DESENVOLVIMENTO DE UM MONÔMERO EM FORMATO DE UMA ADIÇÃO MOLECULAR DA METFORMINA COM O BENZOFUROXANO, UM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO

DEVELOPMENT OF A MONOMER IN THE FORM OF A MOLECULAR ADDITION OF METFORMIN WITH BENZOFUROXAN, A NITRIC OXIDE DONOR

Kamoni Santos de Souza, Antônio José de Souza Calixto (orientador), Arthur Felinto Mendes Ricciotti (orientador)

Universidade Católica de Santos, Iniciação Científica do Ensino Médio, Curso de Farmácia
E-mail para contato: kamoni.materiais@gmail.com

RESUMO – Diabetes Mellitus (DM) é caracterizada principalmente pela hiperglicemia. A OMS definiu o cloridrato de metformina como medicamento essencial por sua ação antidiabética. Pacientes com DM apresentam angiopatias e neuropatias, causadoras do ferimento crônico UPD devido à baixa concentração de óxido nítrico (NO), neurotransmissor encontrado em baixas concentrações nos pacientes diabéticos. Com o objetivo de remediar danos teciduais, está sendo proposta a criação de uma adição molecular entre a metformina e o benzofuroxano (doador de NO) com uma composição monomérica, como forma de amenizar os danos causados pela baixa concentração de óxido nítrico.

Palavras-chave: Metformina; Benzofuroxano; Adição Molecular; Fármaco.

ABSTRACT – Diabetes mellitus (DM) is mainly characterized by hyperglycemia. The WHO has defined metformin hydrochloride as an essential medicine due to its antidiabetic action. Patients with DM have angiopathies and neuropathies, which cause chronic UPD injury due to low concentrations of nitric oxide (NO), a neurotransmitter found in low concentrations in diabetic patients. To remedy tissue damage, the creation of a molecular addition between metformin and benzofuroxan (NO donor) with a monomeric composition is being proposed as a way to mitigate the damage caused by low nitric oxide concentration.

Keywords: Metformin, Benzofuroxan, Molecular Addition, Drug

1 INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é um conjunto de doenças crônicas caracterizadas pela hiperglicemia. Essa patologia é dividida em 2 grupos, a DM Tipo 1, definida como deficiência absoluta na secreção de insulina, e a DM Tipo 2, apresentada como deficiência parcial na secreção da insulina e uma resistência parcial à insulina. Pacientes de ambas DM apresentam angiopatias através da baixa circulação sanguínea nas regiões periféricas e lesões nos vasos; e neuropatias evidenciadas na perda da sensibilidade nervosa. Estas complicações patológicas da DM acarretam o desenvolvimento da Úlcera do Pé Diabético (UPD) (De Paula, 2008; American Diabetes Association, 2010; SBD, 2019).

O desenvolvimento de UPDs se dá pela estagnação na fase inflamatória no processo da cicatrização dos tecidos, tendo em vista que, a regeneração dos tecidos necessita do óxido nítrico (NO) para o êxito cicatricial. O neurotransmissor NO em pessoas portadoras da DM é encontrado em baixa concentração; ademais sua ação imunorreguladora no trato gastrointestinal é evidenciada pela pesquisa desenvolvida por Villa *et al*. (2006) (Flora Filho; Zilberstein, 2000; Malone-Povolny; Maloney; Schoenfisch, 2019)

Devido a necessidade de intervenção medicamentosa em alguns portadores de DM, a Organização Mundial da Saúde (OMS), apresentou como medicamento essencial para o tratamento da DM o cloridrato de metformina, que atua como fármaco antidiabético por meio da diminuição da absorção da glicose nos intestinos, melhora da sensibilidade à insulina e redução da produção de glicose no fígado (Brasil, 2000; Metformin, 2023).

Dessa forma, a partir do artigo de Koh *et al.* (2013), que apresenta uma adição molecular da metformina com outros ácidos, está sendo sugerida a criação de um fármaco por meio de uma adição molecular na forma de um monômero da metformina e do benzofuroxano (doador de NO). O benzofuroxano se juntaria com a molécula de metformina, gerando um fármaco por adição molecular, que manteria a funcionalidade da metformina e abrandaria as complicações da DM pelo doador de NO.

