

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

RAQUEL DOS SANTOS RAUBER

SÍNTESE DE DERIVADOS DO VOXELOTOR COMO AGENTES LIGANTES
COVALENTES IRREVERSÍVEIS DE HEMOGLOBINA

Araraquara, São Paulo

2022

RAQUEL DOS SANTOS RAUBER

**SÍNTESE DE DERIVADOS DO VOXELOTOR COMO AGENTES LIGANTES
COVALENTES IRREVERSÍVEIS DE HEMOGLOBINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, para obtenção do grau de
Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Coorientadora: Ma. Aline Renata Pavan

Araraquara, São Paulo

2022

R237s Rauber, Raquel dos Santos.
Síntese de derivados do Voxelotor como agentes ligantes covalentes irreversíveis de hemoglobina / Raquel dos Santos Rauber. – Araraquara: [S.n.], 2022.
44 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Cursos (Graduação – Farmácia) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.
Coorientadora: Aline Renata Pavan.

1. Voxelotor. 2. VZHE-039. 3. Óxido nítrico. 4. Novos fármacos. 5. Anemia falciforme. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Pavan, Aline Renata, coorient. III. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Auri e Neuza, que foram essenciais por darem todo o suporte e incentivo que eu precisei durante esses anos.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e a graça de poder batalhar para alcançar meus sonhos.

Aos meus pais, que desde sempre apoiaram meus sonhos e não mediram esforços em me ajudar a realizá-los.

À minha irmã, Raissa, que é para mim uma grande amiga, muitas vezes me consolou em momentos difíceis e com certeza melhorou muitos dos meus dias com sua alegria.

Ao meu namorado, João Pedro, que há muitos anos vem sendo meu melhor amigo e um grande incentivador.

Aos meus amigos, Helena, Isabela, Kethllen, Luis, Rafaela, Sarah, Sophia e Thainara, foram meus verdadeiros aliados durante a graduação.

Aos amigos do grupo Lapdesf, que sempre foram muitos solícitos e me ajudaram no laboratório durante o desenvolvimento do projeto.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. Jean Leandro dos Santos, que sempre teve muita dedicação e atenção ao me ensinar tudo aquilo que precisava para o desenvolvimento do projeto.

À minha coorientadora, Ma. Aline Renata Pavan, sempre muito disposta a me ajudar e ensinar, mesmo que em outro continente se fez presente sem medir esforços.

Resumo

A anemia falciforme (AF) é uma doença hematológica de origem genética caracterizada por uma mutação pontual, em que o códon que codifica o ácido glutâmico na hemoglobina adulta normal (HbA) passa a codificar a valina, resultando na hemoglobina falciforme (HbS). Tal troca provoca alterações na estrutura da hemoglobina aumentando a capacidade de polimerização frente aos estágios de desoxigenação. Dentre os tratamentos disponíveis, o mais utilizado é a hidroxiureia (HU), entretanto esta possui alguns efeitos adversos graves e estima-se que em cerca de 1/3 dos pacientes não respondem adequadamente a HU. Uma opção recente aprovada pela agência norte-americana FDA é o voxelotor, capaz de se ligar covalentemente à cadeia alfa da HbS e modular sua afinidade ao oxigênio (O₂). O análogo do voxelotor, composto VZHE-039, demonstrou ser capaz de inibir a polimerização tanto em situações de hipoxia como anoxia mostrando vantagens comparados ao voxelotor. Dessa forma, esse análogo se constitui como um importante protótipo para modificações moleculares. Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância do óxido nítrico (NO) no tratamento da anemia falciforme, apresentando efeitos diretos como dilatadores nos vasos, além de induzir a produção de hemoglobina fetal via ativação da via NO/guanilato ciclase/GMPc. Frente aos efeitos benéficos dos furoxanos como doadores de óxido nítrico, neste trabalho realizamos o planejamento e a síntese de um novo derivado do VZHE-039 conjugado a um doador de óxido nítrico.

Palavras-chaves: Voxelotor, VZHE-039, Óxido nítrico, Novos fármacos, Anemia falciforme.

Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is a hematological disease of genetic origin characterized by a punctual mutation, in which the codon that encodes glutamic acid in normal adult hemoglobin (HbA) starts to encode valine, resulting in sickle cell hemoglobin (HbS). Such an exchange causes changes in the hemoglobin structure, increasing the polymerization capacity in the face of deoxygenation stages. Among the available treatments, the most used is hydroxyurea (HU), however it has some serious adverse effects and it is estimated that in about 1/3 of patients do not respond adequately to HU. A recent option approved by the US FDA is voxelotor, capable of covalently binding to the alpha chain of HbS and modulating its affinity for oxygen. The voxelotor analogue, compound VZHE-039, was shown to be able to inhibit polymerization in both hypoxia and anoxia, showing advantages compared to voxelotor. Thus, this analogue constitutes an important prototype for molecular modifications. In recent years, our research group has demonstrated the importance of nitric oxide (NO) in the treatment of sickle cell anemia, presenting direct effects as dilators in the vessels, in addition to inducing the production of fetal hemoglobin via activation of the NO/guanylate cyclase/cGMP pathway. In view of the beneficial effects of furoxanes as nitric oxide donors, in this work we carried out the planning and synthesis of a new derivative of VZHE-039 conjugated to a nitric oxide donor.

Keywords: Voxelotor, VZHE-039, Nitric oxide, New drugs, Sickle cell anemia.

Lista de Abreviaturas

AF: Anemia Falciforme

HbS: Hemoglobina S (falciforme)

HbA: Hemoglobina A (normal)

HbF: Hemoglobina Fetal

Glu: Ácido Glutâmico

Val: Valina

NO: Óxido Nítrico

HU: Hidroxiureia

FDA: *Food and Drug Administration*

EMA: *The European Medicines Agency's*

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

MetoxiPi: Metoxi-piridina

Lista de Figuras

Figura 1 – Estado inflamatório crônico e vaso-oclusão	12
Figura 2 – Estrutura química da hidroxiiureia.	16
Figura 3 – Estrutura química da L-glutamina.	16
Figura 4 – Mecanismo de ação do crizanilzumabe	17
Figura 5 – Estrutura química do voxelotor.	18
Figura 6 – Estrutura química do composto VZHE-039.	20
Figura 7 – VZHE-039 ligado à Hb.	21
Figura 8 – Composto 3b	22
Figura 9 – Planejamento estrutural do composto (7).	24
Figura 10 – Esquema da rota sintética de obtenção do composto (7).	24
Figura 11 – Espectro de ^1H RMN do composto 2 (600 MHz, DMSO- d_6).	29
Figura 12 – Espectro de ^1H RMN do composto 4 (600 MHz, DMSO- d_6).	31
Figura 13 – Espectro de ^{13}C de RMN do composto (4) (150 MHz, DMSO- d_6).	31
Figura 14 – Espectro de ^1H RMN do composto 7 (600 MHz, DMSO- d_6).	33
Figura 15 – Rota sintética com a tentativa de redução.	35
Figura 16 – Espectro de ^1H de RMN da tentativa de redução do grupo furoxano (600 MHz, DMSO).	35
Figura 17 – Espectro de ^{13}C de RMN da tentativa de redução do grupo furoxano (150 MHz, DMSO).	36

Sumário

Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	6
Abstract	7
Lista de Abreviaturas	8
Lista de Figuras	9
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Anemia Falciforme	11
1.1.1. Fisiopatologia	11
1.1.2. Epidemiologia	13
1.1.3. Tratamento	15
1.1.3.1. Hidroxiureia (HU)	16
1.1.3.2. L-glutamina	16
1.1.3.3. Crizanlizumabe	17
1.1.3.4. Voxelotor	18
1.1.4. Desenvolvimento de ligantes covalentes de hemoglobina	19
1.1.4.1. VZHE-09	19
1.1.4.2. Óxido nítrico (NO)	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Planejamento Estrutural	23
3.2. Metodologia de síntese	24
3.3. Métodos Analíticos	26
3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	26
3.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anemia Falciforme

1.1.1. Fisiopatologia

O transporte de oxigênio (O_2) pelo sangue aos tecidos acontece através da ligação desse gás à hemoglobina, que é um tetrâmero composto de duas subunidades globínicas. As subunidades estão ligadas a um grupo heme cada uma, que por sua vez é constituído pelo anel porfirínico com um átomo de ferro no centro e que é responsável pela ligação ao O_2 . Desde a concepção até os 6 meses de vida, o ser humano apresenta três tipos diferentes de hemoglobina: embrionária, fetal e adulta. Os tipos de hemoglobinas são distintos quanto a constituição de suas cadeias globínicas. A hemoglobina adulta, por exemplo, denominada como hemoglobina A (HbA), é constituída de duas cadeias alfa (α) e duas cadeias beta (β), enquanto a hemoglobina fetal (HbF) possui duas cadeias alfa e duas cadeias gama (SANTOS et al., 2012).

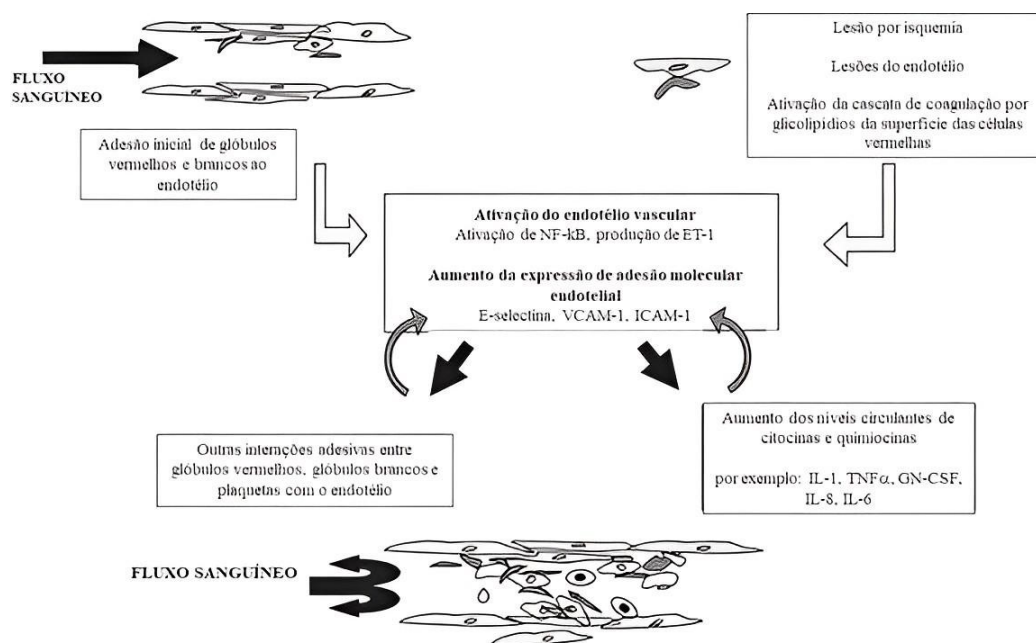
Os portadores da AF possuem uma mutação pontual no gene da β globina, que ocasiona a troca de uma base nitrogenada e, dessa forma, o códon que codificaria o ácido glutâmico (Glu) passa a codificar uma valina (Val). Essa troca resulta numa mudança do carácter químico dos aminoácidos, sendo que o ácido glutâmico em meio fisiológico se apresenta desprotonado e com uma carga negativa, enquanto que a valina é um aminoácido hidrofóbico. A carga presente no Glu faz com que haja uma repulsão entre as hemoglobinas, devido ao fato desse aminoácido estar localizado na superfície da cadeia da β globina. Quando a mutação está presente e o aminoácido da superfície é a Val, existe uma interação entre as hemoglobinas, através de interações hidrofóbicas, resultando em interações que promovem a sua polimerização. A hemoglobina mutada recebe o nome de hemoglobina S (HbS) (MANFREDINI et al., 2007).

