

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS
HÍBRIDOS ÚTEIS PARA TRATAMENTO DAS COMPLICAÇÕES DA ANEMIA
FALCIFORME**

THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS
HÍBRIDOS ÚTEIS PARA TRATAMENTO DAS COMPLICAÇÕES DA ANEMIA
FALCIFORME**

THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA – SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M528s

Melo, Thaís Regina Ferreira de

Síntese e avaliação farmacológica de novos compostos híbridos úteis para tratamento das complicações da anemia falciforme / Thaís Regina Ferreira de Melo. — Araraquara, 2014

202 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Anemia falciforme. 2. . Óxido nítrico. 3. Furoxanos. 4. Ftalimidas. I. Santos, Jean Leandro, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*"É impossível avaliar a força que
possuímos sem medir o tamanho do
obstáculo que podemos vencer, nem
o valor de uma ação sem sabermos o
sacrifício que ela comporta."*

H. W. Beecher.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus pais Paulo e Célia, por terem se preocupado desde o início com a minha educação, sempre me dando todo o apoio necessário e por acreditarem no meu potencial, à minha irmã Thalita e ao meu querido Nailton

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e sabedoria e pela graça de ter me permitido concluir este trabalho.

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

Ao meu querido Nailton, que sempre me apoiou e incentivou na realização deste trabalho, por todo amor, carinho, dedicação, ajuda, e paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pelos ensinamentos, amizade, compreensão, apoio e incentivo em todos os momentos da realização desse trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro para manutenção e desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos de laboratório, Daniela Hartmann Jornada, Diego Chiba, Paulo Renato Yamasaki, Rafael Chelucci, Aylime Castanho, Priscila Longhin Bosquesi, Marcella Gabrielle, Luiz Dutra, Luiza Mota, Isabela Junqueira, Carla Ferreira, Arthur Svendsen, Karina Barbieri, Juliana Reis, Mateus Scontri, José Ricardo S. de Oliveira, Leandro Rosseto, Renata Mota, por toda ajuda e por tornarem os dias de trabalho melhores e mais divertidos.

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

As amigas da República Whiskas: Maria, Fernanda, Tatiane, Tainara, pela convivência diária, compreensão e ajuda em todos os momentos da realização deste trabalho.

Agradecimentos

A Carolina Lanaro, Maria Elisa Lopes Pires e Karina Barbieri pela execução dos ensaios farmacológicos.

Ao Prof. Alberto Gasco e Prof^a Roberta Fruttero da Universidade de Turim, por terem me dado a oportunidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório e me proporcionarem uma experiência maravilhosa de crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas do grupo da Universidade de Turim por me ajudarem na execução das etapas sintéticas e principalmente ao Stefano Guglielmo que contribuiu muito com sua experiência.

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

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
2 Revisão bibliográfica.....	4
3 Objetivos.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 Planejamento estrutural.....	39
5 Material e Métodos.....	42
5.1 Material (Reagentes e solventes).....	42
5.2 Equipamentos.....	43
5.3 Animais.....	43
5.4 Metodologia sintética.....	43
5.5 Métodos Analíticos.....	46
5.6 Ensaio Farmacológico.....	46
5.6.1 Detecção quantitativa de nitrito (SORBA et al 1997).....	46
5.6.2 Viabilidade celular e doseamento do fator de necrose tumoral alfa.....	47
5.6.3 Avaliação da atividade antiagregante plaquetária.....	49
6 Resultados e discussão.....	54
6.1 Síntese do composto I e II.....	55
6.1.1 Síntese do derivado furoxânico funcionalizado 4-fenil-1,2,5- oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (3).....	55
6.1.2 Síntese dos intermediários 4-((2-(4- aminobenzil)hidrazona metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol- 2-oxido (6) e 4-((2-(2- aminobenzil) hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-oxido (7).....	59
6.1.3 Síntese dos compostos finais I e II.....	64

Sumário

6.2 Síntese dos compostos III e IV.....	73
6.2.1 Síntese do 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol.....	73
6.2.2 Síntese dos intermediários furoxânicos 12 e 13.....	74
6.2.3 Síntese dos intermediários 14 e 15.....	77
6.2.4 Síntese dos compostos finais III e IV.....	80
6.3 Detecção quantitativa de nitrito (Doação de óxido nítrico).....	85
6.4 Viabilidade celular e doseamento do fator de necrose tumoral alfa.....	87
6.5. Avaliação da atividade antiagregante plaquetária dos compostos (I-IV) utilizando ADP (10mM) como indutor.....	92
6.6. Avaliação da expressão gênica de gama globina dos compostos obtidos em células K562.....	95
7 Conclusões.....	97
8 Perspectivas.....	99
9 Referências Bibliográficas.....	100
ANEXOS.....	118
ANEXO I.....	182

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
ADP	Difosfato de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
DBU	1,8-diazabicycloundec-7-eno
DCM	Diclorometano
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
EDC	Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
HAc	Ácido acético
Hb	Hemoglobina
HU	Hidroxiureia
IV	Espectrofotometria na região do infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NO	Óxido nítrico
Pf	Faixa de fusão
P.M.	Peso molecular
PRP	Plasma rico em plaquetas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

Lista de abreviaturas

THF	Tetrahidrofurano
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da hemoglobina e do grupo heme (protoporfirina IX).	5
Figura 2: Hemácias de indivíduo falciforme visualizadas sob microscópio óptico mostrando (setas) a presença de células com aspecto anômalo e alongado	7
Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme	10
Figura 4: Propriedades do NO nos vasos sanguíneos.	12
Figura 5: Abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme	13
Figura 6: Estrutura química da hidroxiureia.....	14
Figura 7: Estrutura química da decitabina e seu análogo azacitidina.....	16
Figura 8: Estruturas químicas dos derivados do ácido butírico	17
Figura 9: Estrutura química da talidomida e seus derivados: pomalidomida e lenalidomida	19
Figura 10: Estruturas químicas dos inibidores de desidratação de eritrócito	21
Figura 11: Estrutura química do GMI-1070	22
Figura 12: Estrutura química do eptifibatide	23
Figura 13: Estrutura química do prasugrel	23
Figura 14: Estrutura química do propranolol	24
Figura 15: Equilíbrio tautomérico do furoxano.....	26
Figura 16: Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxanos (MEDANA et al., 1994).	27
Figura 17: Mecanismo de doação de NO proposto por Cerecetto et al. (Santos, 2009)	28
Figura 18: Derivados ftalimídicos sintetizados por Santos, 2009	29
Figura 19; Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	30
Figura 20: Estrutura química do sildenafil	30
Figura 21: Estrutura química da deferroxamina	32

Lista de Figuras

Figura 22: Estrutura química do deferasirox.....	33
Figura 23: Estruturas químicas das hidrazonas do isocotinol e derivados do deferiprone.	34
Figura 24: Estruturas químicas dos inibidores de Rho-kinase.....	37
Figura 25: Estrutura química do regadenoson	37
Figura 26: Efeito protetor em C2 devido à presença da subunidade <i>N</i> -óxido.	57
Figura 27: Viabilidade celular em diferentes concentrações dos compostos I-IV. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle negativo (CN), equivalendo a 100% de viabilidade.	88
Figura 28: Concentração de TNF- α produzido por macrófagos em meio contendo os compostos I-IV em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, LPS); * $p<0,05$ (em comparação ao grupo LPS).	89
Figura 29: Porcentagem de inibição de TNF- α pelos compostos I-IV em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo não inibe TNF- α) * $p<0,05$ (em comparação ao grupo talidomida).....	91
Figura 30: Comparação da porcentagem de inibição de TNF-alfa entre os compostos Lapdesf FUR-FTD VI e o composto VI.....	92
Figura 31: Gráfico da porcentagem de agregação do ensaio de inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) citratado de ratos através do método turbidimétrico induzido por ADP.	93
Figura 32: Gráfico da porcentagem de agregação do ensaio de inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) citratado de ratos através do método turbidimétrico induzido por ADP do composto LAPDESF FUR-FD VI.....	94
Figura 33: Avaliação da expressão gênica de gama-globina em cultura de células K562 pelo Composto I expresso em unidades arbitrárias (U.A.), após 24, 48, 72 e 96 horas nas concentrações de 5, 30 e 60 μ M. (controle DMSO).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 6 e produto final I.....	71
Tabela 2: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 7 e produto final II.....	72
Tabela 3: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 14 e produto final III.....	83
Tabela 4: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 15 e produto final IV.	84
Tabela 5: Porcentagem de produção de Nitrito % (mol/mol)	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos (I-IV) contendo a subunidade espaçadora <i>N</i> -acilidrazona.	39
Esquema 2: Esquema geral da síntese dos compostos I e II.	44
Esquema 3: Esquema geral da síntese dos compostos III e IV.	45
Esquema 4: Mecanismo de formação do aldeído 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol- <i>N</i> -óxido (Fruttero 1989).....	56
Esquema 5: Mecanismo de oxidação utilizando PCC (SOLOMONS, 2009)	58
Esquema 6: Mecanismo da reação de formação dos intermediários 6 e 7	59
Esquema 7: Mecanismo de formação dos intermediários 12 e 13.	75
Esquema 8: Obtenção dos compostos I e II a partir do álcool cinâmico (I).....	118
Esquema 9: Obtenção dos compostos III e IV	140

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (75 MHz; DMSO- d_6)	57
Espectro 2: Espectro de RMN ^1H do composto 6, (300 MHz, DMSO d_6).....	61
Espectro 3: Espectro de RMN ^1H do composto 7, utilizando como solvente(300 MHz, DMSO d_6).....	62
Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C do composto 6 (75 MHz; DMSO d_6)	62
Espectro 5: Espectro de RMN ^{13}C do composto 7 (75 MHz; DMSO- d_6).....	63
Espectro 6: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (6) e final (I) (pastilha de KBr)	65
Espectro 7: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (7) e final (II) (pastilha de KBr).	66
Espectro 8: Espectro de RMN ^1H do composto I, (300 MHz,DMSO d_6).....	67
Espectro 9: Espectro de RMN ^1H do composto II, (300 MHz, DMSO d_6).....	67
Espectro 10: Espectro de RMN ^{13}C do composto I, utilizando como solvente (75 MHz DMSO d_6).....	68
Espectro 11: Espectro de RMN ^{13}C do composto II, utilizando como solvente (75 MHz DMSO d_6).....	69
Espectro 12: Espectro de RMN HMBC do composto II (75 MHz DMSO d_6)	70
Espectro 13: Espectro de RMN de ^{13}C de 3,4-bisaryl-sulfonilfuroxano (11) (75 MHz; CDCl $_3$).	74
Espectro 14: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12 (75 MHz; CDCl $_3$).	76
Espectro 15: Espectro de RMN de ^1H do composto 14 (300 MHz; DMSO d_6).	78
Espectro 16: Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (300 MHz; DMSO d_6).	78
Espectro 17: Espectro de RMN ^{13}C do composto 14 (75 MHz DMSO d_6).....	79
Espectro 18: Espectro de RMN ^{13}C do composto 15 (75 MHz DMSO d_6).....	79
Espectro 19: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (14) e final (III) (pastilha de KBr).....	80

Lista de Espectros

Espectro 20: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (15) e final (IV) (pastilha de KBr).	81
Espectro 21: Espectro de RMN de ^1H do composto 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido(3) (400 MHz; acetona- d_6).....	121
Espectro 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido(3) (400 MHz; acetona- d_6)	121
Espectro 24: Espectro na região do infravermelho do composto 6 (pastilha de KBr)	124
Espectro 24: Espectro de RMN de ^1H do composto 6, ampliado na região de 8,0 a 5,5 ppm. (300 MHz, DMSO-d_6)	124
Espectro 28: Espectro de RMN de HSQC do composto 6 (300 MHz; DMSO-d_6).....	125
Espectro 29: Espectro de massas de alta resolução do composto 6.	126
Espectro 30: Espectro na região do infravermelho do composto 7 (pastilha de KBr)	127
Espectro 32: Espectro de RMN de ^1H do composto 7, ampliado na região de 10,0 a 5,5 ppm (300 MHz, DMSO-d_6).....	128
Espectro 34: Espectro de RMN de HSQC do composto 7 (300 MHz; DMSO-d_6)....	129
Espectro 35: Espectro de RMN de HMBC do composto 7 (300 MHz; DMSO-d_6) ...	130
Espectro 36: Espectro de massas de alta resolução do composto 7.	131
Espectro 37: Espectro na região do infravermelho do produto final I (pastilha de KBr).....	134
Espectro 39: Espectro de RMN de ^1H do composto I, ampliado na região de 8,9 a 6,8 ppm(300 MHz, DMSO-d_6).....	134
Espectro 34: Espectro de RMN de HSQC do composto I (300 MHz; DMSO-d_6).....	135
Espectro 42: Espectro de massas de alta resolução do composto I.	136
Espectro 43: Espectro na região do infravermelho do produto final II (pastilha de KBr).....	138
Espectro 45: Espectro de RMN de ^1H do composto II, ampliado na região de 8,9 a 6,4 ppm (300 MHz ; DMSO-d_6).....	138
Espectro 47: Espectro de RMN de HSQC do composto II (75 MHz, DMSO-d_6).....	139

Lista de Espectros

Espectro 49: Espectro de massas de alta resolução do composto II.	140
Espectro 50: Espectro de RMN de ^1H do ácido sulfonilfeniltioacético (10) (400 MHz; acetona- d_6).	143
Espectro 51: Espectro de RMN de ^1H do ácido sulfonilfeniltioacético (10) (; 400 MHz; acetona- d_6) – ampliação região aromática.	143
Espectro 52: Espectro de RMN de ^1H de 3,4-bisartil-sulfonilfuroxano (11) (300 MHz; CDCl_3).	145
Espectro 54: Espectro de massas de 3,4-bisartil-sulfonilfuroxano (11).	146
Espectro 55: Espectro na região do infravermelho do composto 12.	148
Espectro 56: Espectro de RMN de ^1H do composto 12 (300 MHz; CDCl_3).	149
Espectro 57: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 12 (300 MHz; CDCl_3).	150
Espectro 59: Espectro de massas de alta resolução do composto 12	151
Espectro 60: Espectro na região do infravermelho do composto 13.	153
Espectro 61: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 13 (300 MHz; CDCl_3).	154
Espectro 62: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13 (75 MHz; CDCl_3).	155
Espectro 63: Espectro de massas do composto 13	156
Espectro 65: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 14 (300 MHz; $\text{DMSO}-\text{d}_6$).	159
Espectro 53: Espectro de RMN de HSQC do composto 14 (300 MHz; $\text{DMSO}-\text{d}_6$)...	160
Espectro 55: Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (300 MHz; $\text{DMSO}-\text{d}_6$).	163
Espectro 72: Espectro de RMN HSQC do composto 15 (300 MHz; $\text{DMSO}-\text{d}_6$).	164
Espectro 73: Espectro de RMN de HMBC do composto 15 (300 MHz; $\text{DMSO}-\text{d}_6$). .	165
Espectro 74: Espectro de massas de alta resolução do composto 15	166
Espectro 75: Espectro de RMN de ^1H do composto final III (300 MHz; $\text{DMSO}-\text{d}_6$). .	169
Espectro 76: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto III (300 MHz; $\text{DMSO}-\text{d}_6$).	169

Lista de Espectros

Espectro 77: Espectro de RMN de ^{13}C do composto III (75 MHz, DMSO-d_6).....	170
Espectro 78: Espectro de RMN de HSQC do composto III (300 MHz; DMSO-d_6)....	171
Espectro 79: Espectro de RMN de HMBC do composto III (300 MHz; DMSO-d_6). ..	172
Espectro 80: Espectro de massas de alta resolução do composto final III.....	173
Espectro 81: Espectro de RMN de ^1H do composto final IV (300 MHz; DMSO-d_6). .	175
Espectro 82: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto final IV (300 MHz; DMSO-d_6).	175
Espectro 83: Espectro de RMN ^{13}C do composto IV (75 MHz DMSO-d_6).....	176
Espectro 84: Espectro de RMN de HSQC do composto IV (300 MHz; DMSO-d_6)...	177
Espectro 85: Espectro de RMN de HMBC do composto IV (300 MHz; DMSO-d_6)... ..	178
Espectro 86: Espectro de massas de alta resolução do composto final IV.	179

Resumo

A Anemia Falciforme (A.F.) é uma doença hematológica genética na qual ocorre mutação no gene da β -hemoglobina. Essa mutação promove polimerização das moléculas de hemoglobina, promovendo alterações (afoiçamento) da estrutura física dos eritrócitos e aumento da adesão das células sanguíneas no vaso contribuindo para o aumento do processo vaso-oclusivo, principal característica da doença. A doença promove um processo inflamatório crônico e há aumento de diversas citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do $\text{TNF-}\alpha$, sendo este, portanto um importante alvo para intervenção terapêutica. A hidroxiuréia (HU) é o único fármaco disponível para o tratamento e seus efeitos benéficos estão associados à capacidade de biotransformação da mesma em óxido nítrico. Entretanto, a mielotoxicidade e demais efeitos deletérios da HU, torna importante a introdução de novos fármacos que agregue os efeitos benéficos da mesma sem sua potencial toxicidade. O NO desempenha efeitos benéficos tais como: vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e produção de hemoglobina fetal (HbF), esta última tem função de diminuir a polimerização da hemoglobina. Nesse contexto, em continuidade com uma linha de pesquisa que visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos protótipos candidatos a fármacos para tratamento das complicações da anemia falciforme, foi sintetizada uma nova série de quatro compostos híbridos inéditos (I-IV) contendo a subunidade ftalimídica (inibidora de $\text{TNF-}\alpha$) e o núcleo furoxânico (doador de NO) espaçados pela subunidade N-acilidrazona. Todos os compostos apresentaram-se como doadores de NO. Os compostos I a IV mostraram-se inibidores de $\text{TNF-}\alpha$, sendo o composto IV o mais promissor, inibindo em torno de 65% em concentrações menores que os demais. No ensaio de agregação plaquetária induzida por ADP, os compostos III e IV foram capazes de inibir significativamente a agregação plaquetária. Ademais, a subunidade N-acilidrazona contribuiu para a atividade inibidora de $\text{TNF-}\alpha$ e de agregação. Além disso, o composto I após 72h foi capaz de aumentar a expressão gênica de gama globina aproximadamente duas vezes mais que o controle, na concentração de 5 μM . Assim, estes compostos são promissores candidatos a fármacos para o tratamento das complicações da anemia falciforme.

Abstract

Sickle Cell Anemia is a genetic blood disease in which there is a mutation in the β -hemoglobin gene. This mutation promotes polymerization of hemoglobin molecules that change the structure of the erythrocyte cytoskeleton promoting sickling of the cell. Moreover, there is increased adhesion of blood cells in the vessel contributing to the increasement of the vaso-occlusive process, the main characteristic of the disease. It is further known that the chronic inflammation associated with the disease contributes to a number of complications and among the process responsible for this proinflammatory cytokine is TNF- α , which is an important target for therapeutic intervention. Hydroxyurea (HU) is the only available drug for treatment and its beneficial effects are associated with the same capacity biotransformation of nitric oxide. The NO plays beneficial effects such as vasodilation, inhibition of platelet aggregation and production of fetal hemoglobin (Hb F), latter has the function of decreasing polymerization of hemoglobin. In this context, continuing the research line that aims at planning , synthesis and pharmacological evaluation of new prototypes drug candidates for the treatment of sickle cell anemia complications, in this work have synthesized a series of four new hybrid compounds (I- IV) containing the phthalimide (TNF- α inhibitory subunit) and furoxan subunits (nitric oxide donors) according to structural design. The compounds were presented as NO donors. Compounds I-IV were shown to be inhibitors of TNF- α in the immunoassay of this cytokine assay and the compound IV is the most promising inhibiting between 65% in smaller concentrations than the other. In the assay of ADP-induced platelet aggregation, compounds III and IV were able to inhibit platelet aggregation sigificantly. In addition, the compound I after 72 hours was able to increase the gene expression of gamma globin approximately two times the control, at a concentration of 5 μ M. Thus, these compounds are promising drug candidates for sickle cell anemia complications treatment

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é a hemoglobinopatia hereditária crônica mais prevalente no mundo. Sua origem é predominantemente africana e tem sido relacionada como uma forma de proteção seletiva contra as formas mais letais de malária, devido a sua grande presença nas áreas endêmicas desta doença (WEATHERALL et al., 2008).

Estima-se que a anemia falciforme ocorra em 1 a cada 500 nascimentos afroamericanos e em 1 a cada 4000 nascimentos hispanoamericanos (BONDS, 2005). No Brasil calcula-se que nasçam, por ano, em torno de 3.500 crianças com doença falciforme e 200.000 portadores de traço falciforme (SIMÕES et al., 2010).

A anemia falciforme é caracterizada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina, na qual ocorre uma troca de uma timina por uma adenina (GTG para GAG), resultando na substituição de um ácido glutâmico por valina no gene β -globina dando origem a hemoglobina anômala (β^S -globina) (SAFO et al., 2004).

A desoxigenação da hemoglobina mutada (HbS) favorece interações hidrofóbicas entre as subunidades β do tetrâmero das moléculas de hemoglobina, induzindo a formação de polímeros que pode levar ao afoçamento das hemácias (BUNN, 1997).

A polimerização da HbS representa o evento primário na doença, pois causa alterações na estrutura e flexibilidade dos eritrócitos, promove desidratação celular, estresse físico e oxidativo, o que pode levar a hemólise das hemácias.

Quando há rompimento da hemácia, o grupo heme é liberado na circulação, e o átomo de ferro central deste núcleo, é capaz de sequestrar moléculas de óxido nítrico produzidas pelo endotélio vascular durante o processo homeostático, o que gera nos pacientes falciformes um “caráter vasocontritor” (REITER et al., 2002). Além disso, a deficiência de NO gerada aliada a outros fatores fisiológicos

envolvidos na fisiopatologia da doença produzem o aumento na agregação plaquetária, gerando um quadro de hipercoagulabilidade (ROTHER, 2005).

A vaso-oclusão é decorrente da obstrução, principalmente da microcirculação, causada pelas células falciformes e pela maior adesão das células sanguíneas ao endotélio vascular. Esse quadro pode levar a isquemia e infarto de diversos tecidos por uma perfusão tissular inadequada e ainda contribui para as crises dolorosas, disfunção dos órgãos, e em alguns casos, morte (STEINBERG, 2006; CROIZAT, 1994; DUTTS et al., 1996; WUN et al., 1997).

Foi relatado que pacientes com anemia falciforme apresentam aumento significativo dos níveis circulantes de algumas citocinas inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MALAVÉ et al., 1993). Além dos efeitos pró-inflamatórios que o TNF- α exerce, aumentando as propriedades quimiotáticas e exacerbando a inflamação, ele também é reponsável por: aumentar a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, estimular a produção de radicais livres e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 β e PGE₂. Ademais, o TNF- α também altera as propriedades coagulantes e anticoagulantes (LANARO et al., 2009; INGLIS et al., 2005)

Deste modo, o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α em pacientes portadores de anemia falciforme contribui com as crises vaso-oclusivas, e pode levar ao aparecimento de episódios infecciosos e inflamatórios (BUCHANAN et al., 2004; MALAVÉ et al., 1993; FRANCIS et al., 1992). Assim, compostos que inibam essa citocina poderiam auxiliar na diminuição dos sintomas clínicos da doença.

A talidomida é um fármaco hipnótico e sedativo e foi reconhecida como inibidora da síntese de TNF- α . Diversos análogos estruturais têm sido sintetizados e avaliados, buscando otimizar essa atividade (CHAULET et al., 2011). A subunidade ftalimídica foi destacada como essencial (farmacofórica) para atividade de inibição de TNF- α em estudos de relação estrutura-atividade (LIMA, FRAGA & BARREIRO, 2001). Foi verificado também, que era a inibição desta citocina a responsável por efeitos analgésicos periféricos observados com o uso da talidomida (RIBEIRO, 2000).

Até o momento, não existe um tratamento específico para anemia falciforme. Os fármacos disponíveis auxiliam no tratamento dos sintomas, visando melhorar a qualidade de vida do paciente. Dentre estes fármacos está a hidroxiureia (HU), a qual tem capacidade de melhorar o fluxo pelos vasos sanguíneos, diminuir a concentração de HbS, aumentar os níveis de HbF e atuar como fonte exógena de óxido nítrico (NO) (STEINBERG, 2006; SPACE et al., 2000).

A HU é um agente antineoplásico que interrompe o ciclo celular nas fases S e G1. Estudos têm demonstrado que o tratamento com HU promove aumento dos níveis circulantes de algumas citocinas pró-inflamatórias podendo descompensar de certa forma os efeitos benéficos gerados pelo fármaco. Ademais, um terço dos pacientes tratados não respondem a terapia. Sabe-se, entretanto, que a HU após metabolização, que ocorre principalmente no fígado, é biotransformada em óxido nítrico (NO) sendo este um dos responsáveis pelos efeitos benéficos do fármaco (KING, 2003).

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

O aumento da HbF, tem sido um alvo muito explorado em pacientes portadores da doença, pois os altos níveis da mesma estão relacionados com a diminuição da polimerização da HbS, o que contribui com a redução da severidade da doença (STEINBERG, 2006).

Os doadores de óxido nítrico podem ser uma alternativa no tratamento dos sintomas da anemia falciforme. Alguns exemplos destes compostos são: os nitritos e nitratos orgânicos, furoxanos, complexos NO-metálicos, N-nitrosaminas, S-nitrosotióis e N-hidroxiguanidinas (BARRETO, CORREA & MUSCARA, 2005).

Os derivados furoxânicos (1,2,5-oxadiazol-2-óxido), em razão das suas propriedades doadoras de óxido nítrico, tem sido muito explorados na Química Farmacêutica e Medicinal para obtenção de uma série de compostos híbridos com

diferentes atividades farmacológicas, como por exemplo, atividade antiagregante plaquetária (CERECETTO & PORCAL, 2005; CENA et al., 2004; CALVINO et al., 1992).

Assim, neste trabalho as estruturas foram planejadas visando à ação sinérgica de modulação da síntese de TNF- α e aumento dos níveis de NO. A diminuição dos níveis de TNF- α leva a redução da resposta inflamatória e imune celular, da hiperalgesia e a um maior equilíbrio das propriedades coagulantes. Aliado a isso, as propriedades vasodilatadoras, o estímulo da produção de gama globina, aumentando HbF pela ação do NO representam uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da doença falciforme.

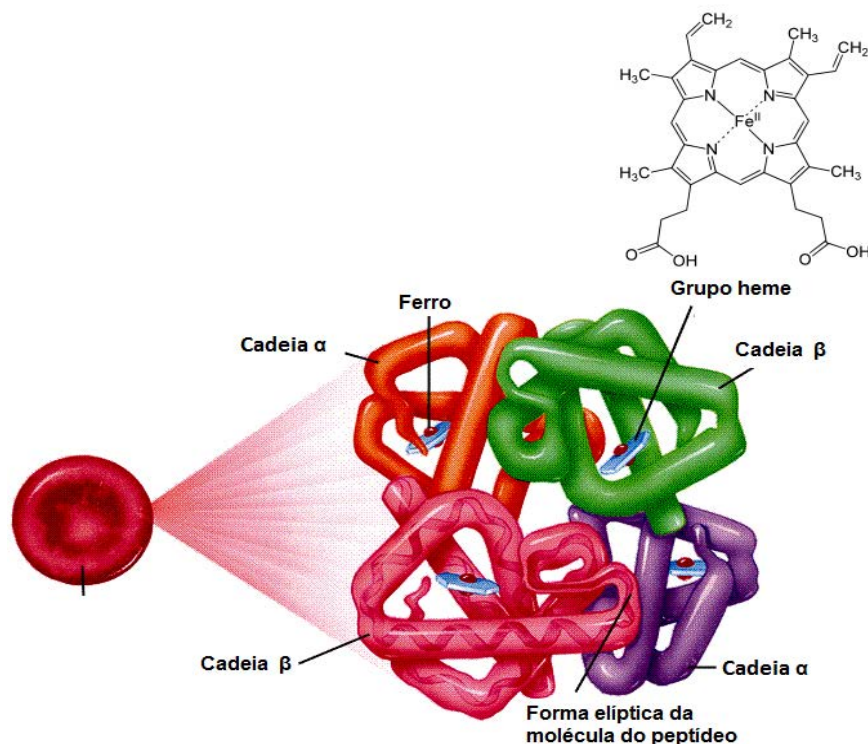
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ANEMIA FALCIFORME

Aspectos gerais

A hemoglobina (Hb) é uma heme-proteína presente nos eritrócitos cuja principal função é o transporte de oxigênio e gás carbônico (PERUTZ et al., 1990). Sua molécula é um tetrâmero polipeptídico, constituído por cadeias globínicas sendo duas subunidades α e outras duas não alfa, cada uma contendo uma subunidade heme (Figura 1), que consiste em um anel porfírinico (protoporfirina IX) formando um complexo central com o átomo de ferro (Fe^{2+}), onde ocorre a ligação do oxigênio (DICKERSON, 1983).

Figura 1: Estrutura da hemoglobina e do grupo heme (protoporfirina IX).



Fonte: Adaptado de: [HTTP://gassama.myweb.uga.edu/](http://gassama.myweb.uga.edu/), acessado em 03/05/2014

Diferentes cadeias globínicas são sintetizadas entre o período embrionário e adulto. Durante o período embrionário são expressas as hemoglobinas Gower1, Gower2 e Portland, deixando de serem expressas na fase fetal em que prevalece a produção da hemoglobina fetal (HbF), constituída por duas das cadeias alfa e gama ($\alpha_2\gamma_2$) e seus níveis decaem após seis meses do nascimento (FORGET, 1998).

A síntese de cadeias delta se inicia por volta do sexto mês de gestação dando origem a hemoglobina (HbA₂) constituída de duas cadeias alfa e duas delta ($\alpha_2\delta_2$) que representa de 2,5%- 3% das hemoglobinas em indivíduos saudáveis. A hemoglobina A (HbA), contém duas cadeias alfa e beta ($\alpha_2\beta_2$) e é predominante nos eritrócitos de adultos saudáveis representando aproximadamente 97% das moléculas totais de hemoglobina (HUEHNS et al., 2008).

Existem centenas de variantes do gene da β -globina, um exemplo é a hemoglobina S (HbS), presente na anemia falciforme. Essa hemoglobina é

constituída por duas cadeias α e duas β ($\alpha_2\beta_2^S$), como a HbA, e resulta de uma substituição de aminoácidos (ácido glutâmico por valina) no gene da cadeia β -globínica. Essa mutação altera propriedades físico-químicas da hemoglobina desencadeando os fenômenos fisiopatológicos da doença (BUNN & FORGET, 1986).

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

Os portadores do traço têm uma expectativa de vida semelhante ao da população em geral, não sendo observado aumento de mortalidade associada especificamente a essa condição (ROCHA, 2004; STARK, JANERICH & JEREB, 1980). Entretanto, alguns estudos relatam uma correlação entre a presença do traço e algumas complicações que ocorrem em condições de hipóxia, desidratação e acidose, como a insuficiência renal, necrose tissular, tromboembolia venosa e rabdomiólise (MURAO & FERRAZ, 2007; AUSTIN et al., 2007; MAKARYUS, CATANZARO & KATONA, 2007).

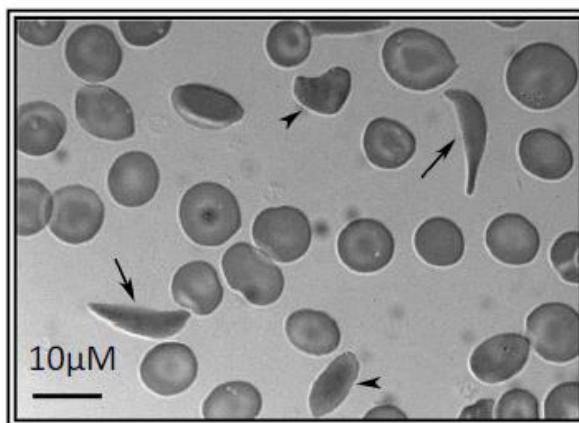
Histórico

As células alongadas e em forma de foice (Figura 2), características da anemia falciforme, foram observadas pela primeira vez em um esfregaço sanguíneo em 1910 pelo médico James Herrick. Hahn and Gillespie, posteriormente, sugeriram que em baixas concentrações de oxigênio ocorria a falcização das hemácias. Anos depois, Watson e colaboradores correlacionaram a diminuição dos níveis de HbF e o aparecimento dos sintomas da doença falciforme em crianças (WATSON et al., 1948; HANH & GILLESPIE 1927). Em 1949, Linus Pauling e colaboradores caracterizaram molecularmente a doença utilizando eletroforese para demonstrar

que havia uma diferença de migração entre a HbS (falciforme) e a HbA (normal) (HERRICK et al., 1910).

Posteriormente, Ingram (1956) demonstrou por meio de estudos de eletroforese que a anemia falciforme era ocasionada pela substituição do ácido glutâmico por uma valina no gene da β -globina da hemoglobina (INGRAM, 1956).

Figura 2: Hemácias de indivíduo falciforme visualizadas sob microscópio óptico mostrando (setas) a presença de células com aspecto anômalo e alongado



Fonte: FRENETTE & ATWEH, 2007

Origem e epidemiologia

Acredita-se que a doença teve origem há milhares de anos atrás, nos países subsaarianos e do centro-oeste da África, no Leste asiático e em algumas regiões da Índia (WEATHERALL, 2008). A distribuição da doença está correlacionada com as regiões endêmicas de malária, devido à hipótese explorada por muitos estudos de proteção à infecção pelo plasmódio (TAYLOR et al., 2012; MIN-O & GROS, 2005).

Diversos mecanismos bioquímicos e imunológicos têm sido estudados para explicar a relação entre a proteção da HbS contra a malária. Sabe-se que as hemácias falciformes infectadas sofrem fagocitose mais rapidamente, reduzindo assim a parasitemia (PIEL et al., 2010). É sabido ainda que nas células falciformes a invasão é diminuída e o crescimento do parasita é dificultado devido as condições

bioquímicas desfavoráveis como a baixa tensão de oxigênio e de potássio intracelular (AYI et al., 2004; PASVOL et al., 1978). Embora existam muitos estudos sobre estes complexos mecanismos envolvidos na proteção contra a malária, ainda não é totalmente clara a relevância dos mesmos *in vivo* (GONG et al., 2013).

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

A AF foi durante muito tempo restrita a África, ao Oriente Médio e partes da Índia, mas atualmente também é comum nas Américas, Caribe e Europa, principalmente por conta da migração e miscigenação racial. Nos Estados Unidos a anemia falciforme afeta aproximadamente um em cada 500 recém-nascidos afro-americanos por ano, e entre 90.000 e 100.000 indivíduos no total (BONDS, 2005).

Com base nos dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, estima-se a existência de 2 milhões de portadores do gene da Hb S no Brasil e que 25 a 50 mil pessoas tenham a forma homozigótica (Hb SS). Calcula-se que nasçam, por ano, em torno de 3.500 crianças com a doença falciforme e 200.000 portadores de traço falciforme (SIMÕES et al., 2010).

Fisiopatologia

O gene falciforme é resultado de uma mutação pontual no gene da β -globina, gerada pela troca de uma timina por adenina (GTG para GAG) substituindo o sexto aminoácido que codifica uma valina ao invés de um ácido glutâmico (BUNN, 1997).

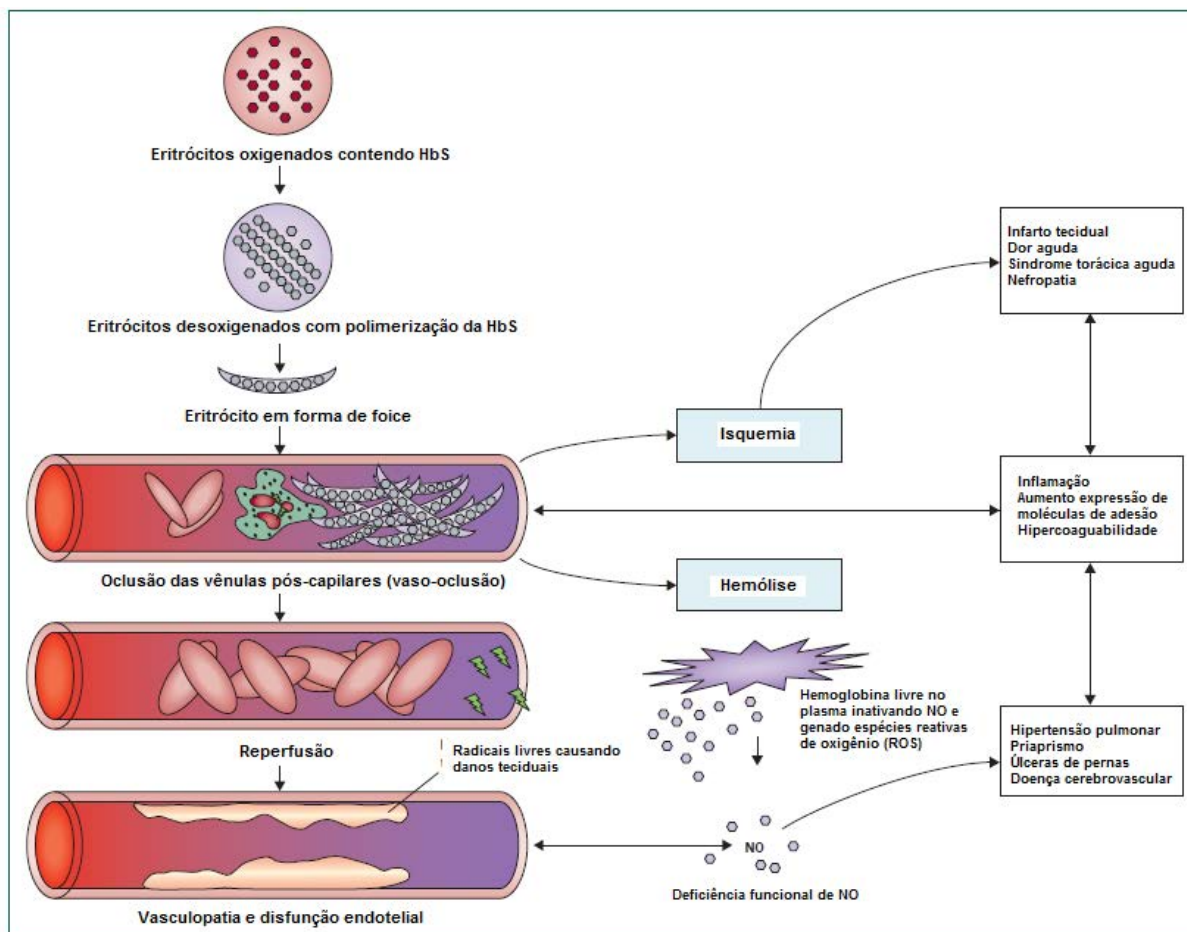
Essa substituição causa modificações na estrutura tridimensional da hemoglobina. A carga neutra da valina permite interações hidrofóbicas entre as moléculas de hemoglobina, desencadeando a agregação em grandes polímeros, quando em estado desoxigenado (DYKES et al., 1979).

A polimerização da HbS representa o evento primário na patogênese molecular da anemia falciforme e é dependente de alguns fatores como: concentração de HbS e oxigênio, presença de hemoglobinas normais, pH,

temperatura, força iônica, e pressão. (DE FRANCESCHI & CORROCHE, 2004; STUART & NAGEL, 2004). A polimerização gera alterações na estrutura e flexibilidade dos eritrócitos, promove desidratação celular, estresse físico e oxidativo, o que pode levar a hemólise das hemácias (REES et al., 2010; BRITTENHAM et al., 1985).

O processo vaso-oclusivo é a maior causa de morbidade em pacientes com anemia falciforme, pois gera o quadro de isquemia, podendo resultar em infarto tecidual e é o principal responsável pelos sintomas clínicos da doença como as crises algicas, síndrome torácica aguda e nefropatia. O ciclo de isquemia seguido por reperfusão gera lesão tecidual, causa estresse oxidativo e inflamatório, aumentando a expressão de moléculas de adesão e consequentemente a produção de citocinas inflamatórias, agravando ainda mais a vaso-oclusão (Figura 3) (WOOD et al., 2005; BELCHER et al., 2005).

Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme



Fonte: Adaptado de REES et al., 2010

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

Estudos têm demonstrado essa interação envolver um complexo de integrinas $\alpha 4 \beta 1$, expressas nas superfícies dos eritrócitos, as quais podem se ligar a fibronectina e à VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina expressas na superfície das células endoteliais (ZENNADI et al., 2008). Além disso, vários ligantes participam indiretamente do processo, como trombospondina, fator de von Willebrand, imunoglobulina e fibrinogênio (KAUL et al., 2009).

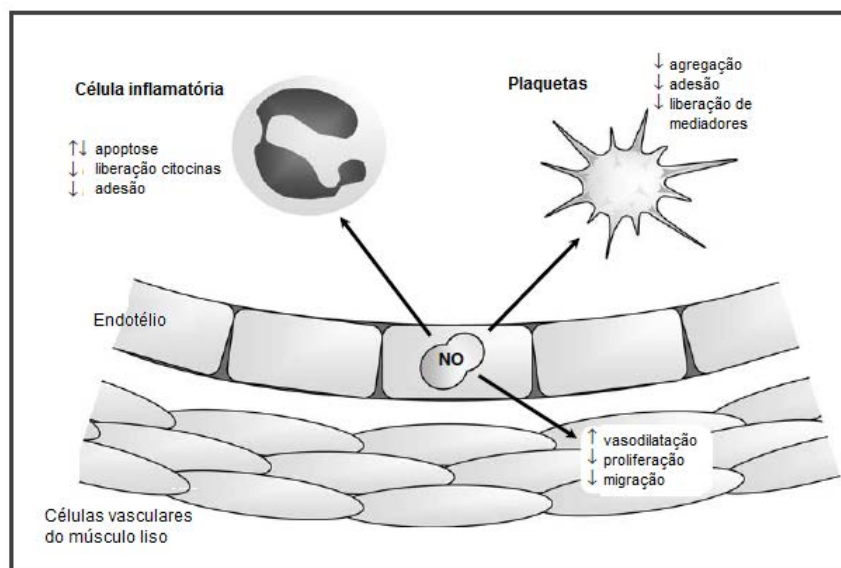
A anemia hemolítica é outro processo fisiopatológico importante na AF e também é impulsionada pela polimerização da HbS. Durante a hemólise dos eritrócitos, há liberação da hemoglobina, arginase e difosfato de adenosina (ADP) para o plasma. A hemoglobina livre pode sequestrar o óxido nítrico endotelial diminuindo os níveis basais dessa molécula. Além disso, a arginase liberada pode metabolizar a arginina plasmática transformando-a em ornitina e uréia. Assim, com a diminuição da concentração da arginina que atuaria como substrato para síntese de NO, há diminuição dos níveis fisiológicos do mesmo. (REITER et al., 2002)

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

O aumento de ADP no plasma induz ativação e agregação de plaquetas e pode contribuir para a patogênese da oclusão vascular (JAGROOP et al., 2003; GLODSMITH et al., 1995).

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

Figura 4: Propriedades do NO nos vasos sanguíneos.



Fonte: adaptado de MILLER & MEGSON, 2007

A inflamação é um fator central na gravidade da vasculopatia da anemia falciforme. A ativação de leucócitos, juntamente com as células endoteliais danificadas e a maior adesão das células sanguíneas ao endotélio vascular, aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- α , IL-1 β , IL-8 que contribuem para o caráter inflamatório crônico da doença, propagando os episódios de dor e as crises vaso-oclusivas (OKPALA, 2004; PERELEMANN et al., 2003).

Uma vez que a polimerização da HbS é o processo inicial da vaso-oclusão, a mesma tem sido um alvo terapêutico importante e muito explorado. Atualmente, a estratégia utilizada de promover o aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF), têm tido um enorme impacto na redução do número e gravidade de episódios vaso-oclusivos e ainda na diminuição da mortalidade de pacientes com A.F. (MANWANI, 2013; MA et al., 2007).

Tratamento

A complexidade da anemia falciforme é uma barreira para as descobertas científicas de terapias que sejam eficazes e seletivas. Este fator associado ao desinteresse da indústria farmacêutica pela pesquisa de novos fármacos para doenças negligenciadas é um dos grandes obstáculos para a descoberta de tratamentos mais efetivos (GEE et al., 2013; O'CONNELL, 2007).

Como não há tratamento específico, as intervenções clínicas se baseiam em medidas gerais e preventivas, visando à melhora da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes, sendo o tratamento na maioria das situações, apenas sintomático.

Assim, serão discutidas a seguir as abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme (Figura 5) e serão abordadas as principais estratégias na busca de novas abordagens terapêuticas no contexto atual da anemia falciforme.

Figura 5: Abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme



Fonte: própria

Abordagens terapêuticas

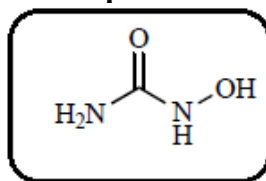
Indutores de síntese de HbF

A indução de HbF tem se mostrado um alvo promissor em diversos estudos experimentais e clínicos envolvendo pacientes portadores da anemia falciforme (PACE & ZEIN, 2006 ; STEINBERG & RODGERS, 2001). Os níveis elevados de HbF em pacientes com anemia falciforme tem sido reconhecido como um fator prognóstico de gravidade clínica, uma vez que os níveis de HbF $\geq 20\%$ estão associados com a redução de eventos clínicos e a baixa concentração de HbF é reconhecida como um preditor de mortalidade precoce. Estes fatos podem ser relacionados à diminuição da polimerização da HbS gerada pelo aumento da HbF e a menor adesividade da mesma, prevenindo o processo vaso-oclusivo (AKINSHEYE et al., 2011; PLATT et al., 1994)

- Hidroxiureia

A HU (Figura 6) é um agente quimioterapêutico, antimetabólito, inibidor seletivo da síntese de ribonucleotídeo difosfato redutase, enzima necessária na conversão de ribonucleotídeos difosfatados em deoxiribonucleotídeos difosfatados. A HU impede que as células saiam da fase G1/S do ciclo celular, sendo usada principalmente em neoplasias do sistema hematopoiético (HANFT et al., 2000). Atualmente, é o único fármaco aprovado pelo FDA (Food Drug Administration) para uso em pacientes com anemia falciforme.

Figura 6: Estrutura química da hidroxiureia



Além da diminuição da vaso-oclusão, do número de episódios de síndrome torácica aguda e da necessidade de transfusão sanguínea, estudos demonstraram que a HU tem a capacidade de aumentar a concentração de hemoglobina fetal, bem

como diminuir o número de crises dolorosas em pacientes sob tratamento (CHARACHE et al., 1995; KINNEY et al., 1999). Em um estudo que acompanhou durante nove anos pacientes tratados com o fármaco, foi observada diminuição de 40% no número de mortes de pacientes tratados com o fármaco (FERSTER et al. , 2001).

Alguns dados sugerem que o mecanismo pelo qual a HU aumenta os níveis de HbF é devido a biotransformação da mesma em NO e a ativação da guanilato ciclase solúvel em células eritróides. (COKIC et al , 2008; COKIC et al , 2003). A ativação de sGC aumenta a expressão de gama globina em células eritroleucêmicas e eritroblastos humanos primários. (CONRAN et al., 2004).

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

Embora a hidroxiureia tenha muitos efeitos benéficos, um dos principais efeitos colaterais é a mielotoxicidade. Outros efeitos deletérios são a hiperpigmentação cutânea, lesões ulcerativas em membros inferiores, aumento dos níveis de citocinas inflamatórias. (NAHAVANDI et al., 2002).

Ainda que existam efeitos deletérios relatados, as evidências documentadas da eficácia do uso da hidroxiurica na redução da morbidade e mortalidade dos pacientes justificam seu uso clínico devido à falta de outras opções terapêuticas mais seguras e eficazes. Entretanto cerca de um terço dos pacientes tratados não respondem a hidroxiureia ou necessitam de aumento da dose para tratamento crônico eficaz, aumentando o risco de toxicidade (RAGHUPATHY & BILLET, 2009)

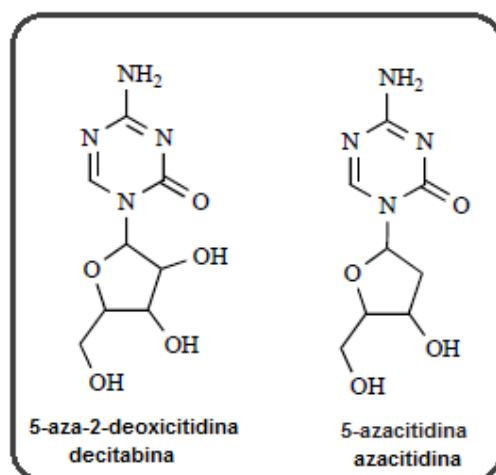
Nesse contexto, torna-se muito importante a introdução de um novo fármaco que agregue os efeitos benéficos da HU sem sua potencial toxicidade.

- Decitabina e azacitidina

A decitabina (5-aza-2-deoxicitidina) (Figura 7) é um potente indutor de HbF via hipometilação do gene promotor da gama globina, inibindo a enzima metiltransferase (DE SIMONE et al., 1983). Estudos realizados com um pequeno grupo de pacientes demonstraram que a decitabina promoveu um aumento na produção de HbF, mesmo em pacientes que não respondiam bem a hidroxiuréia. (SAUNTHARARAJAH et al., 2003). Em modelos animais a decitabina não induziu carcinogênese e curiosamente mostrou-se preventiva ao câncer (LANTRY et al., 1999). Seu análogo a azacitidina (5-azacitidina) (Figura 7), também se mostrou como bom indutor de HbF, porém causou neutropenia, trombocitopenia e leucopenia em humanos, além de uma potencial carcinogênico em animais e devido a isso seus estudos foram descontinuados para o uso na anemia falciforme (SANTOS & CHIN, 2011; CARR et al., 1984).

Deste modo, a decitabina representa uma alternativa na terapia da anemia falciforme, porém estudos mais amplos são necessários para confirmar sua eficácia e segurança em pacientes com a doença (HOPPE, 2011).

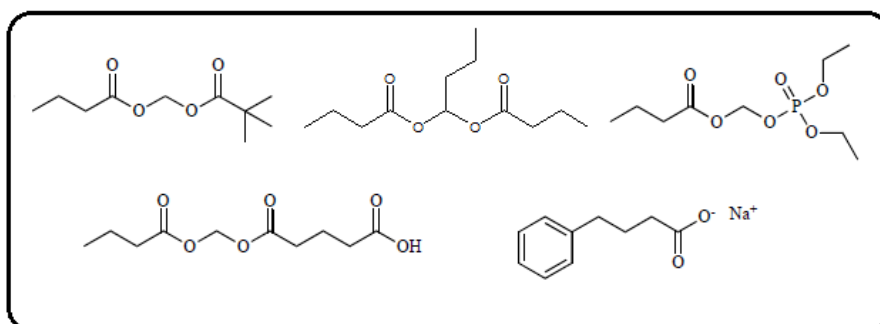
Figura 7: Estrutura química da decitabina e seu análogo azacitidina.



- Derivados do ácido butírico

Os butiratos (Figura 8) são ácidos graxos de cadeia curta inibidores da histona deacetilase, o que resulta na indução do gene da gama globina e aumento da produção de HbF. Acredita-se que o mecanismo envolvido nesta indução seja a sinalização via MAPK p38, a qual regula a expressão gênica de gama globina (MCCAFFREY et al., 1997). Os butiratos têm demonstrado um aumento sustentado da concentração de HbF nos pacientes tratados. Porém, sua meia-vida curta exige um volume administrado muito grande e sua administração é somente por via parenteral, devido a baixa absorção oral, limitando sua efetividade clínica. Neste contexto, novos derivados do ácido butírico, com melhor biodisponibilidade e maior meia-vida estão, atualmente, sob investigações em modelos animais (KUTLAR et al., 2012; PACE, et al., 2002).

Figura 8: Estruras químicas dos derivados do ácido butírico



- Eritropoetina

A eritropoetina humana recombinante é outro composto com capacidade de promover o aumento dos níveis da HbF, conforme demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro*. O uso da mesma combinada com hidroxíureia revelou aumento da concentração de HbF com poucos efeitos colaterais, principalmente em pacientes pouco responsivos a HU, mostrando que esta combinação permite um melhor perfil de tolerância nesse tipo de paciente (LITTLE et al., 2006).

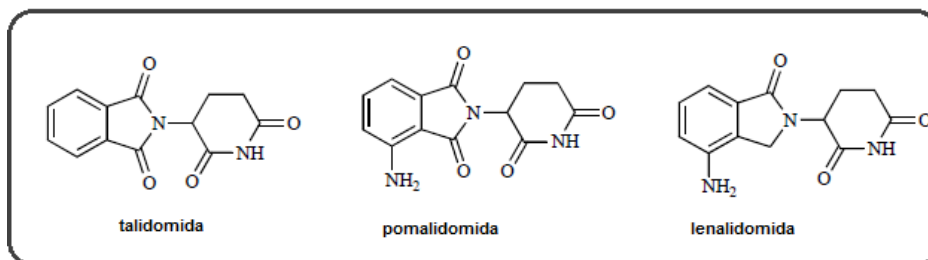
- Talidomida e derivados

A talidomida foi originalmente usada como agente hipnótico/sedativo e antiemético, mas foi retirado do mercado na década de 60 devido aos seus efeitos teratogênicos (MCBRIDE, 1961). Atualmente, a talidomida é usada no tratamento de doenças autoimunes e hematológicas, como o mieloma múltiplo, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (ERIKSSON et al., 2011).

Além do fator de necrose tumoral (TNF- α) tem sido descrito que a talidomida inibe o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e prostaglandina E2 (PGE2) e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estudos demonstraram que o fármaco induz a expressão de mRNA de gama globina de maneira dose dependente. Segundo os autores, o mecanismo desta indução estaria associado à via de sinalização de p38 MAPK e acetilação de histona H4.(AERBAJINAI et al., 2007).Essa proposta foi baseada em relatos anteriores de que o aumento da produção de ROS atuaria como sinalizador para mediar a fosforilação da tirosinas kinases como a p38 MAPK regulando a expressão gênica de gama globina (HSIAO et al., 2006).

A lenalidomida e a pomalidomida (Figura 9) são imunomoduladores análogos da talidomida também descritos como inibidores de TNF- α (LIST et al, 2006). Moutouh-de Parseval e colaboradores (2008) demonstraram que a pomalidomida e a lenalidomida são indutoras da síntese de HbF e moduladoras da diferenciação de eritrócitos em ensaio utilizando células tronco de medula óssea tanto dos pacientes controle quanto dos portadores da doença falciforme. O efeito observado foi ainda maior quando esses fármacos foram combinados com a hidroxiureia, sendo a combinação com pomalidomida mais efetiva que a combinação com lenalidomida (MOUTOUH-DE PARSEVAL et al, 2008). Estudos *in vivo* com animais portadores da doença tratados com a pomalidomida demonstraram aumento na expressão da HbF comparável com a HU, porém não apresentou os efeitos mielossupressivos da mesma, uma vez que foi capaz de aumentar a eritropoiese, preservando a função medular (MEILER et al., 2008).

Figura 9: Estrutura química da talidomida e seus derivados: pomalidomida e lenalidomida



Inibidores da desidratação de eritrócitos

A polimerização da HbS é dependente da concentração intracelular de hemoglobina S, a qual é diretamente dependente do estado de hidratação celular. Dessa forma, a prevenção da desidratação celular tem sido explorada como potencial estratégia terapêutica através da inibição da via de co-transporte potássio-cloreto, na qual a saída do potássio ocasiona saída de íons cloreto e água gerando um desequilíbrio osmótico na célula levando à desidratação e polimerização das moléculas de HbS (FLATMAN et al., 2004). Outra via que pode ser inibida é via cálcio ativada, conhecida como de canal de Gardos, canal de transporte de íons potássio ativado pelo cálcio intracelular, o qual se encontra aumentado nos eritrócitos falciformes, gerando maior perda de potássio e água (LEW et al., 2005).

▪ Magnésio

O magnésio (Mg^{2+}) é um importante regulador do transporte celular de cátions, pois o aumento a concentração da Mg^{2+} intracelular inibe o efluxo de potássio do eritrócito e conseqüentemente previne a desidratação (BRUGNARA & TOSTESON, 1987).

Estudos preliminares em animais transgênicos portadores de anemia falciforme mostraram que a suplementação de magnésio pode reduzir significativamente o co-transporte de KCl, e portanto diminuir volume corpuscular médio, células densas e o número de reticulócitos (DE FRANCESCHI et al., 1996). A administração de magnésio para pacientes adultos com anemia falciforme tem apresentado mínima toxicidade e, possivelmente, menor frequência de vaso-oclusão (DE FRANCESCHI et al., 2000).

O pidolato de magnésio combinado com a HU foi utilizado em ensaio de fase clínica I, com duração de seis meses em crianças e demonstrou diminuição no co-transporte de KCl, porém sem mudanças dos parâmetros hematológicos. Foi observado que a toxicidade do pidolato de magnésio é principalmente em nível gastrointestinal (diarréia e dores abdominais). Estudos de fase clínica II ainda estão sendo realizados para investigar a prevenção da desidratação dos eritrócitos e a redução da frequência de eventos dolorosos em adultos e crianças administrando-se o pidolato de magnésio concomitante com a HU e sozinho, a fim de fornecer maiores informações para posteriores ensaios clínicos de fase III (HANKINS & AYGUN, 2009).

- Clotrimazol

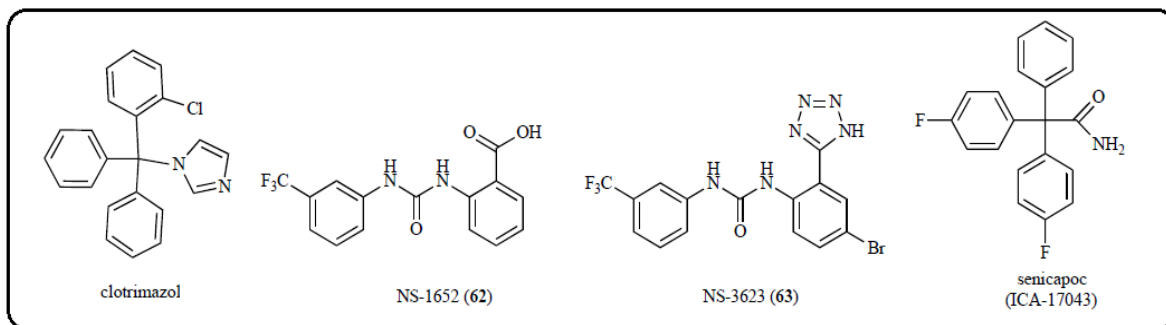
O antifúngico clotrimazol (Figura 10) se mostrou como bloqueador do canal de Gardos, porém, seus efeitos colaterais impem a sua utilização clínica a longo prazo (DE FRANCHESCI et al., 1994). Entretanto, este serviu como protótipo para modificações moleculares e foram descobertos alguns compostos como NS3623 e o NS1652, ativos na inibição de canais de Gardos, impedindo a hemólise e a formação de células falcizadas *in vivo*, usando camundongos transgênicos (MCNAUGHTON-SMITH et al., 2008; BENNEKOU et al., 2001).

- ICA- 17043 (Senicapoc)

Em estudos pré-clínicos com o composto ICA-17043 (Figura 10), o mesmo foi capaz de diminuir a atividade do canal de Gardos, resultando em um aumento da concentração de Hb, diminuição das células densas e da hemólise, entretanto, não houve redução da frequência de episódios de vaso-oclusão (STOCKER et al., 2003; ATAGA et al., 2008).

Deste modo, os benefícios clínicos deste composto ainda necessitam de maiores investigações sendo necessários alguns ensaios para comprovar a eficácia clínica do ICA-17043.

Figura 10: Estruturas químicas dos inibidores de desidrataçãode eritrócito



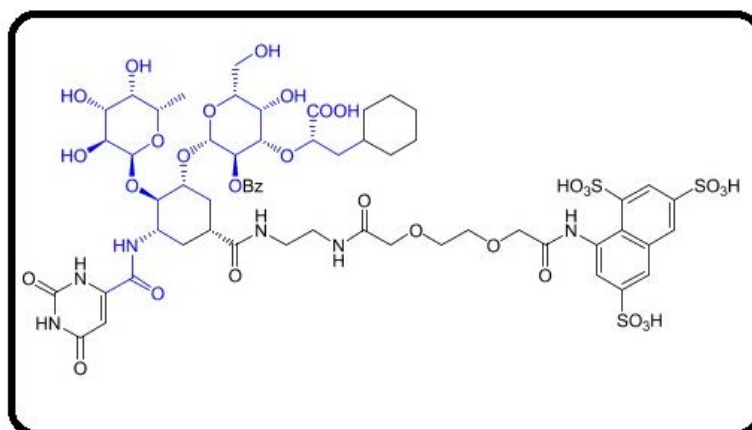
Inibidores da adesão celular

O aumento da adesão das células falciformes no endotélio vascular envolve a expressão de vários fatores de adesão que incluem a integrina $\alpha 4\beta 1$, CD36, molécula intracelular de adesão-4 (ICAM-4), as quais podem se ligar ao endotélio através da E-selectina, P-selectina, integrinas e VCAM-1, diretamente ou ainda por meio de moléculas como a trombospondina e o Fator de vonWillebrand (VWF) (EMBURY et al., 2004; MATSUI et al., 2001).