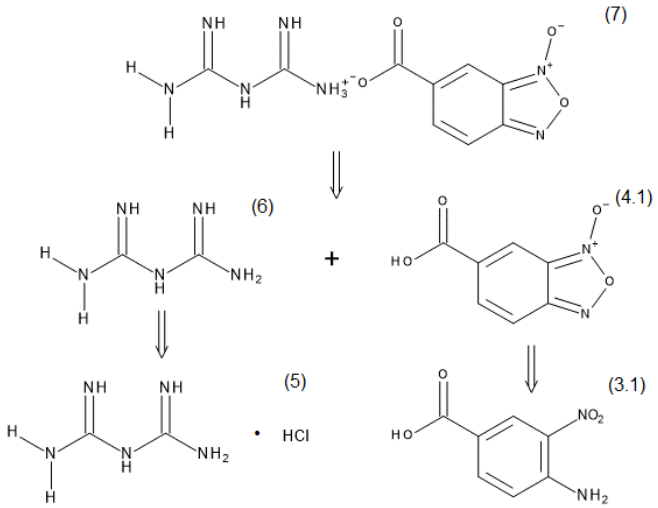
O presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de um fármaco a partir de uma adição molecular da metformina com o benzofuroxano, buscando abrandar os efeitos que as angiopatias e neuropatias causam nos portadores de DM. Destrinchando este objetivo, devemos alcançar por meio da pesquisa, a geração do benzofuroxano a partir de uma rota sintética, a obtenção da metformina com suas aminas livres e a síntese do fármaco utilizando as

características de ácido do benzofuroxano com a base, levando a formação de um produto de adição molecular entre ambos por uma reação entre o ácido e a base.

2 METODOLOGIA

Por meio de pesquisa experimental, foram utilizada uma abordagem retrossintética para a ordenação da obtenção dos compostos. A coleta de dados foi realizada através das características químicas e físicas apresentadas pelas moléculas obtidas, sendo sua análise realizada por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

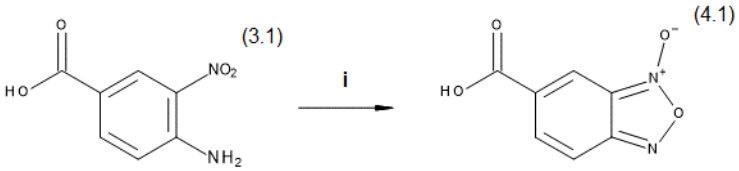
Figura 1: Retrossíntese.



2.1 Síntese do Benzofuroxano (4.1)

A preparação do benzofuroxano foi orientada a partir de um estudo "Síntese, propriedades espectroscópicas, eletroquímicas e antioxidantes de derivados de benzofuroxano e 2H-benzimidazol 1,3-dióxido derivados: Efeitos da conjugação com receptor de elétrons 1,2,3-triazol-1,2,4-oxadiazol" (Mayer, *et al.* (2024), tradução nossa).

Figura 2: Obtenção do Benzofuroxano (4.1).



Condições: **i**) KOH, EtOH, 343,15K, 300s; resfriar até 273,15K, NaClO aquoso, 273,15-278,15K, 3.600s; então, HCl aquoso.

Em um erlenmeyer com capacidade de $2{,}5\times10^{4}m^{3}$, foi diluído $5\times10^{4}kg$ (2,75 mmol) de ácido 4-amino-3-nitrobenzóico em $2{,}7\times10^{5}m^{3}$ de etanol, após a dissolução, foi adicionado

$3{,}02\times10^{4}$kg (5,38 mmol) de KOH e mistura foi submetida à aquecimento até a temperatura de 343,15K; ao submeter o aquecimento a mistura, é evidente a aparição de um precipitado alaranjado, a mistura foi resfriada até alcançar uma temperatura na faixa de 273,15-278,15K. Após alcançar a faixa de temperatura desejada, foram adicionados $2{,}7\times10^{5}$m^3 de hipoclorito de sódio 5% de maneira controlada por 1.800s com o sistema em agitação, logo depois da adição do hipoclorito de sódio, a mistura se manteve em agitação por 5.400s.

