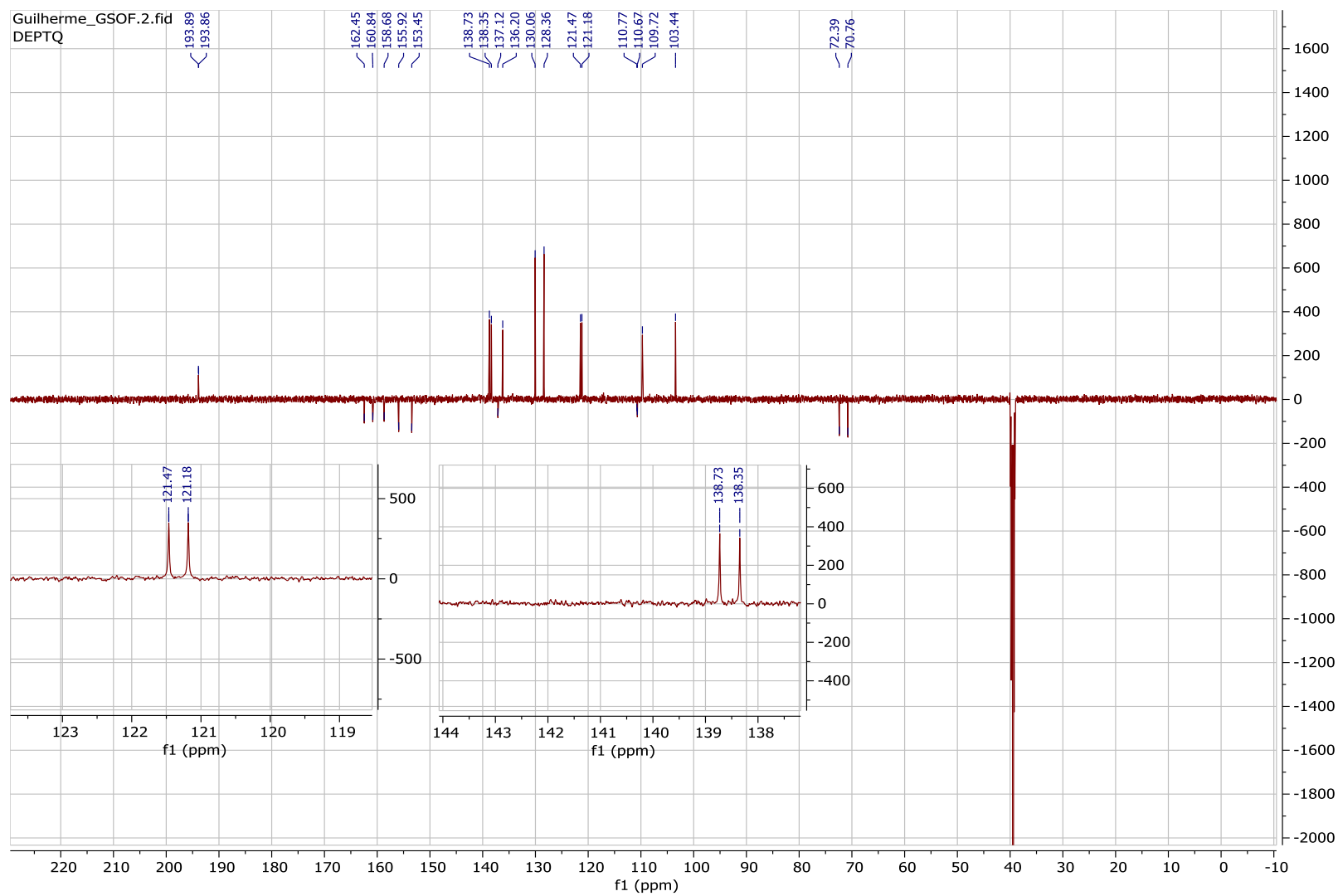


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 17 - Espectro de RMN ^1H (600MHz) da molécula GS0F.

