



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia

ANA CLARA SILVEIRA SCOMPARI

**Estudo de modelagem molecular e síntese de derivados
furoxânicos inibidores de histona deacetilase**

Araraquara, SP

2022

ANA CLARA SILVEIRA SCOMPARI

**Estudo de modelagem molecular e síntese de derivados
furoxânicos inibidores de histona deacetilase**

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

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Coorientadora: Ma. Aline Renata Pavan

Araraquara, SP

2022

S423e Scomparin, Ana Clara Silveira.
Estudo de modelagem molecular e síntese de derivados furoxânicos
inibidores de histona deacetilase / Ana Clara Silveira Scomparin. –
Araraquara: [S.n.], 2022.
82 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação: Farmácia). Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências
Farmacêuticas.

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

1. Anemia falciforme. 2. HDAC. 3. Furoxanos. I. Santos, Jean Leandro
dos, orient. II. Pavan, Aline Renata, coorient. III. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e avós, bases da minha vida, que contribuíram muito para o que sou hoje como pessoa e que nunca hesitaram em conceder sempre o melhor e o necessário para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois, pela minha fé e crença n'Ele, pude ter forças para enfrentar diversos desafios e dificuldades durante os cinco anos de graduação.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Paulo e Rosilene Scomparin e ao meu irmão, Davi Scomparin, por todo apoio e suporte que me deram desde o início e pela base construída, pautada em princípios e valores, que me auxiliaram durante toda minha trajetória e me deram condições de continuar a lutar pelos meus objetivos.

Agradeço aos meus avós, Hermando Scomparin (*in memoriam*), Anna Scomparin (*in memoriam*), Celso Silveira (*in memoriam*) e Clara Silveira, fundamentais e muito importantes em minha formação como pessoa e profissional.

Agradeço ao meu namorado, companheiro e melhor amigo, Vinícius Alexandre, por toda a paciência, por acreditar em meu potencial, por segurar a barra em vários momentos, ser meu porto seguro, por vibrar em cada conquista minha e por todo amor e força durante esses anos.

Agradeço aos meus cunhados, Gabriela Azevedo, Caio Alexandre, Suelen Giacometti e Rafael Domingues por estarem ao meu lado me apoiando em todos os momentos e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço às minhas amigas de faculdade, Eduarda Soler e Glória Carboni, pelo companheirismo durante esses cinco anos e também por todos os dias e noites de estudos, lágrimas, risadas e diversão. Agradeço ainda aos meus amigos de Colégio, em especial Maria Eduarda Bergamaschi, Bruna Sakomura e César Pavani, por estarem ao meu lado em cada momento que enfrentei.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos e a minha coorientadora, Ma. Aline Renata Pavan, pelo suporte, pela amizade e por toda a força durante os quatro anos de trabalho no laboratório e por sempre acreditarem em mim e na pesquisa.

Por fim, agradeço à CNPq pelas bolsas concedidas durante três anos de Iniciação Científica e à equipe do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, que foram essenciais em cada etapa do meu trabalho, sempre me

auxiliando, me apoiando e me aconselhando para o melhor desenvolvimento de minhas atividades, além da amizade construída durante esses anos.

Resumo

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença genética hematológica, caracterizada por uma mutação no sexto códon da cadeia de beta globina, originando uma hemoglobina anormal (HbS). Em baixa tensão de oxigênio, a HbS se polimeriza e induz alterações na estrutura do citoesqueleto da hemácia, alterando seu formato (forma de foice). Dentre as diversas complicações é possível citar crises vaso-oclusivas, dores intensas, e maior susceptibilidade às infecções. Atualmente, o tratamento para a AF inclui os fármacos: hidroxiureia (HU), L-glutamina, voxelotor e crizanlizumab. Dentre essas abordagens, destaca-se a indução da produção de hemoglobina fetal (HbF) por ser capaz de reduzir a morbidade e mortalidade associadas à doença. Pesquisas mostraram que a inibição de enzimas epigenéticas, como as histonas deacetilases (HDACs), promovem o aumento de HbF, sendo as HDACs 1 e 2 os principais alvos. As HDACs são responsáveis pelo silenciamento do gene da gama-globina e sua inibição pode reativar a expressão da mesma e a produção de HbF em adultos, sendo uma abordagem importante no tratamento da AF. Além da inibição seletiva das HDACs, explorou-se também, na mesma molécula, a doação de óxido nítrico (NO) através da introdução de grupos furoxanos. O NO auxilia na farmacoterapia da AF por atuar como vasodilatador e também auxiliar em outras comorbidades cardiológicas resultantes da doença. Sendo assim, quinze novos híbridos foram planejados e avaliados in silico através de modelagem molecular, os quais resultaram em docking scores (DS) que variaram entre -14.302 e -10.308. Todos os compostos apresentaram um padrão de interação com os resíduos de aminoácido do sitio ativo da HDAC-2, sendo eles: His145, His146, Gly154 e Phe155. Das moléculas propostas, três foram, inicialmente, selecionadas para síntese devido à maior acessibilidade sintética. Sendo assim, três novos híbridos contendo três diferentes grupos furoxânicos (metilado, fenilado e bisarilsulfonilfuroxano) foram sintetizados com rendimentos que variaram entre 6.36 e 29.54%, e caracterizados através de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho.

Palavras-chave: anemia falciforme, HDAC, furoxanos

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is an inherited hematologic disorder caused by a single mutation in the β -globin gene, which results in an abnormal hemoglobin (HbS). At low tension of oxygen HbS polymerizes and induces alteration in the cytoskeleton and sickle shaped red blood cell. Vaso-occlusive crises, chronic inflammation, pain and increased infection susceptibility are among the current complications of the disease. Nowadays, the treatment for SCD includes hydroxyurea (HU), L-glutamine, voxelotor and crizanlizumab. Induction of fetal hemoglobin (HbF) production is one of the approaches of HU and is responsible for decreasing morbidity and mortality of the SCD patients. Recent studies have demonstrated that inhibition of epigenetic enzymes, such as Histone deacetylases (HDAC) 1 and 2, are responsible for increasing the HbF production. HDACs are the epigenetic enzymes responsible for the silencing of gamma-globin gene and its inhibition results in the reactivation of this globin expression and HbF production in adults, being nowadays an important approach for SCD treatment. In addition to HDAC inhibition, our work also explored the nitric oxide donation by inserting furoxan subunits to the molecules. NO can help in the treatment of SCD for being a vasodilator and also for improving other cardiological comorbidities of the SCD patients. Thus, fifteen new hybrids were designed and evaluated by molecular modeling, resulting in docking scores (DS) values from -14.302 to -10.308. All compounds presented a pattern in the interaction with the aminoacids residues in the active site of HDAC-2, being them: His145, His146, Gly154 e Phe155. Among the designed molecules, three of them were selected for the synthesis due to a higher synthetic accessibility. Three new hybrids containing three diferente furoxan subunits (methyl, phenyl and bisarilsulfonyl) were synthesized in yields ranging from 6.36 to 29.54%, and characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared.

Keywords: Sickle cell disease, HDAC, furoxan

Lista de Ilustrações e Figuras

Figura 1 - Fisiopatologia da AF.....	13
Figura 2 - Ilustração da alteração da membrana celular de eritrócitos falciformes...	14
Figura 3 - Gráfico da produção de globinas em relação ao tempo de gestação/nascimento	15
Figura 4 - Quadro ilustrativo dos diversos sintomas decorrentes da AF	17
Figura 5 - Episódio de vaso-oclusão em pacientes falciformes.....	18
Figura 6 - Atuação das HATs e HDACs sobre a cromatina.....	21
Figura 7 - Mecanismo de doação de NO por derivados furoxânicos	22
Figura 8 - Mecanismo de difusão do NO	23
Figura 9 - Propriedades química, fisiológica e terapêutica do ânion nitrito.....	24
Figura 10 - Planejamento estrutural	28
Figura 11 - Estrutura química dos compostos A1-A15	29
Figura 12 - Esquemas reacionais de obtenção dos furoxanos Ia, Ib e Ic	33
Figura 13 - Esquema reacional de obtenção do intermediário P ₁	35
Figura 14 - Esquemas reacionais de obtenção dos produtos finais A1, A6 e A11 ...	36
Figura 15 - Sobreposição das poses do inibidor cristalizado e redocado.....	38
Figura 16 - Conformação e interações da molécula A3 no sítio ativo da enzima	40
Figura 17 - Conformação e interações da molécula A8 no sítio ativo da enzima	41
Figura 18 - Conformação e interações da molécula A13 no sítio ativo da enzima ...	41
Figura 19 - Sobreposição das moléculas da série 3 (bisarilsulfonil)	42
Figura 20 - Interação com os resíduos de aminoácidos das moléculas A11, A12, A13, A14 e A15	44
Figura 21 - Imagem 3D da sobreposição das moléculas A11, A12, A13, A14 e A15	45
Figura 22 - Mecanismo de formação do furoxano metilado (Ia)	54
Figura 23 - Mecanismo de formação do furoxano fenilado (Ib)	55
Figura 24 - Mecanismo de formação do produto intermediário P ₁	57
Figura 25 - Formação do produto final A1	58
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹ H da molécula P ₁ (600MHz, DMSO-d ₆).....	72
Figura 27 - Espectro de RMN de ¹³ C da molécula P ₁ (150MHz, DMSO-d ₆)	73
Figura 28 - Espectro de RMN de ¹ H da molécula A1 (600MHz, DMSO-d ₆).....	74
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹³ C da molécula A1 (150MHz, DMSO-d ₆)	75
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹ H da molécula A6 (300MHz, DMSO-d ₆).....	76
Figura 31 - Espectro de RMN de ¹ H da molécula A11 (300MHz, DMSO-d ₆).....	77
Figura 32 - Espectro de IV da molécula A1	78
Figura 33 - Espectro de IV da molécula A6	79
Figura 34 - Espectro de IV da molécula A11	80

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores de DS em relação à contribuição dos furoxanos	39
Tabela 2 - Valores de DS em relação aos substituintes da subunidade do inibidor de HDAC das moléculas	42
Tabela 3 - Parâmetros da regra dos 5 de <i>Lipinski</i> e predição das propriedades farmacocinéticas das estruturas de 1 a 15.....	47
Tabela 4 - Dados de SwissADME das estruturas de 1 a 15	52
Tabela 5 - Resultados físico-químicos de todos os compostos sintetizados	58
Tabela 6 - Dados de RMN do produto intermediário P1	59
Tabela 7 - Dados de RMN do produto final A1	60
Tabela 8 - Dados de IV do produto final A1	61
Tabela 9 - Dados de RMN do produto final A6	62
Tabela 10 - Dados de IV do produto final A6	63
Tabela 11 - Dados de RMN do produto final A11	64
Tabela 12 - Dados de IV do produto final A11	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

AF – Anemia Falciforme

AVC – Acidente Vascular Cerebral

cGMP – Monofosfato Cíclico de Guanosina

DNMT - Metiltransferase

DS – *Docking Score*

HAT – Histona acetilase

HbA – Hemoglobina adulta

HbF – Hemoglobina fetal

HbS – Hemoglobina S

HDAC – Histona deacetilase

HU - Hidroxiuréia

IV - Infravermelho

MAO – Monoaminoxidase

NO – Óxido nítrico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Hemoglobinopatias	12
1.2 Anemia Falciforme	12
1.3 Epidemiologia.....	15
1.4 Tratamento.....	16
1.5 Epigenética	19
1.6 Doadores de óxido nítrico (NO).....	21
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. DESENVOLVIMENTO	27
3.1 Planejamento estrutural	27
3.2 Estudos <i>in silico</i>	28
3.2.1 Modelagem molecular.....	28
3.2.1.1 Metodologia	30
3.2.2 Predição de farmacocinética.....	31
3.2.2.1 Metodologia	31
3.3 Síntese.....	32
3.3.1 Metodologia	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Modelagem molecular.....	38
4.2 Predição farmacocinética.....	45
4.3 Síntese.....	53
4.3.1 Síntese dos furoxanos	53
4.3.1.1 Síntese do furoxano metilado (Ia).....	53
4.3.1.2 Síntese do furoxano fenilado (Ib).....	54
4.3.1.3 Síntese do bisarilsulfonilfuroxano (Ic).....	55
4.3.2 Síntese do intermediário P1.....	56
4.3.3 Síntese dos produtos finais A1, A6 e A11.....	57
4.3.4 Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia de Infravermelho	59
5. CONCLUSÃO	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

APÊNDICE	71
----------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias podem ser resultantes de mutações que afetam os genes reguladores, na qual promovem desequilíbrios quantitativos das proteínas, ou de alterações que envolvem genes estruturais, formando moléculas de hemoglobinas bioquimicamente diferentes das normais, sendo denominadas de hemoglobinas variantes. Essas hemoglobinas alteradas podem ser do tipo S (Hb S) ou C (Hb C) e estão relacionadas à doença falciforme. Sendo assim, o indivíduo heterozigoto para hemoglobina S é conhecido como “traço falcêmico” ou “traço falciforme” (Hb AS) (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

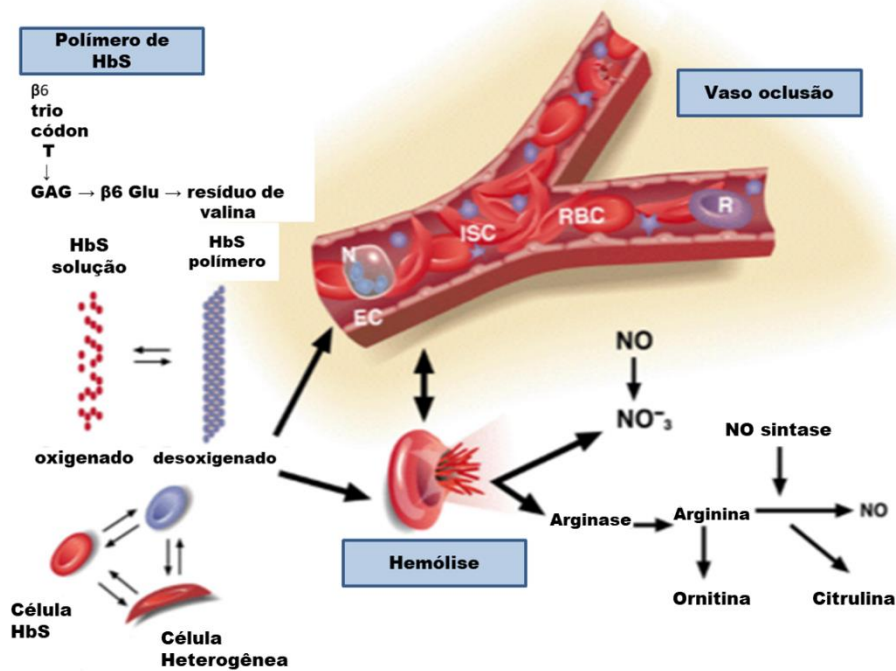
1.2 Anemia Falciforme

A Anemia Falciforme (AF) é a doença de caráter genético e hereditário que mais prevalece no mundo (LOBO; MARRA; SILVA, 2007). Sua patologia é devido a uma mutação no cromossomo 11 que resulta na troca de um ácido glutâmico (GTG) pela valina (GAG) na posição 6 da extremidade N-terminal da cadeia de beta globina, originando, por sua vez, a hemoglobina S (NUZZO; FONSECA, 2004). Quando esta se encontra desoxigenada, há interações hidrofóbicas das partes apolares, alterando sua solubilidade e conformação, dando origem a forma característica de foice (LOBO; MARRA; SILVA, 2007). O polímero da hemoglobina falciforme e também, por vezes, altas concentrações de hemoglobina S oxidada, não polimerizada, danificam o eritrócito e sua membrana (STEINBERG, 2008).

Essa doença manifesta-se em indivíduos homozigóticos para a hemoglobina S em combinação com outras hemoglobinas anormais, o que pode levar a diversos graus de gravidade patológicos (NUZZO; FONSECA, 2004). O indivíduo acometido pela doença pode apresentar múltiplas alterações clínicas, dentre elas a anemia hemolítica, que pode resultar em cálculos biliares (STEINBERG, 2008), crises vaso-oclusivas (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017), incluindo a adesão de eritrócitos ao endotélio (STUART; NAGEL, 2004), crises de dor que podem ser muito intensas e progressivas (LOBO; MARRA; SILVA, 2007), insuficiência renal, priapismo (STUART; NAGEL, 2004), acidente vascular cerebral (AVC), além de maior susceptibilidade a infecções. A Figura 1 mostra duas das principais alterações clínicas: a vaso-oclusão e a hemólise, decorrentes da mutação genética que resulta

na formação do polímero HbS (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Quando uma quantidade de polímeros de hemoglobina se acumula dentro de um eritrócito falciforme, tem-se lesão celular e os eritrócitos danificados causam o fenótipo da doença (STEINBERG, 2008).

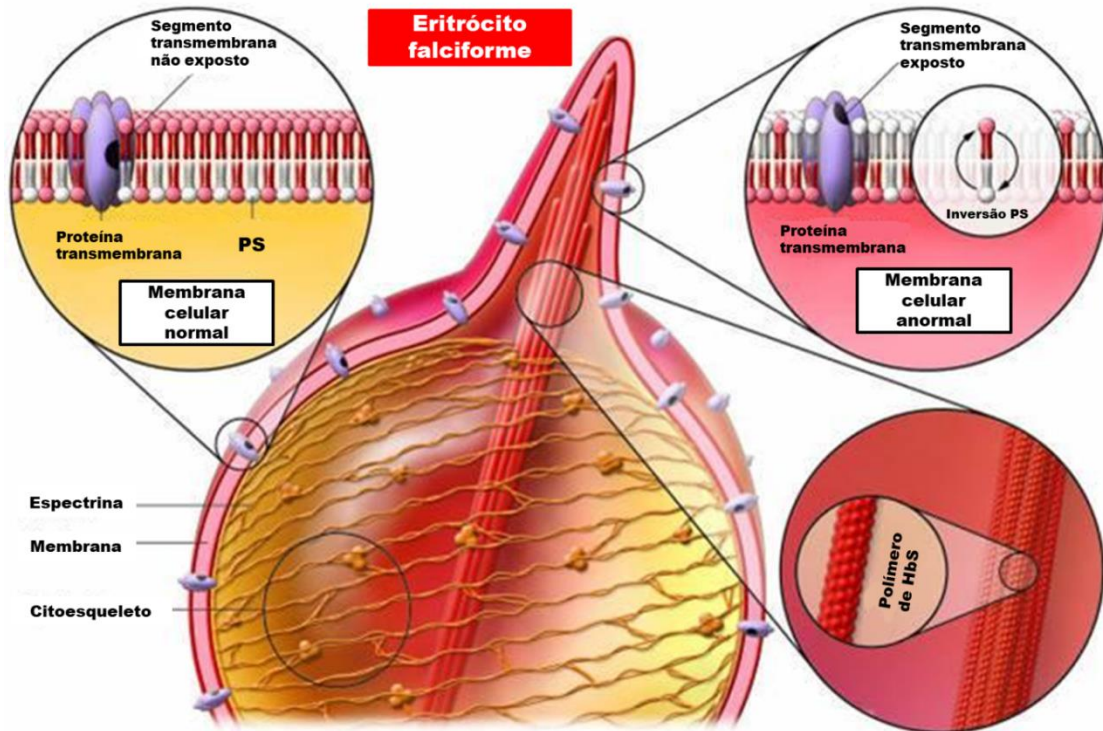
Figura 1 - Fisiopatologia da AF



Fonte: Adaptado de Steinberg, 2008.

Na AF, quando há mudanças na pressão parcial de oxigênio, os eritrócitos de certos indivíduos podem sofrer mudanças reversíveis, como a birrefringência do eritrócito e da membrana celular. A Figura 2 mostra, mais especificamente, a mudança que ocorre na membrana da célula eritrocitária, bem como a formação do polímero decorrente das interações das regiões das globinas. O fato de essas regiões interagirem é devido à baixa pressão parcial de oxigênio. Com isso, o átomo de ferro, presente no grupo heme da hemoglobina, interage de forma reduzida com os átomos de oxigênio (PAULING *et al.*, 1949).

Figura 2 - Ilustração da alteração da membrana celular de eritrócitos falciformes



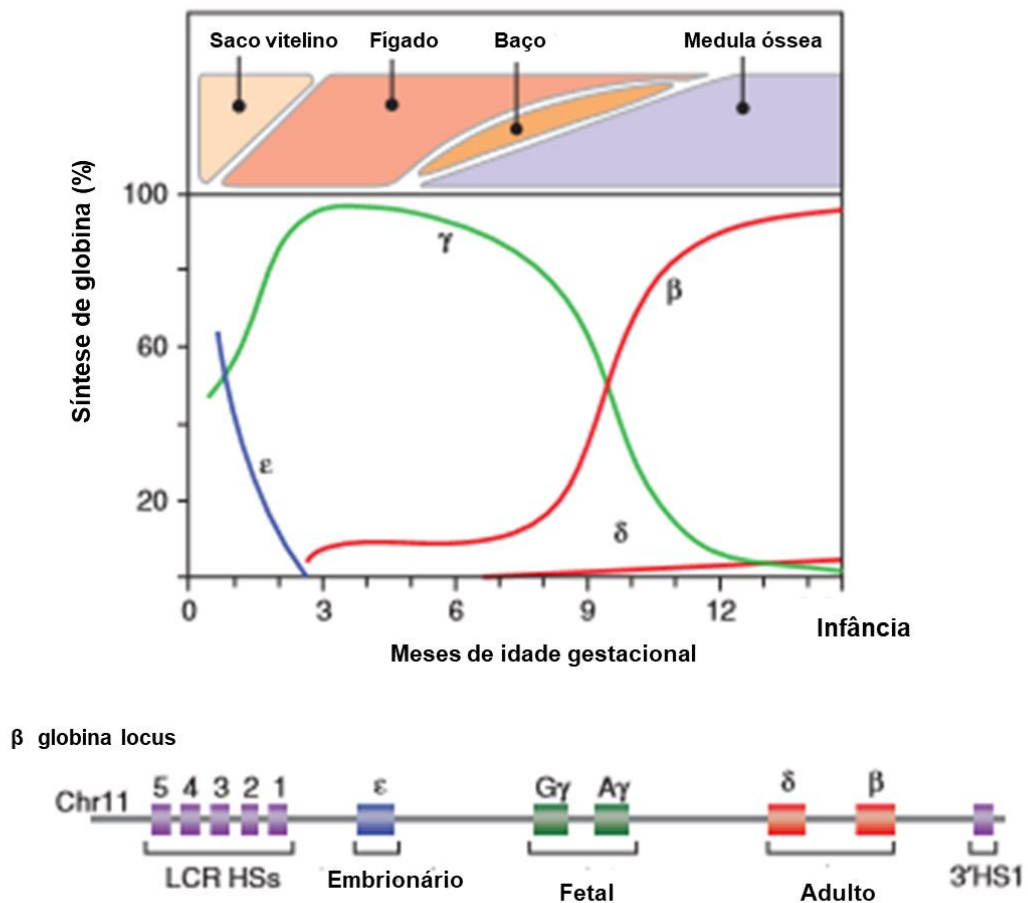
Fonte: Adaptado de Steinberg, 2008.