▪ GMI-1070

O GMI-1070 (Figura 11) é uma molécula glicomimética sintética inibidora da pan-selectina, que tem como alvos E, P e L-selectinas e tem se mostrado como restaurador do fluxo sanguíneo na vaso-oclusão, aumentando a sobrevivência nos animais tratados. Além disso, em ensaios *in vitro* se apresentou como potente inibidor de adesão de neutrófilos pela inibição de E-selectina e ICAM-1. Assim, ensaios clínicos ainda estão sendo realizados para determinar a eficácia do tratamento na vaso-oclusão aguda (CHANG et al., 2010; WUN et al., 2010).

Figura 11: Estrutura química do GMI-1070



- Heparina

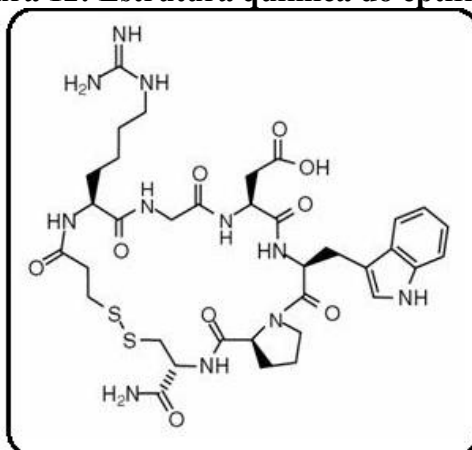
A heparina, um polissacarídeo, tem sido estudada devido ao seu potencial de interferir na adesão das células falciformes ao endotélio através da P-selectina. De fato, estudos clínicos utilizando heparina de baixo peso molecular relataram redução da duração e gravidade dos episódios agudos de vaso-oclusão. (KUTLAR et al., 2012; MATSUI et al., 2002).

- Eptifibatide

Ensaio clínico de fase I com eptifibatide (Figura 12), o qual é um peptídeo sintético cíclico antagonista da glicoproteína IIb/IIIa (ou integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), demonstraram além da diminuição da ativação plaquetária, redução dos marcadores inflamatórios e o aumento da vasodilatação em pacientes com anemia falciforme (LEE et al., 2007).

Estudos de fase clínica II foram iniciados a fim de avaliar os riscos de sangramento e o potencial benefício clínico na diminuição da vaso-oclusão com uso do eptifibatide (VICHINSKY, 2012).

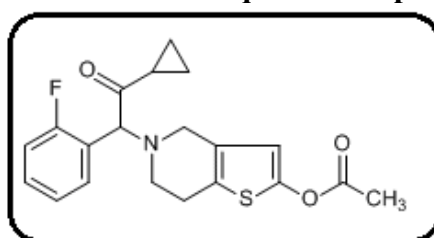
Figura 12: Estrutura química do eptifibatide



- Prasugrel

O prasugrel (Figura 13) é um fármaco da classe das tienopiridinas, usado no tratamento da aterotrombose. É responsável pela inibição do receptor ADP, prevenindo a ativação inicial e a consequente agregação plaquetária. O prasugrel está em estudo de fase II para uso na doença falciforme, a fim de monitorar a taxa e gravidade de eventos hemorrágicos bem como os seus efeitos na vaso-oclusão aguda (JAKUBOWSKI et al., 2011).

Figura 13: Estrutura química do prasugrel

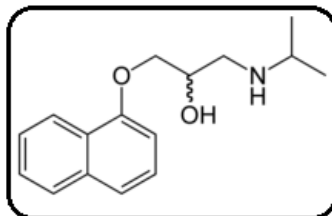


- Propranolol

O propranolol (Figura 14) é um bloqueador beta adrenérgico utilizado principalmente para o tratamento da hipertensão. Estudos *in vitro* em animais falcizados mostraram que a adesão dos eritrócitos ao endotélio e vaso-oclusão induzida por epinefrina foram prevenidas pelo uso do propranolol. A partir destes dados, os ensaios de fase II estão sendo executados para determinar o efeito

inibitório do propranolol em marcadores solúveis de adesão endotelial na doença (ZENNADI et al, 2007).

Figura 14: Estrutura química do propranolol



Vasodilatadores

A promoção da vasodilatação é um efeito desejável durante o tratamento, sendo útil para prevenir os processos de vaso-oclusão. O NO é um vasodilatador sintetizado pelas células endoteliais a partir da L-arginina. É responsável por manter o tônus vascular e encontra-se diminuído na anemia falciforme. (REITER et al., 2002). Além da diminuição da vasodilatação, existe um aumento da inflamação, adesão e de moléculas pró-coagulantes (KATO et al., 2006).

Assim, a terapia visando o aumento da biodisponibilidade de NO pode proporcionar um efeito benéfico aos pacientes, uma vez que, segundo estudos 50% dos pacientes possuem disfunção endotelial gerada pela deficiência de NO (MACK & KATO, 2006).

Doadores de óxido nítrico

O NO é um gás solúvel com meia-vida curta, utilizado para tratar recém-nascidos com hipertensão pulmonar. O primeiro uso clínico na doença falciforme foi relatado por Atz e Wessel no tratamento da síndrome torácica aguda. A inalação do NO diminui a pressão e resistência vascular pulmonar e melhora a oxigenação (ATZ & WESSEL, 2007). Dentre as desvantagens do NO inalado está o seu alto custo e a necessidade de profissionais com treinamento para a administração. Neste contexto, é necessário o desenvolvimento de doadores de NO, menos custosos e com perfil farmacocinético adequado.

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

Outras classes de doadores de NO disponíveis são: nitritos, complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas, *N*-nitrosotióis, *N*-hidroxiguanidinas, derivados de ácido hidroxâmico. Alguns desses doadores como complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas e *N*-nitrosotióis apresentam algumas desvantagens como instabilidade química, física e meias-vidas muito curtas. A menos que essa instabilidade seja resolvida, essas desvantagens os desqualificam como potenciais fármacos doadores de NO (BARRETO, CORREIA & MUSCARÁ, 2005).

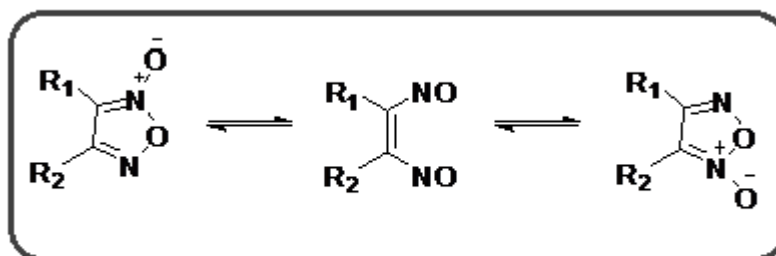
- Furoxanos como doadores de óxido nítrico

O furoxano e seus derivados (*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) representam uma importante classe de compostos heterocíclicos com diferentes propriedades químicas e atividades biológicas. São compostos estáveis em meio ácido e frente a eletrófilos, além de apresentarem estabilidade térmica, porém são pouco estáveis frente a nucleófilos e bases. (WANG, 2002) Comparando-os com os outros doadores de NO, os derivados furoxânicos podem exibir um perfil farmacológico muito desejável: liberação lenta e sem o desenvolvimento de mecanismo de tolerância dos nitratos (SCHONAEFINGER et al., 1999). Esses compostos podem ser obtidos por diversas rotas sintéticas como oxidação de dioximas, termólise de *o*-nitroazidas; dimerização de *N*-óxidos de nitrilas, oxidação de *o*-amino nitroderivados, reação de alcenos com N_2O_3 (CURINI et al., 2000; SCHONAEFINGER et al., 1999; HWANG et al., 1998; BOHN et al., 1995; GODOVIKOVA et al., 1993; GASCO et al., 1991).

Alguns estudos descrevem que o anel furoxânico substituído pode sofrer tautomerismo (Figura 15). Esta isomerização envolve furoxanos com diferentes

substituintes e depende da natureza dos substituintes, bem como dos solventes e temperatura (CERECETTO & PORCAL, 2005; GASCO, 1981).

Figura 15: Equilíbrio tautomérico do furoxano

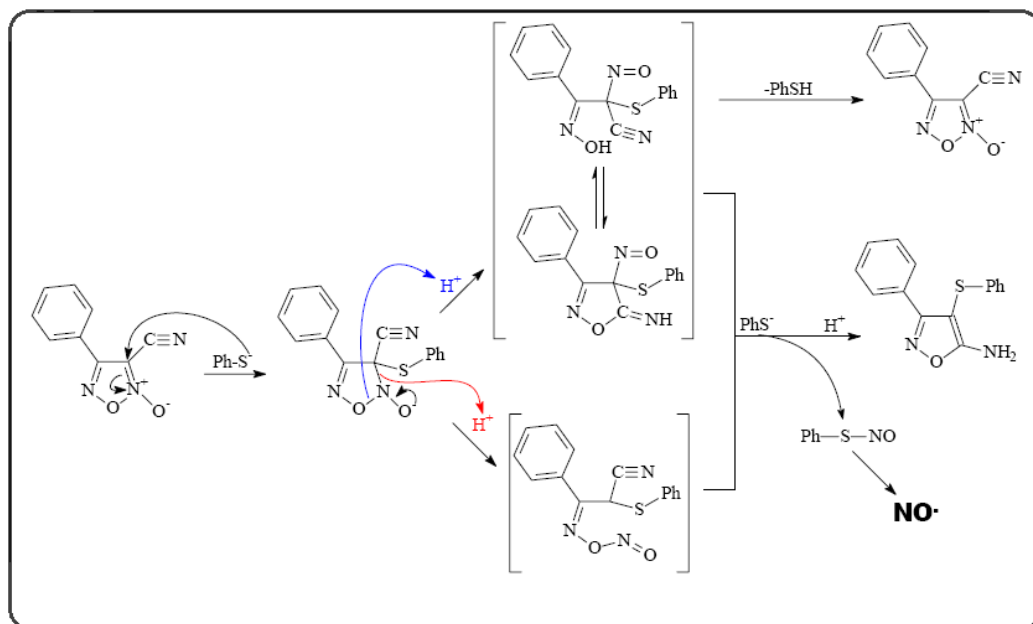


As diversas atividades farmacológicas estão relacionadas em parte à capacidade de doação de óxido nítrico pela subunidade furoxânica. Dentre elas podemos citar: antichagásica (CERECETTO et al., 1999), antiagregante plaquetária (CENA et al 2004), propriedades vasodilatadoras (DEL GROSSO et al., 2005; FRUTTERO et al., 1995), antineoplásica, (CERECETTO, 2005), neuroprotetora (SCHIEFER et al., 2012), entre outras.

Ainda que a capacidade de doação de NO dos derivados furoxânicos esteja bem fundamentada na literatura, os mecanismos para essa doação ainda não foram totalmente elucidados (GASCO et al., 2004). Feelish e colaboradores relataram inicialmente, que alguns derivados furoxânicos como a *N,N'*-diisopropilfuroxancarboxamida e seus análogos *N,N'*-dimetil, eram capazes de liberar NO na presença de tióis (FEELISCH, SCHONAEFINGER & NOAK, 1992).

Estudos posteriores com o 4-fenil-3-furoxancarbonitrilo propuseram o mecanismo para doação de NO representado na Figura 16 (MEDANA et al., 1994).

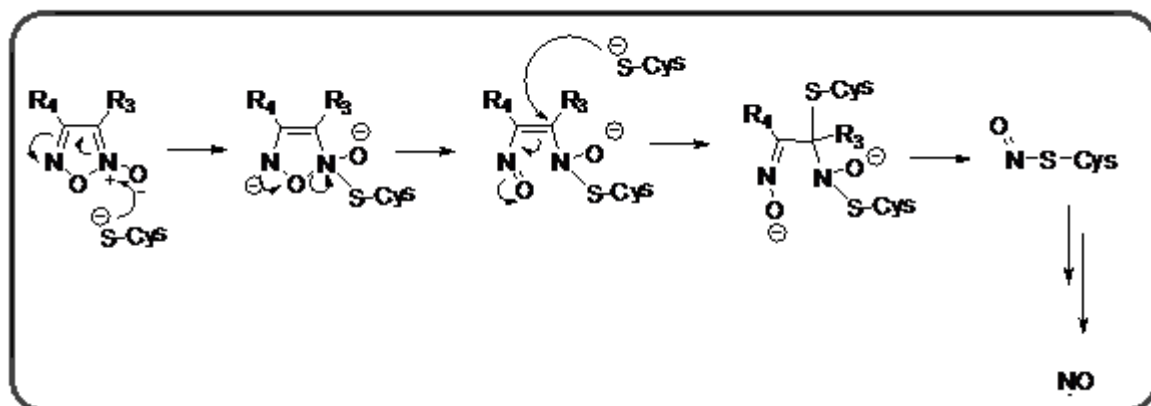
Figura 16: Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxanos (MEDANA et al., 1994).



O ataque do tiolato pode ocorrer no carbono das posições 3 ou 4. No caso do 4-fenil-3-furoxancarbonitrilo ocorreu preferencialmente na posição 3. É proposto que isto aconteça devido a deficiência de elétrons do carbono na posição 3, gerada pelo efeito elétron-retirador do grupamento ciano. De fato, observa-se que a maior doação de NO está relacionada à presença de grupos elétron-retiradores ligados a este carbono quando se relaciona a capacidade de doação de NO com o substituinte do carbono ligado ao *N*-óxido (SORBA et al., 1997). Curiosamente alguns furoxanos também podem produzir NO na ausência de tióis (HECKER, M. et al., 1995).

Estudos recentes conduzidos por Cerecetto e colaboradores sugerem outro mecanismo de doação de NO cisteína dependente. (Figura 17). Este mecanismo propõe que o ataque do tiolato ocorre no nitrogênio do *N*-óxido.

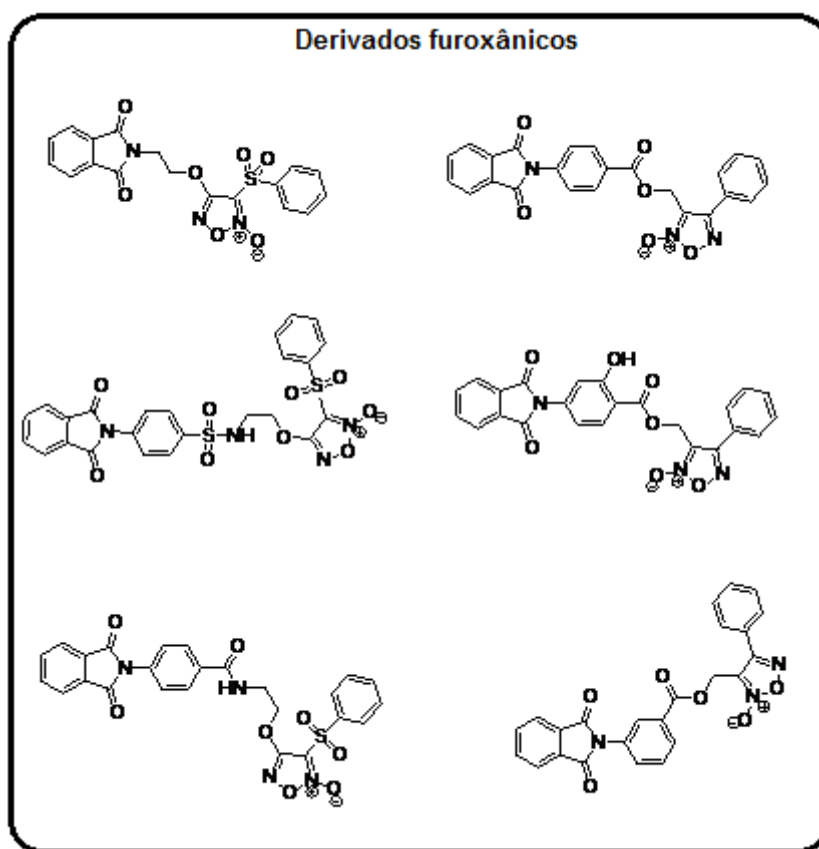
Figura 17: Mecanismo de doação de NO proposto por Cerecetto et al. (Santos, 2009)



Atualmente a hibridação molecular dos furoxanos com diversas moléculas tem sido uma abordagem muito utilizada na Química Farmacêutica e Medicinal. A obtenção dos híbridos é realizada ligando-se uma molécula do doador de NO com outra subunidade com atividade farmacológica de interesse, diretamente ou através de um espaçador que contribua ou não interfira nas atividades farmacológicas desejadas. Deste modo é possível se obter na mesma estrutura química dois efeitos farmacológicos, atingindo diferentes alvos com uma só molécula, melhorando a tolerância, otimizando a farmacocinética de liberação de ambas as substâncias, o que pode beneficiar o tratamento de certas doenças multifatoriais como a anemia falciforme. (SCATENA, 2010).

Neste contexto, Santos e colaboradores sintetizaram novos compostos híbridos contendo a subunidade estrutural da talidomida (Figura 18) e diferentes núcleos furoxânicos a fim de se obter compostos úteis para o tratamento da anemia falciforme, combinando o efeito anti-inflamatório da subunidade ftalimídica e a modulação da doação de NO oriunda dos derivados furoxânicos. Todos os compostos apresentaram atividade anti-inflamatória e analgésica maior que a indometacina e dipirona, as quais foram usadas como controle. A doação de NO foi variável entre os compostos (9-28%), sendo que estes demonstraram habilidade em induzir a expressão de gama-globina *in vitro* (SANTOS, 2009).

Figura 18: Derivados ftalimídicos sintetizados por Santos, 2009



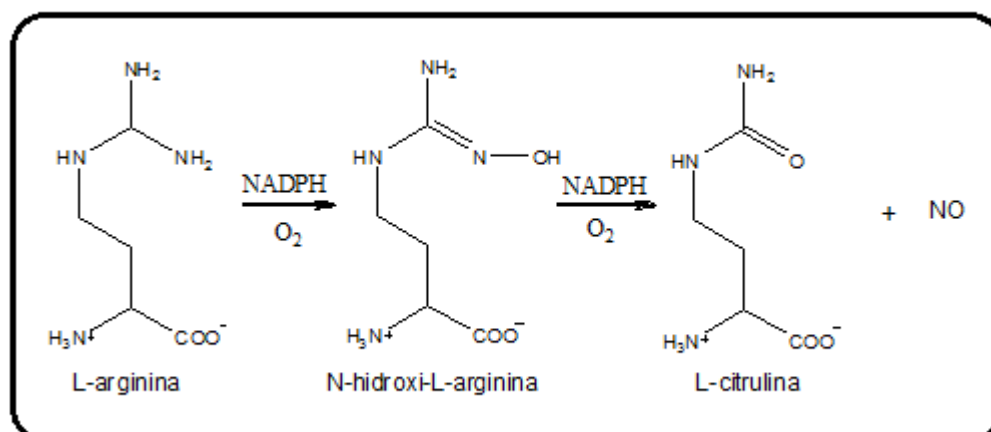
Diversos:

- Arginina

A arginina é um aminoácido cuja biotransformação resulta na formação de L-citrulina e NO (Figura 19). É sabido que os pacientes falciformes apresentam deficiência deste aminoácido e foi verificado que suplementação deste aumenta os níveis de NO principalmente em pacientes que apresentavam eventos vasculares (MORRIS et al., 2000). Ademais, outro estudo mostrou que a administração oral de arginina reduziu a pressão arterial pulmonar em pacientes com hipertensão pulmonar (MORRIS et al., 2003)

A administração da arginina é uma alternativa a inalação de NO por ser mais fácil e segura e tem sido uma prática adotada na clínica médica para alguns pacientes.

Figura 19; Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.

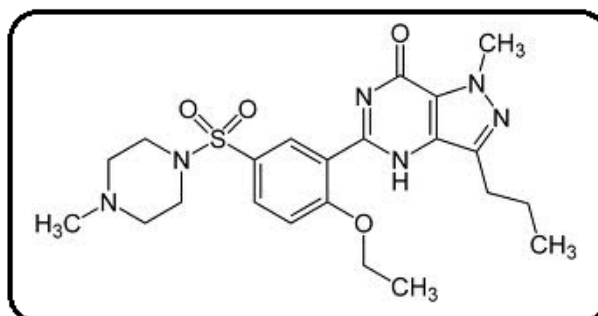


- Sildenafil

O sildenafil (Figura 20) é um fármaco utilizado no tratamento da disfunção erétil e hipertensão pulmonar. É um inibidor da fosfodiesterase-5, enzima responsável por degradar cGMP, amplificando o efeito do NO endógeno. (ATZ & WESSEL, 1999) Além disso, o fármaco diminui a ativação da glicoproteína IIb/IIIa plaqueta-dependente em pacientes com a doença falciforme e hipertensão pulmonar. (VILLAGRA et al., 2007)

Tem sido descrito que o sildenafil tem a capacidade aumentar a sinalização de cGMPC e poderia ser útil para tratamento de pacientes falciformes com hipertensão pulmonar. (BIALECKI & BRIDGES, 2002; BURNETT et al., 2006)

Figura 20: Estrutura química do sildenafil



- Estatinas

As estatinas tem se mostrado efetivas na prevenção de danos nos vasos sanguíneos por meio de diversos mecanismos, incluindo o aumento do NO endotelial. Esses fármacos são capazes de diminuir a inflamação vascular e restaurar o relaxamento endotelial em caso de doenças coronárias e acidente vascular cerebral. Uma vez que o metabolismo de NO se encontra alterado na doença falciforme, as estatinas podem ter um efeito benéfico no tratamento da doença.

Alguns estudos mostraram que a lovastatina também diminuiu a expressão do receptor do fator de ativação plaquetária no epitélio e endotélio. Em um estudo com animais transgênicos, a expressão do fator tecidual em células endoteliais foi inibida pelo fármaco (SOLOVEY et al., 2004).

Assim estes dados sugerem que as estatinas podem ser úteis no tratamento da doença falciforme e novos estudos clínicos estão investigando seu potencial uso.

Agentes quelantes

A terapia de quelação de ferro tem sido utilizada a fim de controlar a sobrecarga de ferro em pacientes que recebem repetidas transfusões sanguíneas, como é o caso dos pacientes com a doença falciforme, a fim de diminuir as complicações da doença (WANKO & TELEN, 2005). O acúmulo de ferro pode ocorrer no fígado, coração e órgãos endócrinos, e aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio causando dano tecidual e muitas vezes morte (RAGHYPATHY et al., 2010).

O ferro é essencial no transporte de oxigênio e metabolismo energético celular e se encontra ligado, na maioria das vezes, às proteínas ou enzimas, pois na forma livre atua como catalisador de reações oxidativas e consequentemente síntese de radicais superóxidos e radical hidroxila, sendo extremamente reativo e danoso. A conversão do superóxido em H_2O_2 pela superóxido dismutase causa peroxidação de lípidos da membrana de diversas organelas citoplasmáticas, levando ao dano celular. Deste modo, a intervenção terapêutica para redução do

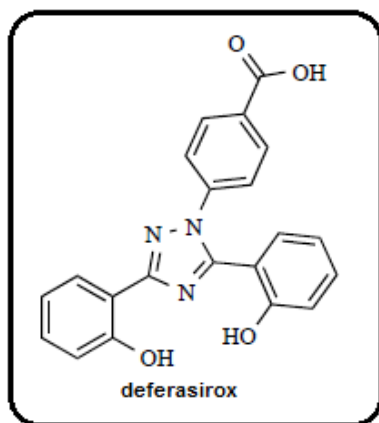
ferro livre torna-se necessária visto que o organismo humano não possui um mecanismo efetivo de eliminação do mesmo (CAPPELLINI & PIGA, 2008).

- Deferroxamina (Desferal[®])

que a coordenação com o metal ocorra são necessárias duas moléculas do fármaco para fixar um átomo de ferro (Figura 22) (PORTER, 2010).

Seu efeito quelante perdura por 24 horas produzindo redução progressiva da concentração de ferro livre plasmático. Os efeitos adversos mais observados são distúrbios gastrintestinais, erupção cutânea, elevação da creatina sérica e transaminases. Esta forma de tratamento mais conveniente e menos invasiva aumenta a adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, seu grande problema é o alto custo. (SECHAUD et al., 2008)

Figura 22: Estrutura química do deferasirox.



- Deferiprone

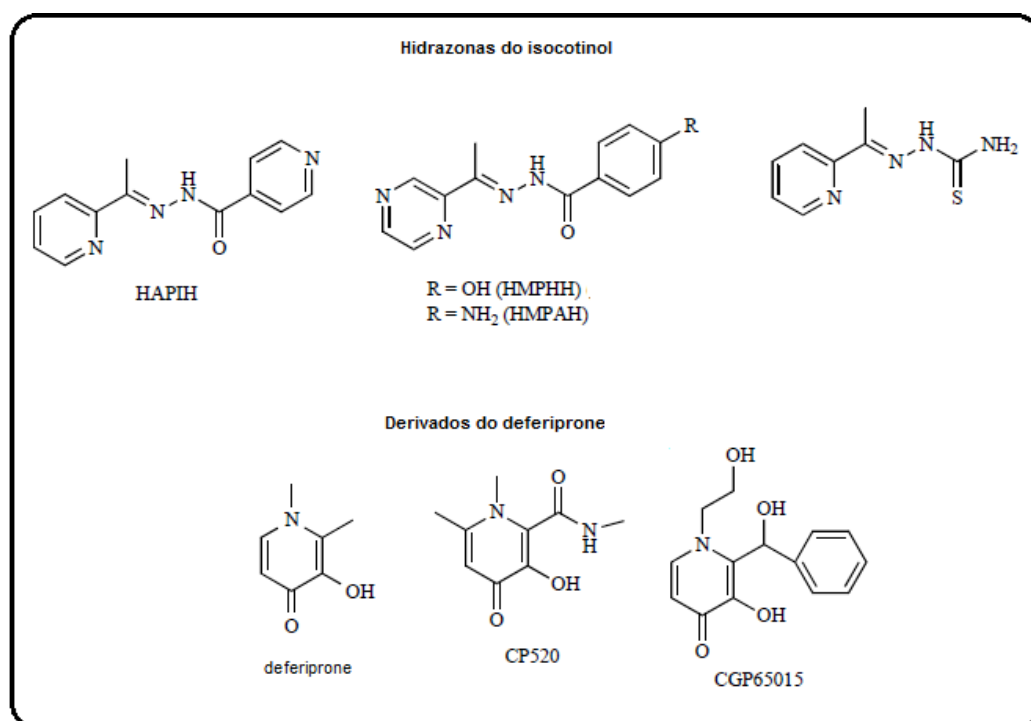
O deferiprone foi desenvolvido para ser um agente quelante de ferro sendo necessário três moléculas para cada átomo de ferro. Este fármaco não é tão efetivo quanto a deferroxamina sendo utilizado em pacientes intolerantes à mesma. Sua meia-vida curta e a sua inativação feita por glucorinação no metabolismo de fase II, inibe a ligação do ferro com o grupo 3-hidroxil diminuindo sua eficácia (Figura14) (KONTOGHIORGHES et al., 1990) A eficácia poderia ser melhorada pela introdução de grupos volumosos na posição 2 da piridina, a fim de diminuir a conjugação com glucoronídeo ou sulfato (KONTOGHIORGHES et al., 2005)

Algumas das características para obtenção de quelantes ideais são: atividade oral com biodisponibilidade adequada; a remoção seletiva de ferro do fígado, tecido do coração, tecido endócrino e do ferro não ligado à transferrina; baixa toxicidade

em órgão como a medula óssea, fígado e rins; perfil farmacocinético adequado com acesso limitado ao sistema nervoso central e placenta. (HIDER & ZHOU, 2005)

Várias estratégias para a descoberta de novos agentes quelantes tem sido descritas na literatura. Alguns candidatos a fármaco desenvolvidos incluem: tiosemicarbazonas (RICHARDSON et al., 2009) hidrazonas de isonicotinol (KALINOWSKI et al., 2008) e os derivados do deferiprone (CP520 e CGP65015) (HIDER & ZHOU, 2000) e de hidroxipiridinonas (Figura 23) (TURCOT et al., 2000).

Figura 23: Estruturas químicas das hidrazonas do isocotinol e derivados do deferiprone.



Modificadores de hemoglobina

É sabido que o afoiçamento dos eritrócitos se inicia com a polimerização da hemoglobina devido às interações hidrofóbicas entre as suas cadeias quando há desoxigenação (HARRINGTON et al., 1997). A inibição deste processo poderia manter a integridade dos eritrócitos aumentando seu tempo de vida.

Os modificadores de hemoglobina classificam-se em covalentes e não-covalentes. Embora os não-covalentes tenham apresentado atividade interessante,

o seu uso ainda é um pouco limitado. Já os covalentes tem sido os mais relatados na literatura (WATERMAN et al., 2013).

A modificação da hemoglobina causada pelos modificadores covalentes diminui o afoçamento dos eritrócitos por dois possíveis mecanismos: aumento da solubilidade de HbS e/ou aumento da afinidade pelo oxigênio (UENO & BAI, 1989).

- Isotiocianatos e aldeídos

Os isotiocianatos tem sido descritos com potencial para alterar as propriedades de solubilidade da hemoglobina S, retardando o processo de polimerização, especificamente por se ligarem à subunidade β da HbS responsável pela interação hidrofóbica que culmina na polimerização.

Os derivados de isotiocianatos atravessam a membrana do eritrócito, aumentam a afinidade da HbS, inibindo a polimerização da HbS desoxigenada (PARK et al., 2003).

Tem sido relatado que compostos contendo a função aldeído poderiam formar um aduto (base de Schiff) com alguma amina *N*-terminal presente nos aminoácidos da cadeia de HbS. Safo e colaboradores demonstraram que os aldeídos heterocíclicos como o furfural, 5-metilfurfural, 5-etilfurfural e 5-hidroxi-metilfurfural, foram capazes de aumentar a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e inibir o afoçamento. Os pesquisadores identificaram ainda que essa substância apresentava grande segurança. (SAFO et al., 2004)

Entretanto alguns fatores como a baixa biodisponibilidade por via oral, necessidade de altas doses para obter efeito significativo e ainda a toxicidade dose-dependente limitam o uso dos isotiocinamatos e aldeídos na terapêutica.

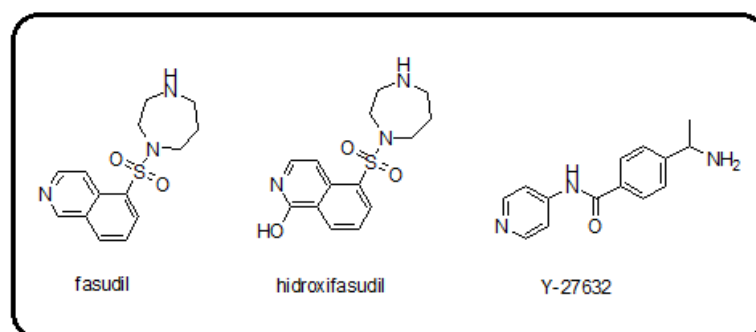
Inibidores de Rho-kinase (Rock)

A proteína Rho-kinase (ROCK), identificada como um efetor da Rho GTPase, está envolvida em processos celulares, incluindo contractilidade, quimiotaxia, adesão e migração, facilitando a infiltração de células inflamatórias, tanto *in vitro* como *in vivo*. (BOUREUX et al., 2007)

A inibição da via das Rho/ROCK, tem se mostrado benéfica para doenças cardiovasculares, neurológicas e oncológicas. Dentre as atividades *in vivo* descritas destes inibidores estão: regulação da pressão arterial, aumento da resistência vascular, regressão de lesões coronárias ateroscleróticas, prevenção do desenvolvimento de diabetes, reparação neurológica, diminuição da formação de agregados β -mieloide, inibição do crescimento, progressão e metástase de tumores, dentre outras. (FUKUMOTO et al., 2005; KANDABASHI et al., 2000; SHIMOKAWA et al., 2001; KISHI et al., 2005; HARA et al., 2000; SONG et al., 2013; LIU et al., 2009; YING et al., 2006) .

Atualmente os inibidores de Rho-kinase têm se mostrado promissores para o tratamento das complicações da anemia falciforme. Em um estudo *in vitro* foi mostrado que inibidores da Rho-kinase como o Y-27632 (Figura 24) foi capaz de reduzir a ativação de células endoteliais humanas e a adesão de eosinófilos de pacientes com anemia falciforme. O fasudil (Figura 24), inibidor de rho-kinase aprovado no Japão para o tratamento e prevenção do vaso-espasmocerebral, mostrou-se benéfico na redução de complicações pulmonares em animais portadores de anemia falciforme, por inibir o recrutamento de eosinófilos e de quimiocinas que promovem a progressão da resposta inflamatória pulmonar (PALLIS et al., 2013).

Um estudo de cruzamento de banco de dados permitiu identificar o hidroxifasudil como promissor para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme, devido sua capacidade de aumentar os níveis de eNOS, NO e cGMP, o que possibilitaria a indução da produção de HbF (DAI et al., 2011). Além disso, o mesmo demonstrou habilidade de reduzir os níveis de IL-6, IL1- β e TNF- α , os quais tem ação pró-inflamatória na doença, reduzindo assim a inflamação (DING et al., 2010). O hidroxifasudil reduziu ainda a expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 e a coagulação (WASHIDA et al., 2011). Quando comparado com a hidroxiuréia, o hidroxifasudil demonstrou diferentes efeitos e mais benéficos que a mesma, sendo melhor na redução da vaso-oclusão e inflamação do que a mesma. Neste contexto este fármaco tem sido sugerido como uma alternativa para o tratamento da anemia falciforme (ESSACK, BAJIC & RADOVANOVIC, 2013) .

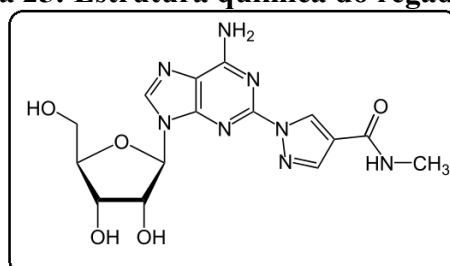
Figura 24: Estruturas químicas dos inibidores de Rho-kinase

Agonistas de adenosina

Algumas evidências têm mostrado que as células iNKT são responsáveis pela propagação da resposta inflamatória da lesão causada pela isquemia-reperfusão presente na fisiopatologia da anemia falciforme, contribuindo assim para o aumento da inflamação e da vaso-oclusão.

Agonistas A2 de adenosina têm se mostrado promissores na redução da ativação de células iNKT, leucócitos e plaquetas diminuindo a injúria pulmonar (WALLACE & LINDEN et al., 2010).

O regadenoson (Figura 25) é um agonista seletivo (A2) de adenosina e seu uso para anemia falciforme está sendo investigado através de estudos clínicos. Os resultados preliminares demonstraram que o mesmo diminuiu a ativação de células iNKT com ausência de efeitos tóxicos, representando um fármaco promissor no tratamento da anemia falciforme (FIELD et al., 2013).

Figura 25: Estrutura química do regadenoson

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

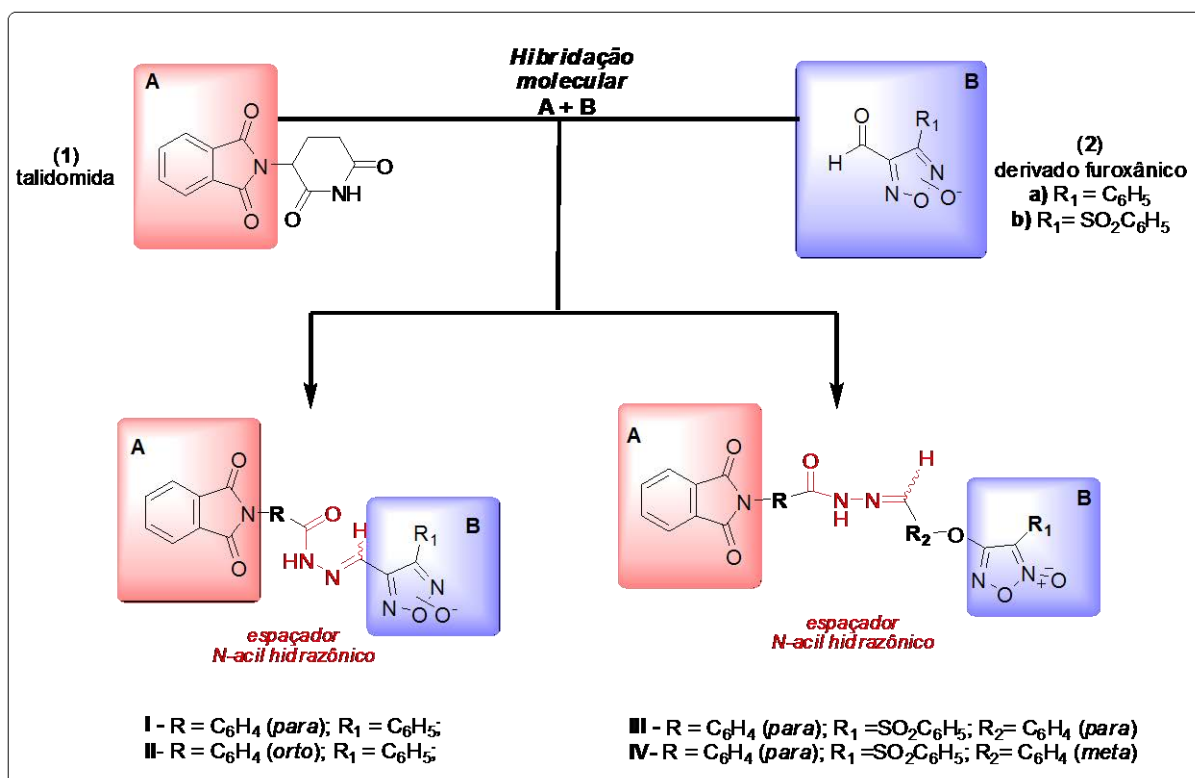
Este trabalho visa o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de quatro candidatos a fármacos inéditos para tratamento dos sintomas da anemia falciforme.

3.2. Objetivos específicos

- Síntese, isolamento, purificação e caracterização estrutural dos compostos híbridos planejados.
- Avaliação da capacidade de doação de óxido nítrico.
- Avaliação da capacidade dos compostos em inibir a síntese do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em ensaio enzimático por ELISA.
- Avaliação da capacidade de inibição da agregação plaquetária.
- Avaliação da capacidade dos compostos em induzir a expressão gênica de gama-globina.

4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Utilizando a estratégia de hibridação molecular foram planejadas novas moléculas contendo as subunidades farmacofóricas: a) do protótipo talidomida (**1**), representada pelo núcleo ftalimídico (**A**); b) do núcleo furoxânico (**B**) com doação diferenciada de óxido nítrico (Esquema 1).



Esquema 1: Planejamento estrutural dos novos compostos híbridos (I-IV) contendo a subunidade espaçadora N-acilidrazona.

As estratégias de modificação molecular têm se mostrado muito promissoras na Química Farmacêutica e Medicinal (WERMUTH, 2004). Entre os processos de modificação molecular destacam-se: hibridação, latenciação, bioisosterismo entre outros (SANTOS, 2009).

A hibridação é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em uma única molécula. Essa estratégia tem sido empregada para

obtenção de diversos fármacos disponíveis no mercado e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos (STRUPEZEWSKI, 1991).

Alguns processos fisiopatológicos envolvidos na gênese de doenças podem sugerir a necessidade de se desenharem bioligantes ou protótipos incluindo na mesma molécula propriedades farmacodinâmicas duplas ou triplas, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica (BARREIRO & FRAGA, 2001)

A subunidade ftalimida (**A**), grupo farmacofórico da talidomida, cuja principal ação é a modulação direta sobre biossíntese de TNF- α da talidomida, foi mantida nos derivados planejados (LIMA et al., 2001; MIYACHI et al., 1997). A presença do anel fenílico ligado à subunidade ftalimídica nos compostos planejados (Esquema 1) permite explorar substituições mais adequadas para modulação da citocina TNF- α conforme dados de relação estrutura-atividade descritos na literatura (MULLER et al., 1999). Além disso, recentemente foi relatado que a talidomida também possui a capacidade de induzir a expressão do gene de gama-globina através do aumento de espécies reativas de oxigênio mediadas pela p38 MAPK (AERBAJINAI et al., 2007).

A subunidade *N*-acilidrazona presente nos novos derivados planejados foi utilizada como agente espaçador. Diversos relatos na literatura demonstram a importância dessa subunidade em compostos com atividade analgésica, anti-inflamatória e antiagregante plaquetária. (LIMA et al., 2008; BARREIRO et al., 2002; BARREIRO & FRAGA, 1999). Acredita-se que essas propriedades estejam relacionadas ao melhor reconhecimento dessa subunidade pelas enzimas ciclooxigenases (COX) e 5-lipooxigenase, o que consequentemente melhoraria o perfil de inibição das mesmas, reduzindo a síntese de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (SILVA et al., 2004 ; MATHY et al., 1993). Dessa forma, esse espaçador poderia contribuir e agregar às atividades farmacológicas dos novos compostos híbridos.

Os derivados furoxânicos (**2a-b**) foram selecionados como doadores exógenos de óxido nítrico. O NO apresenta uma série de efeitos benéficos que poderiam ser explorados para o tratamento da anemia falciforme como: vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e indução de hemoglobina fetal.

De acordo com resultados obtidos anteriormente, inibição de TNF- α associada à capacidade de doação de óxido nítrico representa uma nova abordagem para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme (SANTOS et al., 2012). Assim, neste projeto planejou-se uma série de compostos híbridos (I-IV) (Esquema 1) pretendendo-se assegurar e otimizar o caráter dual de ação ao tratamento das complicações da doença.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material (Reagentes e solventes)

- 2-aminobenzoidrazida (Sigma Aldrich)
- 4-aminobenzoidrazida (Sigma Aldrich)
- acetato de etila (Quemis)
- ácido 3-aminobenzóico (Sigma Aldrich)
- ácido 4-aminobenzóico (Sigma Aldrich)
- ácido acético glacial (Quemis)
- ácido feniltioacético (Sigma Aldrich)
- álcool cinâmico (Fluka)
- anidrido ftálico (Sigma Aldrich)
- cisteína (Sigma Aldrich)
- clorocromato de piridínio (PCC) (Sigma Aldrich)
- clorofórmio (Vetec)
- 1,8-diazabicycloundec-7-ene (DBU) (Sigma Aldrich)
- diclorometano (Vetec)
- dimetilformamida (DMF) (Quemis)
- dimetilaminopiridina (DMAP) (Across)
- etanol (Quemis)
- etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich)
- metanol (Vetec)
- nitrito de sódio (Across)
- sílica gel para cromatografia em coluna 63-200 μm (Sigma Aldrich)
- sílica gel para cromatografia em coluna 40-60 μm (Sigma Aldrich)

5.2. Equipamentos

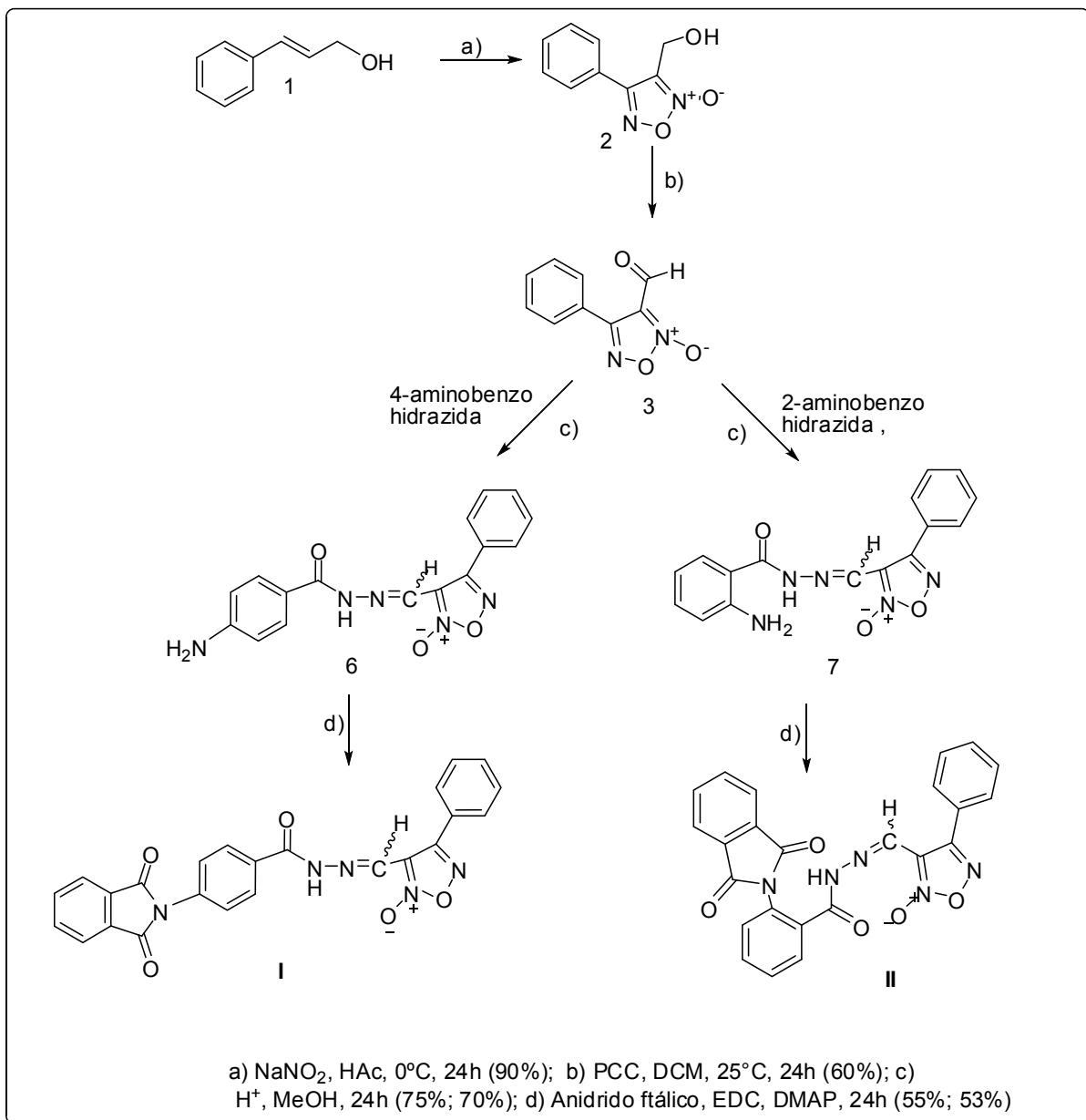
- espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da Shimadzu;
- espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu;
- aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific;

5.3. Animais

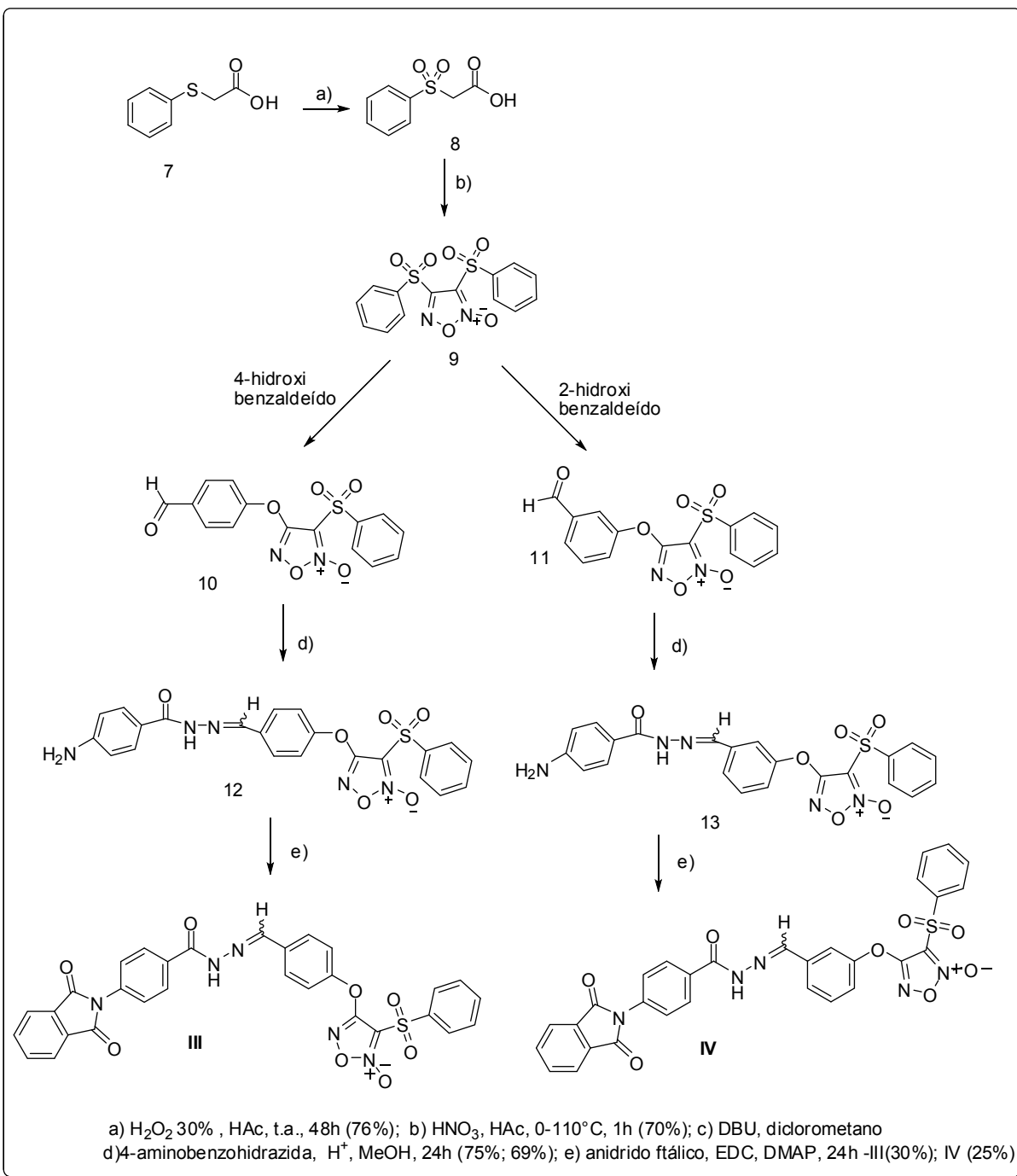
Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (25-30 g) machos, adultos, com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas e com livre acesso a água. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética Internacional para manuseio de animais em modelos de inflamação. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (CEP 32/2013.) (Anexo I).

5.4. Metodologia sintética

A obtenção dos produtos finais planejados envolveu entre 4 e 5 etapas sintéticas. Primeiramente foram obtidos os derivados furoxânicos funcionalizados, conforme descrito na literatura (MONGE et al 1998; SANTOS, 2009), os quais foram então acoplados com as hidrazidas, formando os intermediários *N*-acil-hidrazônicos. Estes intermediários foram posteriormente acoplados com o anidrido ftálico, utilizando-se agente acoplante para a formação dos produtos híbridos finais desejados. (Esquema 2 e 3). A metodologia sintética detalhada para cada etapa é descrita nos Anexos.



Esquema 2: Esquema geral da síntese dos compostos I e II.



Esquema 3: Esquema geral da síntese dos compostos III e IV.

5.5. Métodos Analíticos

- Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.). Utilizou-se cromatografia em camada delgada (cromatofolhas de alumínio de área 20x20 cm- Sílica gel 60 F254 0,2 mm de espessura - Merck) para o acompanhamento das reações. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365 nm)
- Espectrometria de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Os espectros de RMN ^{13}C e ^1H foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da UNESP utilizando-se espectrômetro, Brüker, modelo Advance DPX300 –(300, 75, 600 MHz), utilizando como solventes DMSO-d₆ e CDCl_3 .
- Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV): Os espectros de absorção no IV, na região do infravermelhomedio, ou seja de 4.000 a 400 cm^{-1} , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro FTIR-8300 da Shimadzu.
- Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS): os espectros foram obtidos em Espectrômetro de Massas de Alta Resolução da marca Bruker com detector do tipo TOF (time-of-flight) (IQ-UNESP). As amostras foram solubilizadas em acetonitrila (grau CLAE) em frascos de 1,5 mL e as análises foram realizadas com o equipamento configurado para detecção de íons positivos, faixa de razão massa/carga de 50-2000 m/z e fluxo de gás seco de 5,0 L/min.
- Faixa de Fusão: As faixas de fusão dos compostos foram determinadas, sem correção, em aparelho de Ponto de fusão capilar “Electrothermal”.

5.6. Ensaio Farmacológicos

5.6.1. Detecção quantitativa de nitrito (SORBA et al., 1997)

O NO em solução rapidamente se oxida a nitritos e nitratos, por isso a quantificação da concentração de nitrito é uma forma indireta de mensurar a capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos.

Uma solução do respectivo derivado furoxânico e padrões (20µL) em DMSO foi adicionado a tubo contendo 2 mL de tampão fosfato 50mM (pH 7,4) contendo 5 mM de cisteína, e ainda na ausência de cisteína. A concentração final de cada composto no tubo foi 10^{-4} M. Após 1 hora a 37°C, 1 mL dessa solução foi tratada com 250µL do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro UV/visível. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (NO_2^-) mol/mol $\pm$ E.P.M.

5.6.2. Viabilidade celular e doseamento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (STEWART et al., 2010; MOSMANN, 1983).

Para a avaliação da viabilidade e detecção de TNF- α dos compostos sintetizados, foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino), com peso aproximado de 25-30g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP).

Após estímulo prévio com tioglicolato 3%, macrófagos foram retirados da cavidade peritoneal de camundongos. Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Em uma placa de microtitulação de 96 poços, foram incubadas suspensões de células do exsudato peritoneal (100 µL por poço), na concentração de 5×10^6 células/mL, por 60 minutos para a aderência das células.

Os macrófagos aderentes, estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS), foram incubados novamente junto com as preparações obtidas a partir dos compostos (I-IV). O tempo de incubação foi de 24 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi vertido e 100 µL de solução de MTT (Sigma) a 1mg/mL foi adicionado a cada orifício. A placa foi então incubada por mais 3h a 37°C. Após esse período, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. Somente células e meio de cultura RPMI-1640 foram utilizados como controle negativo, equivalendo a 100% de viabilidade dos macrófagos.

A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível, em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

A citocina TNF- α foi quantificada no sobrenadante obtido da cultura de macrófagos através do teste imunoenzimático ELISA, utilizando Kit Pharmingen de acordo com as instruções do fabricante. As microplacas de poliestireno de 96 poços foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti-TNF- α de camundongo purificado a 4 μ g/ml (100 μ l/cavidade) em tampão PBS e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T).

Após a lavagem, foram bloqueadas com 300 μ l de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA), com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T. Foram adicionados à placa 100 μ l de cada citocina padrão ou sobrenadantes das culturas de células peritoneais. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 4 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μ l/cavidade de anticorpo anti-TNF- α de camundongo marcado com biotina na concentração de 400 ng/ml em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-NaCl).

As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T, foram então adicionados 100 μ l do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse processo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e 100 μ l do substrato (10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H₂O₂) foram adicionados em cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μ l de H₂SO₄ 2N.

A absorvância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível de microplacas e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de TNF- α padrão. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/ml (STEWART et al 2010; MOSMANN, 1983).

5.6.3. Avaliação da atividade antiagregante plaquetária (BORN & CROSS, 1962).

O método turbidimétrico foi utilizado conforme descrito por BORN & CROSS (1962). Ratos Wistar machos (270-340g) foram anestesiados com isoflurano e uma incisão longitudinal no abdômen foi feita para a coleta de sangue arterial obtido do ramo descendente da artéria aorta. Para obtenção de plaquetas lavadas, o sangue dos ratos foi coletado em ACD-C (citrato de sódio 12.4 mM, ácido cítrico 13 mM e glicose 11 mM) (9:1 v/v).

Primeiramente o PRP foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trissódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugados por 13 min a 800 g. O precipitado plaquetário foi ressuspenso em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 800 g por 13 min.

Finalmente, as plaquetas foram ressuspensas em solução de Krebs-Ringer desprovida de Ca^{++} (NaCl 118 mM, NaHCO_3 35 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,17 mM, glicose 5,6 mM) e o número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL através de contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Ao final, foi adicionado cloreto de cálcio à suspensão plaquetária para uma concentração final de 1mM. Para avaliação do ensaio de agregação plaquetária foi usado o método turbidimétrico. 400 μL de solução contendo as plaquetas foram transferidas para a cubeta de agregação e avaliada usando o equipamento agregômetro de 1 canal (Qualitem, São Paulo, Brasil). O aparelho foi calibrado para 0% (suspensão de plaquetas lavadas) e 100% (solução de Krebs-Ringer). Em seguida a agregação foi induzida por ADP (3-10 mM), e monitorada por 10 min.

As substâncias teste e o veículo empregado (DMSO) foram pré-incubados por 5 minutos antes da adição do agente agregante. A concentração de DMSO na amostra não ultrapassou o limite de 1% para não ocorrer interferência nos resultados. As amostras foram analisadas em triplicata e realizados em 3 experimentos independentes para cada substância.

5.6.4. Avaliação da expressão gênica de gama globina dos compostos obtidos em células K562 (SANTOS et al., 2012)

Para a avaliação da expressão gênica de gama globina foi utilizada a linhagem celular de leucemia humana K562 ATCC (American Type Culture Collection), Filadélfia, PA, EUA. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, USA) contendo 10 % de soro bovino fetal e glutamina. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂. Para os experimentos as células foram incubadas na densidade de 1x10⁵ células/mL.

Para realização da cultura com hemina (30uM), esta foi adicionada 72 horas antes do início do experimento com o composto desejado. O tempo de 0 hora consiste na retirada de células K562 não tratadas. A partir desse ponto, foram adicionados os respectivos compostos nas concentrações desejadas (5, 30, 60 e 100 uM), as células foram então mantidas por 7 dias em cultura, sem nova adição de composto ou substituição de meio de cultura. Foram realizadas coletas de células nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A morfologia das células foi analisada nestes pontos através de lâminas de citospin coradas com Leishman e a viabilidade celular foi realizada através da coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer.

Extração de RNA

Para obtenção do RNA de K562 foi utilizado o método de extração com o reagente TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra contendo K562 e TRIzol foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, 200 µL de clorofórmio (CHCl₃) foi adicionado e agitado vigorosamente sendo realizada nova incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 19.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500 µL de isopropanol gelado.

Após homogeneização, foi realizada nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 19.000g à 4°C. O

sobrenadante foi desprezado e ao precipitado adicionou-se 800 µL de etanol gelado a 70%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 14.000g à 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então ressuscitado em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA.

A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante de agarose à 1,2%. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA obtidas, foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen, Life Technologies). Após leitura em espectrofotômetro (Gene Quant-Pharmacia, USA) e quantificação, 3 µg de RNA foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies), para remoção de DNA contaminante. Foi adicionado 1,0 µL de 1 u/µL DNase I, 1,0 µL de 10x DNase I Reaction Buffer (200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µL de reação. A reação foi realizada por 15 minutos a temperatura ambiente e paralisada com 1,0 µL de 25 mM EDTA, e incubado por 10 minutos a 65°C.

Para a síntese do cDNA adicionou-se a seguir 1,0 µL de 50 µM oligo (dT) 20 e 1,0 µL de 10 mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C, seguidos por 1 minuto a 4°C. A cada amostra adicionou-se 10,0 µL da seguinte mistura de reação: 2 µL de 10x RT buffer, 4,0 µL de 25 mM MgCl₂, 2,0 µL de 0,1 M DTT, 1,0 µL de 40 U/µL RNase OUTTM e 1,0 µL de 200 U/µL Superscript III RTTM. A reação ocorreu por 50 minutos a 50°C, seguido de 5 minutos a 85°C. A seguir, foi adicionado 1,0 µL de 2 U/µL E. coli RNase H por 20 minutos a 37°C.

Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio de PCR para amplificação do gene da beta-actina (BAC). Realizou-se as reações com: 5,0 µL de 10x PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µL de 50 mM MgCl₂, 1,0 µL de 10 mM dNTP's, 1,0 µL de 10 mM de primer BACF (5'- AAGAGATGGCCACGGCTGCT – 3'), 1,0 µL de 10 mM de primer BACR (5'- TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 1,0 µL de cDNA e 39 µL de água, para um volume final de 50 µL. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/ 30 segundos – 58°C/ 45 segundos – 72°C/ 40 segundos, sendo finalizado por 72°C/ 7 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1% para verificação da ampliação de 640pb.

Eficiência de Reação

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutivas são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, que as amplificações apresentem 100% de eficiência de amplificação a cada ciclo, ocorrendo duplicação da amostra.

A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{-1/\text{slope}}$, onde slope significa o valor da inclinação da curva (Meijerink et al, 2001).