A principal característica dessa doença é a presença de hemácias em formato de foice, condição causada pela polimerização da HbS quando no estado desoxigenado. Essas hemácias em foice ocasionam uma anemia hemolítica, já que os polímeros formados provocam hemólise lesionando a membrana eritrocítica. Além disso, o transporte de oxigênio é dificultado devido ao maior contato das hemácias em foice às moléculas de adesão circulantes, o que atrapalha a sua circulação e contribui também para processo de vaso-

oclusão pela aderência dessas ao endotélio dos vasos, favorecendo o surgimento de processos infecciosos e inflamatórios (MACHADO et al., 2018).

O processo de vaso oclusão é complexo e multifatorial, envolve a inflamação e vaso-reatividade, e conta com a participação de diversos tipos celulares, presença de estresse oxidativo e biodisponibilidade de óxido nítrico reduzida. Os eritrócitos contendo HbS apresentam maior adesão ao endotélio vascular, e propiciam a ativação deste o que leva ao aumento de expressão de moléculas de adesão e mediadores inflamatórios, além de propiciar ativação da cascata de coagulação. Somado a isso, ocorre maior interação entre as células vermelhas, brancas e as plaquetas, promovendo um ciclo de ativação celular constante, adesão celular e mediação inflamatória que prolongam o estado inflamatório crônico, como demonstrado na figura 1 (CONRAN et al., 2009).

Figura 1 – Estado inflamatório crônico e vaso-oclusão



Fonte: Retirado e adaptado de CONRAN et al., 2009.

A hemácia que contém a HbS possui uma vida útil de aproximadamente 3 semanas, bem menor que a HbA que é de até 120 dias. A hemólise crônica resulta na constante liberação dos componentes presentes na hemácia, como arginase e a própria hemoglobina. A arginase tem como substrato o aminoácido arginina, sendo assim, sua constante liberação no plasma resulta no consumo e diminuição das taxas do mesmo. A produção de NO endógeno é realizada por enzimas denominadas NO sintetases, as quais são responsáveis por converter L-

arginina em L-citrulina liberando NO como produto (MONCADA et al., 1989). Como resultado, a arginase e a NO sintetase irão competir pela arginina do plasma, resultando na diminuição da produção de NO endógeno. De forma concomitante, a hemoglobina livre no plasma é responsável pelo sequestro de NO circulante, diminuindo ainda mais suas taxas (MORRIS, 2008).

O NO exerce um papel fundamental na homeostase vascular, sendo responsável pela manutenção do tônus vascular através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) e produção de cGMP (GEWALTIG et al., 2002); atuando como anti-inflamatório e na regulação de citocinas pró-inflamatórias; e auxiliando no controle do estresse oxidativo através da diminuição de espécies reativas de O₂. A importante redução nas taxas de NO circulante agrava o quadro de inflamação e vaso-oclusão do paciente falciforme, sendo assim é essencial que o tratamento adotado seja capaz de atuar minimizando os efeitos deletérios causados por esse desequilíbrio.

A AF possui uma variabilidade de resposta em seus portadores, sendo que alguns são assintomáticos enquanto outros necessitam de hospitalização, geralmente devido às dores intensas de origem isquêmica. Tais diferenças devem-se a variabilidade fenotípica, sendo que os modificadores genéticos mais bem caracterizados e que possuem influência na resposta genética são os determinantes dos níveis de HbF e a co-herança da alfa-talassemia, porém só estes não explicam a grande quantidade das variações observadas e por isso muitos estudos genéticos ainda são realizados. Apesar dos esforços para entender essa variabilidade, ainda não se obteve nenhum resultado significativo o suficiente. E foi baseando-se nisso que realizou-se também uma busca acerca de como os fatores ambientais podem explicar parte dessa variabilidade clínica, já que o fator climático é reconhecido como influente sobre a dor aguda, outros fatores como a qualidade do ar, o local de habitação, a condição socioeconômica, a prática de atividades físicas e a ocorrência de infecções também podem possuir relevância sobre a manifestação da patologia e contribuir no entendimento dessas diferenças (TEWARI et al., 2015).

1.1.2. Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde e das Nações Unidas, se estima que no mundo ocorra mais de 300.000 nascimentos ao ano de indivíduos afetados pela Anemia Falciforme (AF), sendo, portanto, um importante problema de Saúde Pública. A frequência

dos pacientes vivendo com AF é maior na África Subsaariana, Arábia Saudita e na Índia (ALRAYYES et al., 2018). A AF é encontrada prevalentemente nos afrodescendentes, e no Brasil, estados como a Bahia apresentam taxas de até 1/650 recém-nascidos. Estudos epidemiológicos estimam ainda que no país entre os anos 1998 e 2012 foram aproximadamente 2,6 mil crianças diagnosticadas com AF (ARDUINI et al., 2017).

Um aumento na prevalência e na heterogeneidade genética de hemoglobinopatias no mundo todo se deve à migração, sobretudo na Europa. Entretanto, o melhor acesso à saúde nos países de maior desenvolvimento, e os programas de triagem neonatal resultaram na diminuição dos números de mortalidade precoce, em contraste com os subdesenvolvidos onde as taxas continuam altas. Estima-se que a expectativa de vida dos pacientes com AF nos países desenvolvidos pode superar os 55 anos de idade (TEWARI et al., 2015).

A triagem neonatal permite a identificação precoce de doenças metabólicas, genéticas e/ou infecciosas. Um dos objetivos desta é a detecção de doenças antes dessas apresentarem seus sinais e sintomas, além de acompanhá-las e tratá-las de forma precoce. No Brasil, programas de diagnósticos em recém-nascidos só foram iniciados em 1976 e, apenas em 2001 o Ministério da Saúde incorporou o diagnóstico da AF a esses programas (RODRIGUES et al., 2012). Nos Estados Unidos, a situação já era bem diferente desde a década de 70 no qual já haviam sido iniciados a implementação da triagem neonatal para AF em alguns estados. O resultado dessa testagem precoce é a diminuição do número de mortes das crianças diagnosticadas e a redução da morbidade, isso porque saber previamente se o bebê desenvolverá ou não a doença, permite que os familiares ao serem informados possam tomar os devidos cuidados e procurar assistência médica para iniciar o tratamento a tempo de prevenir as complicações dessa doença (YUSUF et al., 2011).

Apesar de importante para reduzir as taxas de mortalidade infantil, esses programas de triagem neonatais, sobretudo para AF, não são amplamente implementados ao redor do mundo, inclusive no continente africano onde as preocupações maiores são com doenças como HIV e tuberculose. Na África Subsaariana, há uma estimativa de 230.000 nascimentos ao ano afetados pela AF, correspondendo a cerca de 70% dos casos mundiais. A falta do diagnóstico precoce e do acesso aos cuidados pode contribuir significativamente para aumentar a taxa de mortalidade infantil, que pode chegar a 6,4% em crianças menores de 5 anos (MCGANN, 2014).

Em 1949, foi sugerida a “hipótese da malária”, um paradoxo Darwiniano que tenta explicar como as altas frequências de distúrbios genéticos do sangue poderiam oferecer uma vantagem seletiva, como a proteção contra malária que ocorre em pacientes portadores da AF. Essa hipótese foi discutida após perceber-se que a distribuição geográfica da talassemia e da malária na região do mediterrâneo, Sardenha, Melanésia e Quênia coincidem, sendo que tal associação também foi notada entre indivíduos falcêmicos e a malária na África (PIEL et al., 2010).

1.1.3. Tratamento

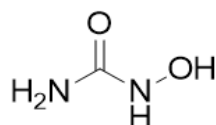
Entre as opções de tratamento padrões, a primeira com uso aprovado para AF pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela agência europeia *The European Medicines Agency's* (EMA) é a hidroxiureia (HU). HU apresenta como principal efeito a indução de HbF a fim de diminuir a concentração da HbS e consequentemente a polimerização, além de reduzir a expressão das moléculas de adesão, diminuir a taxa de hemólise e aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Entretanto, um dos grandes inconvenientes relatados é o de que a HU não é eficaz para aproximadamente 1/3 dos pacientes. Ademais, possui efeitos adversos significativos, como a mielossupressão e genotoxicidade quando usada de forma crônica. A *L*-glutamina é outro medicamento disponível, tendo como efeito o aumento de NAD/NADH intracelular e proporcionando a redução dos episódios dolorosos de vaso-oclusão e do número de hospitalizações devido ao seu papel como antioxidante. Outra opção terapêutica aprovada para AF é o crizanlizumabe. Este é um anticorpo monoclonal responsável pelo bloqueio da interação da P-seletina e o ligante 1 da sua glicoproteína, diminuindo o processo de vaso-oclusão (PAVAN et al., 2020).

O voxelotor, aprovado em 2019 pela FDA, é o primeiro inibidor da polimerização da HbS. Esse fármaco atua através da ligação covalente com a cadeia alfa da hemoglobina, modulando sua afinidade pelo oxigênio, o que resulta numa maior estabilidade das hemácias em seu estado oxigenado, evitando assim a polimerização da hemoglobina. Como consequência, o voxelotor é capaz de reduzir as complicações da AF e mostrou-se como uma opção de tratamento promissora minimizando os agravantes dessa doença (HERITY et al., 2021).

A seguir serão destacados os principais fármacos usados no tratamento e algumas considerações sobre o uso destes na AF.

1.1.3.1. Hidroxiureia (HU)

Figura 2 – Estrutura química da hidroxiureia.

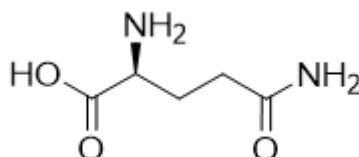


A HU estimula a produção da cadeia gama e induz o aumento de HbF participando de modificações epigenéticas, de eventos transcricionais, de vias de sinalização, de modificações pós-transcricionais, entre outras vias moleculares, mas sem o mecanismo exato conhecido (PULE et al., 2015). O mecanismo de ação da HU é baseado em sua reação com o grupo heme da sGC, resultando na bioconversão da HU à NO e na ativação da enzima. Com a ativação da sGC há um aumento na produção de cGMP e consequente indução da expressão do gene da gama-globina e produção de HbF (COKIC et al., 2008).

Ao induzir a produção de HbF, a HU promove a redução da anemia hemolítica, diminuição do quadro inflamatório e, conseqüentemente, reduz as complicações dos quadros de dores crônicas e agudas, além de melhorar a qualidade de vida do portador da AF, sendo que atualmente é o tratamento padrão para essa doença, inclusive para crianças (POWER-HAYSA et al., 2020).

1.1.3.2. L-glutamina

Figura 3 – Estrutura química da L-glutamina.