A globina é uma apoproteína da hemoglobina que abriga o anel porfirínico. Este é extremamente importante, pois o átomo de ferro presente participa da ligação reversível com o oxigênio para o seu transporte pelo organismo e demais funções fisiológicas (STEINBERG, 2008).

No início do primeiro trimestre de gestação, a produção predominante de globina do tipo beta é a gama globina, no qual seus genes são encontrados no conjunto de genes da beta globina. Quando gama-globina se combina com outras cadeias globulares (cadeias alfa), resultando em um tetrâmero, há formação da hemoglobina fetal (HbF). Após o nascimento, diminui-se a produção de HbF e inicia-se a produção de beta-globina que originará a hemoglobina adulta (HbA), contendo duas cadeias alfa e duas cadeias beta. A partir dos seis meses do nascimento, a produção de HbA já é maior do que a produção de HbF. Devido ao fato do paciente falciforme apresentar a mutação no gene da globina beta, sua hemoglobina adulta apresenta-se alterada (HbS) e, então, a partir dos seis meses do nascimento

iniciam-se os sintomas da doença (SANKARAN; ORKIN, 2013). A Figura 3 mostra a síntese de diferentes globinas correspondentes aos meses de gestação e ao início da infância de um indivíduo e evidencia o período crítico na intersecção das curvas verde (gama globina) e vermelha (beta globina).

Figura 3 - Gráfico da produção de globinas em relação ao tempo de gestação/nascimento



Fonte: Adaptado de Sankaran, 2013.

1.3 Epidemiologia

Estima-se que 7%, aproximadamente, da população mundial seja afetada pela disfunção das hemoglobinas, expressas pelas talassemias e doença falciforme (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005). A doença predomina entre negros e pardos, sendo a África Subsaariana, Sul da Ásia, Oriente Médio e Mediterrâneo as regiões onde mais prevalece a doença falciforme (ESRICK *et al.*, 2015; FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010; SEDRAK *et al.*, 2021).

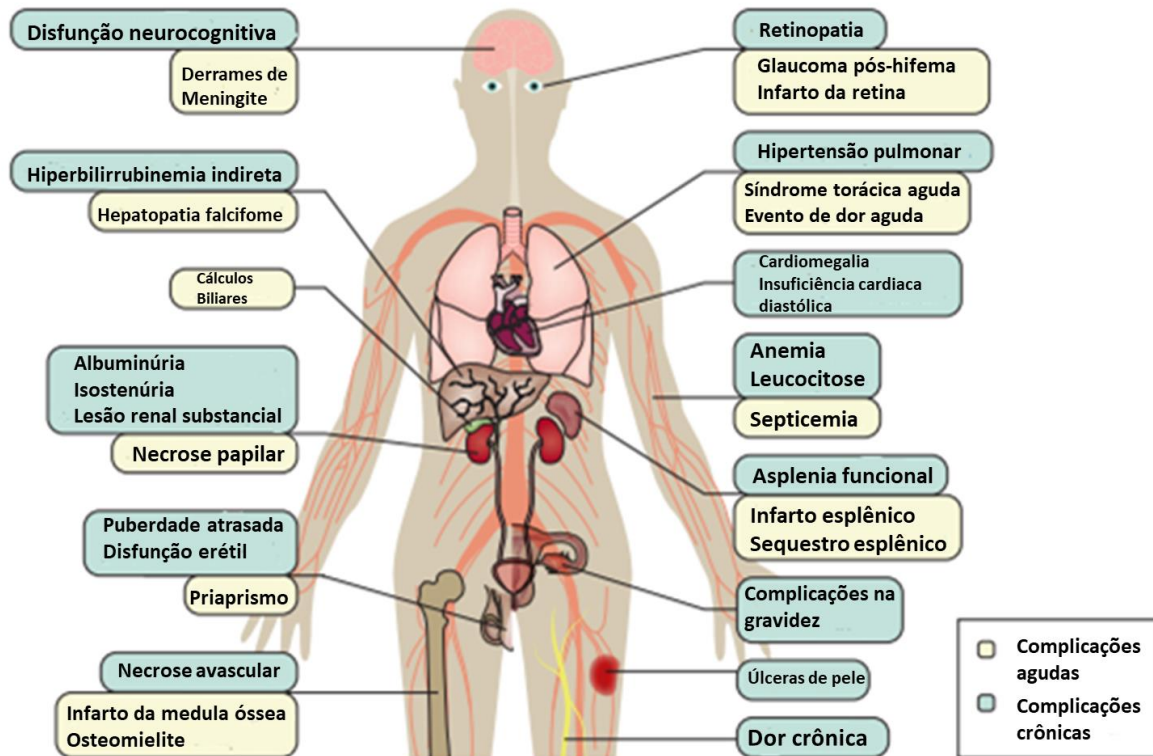
Estudos epidemiológicos feitos no começo dos anos 2000 relataram que, no Brasil, 3.500 crianças nascem, por ano, com a doença falciforme e 200.000 possuem o traço falciforme. No Estado de São Paulo a incidência entre os nascidos vivos é de 1 a cada 4000 (UNIFESP, 2020). Estima-se, também, que mais de 7 milhões de pessoas sejam portadoras do traço falcêmico e que mais de 25.000 possuem a doença (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005). Na América do Norte, mais especificamente nos Estados Unidos, a estimativa é que a doença afeta 1 a cada 500 afro-americanos, cerca de 1 a cada 12 afro-americanos carregam a mutação autossômica recessiva e, aproximadamente, 300.000 crianças nascem com AF anualmente (SEDRAK *et al.*, 2021).

A maior prevalência de HbS ocorre na África tropical e em países onde ocorreu o tráfico negreiro. No Brasil, estima-se que haja, pelo menos, dois milhões de portadores heterozigotos da hemoglobina S e que cerca de 0,1% a 0,3% da população negra é afetada pela doença. Por exemplo, na região sudeste do Brasil, estima-se que 2% da população geral são heterozigotos para HbS e que, entre os negros, a prevalência é de 6% a 10% (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

1.4 Tratamento

Observa-se que uma boa parte da população brasileira é acometida pela doença falciforme. Decorrente disso, sabe-se que muitos sofrem com os sintomas que essa patologia causa, sendo dores fortes e constantes, anemias, problemas renais, crises vaso-oclusivas, dentre muitos outros. A Figura 4 mostra um quadro das inúmeras complicações, tanto agudas como crônicas, decorrentes da doença. Com isso, sem o tratamento adequado, a qualidade de vida do indivíduo diminui, suas visitas aos hospitais são frequentes e, muitas vezes, não conseguem realizar simples atividades diárias.

Figura 4 - Quadro ilustrativo dos diversos sintomas decorrentes da AF

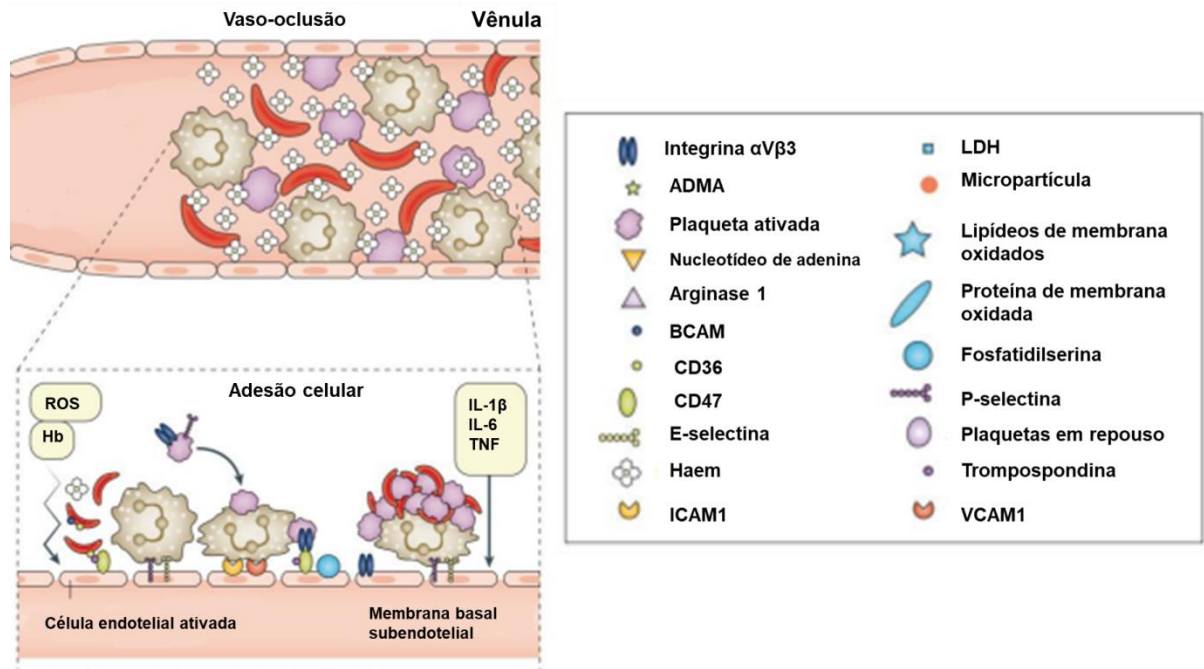


Fonte: Adaptado de Kato, 2018

A vaso-oclusão, bastante comum em pacientes falciformes, mas que merece atenção redobrada, é um fenômeno que ocorre devido a interações entre eritrócitos, células endoteliais, plaquetas e glóbulos brancos, bloqueando o fluxo sanguíneo na região (KATO, G. *et al.*, 2018; MARISA WEXLER, 2022). A Figura 5 mostra como esse episódio ocorre. Em situação de hipóxia, as hemácias falciformes, o grupo heme livre, a hemoglobina e as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) são induzidas, fazendo com que as células endoteliais sejam ativadas, produzindo mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), resultando em inflamação crônica. Além disso, o aumento de expressão de moléculas de adesão, como a proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM1), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), P-selectina, E-selectina, antígeno de superfície de leucócitos (CD47) e a α V β 3 integrina são alguns dos responsáveis pela adesão dos eritrócitos e dos leucócitos (KATO, G. *et al.*, 2018). O resultado desses eventos é uma dor forte e considerável que afeta qualquer parte do

corpo, sendo as costas, tórax e extremidades as regiões mais comuns (MARISA WEXLER, 2022).

Figura 5 - Episódio de vaso-oclusão em pacientes falciformes



Fonte: Adaptado de KATO, 2018

A subjetividade da dor representa um fator que dificulta o tratamento dessa doença (LOBO; MARRA; SILVA, 2007). Vários compostos tornaram-se disponíveis a população com AF, como hidroxureia, butirato de sódio, glutamina, 5-azacitidina e decitabina (ESRICK *et al.*, 2015). Além disso, muitos realizam, regularmente, transfusões sanguíneas, porém, a sobrecarga de ferro pode levar a algumas complicações clínicas (SANKARAN; ORKIN, 2013).

A hidroxureia (HU), fármaco aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 1998, é um agente citotóxico da fase S do ciclo celular e inibidor da ribonucleotídeo redutase (ESRICK *et al.*, 2015). Seu mecanismo de ação na AF é decorrente da produção de óxido nítrico (NO) por, basicamente, dois mecanismos: inativação redox de um radical tirosil e a redução do centro de ferro na ribonucleotídeo redutase e a via solúvel da guanilato ciclase \pm proteína-cinase dependente de cGMP (GLADWIN *et al.*, 2002). Com isso, pesquisas revelaram que, por meio desses mecanismos de ação, conseguia-se induzir a síntese de HbF.

Contudo, esse composto não é eficiente para todos os pacientes que possuem AF (ESRICK *et al.*, 2015). Recentemente, outros três fármacos foram aprovados pela FDA: L-Glutamina, aprovado em julho de 2017 e Voxelotor e Crizanlizumab, ambos aprovados em novembro de 2019.

Porém, mesmo que novos tratamentos surjam, ainda é imprescindível que pesquisas sejam feitas para que outros novos fármacos, mais eficazes, potentes e seguros, estejam disponíveis aos indivíduos acometidos pela doença falciforme.

1.5 Epigenética

Epigenética é o estudo de alterações na expressão gênica, de forma hereditária, que ocorrem sem mudança na sequência de DNA. Fornecem um controle transcricional que regula como os genes são expressos. O epigenoma é dinâmico e estabelece perfis de expressão gênica nas células dos vertebrados, variando para cada tipo de célula (WANG *et al.*, 2004). Sendo assim, alterações anormais epigenéticas podem causar quadros de câncer, distúrbios genéticos, síndromes pediátricas e, também, serem fatores que contribuem para doenças autoimunes e envelhecimento (RODENHISER; MANN, 2006). Os mecanismos principais que compreendem essas alterações envolvem a estrutura da cromatina e modificações diretamente no DNA (D'ALESSIO; SZYF, 2006).

A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, o qual é formado por duas voltas de DNA em um octâmero de histonas, estruturado a partir de duas subunidade de cada histona, sendo elas, respectivamente, H2A, H2B, H3 e H4. A histona H1 age anexando cada núcleo nucleossômico, facilitando, portanto compactação (LUND; LOHUIZEN, 2004).

As caudas N-terminais das histonas se sobressaem dos nucleossomos, servindo como reguladores, onde os sinais epigenéticos podem ser escritos. Contudo, podem sofrer modificações, como acetilação e metilação de lisinas, ubiquitinação, fosforilação de serinas, entre outros (LUND; LOHUIZEN, 2004). Essas alterações influenciam a expressão gênica, dependendo de sinais específicos de desenvolvimento ou bioquímicos. Desse modo, quando a cromatina é condensada, os genes estão inacessíveis, ou seja, silenciados. Quando a cromatina apresenta-se relaxada, seus genes podem ser acessados por enzimas de transcrição, ou seja, estão ativados. As enzimas mais comuns que fazem parte desses processos

incluem as metiltransferases de DNA (DNMTs), histonas deacetilases (HDACs) e histonas acetilases (HATs) (RODENHISER; MANN, 2006).

Algumas evidências bioquímicas, epidemiológicas e clínicas demonstraram que altos níveis de gama globina, forma fetal da beta globina, inibe a polimerização da HbS (BRADNER *et al.*, 2010) e sustentam hipóteses de que a cromatina e estruturas do material genético nos promotores do gene da gama globina são essenciais para a regulação da expressão de HbF (FATHALLAH; ATWEH, 2006). A expressão gênica de gama globina é controlada por fatores de transcrição, como GATA-1, EKLF e por enzimas modificadoras da cromatina, como as HATs e as HDACs (BRADNER *et al.*, 2010). Sendo assim, a hemoglobina fetal inibe a polimerização e a concentração de HbS de cada célula, fazendo com que os eritrócitos fluam com mais homogeneidade na circulação sanguínea (STEINBERG, 2008).

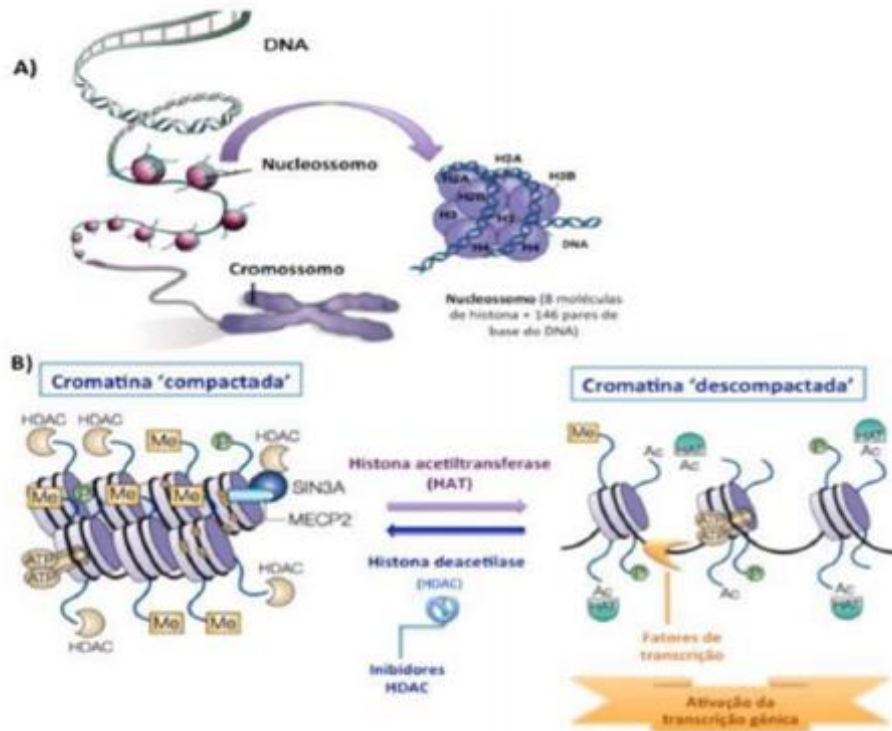
Trabalhos e experimentos recentes propõem que inibidores de histonas deacetilases (HDACs) específicos, como HDAC 1 e HDAC 2 (SANKARAN; ORKIN, 2013), induzem a produção de hemoglobina fetal (HbF) e modulam a estrutura da cromatina (BRADNER *et al.*, 2010).

As HDACs atuam removendo o radical acetil do resíduo de lisina presente nas histonas, causando a compactação da cromatina e silenciamento gênico. A categorização de enzimas HDAC é muito vasta, ou seja, possui variadas isoformas e elas estão distribuídas em famílias e classes (ESRICK *et al.*, 2015). As HDACs 1,2,3 e 8 fazem parte da classe I e são alvos de pesquisas envolvendo maior produção de HbF para tratamento dos sintomas causados pela AF. Possuem funções biológicas potencialmente seletivas (ESRICK *et al.*, 2015) e executam um papel importante na transcrição de genes (WANG *et al.*, 2004). A classe IIa e IIb são compostas, respectivamente, pelas HDACs 4, 5, 7 e 9 e HDACs 6 e 10, já na classe IV, tem-se a HDAC 11. Essas classes se reúnem na família chamada clássica. A classe III, por sua vez, faz parte de outra família, conhecida como sirtuínas.

Os inibidores de HDAC desencadeiam a hiper acetilação de grupos amino dos resíduos de lisina presente nas histonas. O grupo acetil quando inserido nos resíduos de lisina, tornam esse aminoácido neutro e diminuem sua interação com o DNA, relaxando a cromatina. Quando o acetil é removido, a lisina reestabelece sua carga positiva, interagindo com a carga negativa proveniente dos grupos fosfatos do DNA, resultando na compactação da cromatina (ESRICK *et al.*, 2015; FATHALLAH;

ATWEH, 2006). A Figura 6 mostra, de forma didática, como as HATs e as HDACs atuam na cromatina e o efeito resultante de sua inibição.

Figura 6 - Atuação das HATs e HDACs sobre a cromatina

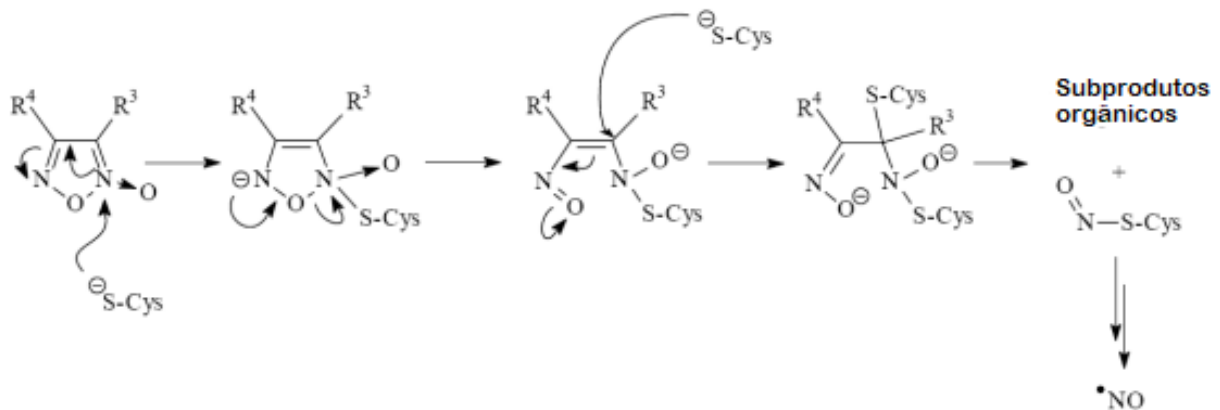


Fonte: Adaptada de Johnstone, 2002

1.6 Doadores de óxido nítrico (NO)

Compostos ligados a nitrogênio-oxigênio possuem potencial em se decompor, serem oxidados ou reduzidos, produzindo espécies reativas de nitrogênio e podendo desempenhar diversas funções no organismo, como o óxido nítrico (NO). A doação de NO depende do ataque do enxofre do aminoácido cisteína ao carbono que contém o nitrogênio *N*-óxido (SANTOS, 2013). Partindo disto, existem diversas classes que se encaixam como doadores de NO, como nitratos e nitritos orgânicos, *N*-nitrosaminas, furoxanos e benzofuroxanos, dentre outros (WANG *et. al.*, 2002). A Figura 7 mostra o mecanismo de doação de NO pelos derivados furoxânicos.