A otimização acontece utilizando a concentração ótima de primer com 7 quantidades conhecidas de amostra, em escala logarítmica: 2ng (2x10⁰), 6,32ng (2x10^{0,5}), 20ng (2x10¹), 63,2ng (2x10^{1,5}), 120ng, 200ng (2x10²) e 632ng (2x10^{2,5}). Os resultados são utilizados para construção de uma curva padrão Ct versus quantidade de amostra.

PCR quantitativo em tempo real – “Real Time PCR”

Após leitura em espectrofotômetro (Gene Quant-Pharmacia, USA) e quantificação, alíquotas de cDNA foram utilizadas como molde em reações de PCR quantitativa em tempo real. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higuchi et al., 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SYBERGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCL₂, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBERGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. Além disso, utiliza-se amostras de cDNA e primers específicos para o gene analisado.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System® (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct.

As reações realizadas continham 12,5 µL do reagente SYBERGreen PCR Master Mix®, 25 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de primer determinada, perfazendo um volume final de 25 µL. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/ 10 minutos, seguido de 45 ciclos: 95°C/ 15 segundos – 60°C/ 1 minuto. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de degradação durante o qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de TM (melting temperature) entre os produtos de PCR amplificados, essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto.

Análise dos dados do real time

A expressão dos genes de interesse foram determinadas de uma forma relativa, sendo normalizadas com relação a genes chamados calibradores, neste estudo foram utilizados a β -actina e o GAPDH, que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. No

entanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a expressão desses genes pode variar consideravelmente (Vandesompele, 2002).

Dos valores de Ct obtidos, foi calculada média aritmética das duplicatas do Ct. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula $Q = E^{\Delta Ct}$, onde E = eficiência de reação e ΔCt = menor Ct observado – Ct da amostra. Desta forma a expressão foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (Menor Ct observado), que recebeu valor $Q = 1$. Os valores de Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao programa Gnorm (Vandesompele, 2002), que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra é dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e Fator de Normalização a amostra. O dado obtido é expresso em unidades arbitrárias ou valor absoluto de expressão.

Os resultados foram avaliados aplicando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os procedimentos experimentais e as respectivas identificações estruturais, juntamente com seus espectros são apresentados na seção Anexos. A interpretação dos espectros de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN de 1H e ^{13}C) dos compostos obtidos foi realizada baseando-se nas referências de SILVERSTEIN et al., 2000 e PAVIA et al., 1996. Para auxílio na interpretação dos deslocamentos químicos por RMN dos derivados que apresentam os núcleos furoxânicos, os espectros obtidos foram comparados com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas análogas (CERECETTO et al., 1999).

6.1. Síntese dos compostos 3-((2-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (I) e 3-((2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (II)

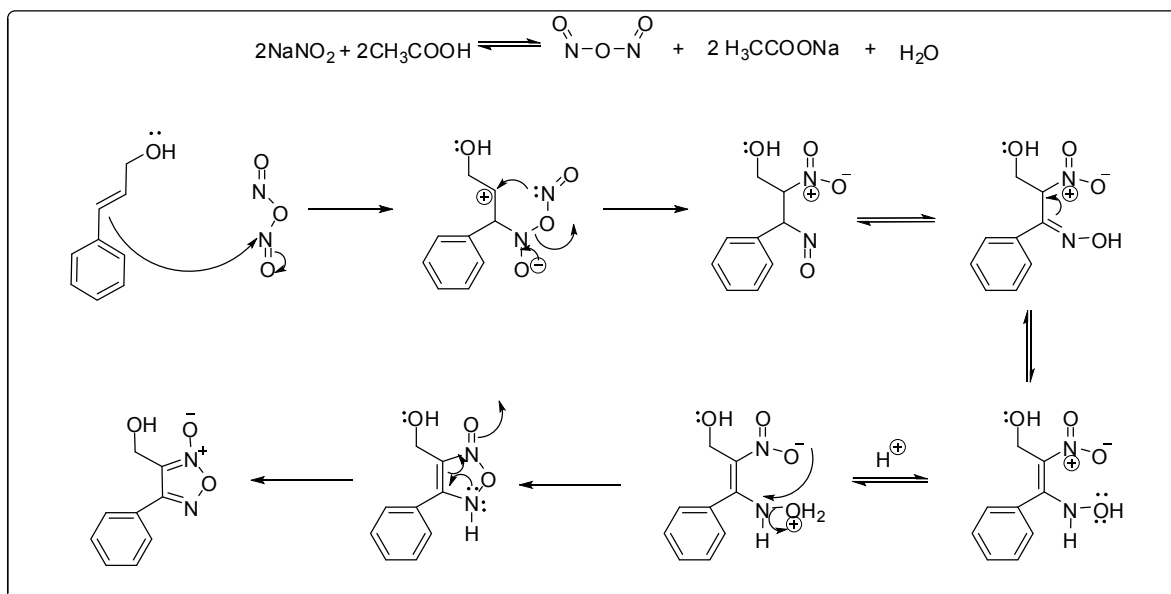
Devido às semelhanças estruturais e mecanísticas de obtenção dos compostos I e II, (Esquema 2) estes serão discutidos em conjunto a seguir.

6.1.1. Síntese do derivado furoxânico funcionalizado 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-*N*-óxido-3-carbaldeído (3)

A obtenção do aldeído 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-*N*-óxido-3-carbaldeído (2) se deu pela reação entre o álcool trans-cinâmico (1) e o nitrito de sódio em meio ácido acético glacial, formando primeiramente o derivado 3-(hidroximetil)-4-fenil-*N*-óxido-1,2,5-oxidiazol. Posteriormente a função álcool foi oxidada a aldeído usando o clorocromato de piridínio (PCC). A metodologia empregada para obtenção do álcool foi realizada conforme descrito por CERECETTO et al., 1999 e SANTOS et al., 2012. O rendimento da reação após purificação por coluna cromatográfica foi de 48%.

Há propostas de que o mecanismo reacional para obtenção do derivado 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxidiazol-2*N*-óxido ocorra como representado no esquema 4, entretanto estudos são necessários a fim de confirmar essa proposta. Teoricamente, a reação envolve o mecanismo de nitrosação/nitração do álcool cinâmico (alceno). Inicialmente, o anidrido nitroso (ou dioxodiazoxano) é formado a partir do nitrito de sódio e dois equivalentes de ácido acético. Em seguida, os elétrons π da ligação C=C do álcool cinâmico atacam um dos nitrogênios do anidrido nitroso de modo que um dos seus átomos de oxigênio passa a comportar mais um par de elétrons não-ligantes, oriundos da ligação N=O. Este mesmo par de elétrons não ligantes reestabelece a ligação N=O, fazendo com que a ligação N-O com o átomo de oxigênio central se rompa, ao mesmo tempo que o outro átomo de nitrogênio ataca o centro carbocatiônico original do no álcool cinâmico seguido de rearranjo e formação da nitro-oxima. Posteriormente a ligação π carbono-carbono é reestabelecida e o oxigênio faz um ataque nucleofílico intramolecular e ocorre a

liberação de uma molécula de água. Após outro rearranjo intramolecular o composto 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2*N*-óxido é formado.

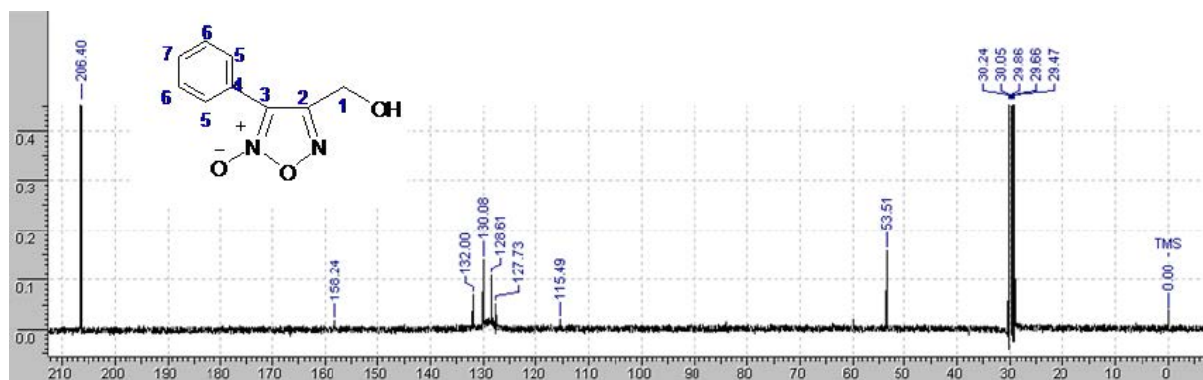


Esquema 4: Mecanismo de formação do aldeído 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido (Fruttero 1989)

Estudos de modelagem molecular realizados por Santos (2009) indicam que a presença da hidroxila do álcool cinâmico auxilia na estabilização da carga negativa do oxigênio, conforme a posição mostrada no Esquema 4, através de ligação de hidrogênio intramolecular, durante a formação do produto. A posição do oxigênio da subunidade *N*-óxido está diretamente relacionada à capacidade de doação de óxido nítrico pelos compostos furoxânicos, sendo importante a sua determinação.

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 1) é possível visualizar em δ 53,51ppm o sinal do carbono metilênico. Também mostra a diferença dos deslocamentos entre os carbonos do núcleo furoxânico (δ 115,49 ppm e δ 158,24 ppm). Esta diferença de deslocamento químico entre esses dois carbonos vizinhos deve-se ao efeito protetor do carbono ligado ao *N*-óxido, já que devido ao efeito de ressonância há proteção deste carbono (C2), efeito este não observado com o outro átomo de carbono do sistema furoxano, o qual está ligado a subunidade fenila, conforme mostrado na Figura 26. O espectro também apresenta os sinais de deslocamentos químicos

referentes aos carbonos da fenila em δ 132,0 (C4); 130,08 (C5); 128,61 (C6); 127,73 (C7)ppm.



Espectro 1: Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido (75 MHz; DMSO- d_6)

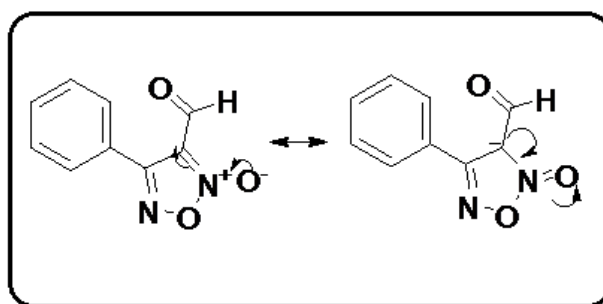
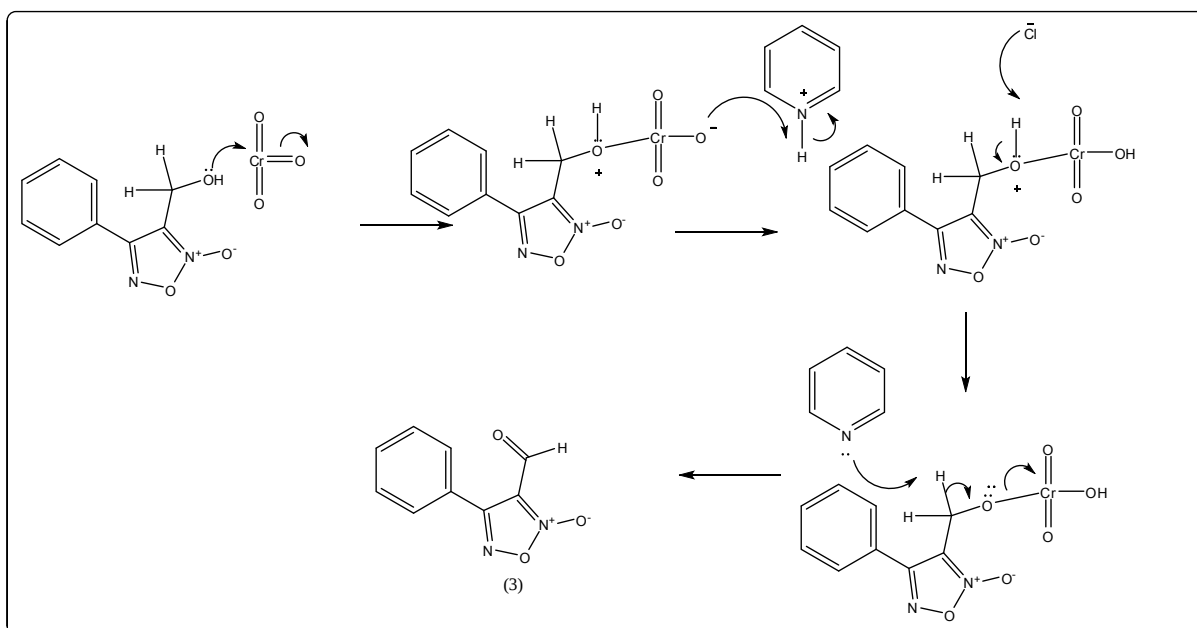


Figura 26: Efeito protetor em C2 devido à presença da subunidade N-óxido.

No espectro de RMN ^1H (Espectro 21, anexos) destaca-se a presença dos hidrogênios metilênicos (CH_2) em 4,72, e os multipletos dos hidrogênios aromáticos, melhor visualizados na ampliação no espectro 22 (Anexos), entre 7,95 e 7,81 ppm. Estes dados sugerem a formação do composto.

Posteriormente, a função álcool foi oxidada a aldeído utilizando clorocromato de piridínio (PCC) como agente oxidante e o produto foi obtido com 48% de rendimento após purificação por coluna cromatográfica. O mecanismo da reação de formação do composto 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido-3-carbaldeído (3) é mostrado no Esquema 5 e tem início com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre da hidroxila ao átomo de cromo do cromato, que possui carga formal positiva (δ^+). Há

rompimento da ligação π ($\text{Cr}=\text{O}$) e o par de elétrons π é acomodado pelo átomo de oxigênio. Este oxigênio abstrai um próton do íon piridínio neutralizando sua carga e o íon cloreto é responsável pela retirada do hidrogênio ácido do oxigênio que pertencia à função álcool. O par de elétrons da piridina retira um próton ácido do carbono vizinho ao oxigênio e o par de elétrons da ligação sigma carbono-hidrogênio forma uma ligação π com o oxigênio ligado ao crômio formando o aldeído e a ligação oxigênio-crômio é então rompida em uma etapa de eliminação.



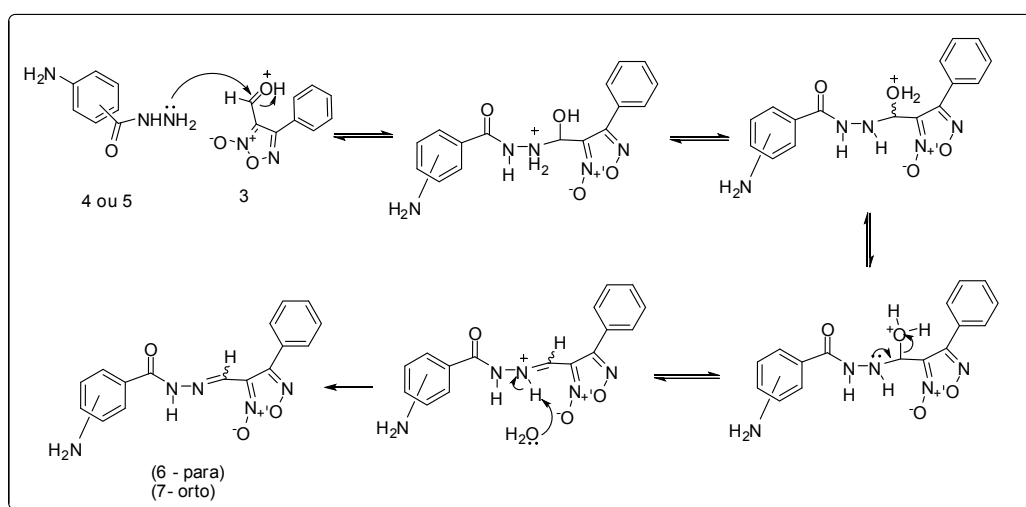
Esquema 5: Mecanismo de oxidação utilizando PCC (SOLOMONS, 2009)

O aldeído obtido apresentou foi obtido como um óleo marrom e analisado por CCD utilizando como fase móvel a mistura de eluentes: acetato de etila:hexano (5:5/v:v), onde foi observado $R_f=0,71$ e após revelação química com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (Revelador de Brady) que cora em amarelo os grupos carbonilas por condensação.

6.1.2. Síntese dos intermediários 4-((2-(4-aminobenzoi)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol- 2-oxido (6) e 4-((2-(2-aminobenzoi)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-oxido (7)

A obtenção dos intermediários *N*-acilidrazônicos (6) e (7), foi realizada reagindo-se, respectivamente, as hidrazidas comerciais 4-aminobenzohidrazida (4) e 2-aminobenzohidrazida (5) com o 4-fenil-1,2,5-oxadiazol-*N*-óxido-3-carbaldeído (3), utilizando catálise ácida.

A reação de condensação entre a hidrazida e o aldeído (Esquema 6) inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre do grupo amino da hidrazida à carbonila do aldeído (3), que apresenta uma carga positiva, por conta da protonação do oxigênio carbonílico, de modo a tornar o carbono carbonílico mais eletrofílico, levando a formação do intermediário hemiaminal *N*-protonado. Nesta etapa há rompimento da ligação π carbono-oxigênio, e o par de elétrons se desloca para o átomo de oxigênio. A transferência rápida do próton do nitrogênio para o oxigênio via solvente, permite a eliminação subsequente de uma molécula de água, a qual é liberada quando o par de elétrons do nitrogênio forma uma ligação π com o carbono, originando o íon imínio, o qual é neutralizado com a retirada do hidrogênio ligado ao nitrogênio pela molécula de água deslocando o equilíbrio na direção da formação do produto (COSTA et al., 2003).



Esquema 6: Mecanismo da reação de formação dos intermediários 6 e 7

Os intermediários (6) e (7) foram avaliados por CCD utilizando como eluente a mistura de solventes hexano:acetato de etila (5:5, v/v) . O composto 6 apresentou-se como um sólido amarelo e faixa de fusão entre 217-219°C, ($R_f = 0,29$) e rendimento de 75%. Já o composto intermediário (7), caracteriza-se por um sólido amarelo claro, de PM = 323,31 g/mol ($C_{14}H_{11}N_5O_3$), faixa de fusão entre 196-199°C , ($R_f = 0,27$) e rendimento de 70%.

As estruturas dos compostos obtidos foram comprovadas por espectrometria no infravermelho, RMN (1H e ^{13}C) e espectrometria de massas.

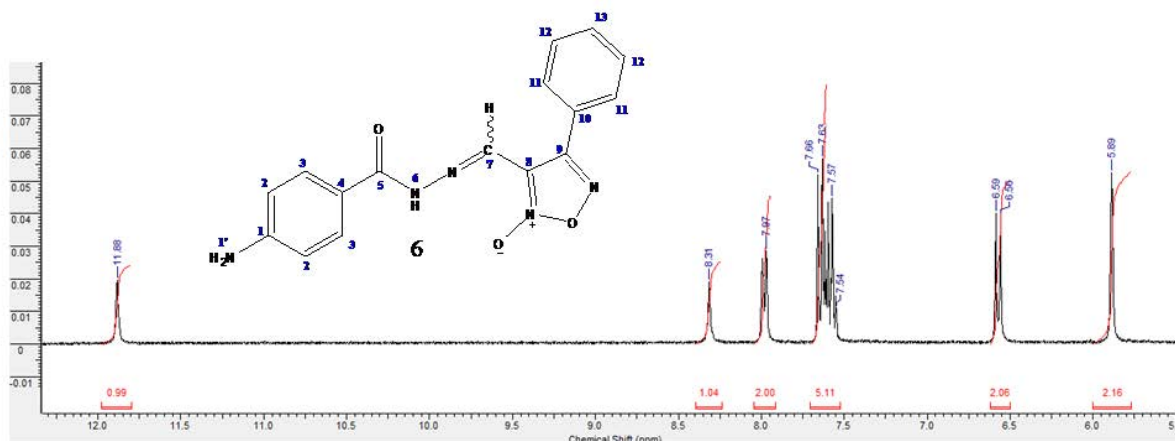
Nos espectros na região do infravermelho (Espectros 24 e 30, anexos), relativos a hidrazona (6) e (7) respectivamente, podem ser observados os estiramentos axiais da ligação N-H da amina em 3469 e 3358 cm^{-1} para (6) e em 3421 e 3342 cm^{-1} para (7).

Os estiramentos axiais referentes à carbonila C=O da amida apresentam-se em 1635 e 1662 cm^{-1} para os compostos (6) e (7), respectivamente, assim como os estiramentos de deformação axial em 1600 e 1612 cm^{-1} apontam a presença da ligação C=N dessas hidrazonas. Observa-se ainda os estiramentos de deformação axial referente à ligação N-O do derivado furoxânico em 1284 e 1247 cm^{-1} para os compostos (6) e (7) respectivamente.

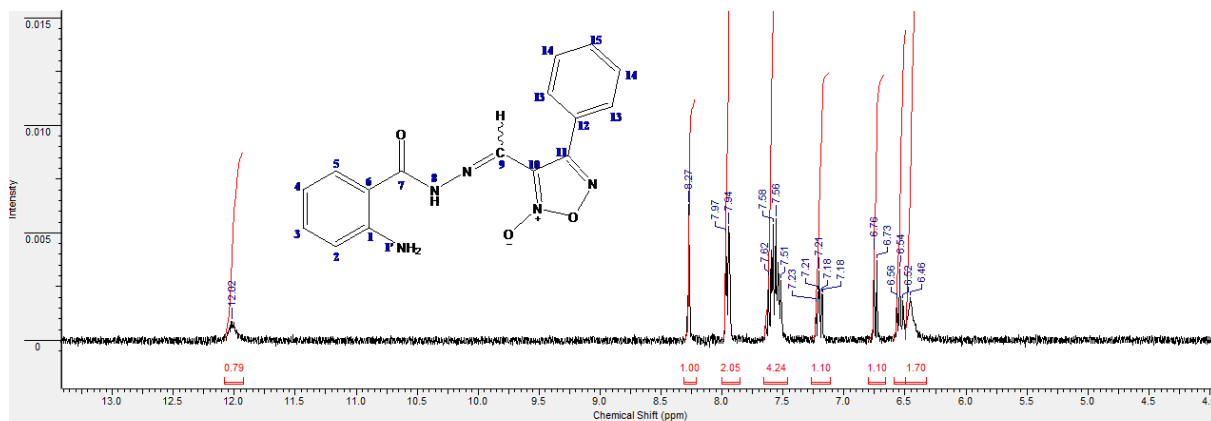
Nos espectros de RMN 1H (Espectros 2 e 3) dos intermediários (6) e (7) é possível visualizar os sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático dissustituído vizinhos ao grupo amino da amina primária, estes mais protegidos pelo efeito elétron-doador da mesma são visualizados em δ 6,58 ppm (2H) e δ 6,57 ppm (2H) e seus respectivos carbonos (C2) no RMN de ^{13}C (Espectros 4 e 5) em δ 114 e δ 113,05 ppm. Já os outros hidrogênios mais desprotegidos, devido ao efeito elétron-retirador do grupo carbonila, estão na região entre δ 7,66-7,54 ppm e δ 7,63-7,52 ppm apresentando-se como um multipeto juntamente com os hidrogênios do anel aromático ligado ao furoxano e seus carbonos em δ 131,67 e δ 128,71 ppm para os intermediários (6) e (7) respectivamente. Não foi possível observar a correta multiplicidade dos hidrogênios aromáticos e apesar de ser uma característica comum para alguns derivados furoxânicos, apresentaram correta integração do número de

hidrogênios. Os sinais dos carbonos do anel furoxânico estão apresentados em δ 113,67 e δ 156,48 ppm (intermediário 6), δ 113,48 e δ 156,56 ppm (intermediário 7) e entre δ 129-131ppm estão os carbonos do anel ligado a ele.

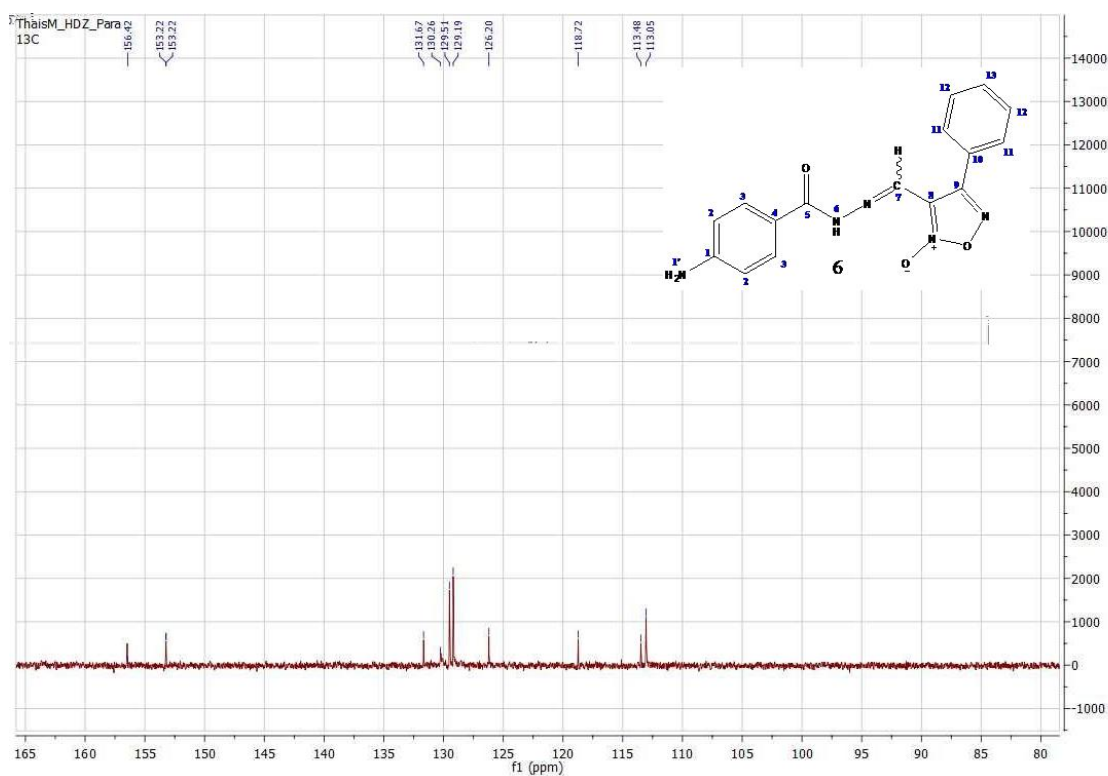
Os simpletos dos hidrogênios amídicos das *N*-acilhidrazonas em δ 11,88 ppm (1H) e δ 12,02 ppm (1H) (para 6 e 7, respectivamente), juntamente com os simpletos em δ 8,31 ppm (1H) e δ 8,28 ppm (1H) da imina e os valores dos espectros de RMN¹³C, no qual os carbonos referentes as carbonilas das *N*-acilhidrazonas em δ 153,22 e δ 151,01ppm e dos carbono das iminas das *N*-acilhidrazonas em δ 131,09 δ 132,28ppm permitiram evidenciar para ambos os compostos a formação de um único diastereoisômero devido à presença de apenas um único sinal (simpleto), nos espectros de RMN de ¹H, referente ao hidrogênio imínico (N=CH) da subunidade N-acilidrazona.



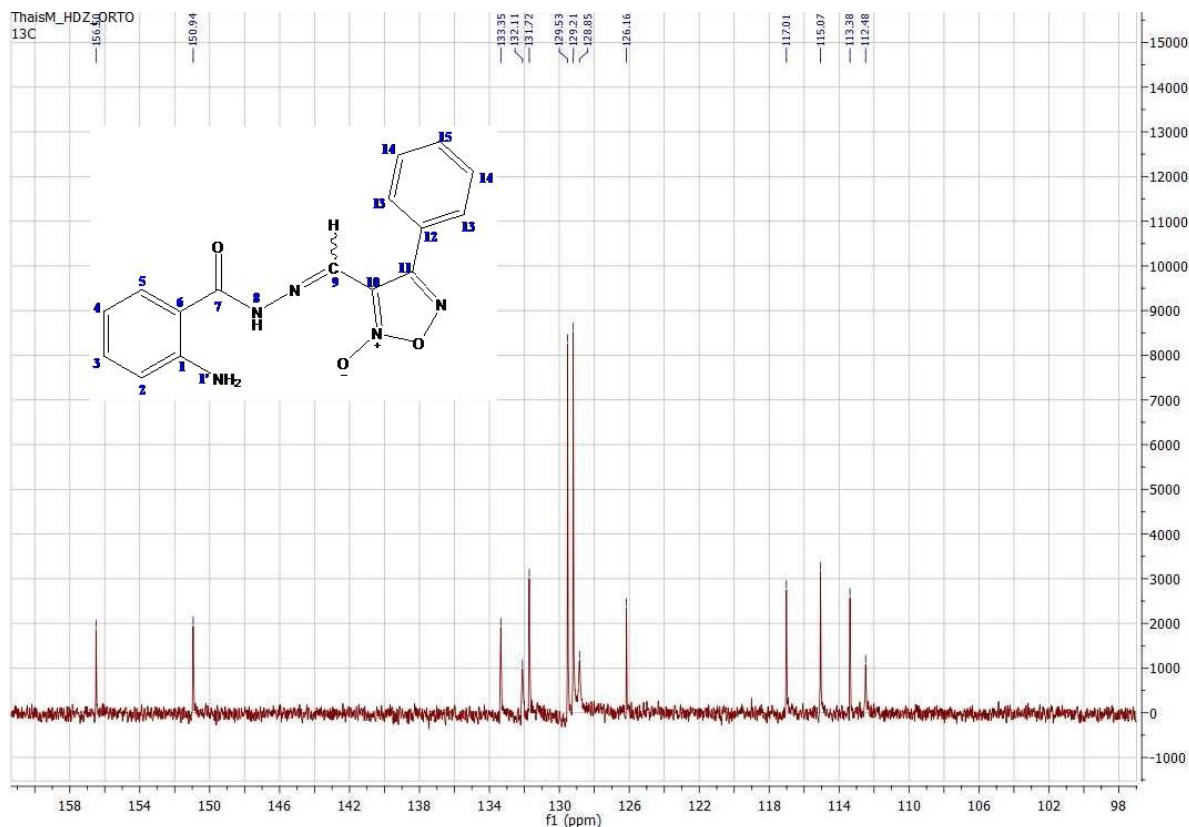
Espectro 2: Espectro de RMN ¹H do composto 6, (300 MHz, DMSO_{d6})



Espectro 3: Espectro de RMN ¹H do composto 7, utilizando como solvente(300 MHz, DMSO_{d6})



Espectro 4: Espectro de RMN ¹³C do composto 6 (75 MHz; DMSO_{d6})



Espectro 5: Espectro de RMN ^{13}C do composto 7 (75 MHz; DMSO- d_6)

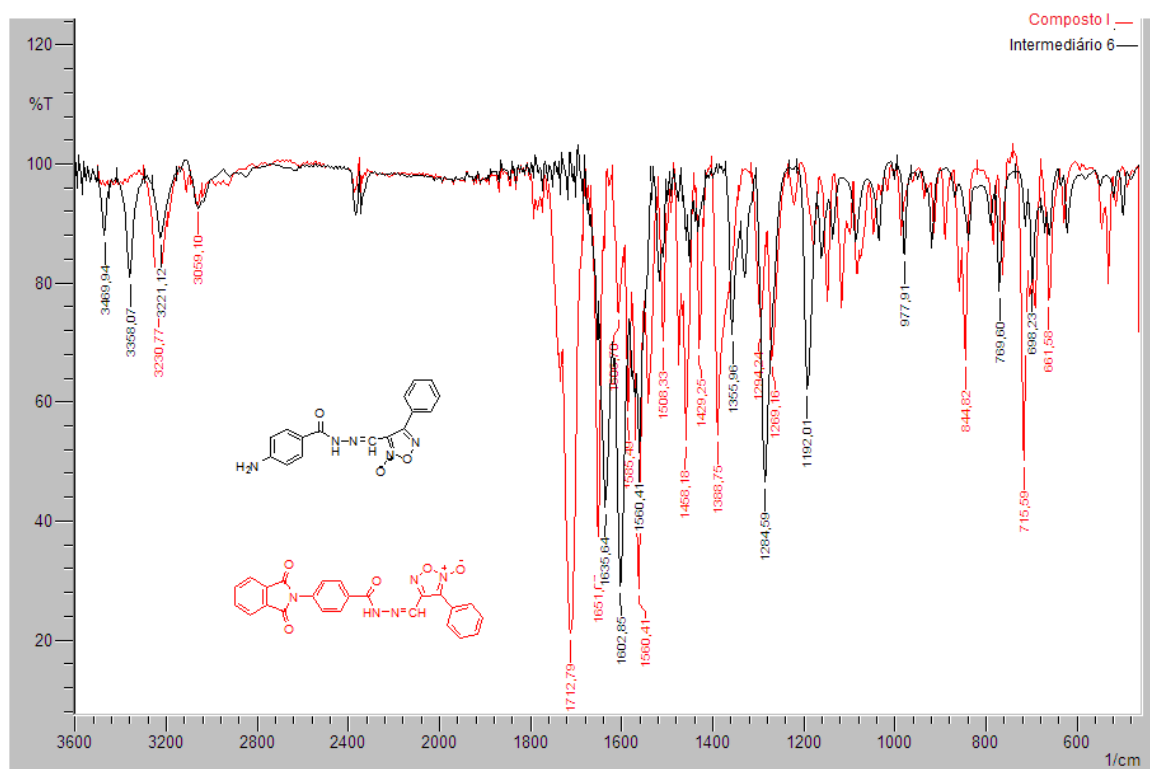
De acordo com dados descritos na literatura, baseados em estudos de RMN de ^1H e ^{13}C de *N*-acilidrazonas, a condensação ácido catalisada de hidrazidas com aldeídos leva a formação preferencial de *N*-acilidrazonas com configuração diastereoisomérica (*E*). Foi ainda descrito que o favorecimento da formação do distereoisômero (*Z*) só foi observado em derivados orto-piridínicos, provavelmente devido à formação de ligação-H intramolecular entre o átomo de nitrogênio piridínico e o hidrogênio da função amida do grupo *N*-acilidrazona. Desta forma, com base nos deslocamentos químicos característicos dos prótons imínicos de derivados *N*-acilidrazônicos descritos por Palla (PALLA et al., 1982; PALLA, GERARDO et al., 1986) e outros trabalhos (CUNHA et al., 2002; LIMA et al., 2000; PEREIRA et al., 1998), pôde-se propor que os sinais referentes aos hidrogênios imínicos de todos os intermediários e compostos finais sintetizados neste trabalho eram referentes aos diastereoisômeros com a configuração relativa (*E*), uma vez que se encontram deslocados para campo mais baixo do que δ 8,10 nos espectros de RMN ^1H , porém

a confirmação inambígua de qual diastereoisomero foi formado poderia ser comprovada, por exemplo, por cristalografia de raio-x, visto que os deslocamentos químicos podem sofrer influência de substituintes diferentes, solventes e de outros fatores.

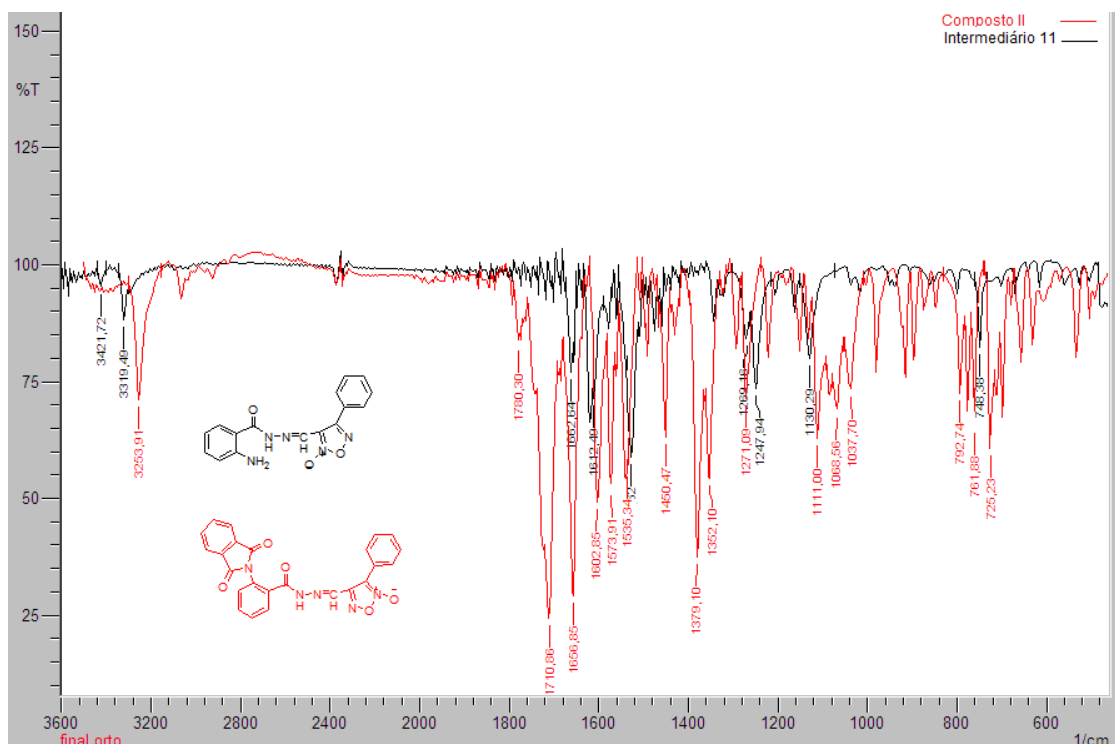
6.1.3. Síntese dos compostos finais I e II

A síntese dos compostos finais I e II se deu pelo acoplamento dos intermediários (6) e (7) com o anidrido ftálico utilizando EDC como agente acoplante e DMAP como catalisador. Os produtos I e II foram obtidos com rendimentos de 55% e 47%, respectivamente, após a purificação por coluna cromatográfica.

Os compostos I e II foram caracterizados por infravermelho, RMN H^1 , C^{13} e espectrometria de massas. No espectro na região do infravermelho, a principal modificação observada é a presença dos estiramentos axiais simétricos e assimétricos das carbonilas do sistema imídico da ftalimída que aparecem em 1740 e 1712 cm^{-1} (composto I) e 1780 e 1710 cm^{-1} (composto II) e ausência do estiramento dos estiramentos da amina primária, melhor observado na sobreposição dos espectros (Espectros 6 e 7).



Espectro 6: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (6) e final (I) (pastilha de KBr)

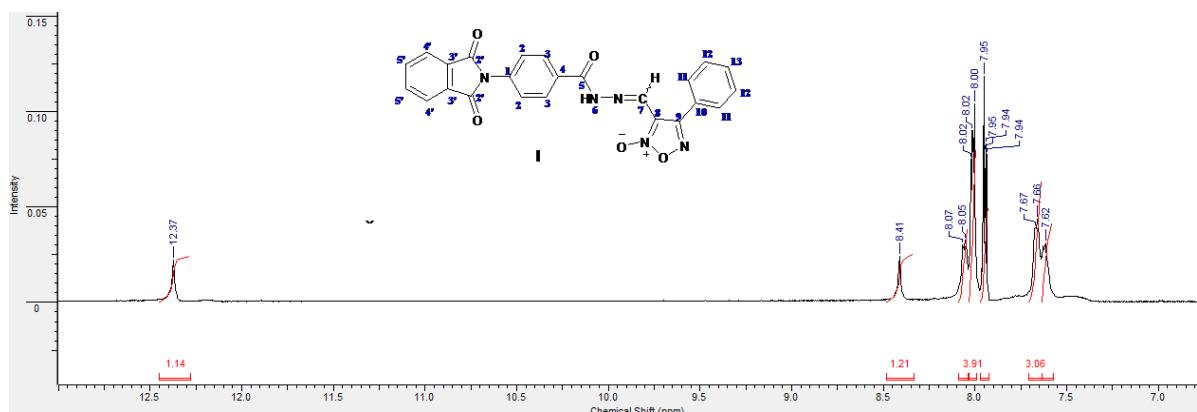


Espectro 7: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (7) e final (II) (pastilha de KBr).

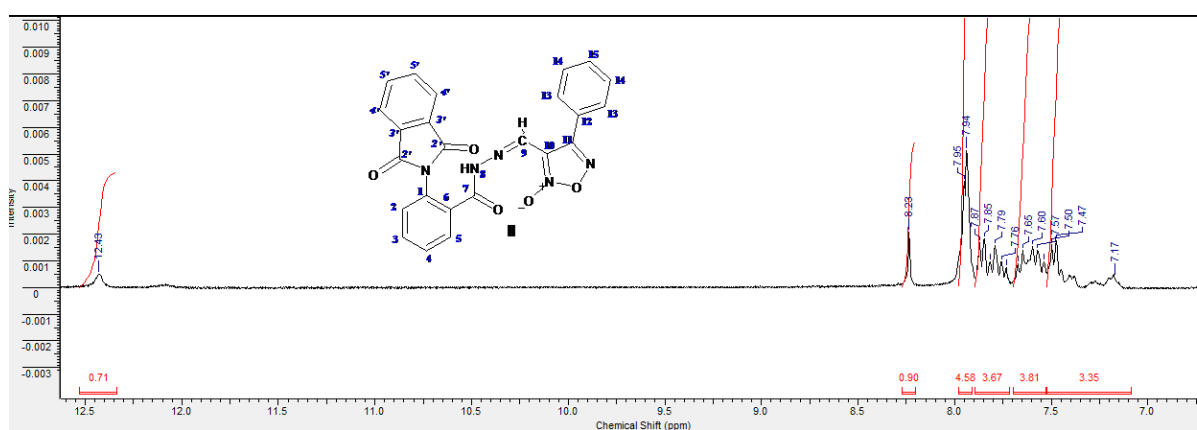
De acordo com dados da literatura, os estiramentos associados à presença do anel furoxânico aparecem em aproximadamente 1600 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} , entretanto, nos espectros apresentados não pode ser destacado de forma inequívoca por ser esta uma região de impressão digital, onde aparecem também vários outros estiramentos como os estiramentos axiais carbono-carbono aromáticos (BOYER et al., 1986).

A análise dos espectros 8 e 9 de RMN de hidrogênio dos produtos I e II permitiu visualizar os simpletos das amidas em $\delta 12,37$ (1H) e $\delta 12,43$ (1H) ppm e o hidrogênio da imina em $\delta 8,41$ (1H) e $\delta 8,23$ (1H) ppm, respectivamente. O multipletto com integração para quatro hidrogênios em $\delta 8,01$ para o composto I e $\delta 7,94$ para o composto II foi atribuído aos hidrogênios do anel ftalimídico conforme descrito na literatura (LIMA et al., 2002). Os hidrogênios aromáticos apresentam-se como multipletos na região entre $\delta 7,8$ - $\delta 7,1$ ppm, sendo difícil a distinção entre os eles, porém a integração dos mesmos é condizente com o número de hidrogênios

(espectro 33 ampliado, anexos). Foi possível distinguir os hidrogênios do anel aromático do furoxano mais desprotegidos em δ 8,06 com constante de acoplamento $J=7,79$ Hz e os hidrogênios mais protegidos vizinhos a amida em δ 7,61.



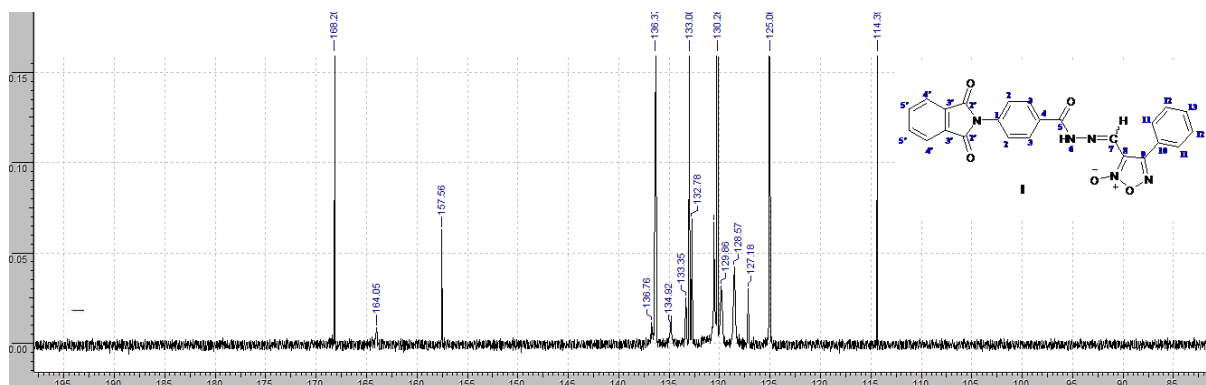
Espectro 8: Espectro de RMN ^1H do composto I, (300 MHz, DMSO-d_6)



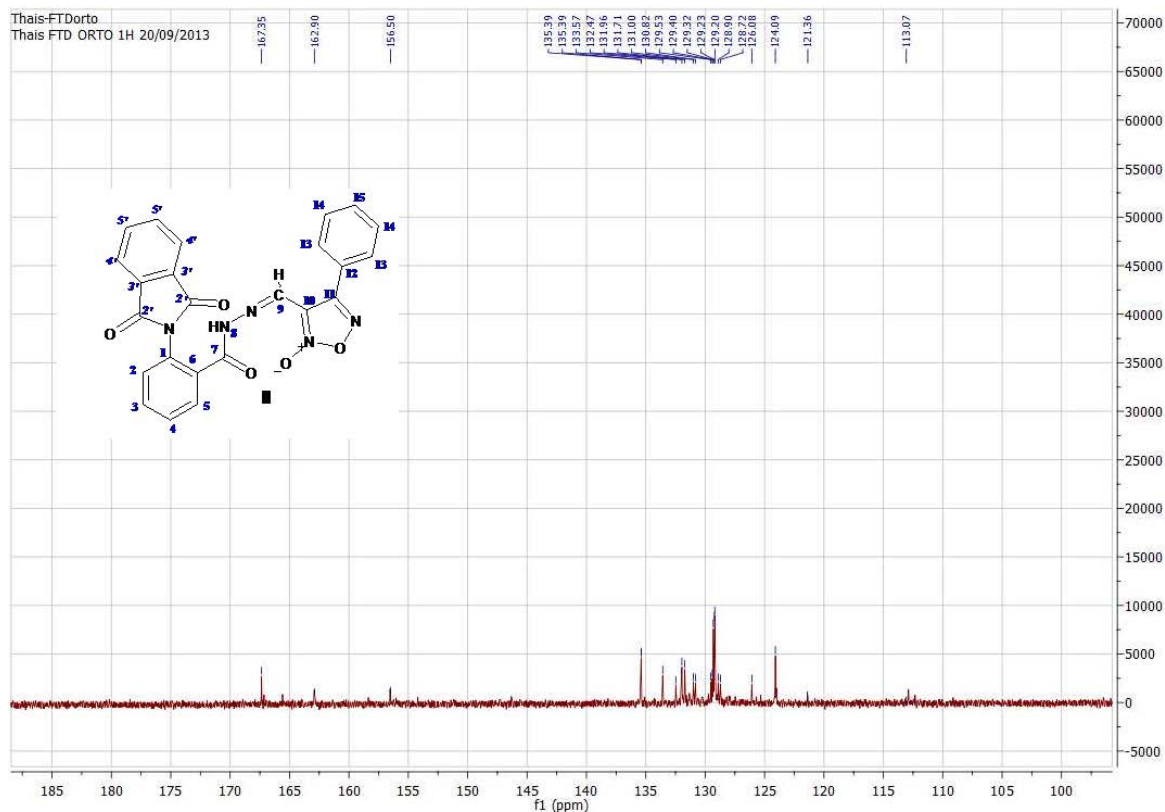
Espectro 9: Espectro de RMN ^1H do composto II, (300 MHz, DMSO-d_6)

Nos espectros 10 e 11 de RMN ^{13}C observam-se as carbonilas do sistema ftalimídico em δ 167,28 ppm (composto I) e δ 168,20 ppm (composto II). Os carbonos do anel aromático ftalimídico também podem ser observados nos deslocamentos químicos dos carbonos em δ 136,37 / δ 125,06 e δ 135,39 / δ 124,09

ppm, além disso, os deslocamentos do núcleo furoxânico estão presentes em δ 157,56 / δ 114,39 e δ 156,21 / δ 112,88 ppm, para os compostos I e II, respectivamente. O carbono da carbonílico da amida apresenta-se em δ 164,05 e δ 163,03, ademais o carbono imínico tem seu deslocamento em δ 134,92 e δ 133,59.

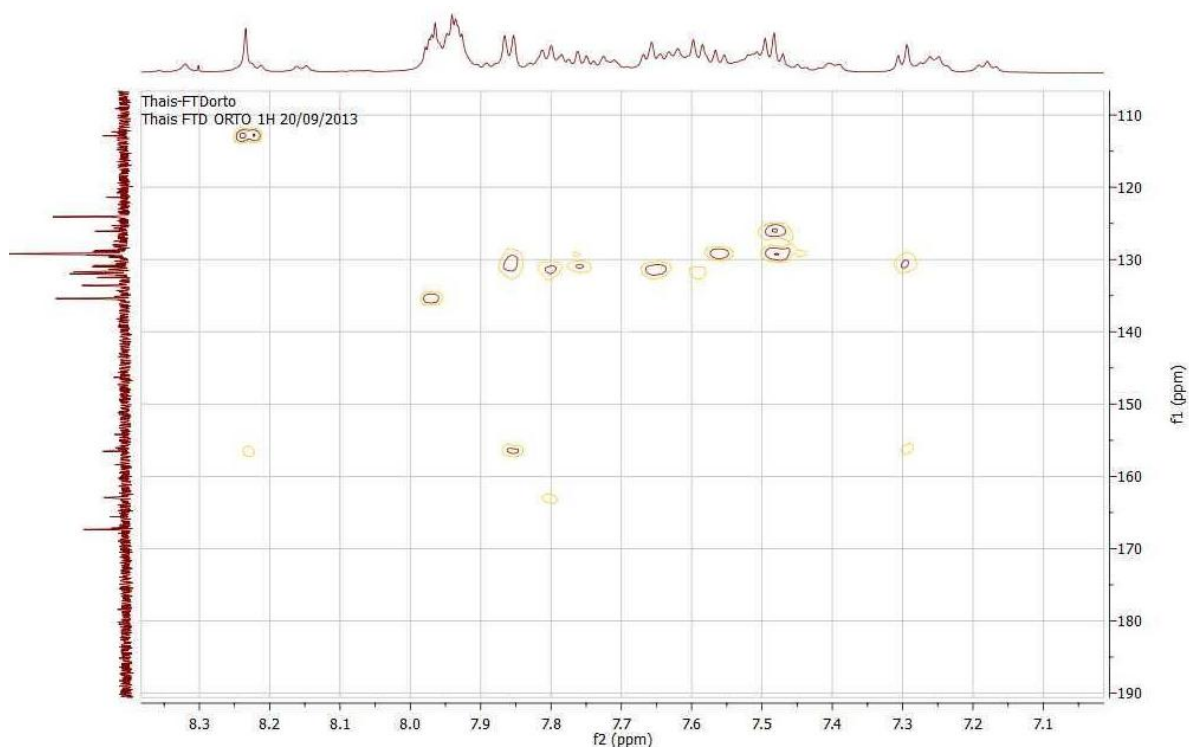


Espectro 10: Espectro de RMN ^{13}C do composto I, utilizando como solvente (75 MHz DMSO-d_6)



Espectro 11: Espectro de RMN ^{13}C do composto II, utilizando como solvente (75 MHz DMSO-d_6)

No espectro 12 de HMBC do composto II visualiza-se o acoplamento do hidrogênio da imina (δ 8,23 ppm) com o carbono mais protegido (δ 114,39 ppm) do furoxano, evidenciando o posicionamento do *N*-óxido ligado a este carbono.



Espectro 12: Espectro de RMN HMBC do composto II (75 MHz DMSO_d₆)

Nas tabelas 1 e 2 podemos comparar os deslocamentos dos intermediários 6 e 7 com os produtos finais I e II. É possível observar que os hidrogênios pertencentes a imina e aos anéis aromáticos estão presentes nas estruturas dos intermediários e produtos finais, porém houve variação do deslocamento químico de quase todos esses hidrogênios, devido ao efeito de desproteção gerado pela introdução do núcleo ftalimídico nos produtos finais.

Tabela 1: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 6 e produto final I.

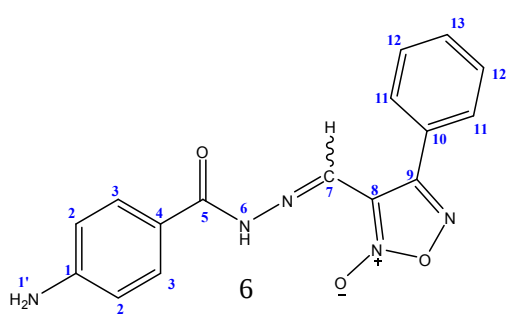
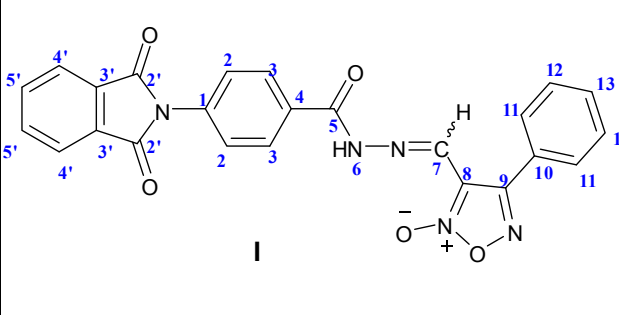
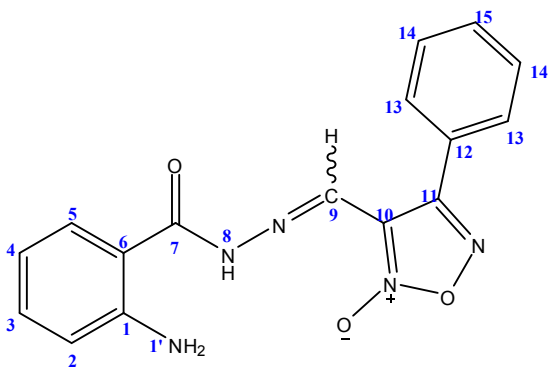
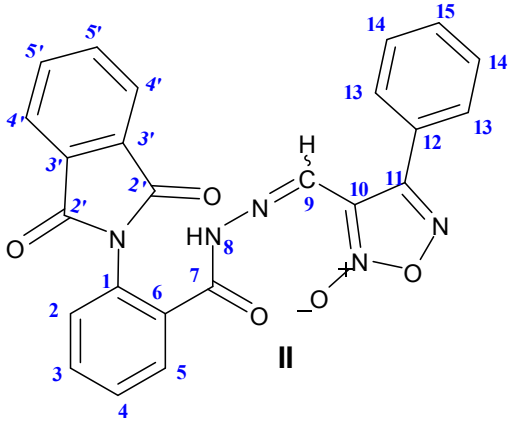
 (6)			 I Composto I	
Posição	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)
1	-	118,72	-	-
2	6,58 (dd)	113,05	7,62 (d)	128,57
3	7,66-7,54 (m)	131,67	8,06 (m)	136,37
4	-	-	-	-
5	-	153,22	-	164,05
6	11,88 (s)	-	12,37 (s)	-
7	8,31 (s)	131,09	8,41 9 (s)	134,92
8	-	113,48	-	114,39
9	-	156,48	-	157,56
10	-	-	-	127,18
11	7,97 (d)	129,51	8,06 (d)	130,26
12	7,66-7,54 (m)	129,19	7,66 (m)	129,86
13	7,66-7,54 (m)	130,22	7,66 (m)	133,00
1'	-	-	-	-
2'	-	-	-	168,20
3'	-	-	8,01 (m)	130,53
4'	-	-	8,01 (m)	125,06
NH ₂	5,9 (s)	-	-	-

Tabela 2: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 7 e produto final II.

 (7)			 Composto II	
Posição	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)
1	-	-	-	-
2	6,57 (t)	116,86	7,50-7,17 (m)	123,95
3	6,75 (dd)	114,76	7,50-7,17 (m)	128,90
4	7,21 (tt)	133,35	7,50-7,17 (m)	131,96
5	7,63-7,52 (m)	128,71	7,87-7,73 (m)	130,82
6	-	-	-	-
7	-	151,01	-	162,90
8	12,02 (s)	-	12,43 (s)	-
9	8,28 (s)	132,28	8,23 (s)	133,57
10	-	112,88	-	113,07
11	-	156,56	-	156,50
12	-	126,46	-	-
13	7,96 (dd)	129,53	7,87-7,73 (m)	129,32
14	7,63-7,52 (m)	129,21	7,67-7,54 (m)	129,11
15	7,63-7,52 (m)	131,57	7,67-7,54 (m)	132,47
1'	-	-	-	-
2'	-	-	-	167,35
3'	-	-	-	-
4'	-	-	7,94 (m)	135,39
5'	-	-	7,94 (m)	124,09
NH ₂	6,46 (s)	-	-	-

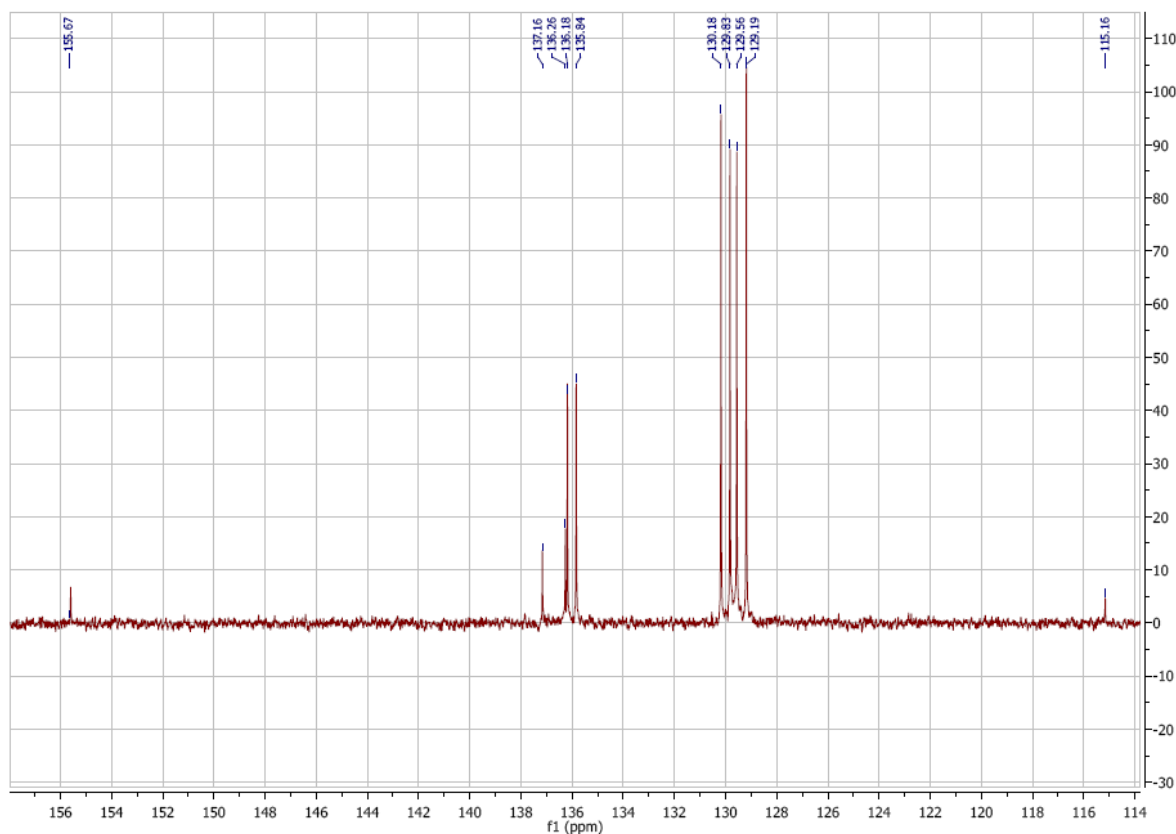
Os espectros de massas de alta resolução (micrOTOF ESI-TOF) , apresentaram o pico relativo ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ com valores de m/z de 476,0944, concordantes com o valor calculado de sua massa monoisotópica 453,1073 com base na fórmula empírica $C_{24}H_{15}N_5O_5$ para o íon molecular (espectros 42 e 49, anexos) de ambos compostos (I e II), confirmando a obtenção destes produtos.

6.2. Síntese dos compostos 4-(4-((2-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (III) e 4-(3-((2-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (IV)

6.2.1. Síntese do 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (9).

Primeiramente o ácido feniltioacético (9) foi oxidado a sulfona (10) utilizando excesso de peróxido de hidrogênio 30%. Em seguida utilizando uma mistura de ácido nítrico 98% e ácido acético glacial obtém-se o derivado bisarilsulfonilfuroxânico (11) em rendimento de 56% como um sólido com faixa de fusão entre 140-142°C (FARRAR, 1964). O mecanismo reacional não é descrito na literatura, mas acredita-se que esse explora a reatividade do carbono metilênico que deve sofrer uma reação de descarboxilação com mecanismo semelhante às reações pericíclicas.