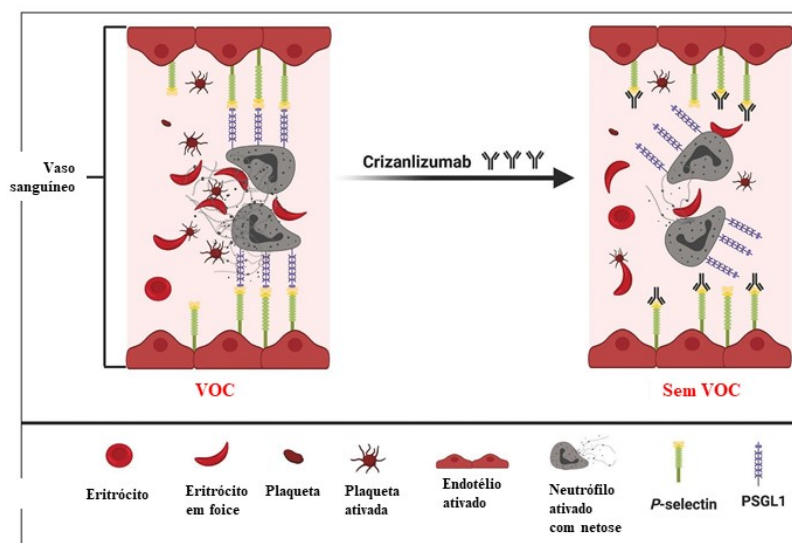
Um dos aminoácidos mais abundantes, a glutamina está envolvida no transporte de nitrogênio, na regulação da homeostase ácido-base e até na sinalização catabólica, como precursora da glutatona, do NAD e da arginina, oferecendo proteção contra danos oxidativos aos eritrócitos. Tais efeitos podem ser benéficos aos pacientes com AF, mas de forma que o uso da L-glutamina seja apenas complementar a outro tratamento, já que ela não possui a capacidade de atuar apenas sobre os eritrócitos, mas sim no organismo como um todo, sendo importante o uso com cautela e monitorado para aqueles que possuem insuficiência renal ou hepática (QUINN, 2018). Nos estudos clínicos da L-glutamina foi demonstrado que seu uso

reduziu em 25% os episódios de crises dolorosas dos pacientes, e diminuiu em cerca de 33% as taxas de hospitalizações, o que levou a aprovação desse fármaco para o tratamento da AF (NIIHARA et al., 2018).

1.1.3.3. Crizanlizumabe

O crizanlizumabe é um anticorpo monoclonal direcionado para a glicoproteína P-selectina, molécula de adesão presente na membrana do endotélio. Seu mecanismo de ação ocorre através da sua ligação à P-selectina, impedindo a adesão de neutrófilos ativados aos vasos, evitando assim a vaso-oclusão (LEIBOVITCH et al., 2022). A Figura 6 apresenta um esquema do mecanismo de ação do crizanlizumabe.

Figura 4 – Mecanismo de ação do crizanilzumabe



Fonte: Retirado e adaptado de RILEY et al., 2019.

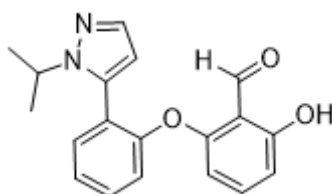
Os ensaios clínicos de fase II realizados com pacientes falciformes demonstraram que o tratamento com crizanlizumabe (5mg/kg) reduziu em até 45,3% a médias das taxas de crises dolorosas em 52 semanas, e também foi capaz de retardar a ocorrência de crises vaso-oclusivas (ATAGA et al., 2017). Em pacientes recebendo placebo, as primeiras crises vaso-oclusivas ocorreram cerca de 1,38 meses após o início do tratamento, enquanto que os pacientes recebendo o anticorpo apresentaram as primeiras crises vaso-oclusivas cerca de 4,07 meses após o início do tratamento (KUTLAR et al., 2019). Tais resultados

demonstraram que o crizanlizumabe era efetivo na diminuição da frequência das crises vaso-oclusivas, e nas crises dolorosas decorrentes das mesmas.

O crizanlizumabe teve aprovação pelo FDA em 2019 e tem seu uso objetivando a prevenção das crises vaso-oclusivas dolorosas, inibindo a adesão dos glóbulos vermelhos falciformes. Foi considerada uma terapia inovadora, mas estudos demonstraram efeitos mais significativos quando o uso é concomitante a HU (RILEY et al., 2019).

1.1.3.4. Voxelotor

Figura 5 – Estrutura química do voxelotor.



Em estudos realizados com o voxelotor foi observada eficácia e segurança, sendo este capaz de reduzir os marcadores de hemólise de forma dose-dependente. O voxelotor pode ser utilizado em terapias combinadas, inclusive com HU (GLAROS et al., 2021).

O voxelotor possui em sua estrutura um aldeído aromático responsável pela ligação covalente com o resíduo de valina da cadeia alfa (α Val1) da hemoglobina, o qual resultará no deslocamento e estabilização da conformação da hemoglobina em seu estado relaxado (R), ou oxigenado. Devido ao fato da polimerização da HbS ocorrer quando a hemoglobina apresenta-se em seu estado deoxigenado, a aplicação de ligantes covalentes de hemoglobina, como o voxelotor, apresenta-se como uma alternativa ao tratamento da AF. Por ser capaz de modular a estrutura tridimensional da hemoglobina, o voxelotor é capaz de prevenir a polimerização da mesma, minimizando os efeitos decorrentes desse fenômeno (GLAROS et al., 2021).

Resultados dos estudos clínicos demonstraram que o voxelotor foi capaz de aumentar os níveis de hemoglobina e de saturação de oxigênio, e reduzir as taxas de falcização das hemácias, hemólise e nas taxas de hospitalização dos pacientes (BLYDEN et al. 2018). O

voxelotor foi aprovado pelo FDA em 2019, sendo uma das mais recentes adições ao tratamento da AF, e é comercializado sob o nome Oxybrite[®].

1.1.4. Desenvolvimento de ligantes covalentes de hemoglobina

Neste capítulo será feito um breve destaque para algumas descobertas recentes que são importantes para conduzir o desenvolvimento de novos fármacos para AF que apresentem a hemoglobina como alvo, e inclusive foram utilizadas para o planejamento deste trabalho.

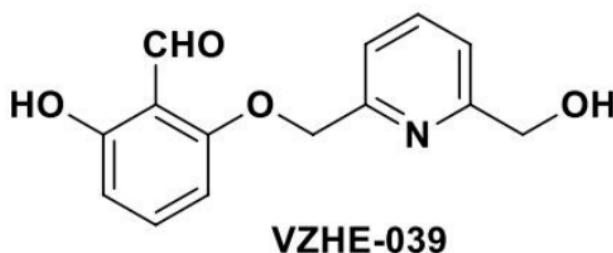
1.1.4.1. VZHE-09

A Hb atua em equilíbrio entres dois estados: o tenso (T) quando está desoxigenada, sendo que apenas nesse estado a HbS possui a capacidade de polimerizar fibras insolúveis e originar as hemácias falciformes; e o relaxado (R) em que ocorre a ligação ao oxigênio por essa conformação possuir maior afinidade a esse gás. Com base nisso, demonstrou-se que moléculas com aldeídos aromáticos possuem capacidade de realizarem interações de base de Schiff com a amina livre do resíduo de Val da cadeia alfa da Hb, que resulta na desestabilização do estado T e estabilização do estado R aumentando a afinidade pelo O₂, e consequentemente reduzindo a polimerização (ABDULMALIK et al., 2020).

Inicialmente, foram estudadas as moléculas de vanilina e 5-HMF como candidatas ao tratamento de AF, por possuírem a capacidade de realizar as interações de base de Schiff com a Val da Hb, entretanto possuem propriedades farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas fracas, já que são metabolizadas muito rapidamente no fígado. A partir dessas informações, Abdulmalik e colaboradores realizaram o planejamento de moléculas que fossem mais potentes em aumentar a afinidade por O₂ e na inibição da falcização das hemácias, entre elas estão INN-312, INN-298 e SAJ-310 que consistem na incorporação da metoxi-piridina (metoxiPi) ao anel aromático da vanilina em diferentes orientações, o que resultou em interações adicionais que potencialmente aumentaram a afinidade da Hb pelo oxigênio. Outro achado foi que os compostos com o metoxiPi na posição orto em relação ao aldeído da vanilina apresentaram mecanismo anti-falciforme independente de O₂, através de interações hidrofóbicas fracas com a hélice F da α -globina (α F-hélice) que provocam aumento da solubilidade da HbS desoxigenada (ABDULMALIK et al., 2020).

Visando sintetizar um composto que fosse um ligante mais forte com a α F-hélice e aumentar a estabilidade metabólica da fração aldeído, Abdulmalik e colaboradores descobriram outros compostos como o TD-7 e o VZHE-039, sendo este último (Figura 6) o mais promissor pois foi capaz de realizar uma interação de ligação de hidrogênio forte com a α F-hélice através de sua fração metilhidroxi do metoxiPi, importante para o mecanismo anti-falcização adicional independente de O₂ (ABDULMALIK et al., 2020).

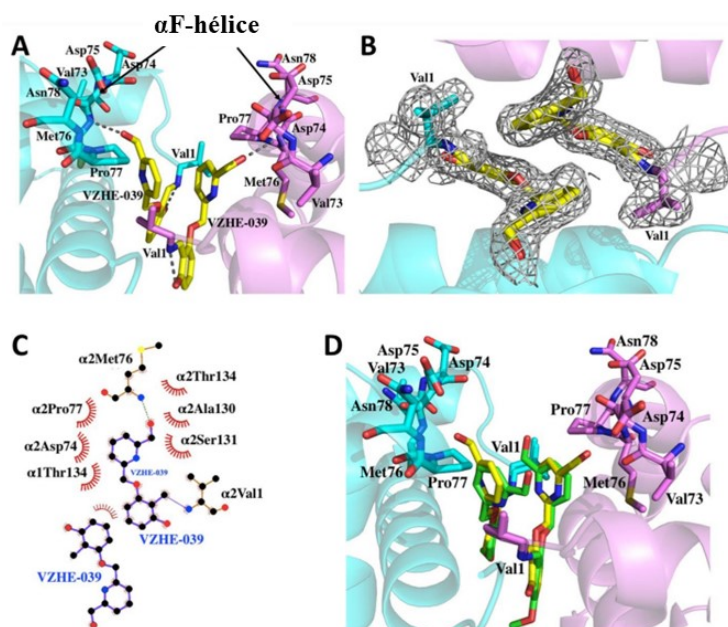
Figura 6 – Estrutura química do composto VZHE-039.



Fonte: Retirado de ABDULMALIK et al., 2020.

A figura 7 demonstra imagens de estudos de cristalografia de raios-X da ligação da molécula de VZHE-039 à Hb, é possível observar a ligação de hidrogênio formada entre a porção metilhidroxil da molécula e o resíduo 76 de metionina da cadeia alfa (α Met76). Observa-se também a interação entre a hidroxila presente no benzaldeído e o resíduo 1 de valina da cadeia alfa (α Val1) que possui a característica de ser uma interação forte e evidenciando que o objetivo estrutural foi atingido. Somado a esses resultados, estudos *in vitro* confirmaram a capacidade desse composto em inibir a falcização até mesmo em situações de anóxia devido sua interação adicional a α F-hélice destacada na Figura 7, juntamente a sua atividade por mecanismo dependente de O₂ pela formação de base de schiff com a Hb. (ABDULMALIK et al., 2020).

Figura 7 – VZHE-039 ligado à Hb.



Fonte: Retirado e adaptado de ABDULMALIK et al., 2020.