Figura 7 - Mecanismo de doação de NO por derivados furoxânicos



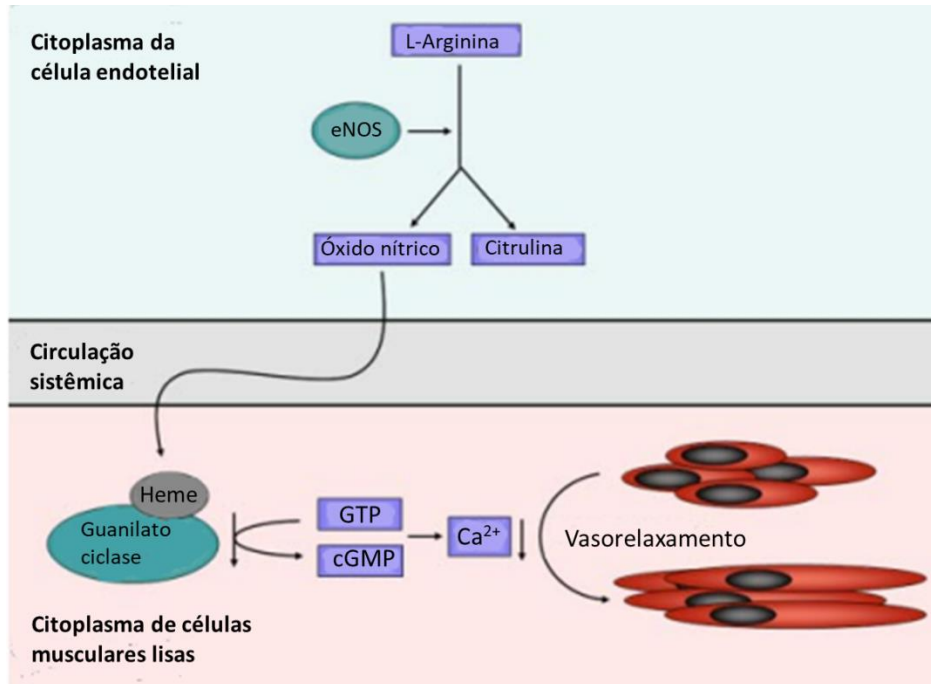
Fonte: adaptado de SANTOS, 2013

Baseando-se no mecanismo de doação do NO pelos grupos furoxânicos, pode-se perceber que modificações do caráter químico (eletronegatividade) dos substituintes inseridos em R₃ e R₄ podem aumentar ou diminuir a estabilidade do anel furoxânico, alterando assim o padrão de doação do óxido nítrico.

O óxido nítrico (NO) é um gás diatômico, no qual promove a manutenção da homeostase vascular, já que é produzido pelas células endoteliais vasculares, e também atua nas células musculares lisas como um forte vasodilatador. Além disso, o NO induz uma série de eventos celulares que possibilitam o fluxo sanguíneo, como inibição da adesão e da agregação plaquetária, pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) (BARRETO, CORREA & MUSCARA, 2005), regulação da expressão de moléculas de adesão celular nas células endoteliais e nos leucócitos da circulação e secreção de proteínas pró-coagulantes (HEBBEL, 1985; REITER *et al.*, 2002; ROTHER, BELL, HILLMEN e GLADWIN, 2005; VOETSCH, JIN e LOSCALZO, 2004). Por possuir moderada solubilidade em água em sistemas biológicos, tende a se concentrar em porções lipofílicas, como membranas e também regiões hidrofóbicas de proteínas (BARRETO, CORREA & MUSCARA, 2005). Sua síntese (endógena) provém do aminoácido L-arginina e é realizada por meio de uma reação de oxidação e catalisada pela eNOS (enzima óxido nítrico sintase), na presença de múltiplos cofatores, como o grupo heme e a tetrahydrobiopterina. O NO se difunde por meio da membrana celular e se liga à porção heme da guanilato ciclase. Decorrente disso, há produção de cGMP, diminuindo a contração das células musculares lisas por meio da redução da concentração intracelular de cálcio livre, produzindo, portanto, relaxamento,

vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo na região. (RONGEN *et al.*, 1994; LUNDBERG *et al.*, 2008). O mecanismo está demonstrado na Figura 8.

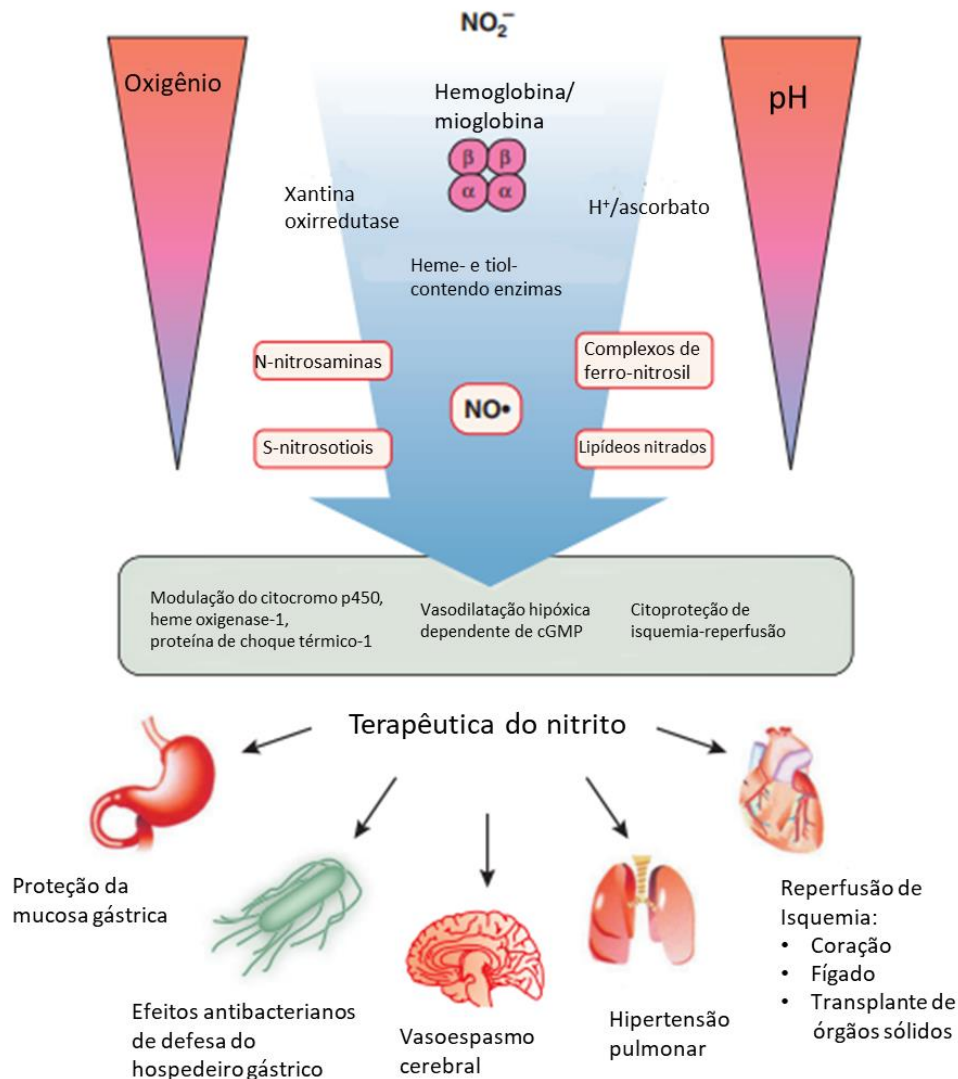
Figura 8 - Mecanismo de difusão do NO



Fonte: adaptado de AKINSHEYE, 2010

Além da sua formação endógena, diversas evidências propõem que o NO pode ser armazenado, intravascular e tecidualmente, na forma de ânion nitrito (NO_2^-), sendo que a sua conversão a NO acontece por meio de reações com hemoglobina, mioglobina, xantina oxidoreductase, enzimas contendo heme e tiol e por redução ácida (Gladwin *et al.*, 2005). A Figura 9 representa as propriedades química, fisiológica e terapêutica do nitrito, bem como a conversão à NO.

Figura 9 - Propriedades química, fisiológica e terapêutica do ânion nitrito



Fonte: adaptado de Gladwin, 2006

É constatado que pacientes com doença falciforme produzem mais espécies oxidativas, como peróxido de hidrogênio e superóxido, e possuem mecanismos de defesa de radicais livres prejudicados. Assim, como as hemácias falciformes são distintas das normais quanto sua morfologia, apresentam aumento de lipídios oxidados e também uma maior tendência à peroxidação lipídica (ASLAN *et al.*, 2000; ASLAN & FREEMAN, 2002). Desse modo, além de propriedades vasodilatadoras, o NO também possui propriedades antioxidantes, já que reage com metais, formando

produtos estáveis, que inibem a reação com peróxido de hidrogênio, controlando o estresse oxidativo no organismo. (DURANTE *et al.*, 1997).

Contudo, alguns estudos sugerem que pacientes com doença falciforme sofrem de diminuição das reservas de NO no organismo e também possuem uma menor resposta a doadores exógenos, em decorrência, provavelmente, do sequestro do óxido nítrico pela hemoglobina plasmática livre, resultante da hemólise que acontece em pacientes com essa patologia. Além disso, os níveis plasmáticos de L-arginina (aminoácido precursor do NO) estão diminuídos nesses pacientes, principalmente durante as crises vaso-oclusivas e a síndrome torácica aguda, sendo que esses níveis variam inversamente em relação aos sintomas de dor. (ENWONWU, XU, & TURNER, 1990; MORRIS, KUYPERS, LARKIN, VINCHINSKY e STYLES, 2000)

Com isso, decorrente da atuação do óxido nítrico no organismo, este composto possui diversas funções benéficas para a AF, pois está envolvida nos mecanismos de inibição da ativação plaquetária, facilitando o fluxo sanguíneo, muito prejudicado devido, principalmente, à vaso-oclusão, mecanismos de regulação da expressão de moléculas de adesão, da redução da adesão das células sanguíneas à parede do epitélio (SPACE *et al.*, 2000), ao aumento da afinidade com o oxigênio, ao aumento da expressão gênica de gama globina, constituinte da HbF (COKIC, 2003), e também mostrou-se eficaz em melhorar a deformabilidade das hemácias, que geram duras consequências a pacientes com doença falciforme (HEAD *et al.*, 1997; McDADE *et al.*, 1997).

Atualmente existem algumas terapias que utilizam diferentes mecanismos, mas que possuem a mesma finalidade: aumentar a biodisponibilidade de NO no organismo. Dentre elas, pode-se citar: NO inalado, nitrito inalado, nitrito intravascular, Hidroxiuréia e arginina, como produtores de NO; Alopurinol, como diminuidor da destruição de NO e as estatinas e Sildenafil, como amplificadores da resposta do óxido nítrico (MACK *et al.*, 2006).

A hidroxiureia (HU), particularmente, é uma das mais utilizadas na terapia para AF, pois atua elevando os níveis de HbF, inibindo, assim, a polimerização da HbS e também gera NO intraeritrocitária por peroxidação, contribuindo para a manutenção do fluxo e da pressão sanguínea (CHARACHE *et al.*, 1995; SPACE *et al.*, 2000; STEINBERG, 2006). Contudo, apesar dos efeitos benéficos que a HU

pode causar, muitos pacientes ainda não respondem ao tratamento com esse fármaco.

O nitrito é outro composto também bastante utilizado na terapêutica. Contudo, é relatado que seu uso prolongado pode gerar tolerância, não sendo, portanto, tão eficaz após certo período de tratamento. Isso acontece devido a sua reação com grupos tióis - importante para liberação do NO - o que, conseqüentemente, diminui os níveis desse grupamento nas células, promovendo a auto-inibição de seu metabolismo (SCHOENAFINGER, 1999).

Sendo assim, levando em consideração essas problemáticas, é imprescindível a busca por novas moléculas, que proporcionem um tratamento mais eficaz e que contemple ainda mais pacientes que sofrem com os sintomas e conseqüências dessa doença.

Além das terapias citadas anteriormente e resgatando a informação de que algumas classes são promissoras na capacidade de doação de óxido nítrico, pode-se citar, de modo particular, a utilização de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos. Em estudos realizados, esses grupos demonstraram exercer diversos efeitos relacionados à bioativação do NO, como citotoxicidade, mutagenicidade, imunossupressão, propriedades relaxantes de músculos centrais, efeitos anticonvulsivos, inibição da monoaminoxidase (MAO), vasodilatador direto e atividades de redução da pressão arterial (WANG *et al.*, 2002), demonstrando serem grupos bastante interessantes na construção de moléculas que funcionem como terapia para pacientes portadores da AF.

Com isso, levando em consideração informações referentes ao mecanismo de doação de NO e a grupos que possuem essa capacidade, como os furoxanos, a introdução de substituintes, favoráveis estericamente e que retiram a densidade eletrônica ao carbono que contém o nitrogênio *N*-óxido, pode ser bastante eficiente, já que esse átomo (carbono) torna-se mais deficiente eletronicamente e com maior suscetibilidade ao ataque do nucleófilo do enxofre do resíduo de cisteína (SANTOS, 2013).

Desse modo, percebe-se a grande importância do óxido nítrico para o organismo, principalmente de pacientes que sofrem com as doenças falciformes, já que a combinação de moléculas que possuem capacidade de doar *N*-óxido, como derivados furoxânicos, e que também sejam inibidores de HDAC, principalmente 1 e

2, e indutores de hemoglobina fetal, podem beneficiar portadores de AF e contribuir para a minimização dos sintomas mais clássicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudos *in silico*, síntese e caracterização de compostos inibidores de HDACs 1 e 2 e doadores de NO, contendo grupamento furoxano com diferentes substituintes.

2.2 Objetivos específicos

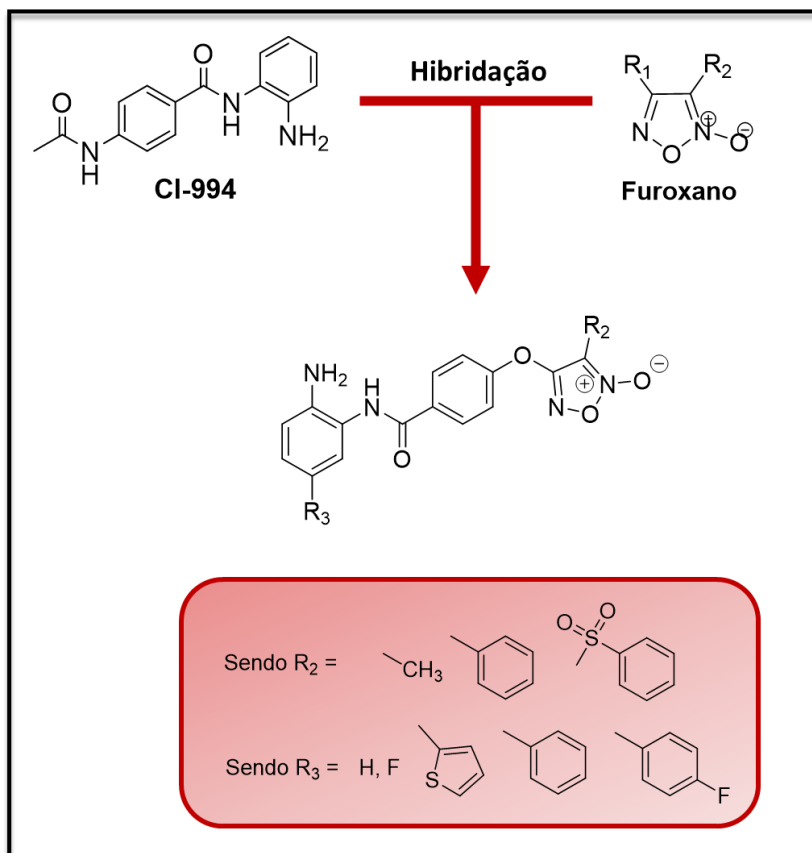
- Realizar estudos de modelagem molecular de 15 compostos com diferentes grupos furoxânicos (metilado, fenilado e bisarilsulfonil) e substituintes na posição –para em relação à amina do anel aromático (átomo de hidrogênio, flúor, tiofeno, fenil e fluorofenil);
- Realizar a síntese do composto intermediário (P1) e dos três compostos finais escolhidos (A1, A6 e A11);
- Realizar a caracterização dos quatro compostos sintetizados (intermediário e os três produtos finais) por ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Planejamento estrutural

Baseando-se nos dados apresentados, planejou-se quinze novas moléculas contendo uma subunidade inibidora de HDAC-1 e 2, e uma subunidade doadora de óxido nítrico, sendo representada pelos furoxanos. Com objetivo de avaliar a seletividade dos inibidores de HDAC, utilizou-se cindo diferentes substituintes na posição R₃, sendo eles: H, F, tiofeno, fenil e 4-fluorofenil. Em relação aos furoxanos, propôs-se a inserção de três diferentes substituintes na posição R₂, com diferentes capacidades de retirar densidade eletrônica, sendo eles: metil, fenil e bisarilsulfonil, com o objetivo de estudar a influência dessas subunidades na doação de NO. A Figura 10 apresenta o esquema das quinze moléculas propostas.

Figura 10 - Planejamento estrutural



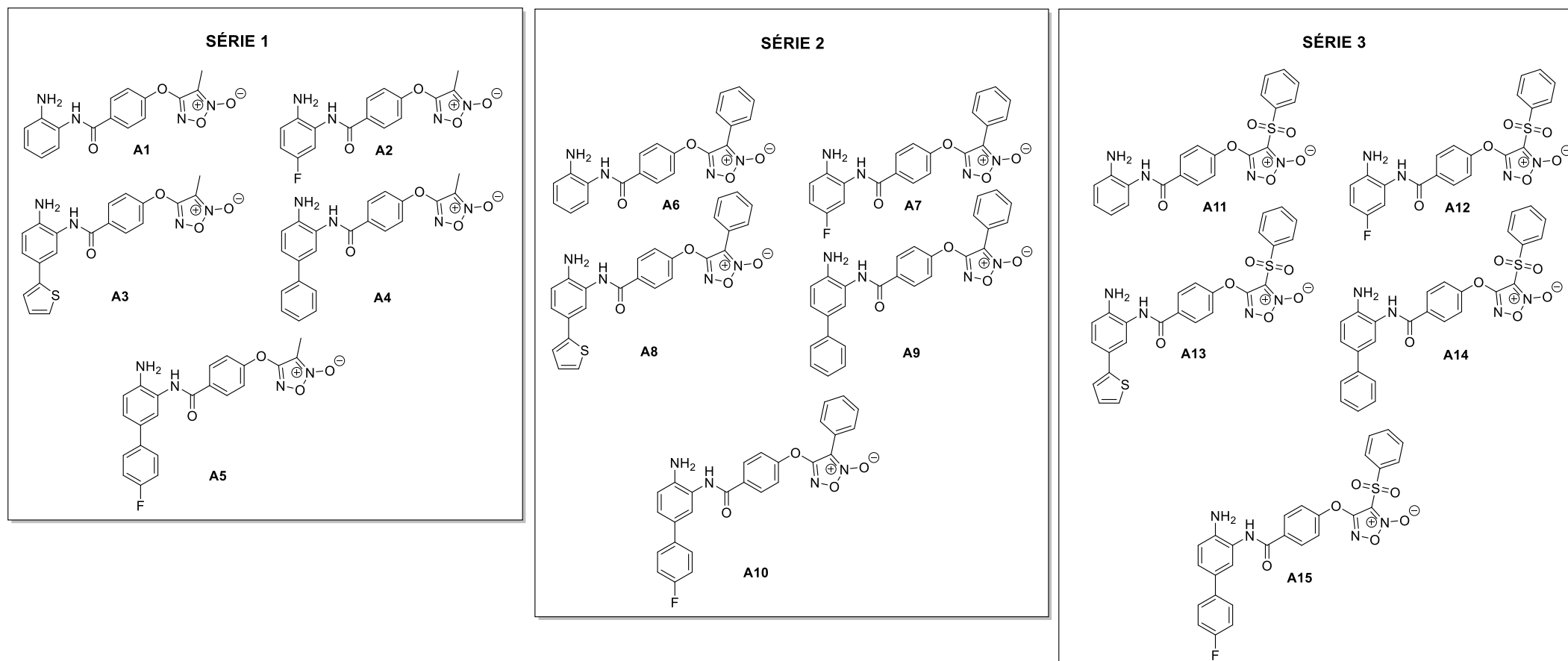
Fonte: própria autora

3.2 Estudos *in silico*

3.2.1 Modelagem molecular

O estudo de modelagem molecular foi realizado, de forma preliminar à síntese, com as estruturas propostas na Figura 11.

Figura 11 - Estrutura química dos compostos A1-A15



Fonte: própria autora

3.2.1.1 Metodologia

O estudo de modelagem molecular foi realizado utilizando-se a estrutura cristalográfica da HDAC-2, obtida do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), sob o código de 4LY1Z, resolução de 1,85 Å e cristalizada com o inibidor 20Y. Para os estudos de modelagem molecular, a proteína obtida foi importada para o programa Maestro[®] (SCHRÖDINGER, 2017a) e preparada para os estudos de modelagem molecular utilizando a função *Protein Preparation Wizard*. O protocolo utilizado seguiu os seguintes passos: (i) remoção das moléculas de água; (ii) adição de átomos de hidrogênio; (iii) preenchimento das cadeias laterais incompletas; (iv) minimização de energia utilizando o campo de força OPLS3. A caixa de interação (*Grid*), onde se encontra o sítio ativo da enzima, foi definida através do *Glide* (SCHRÖDINGER, 2017b), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å. Os ligantes tiveram suas energias minimizadas utilizando-se o programa LigPrep, e o estudo de docking foi realizado de forma flexível, propondo-se no mínimo 10 poses para cada composto.

A validação deste procedimento foi realizada através da redocagem, em que o ligante 20Y, cristalizado com a proteína, foi removido do sítio ativo e novamente docado. A posição original do ligante no cristal é comparada com a posição proposta pela ancoragem e esta análise é realizada através do cálculo *Root Mean Square* (RMSD), onde o valor obtido é considerado de confiança quando o RMSD for inferior a 2 Å (DASTMALCHI; HAMZEH-MIVEHROUD; SOKOUTI, 2016).

O *docking score* (DS) é um termo absoluto gerado pelo *software* que se relaciona com a energia livre de ligação do ligante. Diferentes contribuições são levadas em consideração para gerar esse valor, como campo de força (interações eletrostáticas e de *Van der Waals*) e penalidades ou contribuições que influenciam na interação do ligante com a enzima. De maneira geral, quanto menor seu valor entende-se que as interações entre determinada pose do ligante e a enzima estão sendo mais favorecidas na região definida (FRIESNER, 2006).

3.2.2 Predição de farmacocinética

3.2.2.1 Metodologia

As propriedades farmacocinéticas foram preditas utilizando-se dois diferentes websites, sendo eles o pkCSM e o SwissADME e os dados obtidos estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

O site pkCSM foi desenvolvido utilizando-se da estratégia de assinaturas estruturais baseadas em gráficos (*graph-based structural signatures*) com o intuito de prever propriedades farmacocinéticas de novas entidades químicas. O modelo gráfico é uma representação matemática de entidades químicas intuitivas e bem estabelecidas, do qual diferentes descritores, englobando tanto a estrutura molecular quanto a química, podem ser extraídos. Pode-se obter a representação gráfica de uma molécula através da representação dos átomos como “nós” e das ligações covalentes como arestas. Essa representação pode ser preenchida com informações das propriedades físico-químicas dos átomos e ligações, de onde padrões estruturais podem ser explorados. O maior componente do pkCSM refere-se às propriedades moleculares, como: a “impressão digital” o grupo toxicofórico (calculado baseando-se no SMARTS); a frequência do átomo farmacofórico e propriedades gerais como logP, peso molecular, área de superfície, entre outros. O segundo maior componente são os padrões baseados na distância (*distance-based patterns*), adaptado do algoritmo *Cutoff Scanning*.