O espectro 13 de RMN de ^{13}C mostra os deslocamentos dos carbonos heteroaromáticos da subunidade furoxânica em δ 115,16 e δ 155,67. Novamente, o efeito de ressonância explica a maior proteção de carbono ligado ao N-óxido, conforme já discutido. Já os carbonos do grupo fenila apresentam os seguintes deslocamentos químicos: δ 137,16; δ 136,26; δ 136,18 ; δ 135,84 ; δ 130,18 e δ 129,83 ppm.



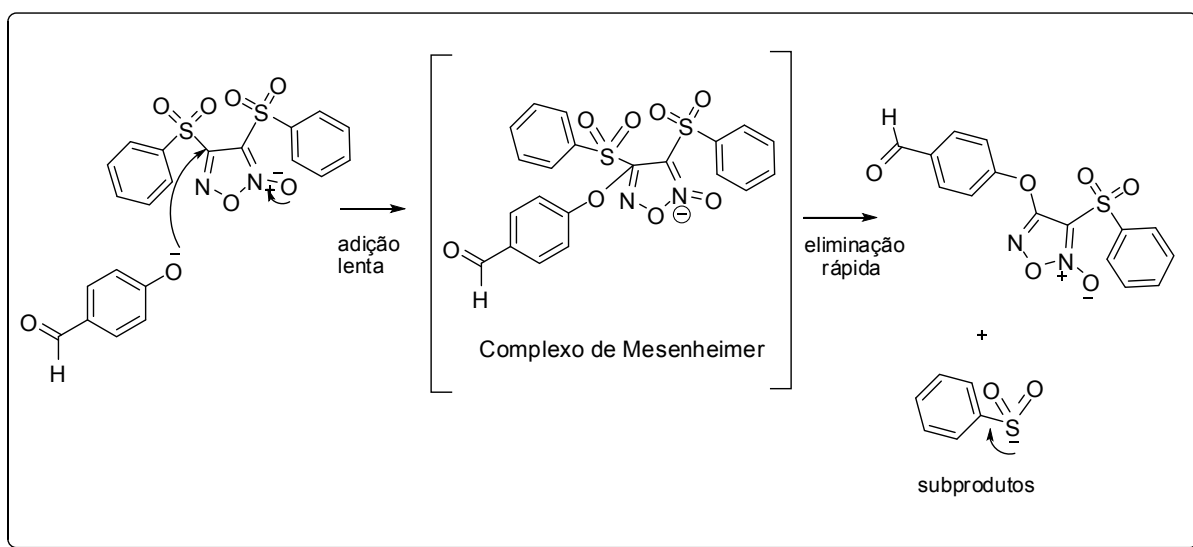
Espectro 13: Espectro de RMN de ^{13}C de 3,4-bis(phenylsulfonyl)-2-N-oxide-1,2,5-oxadiazole (11) (75 MHz; CDCl_3).

O espectro de massas de alta resolução (microTOF ESI-TOF) (Espectro 43, anexos) no modo positivo apresentou picos relativos ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com valor de m/z de 388,98, que são consistentes com o valor de massa monoisotópica de 366,0987 calculado com base na fórmula empírica $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$. Esses dados permitem caracterizar este produto como pertencente à classe de 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido.

6.2.2. Síntese dos intermediários furoxânicos 12 e 13

O 3,4-*bis*(fenilsulfonyl)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol foi reagido com o 4-hidroxibenzaldeído, em meio básico, para formação do intermediário 12 e com o 2-hidroxibenzaldeído para formação do intermediário 13. A função fenol em meio fortemente básico (DBU), é desprotonado transformando-se em um fenóxido que atua como nucleófilo, inicialmente se adicionando ao carbono heteroaromático, para

posteriormente eliminar a sulfona que pode se decompor em SO₂ e benzeno. O mecanismo desta reação é uma adição-eliminação e envolve a formação de carbânion com elétrons delocalizados (complexos de Meisenheimer) (Esquema 7).



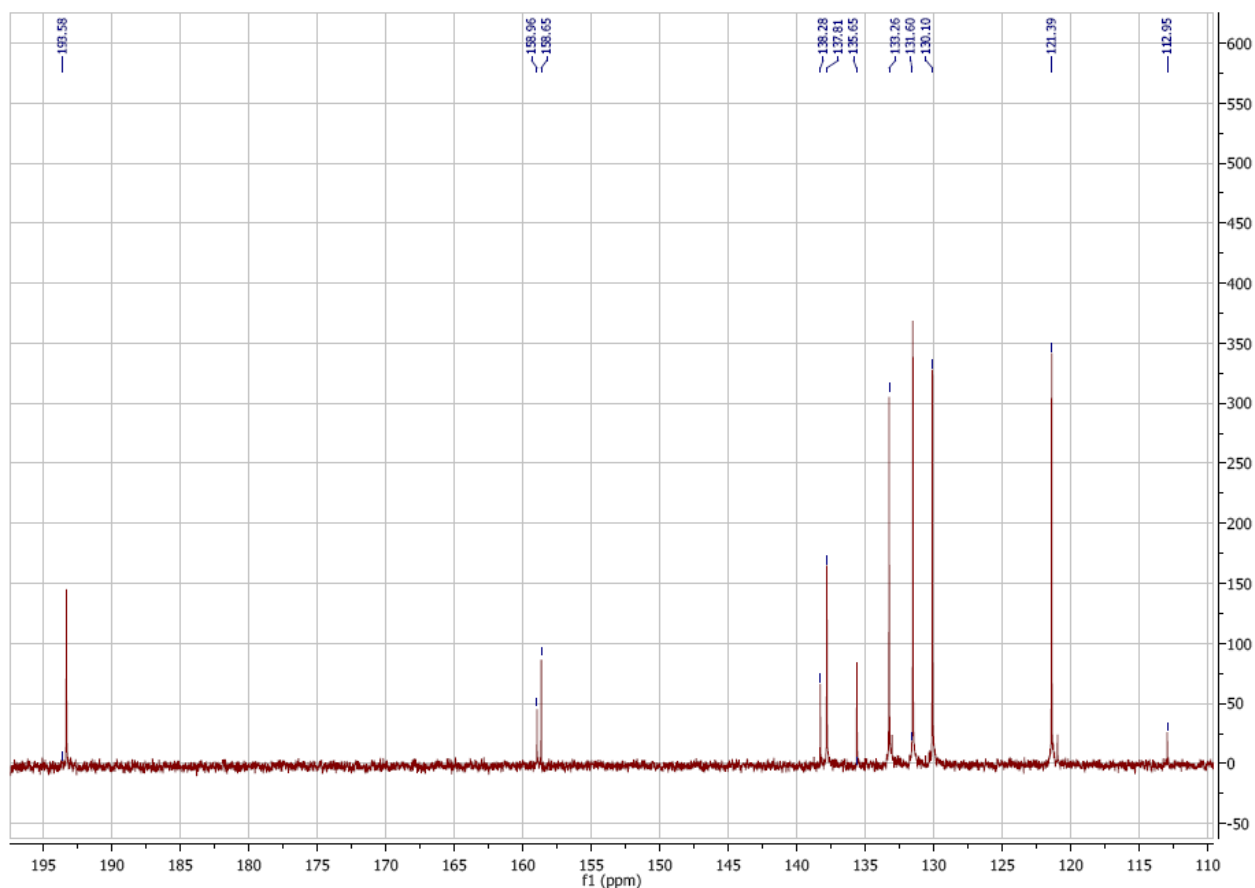
Esquema 7: Mecanismo de formação dos intermediários 12 e 13.

É importante ressaltar que o ataque do oxigênio (fenóxido) ocorre ao carbono que não sustenta a subunidade *N*-óxido, devido a sua maior desproteção, conforme discutido previamente.

Os compostos foram obtidos com rendimentos de 58% e 41%, após purificação por coluna cromatográfica. Os espectros de massas de alta resolução dos intermediários **12 e 13** obtidos pelo modo de ionização positiva e apresentaram picos relativos aos adutos de hidrogênio e de sódio $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ com valores de m/z de 347,0319 e 369,0137, que são consistentes com os valores das massas monoisotópicas calculadas 346,0265 coma base na fórmula na empírica C₁₅H₁₀N₂O₆S⁻ desses compostos (Espectros 47 e 51).

O espectro de RMN de ¹³C do intermediário 12 apresentou onze sinais, para os quais se destacam em δ 112,95 ppm e δ 158,65 ppm atribuídos aos carbonos do anel furoxânico (Espectro 14). Esses dois sinais juntamente com o simpleto em δ 10,03 (1H) referente ao hidrogênio do aldeído no espectro de RMN ¹H e as bandas

em 2.852 cm^{-1} e 2.922 cm^{-1} no espectro de IV, sugerem a obtenção do intermediário 12 como um derivado furoxânico contendo o grupo aldeído (Espectro 46).



Espectro 14: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12 (75 MHz; CDCl_3).

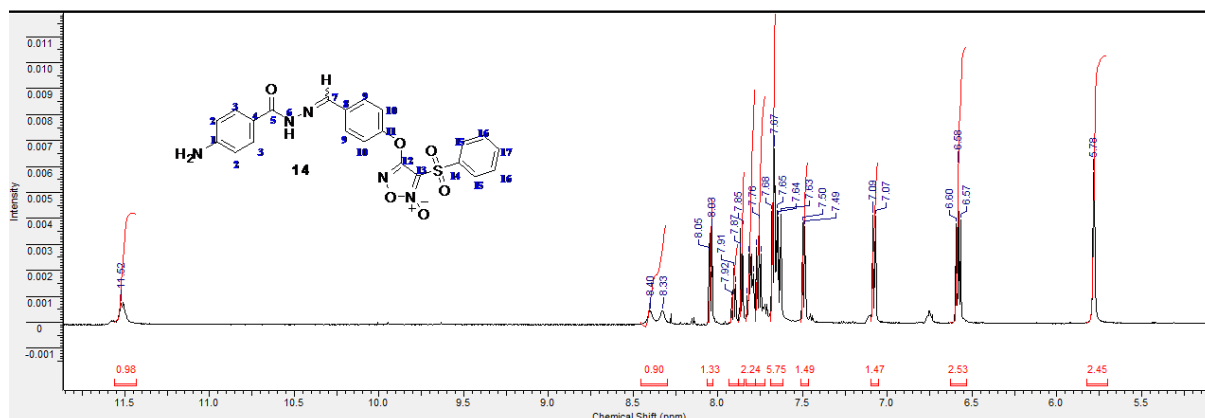
Já para o intermediário 13, os estiramentos observados no espectro de absorção na região de IV em 1.697 cm^{-1} , 2.762 cm^{-1} e 2.850 cm^{-1} (Espectro 48) juntamente com o sinal do espectro de RMN de ^1H em $\delta\text{H } 10,03$, confirmam a presença de um grupo aldeído (Espectro 49). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais em δ 110,68 e δ 153,38 ppm, referentes aos carbonos do anel furoxânico (Espectro 50). O espectro de RMN de ^1H apresenta um dubleto em δ 8,10 ppm pertencente aos hidrogênios mais desprotegidos do anel aromático ligado ao furoxano. Os demais sinais na região de aromáticos apresentam-se sobrepostos, mas a integração mostra a proporção referente a nove hidrogênios, sugerindo a obtenção do intermediário 13.

6.2.3. Síntese dos intermediários 14 e 15

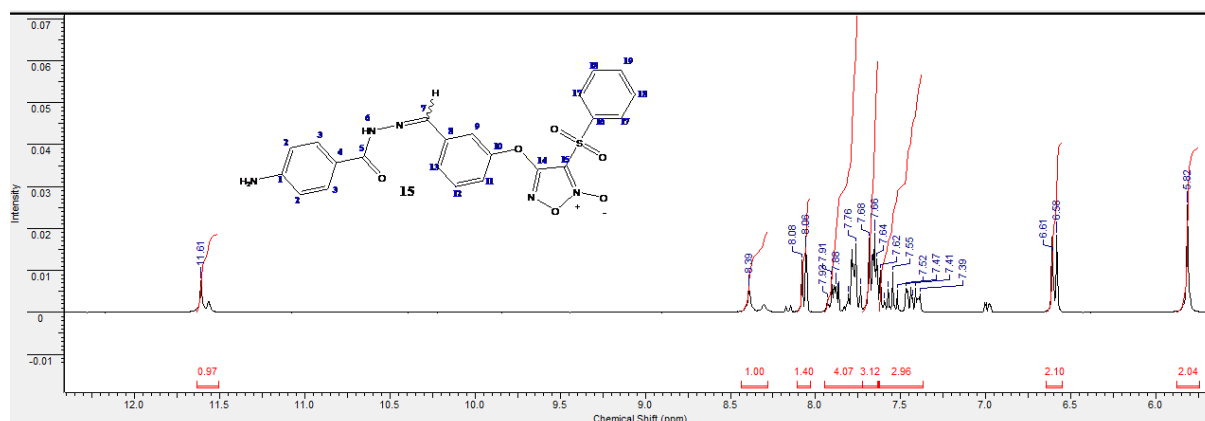
Os intermediários 14 e 15 foram sintetizados reagindo-se os intermediários 12 e 13 contendo a função aldeído, com a 4-aminobenzohidrazida para formação da *N*-acilhidrazona, conforme o mecanismo discutido anteriormente.

Os intermediários 14 e 15 foram obtidos com rendimentos de 58 e 41%, respectivamente. No espectro obtido na região do infravermelho, os estiramentos referentes às deformações axiais assimétricas e simétricas de N-H aparecem em 3454 e 3358 cm^{-1} e o estiramento em 1635 cm^{-1} indica a presença do estiramento referente à deformação da ligação C=O. No RMN de ^1H do composto **14** (Espectro 15) é possível observar o simpleto da amina primária integrando para dois hidrogênios em δ 5,78 ppm e para **15** (Espectro 16) em δ 5,82ppm. O simpleto mais deslocado em δ 11,52 e 11,61 ppm, juntamente com o simpleto da imina com deslocamento em δ 8,33 ppm e em δ 8,4 ppm para os compostos 14 e 15, respectivamente, caracterizam a *N*-acilhidrazona e os respectivos carbonos podem ser visualizados também no espectro de HMBC (Espectros 54 e 57 anexos) sendo em δ 152,92 e δ 153,26 o deslocamento dos carbonos carbonílicos. Em δ 144,96 e δ 145,02 ppm, visualiza-se os deslocamentos dos carbonos imínicos para os compostos 14 e 15, respectivamente.

Dentre os hidrogênios aromáticos é possível distinguir o hidrogênio mais protegido no anel 1,4 dissustituído em δ 6,58 aparecendo como um tripleto no espectro do intermediário 14, pois acopla com os hidrogênios da amina, como visualizado no espectro de HMBC, já os hidrogênios do intermediário 15 apresentam-se como um duplete em δ 6,6.

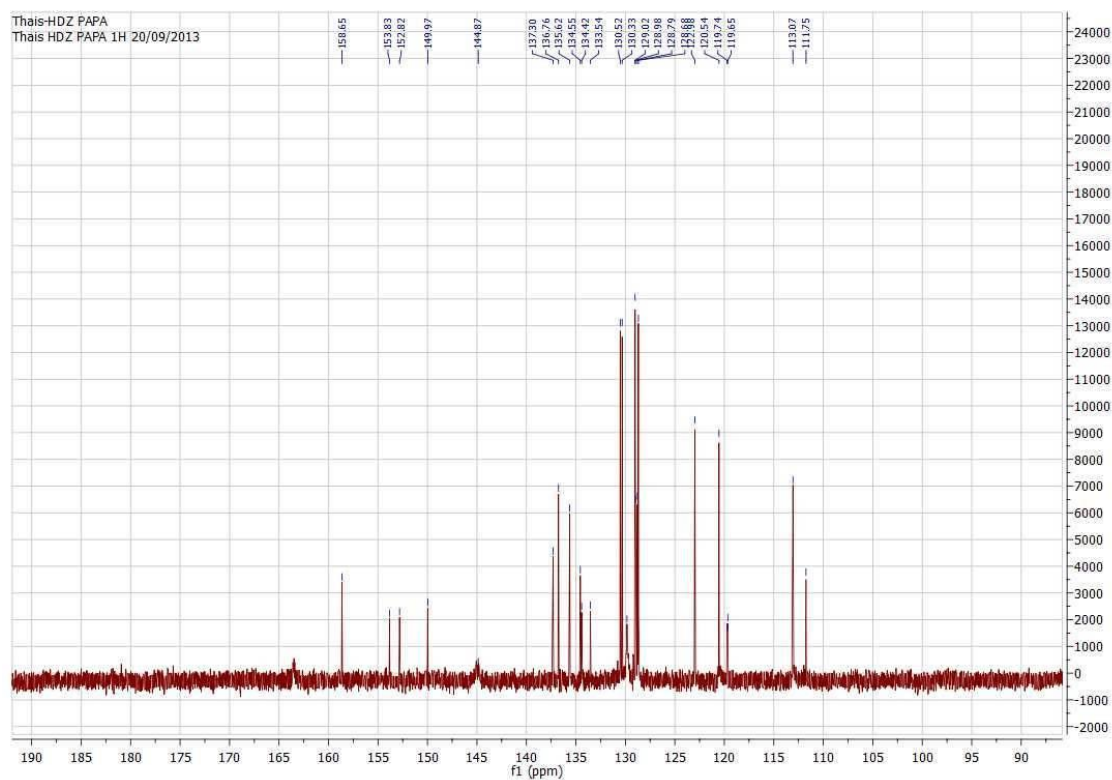


Espectro 15: Espectro de RMN de ^1H do composto 14 (300 MHz; DMSO-d₆).

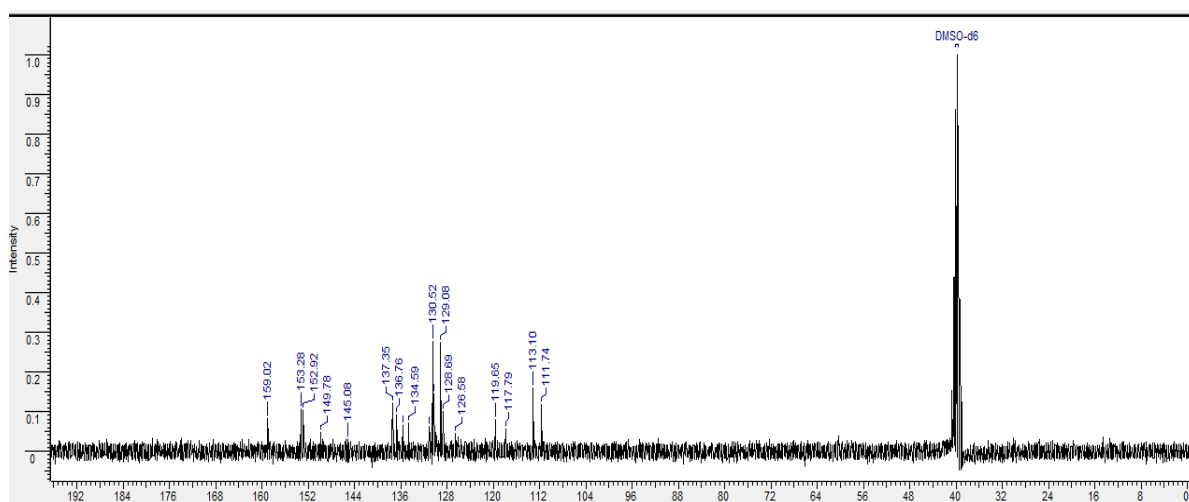


Espectro 16: Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (300 MHz; DMSO-d₆).

Os carbonos do núcleo furoxânico (Espectro 17 e 18) apresentam seus deslocamentos em δ 158,65; δ 111,13 ppm (intermediário 14) e δ 159,02; δ 111,74 ppm (intermediário 15). Os carbonos referentes ao anel aromático aparecem com deslocamentos muito próximos, tornando difícil a diferenciação de seus sinais, mesmo com os espectros bidimensionais, porém a caracterização por espectroscopia de massas de alta resolução obtida pelo modo de ionização positiva apresentou o pico relativo ao aduto de sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ com valor de m/z de 502,0765, que é consistente com o valores calculado 479,0899 com a base na fórmula na empírica $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$ desses compostos, confirmando a formação dos mesmos (Espectro 58)



Espectro 17: Espectro de RMN C^{13} do composto 14 (75 MHz $DMSO-d_6$)

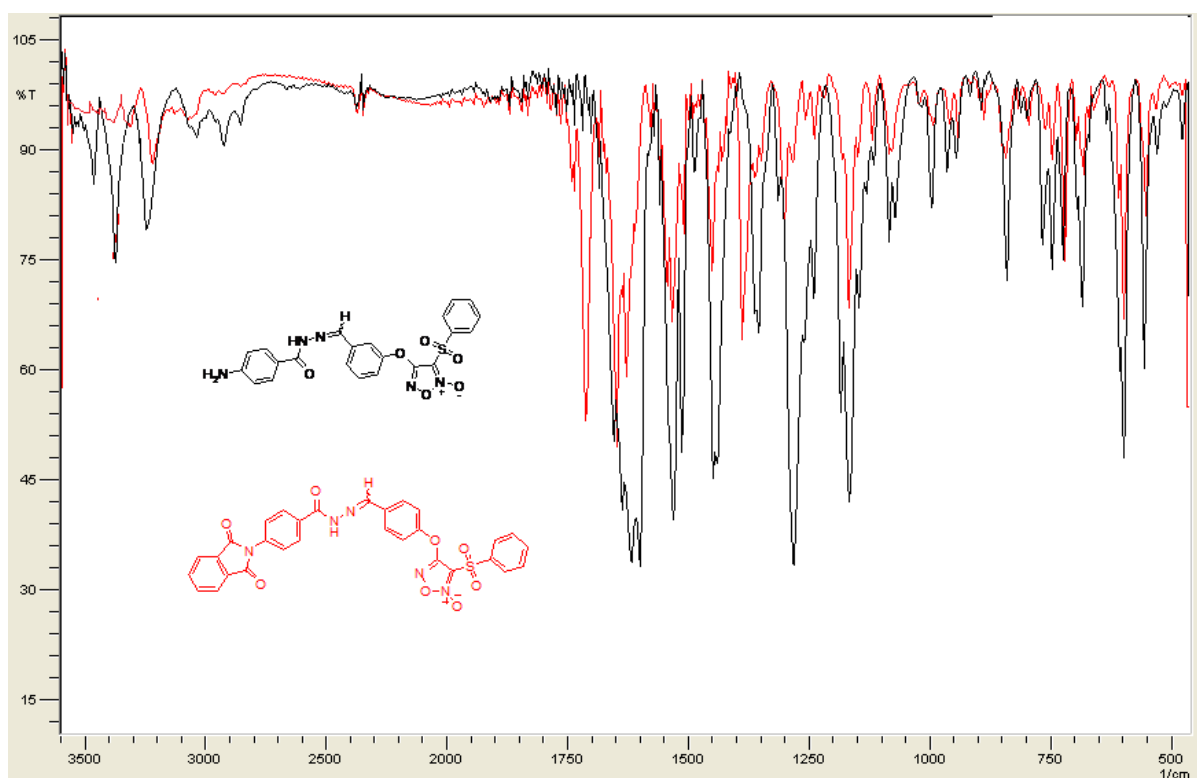


Espectro 18: Espectro de RMN C^{13} do composto 15 (75 MHz $DMSO-d_6$)

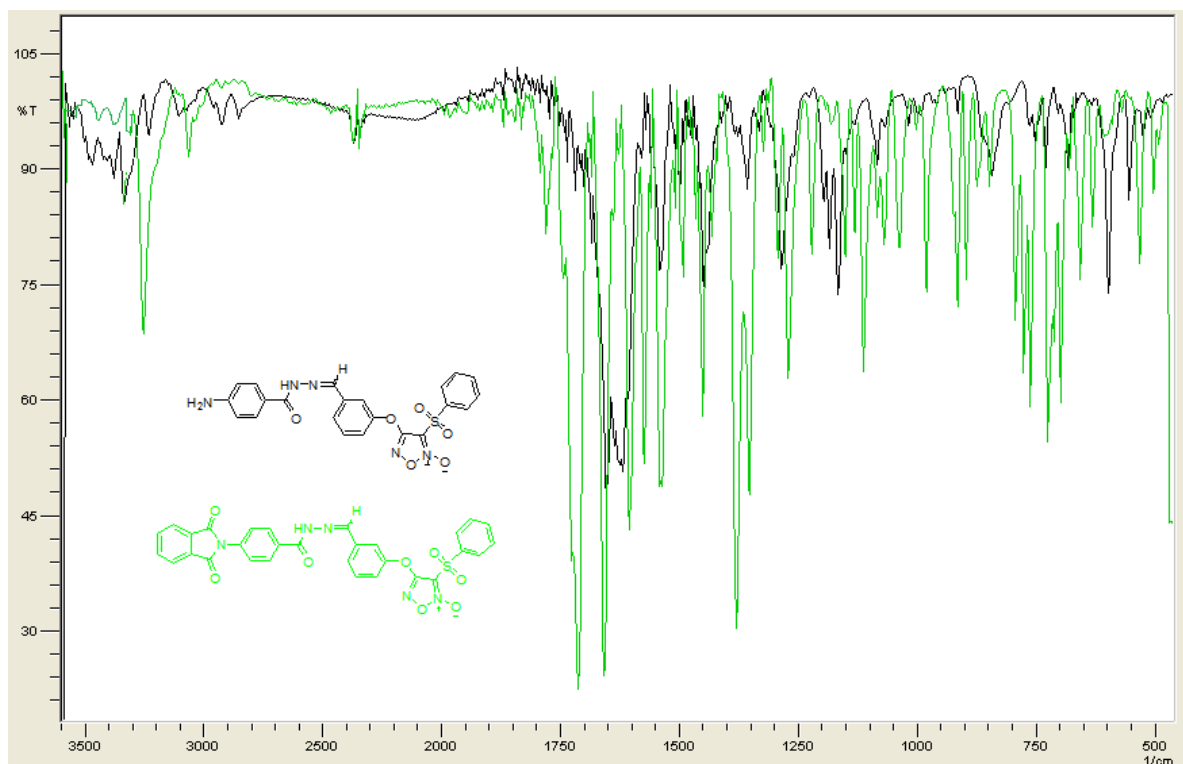
6.2.4. Síntese dos compostos finais III e IV

A síntese dos compostos finais III e IV se deu pelo acoplamento nos intermediários (14) e (15) com o anidrido ftálico utilizando EDC como agente acoplante e DMAP como catalisador.

Nos espectros de infravermelho observa-se a presença da banda de N-H em 3268 e 3292 cm^{-1} para os compostos III e IV, respectivamente e a principal modificação observada é a presença dos estiramentos axiais simétricos e assimétricos das carbonilas do sistema imídico da ftalimída que aparecem em 1774 e 1743 cm^{-1} (composto III) e 1782 e 1744 (composto IV) e ausência do estiramento dos estiramentos da amina primária, melhor observado na sobreposição dos espectros (Espectro 19 e 20).



Espectro 19: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (14) e final (III) (pastilha de KBr).



Espectro 20: Sobreposição dos espectros na região do infravermelho do intermediário (15) e final (IV) (pastilha de KBr).

As tabelas 3 e 4 comparam os deslocamentos dos intermediários 14 e 15 com os produtos finais III e IV. É possível observar que os hidrogênios e carbonos pertencentes a imina, aos anéis aromáticos e do núcleo furoxânico estão presentes nas estruturas dos intermediários e produtos finais, porém ocorreu deslocamento químico de quase todos esses hidrogênios, devido ao efeito de desproteção gerado pela introdução da subunidade ftalimídica nos produtos finais. Destaca-se o desaparecimento do sinal da amina primária no produto final em δ 5,78 e δ 5,82 e o aparecimento dos hidrogênios aromáticos da ftalimida na região de δ 8,00 e dos seus carbonos em 127,20 e 123,66 (composto III) e 128,77 e 124,50 (composto IV).

Os espectros de massas de alta resolução destas substâncias (Espectros 64 e 70) apresentaram o pico relativo ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ com valor de m/z de 632,08, que são condizentes com os valores de massa monoisotópica calculada de 609,0954 com base na fórmula empírica $C_{30}H_{19}N_5O_8S$ desses compostos.

Os produtos finais III e IV foram obtidos com 30% e 25% de rendimento, respectivamente, após a purificação por coluna cromatográfica e contém a subunidade furoxânica tida como doadora de óxido nítrico e a subunidade ftalimídica – inibidora da síntese de TNF-alfa.

Tabela 3: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 14 e produto final III.

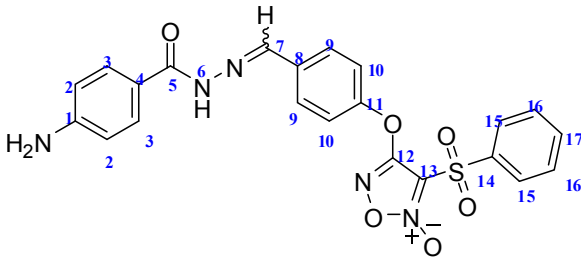
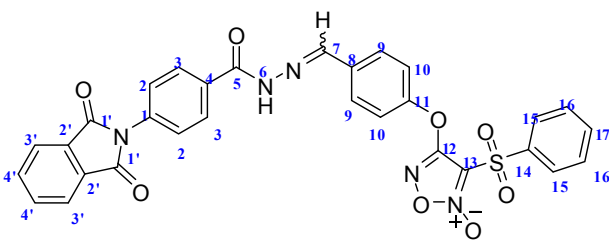
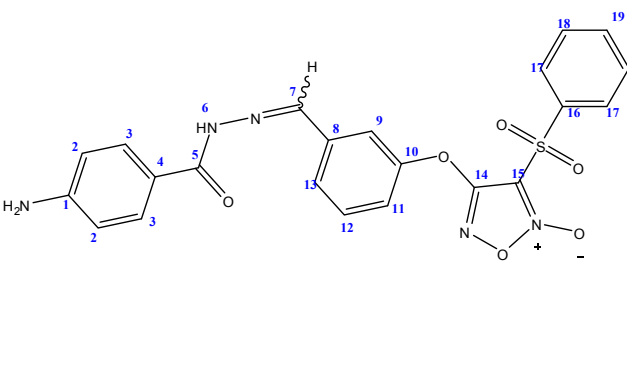
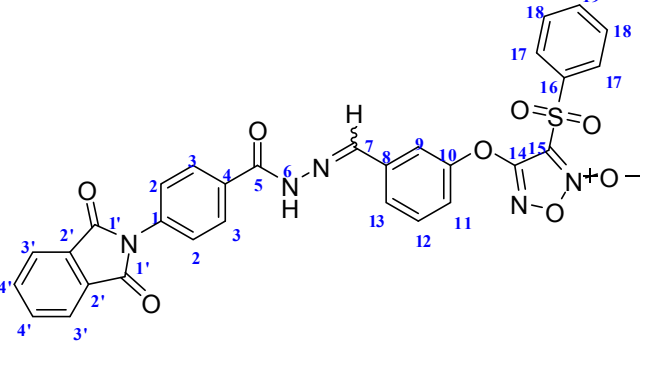
					
(14)			Composto III		
Posição	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)	
1	-	119,65	-	-	
2	6,56 (t)	113,07	7,54 (dd)	120,23	
3	7,76 (m)	130,51	7,94-7,90 (m)	134, 98	
4	-	-	-	-	
5	-	152,82	-	162,82	
6	11,52(s)	-	12,05 (s)	-	
7	8,33(s)	144,96	8,49(s)	146,84	
8	-	-	-	-	
9	7,70-7,65(m)	129,91	7,87 (m)	130,16	
10	7,56(dd)	120,54	7,64 (d)	120,20	
11	-	-	-	132,70	
12	-	158,65	-	158,24	
13	-	111,75	-	111,42	
14	-	-	-	136,92	
15	8,04 (dd)	128,98	8,05 (dd)	129,00	
16	7,70-7,65 (m)	128,57	7,77 (m)	128,68	
17	7,91(ttt)	136,75	7,94-7,90(m)	136,41	
1'	-	-	-	166,88	
2'	-	-	-	-	
3'	-	-	8,05(dd)	128,35	
4'	-	-	8,01 (dd)	123,66	
NH ₂	5,72 (s)	-	-	-	

Tabela 4: Comparação dos deslocamentos químicos do intermediário 15 e produto final IV.

 (15)			 Composto IV		
Posição	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (δ)	
1	-	-	-	-	
2	6,6(dd)	113,10	7,56(m)	121,50	
3	7,69-7,65 (m)	130,34	7,96-7,92(m)	135,37	
4	-	-	-	-	
5	-	153,26	-	167,26	
6	11,61(s)	-	12,09 (s)	-	
7	8,4(s)	145,08	8,50(s)	147,11	
8	-	-	-	137,35	
9	7,94-7,49(m)	117,79	7,85- 7,77(m)	118,11	
10	-	-	-	-	
11	7,60-7,40(m)	119,65	7,73-7,64 (m)	-	
12	7,60-7,40(m)	126,58	7,73-7,64 (m)	127,61	
13	7,60-7,40 (m)	130,52	7,73-7,64 (m)	131,96	
14	-	-	-	153,33	
15	-	111,74	-	111,77	
16	-	134,59	-	-	
17	8,06 (dd)	129,08	8,09(m)	130,54	
18	7,69-7,65 (m)	128,69	7,85- 7,77(m)	129,09	
19	7,94-7,49 (m)	137,35	7,96-7,92(m)	136,78	
1'	-	-	-	167,26	
2'	-	-	-	-	
3'	-	-	8,09(m)	128,77	
4'	-	-	8,00 (m)	124,50	
NH ₂	5,82 (s)	-	-	-	

6.3. Detecção quantitativa de nitrito (Doação de óxido nítrico)

O óxido nítrico (NO) é um radical importante envolvido em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. O núcleo furoxânico (2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol) tem sido amplamente usado na síntese de compostos com importantes atividades farmacológicas, por apresentar capacidade de doação de NO. (GASCO et al., 2004).

Em meio aquoso o NO é muito instável e sua meia vida extremamente curta, formando íons nitrito e nitrato (DUSSE et al., 2003). Portanto, uma das formas de avaliar a capacidade de doação de óxido nítrico é pela quantificação de nitrito presente em solução. Um dos principais métodos de quantificação de nitrito para derivados furoxânicos é descrito por Sorba et al., 1997, e foi utilizado neste trabalho por ser um método prático e rápido para avaliação da capacidade dos derivados furoxânicos em doar óxido nítrico.

O mecanismo de doação de óxido nítrico pelos furoxanos ainda não é bem conhecido. MEDANNA e colaboradores (1994), propuseram que a doação de óxido nítrico se iniciaria pelo ataque da cisteína, presente no ensaio, ao carbono que liagado diretamente à subunidade *N*-óxido conforme representado na Figura 8. Porém o carbono liagado à subunidade *N*-óxido apresenta-se protegido, ou seja, enriquecido eletronicamente, dificultando a adição nucleofílica de um resíduo de cisteína, de acordo com a análise de dados de RMN de ^{13}C .

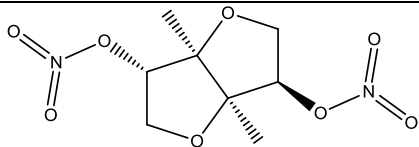
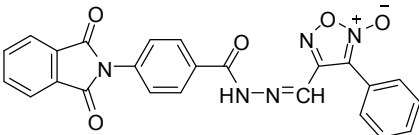
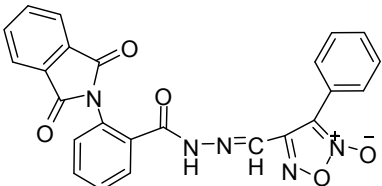
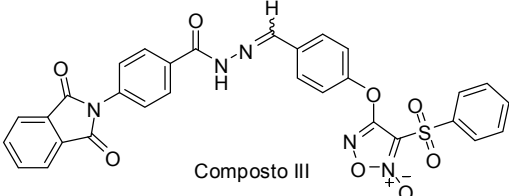
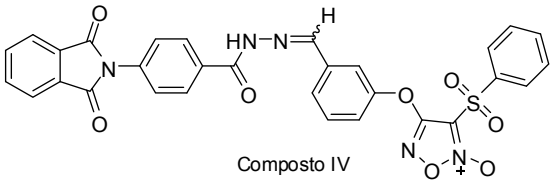
Cerecetto e colaboradores propõem que o ataque inicial do resíduo de cisteína se dá no nitrogênio da subunidade *N*-óxido, conforme representado na Figura 9, pois de acordo com cálculos de potencial eletrostático há maior deficiência eletrônica no nitrogênio *N*-óxido do núcleo furoxânico que no carbono que sustenta esse grupo.

A doação de óxido nítrico é benéfica no tratamento dos sintomas da anemia falciforme, pois esse mediador induz a produção de RNAm de gama globina, que culminará produzindo hemoglobina fetal. Sendo assim, o ensaio quantitativo de nitrito produzido no meio foi realizado a fim de se entender como a relação de

doação de NO pode interferir na capacidade das células em aumentar a expressão do RNAm de gama globina, considerando as diferentes características de doação de NO apresentadas pelos compostos.

As concentrações de nitrito foram determinadas através da curva analítica ($f(x) = 0,0372x + 0,0386$; $r^2 = 0,9992$) usando espectrofotômetro UV/visível na concentração compreendida entre 10-80 nmol/L, utilizando o Reagente de Griess. Os resultados, expressos em porcentagem de nitrito ($\pm$ E.P.M), são representados para cada composto na Tabela 5.

Tabela 5: Porcentagem de produção de Nitrito % (mol/mol)

Compostos	Ausência	% NITRITO (mol/mol) Cisteína 5 mmol
 dinitrato de isossorbida	0	12,6 $\pm$ 0,4
 Composto I	0	7,3 $\pm$ 0,2
 Composto II	0	6,7 $\pm$ 0,8
 Composto III	0	12,1 $\pm$ 0,3
 Composto IV	0	11,9 $\pm$ 0,6

De acordo com os dados da Tabela 5, pode-se observar que na ausência de cisteína nenhum composto foi capaz de doar óxido nítrico após 1 hora, mostrando que a doação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos é dependente da presença de grupos tióis, presentes, por exemplo na cisteína conforme é descrito na literatura (QING ZOU et al., 2011; MEDANA et al., 1999).

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

De acordo com a tabela 5 os compostos sintetizados (I-IV) que apresentaram maior perfil de geração de nitrito foram os compostos III e IV com valores de nitrito quantificados em 12 e 11%, respectivamente. Estas moléculas apresentam a subunidade arilsulfonil ligada ao carbono vizinho ao *N*-óxido, o qual é um grupo elétron-retirador, tornado esse átomo de carbono mais deficiente do ponto de vista eletrônico e mais suscetível ao ataque do nucleófilo (enxofre resíduo de cisteína). Assim, se pode confirmar que a capacidade de doação de NO se relaciona o substituinte do carbono ligado ao *N*-óxido conforme se havia observado em resultados prévios do nosso grupo (Santos, 2009). A maior doação de NO está diretamente relacionada à presença de grupos eletroatratores ligados a esse carbono (SORBA et al., 1997). Esses dados permitem inferir que os compostos obtidos neste trabalho apresentam diferentes perfis de doação de óxido nítrico.

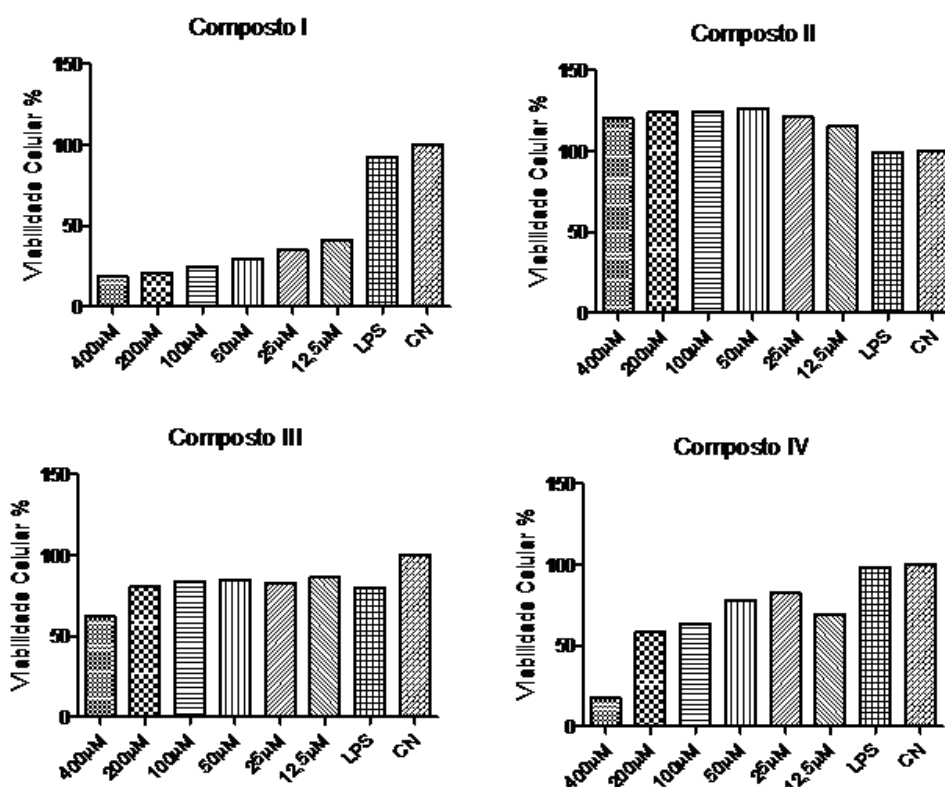
6.4. Viabilidade celular e doseamento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo vaso-oclusivo e de dor na anemia falciforme, contribuindo com o caráter inflamatório crônico da doença (MALAVÉ et al., 1993).

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

Foram testados no ensaio de viabilidade os compostos I-IV, nas concentrações de 400 μ M; 200 μ M; 100 μ M; 50 μ M; 25 μ M; 12,2 μ M (Figura 27). Foi considerado como satisfatória viabilidade igual ou superior a 70%.

Figura 27: Viabilidade celular em diferentes concentrações dos compostos I-IV. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle negativo (CN), equivalendo a 100% de viabilidade.



Os compostos II e III apresentaram em geral boa viabilidade celular, sendo considerados pouco citotóxicos. O composto II apresentou viabilidade em todas as concentrações testadas. Para o composto III foram consideradas viáveis todas as concentrações a partir de 200 μ M e para o composto IV a partir de 50 μ M. A exceção é feita ao composto I, que apresentou resultados com maior citotoxicidade, sendo que em nenhuma das concentrações testadas o composto mostrou-se viável.

Após a definição da viabilidade celular dos compostos sintetizados foi possível realizar o teste imunológico para determinação de TNF- α . Os compostos I-IV foram testados em três concentrações diferentes, as quais variam de acordo com o resultado obtido no ensaio de viabilidade celular (Figura 28):

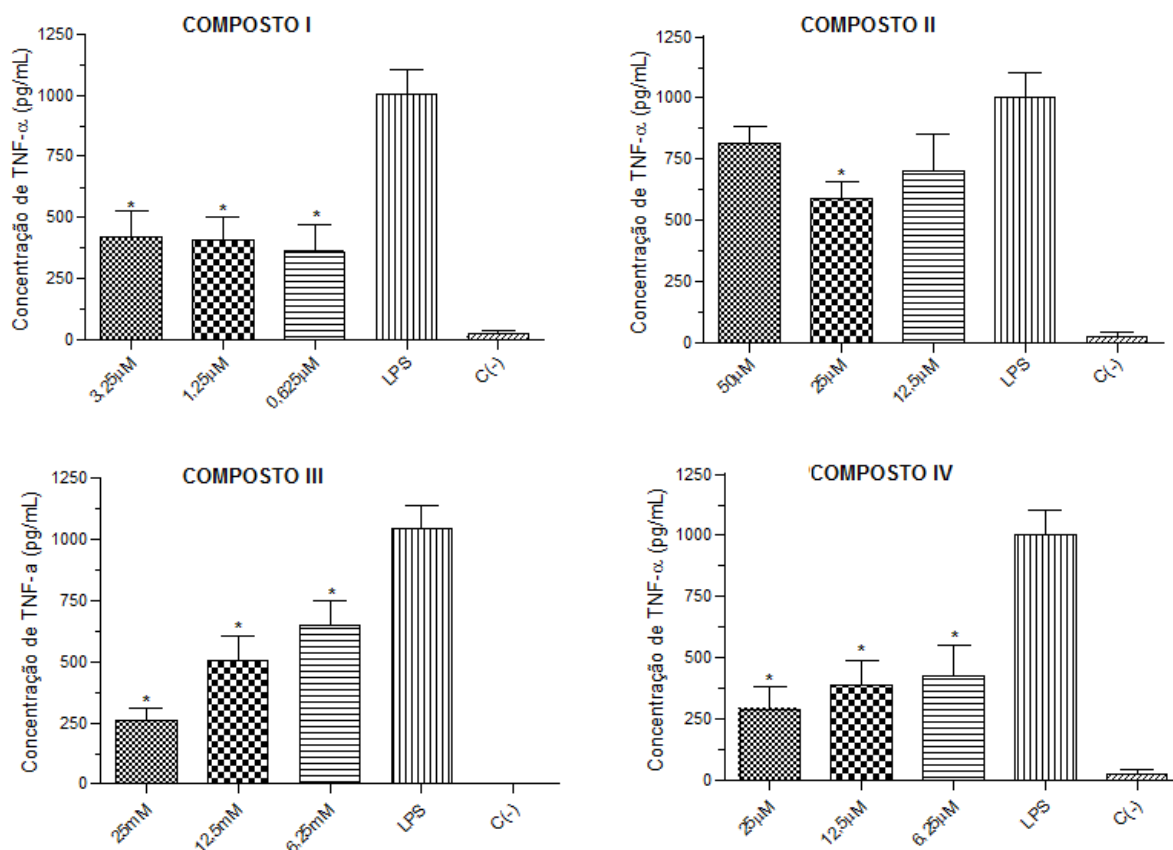


Figura 28: Concentração de TNF- α produzido por macrófagos em meio contendo os compostos I-IV em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e LPS (controle positivo, LPS); * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo LPS).

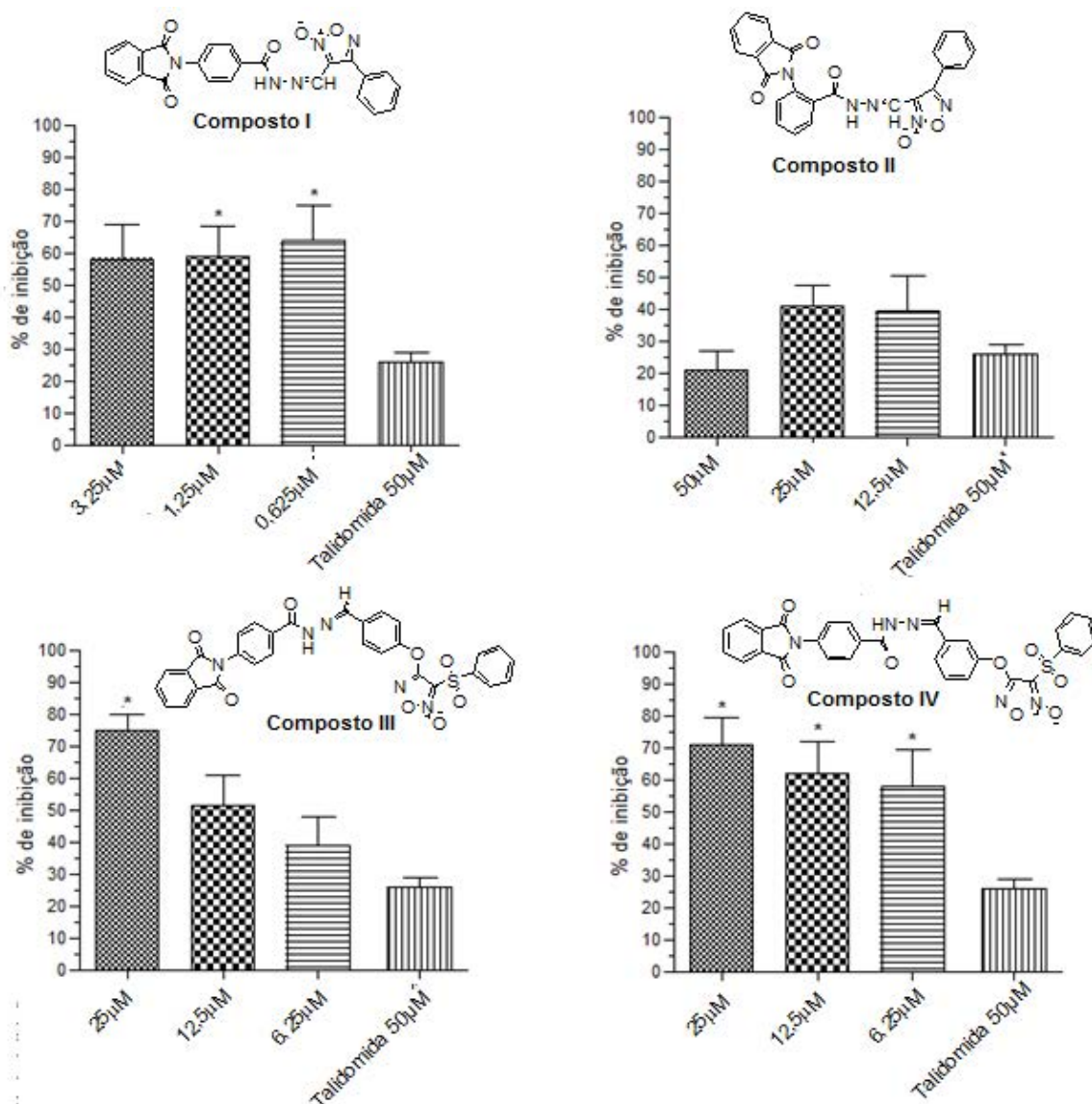
Os compostos I, III e IV apresentaram valores estatisticamente significativos em todas as concentrações avaliadas, com relação à concentração de TNF- α (pg/mL) quando comparado ao controle contendo somente LPS. O composto II mostrou valor significativo somente na concentração de 25 μ M.

Nos resultados de porcentagem de inibição apresentados na Figura 29 é possível observar que os compostos I, III e IV apresentaram porcentagem de inibição em torno de 60%, em concentrações menores que a talidomida. O composto I exibiu melhor perfil de inibição, uma vez que esta ocorreu em menores concentrações em relação aos demais compostos, porém sua citotoxicidade nestas concentrações não foi testada, logo para podermos afirmar que este composto foi o mais ativo são necessários estudos de viabilidade celular para o mesmo. Sendo assim, o composto IV provavelmente é o mais ativo, uma vez que em relação aos

demais compostos, apresentou maior porcentagem de inibição (65%) em todas concentrações testadas, as quais foram significativas em relação a talidomida.

Alguns estudos mostraram que o anel aromático substituído em diferentes posições ligado a ftalimida pode levar a um aumento na inibição de TNF- α . (MIYACHI et al., 1997). De fato, conforme é possível observar, os compostos I, III e IV, os quais possuem o anel aromático ligado diretamente a ftalimida substituído na posição *para* apresentaram maiores valores de inibição em relação ao composto II substituído na posição *orto*.

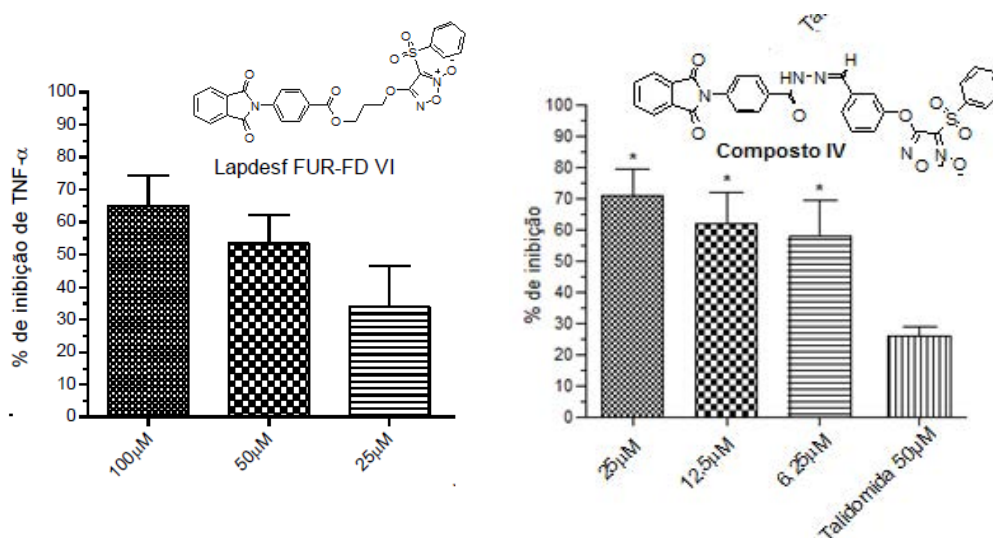
Figura 29: Porcentagem de inibição de TNF- α pelos compostos I-IV em diferentes concentrações, utilizando RPMI-1640-C (controle negativo não inibe TNF- α) * $p < 0,05$ (em comparação ao grupo talidomida)



O composto FUR-FD VI pertence à série de compostos sintetizada anteriormente pelo grupo de pesquisa e devido a sua semelhança estrutural com o composto IV, é possível comparar a atividade inibidora de TNF- α entre esses compostos. A figura 30 mostra que o composto IV é melhor inibidor TNF- α que o composto FUR-FD VI, uma vez que a sua porcentagem de inibição é superior a do FUR-FD VI em doses inferiores a do mesmo. Este fato poderia ser explicado pela introdução da *N*-acilidrazona no composto IV, a qual é descrita com atividade anti-

inflamatória, contribuindo, deste modo, para a inibição do TNF-alfa (FRAGA & BARREIRO, 2006; BARREIRO et al., 2002) .

Figura 30: Comparação da porcentagem de inibição de TNF-alfa entre os compostos Lapdesf FUR-FTD VI e o composto VI.



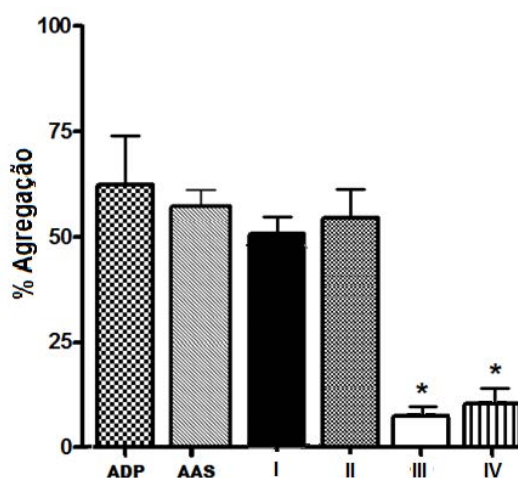
6.5. Avaliação da atividade antiagregante plaquetária dos compostos (I-IV) utilizando ADP (10mM) como indutor

Tem sido relatado que pacientes com anemias hemolíticas frequentemente apresentam anormalidades na coagulação. No caso da anemia falciforme observa-se um estado de hipercoaguabilidade, devido à múltiplos fatores envolvidos na fisiopatologia da doença. (KYPERS, 2007)

A hemólise intravascular pode levar a um estado pró-coagulante, uma vez que libera arginase, hemoglobina no plasma, gerando uma deficiência de NO, por meio do sequestro deste e também pela depleção de arginina, contribuindo com aumento da ativação de plaquetas e expressão de moléculas de adesão (ROTHER, 2005). Aliado a isso, durante a hemólise há também um aumento de ADP, que atua no aumento da agregação plaquetária contribuindo com o processo-vaso-oclusivo. (GLODSMITH et al., 1995)

Deste modo, os híbridos sintetizados contendo os furoxanos e tendo como espaçador a subunidade *N*-acilidrazona foram avaliados no ensaio de agregação plaquetária induzida por ADP. A Figura 16 apresenta o gráfico com os valores obtidos no ensaio de agregação plaquetária dos compostos I a IV:

Figura 31: Gráfico da porcentagem de agregação do ensaio de inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) citratado de ratos através do método turbidimétrico induzido por ADP.



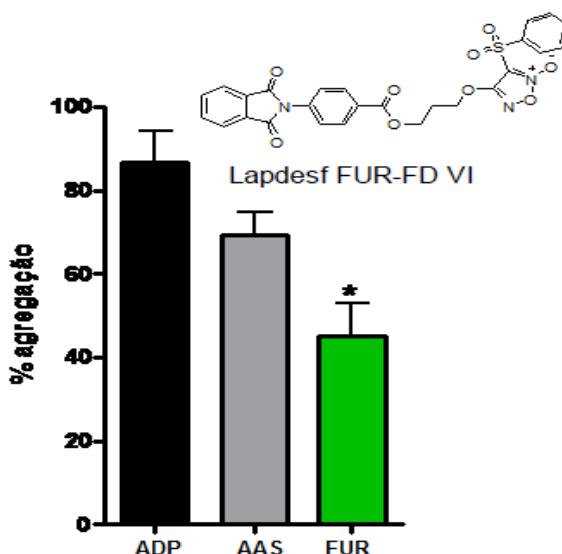
Conforme mostrado na Figura 31 os compostos III e IV inibiram significativamente a agregação plaquetária quando comparados com os compostos I e II e o ácido acetil salicílico (AAS).

A subunidade *N*-acilidrazona além de apresentar atividade analgésica e anti-inflamatória também é citada como antiagregante plaquetária, sendo capaz de mimetizar o ácido araquidônico, inibindo, deste modo, as ciclooxygenases e consequentemente a síntese de tromboxanos (LIMA et al 2008; SILVA et al 2004; BARREIRO et al 2002; BARREIRO & FRAGA, 1999).

A fim de avaliar a contribuição desta subunidade na atividade antiagregante plaquetária dos compostos sintetizados, os resultados obtidos foram comparados com os do composto LAPDES FUR-FD VI, pertencente à série de compostos sintetizada anteriormente, devido a sua semelhança estrutural aos compostos III e IV (Figura 32). Conforme é possível observar na figura 32 a porcentagem de agregação

do LAPDESF FUR-FD VI foi cerca de 45%. Já para os compostos III e IV a porcentagem foi entre 10 e 15 %. Sendo assim, a diminuição da agregação plaquetária pelos compostos III e IV pode estar relacionada a introdução da subunidade N-acilidrazona nestes compostos.

Figura 32: Gráfico da porcentagem de agregação do ensaio de inibição da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) citratado de ratos através do método turbidimétrico induzido por ADP do composto LAPDESF FUR-FD VI.



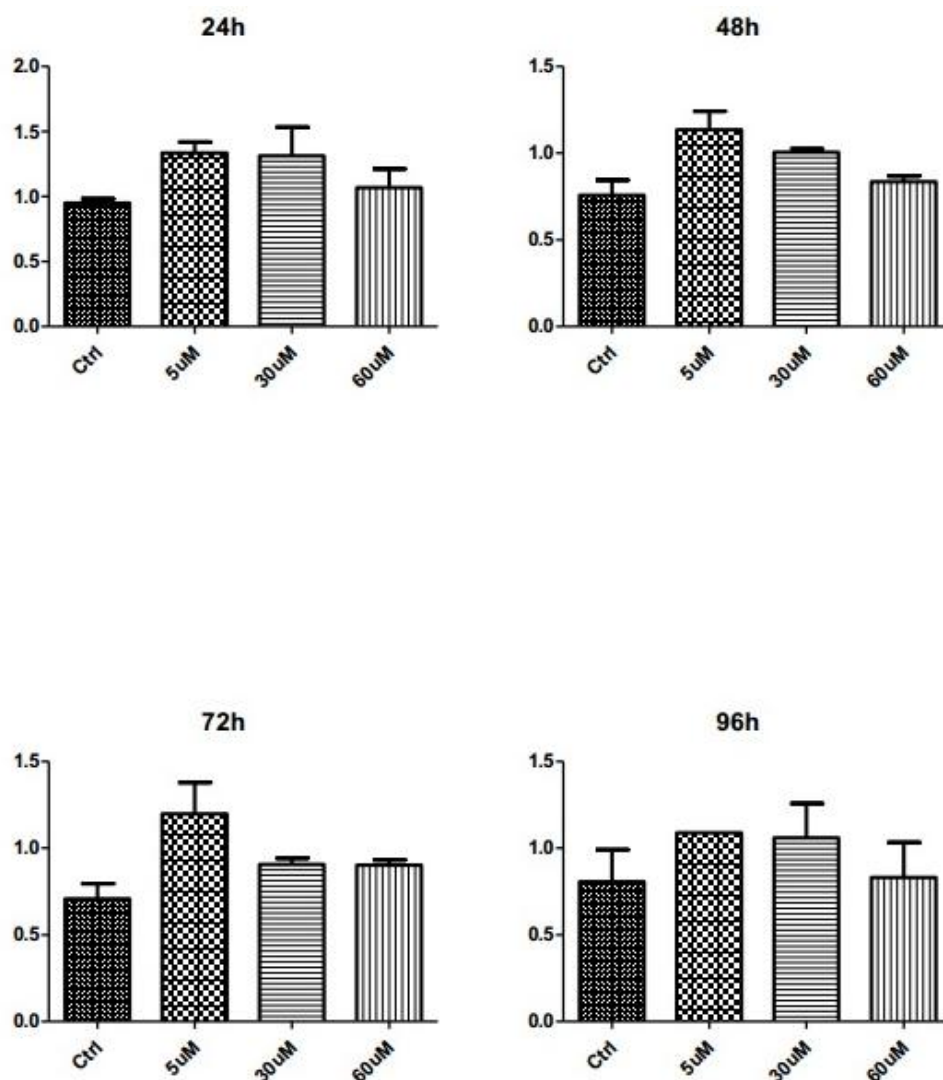
Na anemia falciforme, a injúria tecidual causada pelas células falciformes e a ativação plaquetária aliada a outros fatores fisiopatológicos produzem um quadro de hipercoagulabilidade (KYPERS, 2007). Assim, fármacos antiagregante plaquetários têm se mostrado úteis na terapêutica, a exemplo do prasugrel, inibidor do receptor de ADP, que se encontra em fase de estudo.