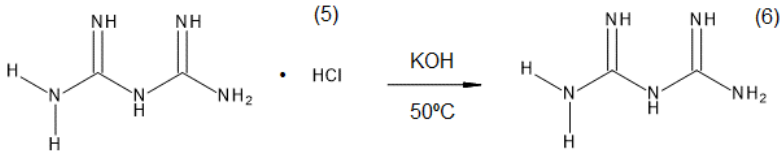
A solução gerada passou pelo processo de acidificação com HCl 6m até o pH 1, aferido com auxílio de fitas de pH, após essa acidificação, foram adicionados $4{,}05\times10^{5}$m^3 de água destilada, a mistura resultante deste processo foi extraída com clorofórmio (3 vezes $2{,}7\times10^{5}$m^3). Por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e teve o solvente removido por rotoevaporação. Em seguida, a mistura foi submetida a uma recristalização com clorofórmio e isolada.

2.2 Obtenção da Metformina Livre (6)

A preparação da metformina livre foi orientada pelo artigo "Um novo derivado da metformina, HL010183, inibe a proliferação e a invasão de células de câncer de mama triplo-negativas" (Koh, *et al.* (2013), tradução nossa).

2.2.1. Obtenção das Metforminas Livres 1, 2, 3 e 4

Figura 3: Obtenção da Metformina Livre (6).



Em um erlenmeyer com capacidade de $2{,}5\times10^{4}$m^3, foi dissolvido $2{,}006\times10^{4}$kg (1,21 mmol) de cloridrato de metformina em 4×10^{6}m^3 de isopropanol (i-PrOH), após a dissolução do cloridrato de metformina, foi adicionado $8{,}8\times10^{5}$kg (1,57 mmol) de hidróxido de potássio (KOH) ao erlenmeyer. Essa mistura foi submetida ao aquecimento até alcançar a temperatura de 323,15K e ficou em agitação por 7.200s com auxílio de um aquecedor e agitador magnético, e uma barra magnética; após esse processo, foram adicionados 5×10^{6}m^3 de acetona para a solubilização da metformina, em seguida a solução foi filtrada a vácuo e para o total

aproveitamento do composto, o erlenmeyer foi lavado duas vezes com aproximadamente $9\times10^{6}m^{3}$ de isopropanol.

Com a metformina ficando na parte filtrada, devido sua dissolução na acetona, a mistura foi transferida para um balão e conectada a um sistema de destilação a vácuo para a retirada dos solventes, o processo de destilação a vácuo ocorreu 2 vezes, com a presença de aquecimento através de um banho de vaselina e agitação com auxílio de um agitador e uma barra magnética, e buscando uma extração total dos solventes da metformina, foi utilizado uma fonte de calor em um sistema a vácuo para extinguir a presença de solventes na forma livre da metformina.

2.2.2. Obtenção da Metformina Livre 5

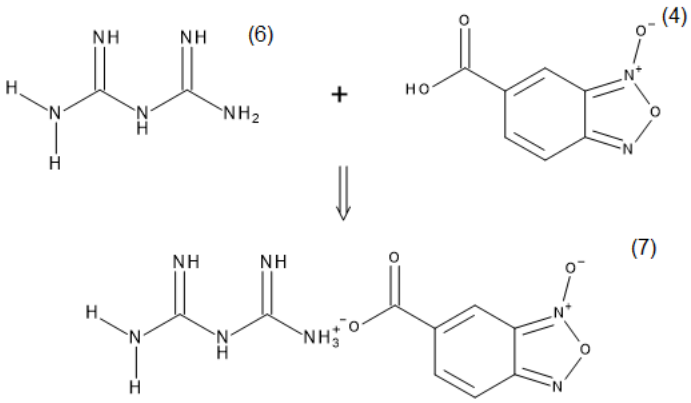
Em um erlenmeyer com capacidade de $2,5\times10^{4}m^{3}$, foi dissolvido $4\times10^{4}kg$ (2,42 mmol) de cloridrato de metformina em $7\times10^{6}m^{3}$ de isopropanol (i-PrOH), após a dissolução do cloridrato de metformina, foi adicionado $1,4\times10^{4}kg$ (2,5 mmol) de hidróxido de potássio (KOH) ao erlenmeyer. Essa mistura foi submetida ao aquecimento até alcançar a temperatura de 323,15K e ficou em agitação por 7.200s com auxílio de um aquecedor e agitador magnético e uma barra magnética; após esse processo, foram adicionados $1\times10^{5}m^{3}$ de acetona para a solubilização da metformina, em seguida a solução foi filtrada a vácuo e para o total aproveitamento do composto, o erlenmeyer foi lavado duas vezes com aproximadamente $7\times10^{6}m^{3}$ de isopropanol e $1\times10^{5}m^{3}$ de acetona.