O SwissADME é uma ferramenta que concede acesso gratuito a um conjunto de modelos preditivos, rápidos e robustos para propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, bem como a semelhança de fármacos para fornecer maior clareza aos estudos relacionados à química medicinal. A análise dos resultados se mostra mais fácil de ser interpretada, mesmo quando o operador não possui conhecimentos aprofundados em *design* de medicamentos auxiliado pelo computador. Sendo assim, esse modelo computacional permite: diferentes métodos de entrada, computação para múltiplas moléculas e a possibilidade de exibi-las e também salvar e compartilhar resultados por molécula individual ou por meio de gráficos globais intuitivos e interativos. Além disso, o programa está integrado ao espaço de trabalho *SwissDrugDesign* e, com isso, concede maior interoperabilidade a várias ferramentas de design de medicamentos auxiliado pelo computador desenvolvidas pelo *Molecular Modeling Group* do *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB), como: triagem virtual baseada em ligantes (*SwissSimilarity18*), previsão de biotarget

(*SwissTargetPrediction19*), docking molecular (*SwissDock20*), design bioisotérico (*SwissBioisostere21*) e mecânica molecular (*SwissParam22*).

Para que os resultados fossem disponibilizados, foi necessário que um arquivo referente à molécula de interesse fosse importado ou desenhado em um campo específico do programa. Com isso, gerou-se um painel contendo o nome da molécula e diferentes seções, reunindo diversos dados, como: estrutura química e radar de biodisponibilidade, propriedades físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade em água, farmacocinética, semelhança a fármacos e dados relacionados à química medicinal.

Para o presente projeto também foram utilizados os seguintes dados: violação de *Lipinski*, referente à seção de semelhança a fármacos, PAINS e acessibilidade sintética, referentes à seção de química medicinal.

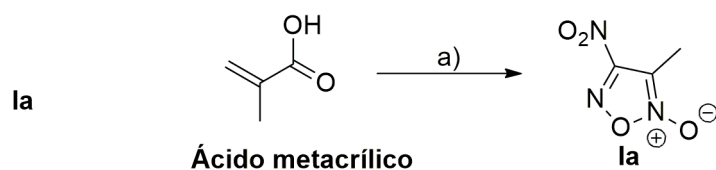
A seção “semelhança a fármacos” compreende à avaliação qualitativa da chance de uma molécula se tornar fármaco para uso via oral em relação a sua biodisponibilidade. No programa, essa subdivisão concede acesso a cinco filtros, dentre eles, a violação ao filtro *Lipinski*. Já a seção “química medicinal” tem como objetivo apoiar os pesquisadores e profissionais da área na busca e no desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico. Para isso, são disponibilizados quatro filtros que indicam possíveis fragmentos problemáticos, como o PAINS e a acessibilidade sintética.

3.3 Síntese

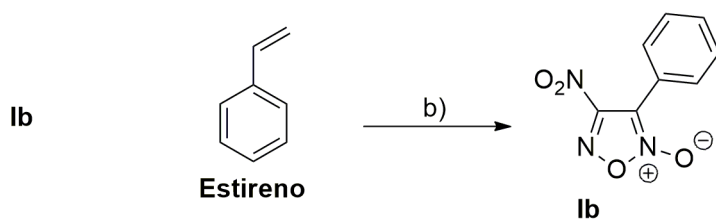
3.3.1 Metodologia

As sínteses das moléculas serão apresentadas em três etapas: (I) - síntese dos furoxanos (metil, fenil e bisaril sulfonil); (II) - síntese do intermediário P1, e (III) - síntese dos compostos finais. A Figura 12 apresenta os esquemas reacionais de obtenção dos furoxanos metilado (Ia), fenilado (Ib) e bisarilsulfonil (Ic).

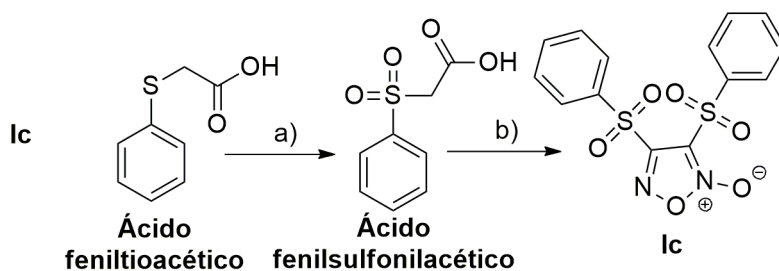
Figura 12 - Esquemas reacionais de obtenção dos furoxanos Ia, Ib e Ic



a) H_2SO_4 60%, CHCl_3 , 0°C ; NaNO_2 , 50°C , 40 min; t.a., *overnight*



b) NaNO_2 , CH_2Cl_2 , ácido acético glacial, 0°C ; HCl concentrado, t.a., *overnight*



a) peróxido de hidrogênio 30%, ácido acético glacial, t.a., 48h; b) ácido nítrico fumegante, ácido acético, 110°C , 1h;

Fonte: própria autora

Síntese do furoxano metilado

Em um balão de 250 mL, sob agitação e em banho de gelo, adicionou-se, aproximadamente, 10 mL de ácido metacrílico, 100 mL de clorofórmio como solvente e 35 mL de ácido sulfúrico 60%, aos poucos e devagar. Deixou-se a reação esfriar e em seguida, adicionou-se, aos poucos, 28 g de nitrito de sódio e deixou-se, em agitação, por 20 minutos. Colocou-se a reação em refluxo, a 50°C , por 40 minutos. Em seguida, retirou-se a temperatura e deixou-se sob agitação *overnight*, à temperatura ambiente. Fez-se a extração, em funil de separação, diluindo o meio reacional em água destilada e, posteriormente, lavou-se a fase aquosa com clorofórmio (3 x 30 mL) e a fase orgânica com água destilada (3 x 30 mL) e bicarbonato de sódio 2% (3 x 20 mL). Após a extração, fez-se filtração simples, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica. A purificação foi realizada

em Biotage®, com fluxo a 25 mL/min, utilizando-se 100% diclorometano (DCM) (v/v) como fase móvel.

Síntese do furoxano fenilado

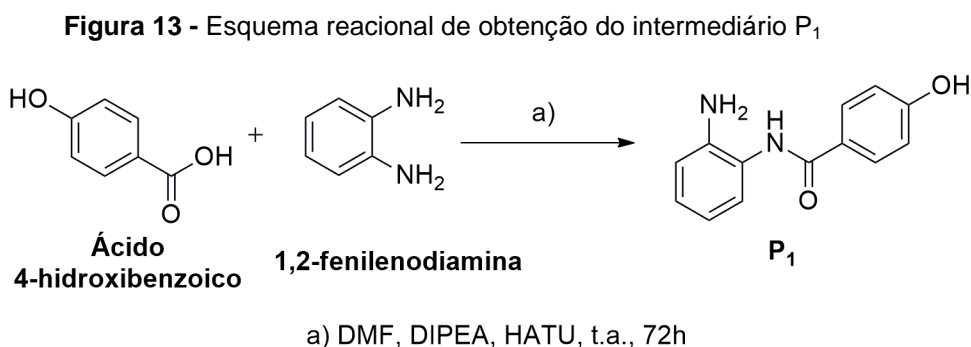
Em um balão de 250 mL, sob agitação, adicionou-se 2,2 mL de estireno, 100 mL de diclorometano (DCM) como solvente e 11 g de nitrito de sódio, aos poucos e devagar. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, em banho de gelo, 9,15 mL de ácido acético glacial e deixou-se, em agitação, por 20 minutos. Adicionou-se, gota a gota, 8 mL de HCl concentrado. Retirou-se do banho de gelo e deixou-se sob agitação *overnight*, à temperatura ambiente. Fez-se a extração, em funil de separação e lavou-se com água destilada (5 x 50 mL). Após a extração, fez-se filtração simples, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica. A purificação foi realizada em Biotage®, com fluxo a 20 mL/min, utilizando-se fase móvel na proporção de hexano:diclorometano 80:20 (v/v).

Síntese do bisarilsulfonil-furoxano

A síntese do bisarilsulfonil-furoxano ocorreu em duas etapas. A primeira, em um balão de 250 mL, adicionou-se 2,5 g de ácido feniltioacético e 10 mL de ácido acético glacial como solvente. A reação foi mantida em banho de gelo e adicionou-se, lentamente, 7,5 mL de peróxido de hidrogênio 30%. Em seguida, retirou-se do banho de gelo e deixou-se sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 48 horas. Fez-se o isolamento do produto formado, ácido fenilsulfonilacético, em funil de separação, adicionando-se ao meio reacional, 100 mL de solução saturada de cloreto de sódio e lavou-se a fase aquosa com acetato de etila (6 x 15 mL). Após a extração, fez-se filtração simples, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica. Ao final, reservou-se o ácido fenilsulfonil acético, obtendo-se um sólido cristalino com coloração branca, com faixa de fusão de 107° C - 110,1° C e rendimento de 93,33%. A segunda etapa consistiu na formação do bisarilsulfonil-furoxano. Sendo assim, em um balão de 250 mL, adicionou-se 1,60 g de ácido fenilsulfonil acético e 5 mL de ácido acético glacial. A reação foi mantida em banho de gelo e adicionou-se, lentamente, 2,5 mL de ácido nítrico fumegante 99,5%. Manteve-se em banho de gelo por 5 minutos e colocou-se em refluxo, à 110° C, por 1 hora. Em seguida, deixou-se resfriar e adicionou-se água destilada gelada ao meio reacional, havendo formação de

precipitado. Após, fez-se filtração à vácuo, lavando-se o precipitado com água destilada gelada.

A segunda etapa de síntese (II) refere-se à formação do produto intermediário P1 ilustrado na figura 13.



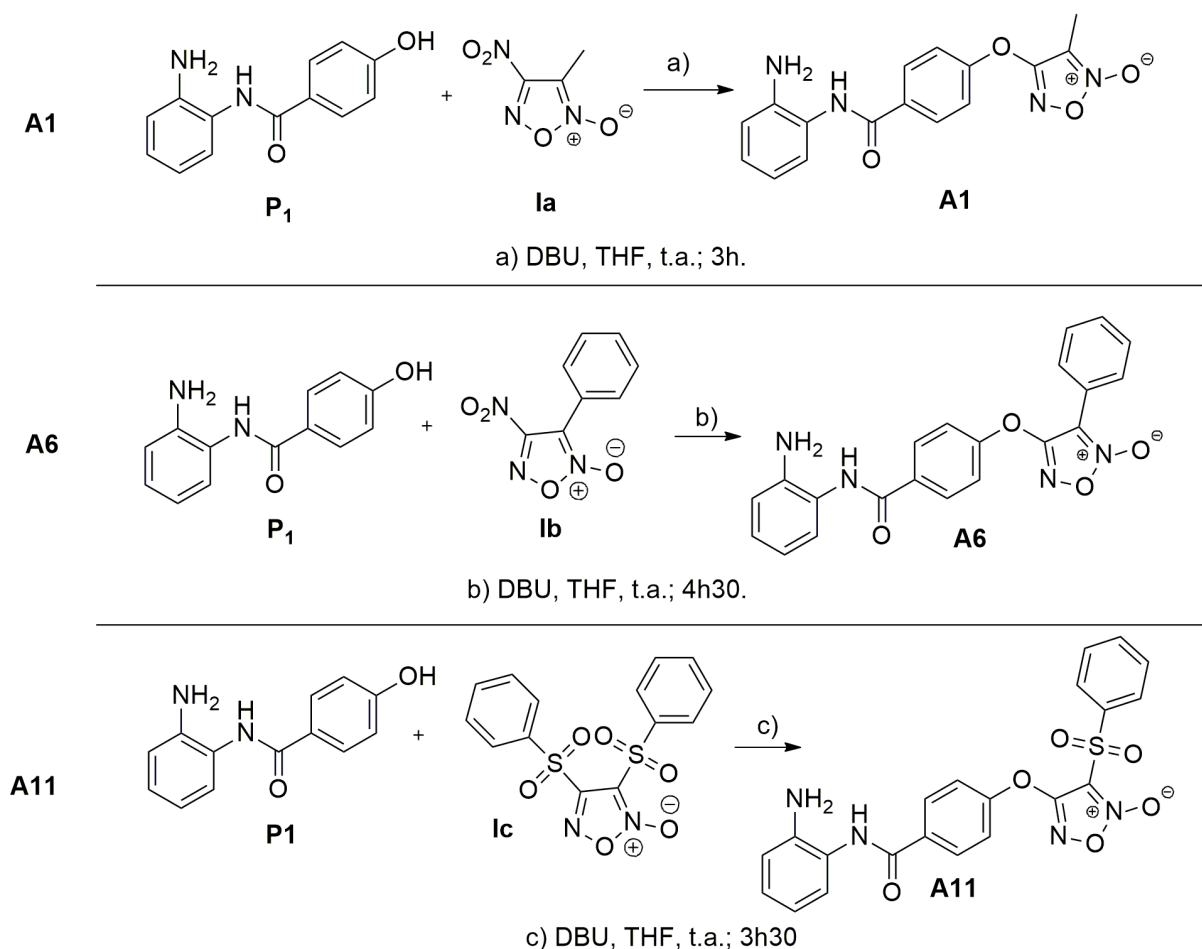
Fonte: própria autora

Síntese do intermediário N-(2-aminofenil)-4-hidróxibenzamida (P₁)

Em um balão de 100 mL adicionou-se 1 equivalente (0,001448 mol – 200 mg) do ácido 4-hidróxidobenzóico, solvente dimetilformamida (DMF) anidro em quantidade suficiente para solubilização do ácido e 1,2 equivalente (0,001738 mol – 303 µL) da base DIPEA. Deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 equivalente (0,002172 mol – 826 mg) do agente acoplante HATU e deixou-se em agitação por 30 minutos. Adicionou-se também 2 equivalentes (0,002896 mol – 313 mg) do 1,2-fenilenodiamina. Colocou-se a reação em atmosfera de nitrogênio, envolveu-se o balão com papel alumínio e deixou-se por 72 horas. Fez-se a extração, em funil de separação, diluindo o meio reacional em 100 mL de acetato de etila e, posteriormente, lavou-se com água (2 x 50 mL) e com solução saturada de NaCl (1 x 50 mL). Após a extração, fez-se filtração simples, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica. A purificação foi realizada utilizando-se uma coluna de vidro de 3,5 cm de diâmetro e 18 cm de altura, utilizando-se fase móvel na proporção acetato de etila:hexano 60:40 (v/v).

A terceira etapa (III) compreende a formação dos produtos finais A1, A6 e A11, ilustrado na figura 14.

Figura 14 - Esquemas reacionais de obtenção dos produtos finais A1, A6 e A11



Fonte: própria autora

Síntese do produto final 4-(4-((2-aminofenil)carbamoil)fenóxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (A1)

Em um balão de 50 mL adicionou-se 1 equivalente (0,00044 mol – 100 mg) do produto intermediário P1, solvente tetrahidrofurano (THF) anidro em quantidade suficiente para solubilização do produto P1 e 1,1 equivalente (0,00048 mol – 38,4 mg) de NaOH 50% (m/m) como base. Deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,2 equivalente (0,00053 mol – 77 mg) do furoxano metilado e deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 2 horas. Fez-se a extração, em funil de separação, diluindo o meio reacional em 80 mL de água destilada gelada e, posteriormente, lavou-se com acetato de etila (6 x 30 mL). Após a extração, fez-se filtração simples, adicionando-

se sulfato de sódio anidro à fase orgânica. A purificação foi realizada utilizando-se Biotage®, com fluxo a 25 mL/min e fase móvel na proporção hexano:acetato de etila 80:20 (v/v).

Síntese do produto final 4-(4-((2-aminofenil)carbamoil)fenóxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (A6)

Em um balão de 50 mL adicionou-se 1 equivalente (0,00022 mol – 50 mg) do produto intermediário P1, solvente tetrahidrofurano (THF) anidro em quantidade suficiente para solubilização do produto P1 e 1,5 equivalente (0,00033 mol – 49,30 µL) de DBU como base. Deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,2 equivalente (0,000264 mol – 55 mg) do furoxano fenilado e deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 4 horas e 30 minutos. Fez-se a extração, em funil de separação, diluindo o meio reacional em 80 mL de água destilada gelada e, posteriormente, lavou-se com acetato de etila (6 x 50 mL). Após a extração, fez-se filtração simples, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica. A purificação foi realizada utilizando-se uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro e 17 cm de altura, utilizando-se fase móvel na proporção acetato de etila:hexano 50:50 (v/v).

Síntese do produto final 4-(4-((2-aminofenil)carbamoil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (A11)

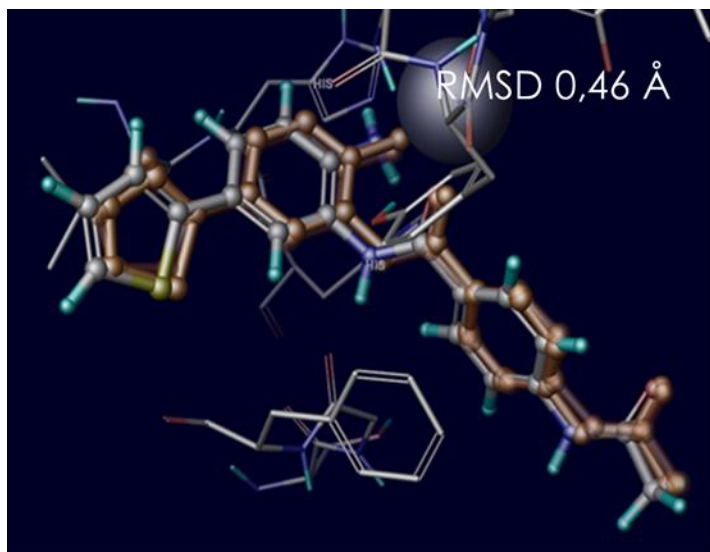
Em um balão de 125 mL adicionou-se 1 equivalente (0,00026 mol – 60 mg) do produto intermediário P1, solvente tetrahidrofurano (THF) anidro em quantidade suficiente para solubilização do produto P1 e 1,5 equivalente (0,00039 mol – 60 µL) de DBU como base. Deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,2 equivalente (0,00026 mol – 114 mg) do bisarilsulfonil-furoxano e deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 3 horas e 30 minutos. Fez-se a extração, em funil de separação, diluindo o meio reacional em 80 mL de água destilada gelada e, posteriormente, lavou-se com acetato de etila (4 x 50 mL). Após a extração, fez-se filtração simples, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica. A purificação foi realizada utilizando-se uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro e 19 cm de altura, utilizando-se fase móvel na proporção acetato de etila:hexano 60:40 (v/v).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelagem molecular

A Figura 15 apresenta a imagem da sobreposição da pose do ligante 20Y cristalizado e redocado, resultante do processo de validação do modelo utilizado através do método de redocagem e cálculo do RMSD. O valor de RMSD obtido da sobreposição foi de 0,46Å, estando então dentro do valor padronizado e possibilitando a validação.

Figura 15 - Sobreposição das poses do inibidor cristalizado e redocado



Fonte. Própria autora

Analisou-se as três séries (de A1 – A15), com diferentes substituições na posição *-para* em relação à amina do anel aromático (átomos de hidrogênio, flúor, tiofeno, fenil e fluorofenil), sendo as estruturas A1 a A5 pertencentes à série 1 (furoxano metilado), as estruturas A6 a A10 pertencentes à série 2 (furoxano fenilado) e as estruturas A11 a A15 pertencentes à série 3 (bisarilsulfonilfuroxano).

Os valores de DS foram analisados seguindo dois parâmetros: o primeiro, analisando-se a contribuição de cada grupo furoxano em relação ao DS e as interações com os aminoácidos do sítio ativo da HDAC-2 (Tabela 1); e o segundo em relação à contribuição dos diferentes substituintes na subunidade do inibidor de HDAC (Tabela 2).

Tabela 1 - Valores de DS em relação à contribuição dos furoxanos

Seção	Estruturas	Docking Score (DS)
SÉRIE 1 (furoxano metilado)	A1	- 10.812
	A2	- 10.587
	A3	- 12.654
	A4	- 12.473
	A5	- 12.945
SÉRIE 2 (furoxano fenilado)	A6	- 11.173
	A7	- 10.308
	A8	- 13.189
	A9	- 13.839
	A10	- 12.974
SÉRIE 3 (furoxano bisarilsulfonil)	A11	- 10.754
	A12	- 11.105
	A13	- 14.302
	A14	- 13.213
	A15	- 12.727
PROTÓTIPO	CI 994 (TIOFENO)	- 10.330
	CI 994	- 12.706

Fonte: própria autora

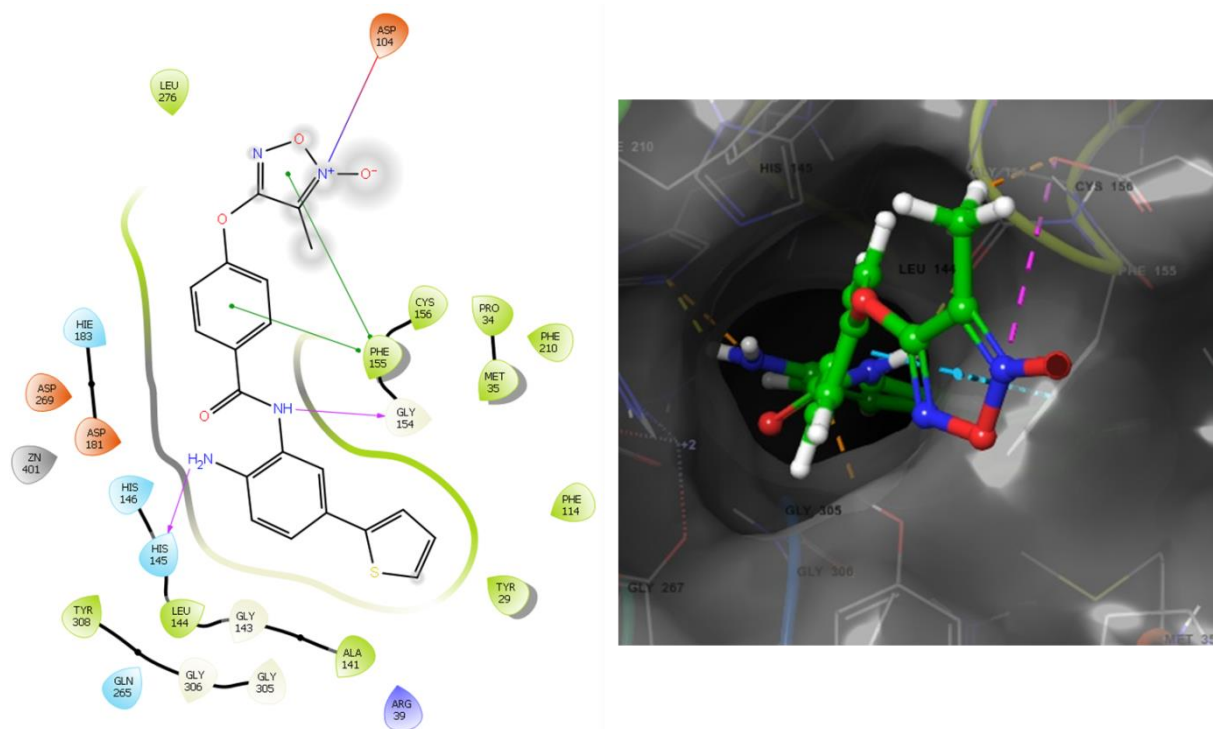
De acordo com os valores de DS apresentados, observa-se uma variação mínima dos resultados de cada série, porém é, de certo modo, significativa. Para efeito comparativo, selecionou-se uma molécula de cada série contendo o grupo tiofeno como substituinte (A3, A8 e A13).