1.1.4.2. Óxido nítrico (NO)

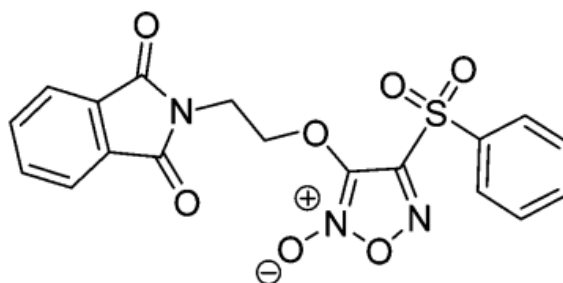
É sabido que o NO possui importantes funções fisiológicas, pois é um radical livre com potente atividade vasodilatadora e que atua regulando a homeostase vascular, por isso em situações de impacto sobre os seus níveis podem resultar em disfunções vasculares. Na AF ocorre a depleção dos níveis de NO por meio de mecanismos que sequestram e/ou diminuem a síntese dessa molécula (MORRIS, CR., 2008), acarretando piora de algumas das condições clínicas dessa doença. Ademais, estudos demonstraram que aumentar o fornecimento de NO ao plasma pode reduzir a gravidade e a duração das crises vaso-oclusivas, inclusive através de moléculas doadoras de NO exógena, como a própria HU apresenta efeitos benéficos promovendo a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e redução da inflamação (HUANG et al., 2022). Os efeitos terapêuticos de NO estão relacionados às suas ações vasodilatadoras, antiplaquetárias, anti-adesão leucocitária, antiproliferativas e antioxidativas que somadas melhoram a função endotelial e reduzem a progressão de doenças vasculares (GEWALTIG et al., 2002).

Um ensaio clínico realizado por Little e colaboradores demonstrou que a suplementação de L-arginina, um precursor de NO, em pacientes utilizando HU possui impacto sobre a produção de HbF e altera o potencial redox das células vermelhas, porém não

detectou-se nenhuma eficácia clinicamente significativa, o que pode ser justificado pelo seu metabolismo aumentado em pacientes com AF (LITTLE et al., 2009).

Compostos que possuem subunidades doadoras de NO podem contribuir benéficamente para o tratamento da AF devido sua capacidade de aumentar expressão do gene γ -globina, inibir agregação plaquetária e promover a vasodilatação. Dessa forma, Santos e colaboradores planejaram moléculas derivadas de ftalimida obtidas por hibridização molecular de uma subunidade de furoxano, visando sua capacidade de doação de NO, e a talidomida. Como resultado obtiveram que todos os compostos sintetizados apresentaram a propriedade de doar NO, entretanto o composto 3b (Figura 8) foi o que se destacou por possuir atividade analgésica e por aumentar a expressão do gene γ -globina, além de ter atividade mutagênica menor que a HU (SANTOS et al., 2012).

Figura 8 – Composto 3b



Fonte: Retirado de SANTOS et al., 2012.

Assim, ligantes covalentes de hemoglobina associados aos furoxanos poderiam atuar por um mecanismo múltiplo de ação ao interferir com a polimerização de HbS e promover a liberação do óxido nítrico, podendo assim constituir uma abordagem diferente para tratar a doença.

2. OBJETIVOS

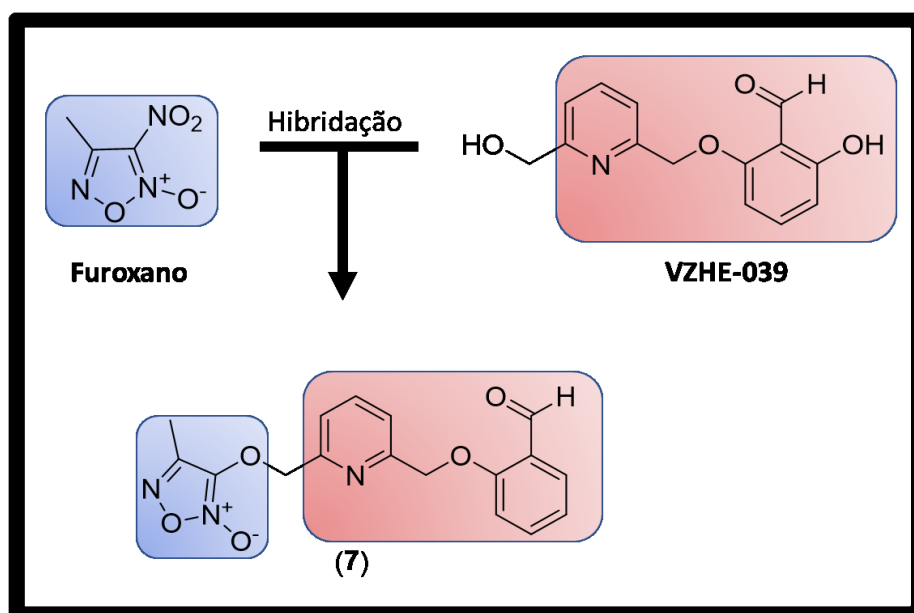
O objetivo do presente trabalho foi o planejamento, a síntese e a caracterização de inibidores covalentes da hemoglobina com capacidade de doação de óxido nítrico visando compostos úteis para o tratamento da anemia falciforme.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Planejamento Estrutural

O composto VZHE-039 foi planejado e sintetizado por Abdulmalik e colaboradores (ABDULMALIK et al., 2020) e apresenta mecanismo de ação similar ao voxelotor, porém foi demonstrado que o VZHE-039 é capaz de evitar a polimerização da HbS tanto em ambientes de hipoxia quanto de anoxia, o que não ocorre quando da utilização do voxelotor. Sendo assim, o composto VZHE-039 apresenta vantagens de utilização, quando comparado ao fármaco aprovado. Baseando-se nesses dados, planejou-se uma nova molécula que apresenta uma hibridação molecular entre o composto VZHE-039 e um doador de óxido nítrico. O composto (7), apresentado na Figura 9, apresenta o grupamento aldeídico (vermelho) para atuação como ligante covalente de hemoglobina. O anel piridínico presente no composto sintetizado por Abdulmalik e colaboradores foi inserido na estrutura do composto (7) com intuito de manter-se a atuação da nova molécula em ambientes de hipoxia e anoxia. Através da estratégia de hibridação, foi inserida na estrutura do composto (7) um grupo furoxano (azul) com o intuito de obter-se um composto capaz de atuar nos sintomas da anemia falciforme através de dois mecanismo de ação diferentes: 1- inibição covalente da hemoglobina devido à presença do grupamento aldeídico, o que resultará na diminuição da polimerização e hemólise; e também através da doação de NO devido a presença do grupo furoxano, o que irá reestabelecer as taxas de NO circulantes do pacientes, restaurando a homeostase.

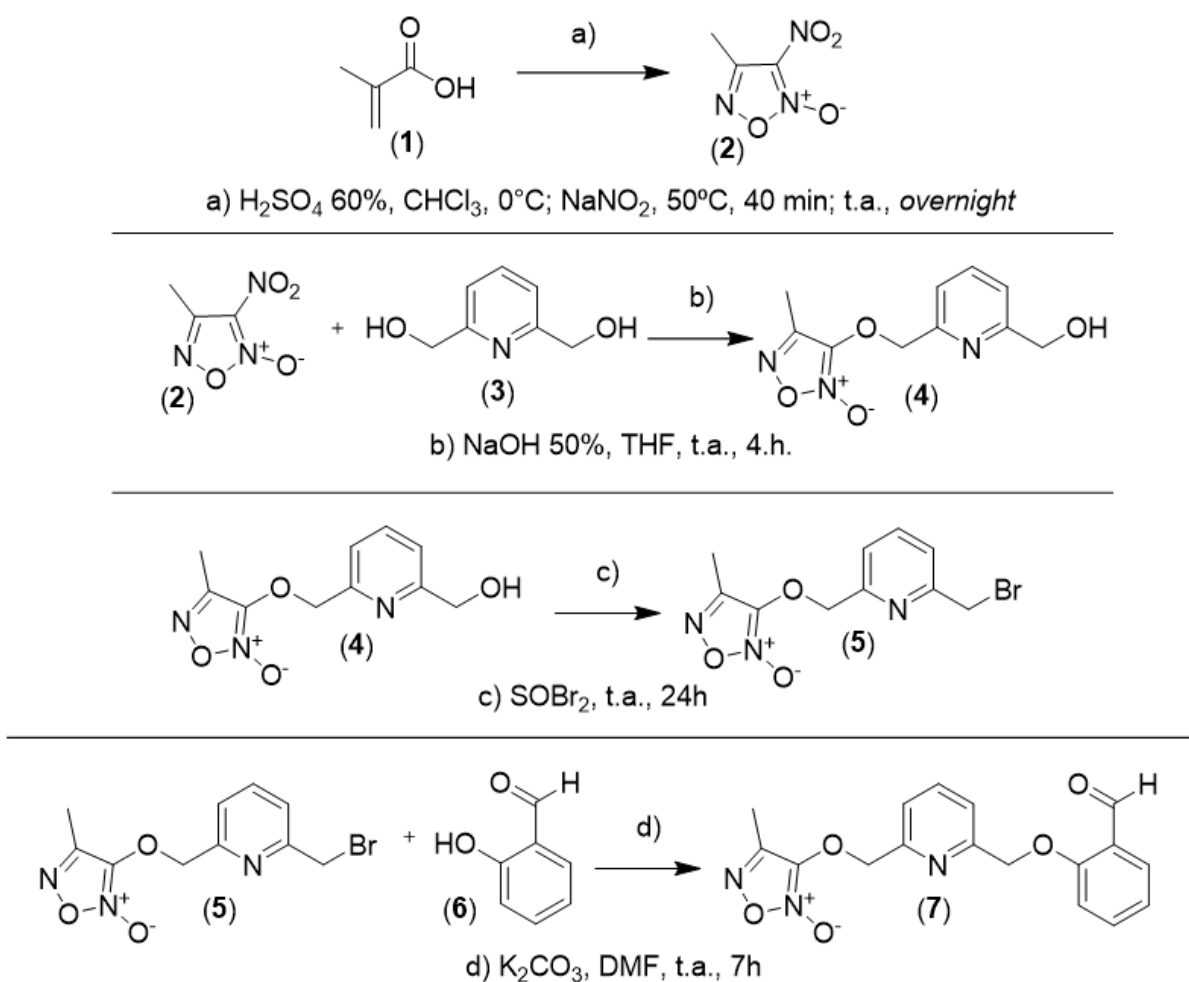
Figura 9 – Planejamento estrutural do composto (7).



3.2. Metodologia de síntese

O produto final foi obtido de acordo com a rota sintética demonstrada na Figura 10.

Figura 10 – Esquema da rota sintética de obtenção do composto (7).