Com a metformina ficando na parte filtrada, devido sua dissolução na acetona, a mistura foi transferida para um balão e conectada a um sistema de destilação a vácuo para a retirada dos solventes, o processo de destilação a vácuo ocorreu 2 vezes. No primeiro processo de destilação, foi utilizado o aquecedor e agitador magnético para melhorar as condições de entropia do sistema, o banho de vaselina foi usado para aquecer o sistema de maneira uniforme e promover uma melhor retirada dos solventes, já na 2º destilação a vácuo, foram adicionados mais $1\times10^{5}m^{3}$ de isopropanol e $2,5\times10^{5}m^{3}$ de acetona, e o aquecimento foi retirado, mas a agitação continuou.

Após a máxima secagem do material na destilação a vácuo, o composto foi depositado em um vidro de relógio e mantido na estufa por aproximadamente 432.000s ininterruptos, neste período de tempo, a temperatura foi controlada no intervalo de 338,15-343,15K.

2.3 Obtenção do Monômero de Metformina com Benzofuroxano (7)

Figura 4: Obtenção do Monômero de Metformina com o Benzofuroxano (7)



Em um erlenmeyer foi dissolvido $7{,}2\times10^{5}$kg (0,56 mmol) da metformina em $8\times10^{6}m^{3}$ de isopropanol, após a dissolução da metformina, foi adicionado $7{,}94\times10^{5}$kg (0,44 mmol) de benzofuroxano. Essa mistura foi aquecida e mantida na temperatura de 323,15K durante 7.200s de agitação com auxílio de uma barra magnética e de um aquecedor e agitador magnético. Após esse processo, foram adicionados $2\times10^{5}m^{3}$ de acetato de etila para a formação de um precipitado, em seguida a solução foi filtrada a vácuo, e para o total aproveitamento o erlenmeyer foi lavado com $9\times10^{6}m^{3}$ de acetona e $5\times10^{6}m^{3}$ de isopropanol. O resíduo de filtração foi retido em um papel de filtro, que posteriormente foi mantido em local ventilado para a total evaporação dos solventes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção do Benzofuroxano

Foi obtido $3{,}8\times10^{4}$kg **(**76% de rendimento) do suposto benzofuroxano, com tonalidade alaranjada e textura sólida, apresentando Ponto de Fusão (PF) entre 395,15-398,65K.

Conforme sugestão do orientador, essa molécula passou por duas etapas de análise, uma antes de sua recristalização e outra após. A divisão das etapas de análise foi fundamentada no empirismo, que previa uma alta taxa de pureza e de acordo com o PF esperado sem ser submetida ao processo de recristalização, no entanto, os resultados obtidos da primeira análise foram discrepantes se comparados com os resultados do artigo de Mayer *et al.* (2024), no artigo é descrito o rendimento de 75% e PF entre 397,75-398,65K, já o composto obtido antes da recristalização apresentava rendimento de 96,7% e PF entre 391,15-393,15K**.**

3.2 Métodos de Obtenção da Metformina Livre

Posto que, é necessário a molécula da metformina estar com suas aminas livres para a formação da adição molecular, foram testadas diversas rotas sintéticas buscando esse resultado.

Na primeira rota, houve a tentativa de obtenção por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH), referenciado por Aurélio (2021). Este método consiste na alteração do pH da solução, que indicaria a disponibilidade de aminas livres, e a posterior extração. Inicialmente este método se mostrou promissor alterando o pH da solução, no entanto, após um período de tempo, o pH voltava a contração inicial; os resultados não foram promissores pois a metformina é considerada uma solução tampão.

A segunda rota foi sugerida pelo orientador, com a finalidade empírica, sendo usado o carbonato de sódio (Na_2CO_3) com a finalidade de alterar o pH da solução com o cloridrato de metformina. Ao utilizarmos o NaOH, que é considerado uma solução básica forte, vimos que a força dessa solução não foi suficiente para a liberação das aminas da metformina, dito isso, houve a sugestão de utilizar uma solução mais fraca para analisarmos a reação da molécula. Utilizando o mesmo parâmetro reacional do primeiro método, o pH, vimos que ao adicionarmos o Na_2CO_3, não alterada em nada o pH da solução.