Neste contexto, os compostos III e IV apresentaram-se como promissores antiagregante plaquetários, podendo futuramente serem úteis no tratamento das complicações da doença (DALLALIO *et al.*, 2007; CHIES & NARDI, 2001).

6.6. Avaliação da expressão gênica de gama globina dos compostos obtidos em células K562

A expressão gênica de gama globina do composto I foi avaliada em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96h) e concentrações (5, 30 e 60 μ M), conforme mostrado na Figura 33):

Figura 33: Avaliação da expressão gênica de gama-globina em cultura de células K562 pelo Composto I expresso em unidades arbitrárias (U.A.), após 24, 48, 72 e 96 horas nas concentrações de 5, 30 e 60 μ M. (controle DMSO)



Conforme é possível observar o composto I foi capaz de induzir a expressão gênica de gama globina na concentração de 5 μ M no tempo de 48 horas. No tempo de 72 horas nesta mesma concentração, aumentou em quase duas vezes a expressão gênica de gama globina em relação ao controle.

O aumento da HbF tem sido explorado como um alvo promissor em diversos estudos por estar relacionado com a redução dos eventos clínicos característicos da doença nos pacientes portadores da mesma (PACE & ZEIN, 2006 ; STEINBERG & RODGERS, 2001). Assim, pretende-se avaliar os demais compostos a fim de entender qual a relação entre a maior ou menor doação de NO e a capacidade de induzir a expressão gênica de gama globina, que culminará na produção de hemoglobina fetal.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos até o presente momento pode-se concluir que as metodologias sintéticas utilizadas foram úteis para obtenção dos derivados furoxânicos, intermediários e de quatro compostos finais inéditos (I, II, III e IV) desejados, os quais foram obtidos com rendimentos adequados.

Os compostos (I a IV) se apresentaram como doadores de óxido nítrico no teste de doação de quantificação de nitrito. A capacidade de doar NO está diretamente relacionada à presença do substituinte ligado ao núcleo heteroaromático furoxânico, mais especificamente ao efeito eletroatrator deste substituinte ligado ao carbono contendo a subunidade *N*-óxido. Grupos químicos que retiram a densidade eletrônica aumentam a doação de NO, e de forma contrária, grupos químicos que doam densidade eletrônica diminuem. Assim, os derivados contendo a subunidade arilsulfonil foram o que mais geraram nitrito, sendo esta uma forma indireta de se avaliar a capacidade de doação de óxido nítrico.

No doseamento da síntese de TNF- α , os compostos I, III e IV apresentaram melhor atividade inibidora de TNF- α . O composto IV apresentou porcentagem de inibição significativa do TNF- α em relação a talidomida em doses menores que a mesma sendo aparentemente o mais promissor, caso o composto I seja citotóxico nas concentrações utilizadas. Foi possível verificar ainda que a subunidade *N*-acilidrazona utilizada como espaçador, contribuiu para a atividade anti-inflamatória, pela comparação dos resultados recentes com os resultados do composto FUR-FD VI obtidos anteriormente, o possui semelhança estrutural com o composto IV, sem a subunidade *N*-acilidrazona como espaçadora.

A inibição da agregação plaquetária é importante para o tratamento das complicações da doença, uma vez que a fisiopatologia da doença envolve um quadro de hipercoagulabilidade. Assim sendo, os compostos III e IV se mostraram como os mais promissores antiagregantes plaquetários. Comparando-se a atividade dos compostos III e IV com a do composto FUR-FD VI, foi possível observar que a *N*-acilhidrazona também contribuiu para o aumento da atividade antiagregante plaquetária dos compostos obtidos.

Os resultados obtidos até o presente momento caracterizam os novos compostos sintetizados como candidatos a fármacos potencialmente úteis ao tratamento das complicações clínicas da anemia falciforme.

.

8 PERSPECTIVAS

- Síntese, caracterização e avaliação farmacológica do regioisômero em posição orto ligado furoxano fenilsulfonil.
- Avaliação da capacidade dos compostos de induzirem a expressão gênica de gama globina e sua relação com a doação de NO, que culminará na produção de hemoglobina fetal.
- Avaliação farmacológica da analgesia, pelo ensaio de contorção abdominal induzido por ácido acético.
- Avaliação da mutagenicidade, pelo ensaio de micronúcleo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERBAJINAI, W. ZHU, J.; GAO, Z.; CHIN, K.; RODGERS, G.P. Thalidomide induces g-globin gene expression through increased reactive oxygen speciesmediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. **Blood** v. 110, n.8, p. 2864-2871, 2007.

AKINSHEYE, I.; ALSULTAN, A.; SOLOVIEFF, N.; NGO, D.; BALDWIN, C.T.; SEBASTIANI, P.; CHUI, D.H.; STEINBERG, M.H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia **Blood** v.118, p.19-27, 2011

ATAGA, K.I. SMITH, W.R.; DE CASTRO, L.M. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. **Blood** v.111, n.8, p.3991–3997, 2008.

ATZ, A.M.; WESSEL, D.L. Sildenafil ameliorates effects of inhaled nitric oxide withdrawal. **Anesthesiology**. v.91, p.307–310, 1999.

ATZ, A.M.; WESSEL, D.L. Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome. **Anesthesiology** v.87, p.988-990, 1997.

AUSTIN, H.; KEY, N.S.; BENSON, J.M.; LALLY, C.; DOWLING, N.F.; WHITSETT, C.; HOOPER, W.C. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. **Blood**, v. 110, n. 3, p. 908-912, 2007

AYI, K.; TURRINI, F.; PIGA, A.; ARESE, P. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. **Blood**. v.104, p. 3364–3371, 2004.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARA, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quím Nova**, v. 28, n. 6, p.1046-1054, 2005.

BELCHER, J.D.; MAHASETH, H.; WELCH, T.E. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**; v.288, p.2715–2725, 2005.

BENNEKOU, P.; FRANCESCHI, L.; PEDERSEN, O.; LIAN, L.; ASAKURA, T.; EVANS, G.; BRUGNARA, C.; CHRISTOPHERSEN, P. Treatment with NS3623, a novel Cl-conductance blocker, ameliorates erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice: a possible new therapeutic approach for sickle cell disease. **Blood** v. 97, n. 5, p. 1451-1457, 2001.

BIALECKI, E.S.; BRIDGES, K.R. Sildenafil relieves priapism in patients with sickle cell disease. **Am J Med**; v.113, p.252, 2002.

BOIANI, M.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; OLEA-AZAR, C.; CASTELLANO, E.E.; LÓPEZ, A.; ESPELETA, O.; MONGE A.V. 1,2,5- Oxadiazole N-oxide derivatives as potential anti-cancer agents: synthesis and biological evaluation. Part IV. **Eur J Med Chem**, v. 36, p. 771–782, 2001.

BONDS, D. R. Three decades of innovation in the management of sickle cell disease: the road to understanding the sickle cell disease clinical phenotype. **Blood Rev.** v. 19 p. 99-110, 2005.

BORN, G. V. R., CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **Journal of Physiology**, v. 168, p. 178 - 196, 1963

BOUREUX, A.; VIGNAL, E.; FAURE, S.; FORT, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. **Mol Biol Evol** v.24,p. 203–216, 2005.

BOYER, J.H. Nitroazoles: The C-nitro derivatives of five-membered N- and N, O-heterocycles. New Orleans: VCH, 1986. Organic nitro chemistry series, v.1. p.1-4. ISBN 0-89573-148-7.

BRITTENHAM, G.M.; GRIFFITH, P.M.; NIENHUIS, A.W.; MCLAREN, C.E.; YOUNG, N.S.; TUCKER, E.E.; ALLEN, C.J.; FARREL, D.E.; HARRIS, J.W. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. **N Engl J Med**, v. 331, p. 567-573, 1994.

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, p.183–189, 1985.

BRUGNARA C, TOSTESON DC. Inhibition of K transport by divalent cations in sickle erythrocytes. **Blood**, v.70, p.1810–1815, 1987.

BUCHANAN, G.R et al. Sickle cell disease. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.35-47. 2004

BUNN, H.F., Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v.337, p. 762–769, 1997.

BURNETT AL, BIVALACQUA TJ, CHAMPION HC, MUSICKI B. Long-term oral phosphodiesterase 5 inhibitor therapy alleviates recurrent priapism. **Urology**, p.1043–1048, 2006

CALVINO R.; MORTARINI V.; GASCO A.; SANFILIPPO A.; RICCIARDI M.L. Antimicrobial properties of some furazan and furoxan derivatives. **Eur J Med Chem Chim Ther**, v.15, p. 485–487, 1980.

CAPPELLINI, M.D.; PIGA, A. Current status in iron chelation in hemoglobinopathies. **Curr Mol Med**, v.8, n.7, p. 663-674. 2008.

CARR, B.I.; REILLY, J.G.; SMITH, S.S.; WINBERG, C.; RIGGS, A. The tumorigenicity of 5-azacytidine in the male Fischer rat. **Carcinogenesis**, v.5, p.1583–1590, 1984.

CENA, C.; BOSCHI, D.; TRON, G.C.; CHEGAEV, K.; LAZZARATO, L.; DI STILO, A.; ARAGNO, M.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Development of a new class of potential antiatherosclerosis agents: NO-donor antioxidants. **Bioorg Med Chem Lett**, v.14, p. 5971–5974, 2004.

CARLSON, J.; HELMBY, H.; HILL, A.V.; BREWSTER, D.; GREENWOOD, B.M.; WAHLGREN, M. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. **Lancet**, v.336, p.1457–1460, 1990.

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ONETTO, S.; RISSO, M.; REY, A.; GIGLIO, J.; LÉON, E.; LÉON, A.; PILATTI, P.; FERNÁNDEZ, M. Synthesis and characterization of thiol containing furoxan derivatives as coligands for the preparation of potential bioelectroactive radiopharmaceuticals. **Arch Pharm Chem Life Sci**, v.339, p. 59–66, 2006.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini Rev Med Chem**, v. 5, p.57-71, 2005.

CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships. **J Med Chem**, v.42, p.1941–1950, 1999.

CHANG, J.; PATTON, J.T.; SARKAR, A.; ERNST, B.; MAGNANI, J.L.; FRENETTE, P.S. GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell mice. **Blood**, v.116, n.10, p.1779–1786, 2010.

CHARACHE, S.; TERRIN, M.L.; MOORE, R.D.; DOVER, G.J.; BARTON, F.B.; ECKERT, S.V.; MCMAHON, R.P.; BONDS, D.R. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med**, v.332, p.1317-1322, 1995.

CHAULET, C.; CROIX, C.; ALAGILLE, D.; NORMAND, S.; DELWAIL, A.; FAVOT, L.; LECRON, J.C.; VIAUD-MASSUARD, M.C. Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- α and IL-6 production inhibitors **Bioorg Med Chem Lett**, v.21, n.3, p.1019-1022, 2011

CHIES, J.A.; NARDI, N.B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Med Hypotheses**, v.57, n.1, p.46-50, 2001.

CHOLERA, R.; BRITAIN, N.J.; GILLRIE, M.R.; LOPERA-MESA, T.M.; DIAKITÉ, S.A.S.; ARIE, T.; KRAUSE, M.A.; GUINDO, A.; TUBMAN, A.; FUJIOKA, H.; DIALLO,

D.A.; DOUMBO, O.K.; HO, M.; WELLEMS, T.E.; FAIRHURST, R.M. Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. **Proc Natl Acad Sci**, v.105 p.991–996, 2008.

CODD, R. Traversing the Coordination Chemistry and Chemical Biology of Hydroxamic Acids. **Coord Chem Rev**, v.252, p.1387-1408, 2008.

COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESILIN-COKIC, B.B.; NJOROGUE, J.M.; MILLER, J.L.; GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest**, v.111, n. 2, p. 231-239, 2003.

CONRAN, N.; ORESCO-SANTOS C.; ACOSTA, H.C.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br J Haematol**, v.124, p.547-554, 2004.

CODD, R. Traversing the Coordination Chemistry and Chemical Biology of Hydroxamic Acids. **Coord Chem Rev**, v.252, p.1387-1408, 2008.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias carboniladas e derivados**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.412.

CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol**, v.87, n.3, p. 592-597, 1994.

DAI, Z.K.; WU, B.N.; CHEN, I.C.; CHAI, C.Y.; WU, J.R. Attenuation of pulmonary hypertension secondary to left ventricular dysfunction in the rat by Rho-kinase inhibitor fasudil. **Pediatr Pulmonol** v.46, p. 45–59, 2011.

DALLALIO, G.; BRUNSON, C.Y.; MEANS, R.T.; Cytokine concentrations in bone marrow of stable sickle cell anemia patients. **J Investig Med**, v.55, n.2, p. 69-74, 2007.

DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H.B.; THANNICKAL, V.J.; RAJAVASHISTH, T.B.; GIMBRONE, M.A. JR.; SHIN, W.S.; LIAO, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J Clin Invest**, v.96, p. 60–68, 1995.

DE FRANCESCHI, L.; BACHIR, D.; GALACTEROS, F.; TCHERNIA, G.; CYNOBER, T. NEUBERG, D.; BEUZARD, Y.; BRUGNARA, C. Oral magnesium pidolate: effects of long-term administration in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol**, v.108, p.284–289, 2000

DE FRANCESCHI, L.; SAADANE, N.; TRUDEL, M.; ALPER, S.L.; BRUGNARA, C.; BEUZARD, Y. Treatment with oral clotrimazole blocks Ca(2+)-activated K⁺ transport and reverses erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice. A model for therapy of sickle cell disease. **J Clin Invest**, v.93, n.4, p.1670–1676, 1994.

DEL GROSSO, E.; BOSCHI, D.; LAZZARATO, L.; CENA, C.; DI STILO, A.; FRUTTERO, R.; MORO, S.; GASCO, A. The furoxan system: design of selective nitric oxide (NO) nonor inhibitors of COX-2 endowed with antiaggregatory and vasodilating activities. **Chem Biodivers**, v.2, p. 886-900, 2005.

DESIMONE, J.; HELLER, P.; SCHIMENTI, J.C.; DUNCAN, C.H. Fetal hemoglobin production in adult baboons by 5-azacytidine or by phenylhydrazine-induced hemolysis is associated with hypomethylation of globin gene DNA. **Prog Clin Biol Res**, v.134, p.489–500, 1983.

DICKERSON RE, GEIS I. Hemoglobin, structure, function, evolution, and pathology. **Am J Hum Genet**, v.35, n.4, p.781–782, 1983.

DING, J.; LI, Q.Y.; WANG, X. SUN, C.H.; LU, C.Z. Fasudil protects hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury by suppressing microglial inflammatory responses in mice. **J Neurochem**, v.114, p. 1619–1629, 2010.

DI STILO, A.; VISENTIN, S.; CENA, C.; GASCO, A.M.; ERMONTI, G.; GASCO, A. New 1,4-dihydropyridines conjugated to furoxanyl moieties, endowed with both nitric oxide-like and calcium channel antagonist vasodilator activities. **J Med Chem**, v. 41, p. 5393–5401, 1998.

DYKES, G.W.; CREPEAU, R.H.; EDELSTEIN, S.J. Three-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of hemoglobin S. **J Mol Biol**, v.130, p. 451- 472, 1979.

DUITS, A.J.; PIETERS, R.C.; SALEH A.W.; VAN ROSMALEN, E.; KATERBERG, H.; BEREND, K.; ROJER, R.A. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clin Immunol Immunopathol**, v.81, n.1, p.96-98, 1996.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico **J Bras Pat Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EMBURY, S.H.; MATSUI, N.M.; RAMANUJAM, S.; MAYADAS, T.N.; NOGUCHI, C.T.; DIWAN, B.A.; MOHANDAS, N.; CHEUNG, A.T. The contribution of endothelial cell P-selectin to the microvascular flow of mouse sickle erythrocytes in vivo. **Blood**, v.104 n. 10, p.3378–3385, 2004.

ERIKSSON, T.; BJORKMAN, S.; HOGLUND, P. Clinical pharmacology of thalidomide. **Eur J Clin Pharmacol**, v.57, p. 365-376, 2001.

ESSACK M, RADOVANOVIC A, BAJIC VB. Information exploration system for sickle cell disease and repurposing of hydroxyfasudil. **PLoS One**, v.8, n.6, 2013

FARRAR, W.V. The 3,4-bisarenesulfonylfuroxans. **J Chem Soc**, p.904–906,1964.

FEELISCH, M.; SCHÖNAEFINGER, K.; NOACK, E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. **Biochem Pharmacol**, v.44, p.1149-1157, 1992.

FERSTER, A.; TAHRIRI, P.; VERMYLEN, C.; STURBOIS, G.; CORAZZA, F.; FONDU, P.; DEVALCK, C.; DRESSE, M.F.; FEREMANS, W.; HUNNINCK, K.; TOPPET, M.; PHILIPPET, P.; VAN, G.C.; SARIBAN, E. Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. **Blood**, v.97, p.3628-3632, 2001.

FIELD, J.J.; LIN, G.; OKAM, M.M.; MAJERUS, E.; KEEFER, J.; ONYEKWERE, O.; ROSS, A.; CAMPIGOTTO, F.; NEUBERG, D.; LINDEN, J.; NATHAN, D.G. Sickle cell vaso-occlusion causes activation of iNKT cells that is decreased by the adenosine A2A receptor agonist regadenoson. **Blood**, v.121, n.17, p.3329-3334, 2013.

FLATMAN, P.W. Regulation of Na-K-2Cl cotransport in red cells. **Adv Exp Med Biol** v.559, p.77-88, 2004.

FORGET, B.G. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Ann NY Acad Sci**, v.850, p.38-44, 1998.

FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J.. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Curr Med Chem**, v.13, n.2, p.167-98, 2006.

FRANCIS, R.B.J.R.; HAYWOOD, L.J. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J Natl Med Assoc**, v.84, n.7, p.611-615, 1992.

FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v.117, n.4, p.850-8, 2007.

FRUTTERO, R.; SORBA, G.; ERMONDI, G.; LOLLI, M.; GASCO, A. Unsymmetrically substituted furoxans. XVII. Structural investigations in benzenesulfonylfuroxan derivatives and related compounds. **Farmaco**, v.52, p.405-410, 1997.

FRUTTERO, R.; DI STILO, D.; GASCO, A. The furoxan system as a useful tool for balancing "hybrids" with mixed α -antagonist and NO-like vasodilator activities. **J Med Chem**, v.38, p. 4944-4949, 1995.

FRUTTERO, R.; FERRAROTTI, B.; SERAFINO, A.; DI STILO, A.; GASCO, A. Unsymmetrically substituted furoxans. Part 11. Methylfuroxancarbaldehydes. **J Heterocyclic Chem**, v.26: p. 1345-1347, 1989.

FUKUMOTO, Y.; MATOBA, T.; ITO, A.; TANAKA, H.; KISHI, T.; HAYASHIDANI, S.; ABE, K.; TAKESHITA, A.; SHIMOKAWA, H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. **Heart**, v.91, p.391-392, 2005

GASCO, A.; MORTARINI, V.; RUA, G.; SERAFINO, A. Unsymmetrically substituted furoxans. III Methylnitrofuroxan: Its structure and behaviour toward nucleophilic substitution. **J Heterocycl Chem**, v.10, p. 587-590, 1973.

GLODSMITH, H.L.; BELL, D.N.; BRAOVAC, S.; STEINBERG, A.; MCINTOSH F. Physical and chemical effects of red cells in the shear-induced. **Biophys J**, v.69 p.1584-95, 1995.

GONÇALVES, M. S.; BONFIM, G. C; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I. β S - haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v.36, n.10, p.1283-1288, 2003

GONG, L.; PARIKH, S.; ROSENTHAL, P.J. GREENHOUSE B Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria **Malar J**, v.12, n.1, p.317, 2013.

HANFT, V.N.; FRUCHTMAN, S.R.; PICKENS, C.V.; ROSSE, W.F.; HOWARD, T.A.; WARE, R.E. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, v.95, n.11, p. 3589-3593, 2000.

HANH, E.V.; GILLESPIE, E.B. Sickle cell anemia. **Arch Int Med**, v.39 p.233, 1927.

HANKINS, J.; AND AYGUN, B. Pharmacotherapy in sickle cell disease- state of art and future prospects. **Br J Haematol**, v.145, n.3, p. 296–308, 2009.

HARA, M.; TAKAYASU, M.; WATANABE, K.; NODA, A.; TAKAGI, T.; SUZUKI, Y.; YOSHIDA J. Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats. **J Neurosurg**, v.93 (Suppl. 1), p.94–101, 2000.

HARRINGTON, D.J.; ADACHI, K.; ROYER, W.E.J. The high-resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. **J Mol Biol**, v.272, p.398-407, 1997.

HEBBEL, R.P. Adhesion of sickle red cells to endothelium: myths and future directions **Transfus Clin Biol**, v.15, n.1-2, p.14-18, 2008.

HEBBEL RP: Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell and sickle disease pathophysiology. **Blood**, 77:214-37, 1991.

HERRICK, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch Intern Med**, v. 6, p. 517-521, 1910.

HIDER, R.C.; ZHOU, T. The design of orally active iron chelators. **Ann N Y Acad Sci**, v.1054, p.141-154, 2005.

HILLERY CA, DU MC, WANG WC, SCOTT JP. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **Br J Haematol**, v.109, p.322–327, 2000.

HOPPE, C. C. Novel therapies targeting the endothelium in sickle cell disease. **Hemoglobin**, v.35, n.5–6, p.530–546, 2011.

HSIAO, C.H.; LI, W.; LOU, T.F.; BALIGA, B.S.; PACE, B.S. Fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves generation of reactive oxygen species. **Exp Hematol**, v.34, p.264-273, 2006.

HUEHNS, E.R.; DANCE, N.; BEAVEN, G.H.; HECHT, F.; MOTULSKY, A.G. Human embryonic hemoglobins. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v.29 p.327 -331, 1964

INGLIS, J.J.; NISSIM, A.; LEES, D.M.; HUNT, S.P.; CHERNAJOVSKY, Y.; KIDD, B.L. The differential contribution of tumor necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. **Arthritis Res Ther**, v.7, n. 4, R807-R816, 2005.

INGRAM, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia haemoglobin. **Nature**, V.178, p.792-794, 1956.

JAGROOP, I.A.; BURNSTOCK, G.; MIKHAILIDIS, D.P. Both the ADP receptors P2Y1 and P2Y12, play a role in controlling shape change in human platelets. **Platelets**, v.14 p.15-20, 2003

JAKUBOWSKI, J.A.; ZHOU, C.; SMALL, D.S.; WINTERS, K.J.; LACHNO, D.R.; FRELINGER, A.L.; HOWARD, J.; MANT, T.G.; JURCEVIC, S.; PAYNE, C.D. A phase 1 study of prasugrel in subjects with sickle cell disease: effects on in vivo markers of platelet activation and of coagulation **Blood**, v.118, n.21, p.1049, 2011.

KALINOWSKI, D. S.; SHARPE, P. C.; BERNHARDT, P. V.; RICHARDSON, D. R. Structure-Activity Relationships of Novel Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease: The Methyl Pyrazinylketone IsonicotinoylHydrazone Series. **J Med Chem**, v.51, p.331-344, 2008.

KANDABASHI, T. SHIMOKAWA, H.; MIYATA, K.; KUNIHIRO, I.; KAWANO, Y.; FUKATA, Y.; HIGO, T.; EGASHIRA, K.; TAKAHASHI, S.; KAIBUCHI, K.; TAKESHITA, A. Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rhokinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1. **Circulation**, v.101, p.1319–1323, 2000.

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F.; LITTLE, J.A.; TAYLOR, J. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v.107, p. 2279–2285, 2006.

KAUL, D.K.; FINNEGAN, E.; BARABINO, G.A. Sick cell-endothelium interactions. **Microcirculation**, v.16, n.1, p.97-111, 2009.

KING, S.B. The nitric oxide producing reactions of hydroxyurea. **Curr Med Chem**, v.10, p.437-452, 2003.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; MASUMOTO, A.; ITO, K.; KIMURA, Y.; INOKUCHI, K.; TAGAWA, T.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A.; SUNAGAWA, K. Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure. **Circulation**, v.111, p.2741-2747, 2005

KONTOGHIOGHES, G.J.; ERACLEOUS, E.; ECONOMIDES, C.; KOLNAGOU, A. Advances in iron overload therapies. prospects for effective use of deferiprone (L1), deferoxamine, the new experimental chelators ICL670, GT56-252, L1NA11 and their combinations. **Curr Med Chem**, v.12, n.23, p.2663-2681, 2005.

KONTOGHIOGHES, G.J.; GODDARD, J.G.; BARTLETT, A.N.; SHEPPARD, L. Pharmacokinetic studies in humans with the oral iron chelator 1,2-dimethyl- 3-hydroxypyrid-4-one. **Clin Pharmacol Ther**, v.48, n.3, p. 255-261,1990.

KUTLAR, A.; ATAGA, K.I.; MCMAHON, L.; GALACTEROS, F.; HAGAR, W.; VICHINSKY, E.; CHEUNG, A.T.; MATSUI, N.; EMBURY, S.H. A potent oral P-selectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell injury in patients with sickle cell disease. **Am J Hemato**, v.87, n.5, p.536-539, 2012.

KUTLAR, A.; ATAGA, K.; REID, M. A phase 1/2 trial of HQK-1001, an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **Am J Hematol**, v.87, n.11, p.1017-1021, 2012.

KUYPERS F.A. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. **Hematology**, p.68-73, 2007.

LANARO, C.; PENTEADO, C.F.F.; ALBUQUERQUE, D.M.; SAAD, S.T.O.; CONRAN, N.; COSTA, F.F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leuk Biol**, v.85, p.235-242, 2009.

LANTRY, L.E.; ZHANG, Z.; CRIST, K.A.; WANG, Y.; KELLOFF, G.J.; LUBET, R.A.; YOU, M. 5-Aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methylnitrosamino)- 1- (3 pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model. **Carcinogenesis**, v.20, p.343-346, 1999.

LEE, S.P.; ATAGA, K.I.; ZAYED, M.; MANGANELLO, J.M.; ORRINGER, E.P.; PHILLIPS, D.R.; PARISE, L.V. Phase I study of eptifibatide in patients with sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v.139, n.4, p. 612-620, 2007.

LEW, V.L.; TIFFERT, T.; ETZION, Z.; PERDOMO, D.; DAW, N.; MACDONALD, L.; BOOKCHIN, R.M. Distribution of dehydration rates generated by maximal Gardos - channel activation in normal and sickle red blood cells. **Blood**, v. 105, n. 1, p. 361-367, 2005.

L. M. Lima, F. S. Frattani, J. L. Dos Santos, H. C. castro, C. A. M. Fraga, R. B. Zingali, E. J. BARREIRO, Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designes as antithrombotic candidates, **Eur J Med Chem**, v.43, n.348-356, 2008.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quim Nova**, v.24, n.5, p.683-688, 2001.

LIMA, L.M., CASTRO, P., MACHADO, A. L., FRAGA, C.A M., LUGNIER, C., MORAES, V.L.G., BARREIRO, E.J. Synthesis and anti inflammatory activity of phtalimide derivates, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg Med Chem**, v. 10, p.3067-3073, 2002.

LIMA, P.D.L.; CARDOSO, P.C.S.; KHAYAT, A.S.; BAHIA, M.O.; BURBANO, R.R. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. **Gen Mol Res**, v.2, n.3, p.328-333, 2003.

LIST, A.; DEWALD, G.; BENNETT, J.; GIAGOUNIDIS, A.; RAZA, A.; FELDMAN, E.; POWELL, B.; GREENBERG, P.; THOMAS, D.; STONE, R.; REEDER, C.; WRIDE, K.; PATIN, J.; SCHMIDT, M.; ZELDIS, J.; KNIGHT, R. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators.Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. **N Engl J Med**, v.355, p.1456-1465, 2006.

LITTLE, J.A.; MCGOWAN, V.R.; KATO, G.J.; PARTOVI, K.S.; FELD, J.J.; MARIC, I., MARTYR, S.; TAYLOR, J.G.; MACHADO, R.F.; HELLER, T.; CASTRO, O.; GLADWIN, M.T. Combination erythropoietin-hydroxyurea therapy in sickle cell disease: experience from the National Institute of Health and a literature review. **Haematologica**, v. 91, p. 1076-1083, 2006.

LIU, J.; OBANDO, D.; SCHIPANSKI, L.G.; GROEBLER, L.K.; WITTING, P.K.; KALINOWSKI, D.S.; RICHARDSON, D.R.; CODD, R. Conjugates of desferrioxamine B (DFOB) with derivatives of adamantine or with orally available chelators as potential agents for treating iron overload. **J Med Chem**, v.53, n.3, p. 1370-1382, 2010.

LIU, S.; GOLDSTEIN, R.H.; SCEPANSKY, E.M.; ROSENBLATT, M. Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. **Cancer Res**, v.69, p.8742–875, 2009.

MACK, A.K.; KATO, G.J. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol**, v.38, p. 1237–1243, 2006.

MAKARYUS, J.N.; CATANZARO, J.N.; KATONA, K.C. Exertional rhabdomyolysis and renal failure in patients with sickle cell trait : Is it time to change our approach? **Hematology**, v. 12, n. 4, p.349-352, 2007.

MALAVÉ, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVE, H. Level of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol**, v. 90, p.172-176, 1993.

MANWANI, D.; FRENETTE, P.S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, v. 2013, p.362-369, 2013.

MATSUI, N.M.; VARKI, A.; EMBURY, S.H. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. **Blood**, v.100, n.10, p.3790–3796, 2002.

MATHY J. P.; GASPARD, S.; MANSUY, D. Phenylhydrazones as new good substrates for the dioxygenase and peroxidase reactions of prostaglandin synthase: Formation of iron(III)-.sigma.-phenyl complexes **Biochemistry**, v.32, p.4014-4021, 1993.

MCBRIDE, W. Thalidomide and congenital abnormalities. **Lancet** v.2, p. 368, 1961.
MATSUI, N.M.; BORSIG, L.; ROSEN, S.D.; YAGHMAI, M.; VARKI, A.; EMBURY, S.H. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. **Blood**, v.98, n.6, p.1955–1962, 2001.

MCCAFFREY, P.G.; NEWSOME, D.A.; FIBACH, E.; YOSHIDA, M.; SU, M.S. Induction of gamma-globin by histone deacetylase inhibitors. **Blood**, v.90, p.2075–2083, 1997.

MCNAUGHTON-SMITH, G.A.; BURNS, J.F.; STOCKER, J.W.; RIGDON, G.C.; CREECH, C.; ARRINGTON, S.; SHELTON, T.; FRANCESCHI, L. Novel inhibitors of the gards channel for the treatment of sickle cell disease. **J Med Chem**, v. 51, n.4, p. 976-982, 2008.

MEDANA, C.; ERMONDI, G.; FRUTERO, R.; DI STILO, A.; FERRETTI, C.; GASCO, A. Furoxans as nitric oxide donors. 4-Phenyl-3-furoxancarbonitrile: thiol-mediated nitric oxide release and biological evaluation. **J Med Chem**, v.37, p. 4412-4416, 1994.

MEILER, S.E.; WADE, M.; CHEN, Z.; RAMALINGAM, P.; MOUTOUHDE PARSEVAL, L.A.; CORRAL, L.G.; KUTLAR, F.; KUTLAR, A. Pomalidomide augments erythropoiesis and fetal hemoglobin production in a humanized mouse model of sickle cell disease. **Blood**, v.112, p.536, 2008.

MIYACHI, H.; AZUMA, A.; OGASAWARA, A; UCHIMURA, E.; WATANABLE, N.; KOBAYASHI, Y.; KATO, F.; KATO, M.; HASHIMOTO, Y.; Novel biological response modifiers: phthalimides with tumor necrosis factor-alpha production-regulating activity **J Med Chem**, v.40, p.2858, 1997.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs **Br J Pharmacol**, v.151, n.3, p.305–321, 2007.

MIN-OO, G.; GROS, P. Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. **Cell Microbiol**, v.7, p.753–763, 2005.

MONGE, A.; LÓPEZ DE CERÁIN, A.; EZPELETA, O.; CERECETTO, H.; DIAS, E.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; ONETTO, S.; SEOANE, G.; SUESCUN, L.; MARIEZCURRENA, R. Synthesis and biological evaluation of 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as hypoxia-selective cytotoxins. **Pharmazie**, v.53, n.11, p. 758-764, 1998.

MORRIS, C.R. Hemolysis-associated pulmonary hypertension in sickle cell disease: global disruption of the arginine-nitric oxide pathway. **Curr Hypert Rev**, v.3, p. 223-230, 2007.

MORRIS, C.R.; MORRIS, S.M. JR, HAGAR, W.; VAN, W.J; CLASTER, S.; KEPKALLENHART, D.; MACHADO, L.; KUYPERS, F.A.; VICHINSKY, E.P. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? **Am J Respir Crit Care Med**, v.168, p.63–69, 2003.

MORRIS, C.R.; KUYPERS, F.A.; LARKIN, S.; VICHINSKY, E.P.; STYLES, F.A. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vasoocclusive crisis and acute chest syndrome. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.22, p.515-520, 2000.

MOUTOUH-DE PARSEVAL, L.A.; VEHELLE, D.; GLEZER, E.; JENSEN-PERGAKES, K.; FERGUSON, G.D.; CORRAL, L.G.; MORRIS, C.L.; MULLER, G.; BRADY, H.; CHAN, K. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. **J Clin Invest**, v.118, p. 248-258, 2008.

MULLER, G. W.; CHEN, R.; HUANG, S. -Y; CORRAL, L. G.; WONG, L. M.; PATTERSON, R. T.; CHEN, Y.; KAPLAN, G.; STIRLING, D. I.; Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- α production. **Bioorg Med Chem** v.9, p.1625-1630, 1999.

MURAO, M.; FERRAZ, M.H.C. Traço falciforme – heterozigose para hemoglobina S. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 29, n. 3, p. 223-225, 2007.

NAHAVANDI, M.; TAVAKKOLI, F.; WYCHE, M.Q.; PERLIN, E.; WINTER, W.P.; CASTRO, O. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea **Br J Haematol**, v.119, n.3, p.855-857, 2002.

NETO, G.C.G.; PITOMBEIRA, M.S.; Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J Bras Patol Med Lab**, v.39, n.1, p.51-56, 2003.

NOGUCHI, C.T.; RODGERS, G.P.; SERJEANT, G.; SCHECHTER, A.N.; Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 318, p. 96–99, 1988.

O'CONNELL, D. Neglected diseases. **Nature**, v.449, p.157, 2007.

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. **Blood Rev**, v. 18, p.65–73, 2004.

PACE, B.S.; ZEIN, S. Understanding mechanisms of gamma-globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Dev Dyn**, v.235, n.&, p.1727-1737, 2006.

PALLIS, F.R.; VITAL, M. D.; FERTRIN, K.Y.; SAAD, S.T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. FRANCO-PENTEADO, C.F. Inhibition Of the Rho/Rho-Kinase Pathway Reduces In Vitro Adhesion Of Sickle Cell Anemia Eosinophils To Human Endothelial Cells **Blood**, v.122, n. 21, p. 2219, 2013

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, p.664–666, 1988

PAPARK, S.; HAYES, B.L.; MARANKAN, F.; MULHEARN, D.C.; WANNA, L.; MESECAR, A.D.; SANTARSIERO, B.D.; JOHNSON, M.E.; VENTON, D.L. Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents. **J Med Chem**, v. 46, n. 6, p. 936-953, 2003

PARK, S.; HAYES, B.L.; MARANKAN, F.; MULHEARN, D.C.; WANNA, L.; MESECAR, A.D.; SANTARSIERO, B.D.; JOHNSON, M.E.; VENTON, D.L. Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents. **J Med Chem**, v. 46, n. 6, p. 936-953, 2003.

PASVOL, G.; WEATHERALL, D.J.; WILSON, R.J. Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. **Nature** v.274, p.701–703, 1978.

PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543-548, 1949.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRITZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 2nd ed. Fort Worth: Saunders Golden Sunburst, 1996, 511 p.

PERELMAN, N.; SELVARAJ, S.K.; BATRA, S.; LUCK, L.R.; ERDREICH-EPSTEIN, A.; COATES, T.D.; KALRA, V.K.; MALIK, P. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. **Blood**, v.102, n.4, p.1506-1514, 2003.

PERUTZ, M.F. Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide **Ann Rev Physiol**, v.52, p.1–25, 1990.

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. **Nat Commun**, v.1, n.104, 2010.

PLATT, O.S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F.; MILNER, P.F.; CASTRO, O.; Steinberg, M.H.; Klug, P.P. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med**, v.330, p.1639–1644, 1994.

PORTER, JB. Deferasirox - current knowledge and future challenges. **Ann N.Y. Acad Sci**, v.1202, p.87-93, 2010.

RAGHUPATHY, R.; MANWANI, D.; LITTLE, J.A. Iron overload in sickle cell disease. **Adv Hematol** v. 2010, p.1-9, 2010.

RAGHUPATHY, R.; BILLETT, H.H. Promising Therapies in Sickle Cell, **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v.9, p.1-8, 2009

REES, D.C.; Williams, T.N.; Gladwin, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n.9757, p.2018-2031, 2010.

REITER, C.D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. **Nat Med**, v.8, p.1383–1389, 2002.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur J Pharmacol**, v. 391, p. 97-103, 2000.

RICHARDSON, D. R.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, V.; SHARPE, P. C.; LOVEJOY, D. B.; ISLAM, M.; BERNHARDT, P. V. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones are Potent Iron Chelators and Antiproliferative Agents: Redox Activity, Iron Complexation and Characterization of their Antitumor Activity. **J Med Chem**, v.52, p.1459-1470, 2009.

ROCHA, H.H.G. Anemia Falciforme. Rio de Janeiro: Rubio, 2004. 291p. ISBN 85-87600-29-X.

ROTHER, R.P.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M.T The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 293, p.1653-1662, 2005.

SAFO, M.K.; ABDULMALIK, O.; DANSO-DANQUAT, R.; BURNETT, J.C.; NOKURI, S.; JOSHI, G.S.; MUSAYEV, F.N.; ASAKURA, T.; ABRAHAM, D.J. Structural basis for the potent antisickling effects of a novel class of five membered heterocyclic aldehydic compounds. **J Med Chem**, v. 47, p. 4665-4676, 2004.

SAKAMOTO, T.M.; LANARO, C.; OZELO, M.C.; GARRIDO, V.T.; OLALLA-SAAD, S.T.; CONRAN, N.; COSTA, F.F. Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients, **Microvasc Res**, v.90, p.173-179, 2013.

SANTOS, J.L.; CHIN, C.M. Recent Insights on the Medicinal Chemistry of Sickle Cell Disease **Curr Med Chem**, v. 18, p.2339-2358, 2011.

SANTOS, J.L. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento da anemia falciforme**.197p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2007.

SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C.; LIMA, L.M.; COSTA, F.F.; LANARO, C. **Uso de compostos derivados ftalimídicos e/ou sulfonamídicos no tratamento de doenças em que há a necessidade de diminuição dos níveis de TNF- α e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico, compostos derivados ftalimídicos, compostos derivados sulfonamídicos, métodos de obtenção de um composto derivado sulfonamídico**. BR n. PI 0705396-7, 12 dez. 2007.

SAUNTHARARAJAH, Y.; HILLERY, C.A.; LAVELLE, D.; MOLOKIE, R.; DORN, L.; BRESSLER, L.; GAVAZOVA, S.; CHEN, Y.H.; HOFFMAN, R.; DESIMONE, J. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. **Blood**, v.102, p.3865–3870, 2003.

SCHECHTER, A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v.112, n.10, p.3927-3938, 2008

SCHOENAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **II Farmaco**, v.54, p.316– 320, 1999.

SÉCHAUD, R.; ROBEVA, A.; BELLELI, R.; BALEZ, S. Absolute oral bioavailability and disposition of deferasirox in healthy human subjects. **J Clin Pharmacol**, v.48, n.8, p.919-925, 2008.

SHIMOKAWA, H.; MORISHIGE, K.; MIYATA, K.; KANDABASHI, T.; ETO, Y.; IKEGAKI, I.; ASANO, T.; KAIBUCHI, K.; TAKESHITA, A. Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. **Cardiovasc Res**, v.51, p.169–177, 2001.

SIMÕES, B. P. I.; PIERONI, F.; BARROS, G. M. N.; MACHADO, C.L.; CANÇADO, RODOLFO D. V.; SALVINO, M. A.; ÂNGULO, I.; VOLTARELLI, J. C. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias Brazilian consensus meeting on stem cell transplantation: hemoglobinopathies committee **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.32 , 2010 .

SPACE, S.L.; LANE, P.A.; PICKETT, C.K.; WEIL, J.V. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. **Am J Hematol**, v.63, n. 4, p.200-204, 2000.

SOLOVEY, A.; KOLLANDER, R.; SHET, A.; MILBAUER, L.C.; CHOONG, S.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; BLAZAR, B.R.; KELM JR, R.J.; HEBBEL, R.P. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. **Blood**, v.104, p.840-846, 2004.

Song, Y.; Chen, X.; Wang, L.Y.; Gao, W.; Zhu, M.J. Rho kinase inhibitor fasudil protects against b amyloid induced hippocampal neurodegeneration in rats. **CNS Neurosci Ther**, v.19, p.603–610, 2013.

SORBA, G.; MEDANA, C.; FRUTTERO, R.; CENA, C.; DI STILO, A.; GALLI, U.; GASCO, A. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **J Med Chem**, v. 40, n. 4, p. 463-469, 1997.

STARK, A.D.; JANERICH, D.T.; JEREB, S.K. The incidence and causes of death in a follow-up study of individuals with haemoglobin AS and SS. **Int J Epidemiol**, v.9, p. 325-8, 1980

STEINBERG, M.H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharmacol Scienc**, v. 27, n.4, p. 204-210, 2006.

STEINBERG, M.H.; RODGERS, G.P. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. **Medicine (Baltimore)**, v.80, n.5, p.328-44, 2001.

STOCKER, J.W.; DE FRANCHESI, L.; NAUGHTON-SMITH, G.A.; CORROCHER, R.; BEUZARD, Y.; BRUGNARA, C. ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. **Blood**. v.101 p.2412–2418, 2003.

TAYLOR, S.M.; PAROBEEK, C.M.; FAIRHURST, R.M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v.12, p.457–468, 2012.

TURCOT, I.; STINTZI, A.; XU, J.; RAYMOND, K.N. Fast Biological Iron Chelators: Kinetics of Iron Removal from Human Diferric Transferrin by Multidentate Hydroxypyridonate. **J Biol Inorg Chem**, v.5, p.634-64, 2000.

UENO, H.; BAI, Y.; MANNING, J.M. Covalent chemical modifiers of sickle cell hemoglobin. **Ann N. Y. Acad Sci**, v. 565, p.239-246, 1989

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

VICHINSKY, E. Emerging 'A' therapies in hemoglobinopathies: agonists, antagonists, antioxidants, and arginine. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v.2012, p.271-5, 2012

VILLAGRA, J.; SHIVA, S.; HUNTER, L.A.; MACHADO, R.F.; GLADWIN, M.T.; KATO, G.J. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. **Blood**, v.110, p.2166–2172, 2007

WALLACE, K.L. ; LINDEN, J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease, **Blood**, v. 116, n.23, p.5010-5020, 2010.

WANG, P.G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications **Chem Rev**, v.102, n.4, p.1091-134, 2002.

WASHIDA, N.; WAKINO, S.; TONOZUKA, Y.; HOMMA, K.; TOKUYAMA, H.; Rho-kinase inhibition ameliorates peritoneal fibrosis and angiogenesis in a rat model of peritoneal sclerosis. **Nephrol Dial Transplant**. v.26, n.9, p.2770-2779, 2011.

WATERMAN, M.R.; YAMAOKA, K.; DAHM, L.; TAYLOR, J.; COTTAM, G.L. NONCOVALENT modification of deoxyhemoglobin S solubility and erythrocyte sickling. **Proc Natl Acad Sci**, v.71, n.6, p.2222-2225, 1974.

WATSON, J.; STAHPMAN, A. W.; BILLELO, F.P. The significance of the paucity of sickle cells in neighborly negro infants. **Am J Med Scie**, v. 215, p.419-423, 1948.

WANKO, S.O.; TELEN, M.J. Transfusion management in sickle cell disease. **Hematol Oncol Clin N Am**, v.19, p.803-826, 2005.

WEATHERALL, D. J. Genetic variation and susceptibility to infection: the red cell and malaria **Br J Haematol**, v.141, n.3, p.276-286, 2008.

WERMUTH, C. G. Multitargeted drugs: the end of the "one-target-one-disease" philosophy? **Drug Discov Today**, v. 9, n. 19, p. 826-827, 2004.

WOOD, K.C.; HEBBEL, R.P.; GRANGER, D.N. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. **Faseb J**, v.19 p.989–991,2005.

WUN, T.; DE CASTRO, L.; STYLES, L. Effects of GMI-1070, a pan-selectin inhibitor, on leukocyte adhesion in sickle cell disease: results from a phase 1/2 study. **Blood** v.116, n.21, p.262a, 2010.

WUN, T.; PAGLIERONI, T.; TABLIN, F.; WELBORN, J.; NELSON, K.; CHEUNG, A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. **J Lab Clin Med**, v.129, n.5, p. 507-516, 1997.

YING, H.; BIROC, S.L.; LI, W.W.; ALICKE, B.; XUAN, J.A.; PAGILA, R.; OHASHI, Y.; OKADA, T.; KAMATA, Y.; DINTER, H. The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. **Mol Cancer Ther**, v.5, p.2158–2164,2006.

ZENNADI, R.; CHIEN, A.; XU, K.E.; BATCHVAROVA, M.; TELEN, M.J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood**, v. 112, n. 8, p. 3474-3483, 2008.

ZENNADI, R.; MOELLER, B.J.; WHALEN, E.J.; BATCHVAROVA, M.; XU, K.; SHAN, S.; DELAHUNTY, M.; DEWHIRST, M.W.; TELEN, M.J. Epinephrine-induced activation of LW-mediated sickle cell adhesion and vaso-occlusion in vivo. **Blood**, v.110, n.7, p.2708–2717,2007.

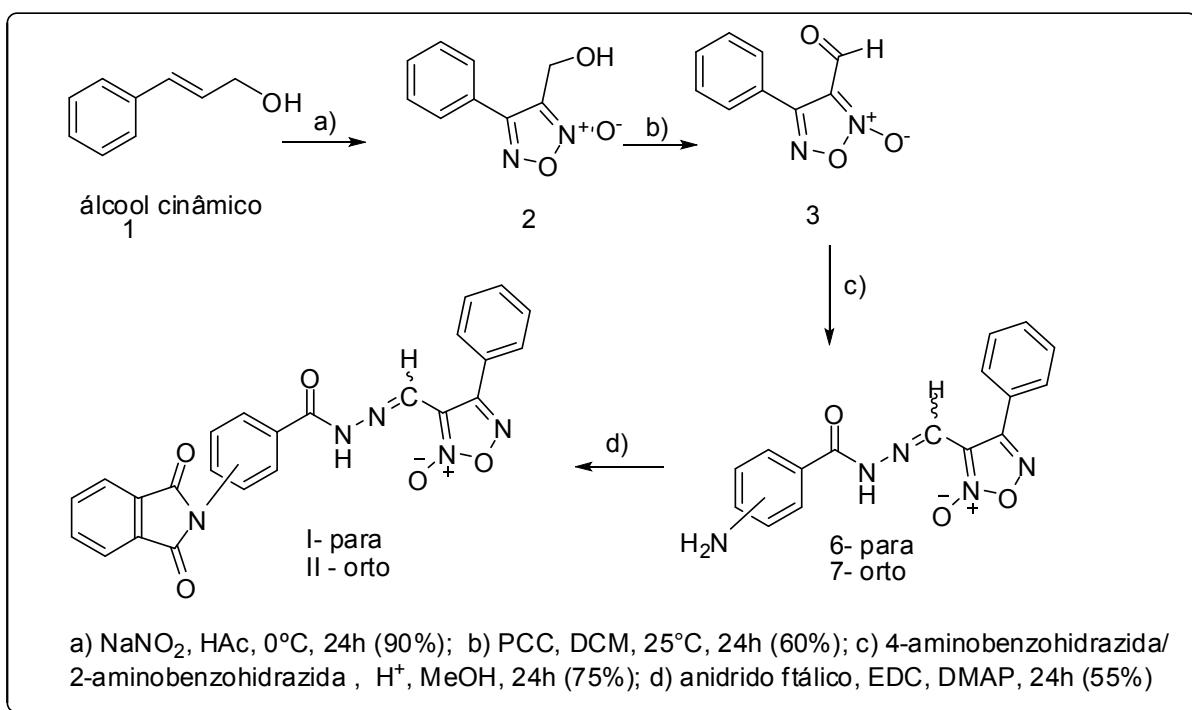
ANEXOS

Procedimentos experimentais e espectros

Os procedimentos sintéticos dos produtos obtidos, bem como as respectivas caracterizações estruturais serão apresentados nesta seção na sequência de obtenção dos produtos finais (compostos I-IV).

A) Procedimento sintético:

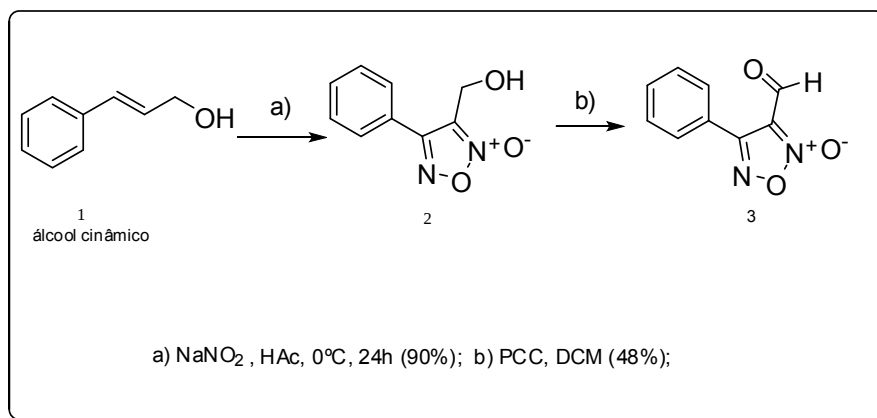
1. Síntese dos compostos I e II



Esquema 8: Obtenção dos compostos I e II a partir do álcool cinâmico (I)

1.1 Síntese do derivado furoxânico funcionalizado 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido-3-carbaldeído (3) (SANTOS, 2009)

Esquema sintético:



Procedimento:

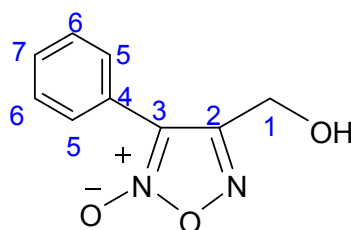
Em balão de fundo redondo de 125 mL adicionou-se 10,8 g do álcool trans-cinâmico(1) em 16mL de ácido acético. Em seguida, com auxílio de funil de adição adicionou-se lentamente a solução saturada de nitrito de sódio em água 15,52g (0,3 mol) em 35 mL de água destilada mantendo a reação em banho de gelo. Após a completa adição da solução de nitrito de sódio, a reação foi retirada do banho de gelo e mantida em temperatura ambiente por um período de 24 horas.

O isolamento da reação foi realizado por extração com éter etílico (4 x 30 mL). A fase orgânica foi então lavada com solução saturada de NaCl , em seguida foi adicionado o agente secante sulfato de sódio anidro para remoção da água residual. O volume do conteúdo foi reduzido sob pressão reduzida e a purificação do produto desejado foi feita em coluna cromatográfica usando sílica gel como fase estacionária e mistura de 50% acetato de etila e 50% hexano como fase móvel, o produto isolado tem aspecto oleoso com coloração alaranjada.

O rendimento da reação foi de 90% e na análise por Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D) foi obtido Fator de Retenção de 0,71 (R_f). Após a purificação do 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxidiazol-N-óxido, a função álcool foi

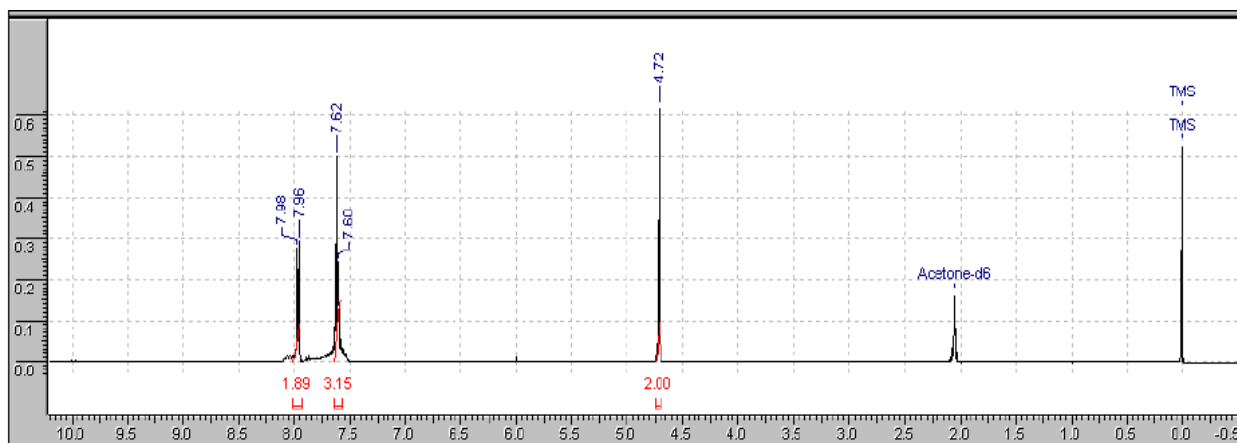
oxidada a aldeído diluindo-se 900mg (4,6 mmol) do derivado furoxânico em 30 mL de diclorometano anidro em balão de fundo redondo de 125 mL e adicionando 1,45g de PCC (clorocromato de piridínio) (6,7 mmol). Este meio reacional foi mantido sob vigorosa agitação e temperatura ambiente durante o período de 24 horas. Uma vez completada a reação, o conteúdo do meio reacional foi filtrado e foi feita extração do produto com clorofórmio (5 x 40mL). O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando como fase móvel 50% acetato de etila e 50%h. O produto formado é oleoso de coloração marrom e teve fator de retenção obtido através da cromatografia em camada delgada 0,85 (Rf) e com rendimento de 48%.

Caracterização estrutural :

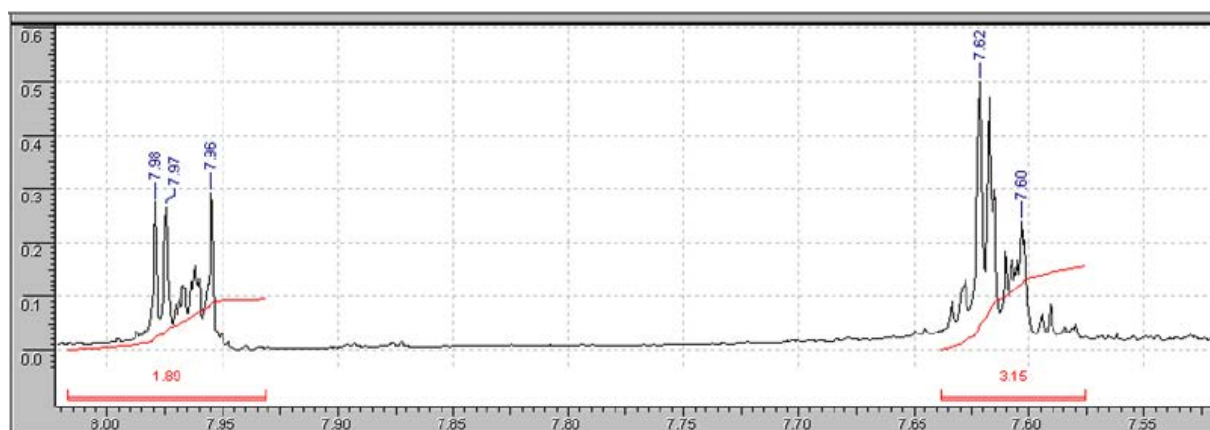


RMN ^1H (400 MHz; acetona- d_6): 7,97 (m; H₅; 2H); 7,81 (m; H₆ e H₇; 3H); 4,72 (s; H₁; 2H) ppm.

RMN ^{13}C (400 MHz; acetona- d_6): 158,6 (C2); 132,0 (C4); 130,08 (C5); 128,61 (C6); 127,73 (C7); 115,49 (C3); 53,81 (C1) ppm.



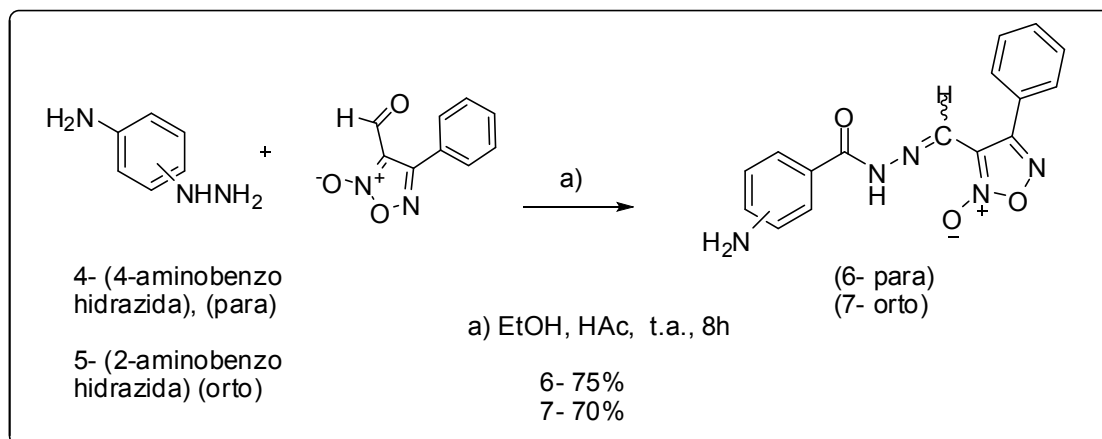
Espectro 21: Espectro de RMN de ^1H do composto 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido(3) (400 MHz; acetona- d_6)



Espectro 22: Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto 3-hidroximetil-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-N-óxido(3) (400 MHz; acetona- d_6)

1.2 Síntese dos intermediários 6 e 7: Procedimento experimental 4-((2-(4-aminobenzil)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (6) e 4-((2-(2-aminobenzil)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (7)

Esquema sintético



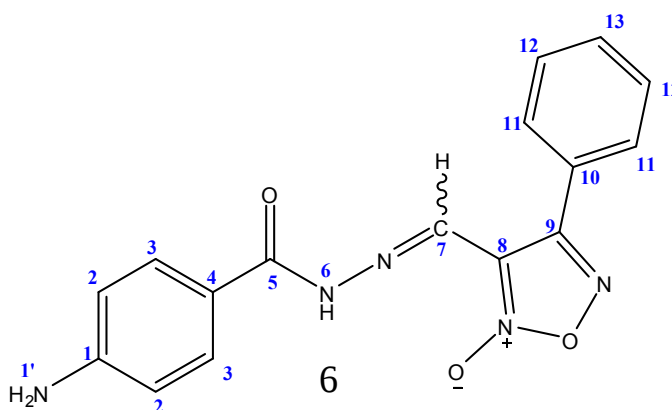
Procedimento:

A reação de formação dos intermediários (6 e 7) acima foi realizada em etanol com catálise ácida. Para tanto, foram adicionados em balão de fundo redondo de 50 mL quantidades equimolares de 4-fenil-1,2,5-oxidiazol-*N*-óxido-3-carbaldeído (0,300 g; 1,5mmol) e de 4-aminobenzohidrazida (0,504 g; 1,5 mmol) em 15,0 mL de etanol, com posterior adição de 3 gotas de ácido acético glacial. Posteriormente, a mistura reacional foi colocada sob agitação constante à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 8 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da hidrazona na com substituinte amino na posição *orto*, utilizando-se, para tanto, a 2-aminobenzohidrazida. O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel: 50% hexano e 50% acetato de etila. As placas cromatográficas também foram reveladas com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (Revelador de Brady) que cora em amarelo os compostos contendo carbonila. Os resultados mostraram que essa função não estava presente nos produtos desejados (orientação para e orto), sugerindo a formação destes compostos.