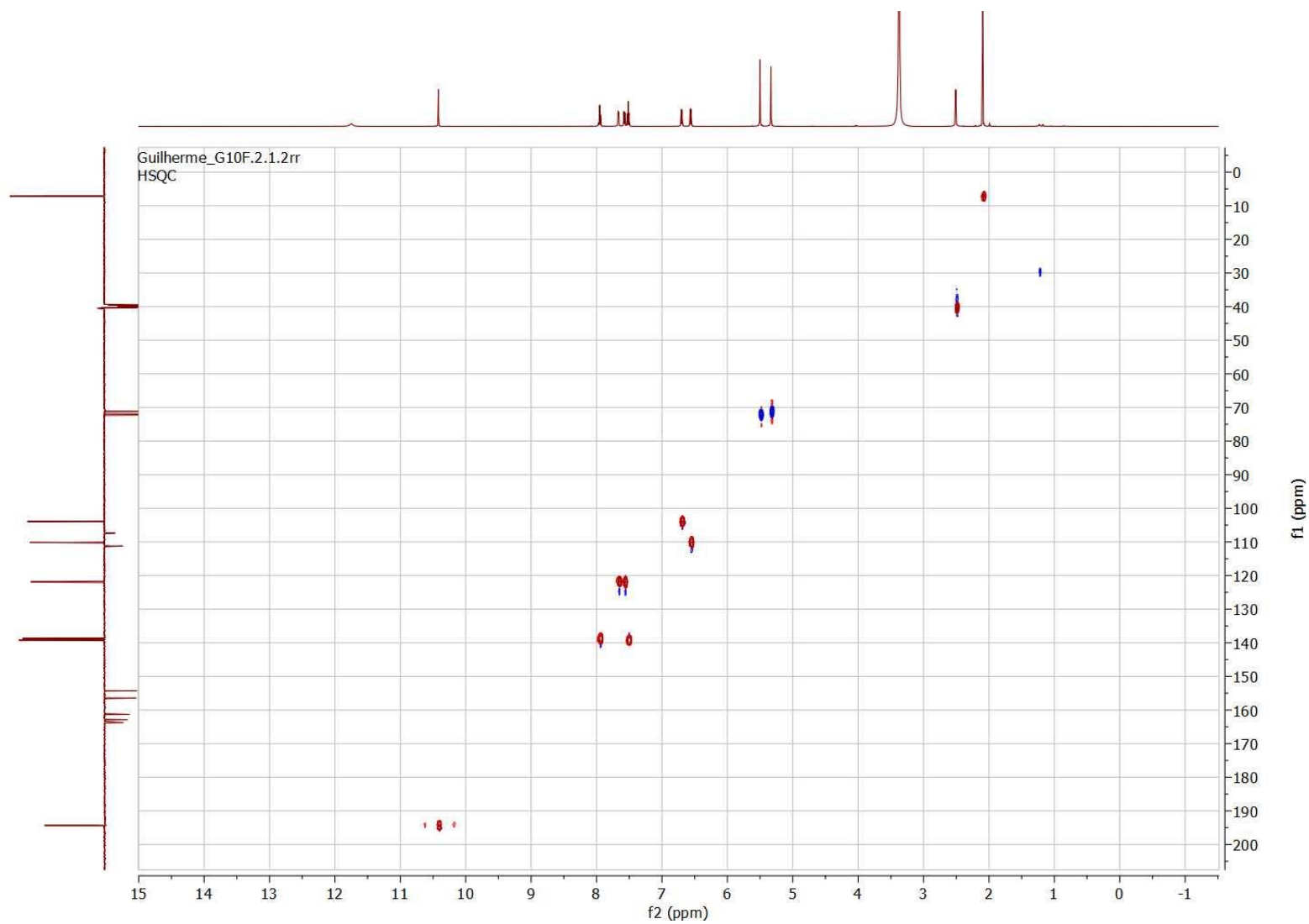


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 18 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ, 150MHz) da molécula GS0F.