Essas diferenças estão relacionadas aos substituintes do grupo furoxânico presente nas moléculas (metil, fenil e bisarilsulfonil) que, quando visualizadas interagindo com a enzima alvo, se encontram na parte externa ao sítio ativo,

podendo realizar interações adicionais com os resíduos de aminoácidos presentes nessa região.

O furoxano metilado (representado pela molécula A3) possui uma particularidade interessante. Na figura 16, observam-se duas interações: do anel aromático com o resíduo de Phe 155 e do N⁺ com o resíduo de Asp 104. No entanto, mesmo que o programa utilizado para modelagem molecular apresente essas interações, deve-se considerar que, para a liberação de NO, o anel furoxânico deve ser aberto e, sendo assim, por meio de seu mecanismo de ação não se pode garantir tais interações adicionais.

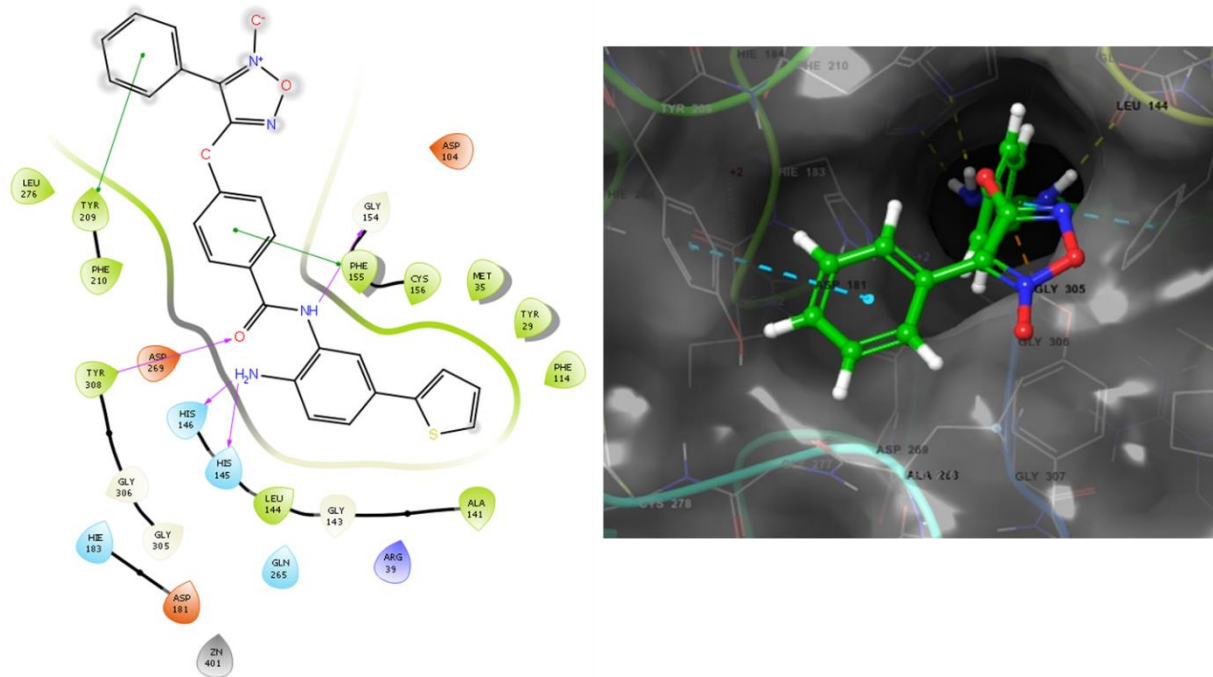
Figura 16 - Conformação e interações da molécula A3 no sítio ativo da enzima



Fonte: própria autora

O furoxano fenilado (representado pela molécula A8) possui interação do anel aromático com o resíduo de Tyr 209, por meio do empilhamento T, podendo ser visualizado na Figura 17. Devido as fato dessa interação se dar com o substituinte do furoxano, e não com o anel furoxano em si, é mais provável que essa interação ocorra *in vitro*.

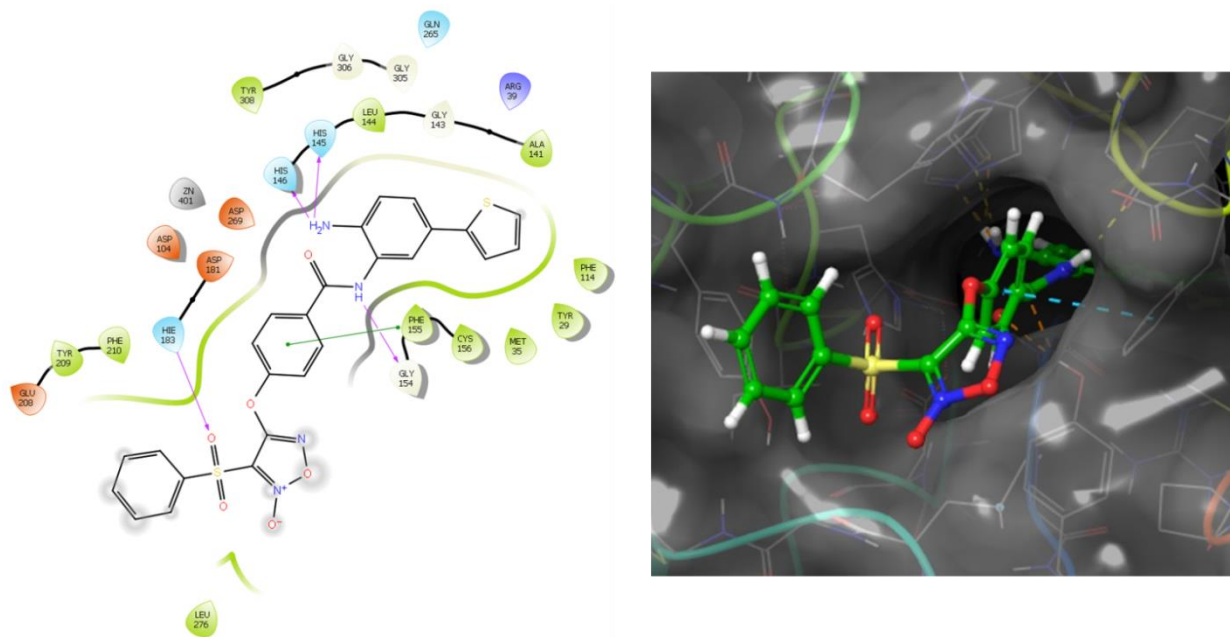
Figura 17 - Conformação e interações da molécula A8 no sítio ativo da enzima



Fonte: própria autora

Já o furoxano bisarilsulfonil (representado pela molécula A13) possui interação do oxigênio do grupo SO_2 com o resíduo de Hie 183, por meio da ligação de hidrogênio. Essa interação pode ser visualizada por meio da Figura 18.

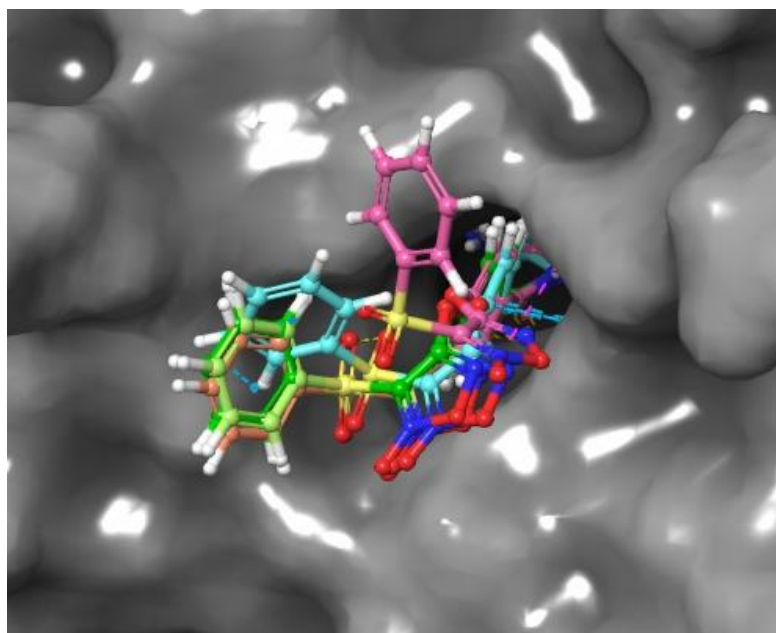
Figura 18 - Conformação e interações da molécula A13 no sítio ativo da enzima



Fonte: própria autora

A Figura 19 apresenta a sobreposição das três estruturas da série 3 com intuito de salientar que a ligação que conecta o substituinte bisarilsulfonil à molécula é flexível e pode rotacionar na região externa da enzima, sendo então capaz de interagir com diversos resíduos de aminoácidos. O mesmo ocorre com as estruturas da série 2.

Figura 19 - Sobreposição das moléculas da série 3 (bisarilsulfonil)



Fonte: própria autora

Tabela 2 - Valores de DS em relação aos substituintes da subunidade do inibidor de HDAC das moléculas

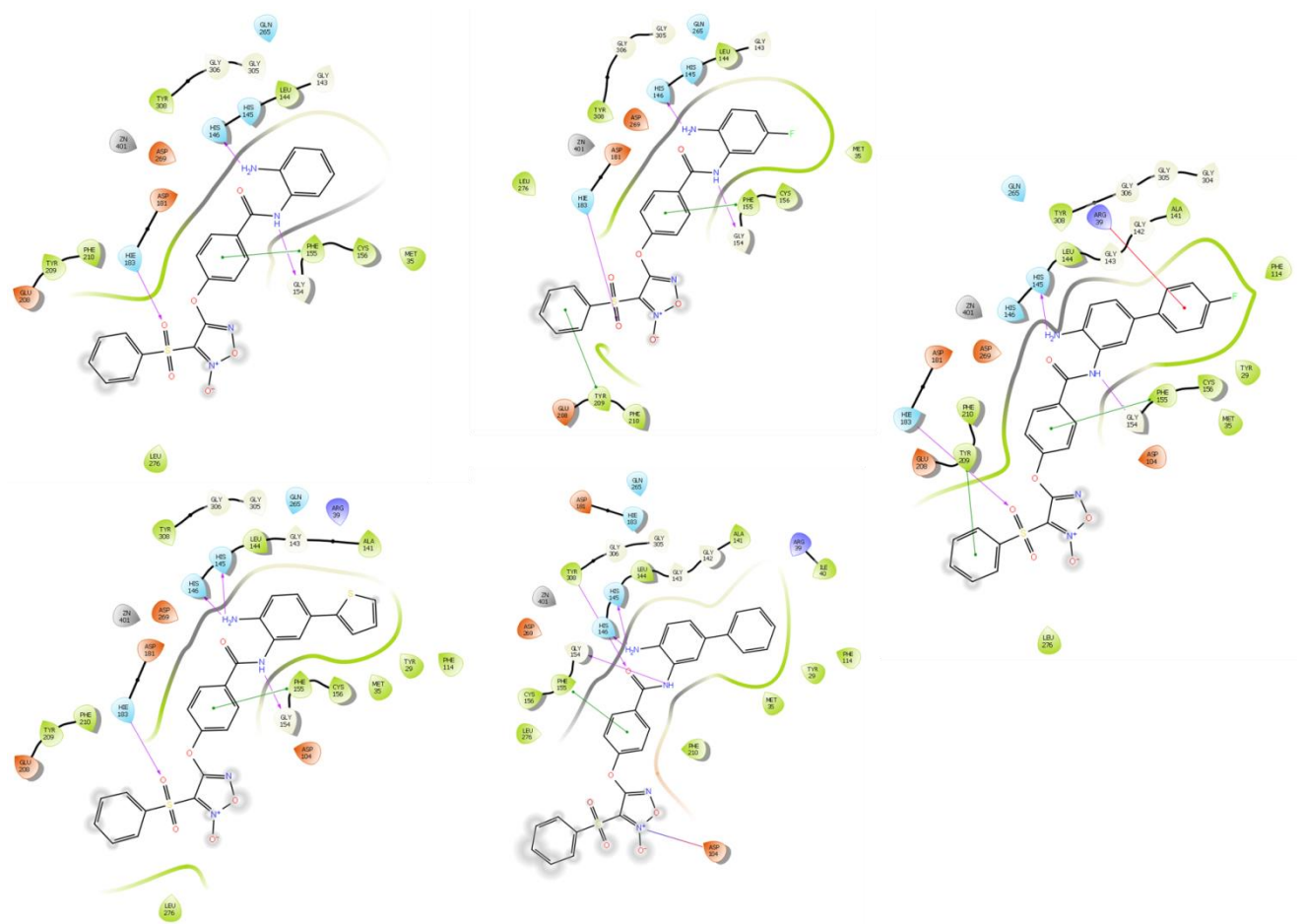
Substituinte	Estrutura	<i>Docking Score (DS)</i>
HIDROGÊNIO	A1	- 10.812
	A6	- 11.173
	A11	- 10.754
FLÚOR	A2	- 10.587
	A7	- 10.308
	A12	- 11.105

TIOFENO	A3	- 12.654
	A8	- 13.189
	A13	- 14.302
FENIL	A4	- 12.473
	A9	- 13.839
	A14	- 13.213
FLUROFENIL	A5	- 12.945
	A10	- 12.974
	A15	- 12.727
PROTÓTIPO	CI 994 (TIOFENO)	- 10.330
	CI 994	- 12.706

Fonte: própria autora

De acordo com os valores de DS apresentados, observa-se que, em cada grupo, separado por substituinte, os resultados são bastante semelhantes. A efeito comparativo selecionou-se uma molécula de cada grupo, contendo o furoxano bisarilsulfonil (A11, A12, A13, A14 e A15), para que fosse observado as interações que as moléculas realizam dentro do sítio da enzima. Conforme a Figura 20 mostra, todas as moléculas interagem com os mesmos resíduos de aminoácidos, sendo eles: Hys 145 (por ligação de hidrogênio), Hys 146 (por ligação de hidrogênio), Gly 154 (por ligação de hidrogênio) e Phe 155 (por empilhamento pi).

Figura 20 - Interação com os resíduos de aminoácidos das moléculas A11, A12, A13, A14 e A15

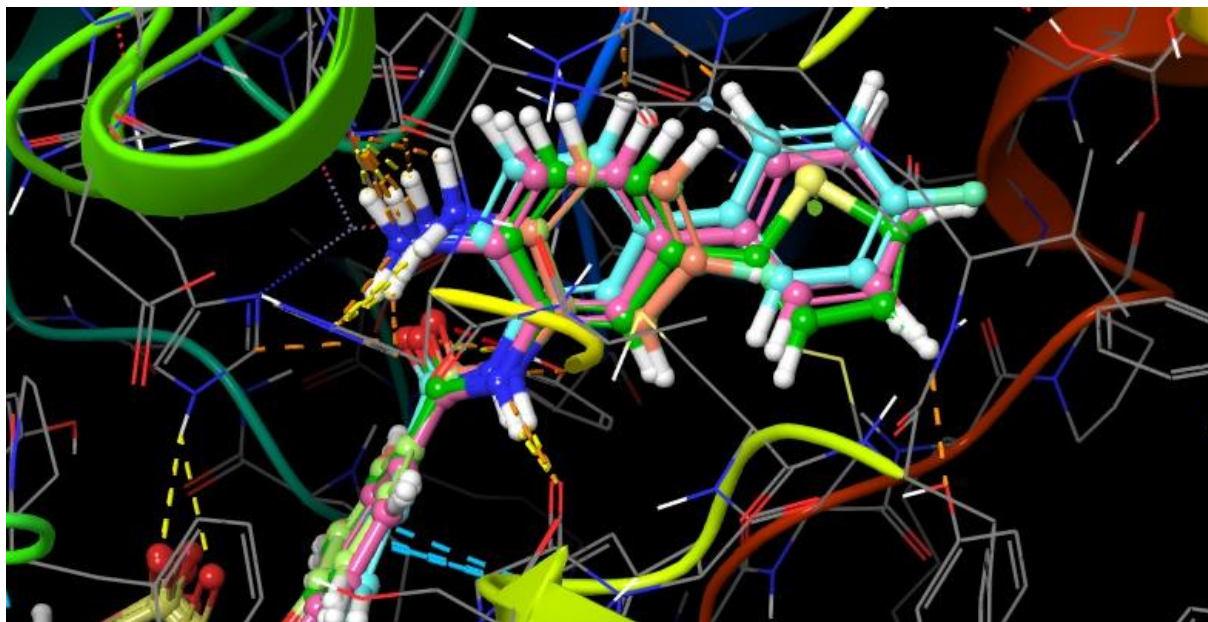


Fonte: própria autora

Além disso, é importante ressaltar que todas as moléculas são capazes de quelar o átomo de zinco pela subunidade amídica presente nas estruturas, resultando em inibição enzimática, que caracteriza um dos efeitos esperados e desejados.

Ademais às interações realizadas entre as estruturas e os resíduos de aminoácidos, o programa de modelagem molecular leva em consideração também a ocupação da molécula dentro do sítio ativo, seu encaixe e, conseqüentemente, sua conformação. Desse modo, os valores de DS também se relacionam aos diferentes substituintes da porção da molécula responsável pela inibição da HDAC. A Figura 21 mostra uma imagem 3D da sobreposição de todas as moléculas selecionadas (A11, A12, A13, A14 e A15) a fim de mostrar a ocupação da cavidade existente no sítio ativo pelos cinco substituintes.

Figura 21 - Imagem 3D da sobreposição das moléculas A11, A12, A13, A14 e A15



Fonte: própria autora

As HDACs de classe I (HDAC1, 2, 3 e 8) apresentam um bolsão de 14Å adicional quando comparadas as outras classes. O bolsão adicional das HDACs 3 e 8 apresentam resíduos de aminoácido que impedem o encaixe das subunidades adicionais que são inseridas na posição *-para* em relação à amina das estruturas químicas apresentadas até o momento. Sendo assim, ao adicionar-se substituintes nessa posição, é possível conferir seletividade na inibição das HDAC 1 e 2. Os dados de DS apresentados na Tabela 2, mostram que as moléculas que apresentam os substituintes tiofeno, fenil e 4-fluorofenil resultaram em DS mais promissoras que os que contém átomo de hidrogênio ou flúor, o que pode ser explicado pelo encaixe desses substituintes no bolsão das enzimas. Ou seja, espera-se que essas moléculas apresentem um melhor perfil de inibição e também seletividade de inibição contra HDAC 1 e 2, quando comparadas à 3 e 8.

4.2 Predição farmacocinética

As moléculas foram avaliadas quanto a adequação à regra dos 5 de *Lipinski*, solubilidade em água, LogP, absorção intestinal e metabolismo pelas enzimas substrato (S) CYP2D6 e CYP3A4 e pelas enzimas inibidoras (I) CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4, sendo os dados coletados apresentados na Tabela 3.

Os dados coletados no *website* SwissADME em relação a violação de *Lipinski*, PAINS e acessibilidade sintética, estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 3 - Parâmetros da regra dos 5 de *Lipinski* e predição das propriedades farmacocinéticas das estruturas de 1 a 15

Estrutura	Massa molar (g/mol)	LogP calculado	Solubilidade em água (log mol/L)	Absorção intestinal (% absorvida)	Nº de aceptores de ligação de hidrogênio	Nº de doadores de ligação de hidrogênio	Metabolismo	Toxicidade AMES (sim/não)
A1	326.313	2.2432	-3.059	79.753	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – sim CYP2C19 (I) – não CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – não	Não
A2	344.302	2.3823	-3.261	83.085	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – sim CYP2C19 (I) – não CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – não	Sim
A3	408.439	3.9717	-4.079	87.534	7	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – sim CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – sim CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Sim
A4	402.410	3.9102	-4,140	87.144	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim	Sim

							CYP1A2 (I) – sim CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	
A5	420.400	4.0493	-4.105	87.698	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – sim CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – sim CYP2D6 (I) – sim CYP3A4 (I) – não	Sim
A6	388.383	3.6018	-4.175	87.400	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – sim CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – sim CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Não
A7	406.373	3.7409	-4.162	90.732	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – sim CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – sim CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Não
A8	470.510	5.3303	-4.148	95.180	7	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não	Não

							CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – sim CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	
A9	464.481	5.2688	-4.072	94.790	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – sim CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Não
A10	482.471	5.4079	-3.707	95.344	6	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não CYP2C19 (I) – sim CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – não	Não
A11	452.448	2.7676	-4.308	78.749	8	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não CYP2C19 (I) – não CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Não
A12	470.438	2.9067	-4.218	82.081	8	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não	Não

							CYP2C19 (I) – não CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	
A13	534.575	4.4961	-3.877	86.530	9	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não CYP2C19 (I) – não CYP2C9 (I) – sim CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Não
A14	528.546	4.4346	-3.779	86.140	8	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não CYP2C19 (I) – não CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Não
A15	546.536	4.5737	-3.491	86.694	8	2	CYP2D6 (S) – não CYP3A4 (S) – sim CYP1A2 (I) – não CYP2C19 (I) – não CYP2C9 (I) – não CYP2D6 (I) – não CYP3A4 (I) – sim	Não

Fonte: própria autora

Para a análise dos resultados obtidos na tabela 3, selecionaram-se as estruturas A1, A6 e A11, nas quais foram, posteriormente, sintetizadas. A molécula A1 apresentou um LogP de, aproximadamente, 2.24 e solubilidade em água de – 3.059 log mol/L, enquanto que a molécula A6 apresentou um LogP maior de, aproximadamente, 3.60 e solubilidade de – 4.175 log mol/L. Essa diferença impacta no valor de absorção intestinal, no qual, para A1, a porcentagem absorvida é de, aproximadamente 79,75% e, para A6, é de 87,40%.