Procedimentos experimentais

- a) Em um balão de 250 mL, foram adicionados 100 mL de clorofórmio, 35 mL de ácido sulfúrico 60% e aproximadamente 10 mL (0,12 mol) de ácido metacrílico (1). Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se lentamente 28g (0,41 mol) de nitrito de sódio durante 20 minutos. Em seguida, a reação foi aquecida a 50°C em banho de óleo durante 40 minutos em refluxo. Decorrido esse tempo, retirou-se do aquecimento e a reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Ao final adicionou-se água gelada e o isolamento do produto foi realizado pela extração da fase aquosa através de adições de de clorofórmio (3 x 30 mL). Posteriormente a fase orgânica foi lavada com água destilada (3 x 30 mL), bicarbonato de sódio 2% (3x 20 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (2 x 20 mL), logo depois foi adicionado o agente secante sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. Depois de filtrada, a fase orgânica foi deixada para evaporação do solvente. A purificação foi realizada por cromatografia de média pressão no equipamento Isolera (Biotage®), em coluna de 25g Snap Ultra® com fase móvel isocrática de 100% diclorometano em um fluxo de 35 mL/min. E após isolamento identificado por cromatografia em camada delgada (FM: 100% diclorometano) os solventes foram evaporados para obtenção de um sólido amarelo ouro e com rendimento médio de 35% (2).
- b) A um balão de 25 mL foram adicionados 270 mg (1,94 mmol) de bis-metilhidroxipiridina (3), 150 mg de NaOH 50% (w/w) e 4 mL de THF, mantendo a reação sob agitação à 0° C. Após resfriamento, lentamente adicionou-se 280 mg (1,94 mmol) do (2) em banho de gelo. Terminada a adição, removeu-se o banho de gelo e manteve-se a reação à temperatura ambiente por 4 horas. Ao final da reação, adicionou-se 50 mL de água gelada e o conteúdo foi transferido para um funil de separação para o isolamento do produto. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (6 x 30 mL). A fase orgânica foi coletada e seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à pressão reduzida. Purificou-se o produto por cromatografia de média pressão no equipamento Isolera (Biotage®), em coluna de 25g Snap Ultra® com fase móvel gradiente de hexano:acetato de etila de 8:2 a 6:4 e fluxo de 35 mL/min. Após isolamento identificado por cromatografia em camada delgada (FM: 8:2 hexano:acetato de etila) os solventes foram evaporados e obteve-se um sólido amarelo com rendimento de 48% (4).

- c) Adicionou-se em um balão de 10 mL, 80mg de (4) e 1 mL de brometo de tionila, deixando a reação sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Ao final da reação, foram adicionados água gelada e gelo até que parasse de exalar os vapores do brometo de tionila em excesso, em seguida ajustou-se o pH do meio para entre 7 e 8, utilizando uma solução de hidróxido de sódio a 10%. Depois, para extração da fase aquosa foi utilizado acetato de etila (4 x 10 mL) e a fase orgânica coletada foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. A purificação do produto foi feita por cromatografia de média pressão no equipamento Isolera (Biotage®), em coluna de 10g Snap Ultra® com fase móvel isocrática hexano:acetato de etila 6:4 e fluxo de 17mL/min. Após isolamento identificado por cromatografia em camada delgada (FM: 6:4 hexano:acetato de etila) os solventes foram evaporados e obteve-se um sólido branco com rendimento de 47% (5).
- d) Em um balão de 25 mL contendo 5 mL de DMF anidro, realizou-se a mistura de 19,2 mg (0,157 mmol) de salisalaldeído (6) e 21,7 mg de carbonato de potássio (0,157 mmol), a qual foi mantida sob agitação por 5 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados aos poucos e sob banho de gelo, 47,2 mg do (5) (0,157mmol) previamente solubilizado em DMF anidro, em seguida a reação foi mantida sob agitação e em temperatura ambiente por 7 horas. Ao final, 30 mL de água gelada foram adicionados e a extração da fase aquosa foi realizada com acetato de etila (3 x 10 mL). A fase orgânica coletada foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O produto foi purificado por cromatografia de média pressão no equipamento Isolera (Biotage®), em coluna de 10g Snap Ultra® com fase móvel isocrática de hexano:acetato de etila 6:4, em um fluxo de 15mL/min. Após isolamento identificado por cromatografia em camada delgada (FM: 6:4 hexano:acetato de etila) os solventes foram evaporados e obteve-se um sólido branco com rendimento de 82% (7).

3.3. Métodos Analíticos

3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada utilizadas para acompanhamento das reações foram realizadas usando cromatoplasmas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60

F254 (Sigma®) para o acompanhamento das reações. A visualização das cromatoplacas foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).

3.3.2. *Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram obtidos nos espectrômetros a 300 ou 600 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C , utilizando-se solventes deuterados no preparo das amostras. As análises foram realizadas no Instituto de Química (UNESP-Araraquara), utilizando, especificamente, um espectrômetro de 300 MHz (7.0 Tesla; ^1H e ^{13}C) Fourier com Dual probe $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ – Bruker® e espectrômetro de 600 MHz (14.0 Tesla; ^1H e ^{13}C) Ascend – Bruker®. Os deslocamentos químicos foram apresentados em partes por milhão (ppm; δ) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram representados por s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obtenção do composto final (7) e como demonstrado na Figura 10, foi necessário seguir uma rota sintética composta por quatro etapas. Na primeira, obteve-se o intermediário furoxano (2) através da reação entre o ácido metacrílico em meio contendo nitrito de sódio e ácido sulfúrico 60%. O composto (2) foi obtido como um sólido de coloração amarela com rendimento médio de 35%. Em seguida, reagiu-se o intermediário (2) com o 2,6-Bis(hidroximetil)piridina (3) para obtenção do composto (4), sendo que ao final da reação a placas cromatográfica demonstrava uma mancha além do esperado, que representava um subproduto formado, pois o composto (3) possui duas hidroxilas reativas que originam um produto di-substituído e por isso o rendimento dessa reação foi baixo, de 48% e o produto purificado apresentava coloração amarelo claro. Através da reação de bromação, reagiu-se o intermediário hidroxilado (4) com brometo de tionila para obtenção do composto (5) como um sólido de coloração branca e rendimento de 47%, que foi relativamente baixo devido perdas na vidraria utilizada, pois ao final da reação pela adição da água havia a formação de um crude nas paredes do balão de difícil solubilização e recuperação. O produto final (7) foi então obtido através da reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) entre o derivado halogenado e o ácido salicílico (6). O composto (7) apresenta-se como um sólido de coloração branca e rendimento de 82%.

Os compostos intermediários (2) e (4), assim como o composto final (7) foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (1H) e de carbono (^{13}C) em frequências de 600MHz e 150MHz respectivamente, sendo que os dados obtidos estão apresentados a seguir.

Composto (2):

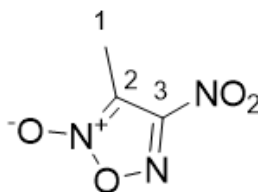
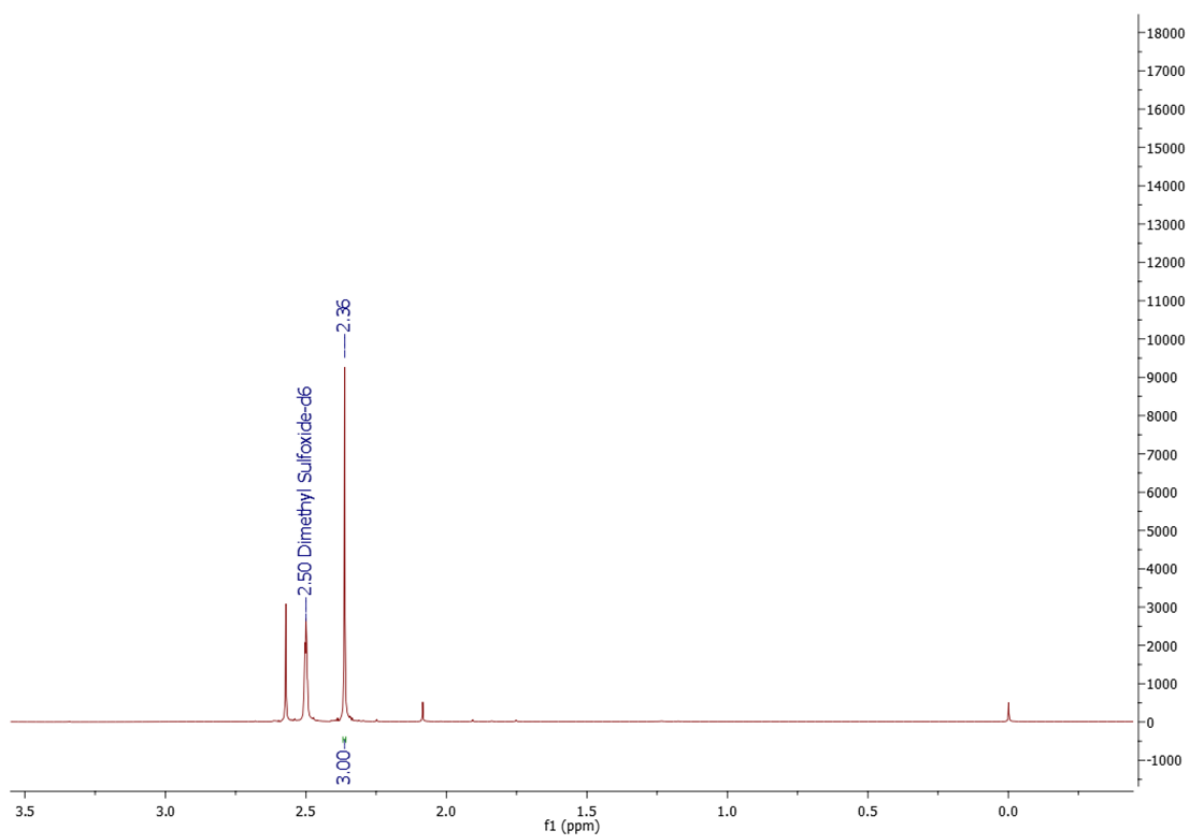
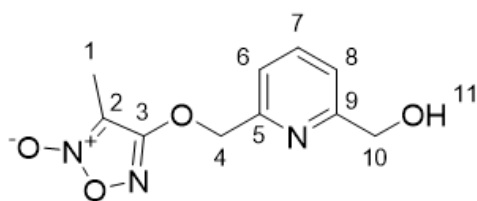


Figura 11 – Espectro de ^1H RMN do composto 2 (600 MHz, DMSO- d_6).



Através do espectro de RMN de ^1H do composto (2) (Figura 12) é possível visualizar os hidrogênios da metila H^1 como um simpleto integrando para três hidrogênios em 2.36 ppm.

Composto (4):



Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	2.09 (s, 3H)	6.73
2	-	106.91
3	-	153.12

4	5.43 (s, 2H)	71.83
5	-	162.99
6	7.45 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H)	119.97
7	7.88 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H)	137.00
8	7.48 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H)	120.28
9	-	163.32
10	4.57 (d, 2H)	64.09
11	5.47 (t, 1H)	-

Através do espectro de ^1H de ressonância magnética nuclear do composto (4) (Figura 13) é possível visualizar os hidrogênios aromáticos H6-H8 na região entre 7.88 e 7.45 ppm. O hidrogênio H7 apresenta-se como um tripleto em 7.88 ppm, enquanto os hidrogênios H6 e H8 apresentam-se como dupletos em 7.45 e 7.48 ppm, sendo que a proximidade entre eles se deve ao semelhante ambiente químico entre eles na estrutura química. Os hidrogênios metilênicos H4 e H10 apresentam-se como um simpleto em 5.43 ppm integrando para dois hidrogênios, e um duplete em 4.57 ppm integrando também para dois hidrogênios, respectivamente. O hidrogênio H10 apresenta-se como duplete por acoplar com a hidroxila vizinha a ele. O hidrogênio H11 (hidroxila) apresenta-se como um tripleto em 5.47 ppm integrando para um hidrogênio, e a os hidrogênios do grupamento metila apresentam-se como um simpleto em 2.09 ppm integrando para três hidrogênios. Comparando-se com o espectro obtido do intermediário (2), é possível perceber que o simpleto referente à metila desloca-se para à direita, sugerindo-se a troca de substituinte do anel furoxânico e a efetividade da reação. A Figura 13 apresenta o espectro de ^1H de RMN do composto (4), enquanto que a Figura 14 apresenta o espectro de ^{13}C de RMN.

Figura 12 – Espectro de ^1H RMN do composto 4 (600 MHz, DMSO-d_6).

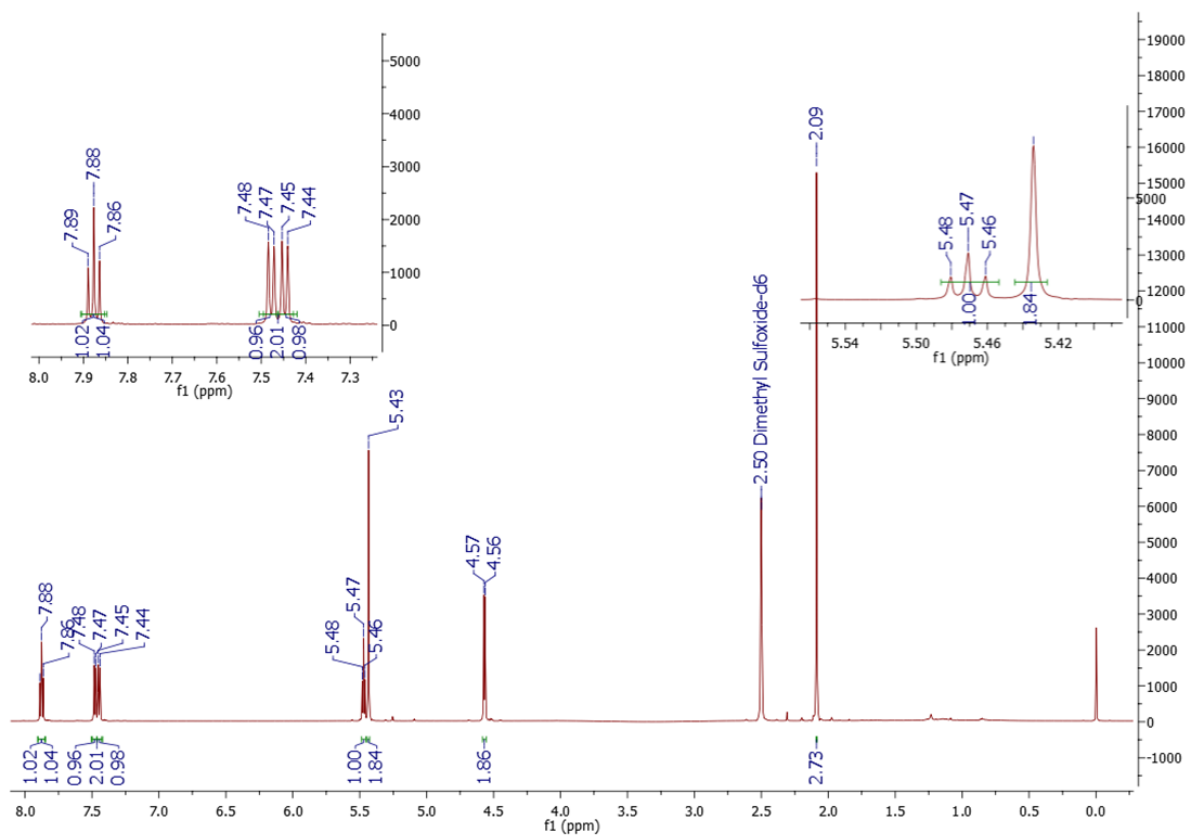
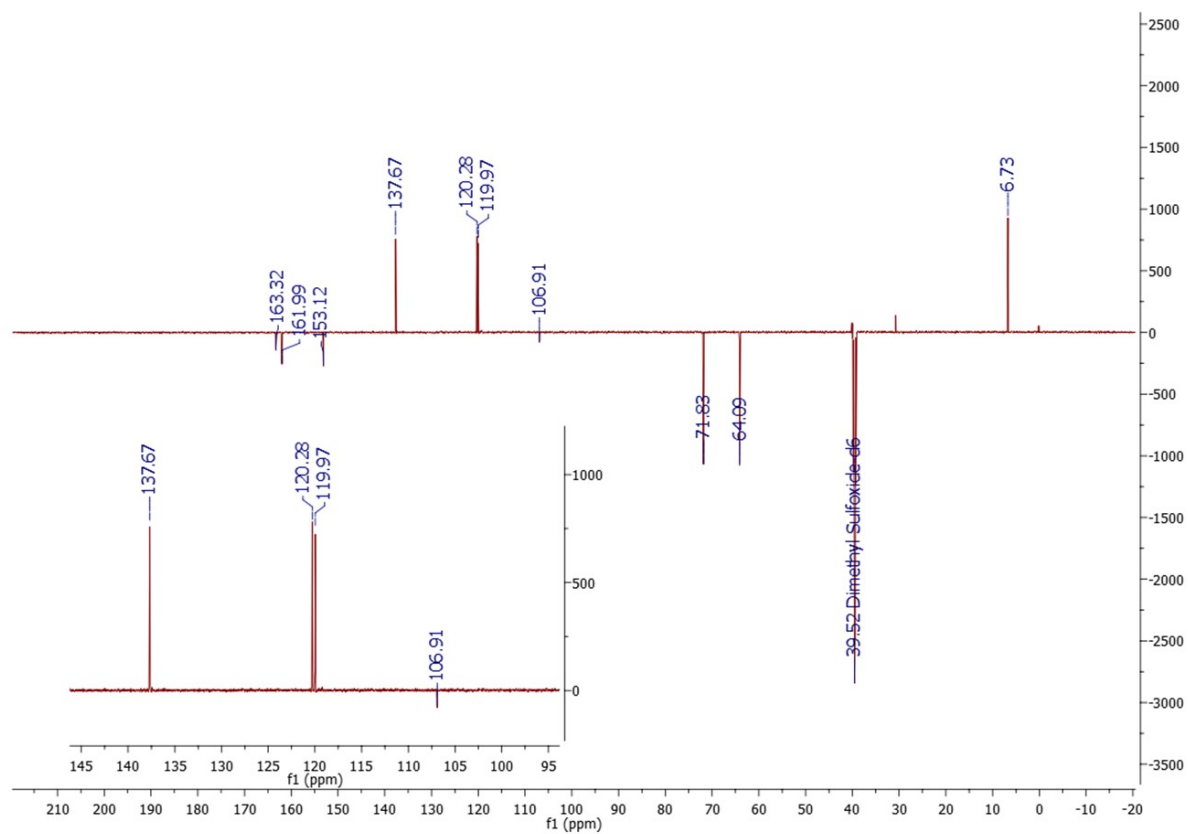
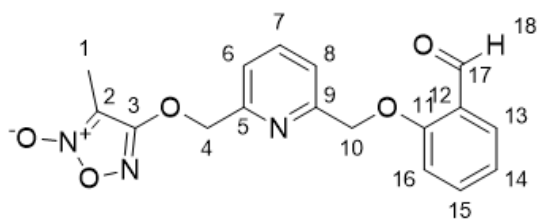


Figura 13 – Espectro de ^{13}C de RMN do composto (4) (150 MHz, DMSO- d_6).



Composto (7):



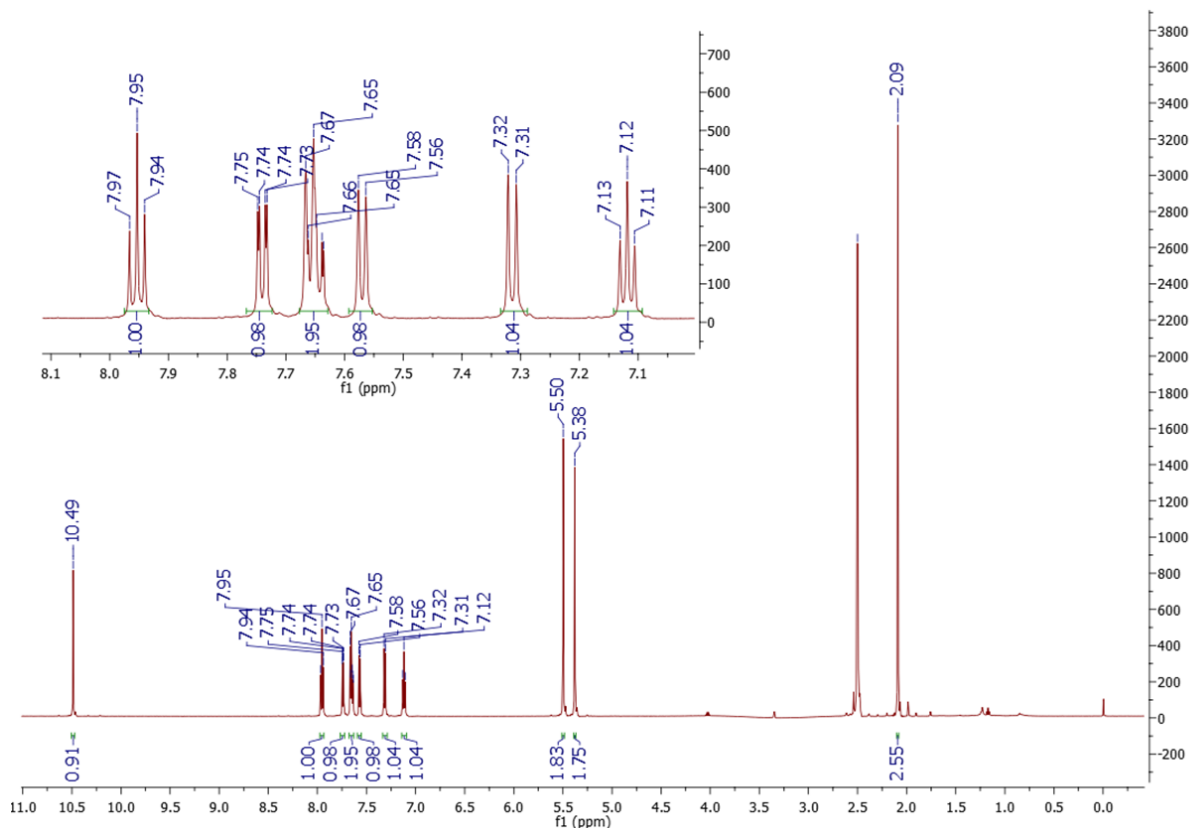
Posição	δ_{H} (ppm)
1	2.09 (s, 3H)
2	-
3	-
4	5.38 (s, 2H)

5	-
6	7.31 (d, $J=8.4\text{Hz}$)
7	7.95 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H)
8	7.57 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H)
9	-
10	5.50 (s, 2H)
11	-
12	-
13	7.74 (dd, $J=7.6$, 1.8Hz , 1H)
14	7.68-7.63 (m, 2H)
15	7.12 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H)
16	7.68-7.63 (m, 2H)
17	-
18	10.49 (s, 1H)

Por meio do espectro de ^1H de RMN do composto **(7)** (Figura 15) é possível visualizar os hidrogênios aromáticos H6-H8 e H13-H16 na região entre 7.95 ppm e 7.12 ppm num total de sete hidrogênios. Comparando-se com o espectro de ^1H do intermediário **(4)** é possível visualizar que os hidrogênios H6-H8 sofreram um leve deslocamento à região esquerda do espectro devido à inserção do anel aromático na posição H11, a qual retira densidade eletrônica da região e aumenta a desproteção dos hidrogênios citados. Além disso, os hidrogênios H13 e H15 são visualizados como um duplo duplete em 7.74 ppm integrando para um hidrogênio e um triplete em 7.12 ppm integrando também para um hidrogênio, enquanto que os hidrogênios H14 e H16 são vistos como um multiplete em 7.68-7.63 ppm integrando para dois hidrogênios. Os hidrogênios metilênicos (H4 e H10) são visualizados como dois simpletos em 5.38 ppm e 5.50 ppm, ambos integrando para dois hidrogênios,

respectivamente. Houve um deslocamento de aproximadamente 1ppm no sinal do hidrogênio H10, resultante da inserção do anel aromático. Além disso, não é mais visualizado o tripleto em 5.47ppm da hidroxila do intermediário sintético, o que assegura a obtenção do composto desejado. O hidrogênio do grupamento aldeído é visualizado como um simpleto em 10.49 ppm integrando para um hidrogênio.