Ao término da reação, realizou-se filtração sob pressão reduzida e lavagem do produto obtido com 10 mL de água e 15 mL de etanol gelado, para a remoção de reagente residual. O sólido obtido foi deixado secar a temperatura ambiente..

A hidrazona em orientação para (6), 4-((2-(4-aminobenzil)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol- 2-óxido, caracteriza-se por um sólido amarelo, de PM = 323,31 g/mol ($C_{14}H_{11}N_5O_3$), faixa de fusão entre 217-219°C, fator de retenção ($R_f = 0,29$) e rendimento de 75%. Já a hidrazona em orientação orto (7), 4-((2-(2-aminobenzil)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-oxido, caracteriza-se por um sólido amarelo claro, de PM = 323,31 g/mol ($C_{14}H_{11}N_5O_3$), faixa de fusão entre 196-200°C , fator de retenção ($R_f = 0,27$) e rendimento de 70%.

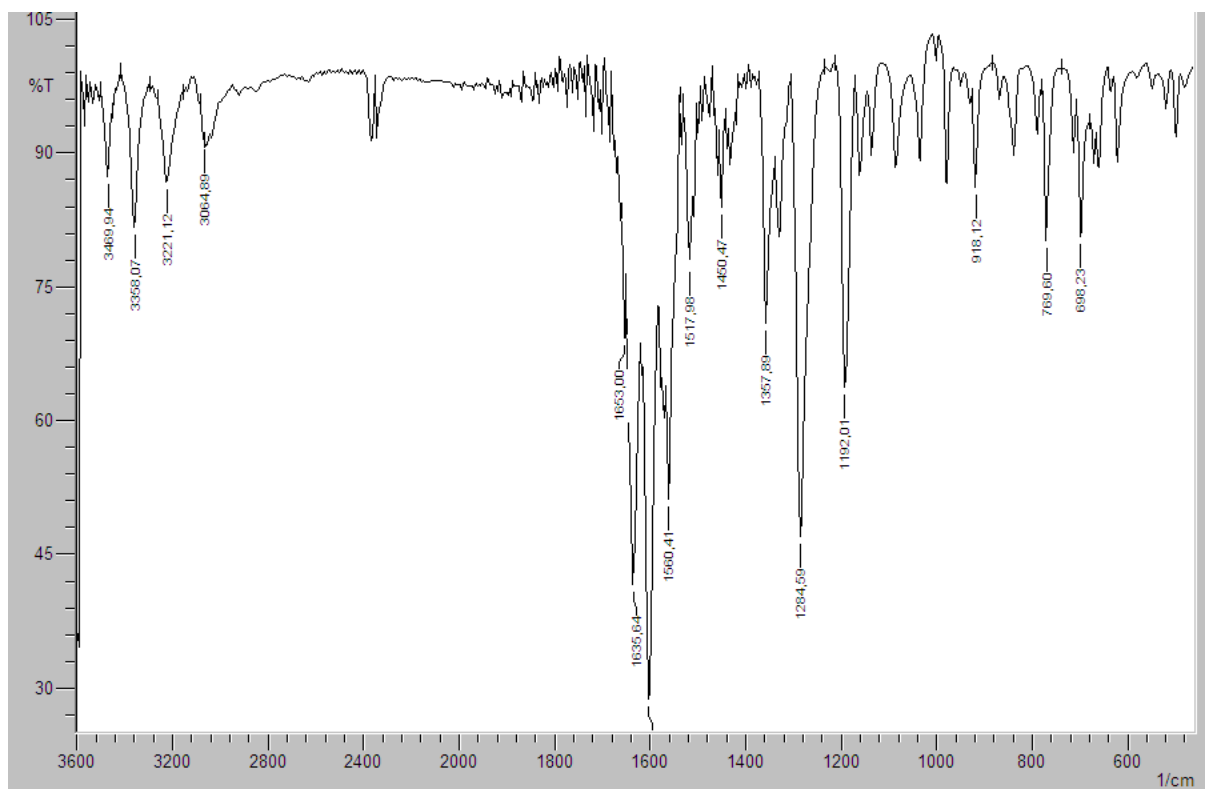
Caracterização estrutural:



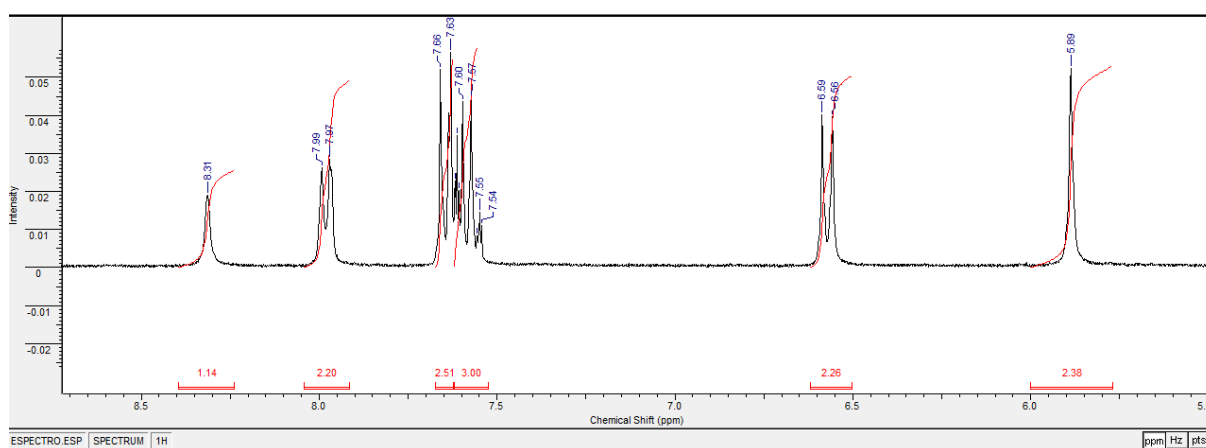
Infravermelho (pastilha de KBr) cm^{-1} : 3469 e 3358 (ν NH_2); 3221 (ν $N-H_{amida}$); 1635 (ν $C=O$ amida); 1600 (ν $C=N$); 1551 (ν NH_2); 1357 (ν $C-N$); 1284 (ν $N-O$)

RMN 1H (300 MHz; $DMSO-d_6$) ppm: 11, 88 (1H, s, H6); 8,31 (1H, s, H7); 7,97 (2H, d, H11, $J = 7,54$ Hz) 7,66-7,54 (5H, m, H3, H12 e H13); 6,58 (2H, d, H2; $J = 8,2$ Hz); 5,9 (2H, s, NH_2) ppm.

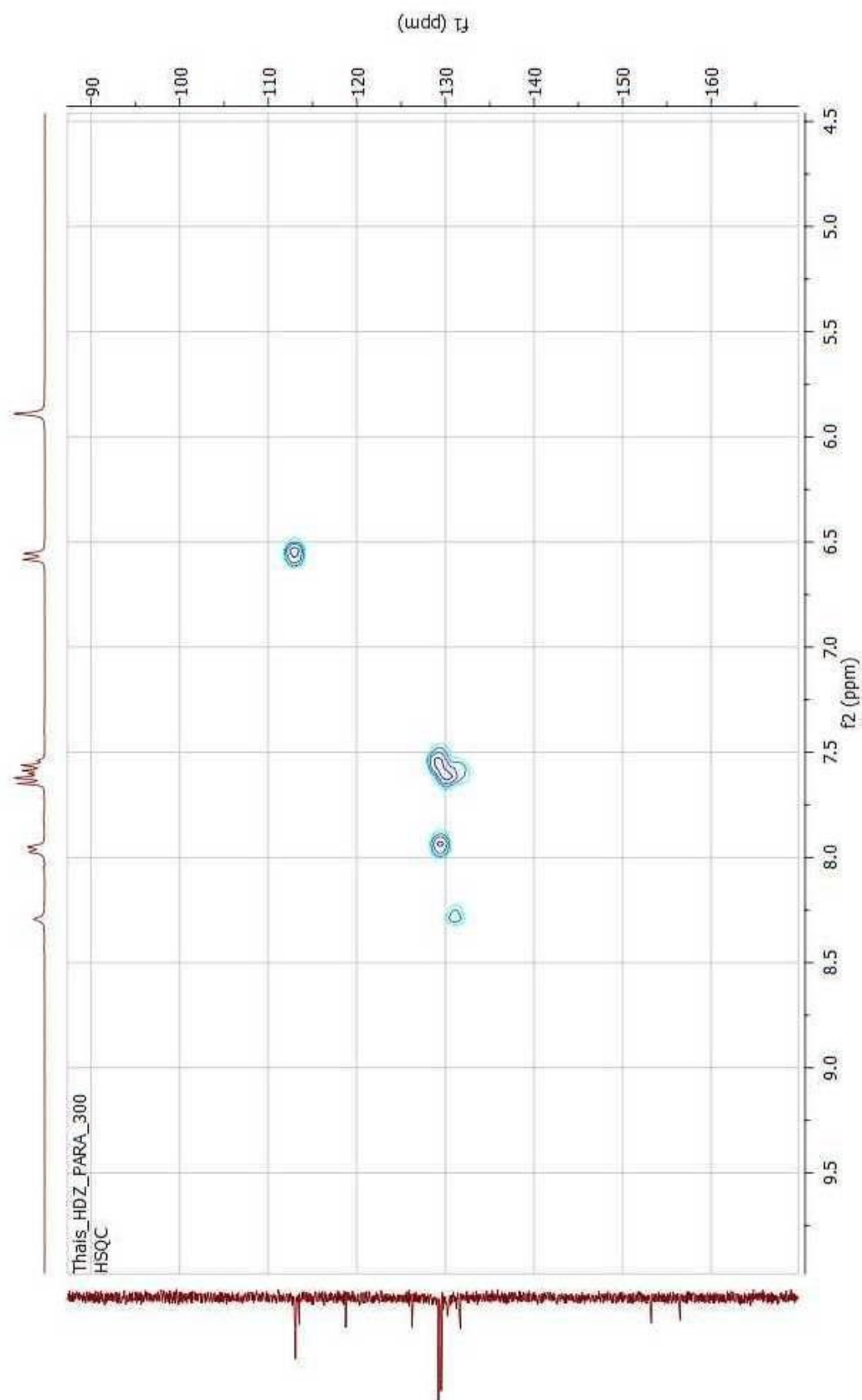
RMN ^{13}C (75 MHz; $DMSO-d_6$) ppm: 156,48 (C9); 153, 22 (C5); 131,67 (C3); 131,09 (C7); 130,22 (C13); 129,51 (C11); 129,19 (C12); 126,20 (C10); 118,72 (C1); 113,48 (C8); 113,05 (C2).



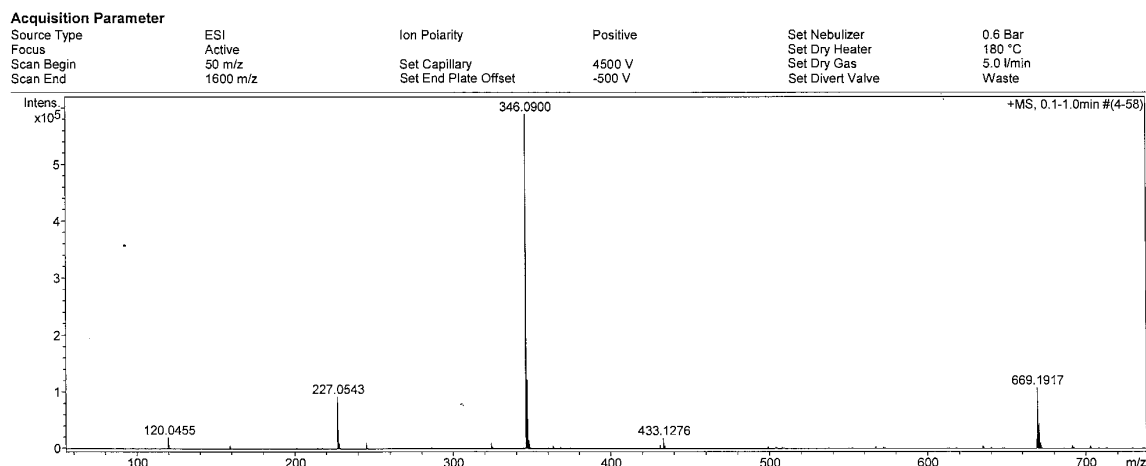
Espectro 23: Espectro na região do infravermelho do composto 6 (pastilha de KBr)



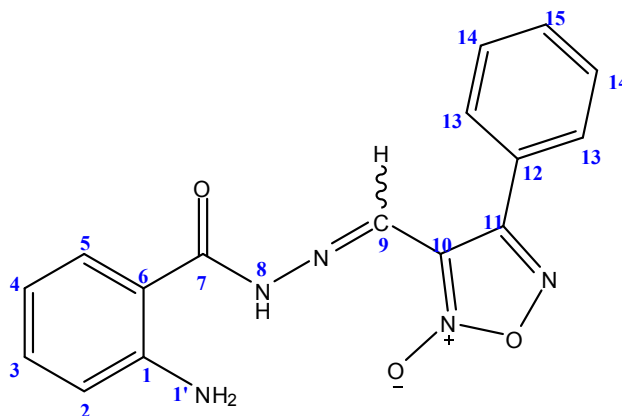
Espectro 24: Espectro de RMN de ¹H do composto 6, ampliado na região de 8,0 a 5,5 ppm. (300 MHz, DMSO-d₆)



Espectro 25: Espectro de RMN de HSQC do composto 6 (300 MHz; DMSO_d₆)



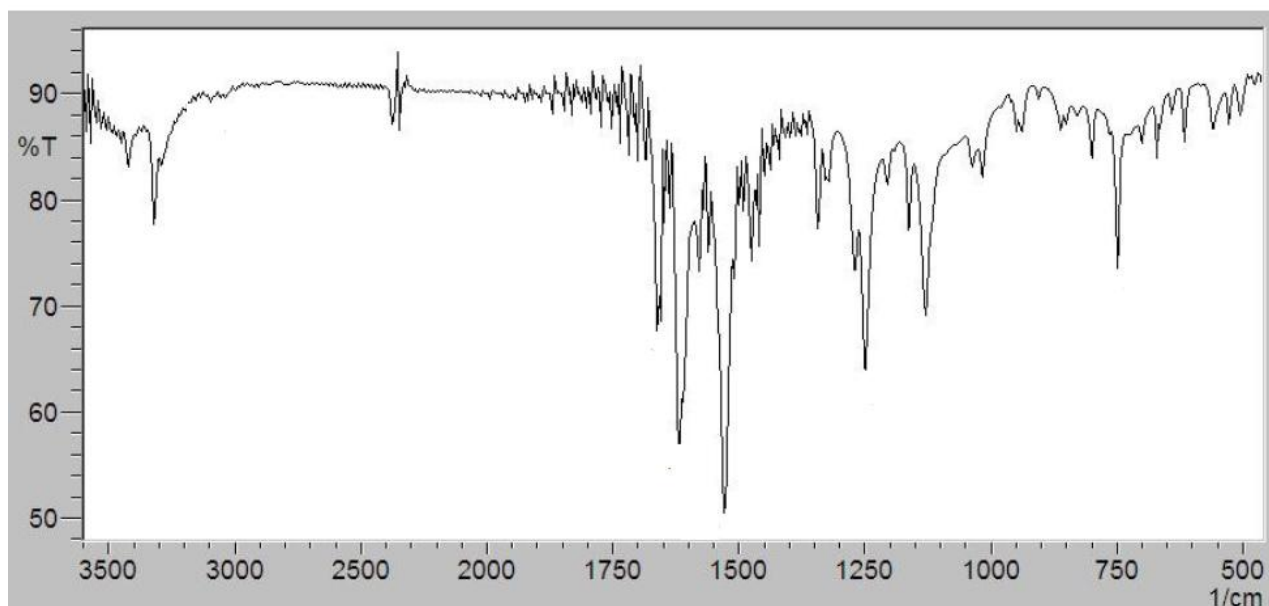
Espectro 26: Espectro de massas de alta resolução do composto 6.



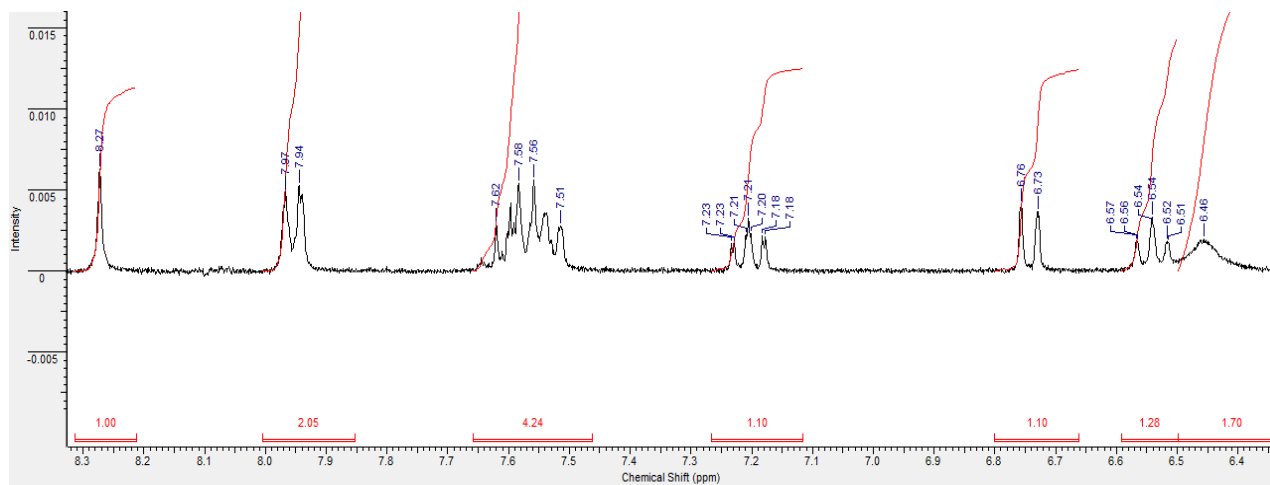
Infravermelho (pastilha de KBr) cm^{-1} : 3421 (ν NH_2); 3319 (ν $\text{N-H}_{\text{amida}}$); 1662 (ν $\text{C=O}_{\text{amida}}$); 1612 (ν C=N); 1529 (ν NH_2); 1340 (ν C-N); 1247 (ν N-O)

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6) ppm: 12,02 (1H, s, H8); 8,28 (1H, s, H9); 7,96 (2H, dd, H13) 7,63-7,52 (4H, m, H5, H14 e H15); 7,21 (1H, tt, H4, $J = 8,0\text{Hz}$ e $J = 1,7\text{Hz}$); 6,75 (1H, dd, H2, $J = 8,0\text{Hz}$ e $J = 1,7\text{Hz}$) 6,57 (1H, tt, H4, $J = 8,0\text{Hz}$ e $J = 1,7\text{Hz}$); 6,46 (2H, s, NH_2) ppm.

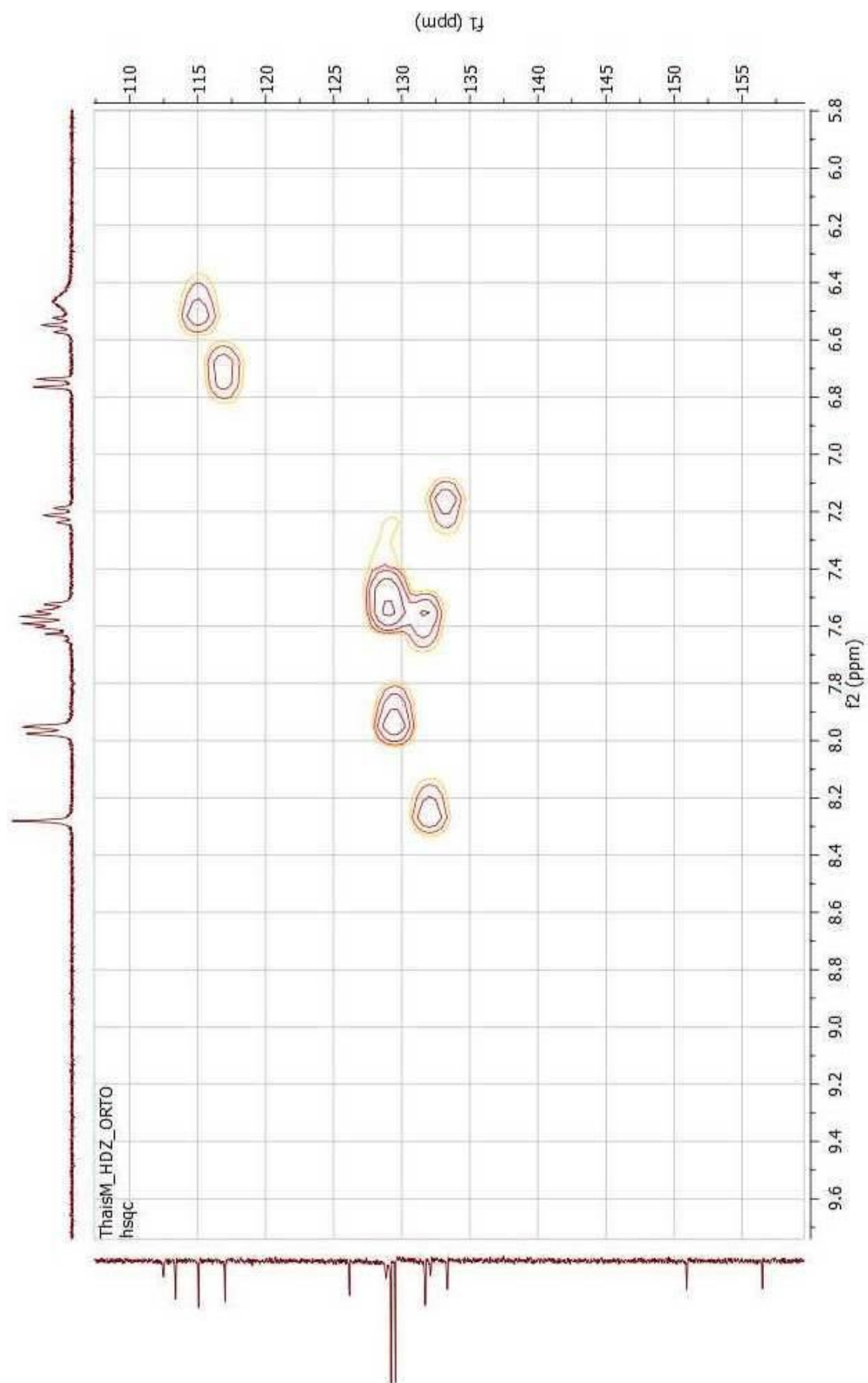
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-d_6) ppm: 156,50 (C11); 150,94 (C7); 133,35 (C4); 132,11 (C9); 131,72(C15); 129,53(C13); 129,21(C14); 128,85(C5); 117,01(C2); 115,07(C3); 113,38(C10); 112,48 (C1).



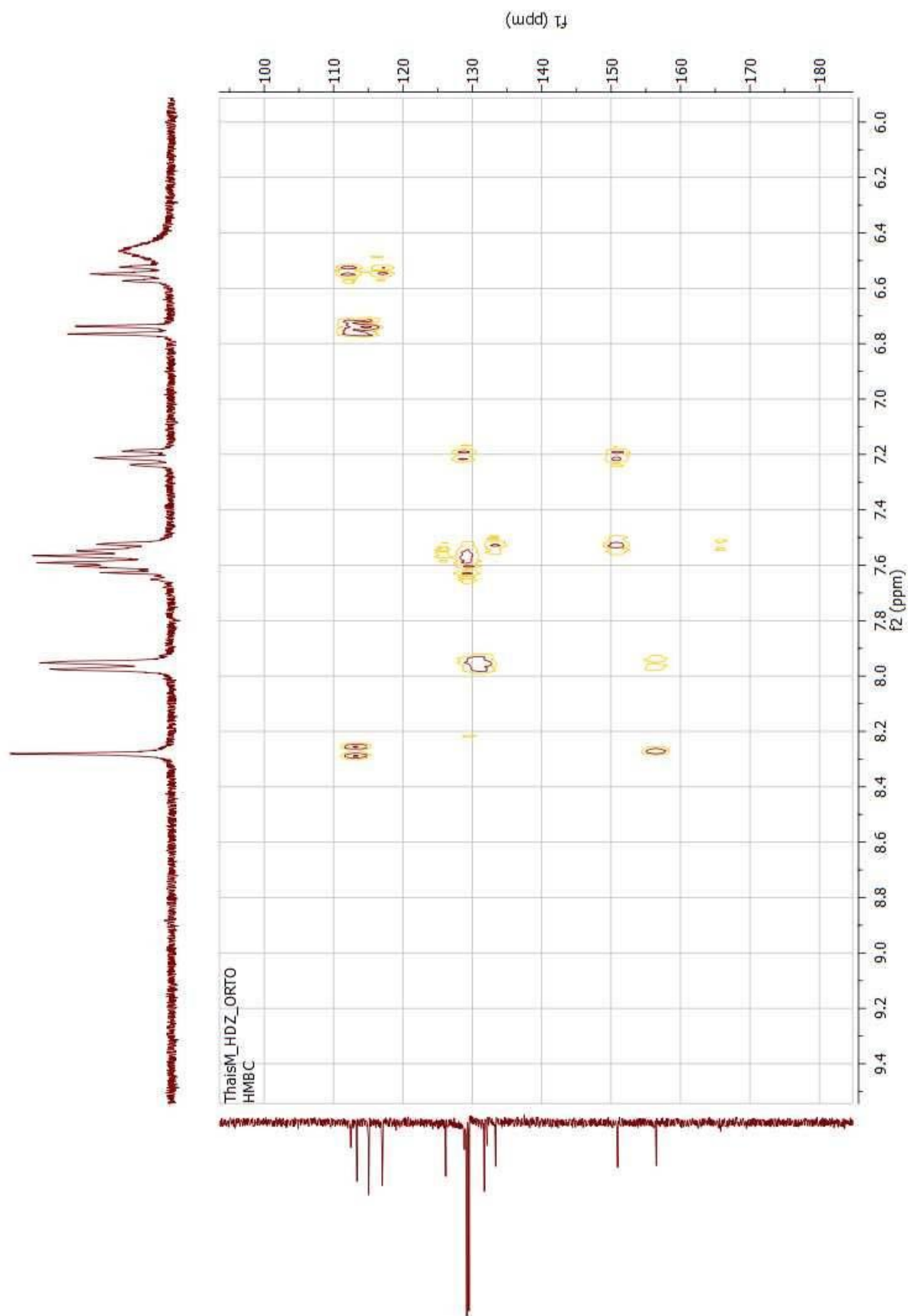
Espectro 27: Espectro na região do infravermelho do composto 7 (pastilha de KBr)



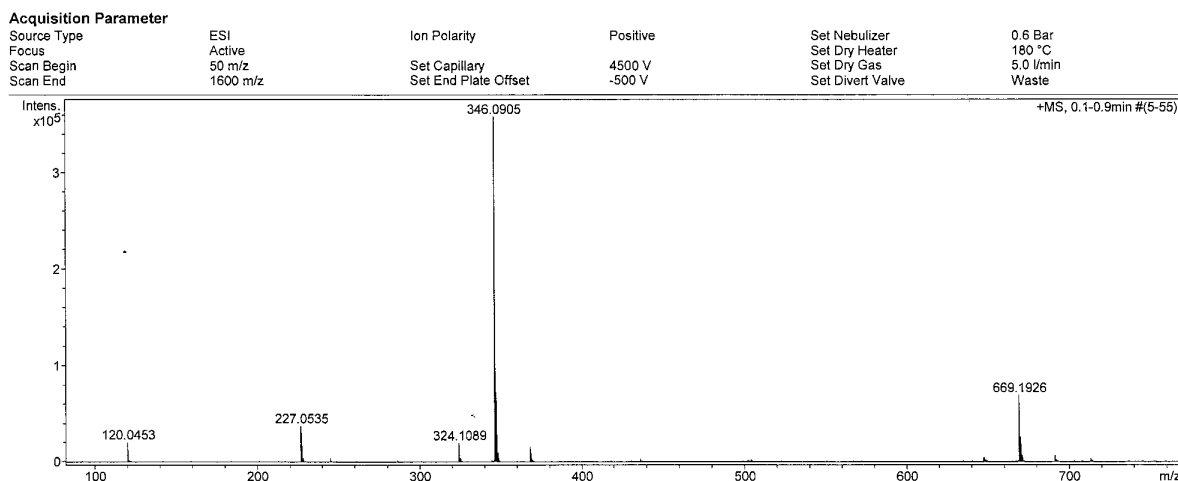
Espectro 28: Espectro de RMN de ^1H do composto 7, ampliado na região de 10,0 a 5,5 ppm (300 MHz, DMSO-d_6)



Espectro 29: Espectro de RMN de HSQC do composto 7 (300 MHz; DMSO_d₆)



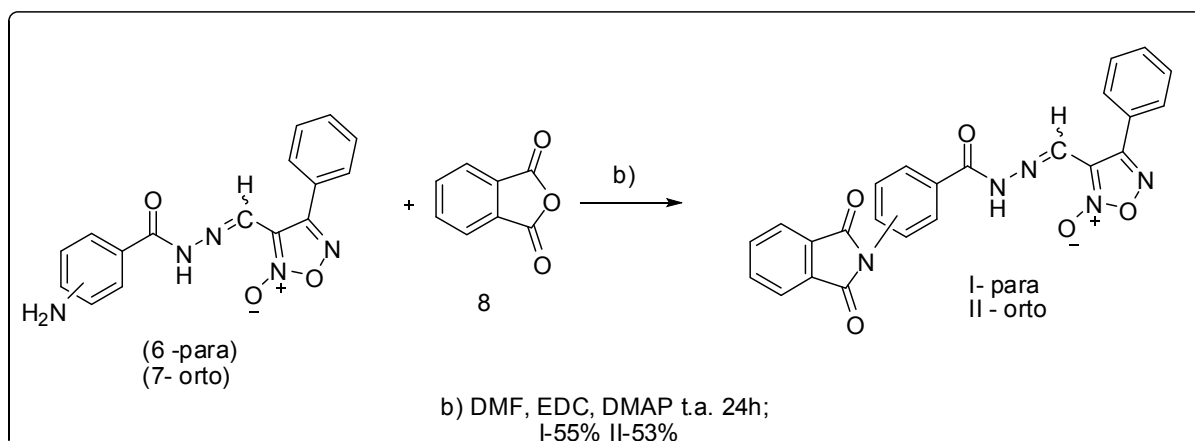
Espectro 30: Espectro de RMN de HMBC do composto 7 (300 MHz; DMSO-d_6)



Espectro 31: Espectro de massas de alta resolução do composto 7.

1.3 Síntese dos compostos híbridos finais I e II: 3-((2-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (I) e 3-((2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (I)

Esquema sintético:



Procedimento:

A reação de formação dos compostos finais híbridos (I e II) foi realizada em um balão de 125 mL, onde foram adicionados 0,149 g (0,001 mol) de anidrido ftálico (8) e 0,230 g (0,0012 mol) de EDC (agente acoplante), seguidos de 0,323 g (0,001 mol) do intermediário 4-((2-(4-aminobenzoyl)hidrazono)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-

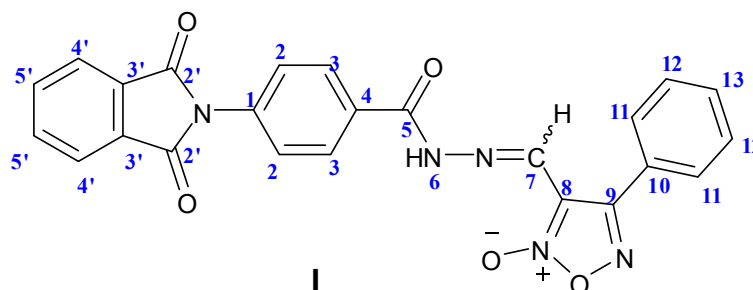
2-óxido (6) e 0,05 g de DMAP, como agente catalisador em 10,0 mL de dimetilformamida anidro. O sistema foi mantido sob agitação constante e à temperatura ambiente por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção produto final 3b, utilizando-se 0,323 g(0,001 mol) do intermediário 4-((2-(2-aminobenzoil)hidrazona)metil)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (7).

Ao término da reação, foi adicionado ao meio cerca de 10 mL de água destilada e 10 mL de HCl 0,5 M para diminuir o pH do meio e provocar a precipitação do produto. O isolamento da mistura reacional foi feito por filtração simples, lavando-se o precipitado com água e etanol gelados e deixado secar a temperatura ambiente.

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel: 50% hexano e 50% acetato de etila.

O composto final híbrido obtido (I), o 3-((2-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol- 2-óxido é caracterizado por um sólido amarelo, com faixa de fusão entre 205-208°C, PM = 453,41 g/mol, fator de retenção (R_f = 0,64) e rendimento de, aproximadamente, 55 %. Já o composto híbrido (II), 3-((2-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol-2-óxido é caracterizado por um sólido amarelo, com faixa de fusão entre 250,5-251,1° C, PM = 453,41 g/mol, fator de retenção (R_f = 0,54) e rendimento de, aproximadamente, 53%.

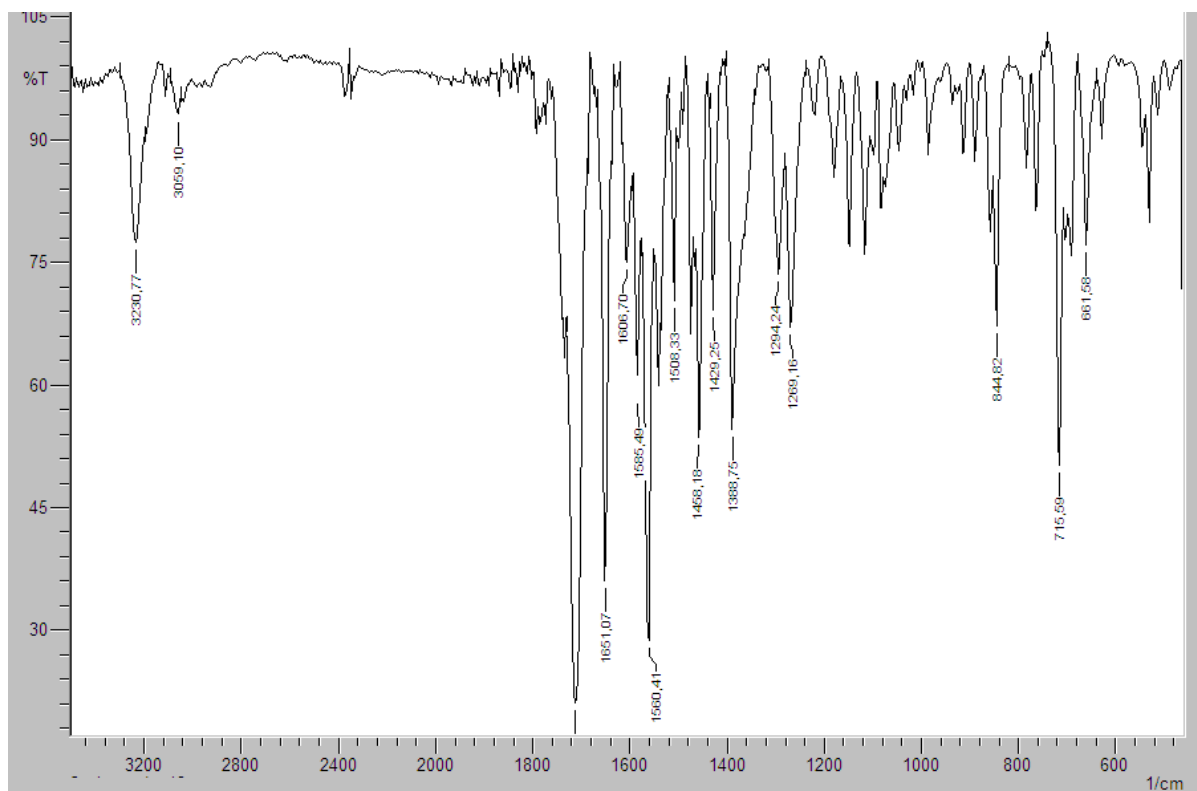
Caracterização estrutural :



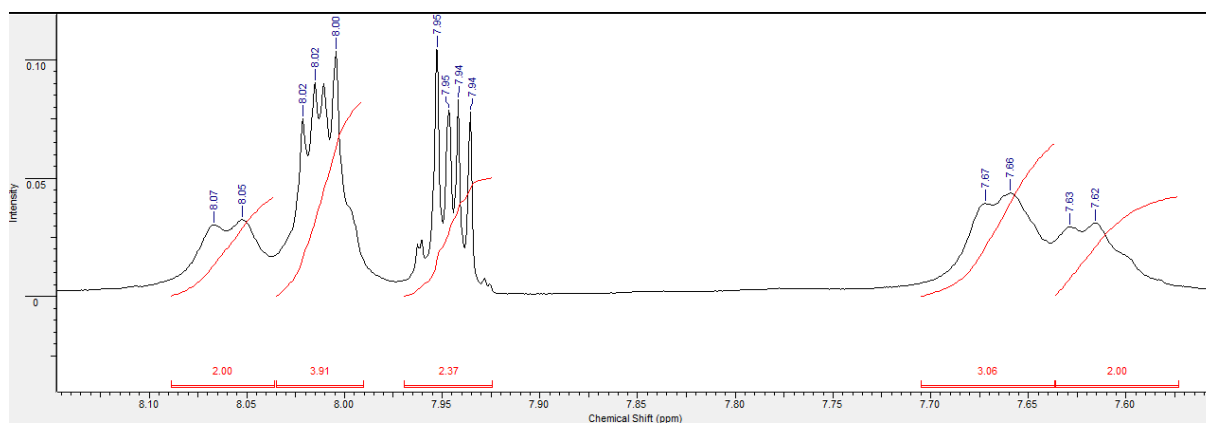
Infravermelho (pastilha de KBr) cm^{-1} : 3230 (ν N-H_{amida}); 1740 e 1712(ν C=O imida) 1651(ν C=O amida); 1606 (ν C=N); 1379(ν C-N); 1269 (ν N-O).

RMN ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) ppm:12,37 (1H, s, H6); 8,41 (1H, s, H7); 8,01(4H, m, H3', H4') 8,06 (2H, d, H11, J=7,79 Hz) 7,97 (2H, m, H3) 7,66 (3H, m, H12 e H13); 7,61 (2H, d, H2, J=7,32 Hz).

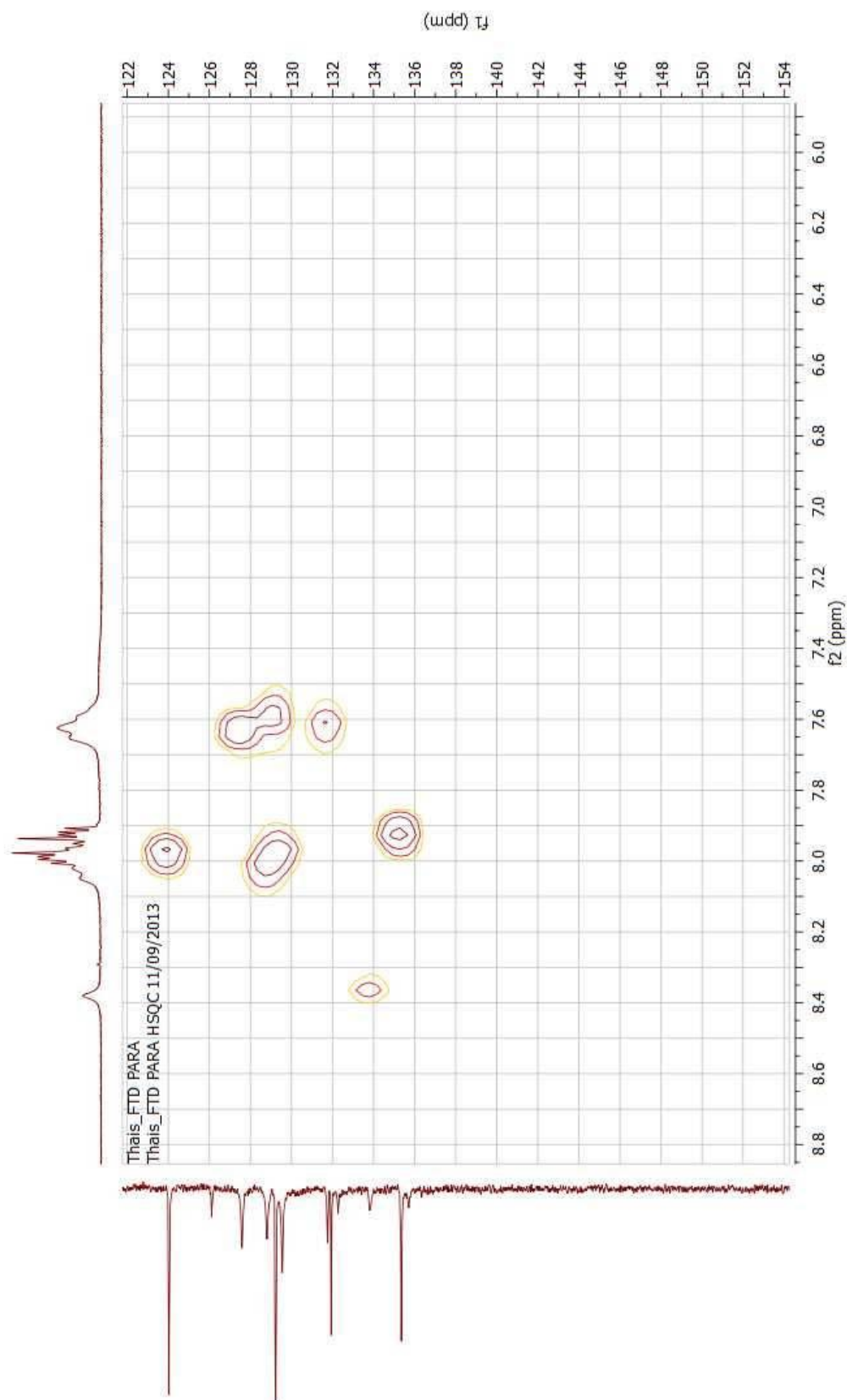
RMN ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)ppm: 168,20 (C1') 1604,05 (C5), 157,56 (C9); 136,37 (C3); 134,92 (C7); 133,0 (C13); 130,53 (C3'); 130,26 (C11); 129,86 (C12); 128,57 (C2); 127,18 (C10); 125,06 (C4') 114,39 (C8).



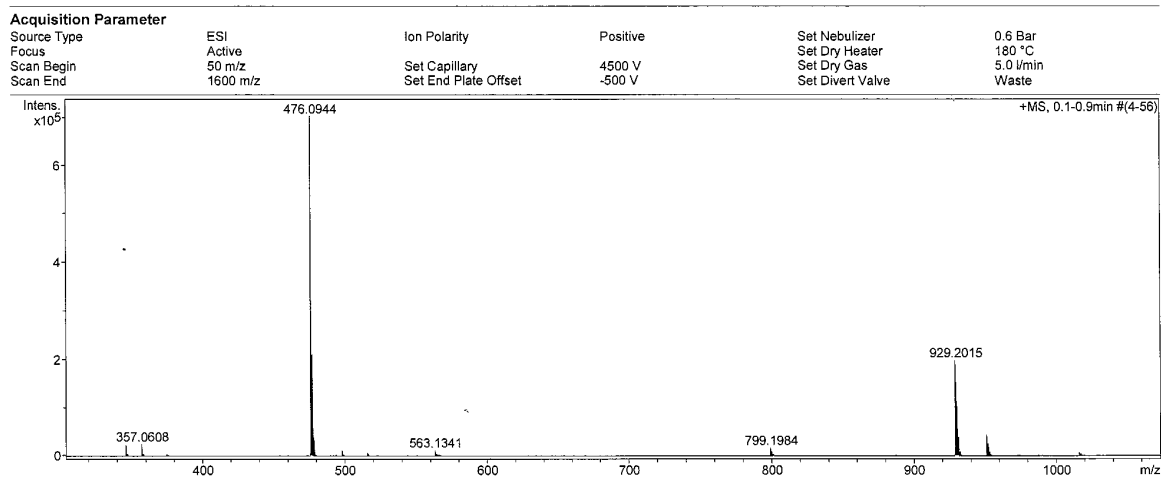
Espectro 32: Espectro na região do infravermelho do produto final I (pastilha de KBr)



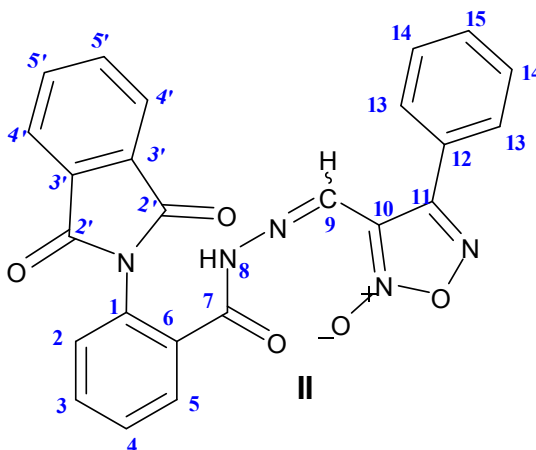
Espectro 33: Espectro de RMN de ^1H do composto I, ampliado na região de 8,9 a 6,8 ppm(300 MHz, DMSO_d6)



Espectro 34: Espectro de RMN de HSQC do composto I (300 MHz; DMSO $_d$ 6)



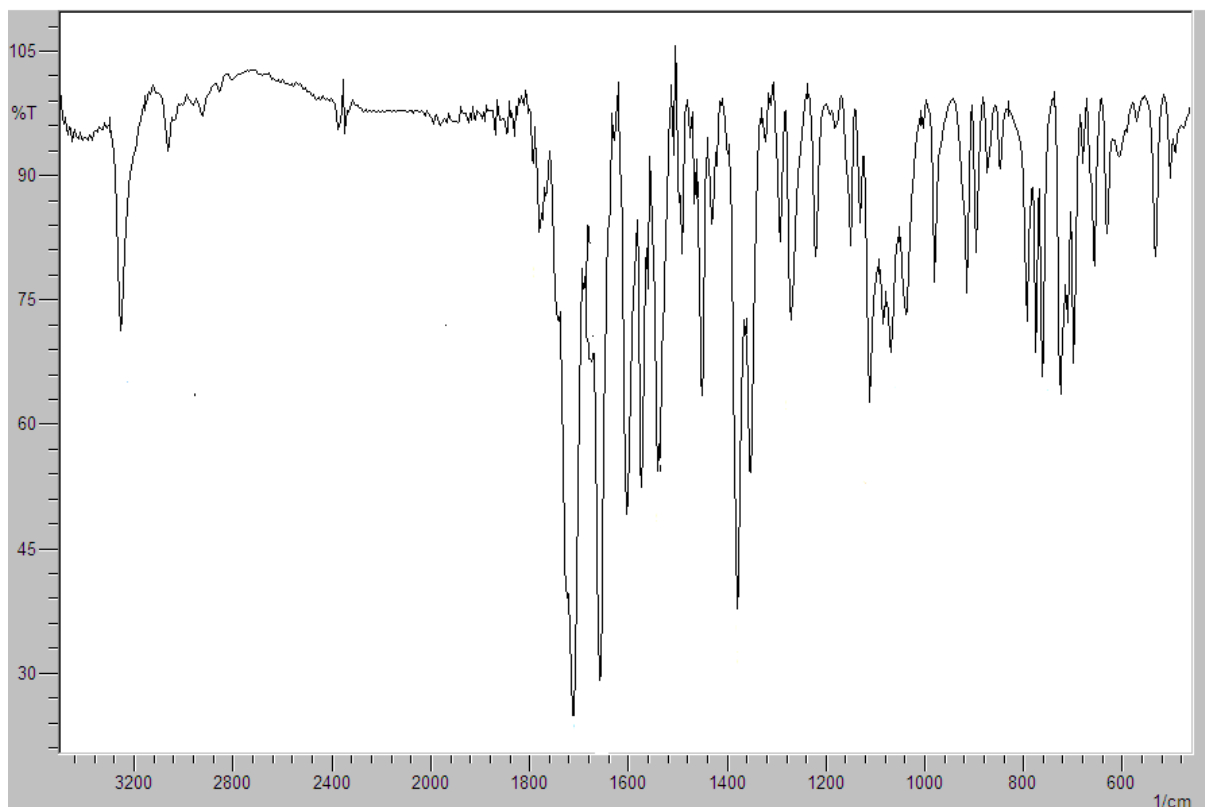
Espectro 35: Espectro de massas de alta resolução do composto I.



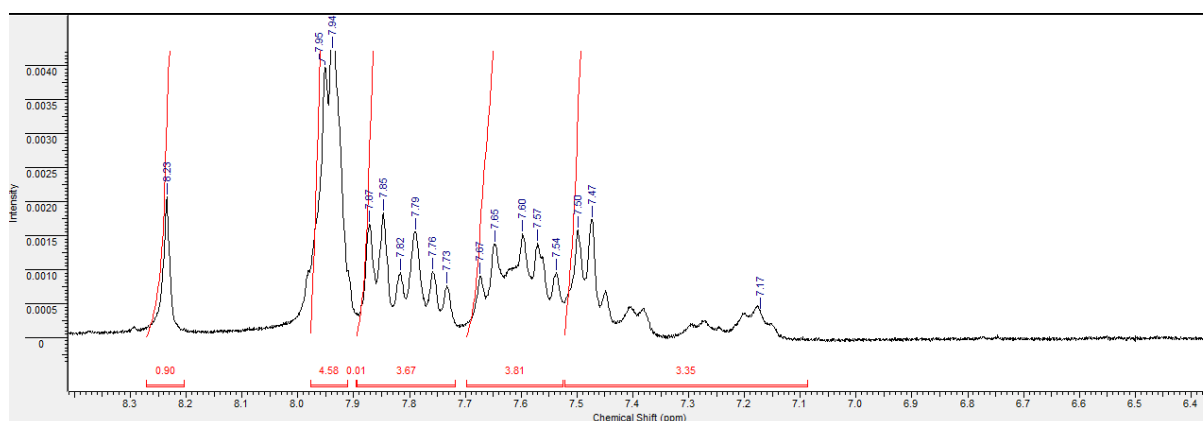
Infravermelho (pastilha de KBr) cm^{-1} : 3253 (ν N-H_{amida}); 1780 e 1710(ν C=O imida) 1656(ν C=O amida); 1602 (ν C=N); 1379(ν C-N); 1269 (ν N-O)

RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6) ppm: 12,43(1H, s, H8); 8,23 (1H, s, H9); 7,94 (4H, m, H4', H5') 7,87-7,73 (3H, m, H13, H5); 7,67-7,54 (3H, m, H14 e H15); 7,50-7,17 (3H, m, H2, H3, H4,).

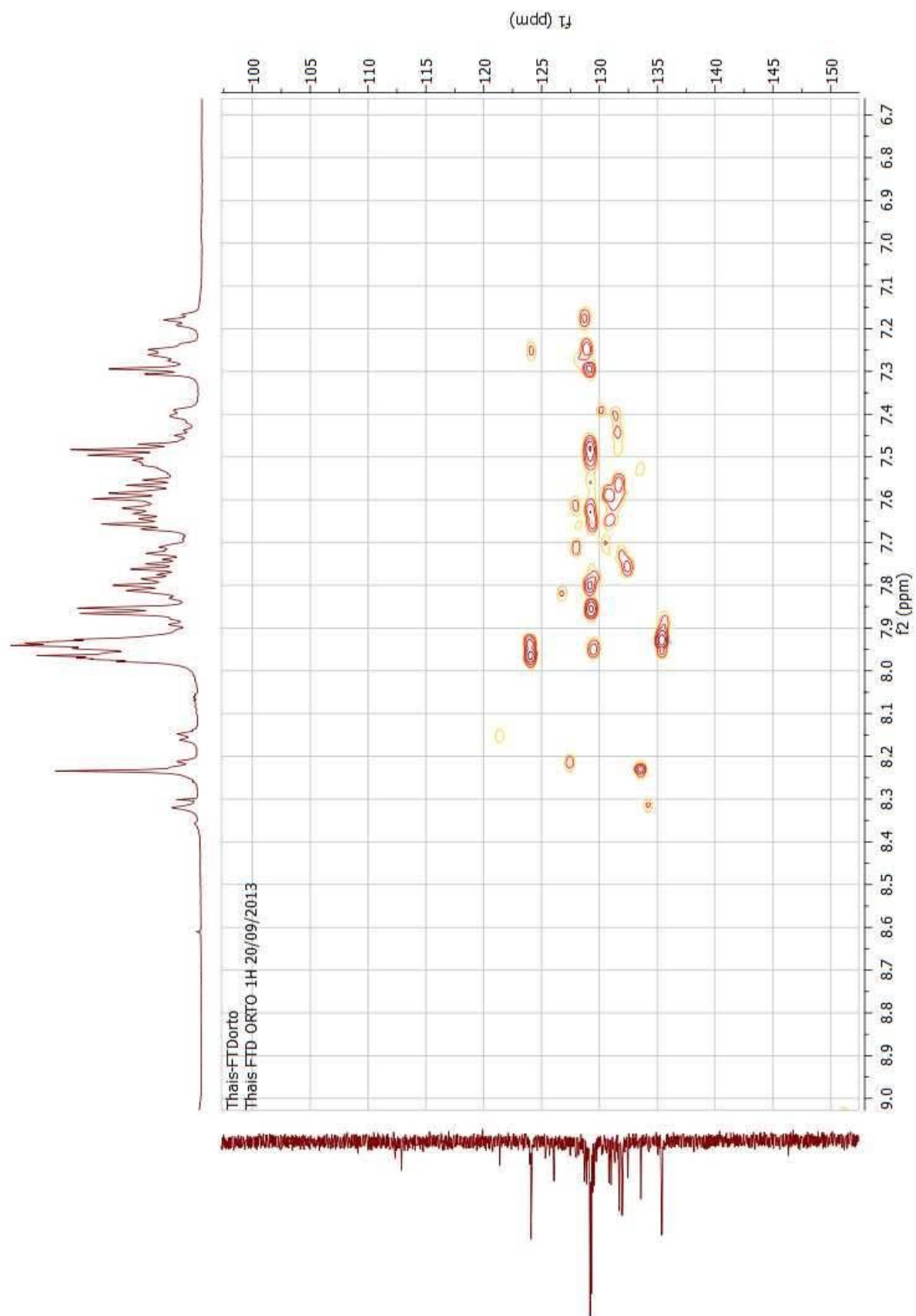
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6)ppm: 167,35 (C2'); 162,09 (C7); 156,50 (C11); 135,39 (C4'); 133,57 (C9); 132,47 (C15); 131,97 (C4); 130,92 (C5); 129,32 (C13); 129,11 (C14); 124,09 (C5'); 123,95 (C2); 113,07 (C10).



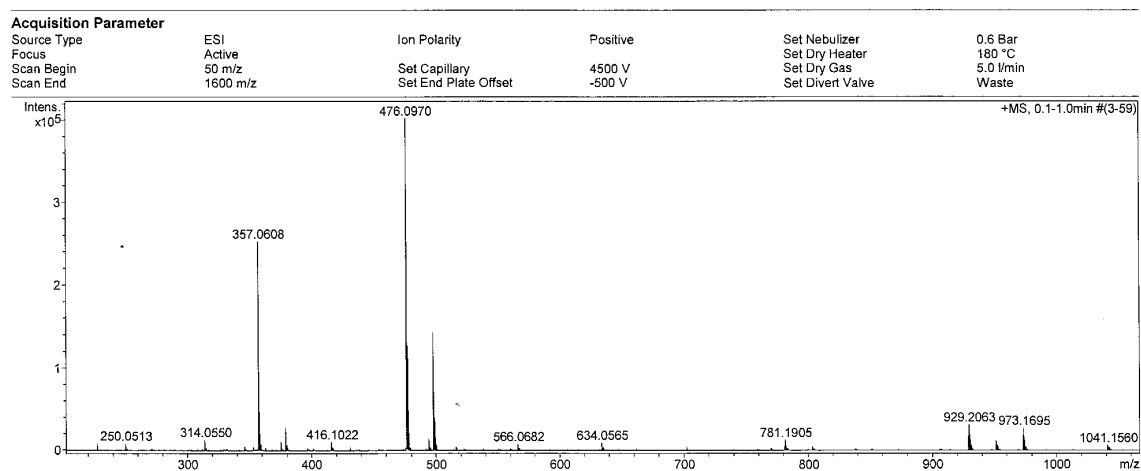
Espectro 36: Espectro na região do infravermelho do produto final II (pastilha de KBr)



Espectro 37: Espectro de RMN de ^1H do composto II, ampliado na região de 8,9 a 6,4 ppm (300 MHz ; DMSO-d_6)

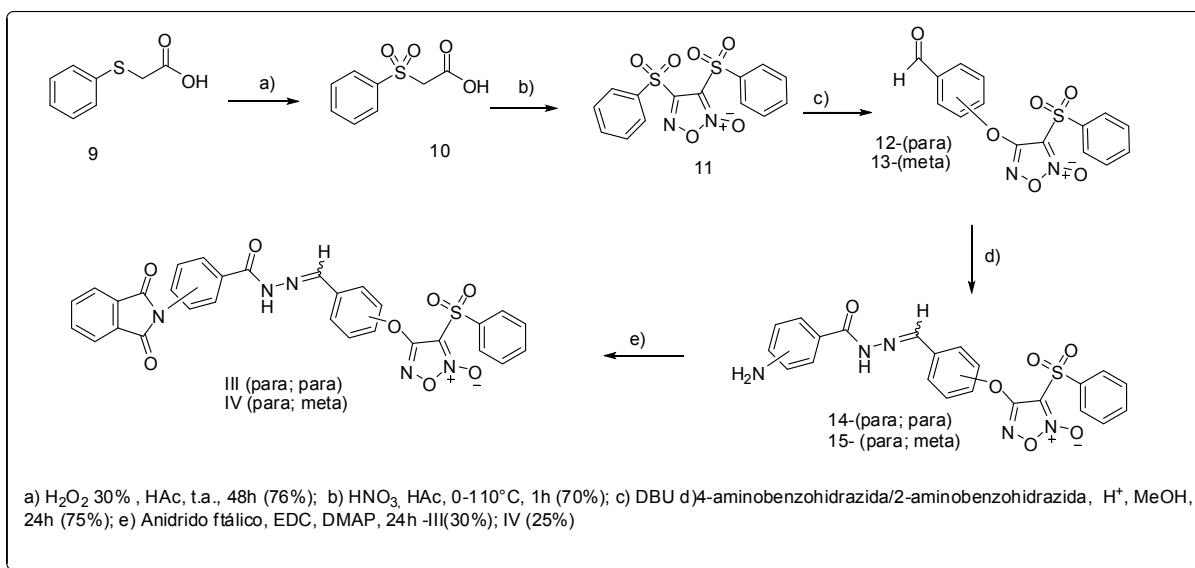


Espectro 38: Espectro de RMN de HSQC do composto II (75 MHz, DMSO-d_6)



Espectro 39: Espectro de massas de alta resolução do composto II.

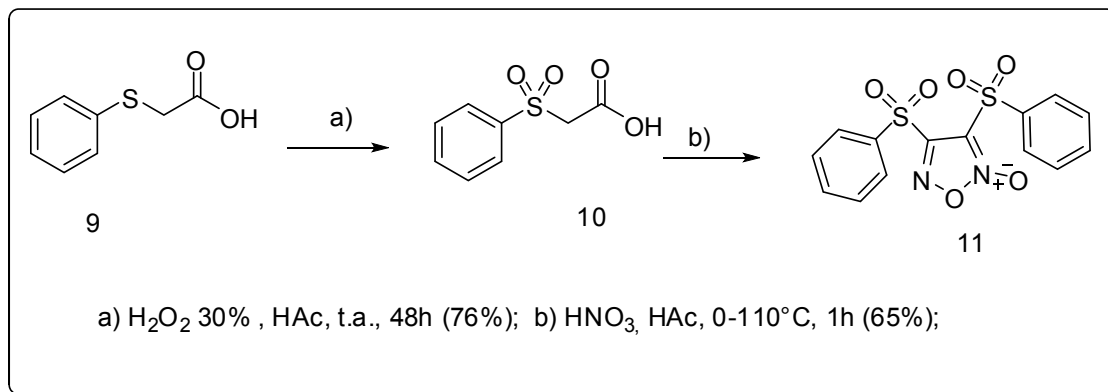
2.0 Síntese dos compostos III e IV:



Esquema 9: Obtenção dos compostos III e IV .