Em relação à molécula A11, o logP se assemelha ao da molécula A1 cujo valor é 2.76. No entanto, a solubilidade em água é mais próxima à da molécula A6, possuindo um valor igual a – 4.308 log mol/L. Contudo, mesmo com um valor de logP e solubilidade em água maior que a molécula A1, a molécula A11 apresenta uma porcentagem de absorção de, aproximadamente, 78,75%, um valor menor que as outras duas moléculas, porém bem próxima ao valor da molécula A1.

Outro aspecto importante é em relação à participação das enzimas da CYP450 no metabolismo dessas moléculas. As enzimas participantes do metabolismo de A1 são: CYP3A4 (S) e CYP1A2 (I); de A6 são: CYP3A4 (S), CYP1A2 (I), CYP2C19 (I), CYP2C9 (I) e CYP3A4 (I); e de A11: CYP3A4 (S) e CYP3A4 (I). Observa-se, com isso, que a molécula, cuja participação das enzimas é maior, é a A6.

Tabela 4 - Dados de SwissADME das estruturas de 1 a 15

Estrutura	Lipinski (sim/não); violação	PAINS	Acessibilidade sintética
A1	sim; 0	0	3.11
A2	sim; 0	0	3.11
A3	sim; 0	0	3.47
A4	sim; 0	0	3.50
A5	sim; 0	0	3.53
A6	sim; 0	0	3.54
A7	sim; 0	0	3.53
A8	sim; 0	0	3.86
A9	sim; 1 (logP > 5)	0	3.93
A10	sim; 1 (logP > 5)	0	3.95
A11	sim; 0	0	3.74
A12	sim; 0	0	3.73
A13	sim; 1 (MM > 500)	0	4.05
A14	sim; 1 (MM > 500)	0	4.12
A15	sim; 2 (MM > 500; logP > 5)	0	4.13

Fonte: própria autora

A partir dos dados apresentados na Tabela 4, é possível visualizar que todas as 15 moléculas obedecem a regra dos 5 de *Lipinski*, a qual preza por 4 quesitos: massa molecular menor do que 500 daltons, LogP menor do que 5, número de grupamentos doadores de ligação de hidrogênio menor do que 5 e número de aceptores de ligação de hidrogênio menor do que 10. Ainda que as moléculas A9, A10 e A15 obedeçam à regra de *Lipinski*, possuem uma violação referente ao logP, por apresentá-lo maior que 5. O mesmo acontece para as moléculas 13, 14 e 15, em relação a massa molar ser maior que 500 daltons. No entanto, esses valores não devem ser significativamente maiores que o padrão, caso contrário, o programa não incluiria esses compostos na regra de *Lipinski*.

Nenhuma das estruturas avaliadas classifica-se como PAIN (*Pan-Assay Interference Compound*), os quais se caracterizam por compostos que apresentam resultados falso-positivos em ensaios biológicos, afetando a confiabilidade e continuidade dos estudos. O estudo de acessibilidade sintética dos 15 compostos são bastante semelhantes, variando de 3.11 a 4.13. Sendo assim, para a síntese dos compostos, foram selecionadas as moléculas com menor valor de acessibilidade sintética, ou seja, com maior facilidade de síntese, sendo uma de cada série (A1, A6 e A11), cujos valores são, respectivamente: 3.11, 3.54 e 3.74.

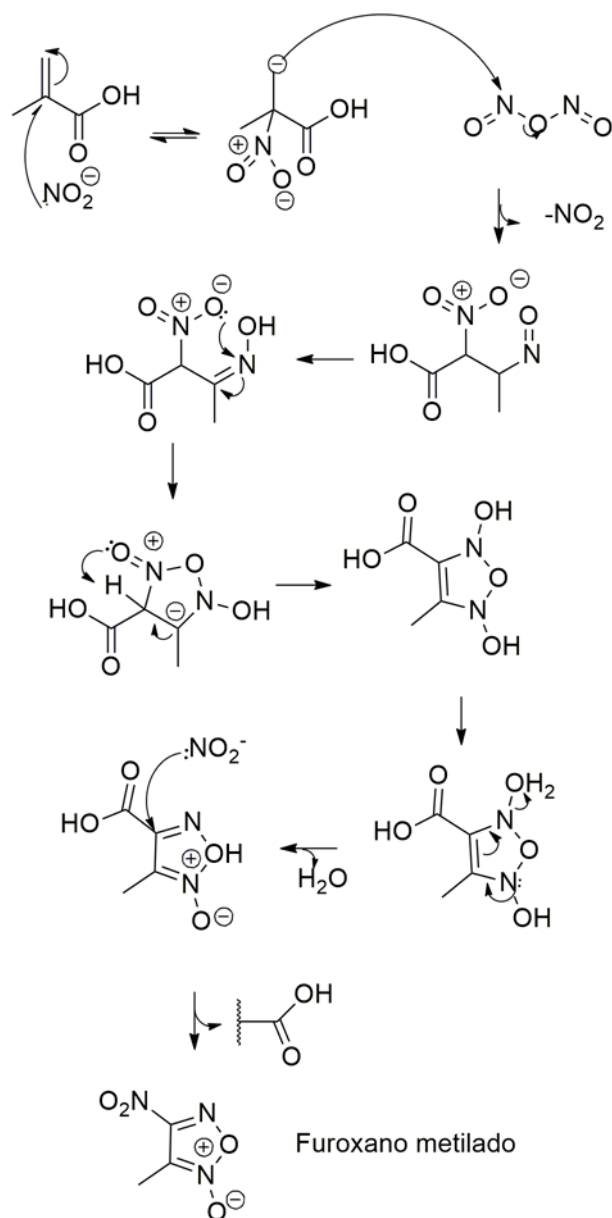
4.3 Síntese

4.3.1 Síntese dos furoxanos

As sínteses dos furoxanos metilado e fenilado ocorreram por meio da reação de alcenos com o nitrito de sódio em meio ácido.

4.3.1.1 Síntese do furoxano metilado (Ia)

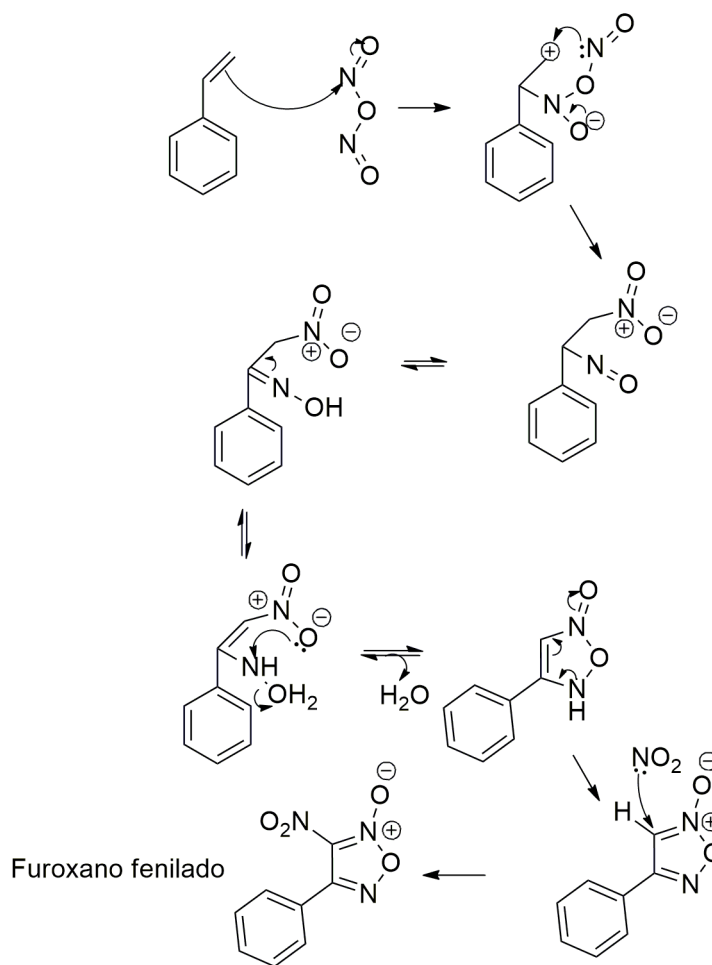
A Figura 22 é um esquema do mecanismo de formação do furoxano metilado, no qual se utilizou o ácido metacrílico como reagente de partida, nitrito de sódio e ácido sulfúrico, tornando o meio reacional mais ácido para permitir que a reação aconteça.

Figura 22 - Mecanismo de formação do furoxano metilado (Ia)

Fonte: própria autora

4.3.1.2 Síntese do furoxano fenilado (Ib)

A Figura 23 mostra o mecanismo de formação do furoxano fenilado, no qual se utilizou, como reagente de partida, o estireno, além do nitrito de sódio, do ácido acético glacial e também do ácido clorídrico. O núcleo furoxânico é formado do mesmo modo que o furoxano metilado (Ia), demonstrado na Figura 22.

Figura 23 - Mecanismo de formação do furoxano fenilado (Ib)

Fonte: própria autora

É importante ressaltar que o N_2O_3 , presente nas reações descritas nas Figuras 22 e 23, é formado pela reação do nitrito de sódio (NaNO_2) com o ácido utilizado em cada síntese. Esse composto contribui para a formação do anel furoxânico por meio da reação com o ácido metacrílico e o estireno para a síntese, respectivamente, dos furoxanos metilado e fenilado.

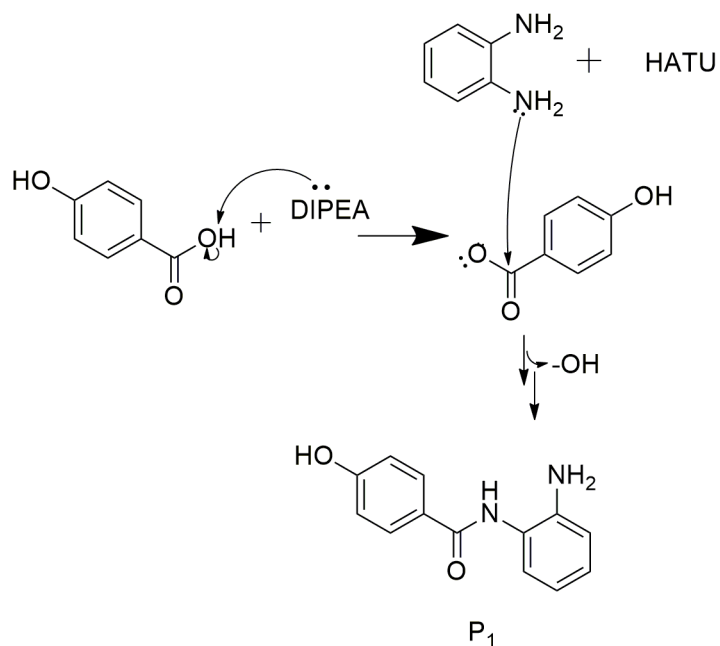
4.3.1.3 Síntese do bisarilsulfonilfuroxano (Ic)

A síntese do furoxano bisarilsulfonil foi realizada por meio de duas etapas: a primeira, uma reação de oxidação do sulfeto (ácido feniltioacético), resultando em uma sulfona (ácido fenilsulfonilacético), utilizando-se peróxido de hidrogênio 30%. Neste caso, um oxigênio é adicionado à estrutura, mais especificamente, ao enxofre. A

segunda consistiu em uma reação entre a sulfona formada com ácido nítrico fumegante para a formação do núcleo bisarilsulfonilfuroxano.

4.3.2 Síntese do intermediário P1

A formação do produto intermediário P1 aconteceu por meio da reação de um ácido com uma diamina. A Figura 24 demonstra a reação, no qual foi necessário, primeiramente, que a base utilizada, no caso, o DIPEA, desprotonasse o grupamento hidroxila da função orgânica ácido do reagente ácido 4-hidroxibenzoico. Além disso, para que a diamina utilizada (1,2-fenilenodiamina) fosse mais reativa, foi necessário formar um complexo com o agente acoplante utilizado, o HATU. Com isso, o nitrogênio da diamina foi capaz de atacar a carbonila do ácido, resultando na saída do grupamento hidroxila e também na formação do produto intermediário P1.

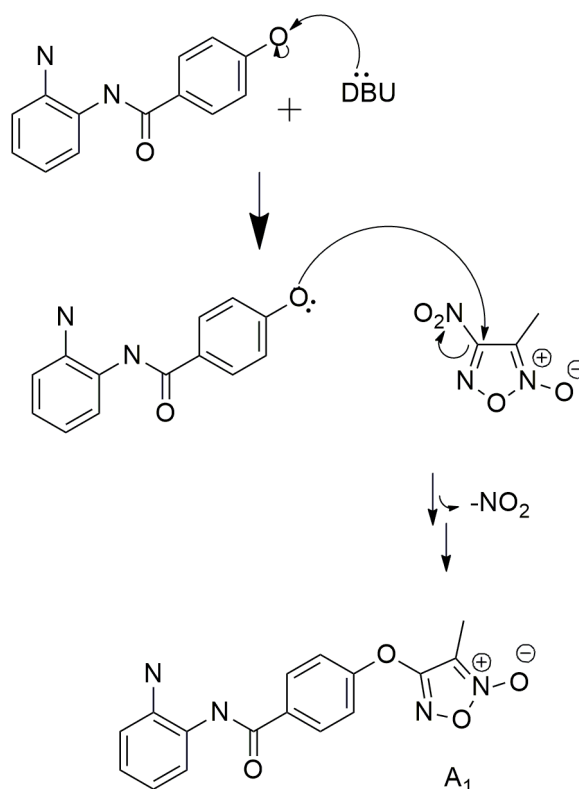
Figura 24 - Mecanismo de formação do produto intermediário P1

Fonte: própria autora

4.3.3 Síntese dos produtos finais A1, A6 e A11

O mecanismo de formação dos três produtos finais A1, A6 e A11 é o mesmo, alterando-se apenas o furoxano e, em alguns casos, a base utilizada. A Figura 25 mostra o mecanismo de formação desses produtos representado pelo composto A1. Primeiramente, ocorreu a desprotonação do grupamento hidroxila de P1, fazendo com que o oxigênio tivesse elétrons disponíveis para atuar como nucleófilo, atacando o carbono do furoxano. Com isso, resultou-se formação de uma ligação éter entre o produto P1 e o anel furoxânico, obtendo-se o produto final.

Figura 25 - Formação do produto final A1



Fonte: própria autora

A Tabela 5, com o propósito de a fim de reunir as informações obtidas após a síntese, apresenta os resultados físico-químicos – estado físico do produto, coloração, faixa de fusão e rendimento – de todos os compostos sintetizados (furoxanos metilado, fenilado e bisarilsulfonil; P1; A1, A6 e A11)

Tabela 5 - Resultados físico-químicos de todos os compostos sintetizados

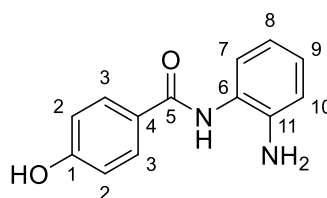
Nome do composto	Resultados físico-químicos			
	Estado físico	Coloração	Faixa de fusão (° C)	Rendimento (%)
Furoxano metilado	Sólido	Esverdeado	50,2 °C – 54,4 °C	9,03%
Furoxano fenilado	Sólido	Verde claro	40,9 °C – 42,6° C	15,62%
Bisarilsulfonilfuroxano	Sólido	Branco	136,4 °C – 149,9° C	28,75%
P1	Sólido	Bege	165 °C – 171 °C	59,60%
A1	Sólido	Branco	149 °C – 155 °C	6,36%
A6	Sólido	Branca	186 °C – 190 °C	29,54%
A11	Sólido	Branca	165 °C – 174 °C	23,85%

Fonte: própria autora

4.3.4 Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia de Infravermelho

A Ressonância Magnética Nuclear e a Espectroscopia de Infravermelho são instrumentos utilizados para caracterização de moléculas. Para este estudo, os compostos que foram devidamente caracterizados são: P1, A1, A6 e A11. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e os de Infravermelho serão apresentados na seção Apêndice. A interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de Infravermelho (IV) de ^1H e ^{13}C foi realizada baseando-se nas referências: SILVERSTEIN et al., 2006 e PAVIA et al., 2001.

Tabela 6 - Dados de RMN do produto intermediário P1



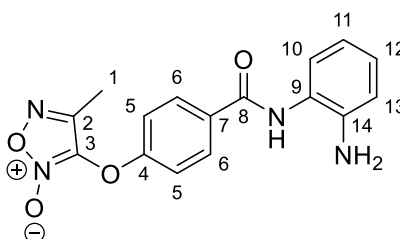
	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	-	160.36
2	7.85 (d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H)	114.81
3	6.84 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H)	129.77
4	-	125.17
5	-	164.91
6	-	123.78
7	7.14 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H)	126.22
8	6.59 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H)	116.32
9	6.95 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H)	126.60
10	6.77 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H)	116.18
11	-	143.10
NH _{amida}	9.44 (s, 1H)	-

NH ₂	4.84 (s, 2H)	-
OH	10.04 (s, 1H)	-

Fonte: própria autora

Analisando-se o espectro de ¹H RMN é possível visualizar dois dupletos em 7.85 e 6.84 ppm, ambos integrando para dois hidrogênios e com constantes de acoplamento no valor de 8.4Hz (orto), representando os hidrogênios H₂ e H₃. Os hidrogênios H₇-H₁₀ são visualizados como dois dupletos e dois tripletos em 7.14, 6.59, 6.95 e 6.77 respectivamente. Os hidrogênios H₇ e H₁₀ apresentam-se como dupletos por acoplarem apenas com um hidrogênio vizinho, sendo eles os hidrogênios H₈ e H₉, respectivamente, enquanto os hidrogênios H₈ e H₉ apresentam-se como tripletos por acoplarem com dois hidrogênios vizinhos (H₇ e H₉; H₈ e H₁₀, respectivamente). O grupamento hidroxila (OH), apresenta-se como um simpleto em 10.04 ppm. Os hidrogênios da amida e da amina apresentam-se como simpletos em 9.44 ppm (1H) e 4.84 ppm (2H), respectivamente.

Tabela 7 - Dados de RMN do produto final A1



	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	2.14 (s, 3H)	7.02
2	-	162.81
3	-	107.68
4	-	154.92
5	7.55 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H)	119.22
6	8.10 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H)	130.02
7	-	132.41
8	-	164.35

9	-	123.06
10	7.16 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H)	126.67
11	6.60 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 1H)	116.21
12	6.98 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H)	126.88
13	6.78 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H)	116.06
14	-	143.31
NH _{amida}	9.73 (s, 1H)	-
NH ₂	4.96 (s, 2H)	-

Fonte: própria autora

Analisando-se o espectro de ¹H RMN é possível visualizar dois dupletos em 7.55 e 8.10 ppm, ambos integrando para dois hidrogênios e com constantes de acoplamento no valor de 8.5Hz (orto), representando os hidrogênios H₅ e H₆. Os hidrogênios H₁₀-H₁₃ são visualizados como dois dupletos e dois tripletos em 7.16, 6.60, 6.98 e 6.78, respectivamente. Os hidrogênios H₁₀ e H₁₃ apresentam-se como dupletos por acoplarem apenas com um hidrogênio vizinho, sendo eles os hidrogênios H₁₁ e H₁₂, respectivamente, enquanto os hidrogênios H₁₁ e H₁₂ apresentam-se como tripletos por acoplarem com dois hidrogênios vizinhos (H₁₀ e H₁₂; H₁₁ e H₁₃, respectivamente). O grupamento metila (CH₃), apresenta-se como um simpleto em 2.14 ppm integrando para três hidrogênios, enquanto os hidrogênios da amida e da amina apresentam-se como simpletos em 9.73 ppm (1H) e 4.96 ppm (2H), respectivamente. Comparando-se com o espectro de ¹H RMN do intermediário P1, é possível perceber a ausência do simpleto em 10.04 ppm, o qual representava o grupamento hidroxila, o que se sugere a formação da ligação éter e do composto proposto.

Tabela 8 - Dados de IV do produto final A1

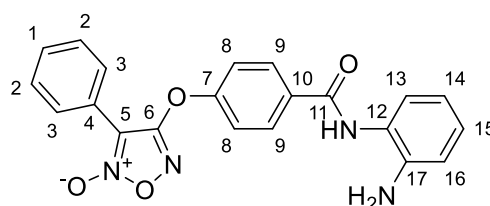
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)
N-H _{amida}	3296
C-H _{aromático}	2924
C=O _{amida}	1635

N-O _{furoxano}	1456
CH ₃	2852/1382
C-N _{aromático}	1280
C-O _{éter}	1168
NH ₂	1608

Fonte: própria autora

O espectro de infravermelho apresenta as bandas dos grupos funcionais presentes na estrutura do composto A1. É possível visualizar o estiramento em 3296 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} representando o estiramento N-H e C=O do grupamento amida. Além disso, as bandas em 1456 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} e 1382 cm^{-1} representam os estiramentos do grupamento furoxano, sendo eles o estiramento N-O e CH₃ e, por fim, visualiza-se o estiramento em 1168 cm^{-1} característico de éter, sugerindo a formação do composto proposto.

Tabela 9 - Dados de RMN do produto final A6



	δ_{H} (ppm)
1	7.69-7.57 (m, 5H)
2	8.15-8.04 (m, 4H)
3	7.69-7.57 (m, 5H)
4	-
5	-
6	-
7	-
8	8.15-8.04 (m, 4H)
9	7.69-7.57 (m, 5H)

10	-
11	-
12	-
13	7.16 (d, J=6.9Hz, 1H)
14	6.63-6.56 (m, 1H)
15	6.98 (t, J=8.0, 1.5Hz, 1H)
16	6.78 (dd, J=8.0, 1.3Hz, 1H)
NH _{amida}	9.74 (s, 1H)
NH ₂	4.94 (s, 2H)

Fonte: própria autora

Analisando-se o espectro de ¹H RMN, observa-se que, alguns hidrogênios, por mais que estejam distantes fisicamente, sofrem a mesma influência dos grupos funcionais que estão próximos deles e, por isso, possuem o sinal na mesma região do espectro. Isso acontece com os hidrogênios H₁, H₃ e H₉ em 7.69-7.57 ppm, integrando para 5H e com os hidrogênios H₂ e H₈, em 8.15-8.04 ppm, integrando para 4H . Os hidrogênios H₁₃-H₁₆ são visualizados como: um duplete em 7.16 ppm; um multiplete em 6.63-6.65 ppm; um triplete em 6.98 ppm e um duplo duplete em 6.78 ppm, respectivamente. Os hidrogênios H₁₃ e H₁₆ apresentam-se como dupletos por acoplarem apenas com um hidrogênio vizinho, sendo eles os hidrogênios H₁₄ e H₁₅, respectivamente. O hidrogênio H₁₄ acopla-se com dois hidrogênios vizinhos, o H₁₃ e H₁₅, porém, no espectro apresenta-se como um multiplete. Já o hidrogênio H₁₅ também acopla-se com dois hidrogênios vizinhos, o H₁₄ e H₁₆ , e, no espectro apresenta-se como um triplete. Os hidrogênios da amida e da amina apresentam-se como simpletos em 9.74 ppm (1H) e 4.94 ppm (2H), respectivamente.