Figura 14 – Espectro de ^1H RMN do composto 7 (600 MHz, DMSO- d_6).



Durante a realização das reações de obtenção dos compostos descritos, foram realizadas também tentativas de redução do anel furoxano com o objetivo futuro de comparar as atividades biológicas entre o composto final (**7**) não reduzido com o reduzido, ou seja, o que tem a capacidade de doação de NO e o que não tem.

Para isso, inicialmente foi seguida a metodologia descrita por Gasco e colaboradores (GASCO et al., 1973), em que ao composto (**2**) foi adicionado trietilfosfito, cuja reação foi mantida sob agitação, aquecimento a 95°C e em refluxo por cerca de 20 horas, após extração e evaporação do solvente o produto possuía a característica de um óleo marrom. Entretanto, nas placas cromatográficas, este composto se apresentava retido na base nas mais diferentes fases móveis, polares ou apolares, sendo assim e com base (GASCO; BOULTON, 1981),

pode-se sugerir que a metodologia utilizada resultou na abertura do anel devido ao aquecimento prolongado. Uma nova tentativa foi realizada à temperatura ambiente, porém o mesmo foi visualizado nas placas cromatográficas.

Em busca de outras metodologias para redução do grupamento furoxano, foi encontrado o trabalho de Fershtat e colaboradores (FERSHTAT et al., 2019) que demonstrou ter conseguido realizar tal reação utilizando o composto **(2)** e cloreto de estanho, entretanto provocava também a redução do dióxido de nitrogênio presente na estrutura a uma amina. Pensando na reatividade desse produto para seguir em nossa rota sintética, foi decidido testar essa metodologia aplicando-a ao composto **(4)**, então após 1 hora dessa reação em meio ácido, realizou-se uma placa cromatográfica do meio reacional comparando-o com os reagentes de partida e aparentemente todo o composto **(4)** havia sido consumido, indicando assim o final da reação.

A placa cromatográfica após isolamento mostrava que havia apenas um produto e por essa reação ter sido realizada com quantidades bem pequenas, não foi realizada a purificação para evitar perdas significativas, seguindo para as reações descritas como **(c)** e **(d)** para adição do salicilaldeído (figura 15). Terminada essa etapa, o produto obtido foi encaminhado para espectrometria de RMN, para assim ser determinado se o desejado havia sido obtido ou não.

Figura 15 – Rota sintética com a tentativa de redução.

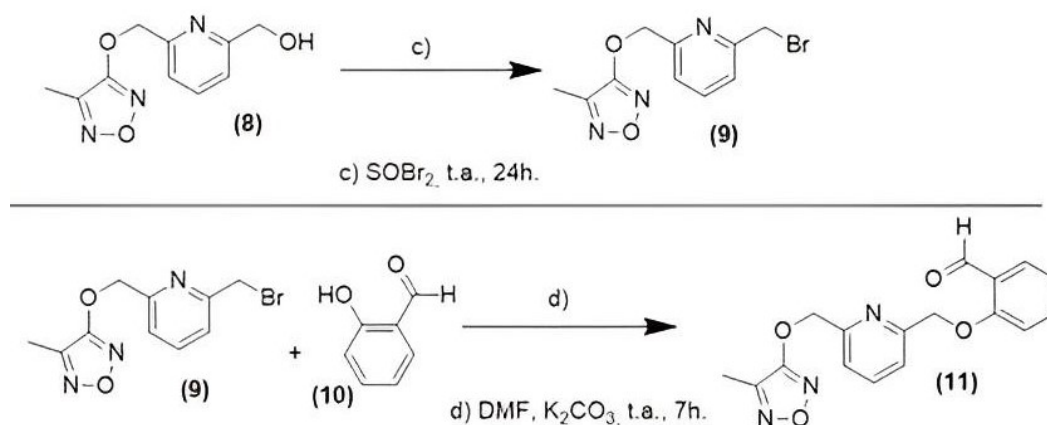


Figura 16 – Espectro de ^1H de RMN da tentativa de redução do grupo furoxano (600 MHz, DMSO-d_6).

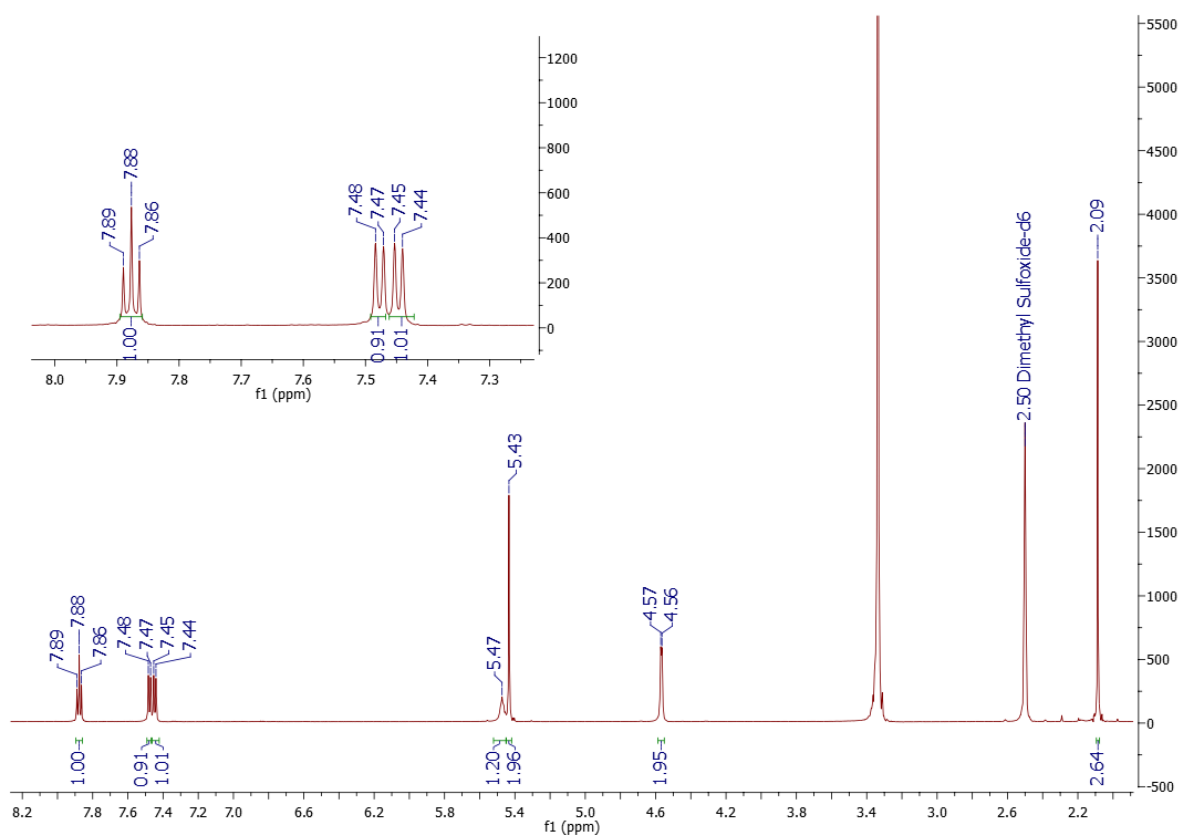
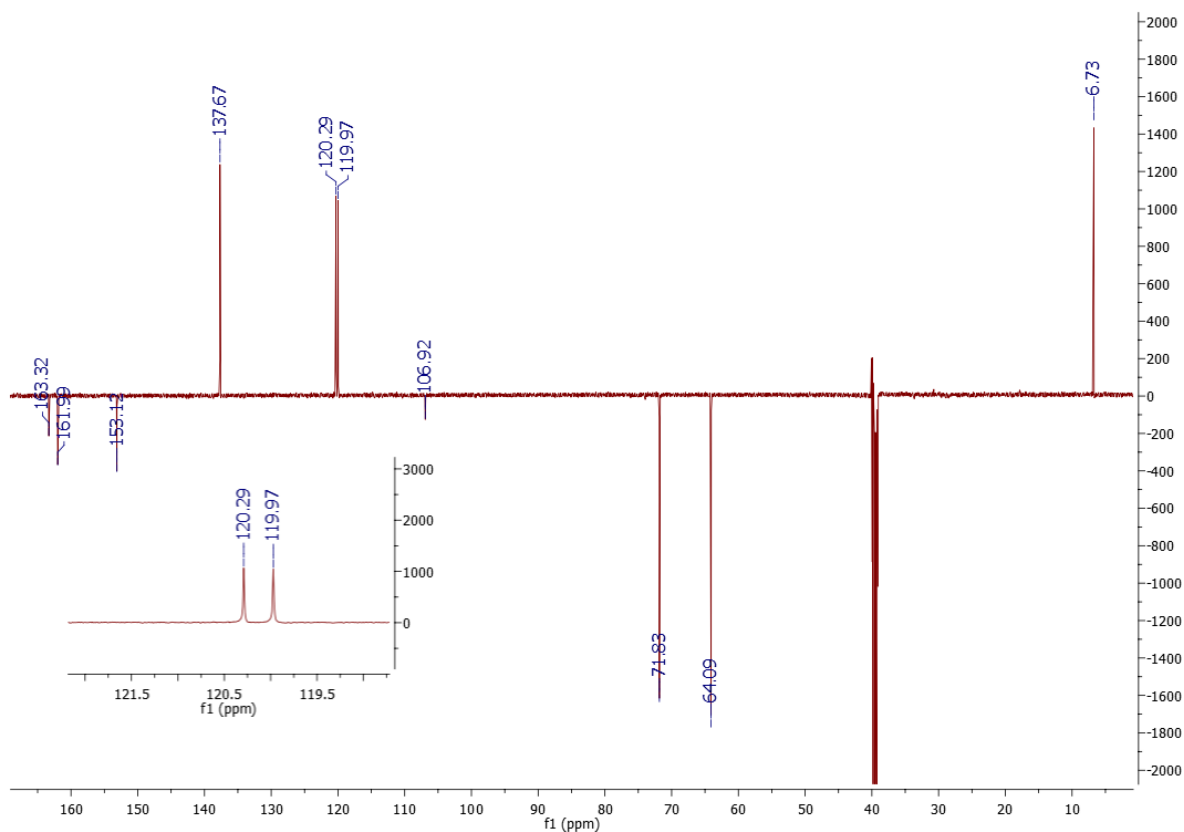


Figura 17 – Espectro de ^{13}C de RMN da tentativa de redução do grupo furoxano (150 MHz, DMSO-d_6).



Através dos espectros RMN, constatou-se que o produto esperado não foi obtido, isso porque os espectros são idênticos aos do composto **(4)**, quando na verdade o que se esperava visualizar era um deslocamento dos sinais de hidrogênio e carbono vizinhos ao anel para direita que é a região de proteção, entretanto o que se vê é um deslocamento para esquerda, referente a região de desproteção devido a carga positiva do átomo de nitrogênio do NO, que atrai a densidade eletrônica da região e desloca os sinais de carbono e hidrogênio essa direção.