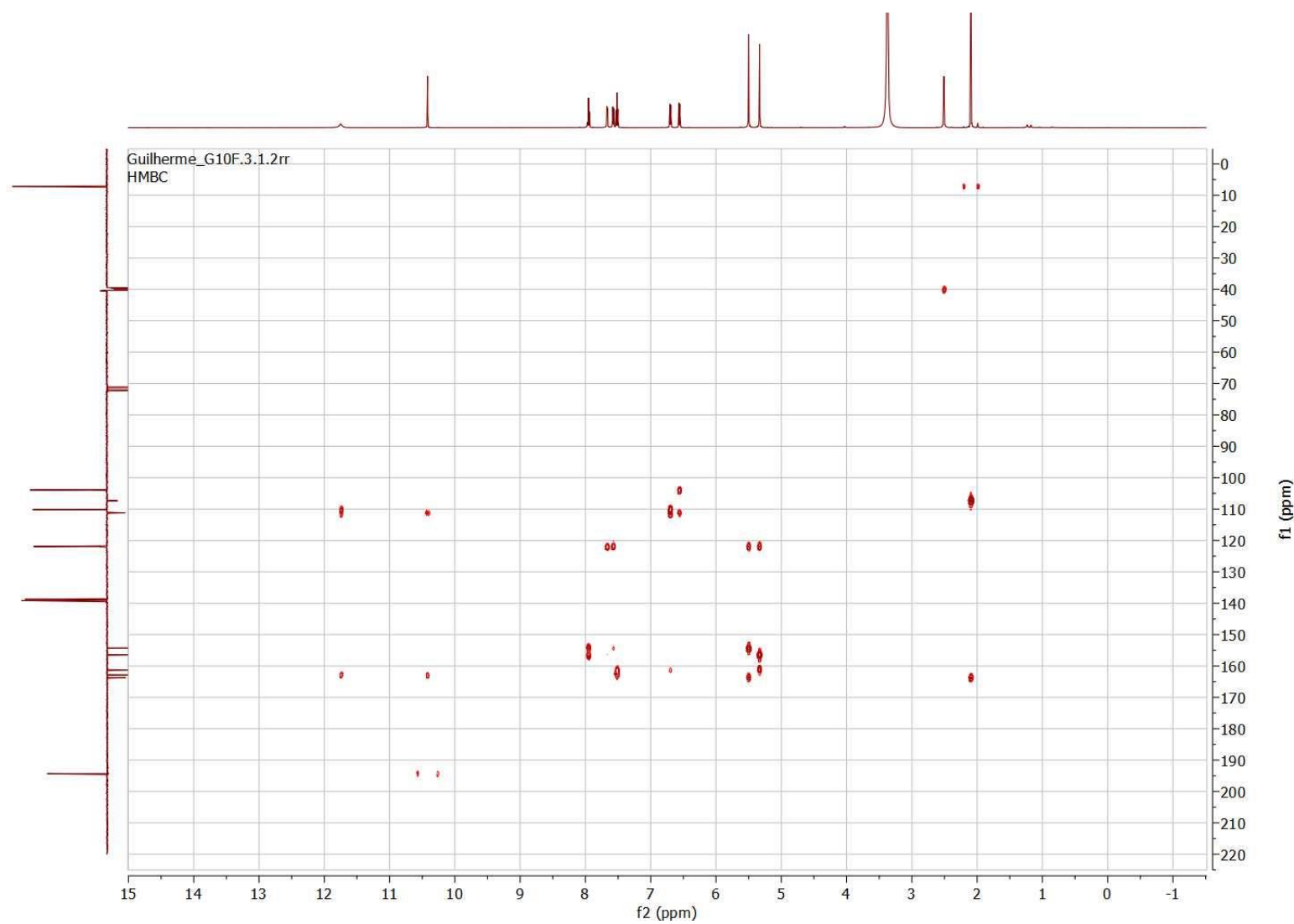
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 19 - Experimento HSQC (Bruker® 600) da molécula GI0F.