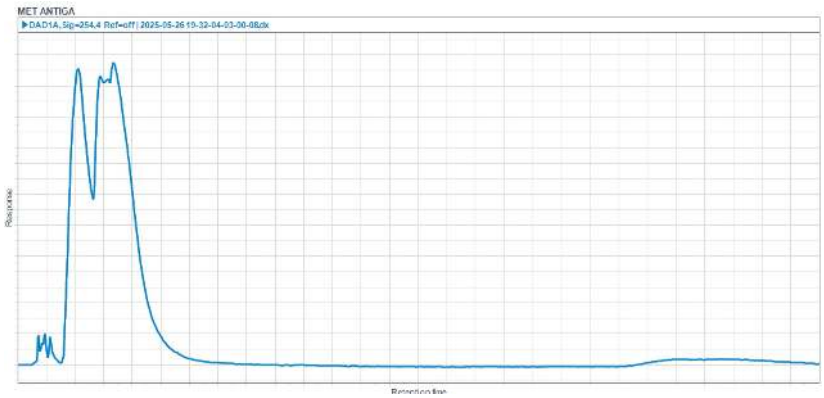
A terceira rota foi realizada uma tentativa de obtenção por intermédio do artigo de Koh *et al.* (2013), que na primeira tentativa de obtenção, houve sucesso reacional e a formação da suposta metformina livre.

3.3 Obtenção das Metforminas 1, 2, 3 e 4

3.3.1. Metformina 1

Foi obtido $1{,}76\times10^4$kg (70% de rendimento) da suposta metformina livre 1, com tonalidade bege e textura sólida, detinha PF entre 392,15-393,15K.

Figura 5: HPLC Metformina 1.



A partir de uma análise do HPLC, podemos identificar a falta de pureza na suposta molécula de metformina 1. De acordo com a pesquisa de Koh *et al*. (2013), o PF é correspondente, visto que, em sua pesquisa ele apresente PF entre 392,15-393,15K, entretanto, o autor descreve o seu composto como um "sólido branco", divergindo na coloração do composto adquirido em nossa reação. Essa mudança de tonalidade pode indicar divergência do composto obtido para o composto desejado, mas, com a apresentação de PF idêntico ao esperado, a alteração de tonalidade teve baixo impacto na continuidade sintética.

3.3.2. Metformina 2

Foi obtido $2{,}039\times10^{4}$kg (41% de rendimento) da suposta metformina livre 2, com tonalidade inicial bege e textura sólida e tonalidade final esverdeada com textura sólida, detinha PF entre 386,15-387,15K.

Figura 6: HPLC Metformina 2.

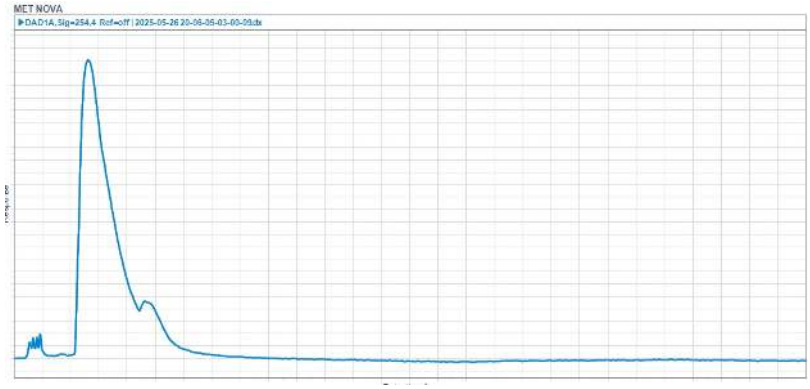


Figura 7: Comparativo de Tonalidades Metformina 2.



Na figura 7, podemos identificar, da esquerda para a direita, o primeiro balão que contém a suposta metformina 2 com sua tonalidade inicial e o segundo balão, que contém a metformina 2 com sua tonalidade alterada. Ao fim do processo reacional, o composto foi armazenado em local protegido da luz, sua tonalidade inicial era semelhante a suposta primeira metformina, no entanto, alguns dias depois, quando o composto foi verificado, sua coloração se encontrava esverdeada, mas, os padrões de PF continuavam como o esperado para a metformina com aminas livres. Devido sua alteração de cor, o composto foi submetido a novos processos de purificação, acarretando o seu baixo rendimento; entretanto, não foi possível remover essa tonalidade esverdeada. Os processos que envolviam esse composto foram realizados da mesma forma, buscando analisar, de maneira empírica, o comportamento dessa molécula, supostamente impura. Paralelamente, com a análise no HPLC da suposta molécula de metformina 2, podemos perceber um pico quase que único, indicando uma alta pureza do composto obtido.

3.3.3. Metformina 3 e 4

Ambas metformina tiveram sua coleta impossibilitada devido a textura viscoso dos compostos, resultando na ausência de teste de PF e aferição de seu rendimento.

3.4 Obtenção da Metformina 5

Foi obtido $3{,}1\times10^{4}$kg (77,5% de rendimento) da suposta metformina livre 5, com tonalidade bege clara e textura sólida, detinha PF entre 388,15-403,15K.

Após a sequência de resultados inconclusivos, houve a alteração de alguns passos para a formação do composto desejado, essa alteração teve como justificativa a percepção visual, que identificou a alteração da textura do composto no processo da segunda destilação a vácuo. Diante dessa alteração reacional, o composto se apresentou menos viscoso, entretanto, continuava apresentando dificuldade na hora de coletar o composto gerado. A partir do manuseio para a retirada do composto do balão reacional, percebemos que ao deixar o composto exposto ao ambiente, ele se apresentava mais viscoso, resultando na conclusão que: a metformina absorve a umidade do ar, sabendo disto, submetemos o composto ao processo de secagem, que possibilitou sua coleta e análise.

Ao compararmos a facilidade de obtenção da suposta metformina 1 com a dificuldade de sua obtenção depois da suposta metformina 2, podemos considerar que, com o processo de

destilação a vácuo, a bomba de vácuo pode estar com seu funcionamento comprometido, dificultando a extração total dos solventes presentes.

3.5 Obtenção dos Monômeros de Metformina com Benzofuroxano

Na formação do primeiro composto, foi obtido $2{,}8\times10^{5}$kg (18% de rendimento) do suposto monômero 1, com tonalidade amarelada e textura sólida, detinha PF entre 478,15-483,15K. Já na formação do segundo composto, foi obtido $9{,}46\times10^{5}$kg (39% de rendimento) do suposto monômero 2, com tonalidade amarelada e textura sólida, detinha PF entre 478,15-480,15K.

Figura 8: HPLC Monômero 1.

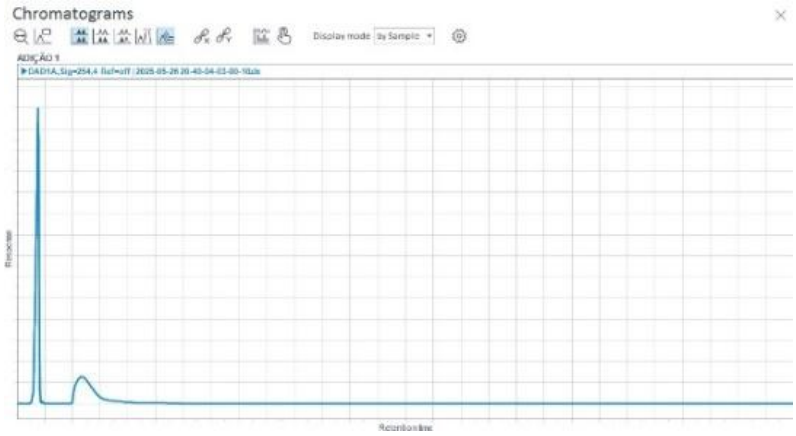
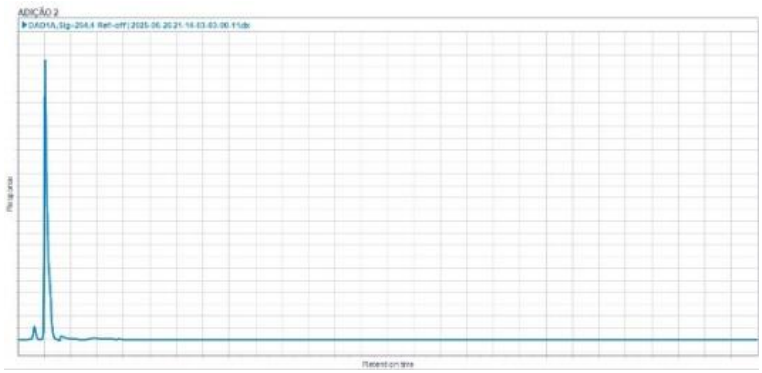


Figura 9: HPLC Monômero 2.