Como foi demonstrado que o produto esperado não foi obtido, realizou-se então uma nova tentativa de redução do anel furoxano, mas dessa vez utilizando o composto **(7)**, seguindo a mesma metodologia utilizada anteriormente. Ao final da reação, a placa cromatográfica apresentava uma nova mancha com fator de retenção diferente do composto de partida **(7)**, portanto seguiu-se com o isolamento e purificação no equipamento Isolera Biotage®. Essa última etapa foi seguida da realização da CCD para acompanhamento da separação dos compostos e por meio das placas cromatográficas foi identificado que o

isolamento realizado pelo equipamento tratava-se apenas do composto (7), permitindo constatar que a redução não ocorreu.

Apesar das tentativas de redução do anel furoxano não terem resultado no que era desejado, demonstrou que são necessárias outras metodologias para a obtenção do que foi pretendido..

5. CONCLUSÃO

Após 4 etapas sintéticas para obtenção do composto final (**7**), cujos rendimentos foram de 35% para a etapa **a**), 48% para etapa **b**), 47% para etapa **c**) e 82% para a etapa **d**), e por meio dos resultados obtidos através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C é possível concluir que a rota sintética proposta foi bem executada, sintetizando de forma adequada os seus intermediários e composto final, atingindo o objetivo inicial de sintetizar um composto com possível capacidade de ligação covalente a hemoglobina e doação de NO, além de demonstrarem também que os compostos encontram-se puros, o que é importante para que o composto (**7**) possa prosseguir para análises de atividade *in vitro*, para a testagem de suas atividades desejadas.

Ademais, pode-se inferir que a redução do anel furoxano, embora já tenha sido descrita por alguns autores, trata-se de uma metodologia de difícil realização quando este possui substituintes mais complexos que o grupamento nitro, sendo assim para sintetizar um composto reduzido para comparar sua atividade com o composto (**7**) se faz necessário encontrar outras maneiras de realizar tal reação.

REFERÊNCIAS

- ALRAYYES, S.; BAGHDAN, D.; HADDAD, R. Y.; COMPTON, A. A.; MOHAMA, S.; GOREISHI, R.; KAWAR, N. Sick cell disease; An overview of the disease and its systemic effects. **Disease-a-Month** v. 64, n. 6, p. 283–289, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2017.12.003>.
- ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v. 39, n.1, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.008>.
- TEWARI, S.; BROUSSE, V.; PIEL, F. B.; MENZEL, S.; REES, D. C. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. **Haematologica** v. 100, n. 9, p. 1108–1116, 2015. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.120030>.
- RODRIGUES, D. DE O. W.; FERREIRA, M. C. B.; CAMPOS, E. M. S.; PEREIRA, P. M.; OLIVEIRA, C. M.; TEIXEIRA, M. T. B. **História da triagem neonatal para doença falciforme no Brasil – capítulo de Minas Gerais**. **Rev Med Minas Gerais**, v. 22, n. 1, p. 1-128, 2012.
- YUSUF, H. R.; LLOYD-PURYEAR, M. A.; GRANT, A. M.; PARKER, C. S.; CREARY, M. S.; ATRASH, H. K. Sick cell disease: The need for a public health agenda. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 41, n. 6, Suppl. 4, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2011.09.007>.
- MCGANN, P. T. Sick cell anemia: An underappreciated and unaddressed contributor to global childhood mortality. **Journal of Pediatrics** v. 165, n 1, p. 18–22, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.01.070>.
- PIEL, F. B.; PATIL, A. P.; HOWES, R. E.; NYANGIRI, O. A.; GETHING, P. W.; WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J.; HAY, S. I. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 8, 2010. <https://doi.org/10.1038/ncomms1104>.
- SANTOS, J.L; MAN CHIN, C. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Química Nova** v. 35, n. 4, p. 783-790, 2012.

MANFREDINI, V.; CASTRO, S.; WAGNER, S.; DA, M.; BENFATO, S. A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma**, v. 19, n. 1-2, p. 3-6, 2007.

MACHADO, A.; LOURENÇO, G.; HAMMES, T.; PARISI, M. Anemia falciforme aspectos clínicos e epidemiológicos. 2018. *In*: Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2018. Cruz Alta, RS. Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães, UNICRUZ.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin** v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009. <https://doi.org/10.1080/03630260802625709>.

GLAROS, A. K.; RAZVI, R.; SHAH, N.; ZAIDI, A. U. Voxelotor: alteration of sickle cell disease pathophysiology by a first-in-class polymerization inhibitor. **Therapeutic Advances in Hematology** v. 12, 2021. <https://doi.org/10.1177/20406207211001136>.

PULE, G.D.; MOWLA, S.; NOVITZKY, N.; WIYSONGE, C.S.; WONKAM A. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. **Expert Rev Hematol** v. 8, p. 669–79, 2015.

PAVAN, A. R.; DOS SANTOS, J. L. Advances in Sickle Cell Disease Treatments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2008–2032, 2020. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200610175400>.

HERITY, L. B.; VAUGHAN, D. M. M.; RODRIGUEZ, L. R.; LOWE, D. K. Voxelotor: A Novel Treatment for Sickle Cell Disease. **Annals of Pharmacotherapy** v. 55, n. 2, p. 240–245, 2021. <https://doi.org/10.1177/1060028020943059>.

POWER-HAYS, A.; WARE, R. E. (2020). Effective use of hydroxyurea for sickle cell anemia in low-resource countries. **Current Opinion in Hematology** v. 27, n. 3, p. 172–180, 2020. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000582>.

NAHAVANDI, M.; PERLIN, E.; KASSIM, O.; WYCHE, M.O.; CASTRO, O.; TAVAKKOLI, F. Upregulation of TNF α by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. **Blood**. v. 96, p. 14, 2000.

QUINN, C. T. L-Glutamine for sickle cell anemia: more questions than answers. v. 132, n. 7, p. 689-693, Aug. 16, 2018. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/132/7/689/1466509/blood834440.pdf>.

LEIBOVITCH, J. N.; TAMBE, A. V.; CIMPEANU, E.; POPLAWSKA, M.; JAFRI, F.; DUTTA, D.; LIM, S. H. L-glutamine, crizanlizumab, voxelotor, and cell-based therapy for adult sickle cell disease: Hype or hope? **Blood Reviews** v. 53, 100925, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100925>

RILEY, T. R.; RILEY, T. T. Profile of crizanlizumab and its potential in the prevention of pain crises in sickle cell disease: Evidence to date. **Journal of Blood Medicine** v. 10, p. 307–311, 2019. <https://doi.org/10.2147/JBM.S191423>.

ABDULMALIK, O.; PAGARE, P. P.; HUANG, B.; XU, G. G.; GHATGE, M. S.; XU, X.; CHEN, Q.; ANABARAONYE, N.; MUSAYEV, F. N.; OMAR, A. M.; VENITZ, J.; ZHANG, Y.; SAFO, M. K. VZHE-039, a novel antisickling agent that prevents erythrocyte sickling under both hypoxic and anoxic conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77171-2>.

HUANG, B.; GHATGE, M. S.; DONKOR, A. K.; MUSAYEV, F. N.; DESHPANDE, T. M.; AL-AWADH, M.; ALHASHIMI, R. T.; ZHU, H.; OMAR, A. M.; TELEN, M. J.; ZHANG, Y.; MCMAHON, T. J.; ABDULMALIK, O.; SAFO, M. K. Design, Synthesis, and Investigation of Novel Nitric Oxide (NO)-Releasing Aromatic Aldehydes as Drug Candidates for the Treatment of Sickle Cell Disease. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 6835, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27206835>.

GASCO, A.; BOULTON A. J. Furoxans and Benzofuroxans. **Advances in heterocyclic chemistry**, v. 29, p. 251-340, 1981. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60789-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60789-8).

GASCO, A.; MORTARINI V.; RUA C.; SERAFINO A. Unsymmetrically substituted furoxans. III. Methylnitrofuroxan: Its Structure and Behavior Toward Nucleophilic Substitution. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 587-590, 1973. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570100429>.

FERSHTAT, L. L.; BYSTROV, D. M.; ZHILIN, E. S.; MAKHOVA, N. N. N-Oxide-Controlled Chemoselective Reduction of Nitrofuroxans. **Synthesis** (Germany), v. 51, n. 3, p. 747–756, 2019. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1611056>.

MONCADA, S.; PALMERE, R.; HIGGS, A. A pathway for commentary of nitric oxide from l-arginine the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol**, v. 38, p. 1709–1715, 1989.

MORRIS, C.R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. **Hematol Am Soc Hematol Educ Progr**, v. 5, p. 177–185, 2008. DOI: 10.1182/asheducation-2008.1.177.

GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovasc Res.**, v. 55, p. 250–260, 2002.

COKIC, V.P.; ANDRIC, S.A.; STOJIKOVIC, S.S.; NOGUCHI, C.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, v. 111, p. 1117–1123, 2008.

NIIHARA, Y.; MILLER, S. T.; KANTER, J.; LANZKRON, S.; SMITH, W. R.; HSU, L. L.; GORDEUK, V. R.; VISWANATHAN, K.; SARNAIK, S.; OSUNKWO, I.; GUILLAUME, E.; SADANANDAN, S.; SIEGER, L. 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. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1715971>.

ATAGA, K. I.; KUTLAR, A.; KANTER, J.; LILES, D.; CANCADO, R.; FRIEDRISCH, J.; GUTHRIE, T. H.; KNIGHT-MADDEN, J.; ALVAREZ, O. A.; GORDEUK, V. R.; GUALANDRO, S.; COLELLA, M. P.; SMITH, W. R.; ROLLINS, S. A 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. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1611770>.

KUTLAR, A.; KANTER, J.; LILES, D. K.; ALVAREZ, O. A.; CANÇADO, R. D.; FRIEDRISCH, J. R.; KNIGHT-MADDEN, J. M.; BRUEDERLE, A.; SHI, M.; ZHU, Z.; ATAGA, K. I. Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: A SUSTAIN study analysis. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 1, p. 55–61, 2019. <https://doi.org/10.1002/ajh.25308>.

BLYDEN, G.; BRIDGES, K. R.; BRONTE, L. Case series of patients with severe sickle cell disease treated with voxelotor (GBT440) by compassionate access. **American Journal of Hematology** v. 93, n. 8, p. E188–E190, 2018. <https://doi.org/10.1002/ajh.25139>.

LITTLE, J. A.; HAUSER, K. P.; MARTYR, S. E.; HARRIS, A.; MARIC, I.; MORRIS, C. R.; SUH, J. H.; TAYLOR, J.; CASTRO, O.; MACHADO, R.; KATO, G.; GLADWIN, M. T. Hematologic, biochemical, and cardiopulmonary effects of l-arginine supplementation or phosphodiesterase 5 inhibition in patients with sickle cell disease who are on hydroxyurea therapy. **European Journal of Haematology**, v. 82, n. 4, p. 315–321, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01210.x>.

DOS SANTOS, J. L.; LANARO, C.; CHELUCCI, R. C.; GAMBERO, S.; BOSQUESI, P. L.; REIS, J. S.; LIMA, L. M.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; COSTA, F. F.; CHUNG, M. C. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. Part II: Furoxan derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7583–7592, 2012. <https://doi.org/10.1021/jm300602n>.