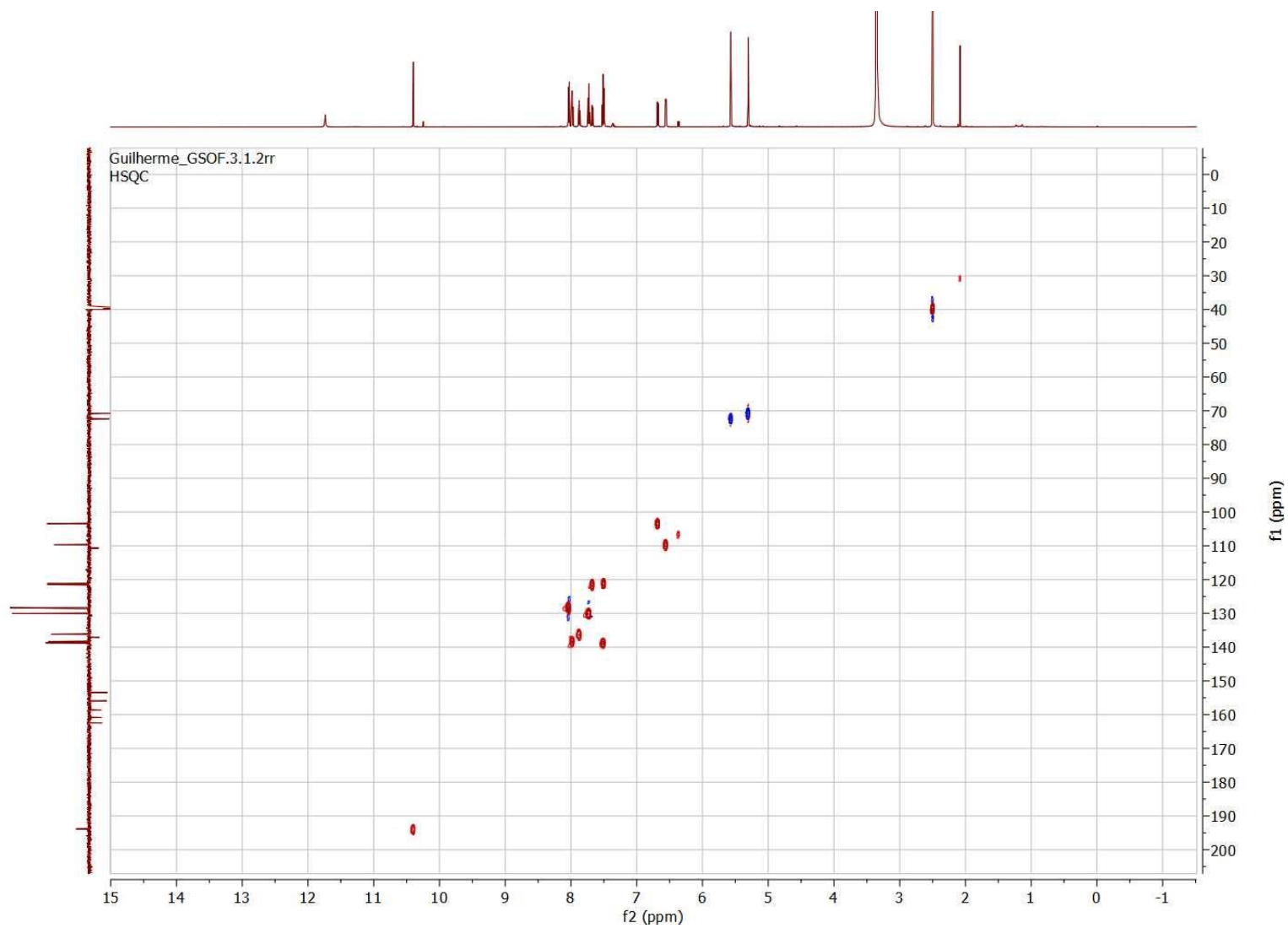
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 20 - Experimento HMBC (Bruker[®] 600) da molécula GI0F.