Devido ao baixo rendimento do suposto monômero 1, a produção deste segundo monômero foi sugerida pelo orientador, processo que obteve mais que o dobro do rendimento da primeira reação. No estudo de Koh *et al.* (2013), não foi realizada a adição molecular da metformina com o benzofuroxano, impossibilitando a comparação dos dados de nossa preparação. Diante da observação dos HPLCs das adições moleculares, podemos ver que seus picos únicos foram semelhantes, indicando uma alta taxa de pureza nos compostos obtidos.

4 CONCLUSÃO

Diante do tema exposto para o desenvolvimento da pesquisa, o desdobramento ocorrido é bastante satisfatório, tendo em vista os problemas na obtenção da metformina livre, que apresentou complexidade para sua preparação. Dito isso, a dificuldade na obtenção da metformina livre está intrinsecamente ligada com a carência de revisões bibliográficas sobre o assunto, tornando a publicação desta pesquisa um material de alta relevância. Portanto, com a formação dos monômeros relatados, que alcançaram análises promissoras no HPLC, demostrando a alta possiblidade da obtenção dos monômeros desejados, possibilitando futuramente sua otimização para alcançar melhores rendimentos, evidentemente, encontra-se a mínima presença de impurezas nestas moléculas, mas, generalizando, a formação dos monômeros foi satisfatória. Com o sucesso na geração molecular advinda da adição molecular, há possiblidade de expansão para o desenvolvimento de uma pesquisa sobre o dímero deste fármaco. Por fim, venho agradecer a Universidade Católica de Santos (Unisantos) pela oportunidade de realização da iniciação do ensino médio, ao orientador Antonio José de Souza Calixto pela confiança e pelas instruções para realização da pesquisa, e ao coorientador Arthur Felinto Mendes Ricciotti pelo acompanhamento e auxílio laboratorial no desenvolvimento desta pesquisa.

5 REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care, v. 33, n. Supplement_1, p. S62-S69, 2010.

AURÉLIO, Juliana Gruenwaldt Maia. Avaliação da Influência dos Sais de Metformina no Desenvolvimento de um Sistema Biopolimérico de Liberação Modificada a Base de PLLA.

BRASIL, Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2000.

DE PAULA, Rogério Baumgratz. Avaliação cardiovascular de pacientes hipertensos e diabéticos do tipo 2 sem antecedentes de vasculopatia. Rev. Soc. Bras. Clín. Méd., v. 6, n. 1, p. 8-14, 2008.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, Bruno. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 46, p. 265-271, 2000.

KOH, Minsoo et al. A novel metformin derivative, HL010183, inhibits proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells. Bioorganic & medicinal chemistry, v. 21, n. 8, p. 2305-2313, 2013.

MALONE-POVOLNY, Maggie J.; MALONEY, Sara E.; SCHOENFISCH, Mark H. Nitric oxide therapy for diabetic wound healing. Advanced healthcare materials, v. 8, n. 12, p. 1801210, 2019.

MAYER, Joao CP et al. Synthesis, spectroscopic, electrochemistry and antioxidant properties of benzofuroxan and 2H-benzimidazole 1, 3-dioxide derivatives: Effects of conjugation with electron-acceptor 1, 2, 3-triazolyl-1, 2, 4-oxadiazole. Journal of Molecular Structure, v. 1311, p. 138420, 2024.

METFORMIN: uses, side effects & warnings. 2023.

SBD – Associação Brasileira de Diabetes. Diabetes e Imunização: Posicionamento Oficial, 2019.

VILLA, Afonso Luiz et al. The cytoprotective effect of a nitric oxide donor drug on gastric mucous membrane of rats treated with ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug. Arquivos de Gastroenterologia, v. 43, p. 233-237, 2006.