2.1 Síntese do 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-N-óxido-1,2,5-oxadiazol (11).

Esquema sintético:



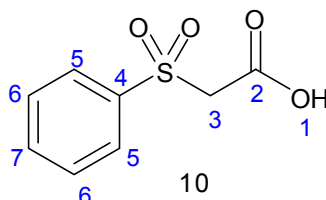
Procedimento:

Primeiramente foi obtido o ácido fenilsulfonilacético (10), adicionando em balão de 250 mL adicionou-se 5 g de ácido feniltioacético (9) (1equivalente) em 40 mL de ácido acético glacial e 12 mL (4 equivalentes) de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por dois dias (48 horas). O isolamento foi realizado adicionando-se cerca de 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio, em seguida realizaram-se extrações (4 x 15 mL) com acetato de etila. Foi adicionado à fase orgânica sulfato de sódio anidro. Em seguida, filtrou-se e evaporou-se a fase orgânica a pressão reduzida. O produto (10) obtido com rendimento de 76% como um sólido branco (PM = 200,21; $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4\text{S}$).

Em seguida, em balão de 100 mL, adicionou-se 3,21 g do fenilsulfonilacético (10), obtido na etapa anterior, em 10 mL de ácido acético glacial mantendo a temperatura a 0°C. Adicionou-se gota a gota 5 mL de ácido nítrico fumegante a 0°C. A mistura resultante permaneceu sob agitação a 0°C por 5 minutos e depois a reação foi mantida sob agitação e refluxo a 110°C por 45 minutos. Após esse tempo a mistura reacional foi resfriada e adicionou-se lentamente água gelada. Houve formação de um precipitado que foi filtrado e lavado com água gelada. O produto obtido (11) foi cristalizado com uma mistura de acetato de

etila/diclorometano/hexano (1:1:1) para fornecer de 2,54 g de um sólido branco com 65% de rendimento e faixa de fusão =140°C-142°C (PM = 366,38; C₁₄H₁₀N₂O₆S₂).

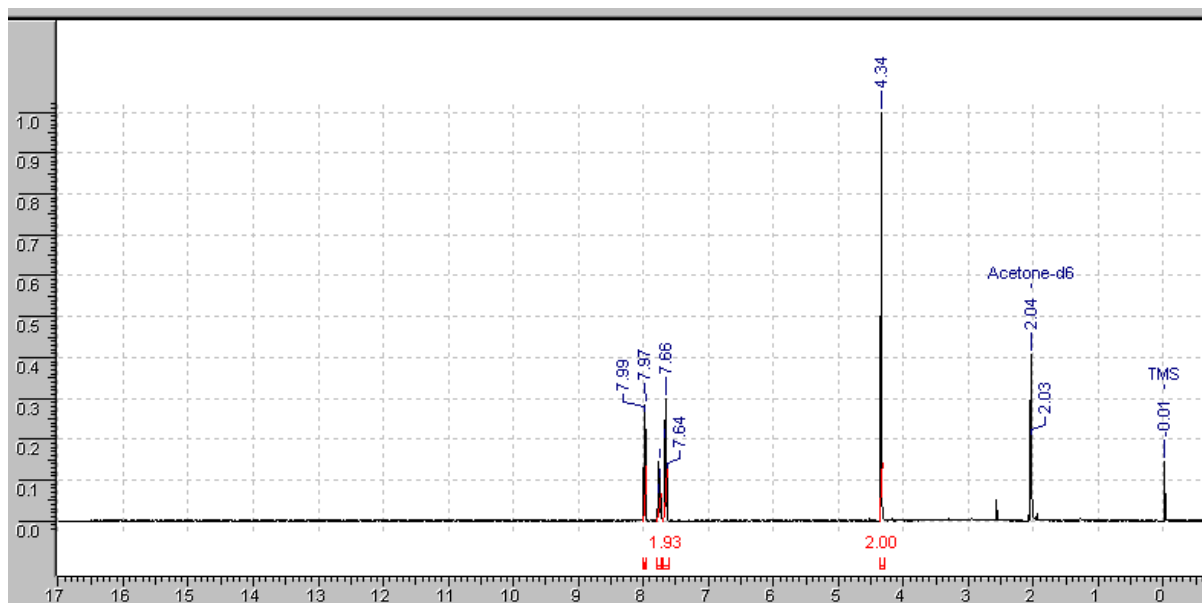
Caracterização estrutural:



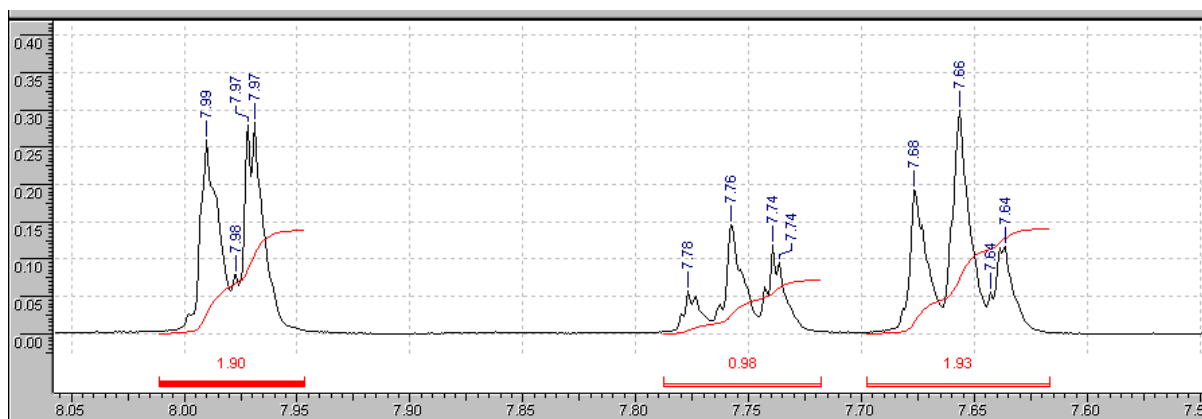
RMN H¹ (400 MHz; acetona-d₆): δ 7,98 (2H ,dd. H5, J_{orto} = 7,33Hz e J_{meta} = 2,02);

7,76 (1H , ddd; H7; J_{orto} = 7,33 Hz e J_{meta} = 2,02); 7,66 (ddd; H6; 2H; J_{orto} = 7,33

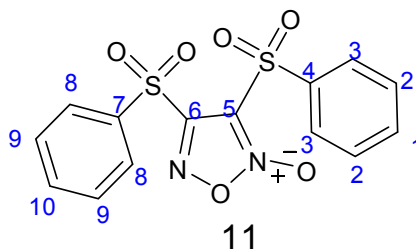
Hz e J_{meta} = 2,02); 4,34 (s; H3; 2H) ppm.



Espectro 40: Espectro de RMN de ^1H do ácido sulfonilfeniltioacético (10) (400 MHz; acetona-d₆).

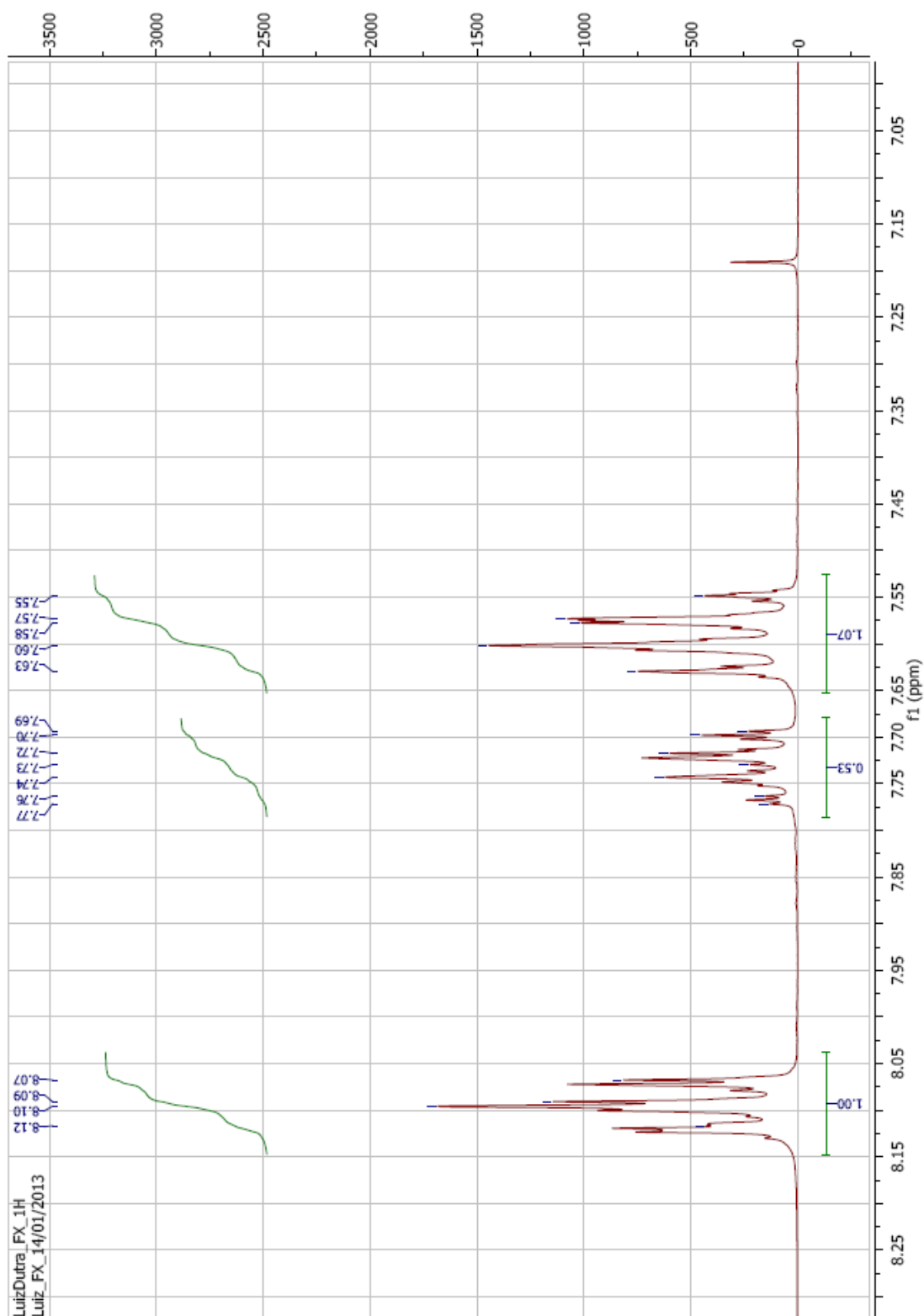


Espectro 41: Espectro de RMN de ^1H do ácido sulfonilfeniltioacético (10) (; 400 MHz; acetona-d₆) – ampliação região aromática.

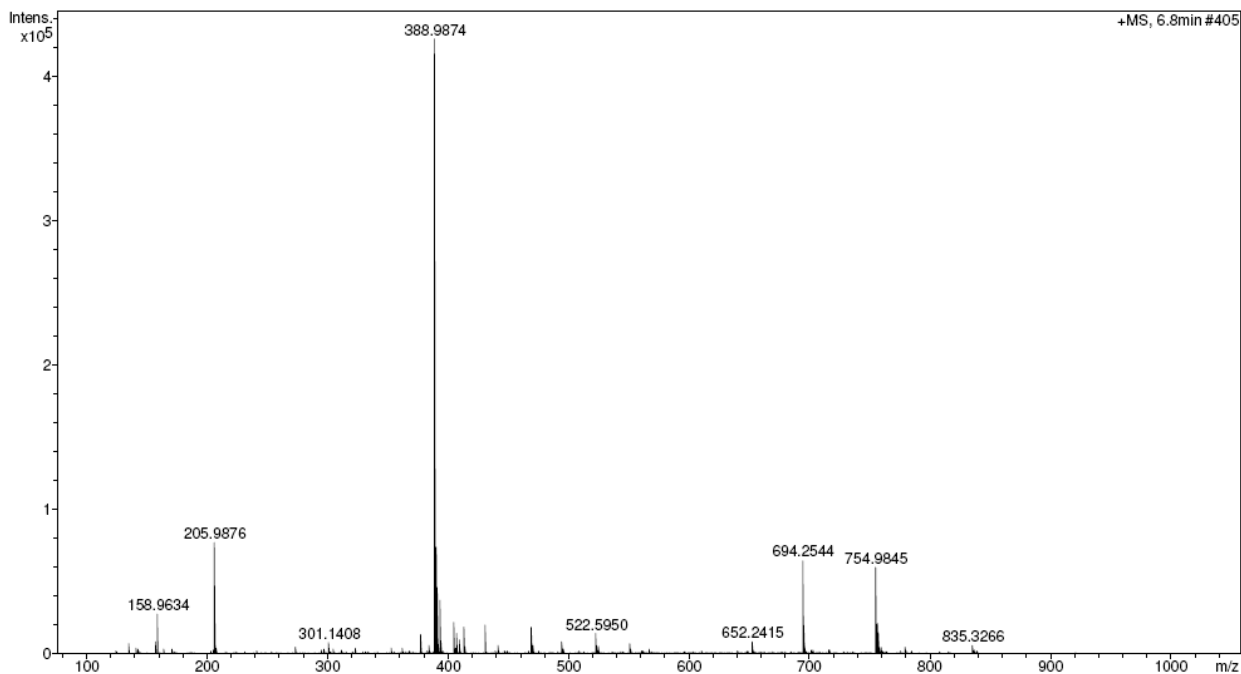


RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3): 8,10 (H_3 e H_8 ; 4H; $J_{\text{orto}} = 7,33$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,26$ Hz); 7,72 (H_1 e H_{10} ; 2H; $J_{\text{orto}} = 7,33$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,26$ Hz); 7,60 (H_2 e H_9 ; 4H; $J_{\text{orto}} = 7,58$ Hz e $J_{\text{meta}} = 1,77$ Hz) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): 155,67 (C_6); 137,16 (C_7) 136,26 (C_4); 136,18 (C_{10}); 135,84 (C_1); 130,18 (C_8); 129,83 (C_3); 115,16 (C_5) ppm.



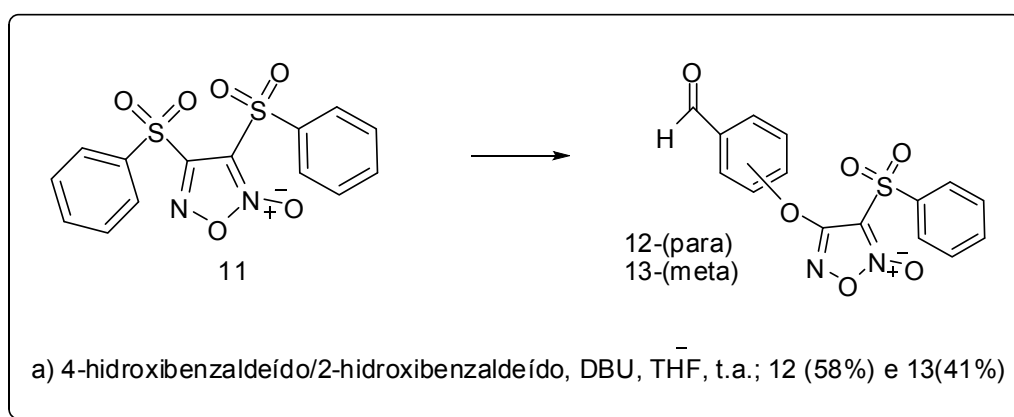
Espectro 42: Espectro de RMN de ^1H de 3,4-bisaryl-sulfonylfuroxano (11) (300 MHz; CDCl_3).



Espectro 43: Espectro de massas de 3,4-bis(aryl)-sulfonylfuroxano (11)

2.2 Síntese dos intermediários furoxânicos 12 e 13

Esquema sintético:



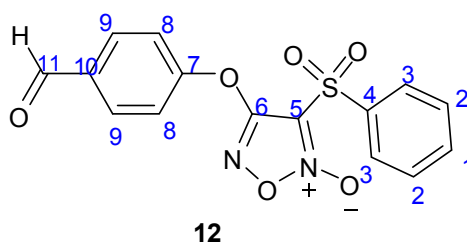
Procedimento:

Para obtenção do intermediário 10, solubilizou-se 1 g de furoxano (11) (5,53 mmol) em 20 mL de THF, em um balão de 50 mL. Em seguida adicionou-se 0,83 mL

de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU) e a reação foi mantida a sobre agitação por 15 minutos e então foi adicionado 0,67 g de 4-hidroxibenzaldeído (5,53 mmol) e reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 1,5 horas. O intermediário 12 foi obtido utilizando o mesmo procedimento utilizando o 2-hidroxibenzaldeído. O acompanhamento da reação foi realizado utilizando cromatografia em camada delgada utilizando como fase móvel: 50% DCM: 50% hexano.

O isolamento do produto foi realizado adicionando cerca de 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio e extração da fase aquosa com acetato de etila (4 x 30 mL). A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (fase estacionária: sílica; fase móvel: Fase móvel: 50% DCM: 50% hexano). O intermediário 13 com rendimento de 32% (PM = 285,04; C₁₀H₁₁N₃O₅S).

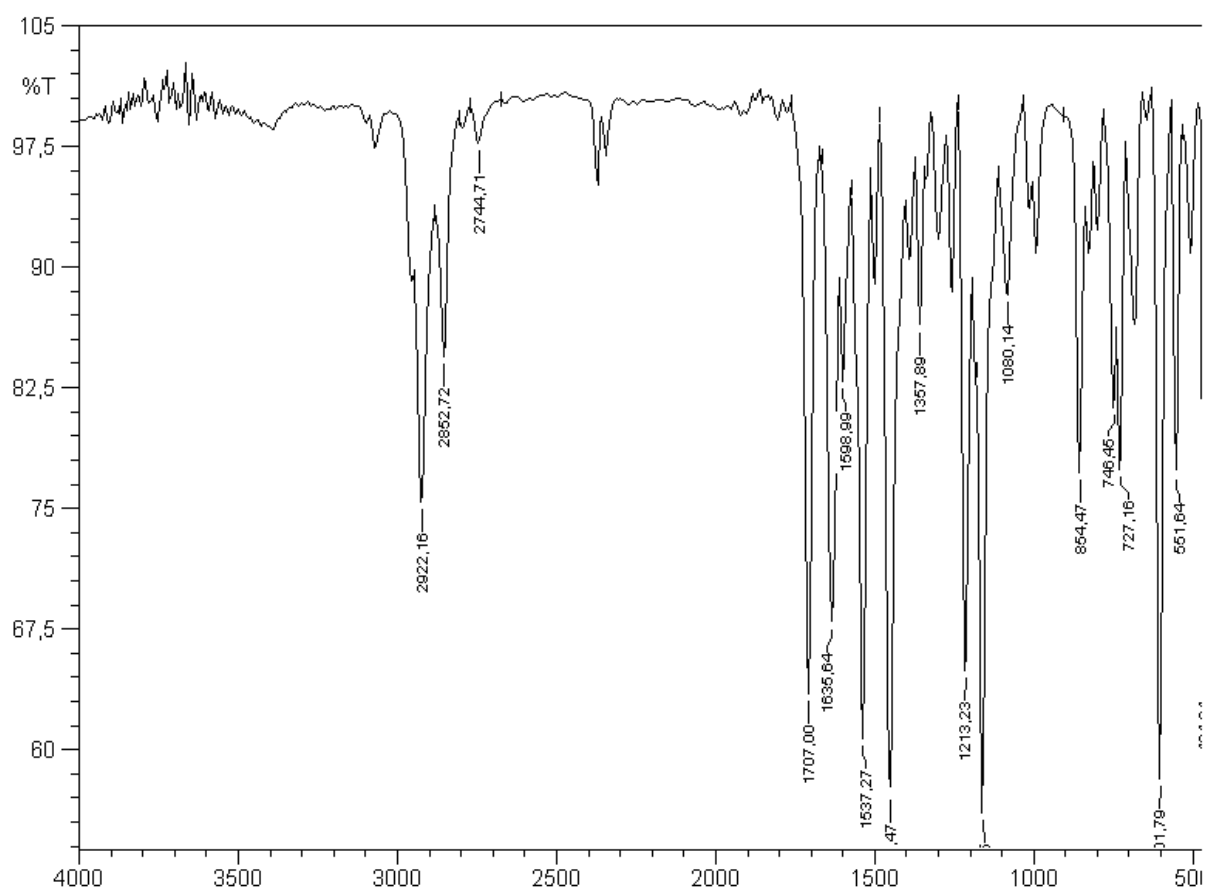
Caracterização estrutural:



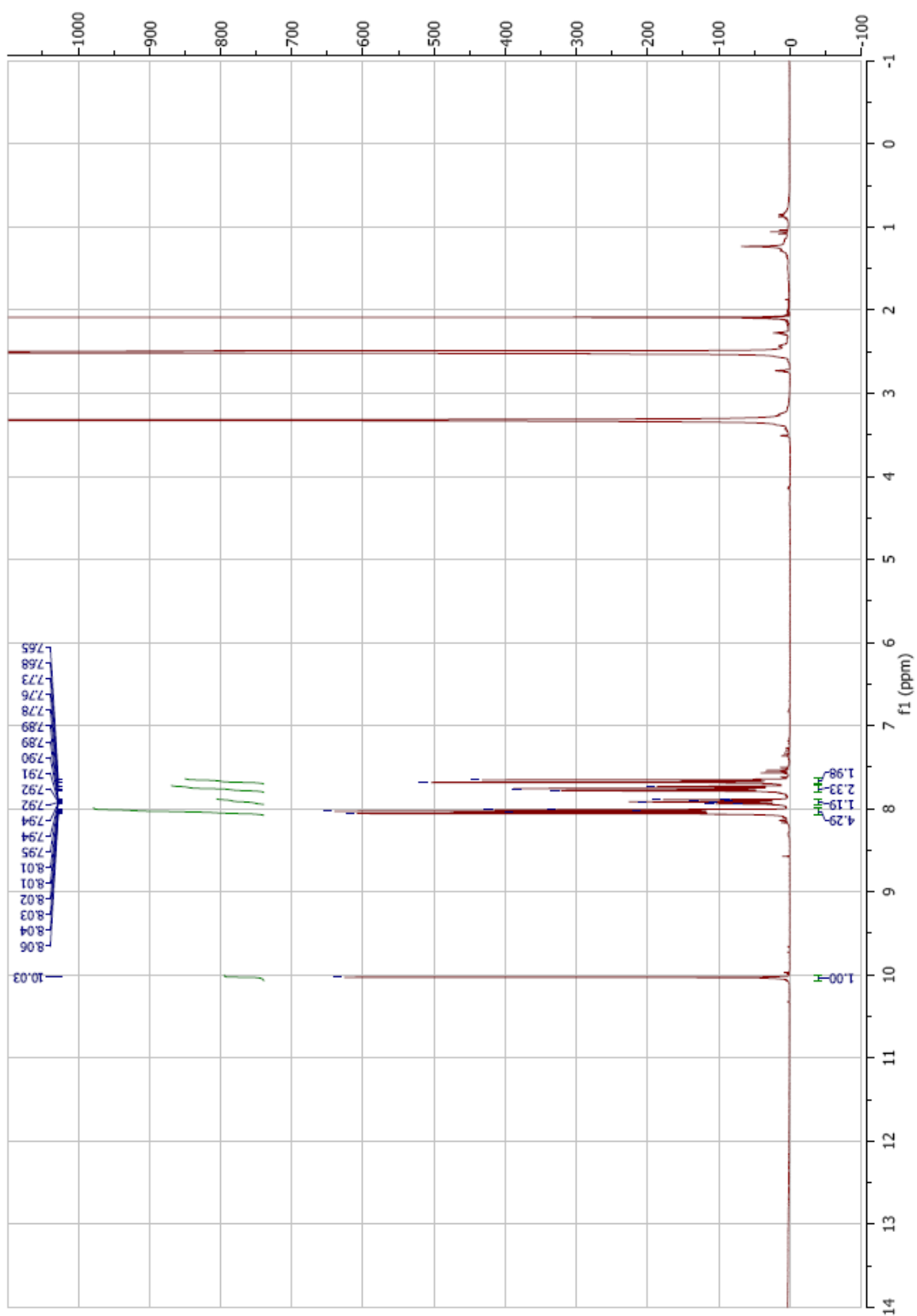
IV (KBr) cm⁻¹: 2922 e 2859 (ν CH_{aldeído}), 1707 (ν C=O_{aldeído}), 3130 (ν C-H), 1623 (ν N-H), 1420 (δ_{as}C-H), 1395 (δ_s N-H)

RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃d): 10,03 (H-C=O, 1H, s,); 8,04 (H₃, 2H, m, J_{meta}= 3,0 Hz e J_{orto} = 9,00 Hz) 8,02 (H₉, 2H, m, J_{meta}= 3,0 Hz e J_{orto} = 9,00 Hz) 7,92 (H₁, 1H, tt; J_{meta}= 3,0 Hz e J_{orto} = 9,00 Hz); 7,75 (H₂, 2H, m, J_{orto} = 9,00 Hz); 7,66 (H₈, 2H, d).

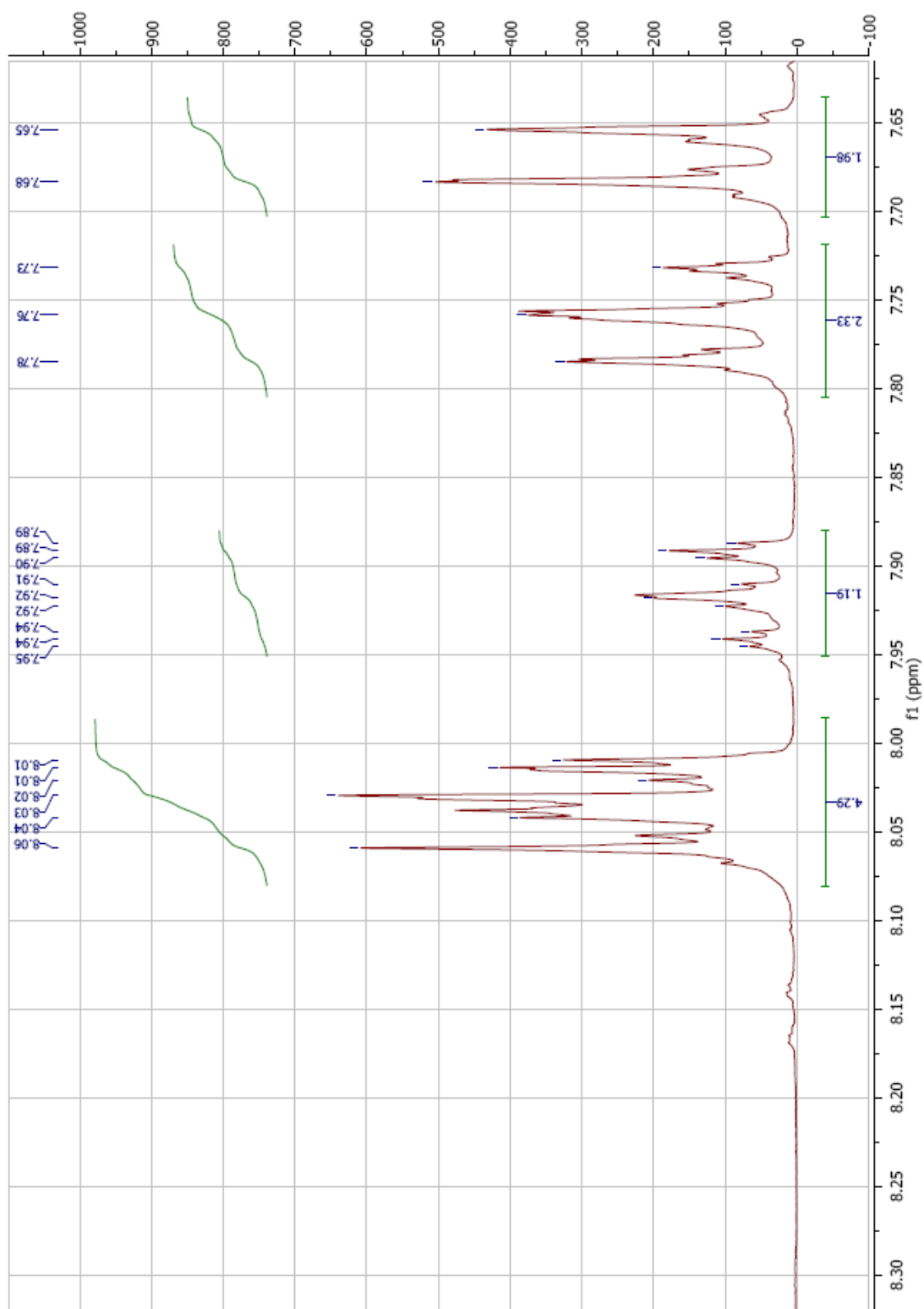
RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃d): 193,58 (HC=O), 158,96 (C₇); 158,64 (C₆); 138,28 (C₄) 137,81 (C₁); 135,65 (C₁₀); 133,26 (C₉); 131,60 (C₃); 130,10 (C₂); 121,39 (C₈)



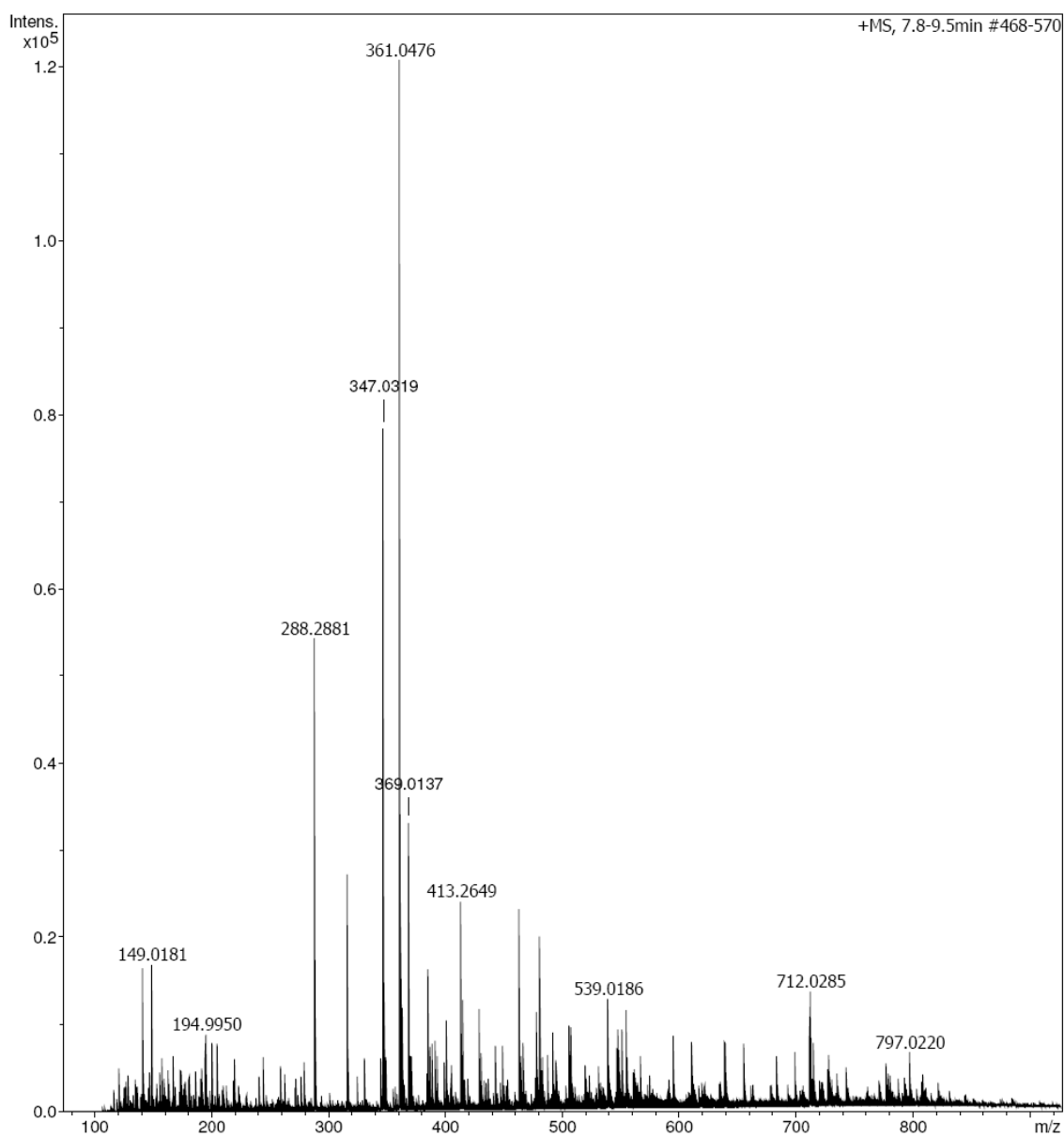
Espectro 44: Espectro na região do infravermelho do composto 12 (pastilha de KBr)



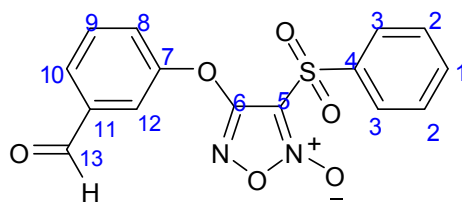
Espectro 45: Espectro de RMN de ¹H do composto 12 (300 MHz; CDCl₃).



Espectro 46: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 12 (300 MHz; CDCl_3).



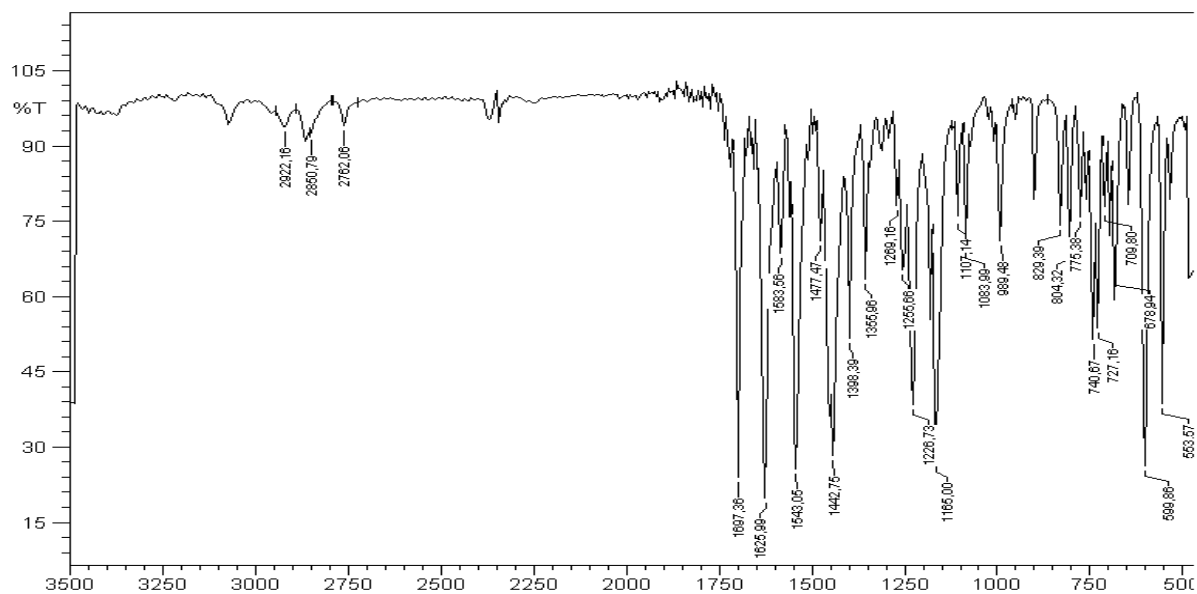
Espectro 47: Espectro de massas de alta resolução do composto 12

**13**

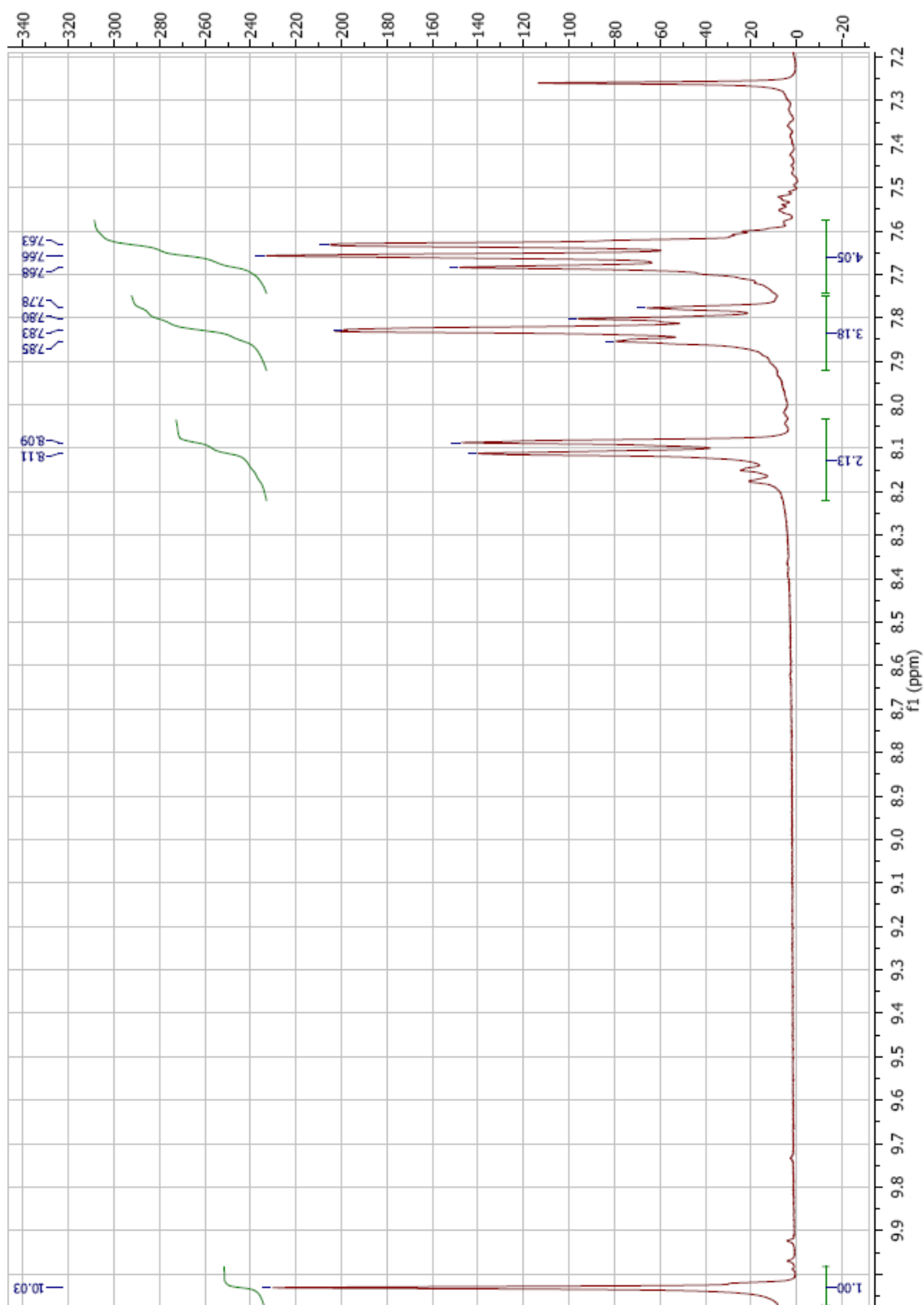
IV (KBr) cm^{-1} : 1967, 2.762 e 2.850 ($\nu \text{CH}_{\text{aldeído}}$), 1707 ($\nu \text{C}=\text{O}_{\text{aldeído}}$), 3130 ($\nu \text{C-H}$), 1623 ($\nu \text{N-H}$), 1420 ($\delta_{\text{as}} \text{C-H}$), 1395 ($\delta_{\text{s}} \text{N-H}$)

RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3): 10,03 (H-C=O, 1H, s,); 8,10 (H₃, 2H, m, $J_{\text{meta}} = 3,0$ Hz e $J_{\text{orto}} = 9,00$ Hz) 7,86 (H₁₂, 1H, m) 7,83 (2H, m, H₁, H₂ $J_{\text{meta}} = 3,0$ Hz e $J_{\text{orto}} = 9,00$); 7,66 (3H, H₈, H₉, H₁₀, m)

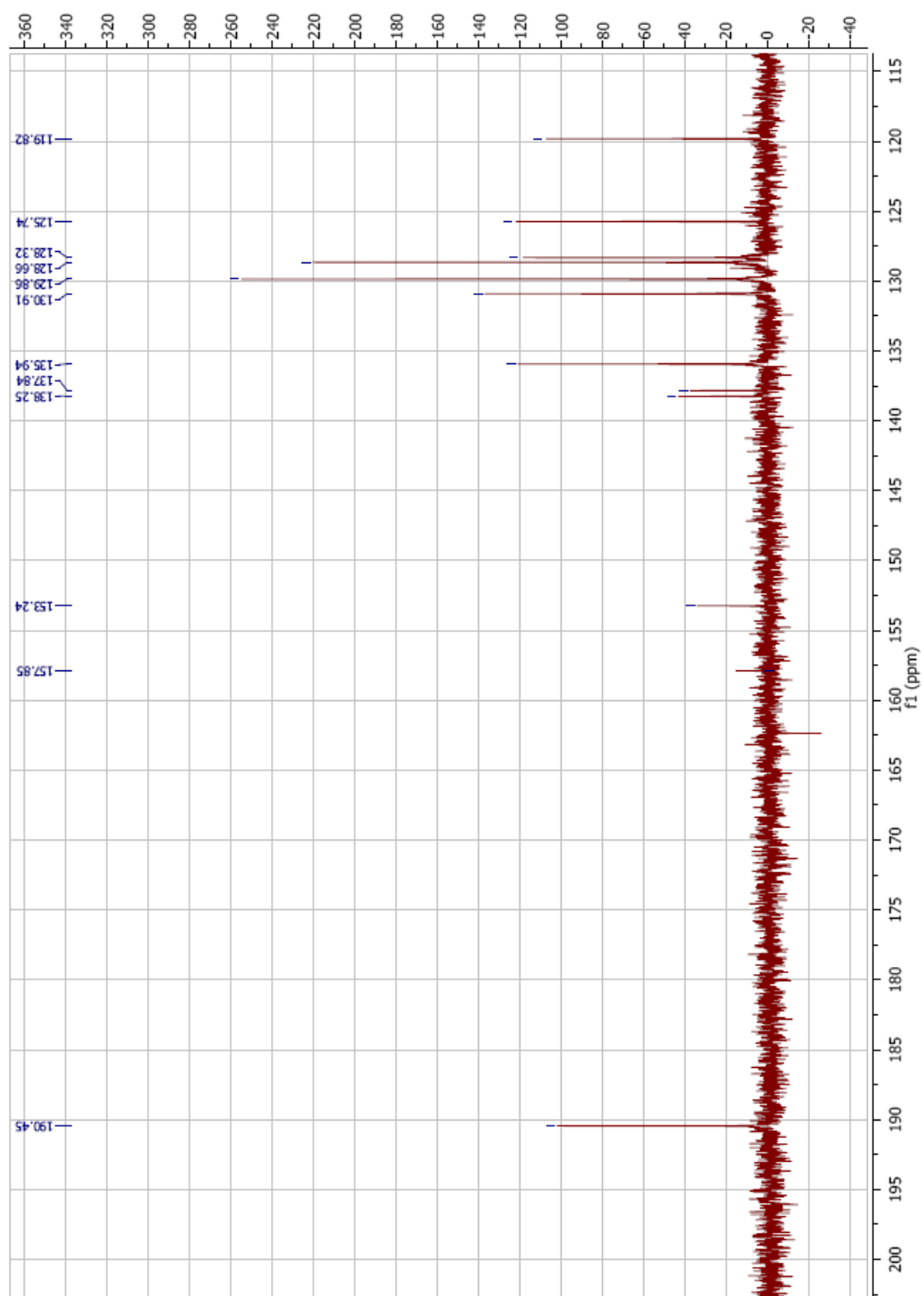
RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): 190,54 (HC=O), 157,89 (C₇); 153,56 (C₆); 138,25 (C₄) 137,84 (C₁₁); 135,89 (C₁); 130,96 (C₉); 129,86 (C₃); 128,66 (C₂); 128,32 (C₁₀) ;125,74 (C₈); 119,89 (C₁₂)



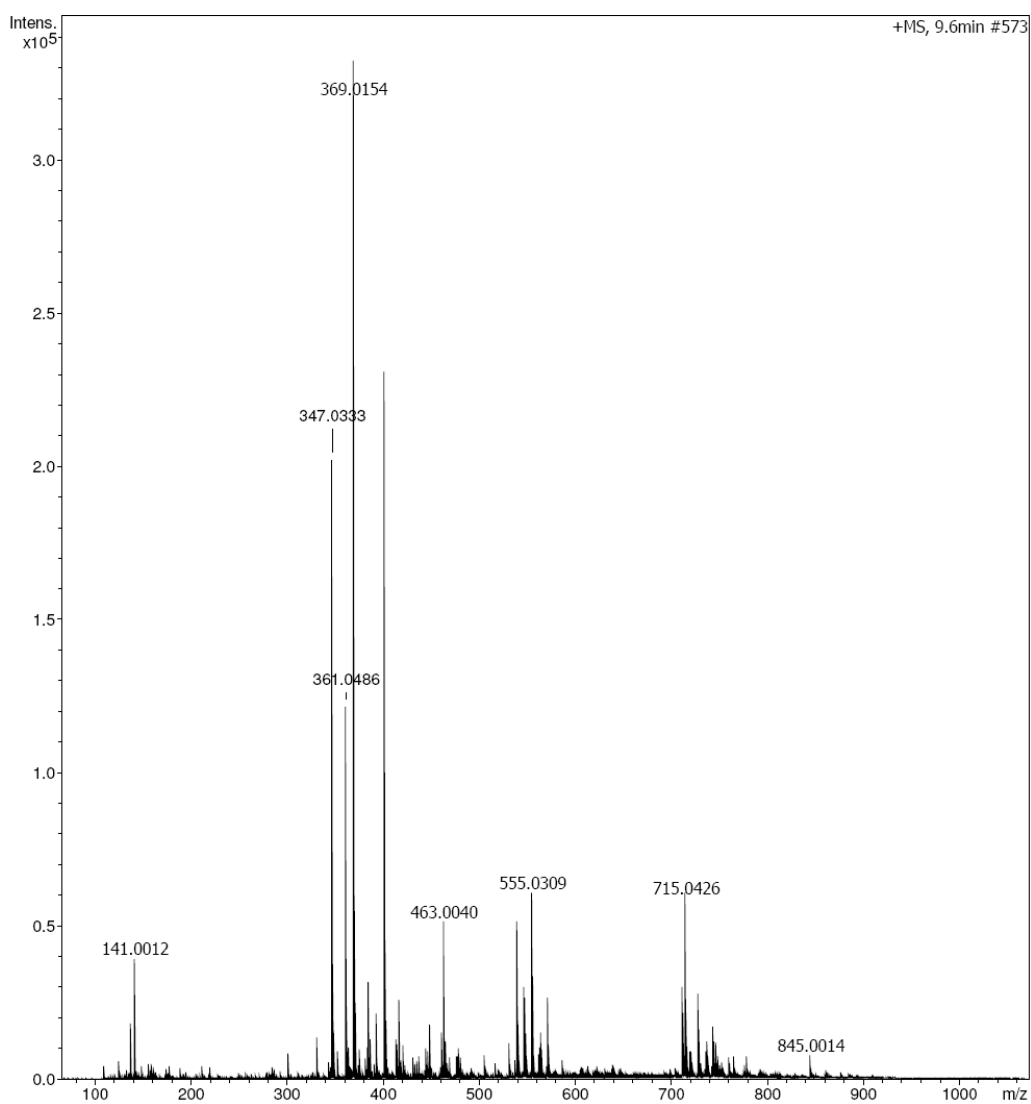
Espectro 48: Espectro na região do infravermelho do composto 13 (pastilha de KBr)



Espectro 49: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 13 (300 MHz; CDCl_3).



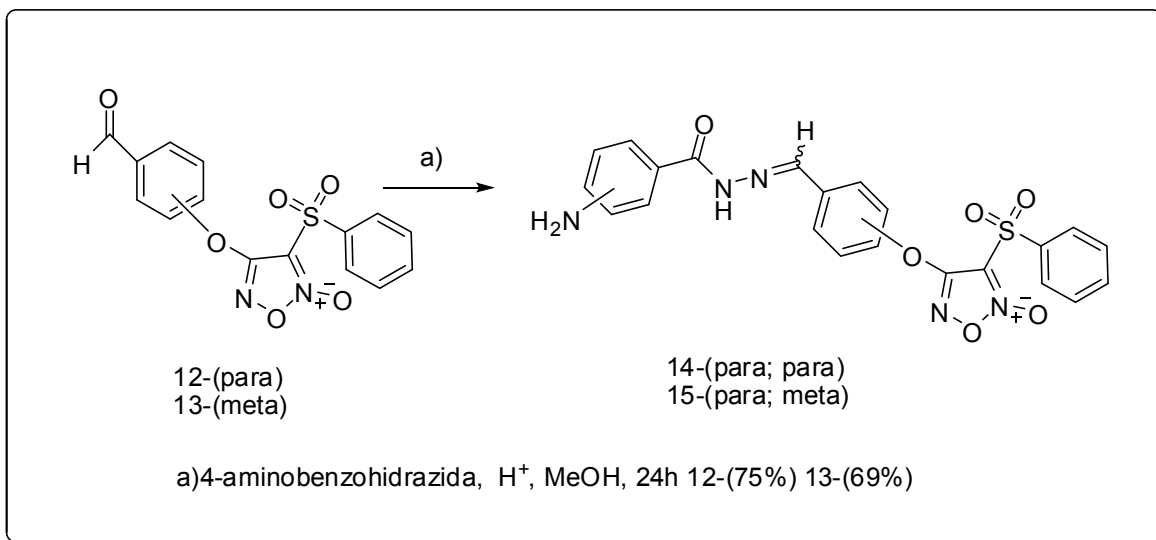
Espectro 50: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 13 (75 MHz; CDCl_3).



Espectro 51: Espectro de massas do composto 13

2.3 Síntese dos intermediários 14 e 15

Esquema sintético:



Procedimento:

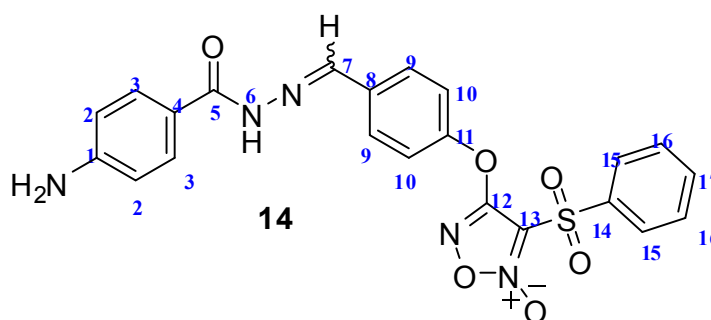
A reação de formação dos intermediários 14 e 15 acima foi realizada em metanol, catalisada por ácido. Para tanto, foram adicionados em balão de fundo redondo de 50 mL quantidades equimolares de 4-(4-formil)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol- 2-óxido (12) (0,300 g; 1,5mmol) e de 4-aminobenzohidrazida (0,504 g; 1,5 mmol) em 15,0 mL de etanol, mL, com posterior adição de 3 gotas de ácido acético glacial. Posteriormente, a mistura reacional foi colocada sob agitação constante à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da hidrazona (15), utilizando-se, para tanto, o intermediário furoxânico 4-(2-formil)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol- 2-óxido(13). O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel: 50% hexano e 50% acetato de etila.

Ao término da reação, realizou-se filtração sob pressão reduzida e lavagem do produto obtido com 10 mL de água e 15 mL de etanol gelado, para a remoção de resquícios dos reagentes. O sólido obtido foi deixado secar a temperatura ambiente.

O intermediário (14), 4-(4-((2-(4-aminobenzoyl)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido, caracteriza-se por um sólido amarelo, de PM =

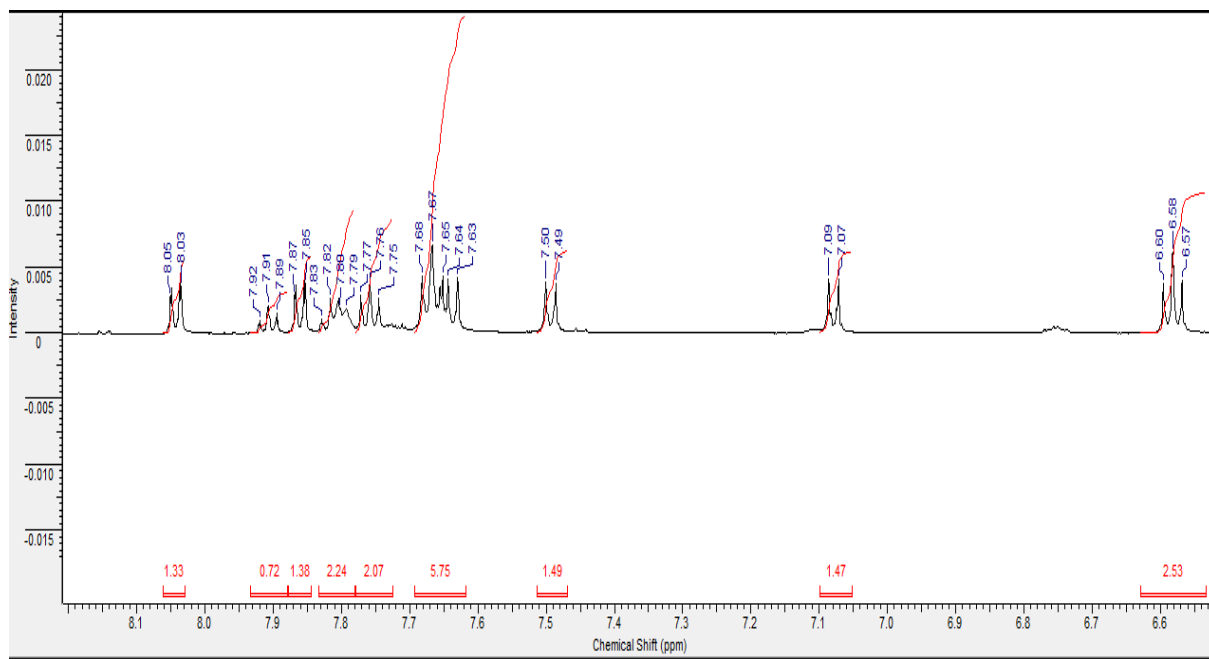
479,47 g/mol ($C_{22}H_{17}N_5O_6S$), faixa de fusão entre 173-175°C, fator de retenção ($R_f = 0,15$) e rendimento de 75%. Já o intermediário (15), 4-(3-((2-(4-aminobenzoyl)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido, caracteriza-se por um sólido amarelo claro, de PM = 479,47 g/mol ($C_{22}H_{17}N_5O_6S$), faixa de fusão entre 175-178°C, fator de retenção ($R_f = 0,22$) e rendimento de 69%.

Caracterização estrutural:

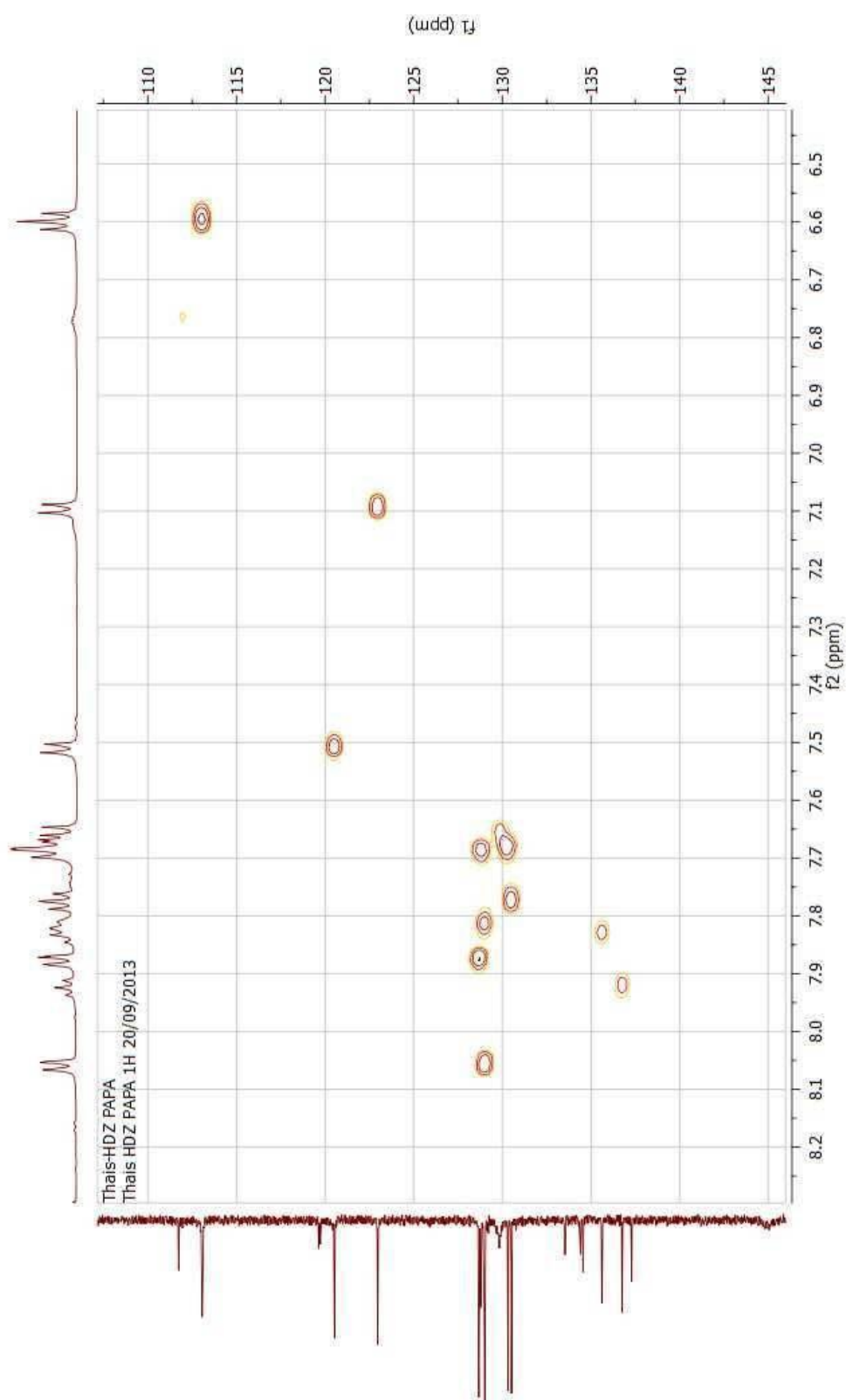


RMN 1H (300 MHz; $DMSO-d_6$) ppm: 11,52(1H, s, H6); 8,33 (1H, s, H7); 8,04/ 7,86 (2H, d, H15, $J=7,3\text{Hz}$ e $J=1,2$); 7,91 (1H, ttt, H17); 7,76 (2H, m, H3); 7,70-7,65 (4H, m, H9, H16); 7,65 (2H, dd, H10, $J=8,4\text{Hz}$); 6,58 (2H, t, H2, $J=8,8\text{ Hz}$); 5,72 (2H, s, NH_2).