Tabela 10 - Dados de IV do produto final A6

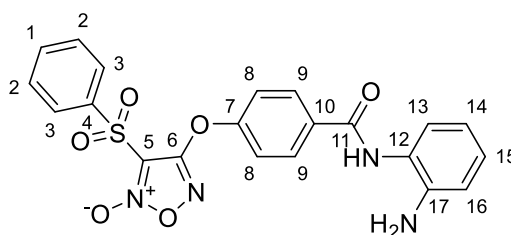
Grupo funcional	Número de onda (cm⁻¹)
N-H _{amida}	3267
C-H _{aromático}	3040
C=O _{amida}	1635

N-O _{furoxano}	1460
C-N _{aromático}	1203
C-O _{éter}	1200
NH ₂	1608

Fonte: própria autora

O espectro de infravermelho apresenta as bandas dos grupos funcionais presentes na estrutura do composto A6. É possível visualizar o estiramento em 3267 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} representando o estiramento N-H e C=O do grupamento amida. Além disso, a banda em 1460 cm^{-1} representa o estiramento do grupamento furoxano, sendo ele o estiramento N-O e, por fim, visualiza-se o estiramento em 1200 cm^{-1} característico de éter, sugerindo a formação do composto proposto.

Tabela 11 - Dados de RMN do produto final A11



	δ_{H} (ppm)
1	7.97-7.89 (m, 1H)
2	8.13-8.02 (m, 4H)
3	7.84-7.73 (m, 2H)
4	-
5	-
6	-
7	-
8	8.13-8.02 (m, 4H)
9	7.57 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H)
10	-
11	-

12	-
13	7.16 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H)
14	6.60 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H)
15	7.02-6.94 (m, 1H)
16	6.78 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H)
NH _{amida}	9.75 (s, 1H)
NH ₂	4.75 (s, 2H)

Fonte: própria autora

Analisando-se o espectro de ^1H RMN, observa-se que, alguns hidrogênios, por mais que estejam distantes fisicamente, sofrem a mesma influência dos grupos funcionais que estão próximos deles e, por isso, possuem o sinal na mesma região do espectro. Isso acontece com os hidrogênios H₂ e H₈, em 8.13-8.02 ppm, integrando para 4H. Contudo, comparando-se com o espectro de A6, nota-se uma mudança de valores para os hidrogênios H₁, H₃ e H₉, nos quais se apresentam na região de 7.97-7.89 ppm, 7.84-7.73 ppm e 7.57, respectivamente. Uma possível explicação para esse fato é que esses hidrogênios sentiram mais a influência do novo grupo (bisarilsulfonil), sendo este um grupo mais retirador de elétrons, mais eletronegativo, deslocando, assim, os sinais mais para a região esquerda do espectro. Os hidrogênios H₁₃-H₁₆ são visualizados como: um duplete em 7.16 ppm; um triplete em 6.60 ppm; um multiplete em 7.02-6.94 ppm e um duplete em 6.78 ppm, respectivamente. Os hidrogênios H₁₃ e H₁₆ apresentam-se como dupletos por acoplarem apenas com um hidrogênio vizinho, sendo eles os hidrogênios H₁₄ e H₁₅, respectivamente. O hidrogênio H₁₄ acopla-se com dois hidrogênios vizinhos, o H₁₃ e H₁₅, porém, no espectro apresenta-se como um triplete. Já o hidrogênio H₁₅ também acopla-se com dois hidrogênios vizinhos, o H₁₄ e H₁₆, e, no espectro apresenta-se como um multiplete. Os hidrogênios da amida e da amina apresentam-se como simpletos em 9.75 ppm (1H) e 4.75 ppm (2H), respectivamente.

Tabela 12 - Dados de IV do produto final A11

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)
N-H _{amida}	3290

C-H _{aromático}	2924
C=O _{amida}	1635
N-O _{furoxano}	1450
S=O _{furoxano}	1040
C-N _{aromático}	1280
C-O _{éter}	1165
NH ₂	1541

Fonte: própria autora

O espectro de infravermelho apresenta as bandas dos grupos funcionais presentes na estrutura do composto A11. É possível visualizar o estiramento em 3290 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} representando o estiramento N-H e C=O do grupamento amida. Além disso, as bandas em 1450 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} representam os estiramentos do grupamento furoxano, sendo eles o estiramento N-O e S=O e, por fim, visualiza-se o estiramento em 1165 cm^{-1} característico de éter, sugerindo a formação do composto proposto.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que, pela modelagem molecular, todos os compostos apresentaram um padrão de interação com os resíduos de aminoácido do sitio ativo da HDAC-2, sendo eles: His145, His146, Gly154 e Phe155 e obtiveram resultados de DS promissores, que variaram entre -14.302 e -10.308. Além disso, é possível inferir que, pela síntese, houve a formação de um produto intermediário (P1), caracterizado por RMN de 600MHz e obtido como um sólido de coloração bege, com faixa de fusão de 165° C - 171° C e rendimento de 59,60%. Além disso, houve também a formação de três produtos finais: A1, caracterizado por RMN de 600 MHz, obtido como um sólido de coloração branca, com faixa de fusão de 149° C - 155° C e rendimento de 6,36%; A6, caracterizado por RMN de 300MHz, obtido como um sólido de coloração branca, com faixa de fusão de 186° C - 190° C e rendimento de 29,54%; e A11, caracterizado por RMN de

300MHz, obtido como um sólido de coloração branca, com faixa de fusão de 165° C - 174° C e rendimento de 23,85%.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aslan M, Freeman BA. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. **Immunol Res** ;26(1–3):107–118, 2002.

Aslan M, Thornley-Brown D, Freeman BA. Reactive species in sickle cell disease. **Ann NY Acad Sci**, 899:375–391, 2000.

BAEL, J.; WALTERS, M. A. Chemical con artists foil drug Discovery. **Nature**, v. 513, p. 481-483, setembro 2014.

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.

BRADNER, J. E. et al. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, p. 12617–12622, 2010.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Falciformes (DF) e outras Hemoglobinopatias**. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/doencas-falciformes-df-e-outras-hemoglobinopatias>.

Charache, S., Torrin, M.L., Moore, R.D., Dover, G.J., Barton, F.B., Eckert, S.V., McMahon, R.P. & Bonds, D.R. Effect of hydroxyurea on frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. **New England Journal of Medicine**, 332, 1317–1322, 1995.

COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B.; NJOROGE, 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.

D’ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tête-à-tête: The bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 4, p. 463–476, 2006.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Nature (Scientific Reports)**. 2017.

DASTMALCHI, S. .; HAMZEH-MIVEHROUD, M.; SOKOUTI, B. Applied Case

Studies and Solutions in Molecular Docking-Based Drug Design. **Hershey PA: Medical Information Science Reference**, 2016.

Doença Falciforme. **Unifesp.br**. Disponível em: <<https://sp.unifesp.br/epe/desc/noticias/doenca-falciforme>>.

Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Shafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon mono-oxide production in vascular smooth muscle cells. **Circ Res** 80:557–564, 1997.

Enwonwu CO, Xu XX, Turner E. Nitrogen metabolism in sickle cell anemia: free amino acids in plasma and urine. **Am J Med Sci**, 300(6):366–371, 1990.

ESRICK, E. B. et al. Inactivation of HDAC1 or HDAC2 induces gamma globin expression without altering cell cycle or proliferation. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 7, p. 624–628, 2015.

FATHALLAH, H.; ATWEH, G. F. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. **American Society of Hematology**, p. 58–62, 2006.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 3, p. 203–208, 2010.

FRIESNER, R. A. ET AL. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein - Ligand Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6177–6196, 2006.

GLADWIN, M. T. et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 116, n. 2, p. 436–444, 2002.

GLADWIN, Mark T; SCHECHTER, Alan N; KIM-SHAPIRO, Daniel B; *et al*. The emerging biology of the nitrite anion. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 6, p. 308–314, 2005.

Head, C.A., Brugnara, C., Martinez-Ruiz, R., Kacmarek, R.M., Bridges, K.R., Kuter, D., Bloch, K.D. & Zapol, W.M. Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, 100, 1193–1198, 1997.

Hebbel RP. Auto-oxidation and a membrane-associated 'Fenton reagent': a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. **Clin Haematol**, 14(1):129–140, 1985.

KATO, Gregory J.; PIEL, Frédéric B.; REID, Clarice D.; *et al*. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 2018.

KYLE MACK, A. ; KATO, Gregory J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 8, p. 1237–1243, 2006.

LOBO, C. L. D. C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 247–258, 2007.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 39, n. 6, p. 943–9, 2005.

LUND, A. H.; LOHUIZEN, M. V. Epigenetics and cancer. **Genes & Development**, v. 18, p. 2315–2335, 2004.

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, 7:156–167, 2008

McDade, W.A., Shaba, H.M., Boler, N. & Mathies, S. Nitric oxide increases the solubility of deoxyhemoglobin S solutions and promotes unsickling of sickled cells. **National Sickle Cell Disease Conference**, 1, 252, 1997.

Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. **J Pediatr Hematol Oncol**, 22(6):515–520, 2000.

NUZZO, D. V. P. DI; FONSECA, S. F. Sickle cell disease and infection. **Journal of Infection**, v. 80, n. 5, p. 347–54, 2004.

PAULING, L. et al. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543–8, 1949.

Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO III, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. **Nat Med**, 8(12):1383–1389, 2002.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical applications. **Cmaj**, v. 174, n. 3, p. 341–348, 2006.

Rongen GA, Smits P, Thien T. Endothelium and the regulation of vascular tone with emphasis on the role of nitric oxide. Physiology, pathophysiology and clinical implications. **Neth J Med** 44:26–35, 1994.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **J Am Med Assoc**, 293 (13):1653–1662, 2005.

SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, p. 1–14, 2013.

SANTOS, Jean Leandro dos. Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme. 2013. 128 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, 2013.

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

SCHRÖDINGER. **Glide**New York, 2017b.

SCHRÖDINGER. **Maestro**New York, 2017a.

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.

STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **The Scientific World Journal**, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

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

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, p. 1343–60, 2004.

Voetsch B, Jin RC, Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. **Histochem Cell Biol**, 122(4):353–367, 2004.

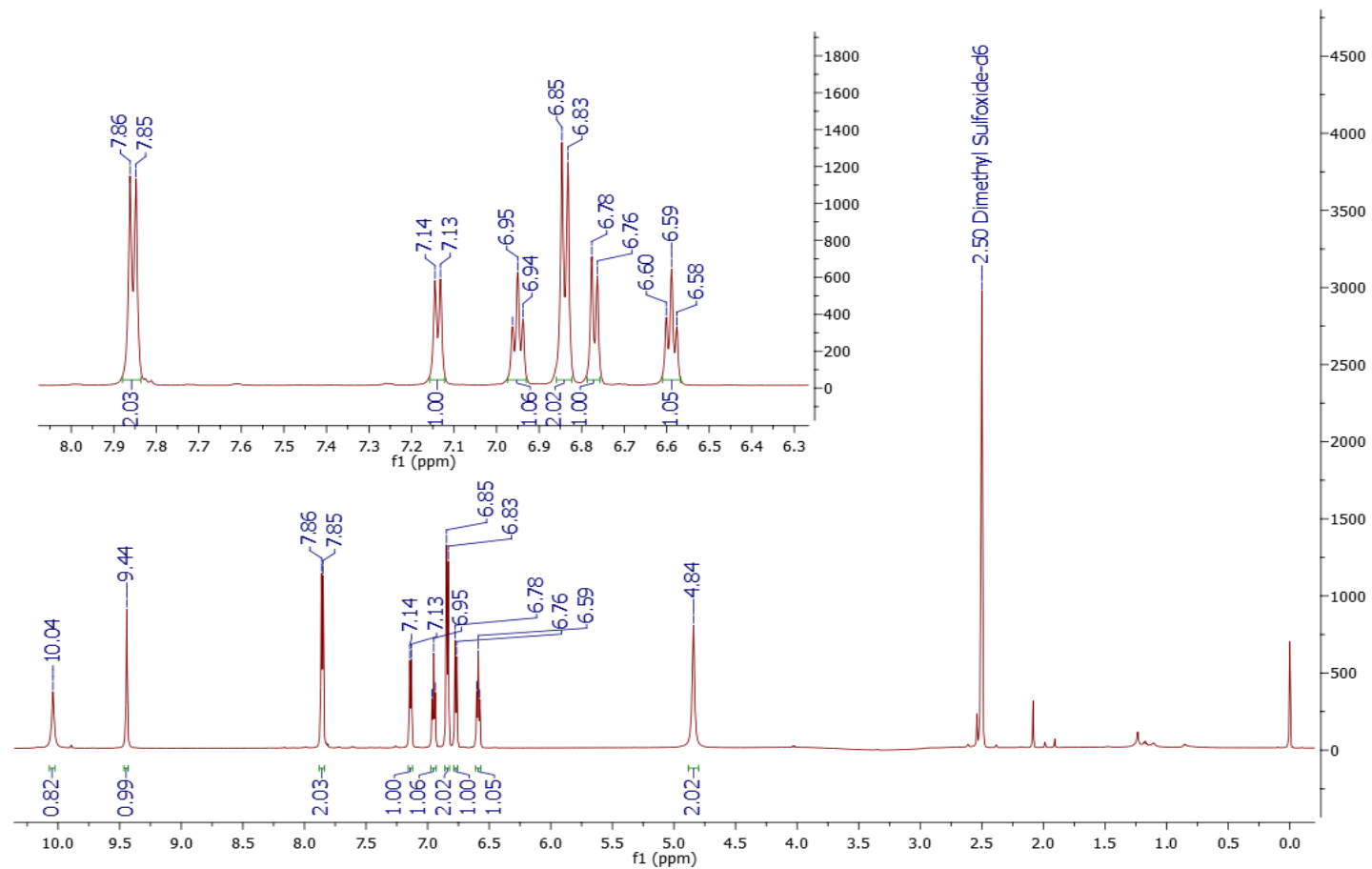
WANG, D. F. et al. On the function of the 14 A long internal cavity of histone deacetylase-like protein: implications for the design of histone deacetylase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 3409–3417, 2004.

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, 1091–1134, 2002.

Wexler, Marisa. Vaso-Occlusive Crisis – Sickle Cell Disease News. **Sickle Cell Disease News**. Disponível em: <<https://sicklecellanemianews.com/vaso-occlusive-crisis/>>.

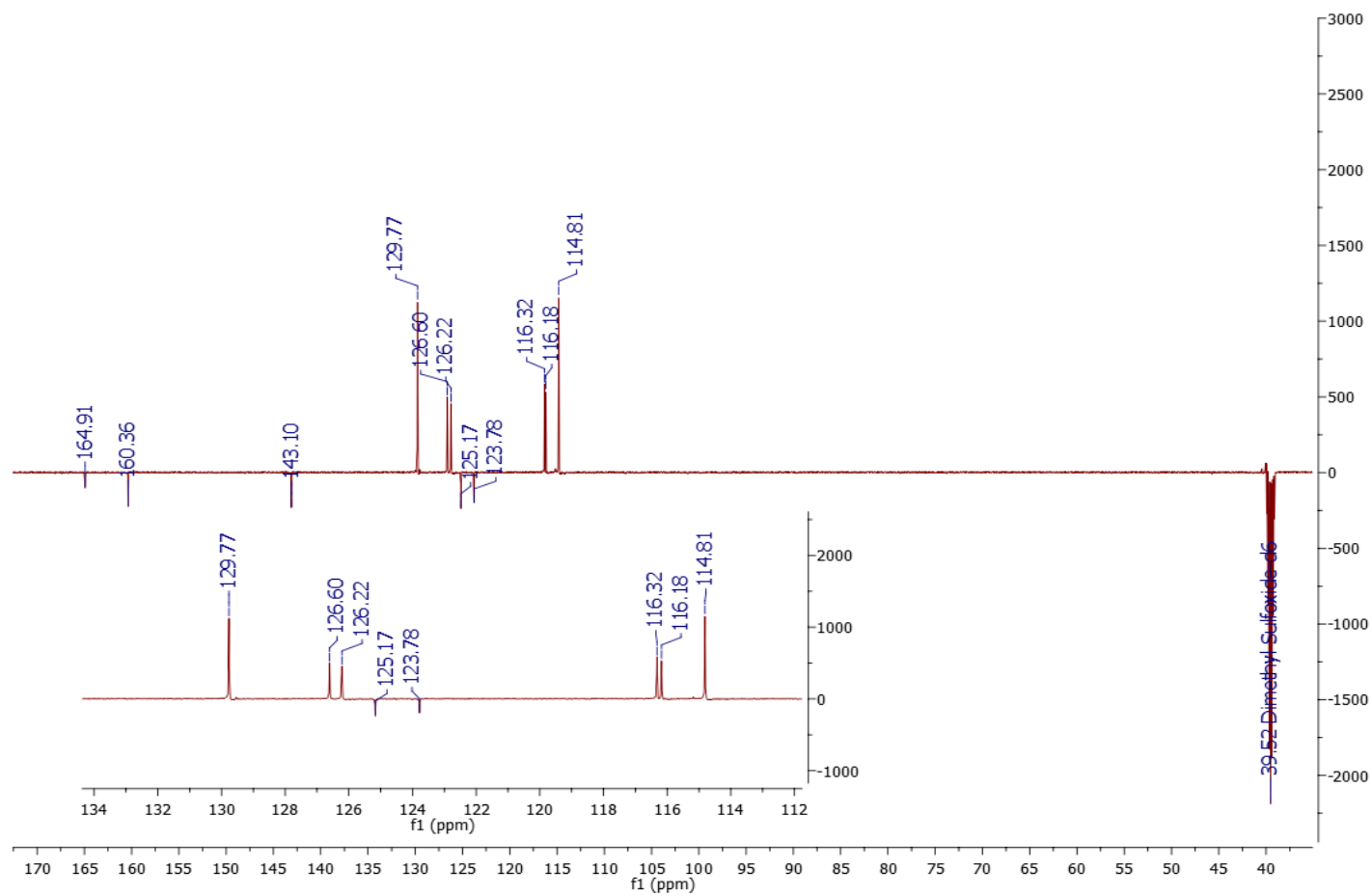
APÊNDICE

Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H da molécula P1 (600MHz, DMSO- d_6)

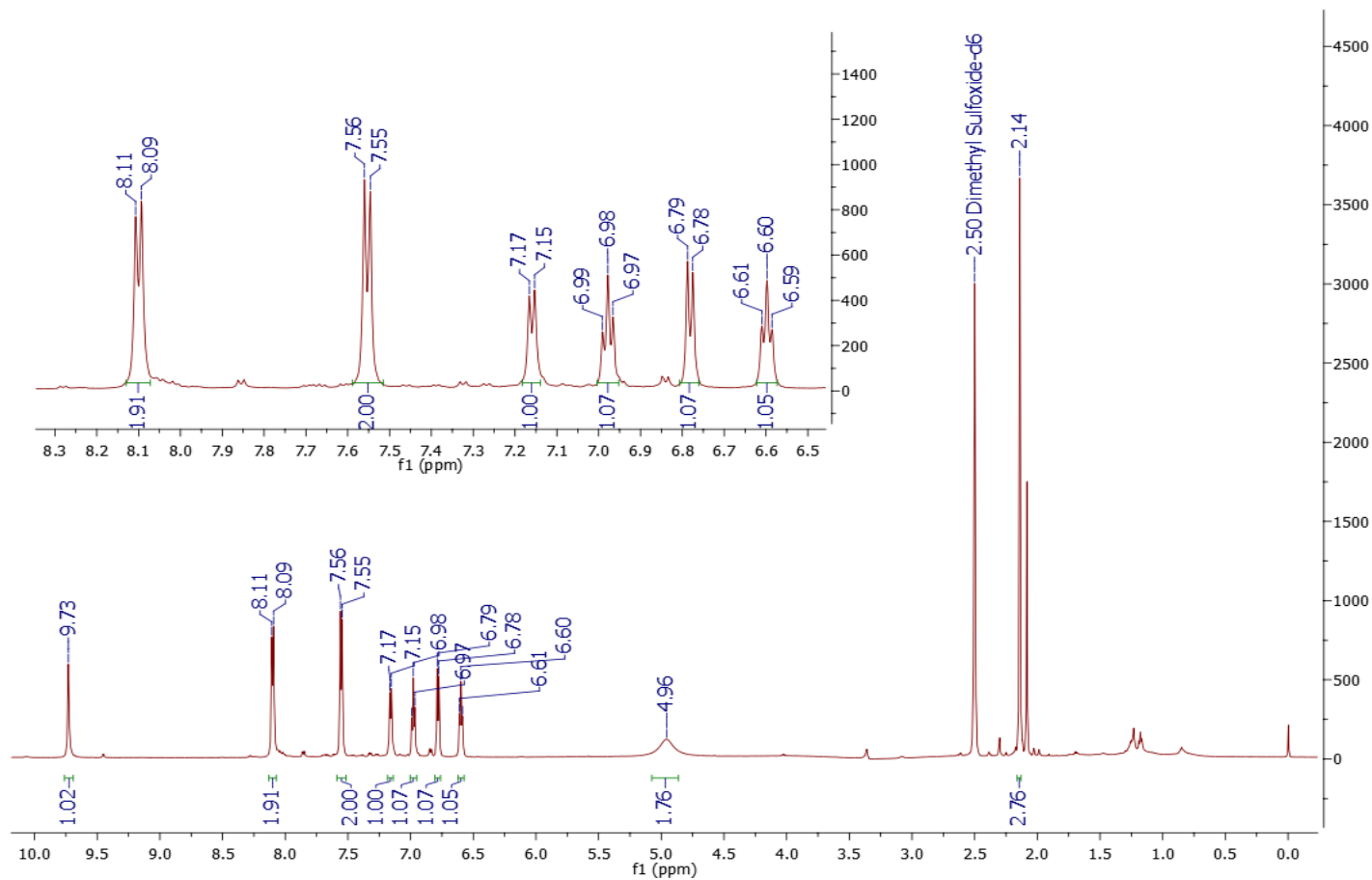


Fonte: própria autora

Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula P1 (150MHz, DMSO- d_6)

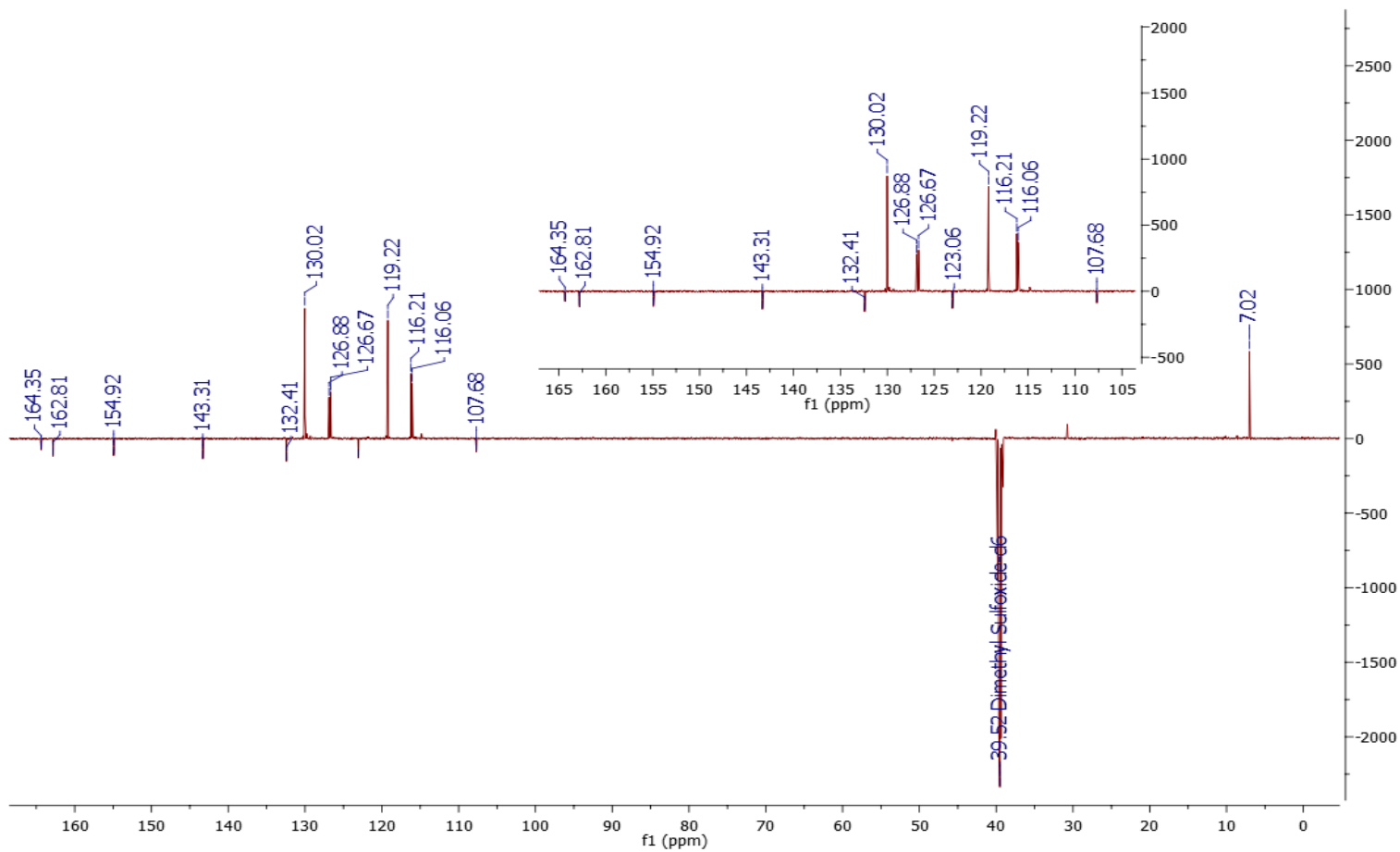


Fonte: própria autora

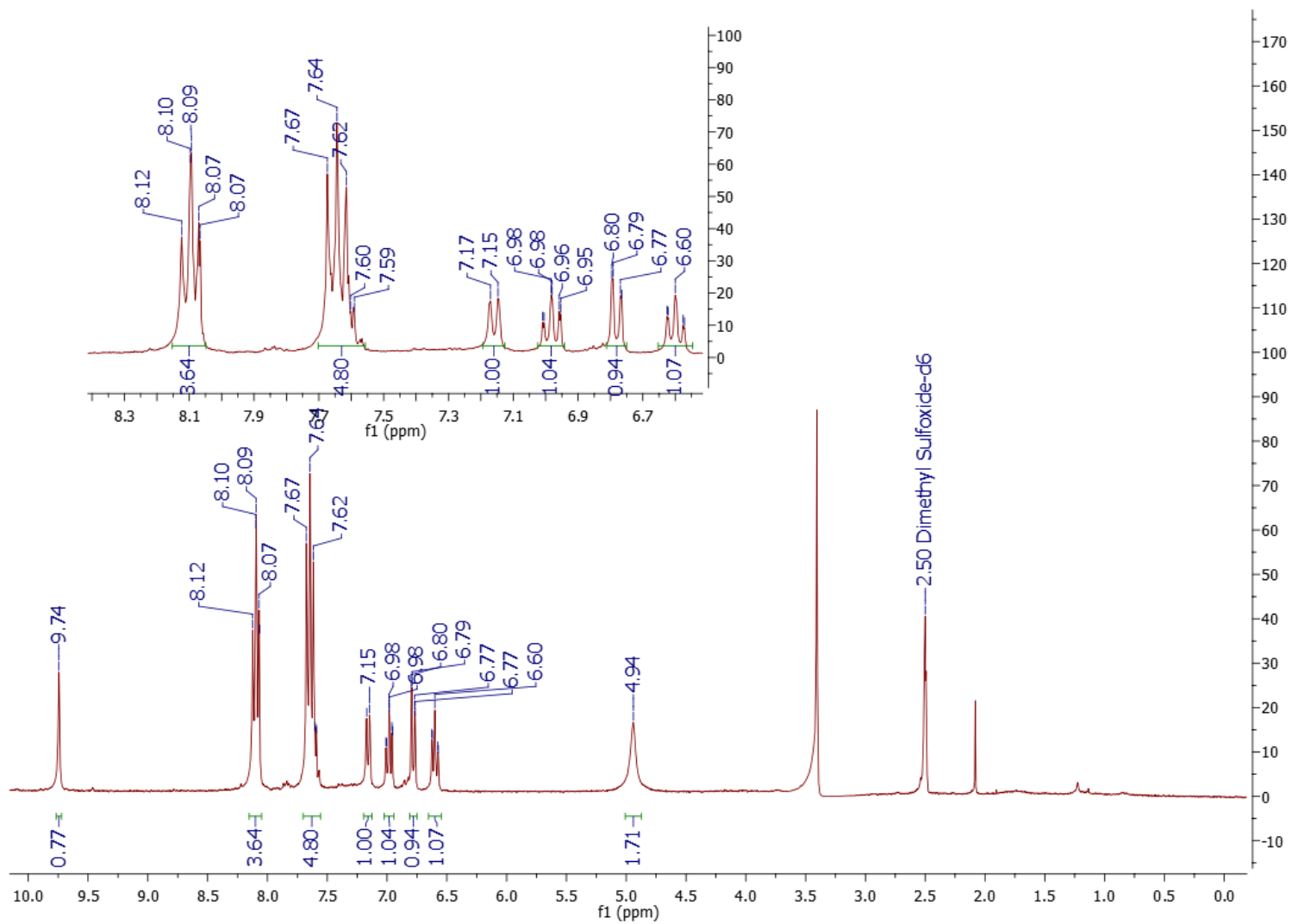
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H da molécula A1 (600MHz, DMSO- d_6)

Fonte: própria autora

Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula A1 (150MHz, DMSO- d_6)

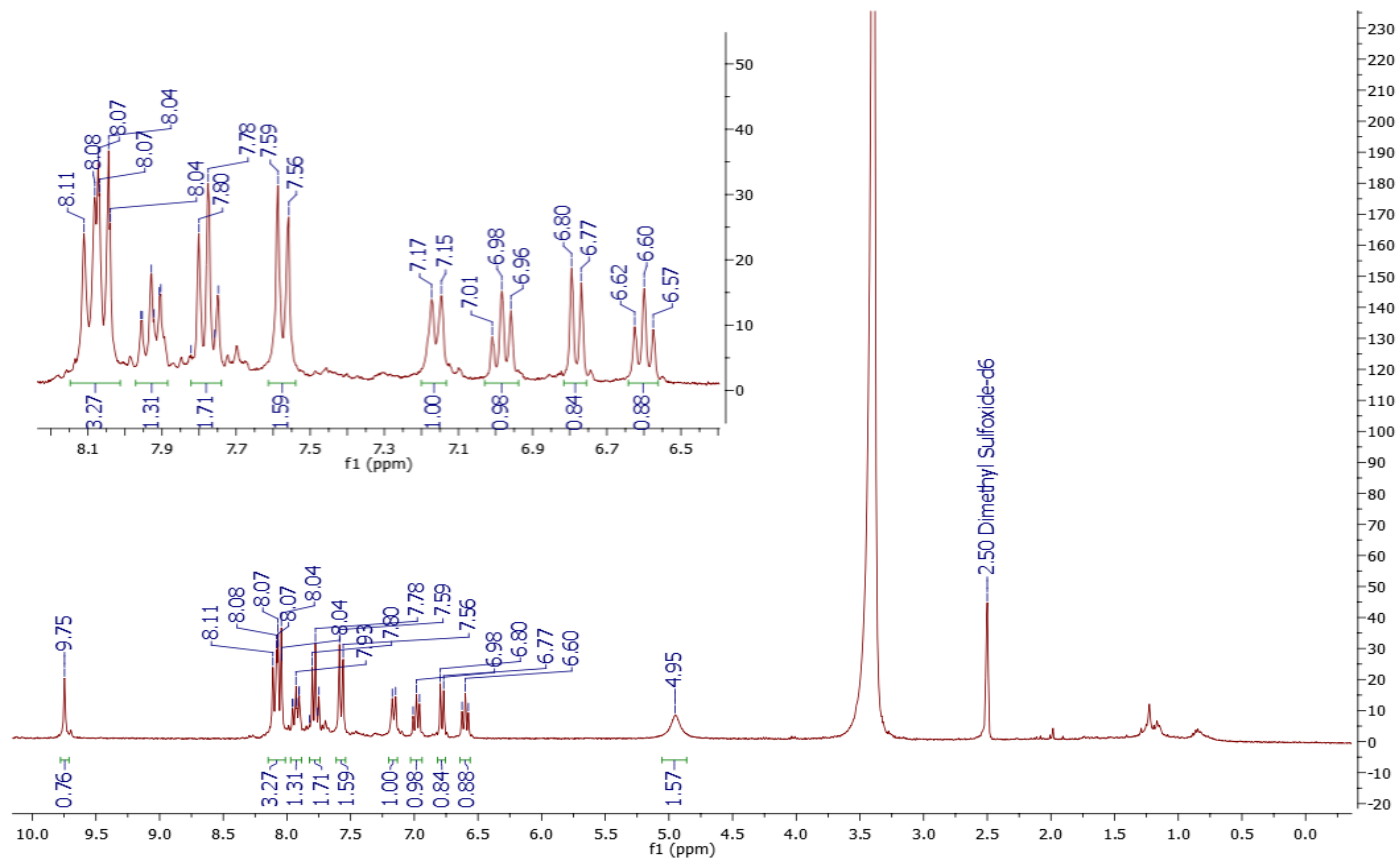


Fonte: própria autora

Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H da molécula A6 (300MHz, DMSO- d_6)

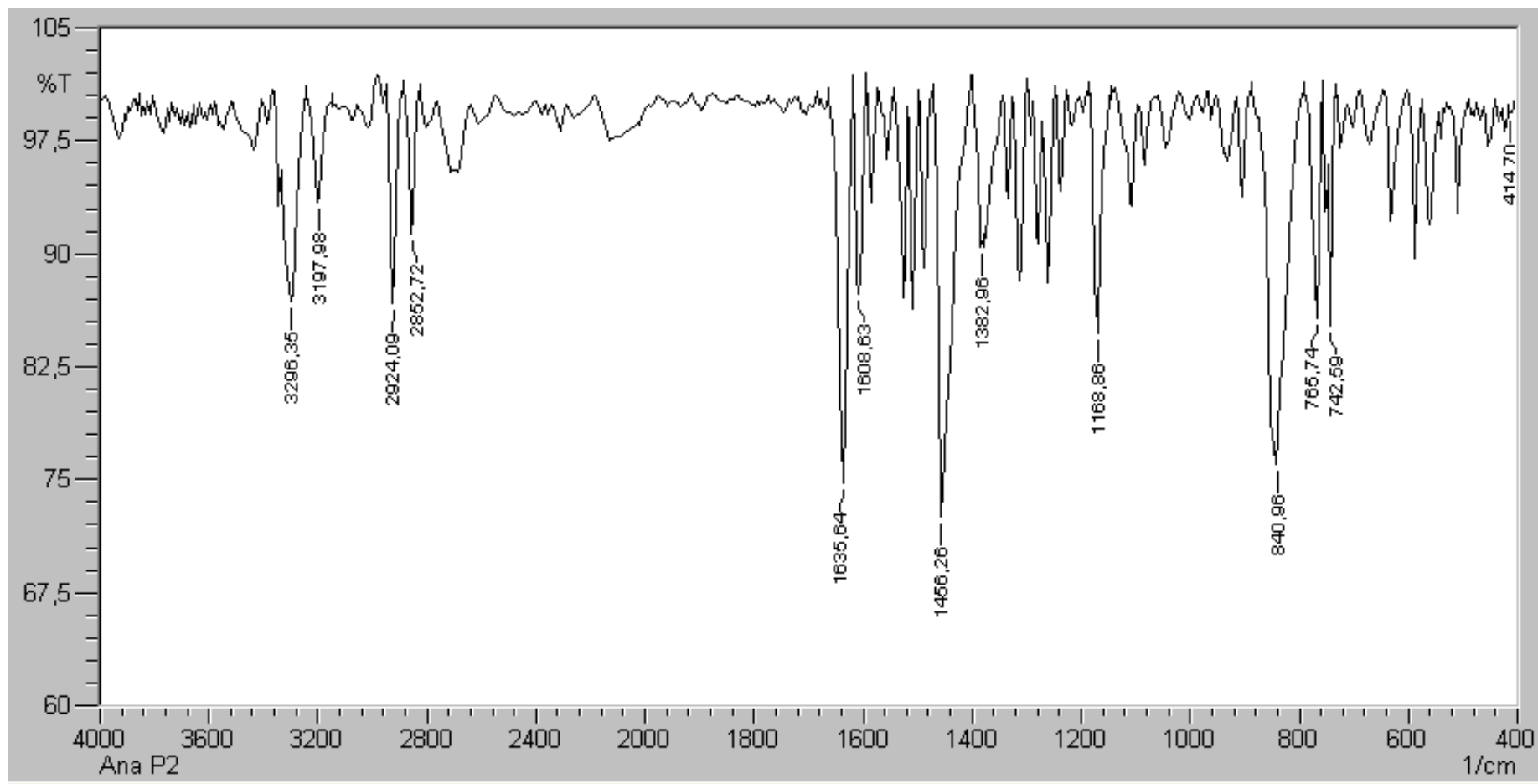
Fonte: própria autora

Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da molécula A11 (300MHz, DMSO- d_6)



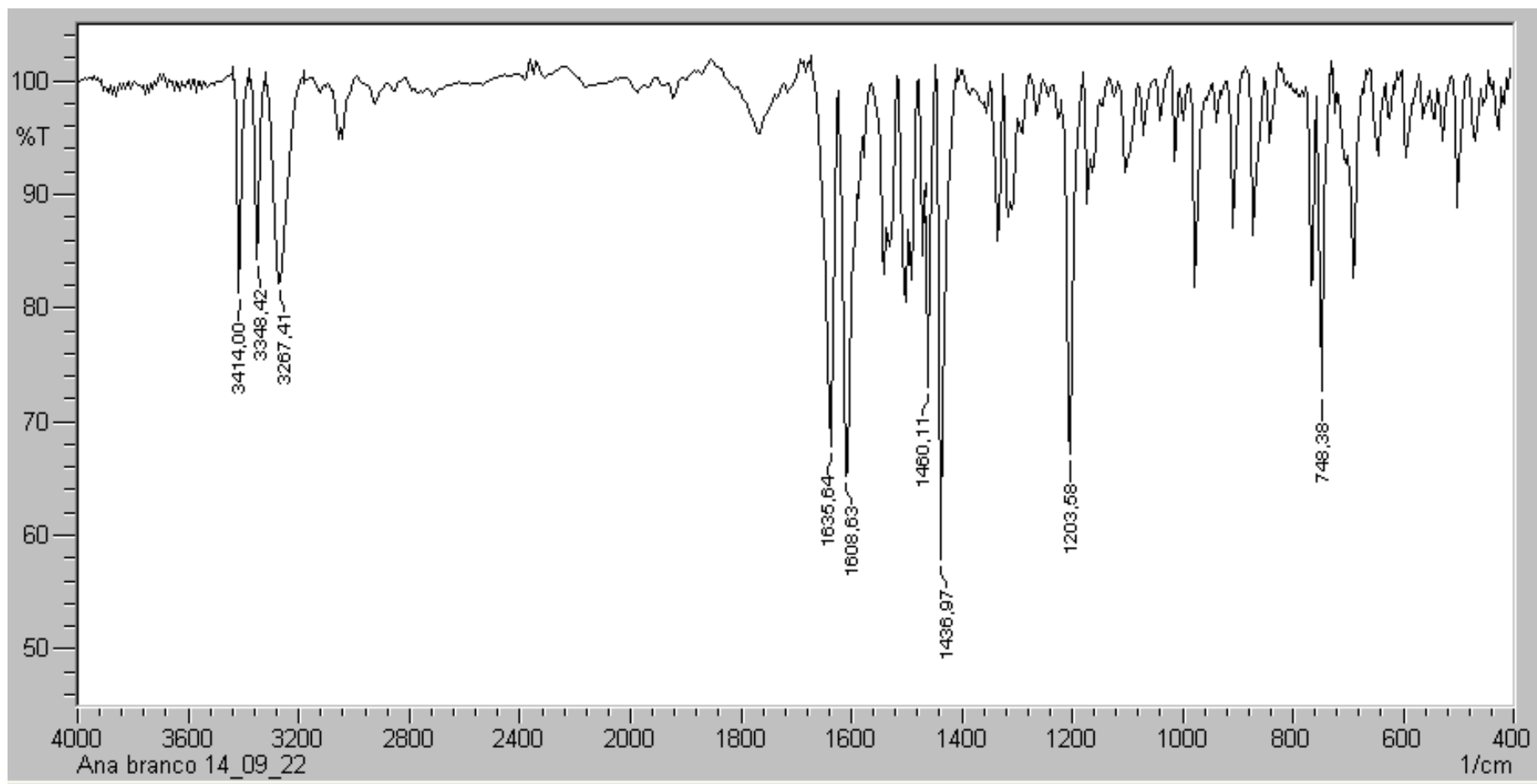
Fonte: própria autora

Figura 32 - Espectro de IV da molécula A1



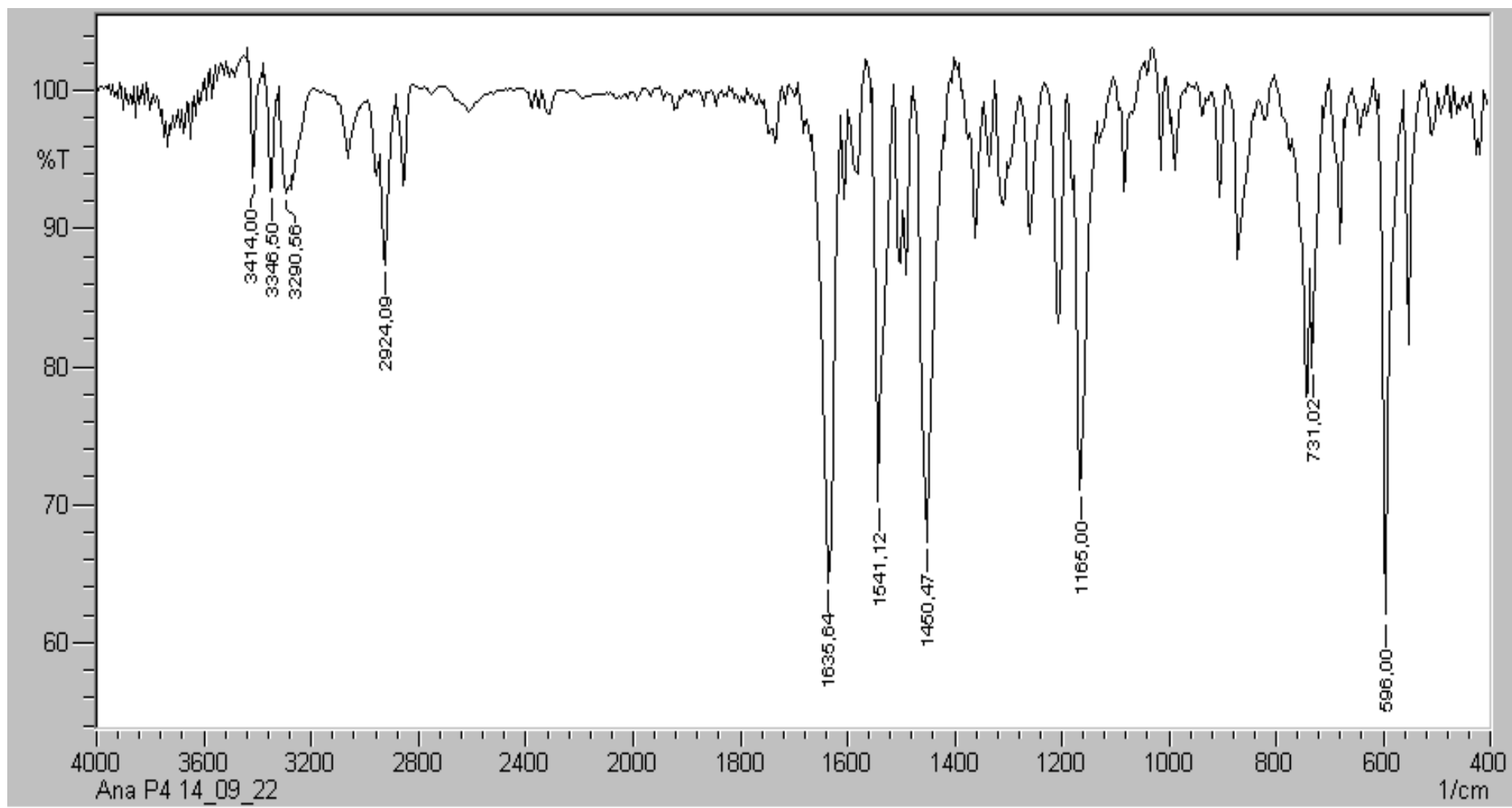
Fonte: própria autora

Figura 33 - Espectro de IV da molécula A6



Fonte: própria autora

Figura 34 - Espectro de IV da molécula A11



Fonte: própria autora