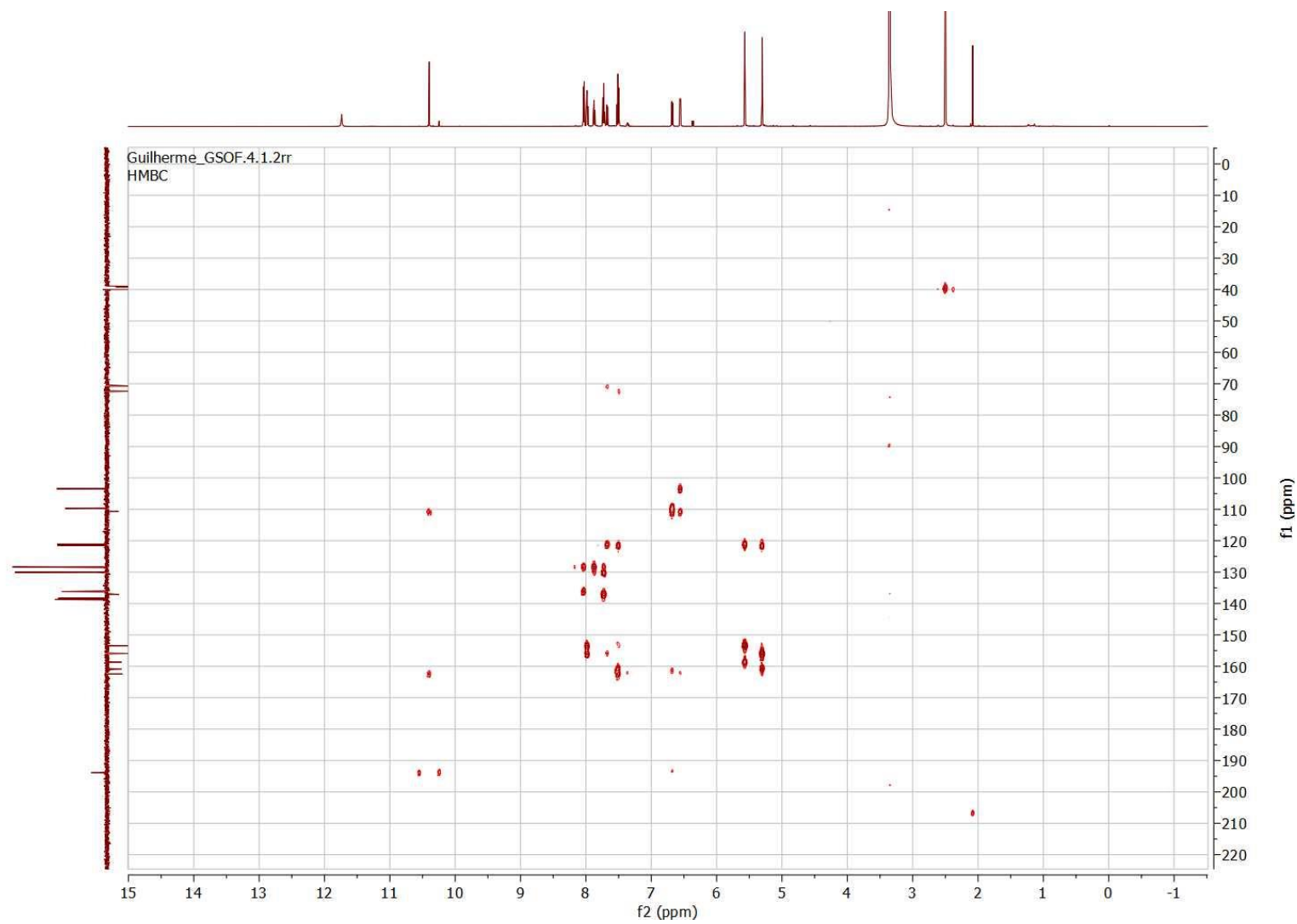
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 21 - experimento HSQC (Bruker® 600) da molécula GS0F.



Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 22 - Experimento HMBC (Bruker® 600) da molécula GS0F.



Fonte: dados da pesquisa.