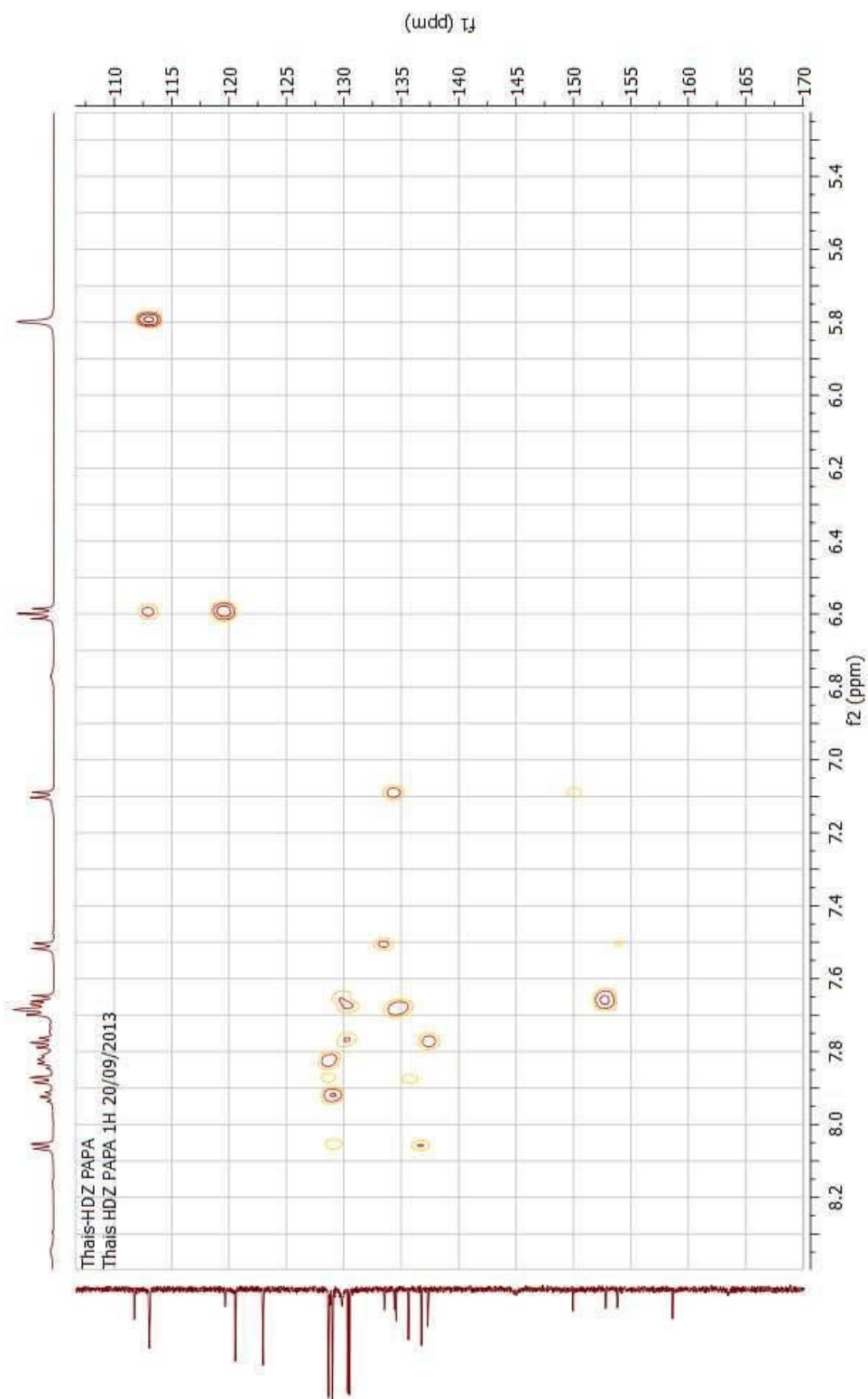
RMN ^{13}C (75 MHz; $DMSO-d_6$) ppm: 158,65 (C12); 152,82 (C5); 144,96 (C7); 136,75 (C17); 130,51 (C3); 129,98 (C15); 129,91 (C9); 128,57 (C16); 120,54 (C10); 119,65 (C1); 113,07 (C2); 111,75 (C13).



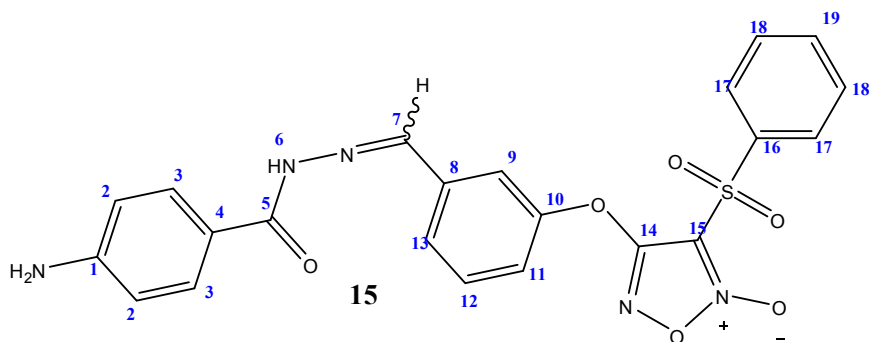
Espectro 52: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 14 (300 MHz; DMSO-d_6).



Espectro 53: Espectro de RMN de HSQC do composto 14 (300 MHz; DMSO-d_6).

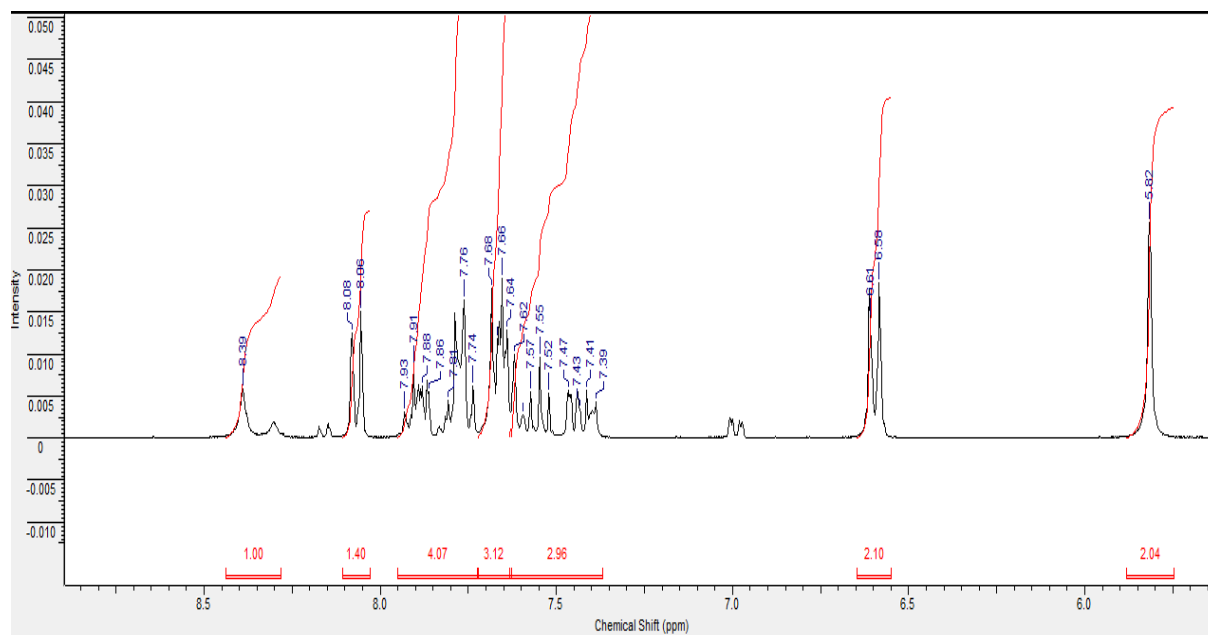


Espectro 54: Espectro de RMN de HMBC do composto 14 (300 MHz; DMSO_d₆).

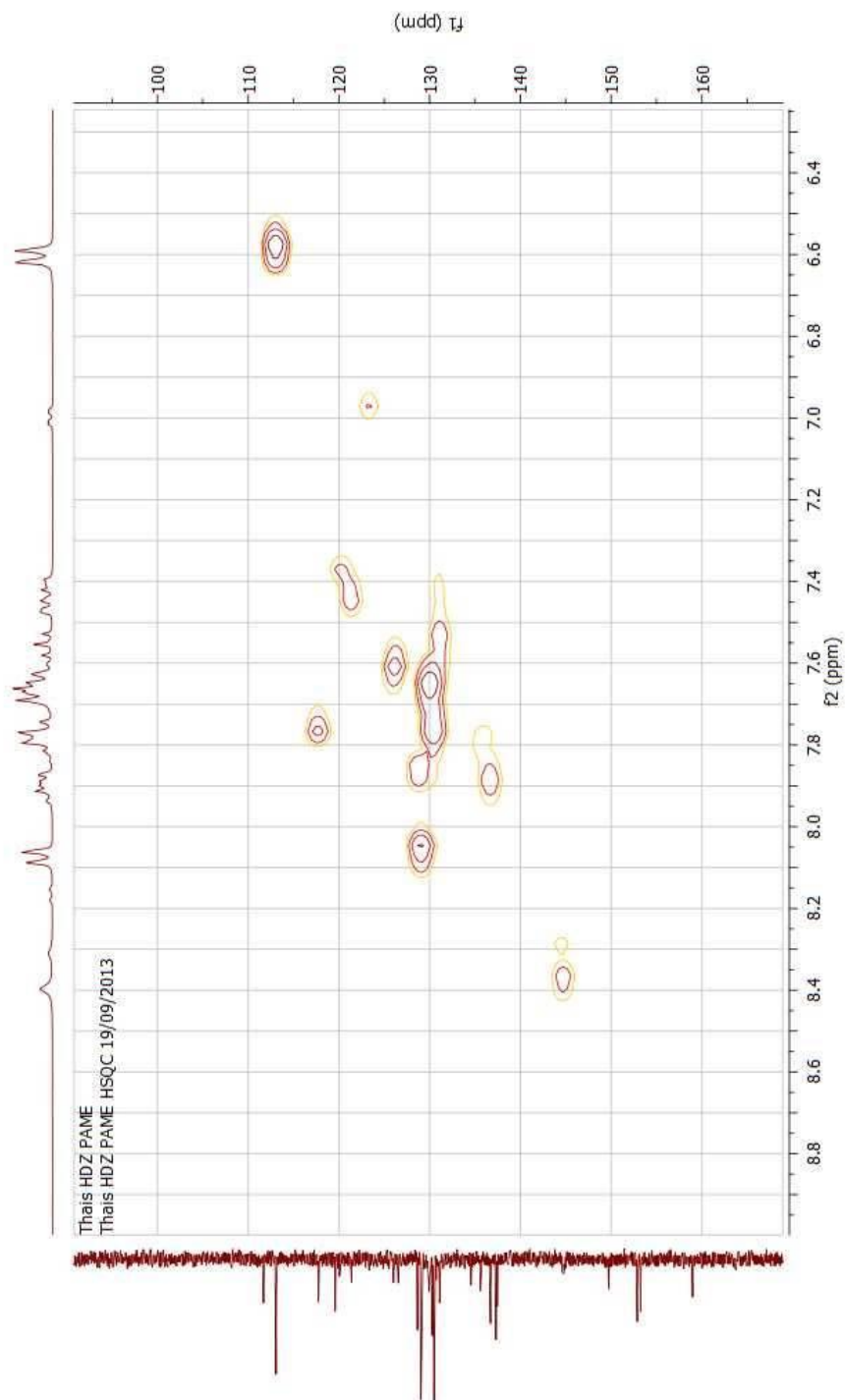


RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6) ppm: 11,61(1H, s, H6); 8,4 (1H, s, H7); 8,06 (1H, d, H17) 7,94-7,49 (4H, m, H17, H19, H9); 7,69-7,65 (3H, m, H18 e H3); 7,60-7,40 (3H, m, H13, H12, H11); 6,60 (2H, dd, H2, $J=8,28\text{Hz}$, $J=1,77\text{Hz}$); 5,82 (2H, s, NH_2).

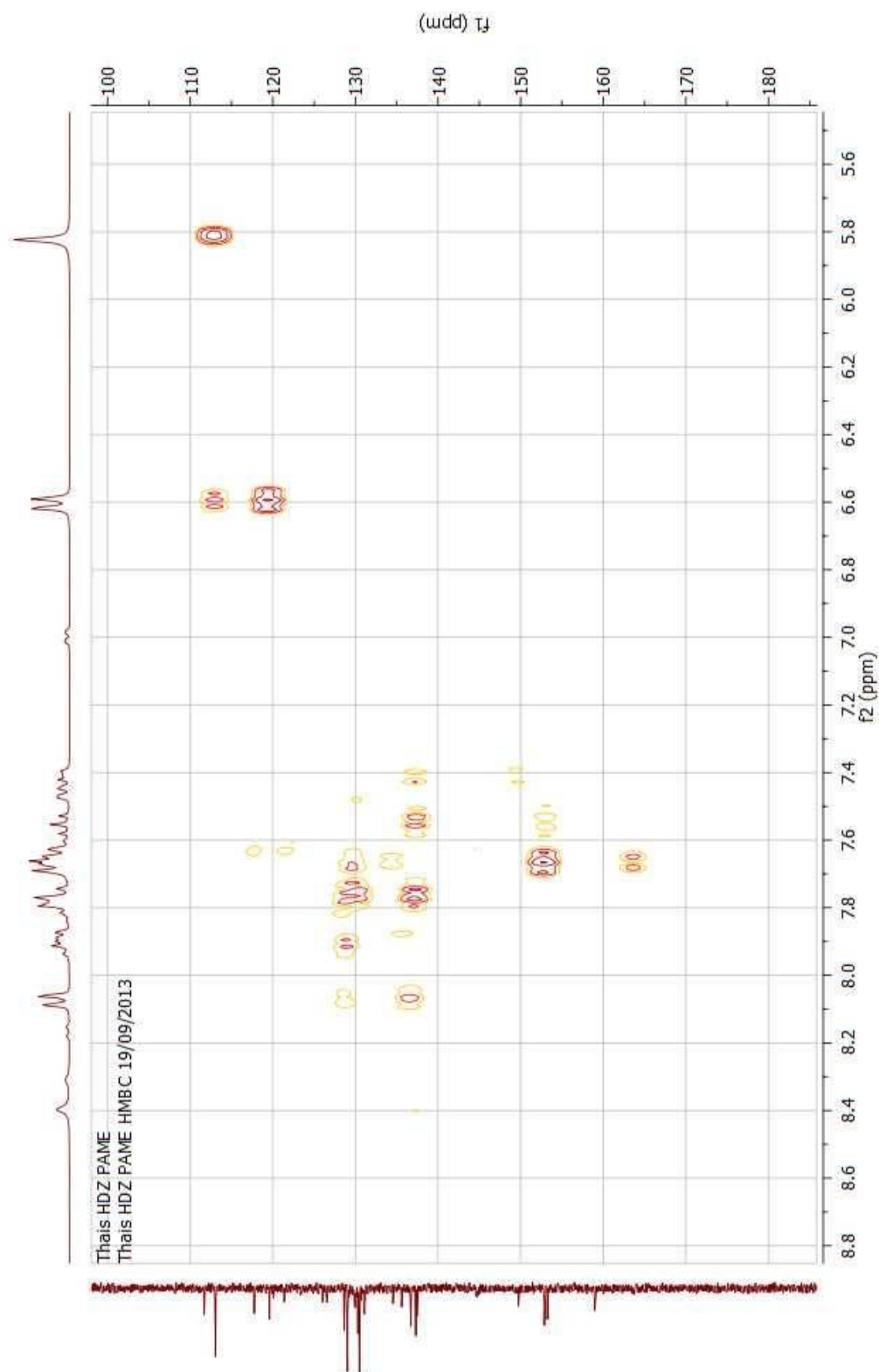
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6)ppm: 159,02 (C14); 153,26(C5); 145,08 (C7); 137,35 (C19); 134,59 (C16); 130,52 (C13); 130,34 (C3); 129,08 (C17); 128,69 (C18) 126,58 (C12); 119,65 (C11); 117,79 (C9); 113,10 (C2); 111,74 (C15).



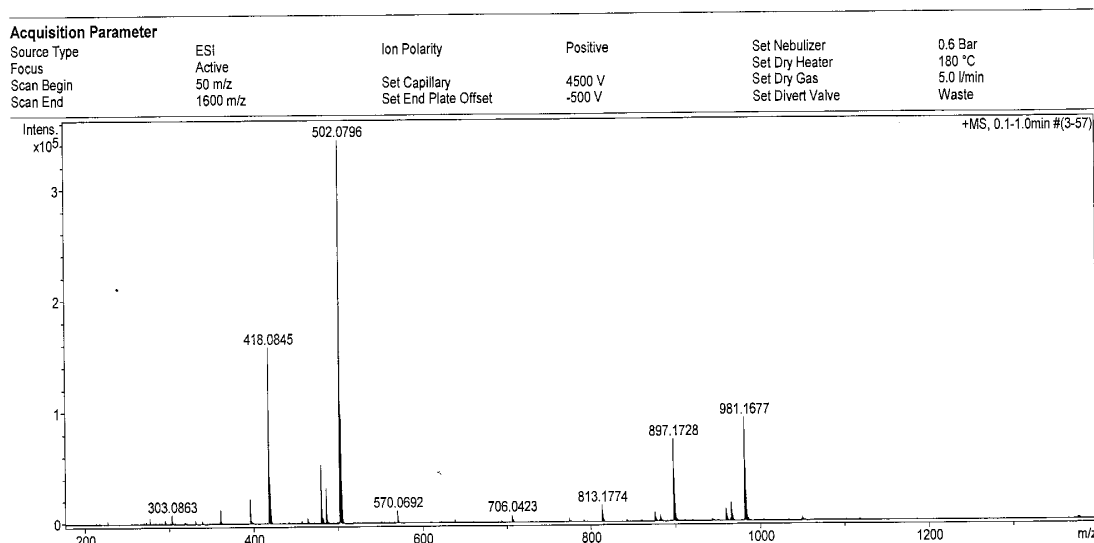
Espectro 55: Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (300 MHz; DMSO-d_6).



Espectro 56: Espectro de RMN HSQC do composto 15 (300 MHz; DMSOd6).



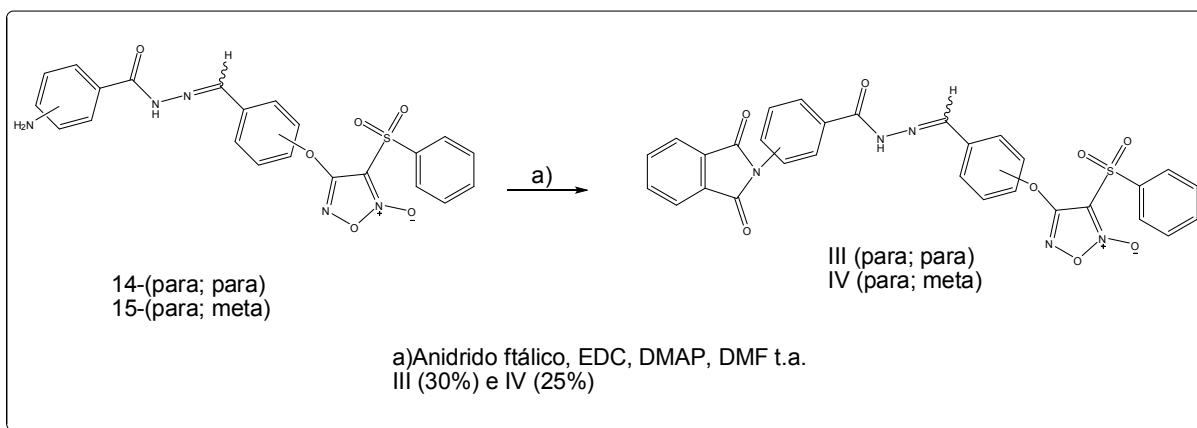
Espectro 57: Espectro de RMN de HMBC do composto 15 (300 MHz; DMSO_d₆).



Espectro 58: Espectro de massas de alta resolução do composto 15

2.4 Síntese dos compostos III e IV

Esquema sintético:



Procedimento:

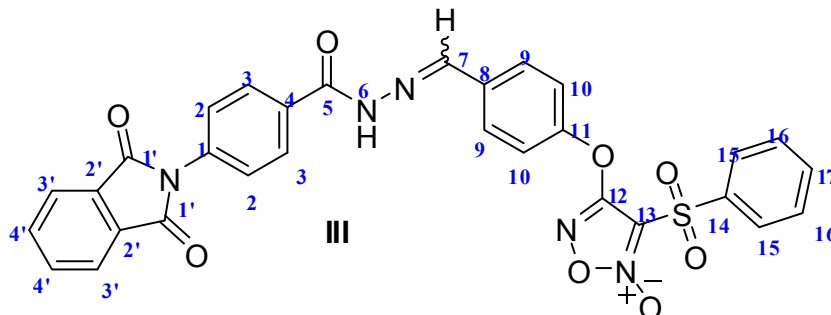
A reação de formação dos compostos finais híbridos (III e IV) foi realizada em um balão de 125 mL, onde foram adicionados 0,149 g (0,001 mol) de anidrido ftálico (8) e 0,230 g (0,0012 mol) de EDC (agente acoplante) e ainda 0,05 g de DMAP, como agente catalisador, seguidos de 0,479 g; (0,001 mol) do intermediário 4-(4-((2-

(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido (14) em 20,0 mL de dimetilformamida anidro. À mistura reacional foi mantida sob agitação constante e à temperatura ambiente por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção produto final IV, utilizando-se 0,479 g (0,001 mol) do intermediário (15), 4-(3-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido. Ao término da reação, foi adicionado ao meio cerca de 10 mL de água destilada e 10 mL de HCl 0,5 M para diminuir o pH do meio e provocar a precipitação do produto. O isolamento da mistura reacional foi feito por filtração simples, lavando-se o precipitado com água e etanol gelados e deixado secar a temperatura ambiente.

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (C.C.D.), utilizando-se como fase móvel: 50% hexano e 50% acetato de etila.

O composto final híbrido obtido (III), o 4-(4-((2-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido é caracterizado por um sólido amarelo, com faixa de fusão entre 220-223°C, PM = 609,57 g/mol, (C₃₀H₁₉N₅O₈S) fator de retenção (R_f = 0,37) e rendimento de aproximadamente 30%. Já o composto híbrido (IV), 4-(2-((2-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)benzoil)hidrazono)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido é caracterizado por um sólido amarelo, com faixa de fusão entre 202-204° C, PM = 609,57 g/mol, (C₃₀H₁₉N₅O₈S) fator de retenção (R_f = 0,36) e rendimento de, aproximadamente, 25%.

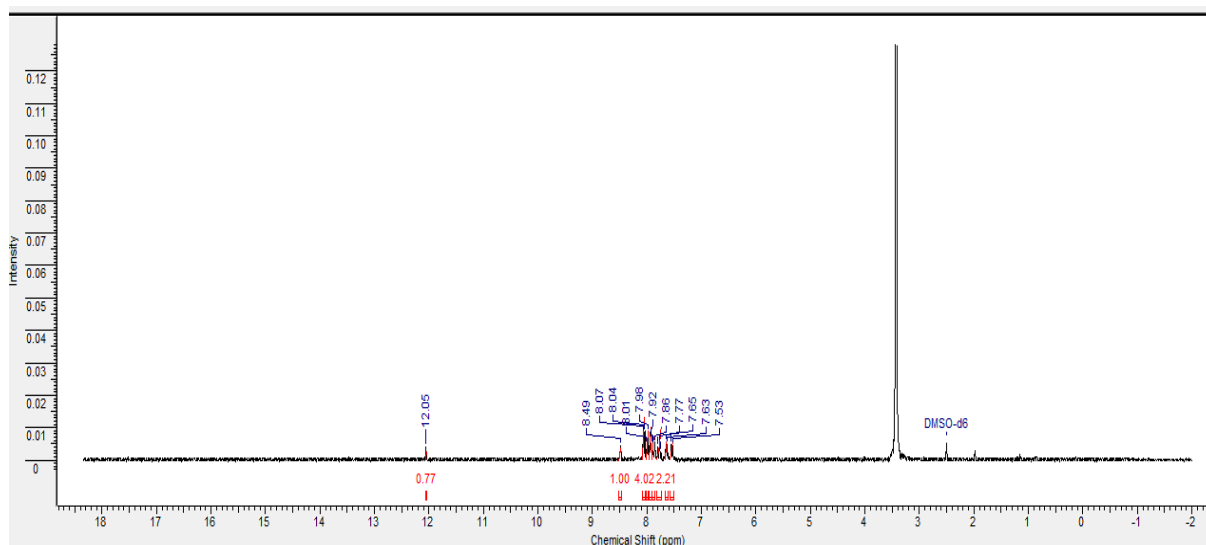
Caracterização estrutural:



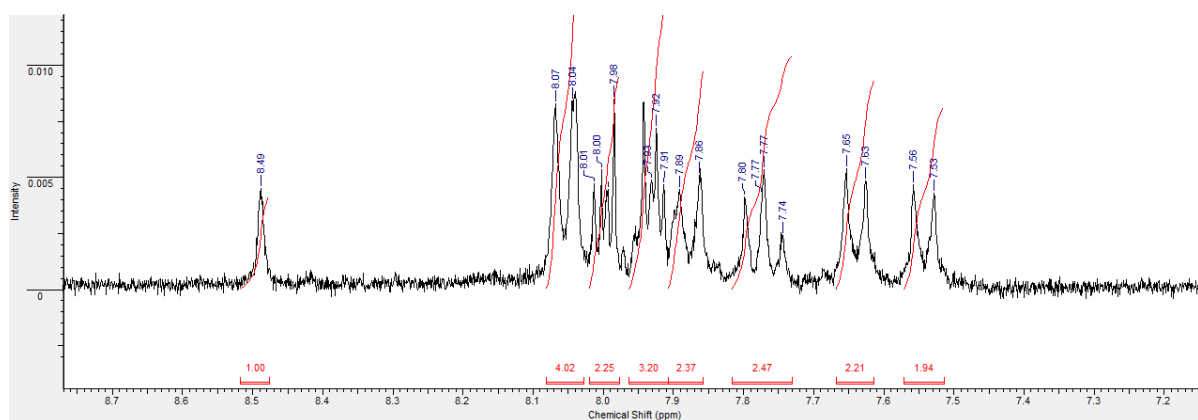
IV (KBr) cm^{-1} : 3268 (ν N-H), 3059 (ν C-H aromático); 1774 e 1743 (ν C=O imida simétrico e assimétrico); 1604 (ν C=N furoxano) ; 1388 (ν C-N-C)

RMN ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) ppm: 12,05 (1H, s, H6); 8,05 (4H, dd, H15, H3'); 8,01 (2H, dd, H4'); 7,94-7,90 (3H, m, H3, H17); 7,87 (2H, m, H9); 7,77 (2H, m, H16); 7,64(2H, d, H10, J=7,76;); 7,54(2H, d, H2).

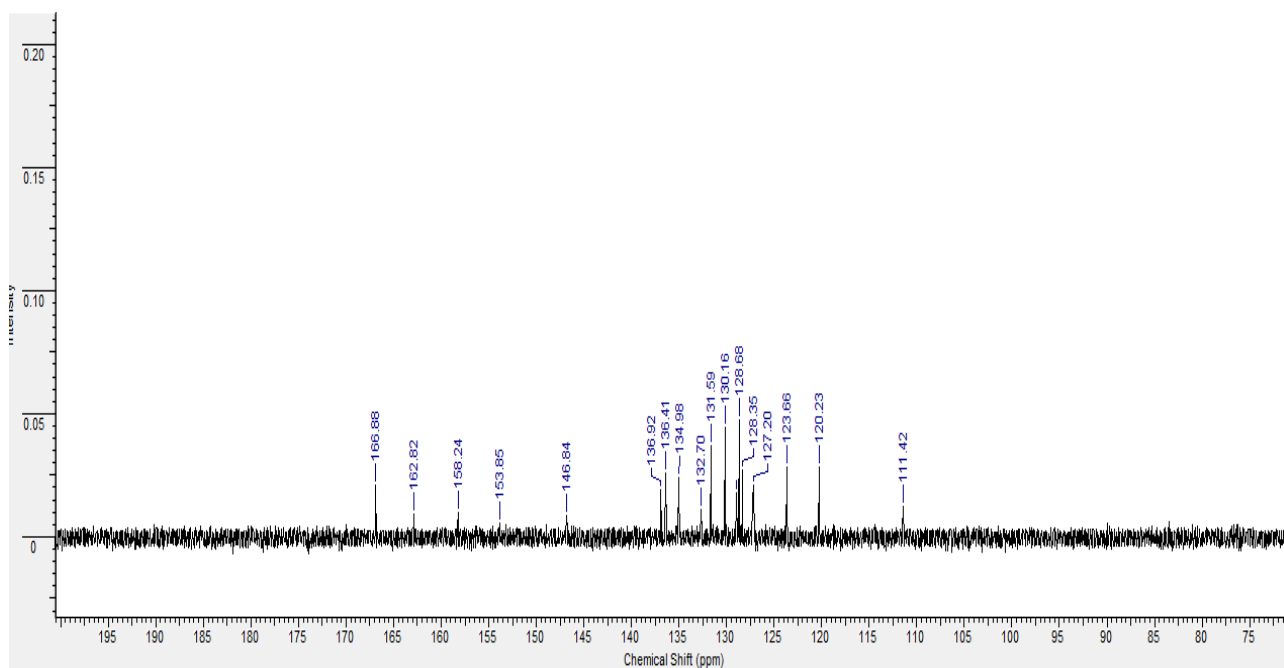
RMN ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)ppm: 166,88 (C1'); 162,82 (C5); 158,24 (C12); 146,84 (C7); 136,92 (C14); 136,41 (C17); 134,98 (C3) 132,70 (C11); 130,16 (C9); 129,00 (C15); 128,68 (C16); 128,35 (C3'); 127,20 (C10); 123,66 (C4'); 120,23 (C2); 111,42 (C13).



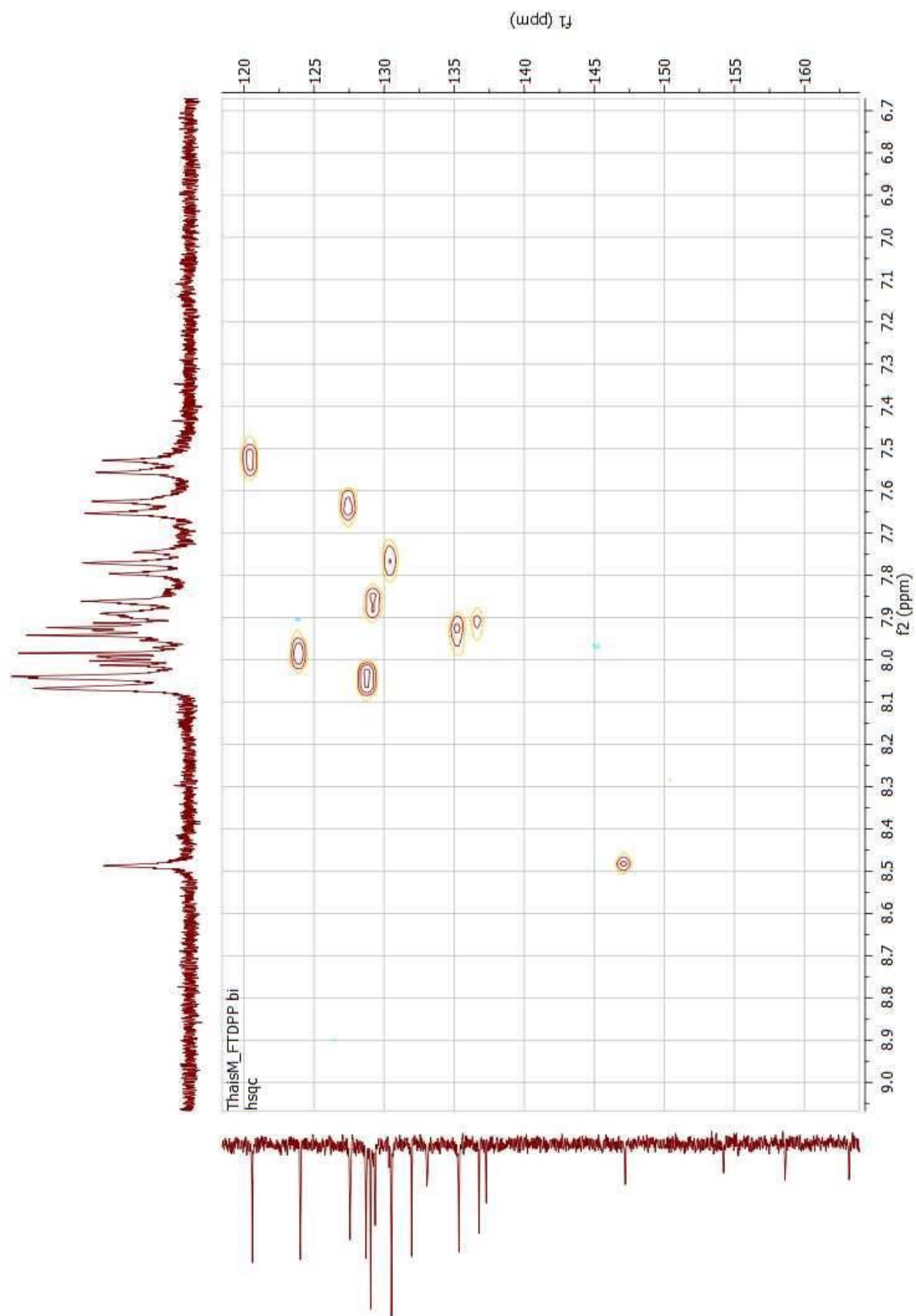
Espectro 59: Espectro de RMN de ^1H do composto final III (300 MHz; DMSO-d_6).



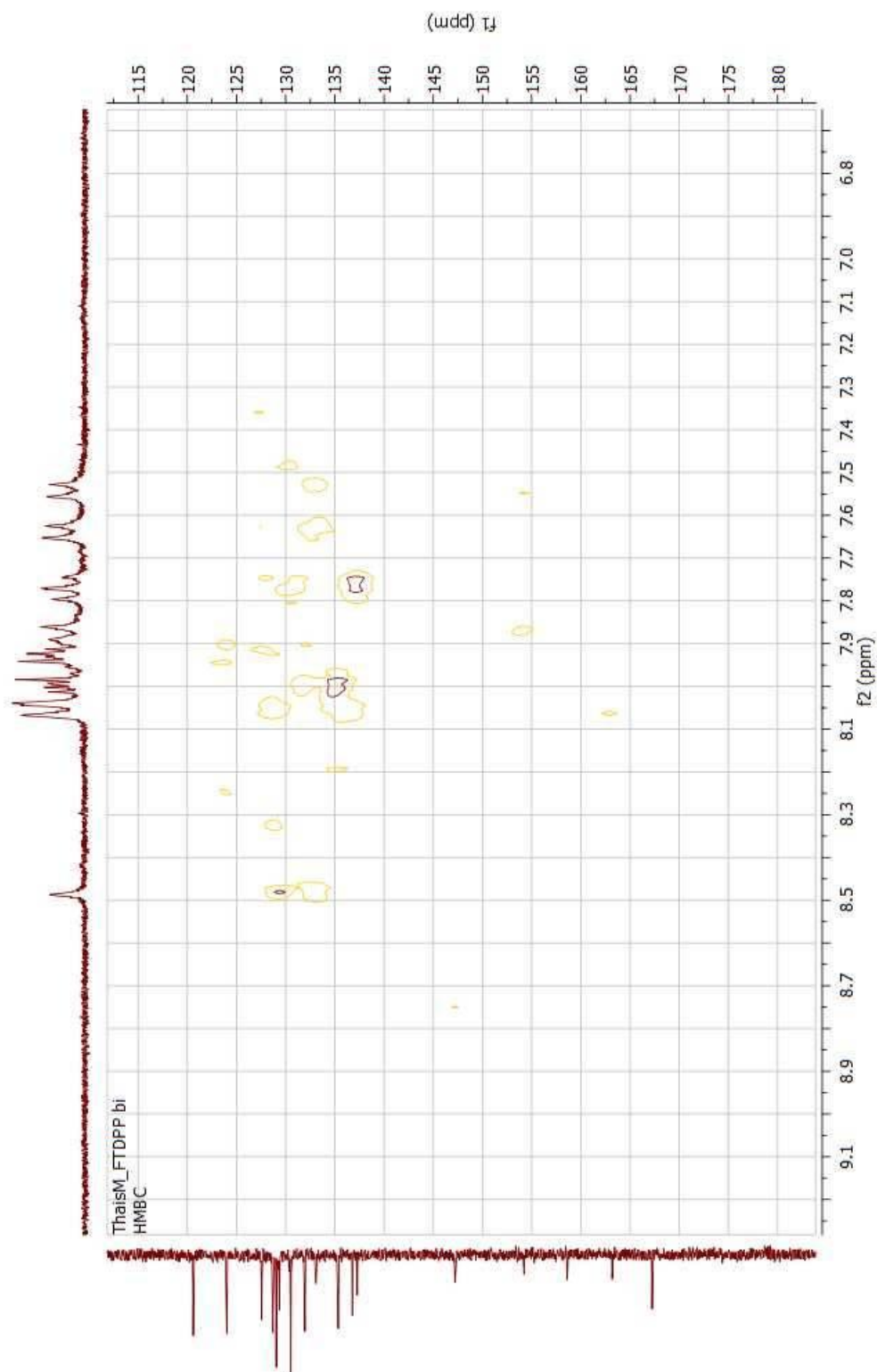
Espectro 60: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto III (300 MHz; DMSO-d_6).



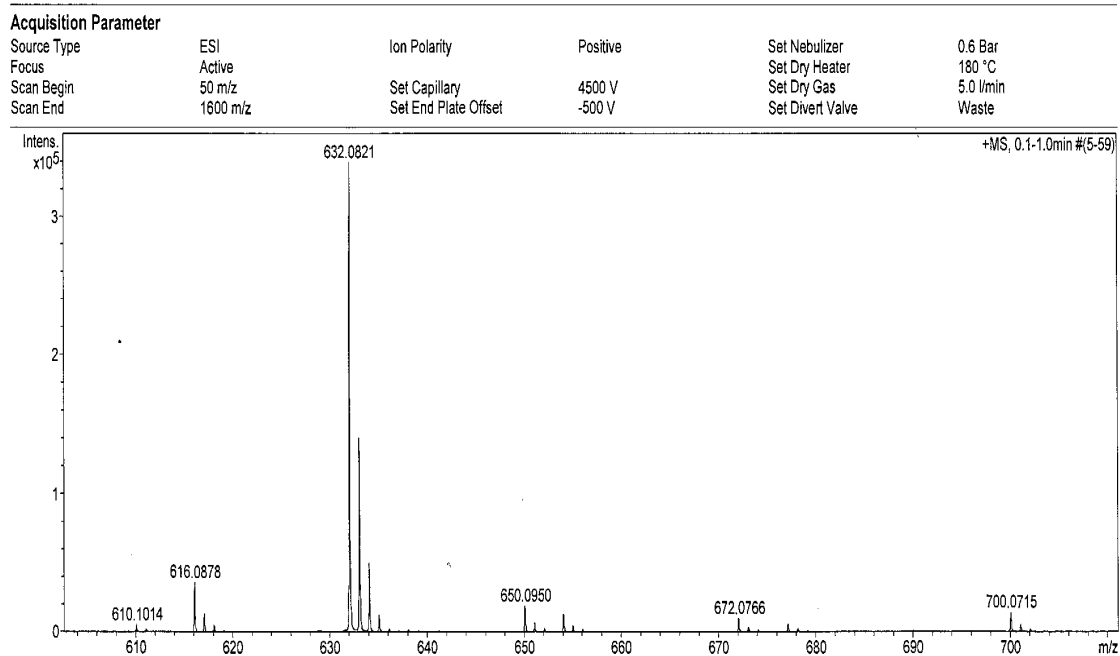
Espectro 61: Espectro de RMN de ^{13}C do composto III (75 MHz, DMSO-d_6)



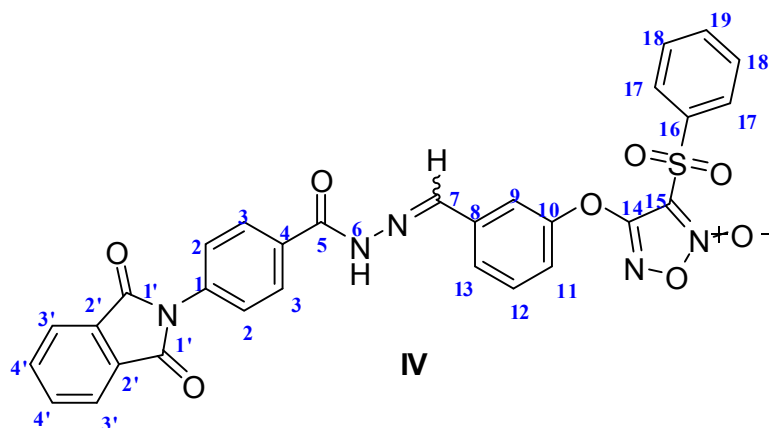
Espectro 62: Espectro de RMN de HSQC do composto III (300 MHz; DMSO_d₆).



Espectro 63: Espectro de RMN de HMBC do composto III (300 MHz; DMSO_d₆).



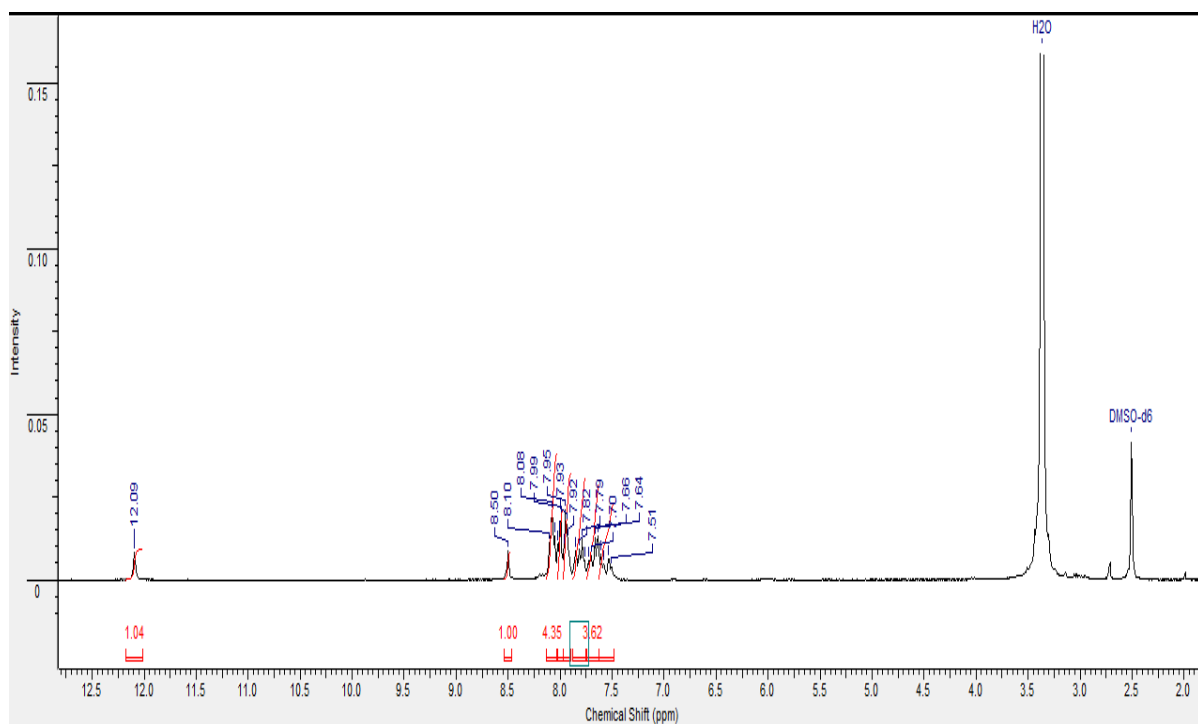
Espectro 64: Espectro de massas de alta resolução do composto final III



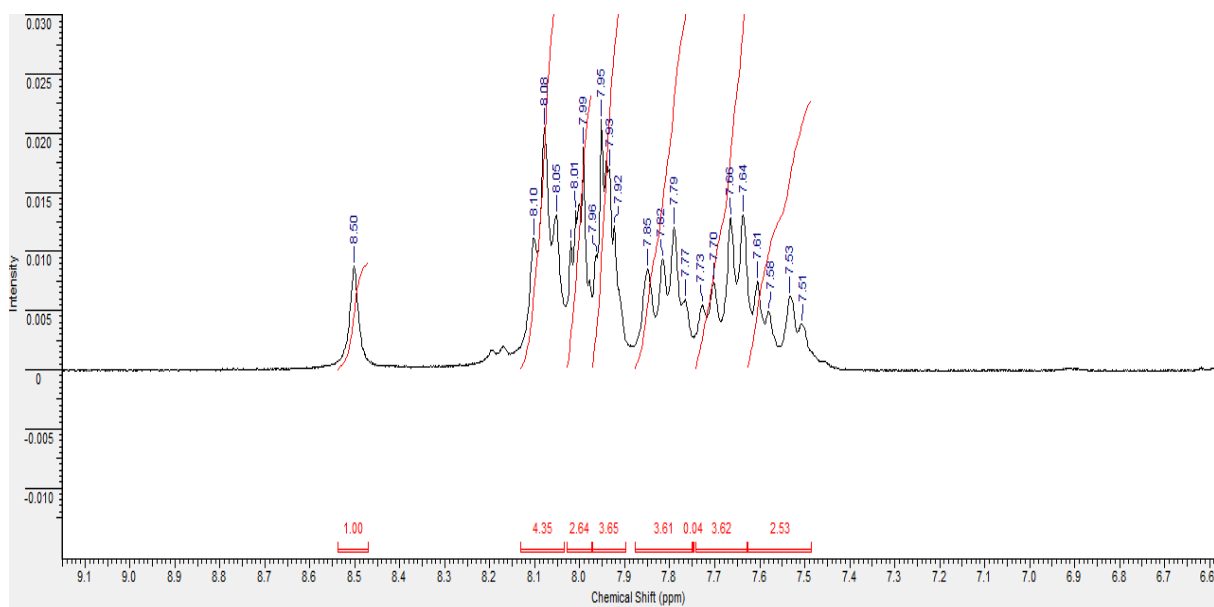
IV (KBr) cm⁻¹: 3292 (νN-H), 3079 (νC-H aromático); 1782 e 1744 (ν C=O imida simétrico e assimétrico); 1607 (ν C=N furoxano) ; 1399 (ν C-N-C)

RMN ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆) ppm: 12,09(1H, s, H₆); 8,5 (1H, s, H₇)8,09 (4H, m, H₁₇, H_{3'}); 8,00 (2H, m, H_{4'}) 7,96-7,92 (3H, m, H₃, H₁₉); 7,85- 7,77 (3H, m, H₉, H₁₈); 7,73-7,64 (3H, m, H₁₁, H₁₂, H₁₃); 7,56 (2H, m H₂).

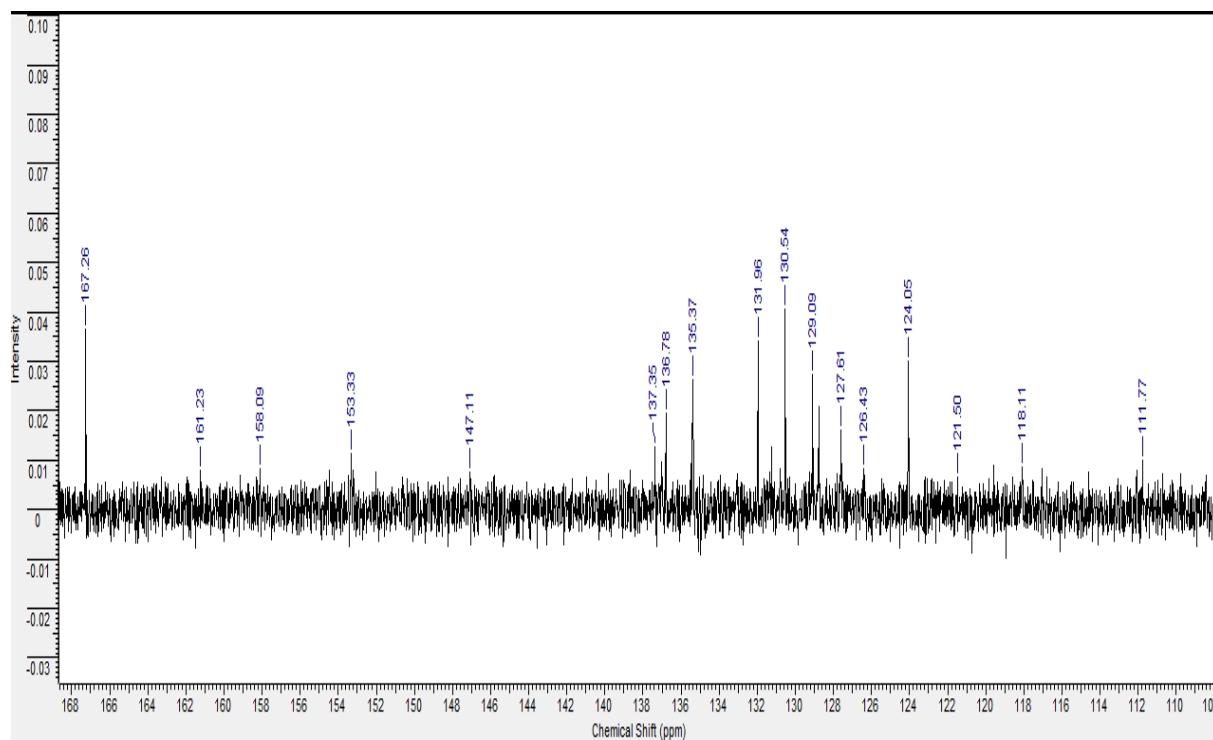
RMN ¹³C (75 MHz; DMSO-*d*₆) ppm: 167,26 (C_{1'}); 161,23 (C₅); 153,33 (C₁₄); 147,11 (C₇); 137,35(8); 136,78 (C₁₉); 135,37 (C₃) 131,96 (C₁₃); 130,54(C₁₇); 129,09(C₁₈); 128,77(C_{3'}); 127,61 (C₁₂); 124,50(C_{4'}); 121,50(C₂); 118,11 (C₉); 111,77(C₁₅).



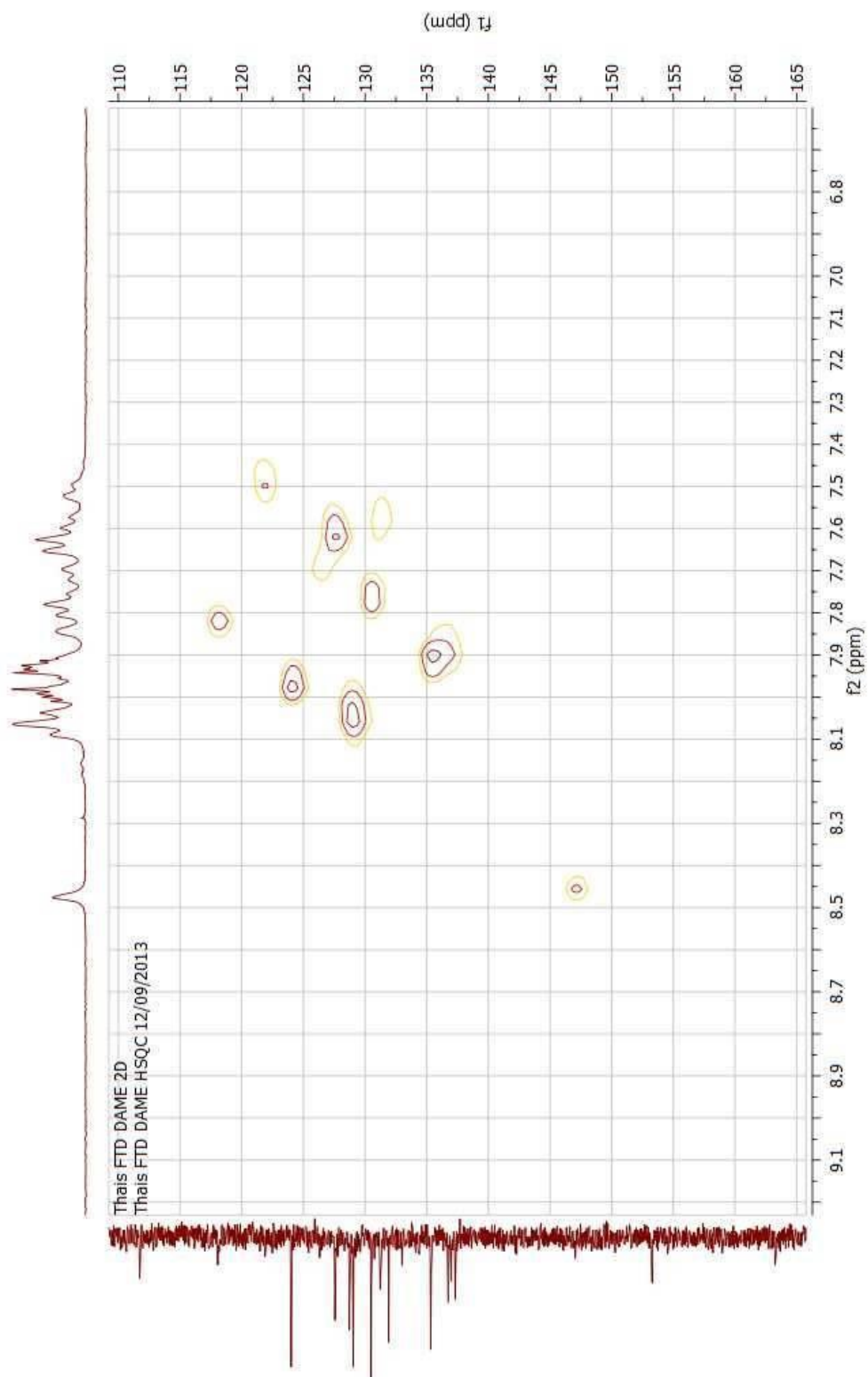
Espectro 65: Espectro de RMN de ^1H do composto final IV (300 MHz; DMSO-d_6).



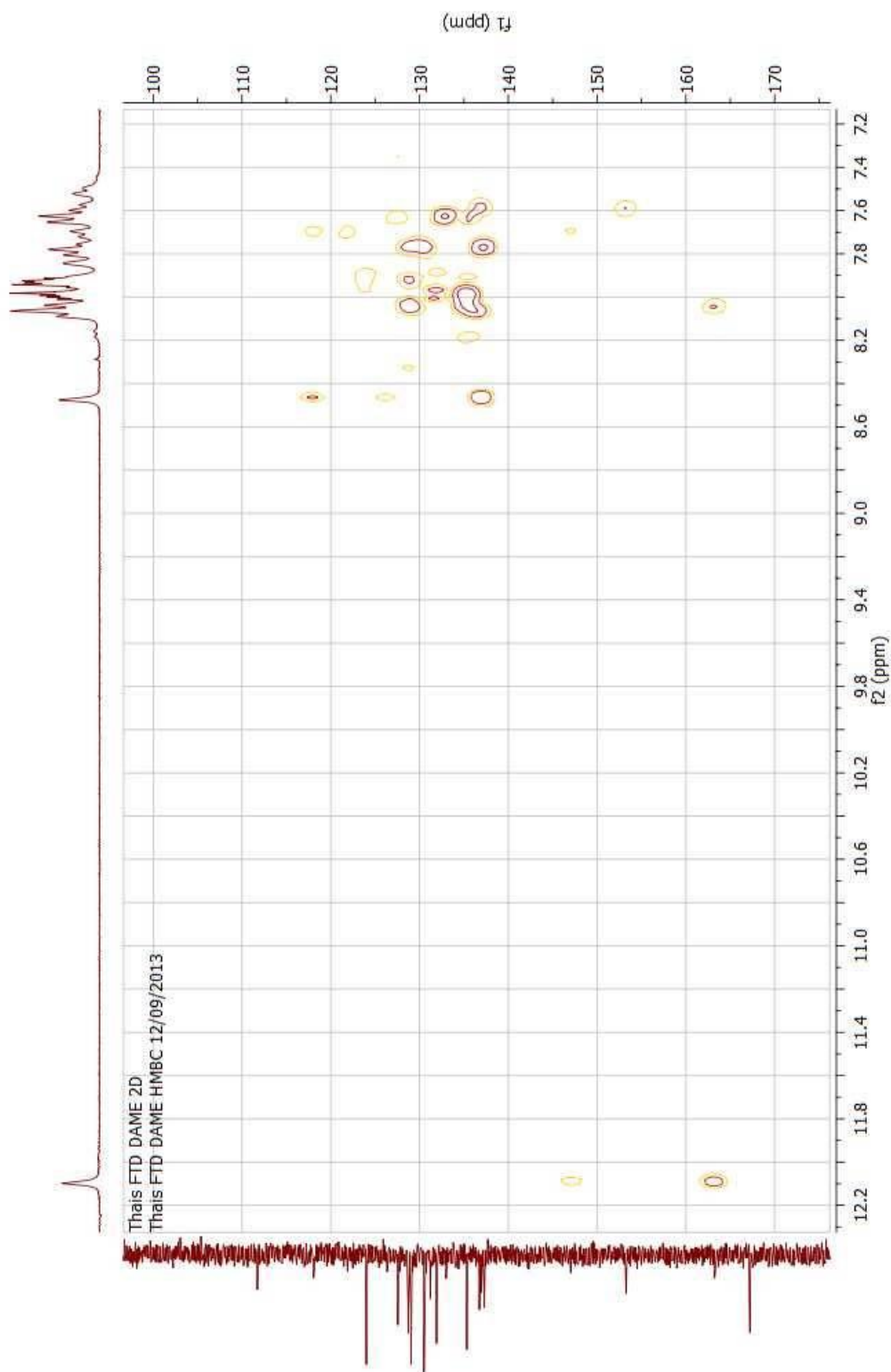
Espectro 66: Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto final IV (300 MHz; DMSO-d_6).



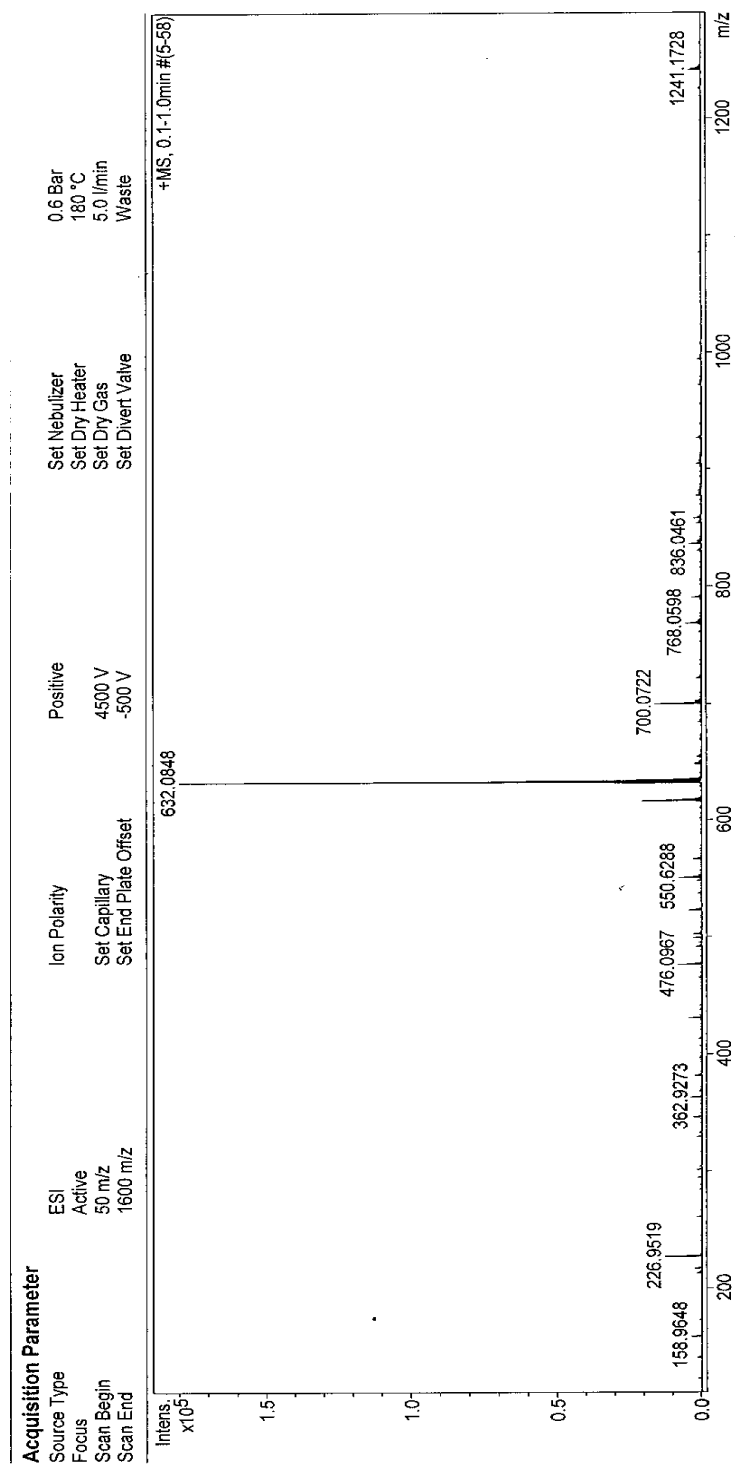
Espectro 67: Espectro de RMN ^{13}C do composto IV (75 MHz DMSOd6)



Espectro 68: Espectro de RMN de HSQC do composto IV (300 MHz; DMSOd6).



Espectro 69: Espectro de RMN de HMBC do composto IV (300 MHz; DMSO_d₆).



Espectro 70: Espectro de massas de alta resolução do composto final IV.

ANEXO I

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 32/2013

Interessado: THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Projeto: Síntese e Avaliação Farmacológica de novos compostos híbridos úteis para tratamento dos sintomas de anemia falciforme

Parecer nº 53/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 09 de outubro de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Síntese e Avaliação Farmacológica de novos compostos híbridos úteis para tratamento dos sintomas de anemia falciforme", apresentado pela pós-graduanda THAÍS REGINA FERREIRA DE MELO, sob orientação do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em DEZEMBRO de 2015, em formulário para este fim.

Araraquara, 17 de outubro de 2013.



Profª Drª ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA