



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KEOMA KEYSON LIMA CAVALCANTE

**SÍNTESE DE HÍBRIDOS APOCININA-PROTOCATECULATO
DE HEPTILA E AVALIAÇÃO IN SILICO DE POTENCIAIS
INIBIDORES DE NOX2.**

Londrina
2022

KEOMA KEYSON LIMA CAVALCANTE

**SÍNTESE DE HÍBRIDOS APOCININA-PROTOCATECULATO
DE HEPTILA E AVALIAÇÃO IN SILICO DE POTENCIAIS
INIBIDORES DE NOX2.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Cristina Perez

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Orsato

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C376s Cavalcante, Keoma Keyson Lima.
Síntese de híbridos apocinina-protocateculato de heptila e avaliação in silico de potenciais inibidores de nox2 / Keoma Keyson Lima Cavalcante. - Londrina, 2022.
64 f. : il.

Orientador: Carla Cristina Perez.
Coorientador: Alexandre Orsato.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.
Inclui bibliografia.

1. NADPH oxidase - Tese. 2. Inibidores de NOX - Tese. 3. Avaliação in silico - Tese. I. Perez, Carla Cristina. II. Orsato, Alexandre. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

KEOMA KEYSON LIMA CAVALCANTE

**SÍNTESE DE HÍBRIDOS APOCININA-PROTOCATECULATO
DE HEPTILA E AVALIAÇÃO IN SILICO DE POTENCIAIS
INIBIDORES DE NOX2.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Cristina Perez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Carla Cristina Perez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fabio Vandresen
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 04 de março de 2022.

CAVALCANTE, Keoma Keyson Lima. **Síntese de híbridos apocinina-protocateculato de heptila e avaliação in silico de potenciais inibidores de NOX2.** 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O estresse oxidativo é um efeito subsequente ao desequilíbrio redox em organismos vivos. Esta condição está diretamente ligada à produção exagerada de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e está associada à progressão de várias doenças inflamatórias, degenerativas e mutagênicas. As enzimas da família NADPH oxidase (NOX) são conhecidas como as principais fontes de EROs (principalmente a NOX2), e suas subunidades dispersas no citosol têm chamado atenção como importantes alvos moleculares na busca pela prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Este trabalho, visou a síntese de uma série de compostos híbridos bem como na inibição seletiva das NOX. Em estudos anteriores, os polifenóis com longas cadeias de carbono são classificados como bons inibidores da NOX. A exemplo desta classe: o éster protocateculato de heptila, derivado do ácido protocatecuico possui alto índice de inibição de NOX2, ao mesmo tempo em que atua na redução de EROs (via antioxidante). Visando as características ressaltadas nestes estudos e discutindo sobre a dicotomia do equilíbrio entre hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade para permeação da membrana celular, pensou-se para este trabalho na síntese de compostos híbridos derivados da apocinina e do éster protocateculato de heptila como potenciais inibidores seletivos das NOX. A verificação das características moleculares para mensurar a capacidade da permeação celular e acesso as subunidades da NOX foram feitas com as bases teóricas das Regras de Lipinski e Veber e utilizando softwares livres que auxiliam nos cálculos das propriedades físico-químicas. As características moleculares foram então planejadas a partir da esterificação do composto fenólico ácido vanílico com dióis de diferentes cadeias de carbono (parte lipofílica) com grupos hidroxila (parte hidrofílica) e oxigênios de éter em suas cadeias. Após um estudo das melhores condições reacionais para a formação dos compostos, estes foram obtidos em meio a compostos secundários, sendo passíveis de purificação por coluna cromatográfica, com rendimentos de 33% a 90%. A identidade dos compostos foi confirmada por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C). Ensaio biológicos para quantificar a inibição da NOX2 serão realizados no futuro.

Palavras-chave: NADPH oxidase; inibidores de NOX; avaliação in silico.

CAVALCANTE, Keoma Keyson Lima. **Síntese de híbridos apocinina-protocatecolato de heptila e avaliação in silico de potenciais inibidores de NOX2.** 2022. 64 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

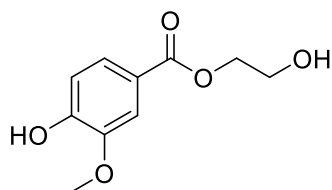
ABSTRACT

Oxidative stress is a subsequent effect of redox imbalance in living organisms. This condition is directly linked to the exaggerated production of Reactive Oxygen Species (ROS) and is associated with the progression of several inflammatory, degenerative and mutagenic diseases. The enzymes of the NADPH oxidase (NOX) family are known as the main sources of ROS (mainly NOX2), and their subunits dispersed in the cytosol have drawn attention as important molecular targets in the search for the prevention of diseases related to oxidative stress. This work aimed at the synthesis of a series of hybrid compounds as well as at the selective inhibition of NOX. In previous studies, polyphenols with long carbon chains are classified as good NOX inhibitors. As an example of this class: the heptyla protocatecolate ester, derived from protocatechuic acid, has a high NOX2 inhibition index, at the same time it acts on the reduction of ROS (antioxidant pathway). Aiming at the characteristics highlighted in these studies and discussing the dichotomy of the balance between hydrophilicity and lipophilicity for permeation of the cell membrane, it was thought for this work in the synthesis of hybrid compounds derived from apocynin and the heptyla protocatecolate ester as potential selective NOX inhibitors. The verification of molecular characteristics to measure the capacity of cellular permeation and access to NOX subunits was carried out with the theoretical bases of Lipinski and Veber's Rules and using free software that help in the calculation of physicochemical properties. The molecular characteristics were then planned from the esterification of the phenolic compound vanillic acid with diols of different carbon chains (lipophilic part) with hydroxyl groups (hydrophilic part) and ether oxygens in their chains. After a study of the best reaction conditions for the formation of compounds, these were obtained in the midst of secondary compounds, being amenable to purification by column chromatography, with yields of 33% to 90%. The identity of the compounds was confirmed by spectroscopic techniques (^1H and ^{13}C NMR). Biological assays to quantify NOX2 inhibition will be performed in the future.

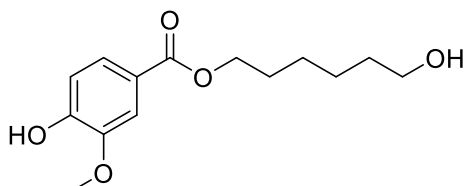
Key words: NADPH oxidase; NOX inhibitors; In silico evaluation.

LISTA DE ESTRUTURAS

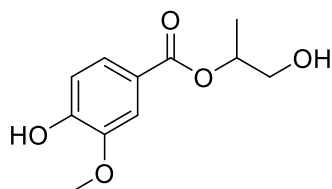
Composto 8a –



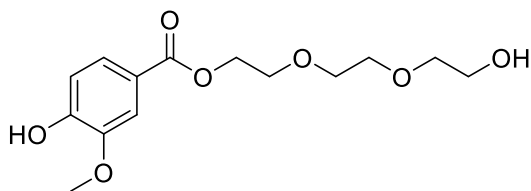
Composto 8b –



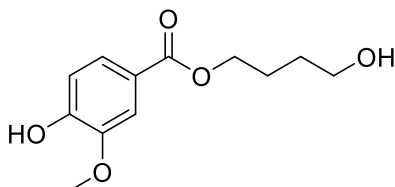
Composto 8c –



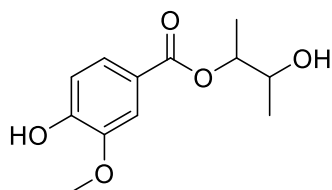
Composto 8d –



Composto 8e –



Composto 8f –



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Topologia simplificada, mostrando ambiente intra e extracelular, dos complexos desativados NOX1, NOX2 e NOX3	12
Figura 2 – Comparação de topologia transmembranar entre as NOX e DUOX.....	13
Figura 3 – Procedimento geral de fagocitose e ativação da NADPH oxidase	14
Figura 4 – Estrutura química de alguns inibidores de homólogos da NOX e/ou que atuam em outras vias de inibição para o estresse oxidativo	18
Figura 5 – Estruturas Moleculares do APC e EPH, dados de LogP e IC50 (inibição da NOX 2)	24
Figura 6 – Planejamento Estrutural dos derivados ésteres	26
Figura 7 – Fases percorridas pelo fármaco em sua administração oral até a produção do efeito terapêutico	27
Figura 8 – Expansão dos sinais no espectro de RMN de ¹ H do composto 8a	37
Figura 9 – Expansão dos sinais no espectro de RMN de ¹³ C do composto 8 ^a	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NOX	NADPH Oxidase
DUOX	Dual Oxidase
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ATP	Trifosfato de Adenosina
MPO	Mieloperoxidase
FAD	Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
DGC	Doença Granulomatosa Crônica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
LPS	Lipopolissacarídeo
DPI	Difenil Iodônio
EPH	Éster Protocateculato de Heptila
APC	Ácido Protocatecúico
TCCA	Ácido Tricloisocianúrico
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
DMF	Dimetilformamida
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
R _f	Fator de Retenção
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
TPSA	Área de Superfície Polar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	A FAMÍLIA DE NADPH OXIDASE.....	10
1.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) NA AÇÃO DOS NEUTRÓFILOS	14
1.3	AGENTES DE REGULAÇÃO DAS EROs.....	17
1.3.1	A Ação dos Compostos Fenólicos.....	19
1.3.2	Compostos Fenólicos e sua Ação Inibitória.....	21
1.4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	Resultados e discussão	28
3.1	AS REGRAS DE LIPINSKI <i>IN SILICO</i>	28
3.2	SÍNTESE DOS DERIVADOS ESTERIFICADOS	32
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS ESTERIFICADOS	37
4	CONCLUSÃO	40
5	METODOLOGIA	41
5.1	AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS <i>DERIVADOS</i>	41
5.2	PROCEDIMENTOS GERAIS	42
5.3	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	42
5.4	SÍNTESE DOS DERIVADOS	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	APÊNDICES	54
	APÊNDICE A – Espectros de RMN de ¹ H dos Derivados da Série.....	55
	APÊNDICE B – Espectros de RMN de ¹³ C dos Derivados da Série.....	61

1 INTRODUÇÃO

A enzima NADPH Oxidase 2 (NOX2), presente nos neutrófilos, têm a função biológica de produzir grandes quantidades de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), por meio de um *Burst* Oxidativo. Essas espécies atuam a favor do Sistema Imunológico ao agir sobre microrganismos invasores ao corpo humano. (BARBOSA et al., 2010)

Relatos da literatura citam várias enzimas que são capazes de produzir EROs, tais como oxidases (que catalisam processos redox, utilizando o oxigênio molecular como aceptor ou doador de elétrons), oxigenases (que catalisam as reações de captura de oxigênio elementar para formação de novas espécies oxidadas) e sintases (que catalisam os processos gerais de sínteses de moléculas). Dentre estes grupos de enzimas, a NADPH oxidase destaca-se por exercer a produção de EROs como função basal e única, não dependente de outros fatores. (ALTENHÖFER et al., 2015)

O *Burst* Oxidativo é entendido como um exagerada produção de espécies oxidativas. É uma condição que, associada à inaptidão de defesas antioxidantes dos sistemas vivos, leva ao Estresse Oxidativo, que pode desenvolver perda de funções biológicas pela oxidação de biomoléculas e destruição de tecidos. (BARBOSA et al., 2010; FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

Este trabalho tem centro na principal fonte endógena de produção das EROs, as NADPH oxidases, em destaque a NOX2, que embora seja a chave de ignição do sistema defensivo, em condições adversas e descontroladas, pode progredir a danos teciduais irreversíveis.

1.1 A FAMÍLIA DE NADPH OXIDASE

As NADPH oxidases são complexos enzimáticos que compõe em parte a estrutura da membrana plasmática de determinadas células. Estas enzimas são constituintes de uma “família de NOX” de sete enzimas que diferem entre suas estruturas e locais de atuação nos sistemas biológicos.

Chocry e Leloup (2019), em uma recente revisão, destacaram que o primeiro relato sobre as NOX foi em pesquisas a mais de 20 anos, sobre a Doença Granulomatosa Crônica (DGC). Nestas pesquisas, os autores apontavam a escassez da única proteína responsável pela produção de EROs em mecanismos de defesa, a proteína b₅₅₈, que atualmente é chamada de gp91^{phox} e é conhecida por ser uma subunidade constituinte da NOX.

Anos após os primeiros relatos, Faust e colaboradores (1995) mostraram que organismos que apresentam deficiência da gp91^{phox} ainda podiam gerar EROs. Este fato revelaria a existência de unidades até então desconhecidas, que também seriam responsáveis pela produção dessas espécies juntamente com a proteína gp91^{phox}. A partir deste ponto histórico, estudos comprovaram a existência e descrição dessas unidades. Atualmente são conhecidos sete homólogos da NADPH oxidase (Tabela 1), nomeadas de NOX1 a NOX5, mais as Dual Oxidases DUOX1 e DUOX2. Este homólogos se diferem pelo tecido/sistema em que se encontram, por pequenas variações em suas funções nestes tecidos e composições químicas. (ALTENHÖFER et al., 2015; FARIA et al., 2012)

Tabela 1 – Homólogos da classe de NADPH oxidase, exemplos de seus locais de detecção e quais espécies de EROs são produzidas por cada homólogo.

HOMÓLOGOS	PRINCIPAIS LOCAIS DE DETECÇÃO	PRODUÇÃO DE EROS
NOX1	Musculo Vascular Liso	O ₂ ^{-•}
NOX2	Fagócitos	O ₂ ^{-•}
NOX3	Sistema auditivo	O ₂ ^{-•}
NOX4	Células endoteliais, músculo esquelético e neurônios	H ₂ O ₂
NOX5	Baço e testículos	O ₂ ^{-•}
DUOX 1 e 2	Trato gastrointestinal e sistema tireoidiano	H ₂ O ₂

Fonte: Adaptado de Altenhöfer et al. (2015); Chocry e Leloup (2020); Lambeth (2004).

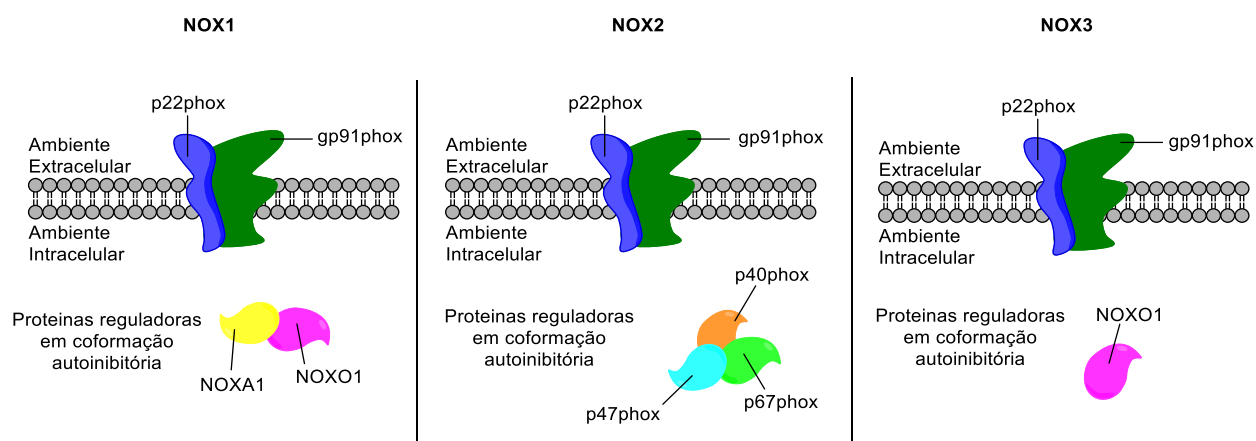
Em termos estruturais, todos os homólogos possuem dois polipeptídios (p22^{phox} e gp91^{phox}) como componentes formadores da membrana plasmática, formando o flavocitocromo b₅₅₈, que contém um grupo Dinucleotídeo de Flavina e

Adenina (FAD) como domínio redox, que age na ativação celular, transferindo elétrons do NADPH para oxigênio. (HANCOCK; DESIKAN; NEIL, 2001)

As diferenças entre as NOX estão evidentes em suas topologias (demonstradas nas figuras 1 e 2), que consistem em subunidades proteicas presas à membrana celular e outras dispersas no citosol, e que se alinham para ativação destes complexos. (CHOCRY; LELOUP, 2020)

Conforme demonstrado na figura 1, diferentes NOX possuem diferentes componentes proteicos dispersos no citosol (NOXA1 e NOXO1 para NOX1; p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox} para NOX2; assim como NOXO1 para NOX3). (HANCOCK; DESIKAN; NEIL, 2001)

Figura 1 – Topologia simplificada, mostrando ambiente intra e extracelular, dos complexos desativados NOX1, NOX2 e NOX3.

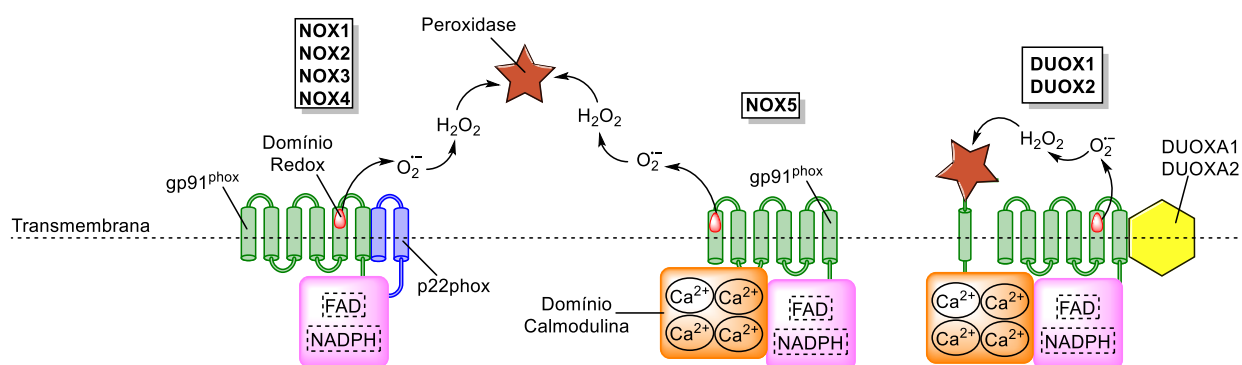


Fonte: Adaptado de Altenhöfer et al. (2015); Lambeth (2004).

Diferente das NOX, as Dual Oxidases (DUOX1 e DUOX2) são chamadas assim por conterem um domínio transmembrana com atividade peroxidase adicional ao que já existem nas NOX comuns. Outras divergências topológicas podem ser mais bem observadas na figura 2, notando-se também que as DUOX e a NOX5 são semelhantes pelo domínio calmodulina, que promovem ligações ao íon cálcio que modelam a conformação do complexo ativado e regulam os sítios enzimáticos.

(LAMBETH, 2004)

Figura 2 – Comparação de topologia transmembranar das NOX e DUOX.



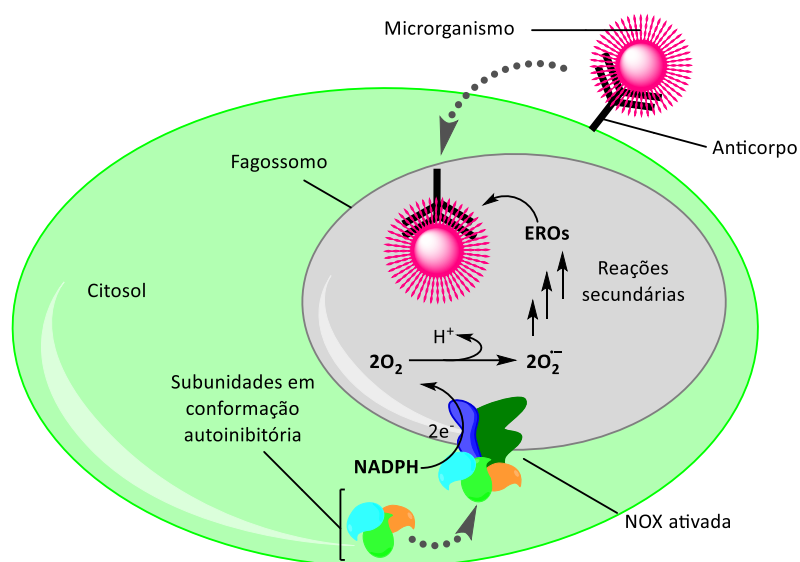
Fonte: Adaptado de Altenhöfer et al. (2015); Lambeth (2004).

Mais uma vez enfatiza-se que as enzimas da família NADPH oxidase têm como função basal a geração de EROs. No entanto, a quantidade dessas espécies, geradas pela NOX2 (durante o estímulo dos neutrófilos) é imensamente maior do que nas outras NOX. (HANCOCK; DESIKAN; NEIL, 2001) Assim, este trabalho centra-se no entendimento de que este é o melhor alvo molecular para tratamento do Estresse Oxidativo.

As funcionalidades da NOX2 vão desde sinalizações no organismo até a ação de mediadores anti-inflamatórios nos ciclos de defesa. (BABIOR, 1999; FARIA et al., 2012).

O método de ativação dos complexos nesse homólogo é amplamente discutido na literatura. Inicialmente, ocorre a detecção de microrganismos por meio dos receptores de anticorpos na membrana celular e segue-se para captura do microrganismo pelo processo de fagocitose (figura 3). (BABIOR; KIPNES; CURNUTTE, 1973; QUINN; AMMONS; DELEO, 2006)

Figura 3 – Procedimento geral de fagocitose e ativação da NADPH oxidase.



Fonte: Adaptado de Quinn, Ammons e Deleo (2006)

Este processo nato ao sistema imunológico engatilha a fosforilação das subunidades em conformação autoinibitória da NOX2, principalmente a subunidade proteica $p47^{phox}$, mudando suas conformações, e alinhando-as à porção enzimática transmembranar, formando assim o complexo ativado. (BELAMBRI et al., 2018)

Posterior à formação do complexo ativado, a NOX2 inicia um *Burst* Oxidativo, sintetizando EROs, as quais “matam” a célula juntamente com o microrganismo invasor englobado na etapa anterior. (BABIOR, 1999; DELEO et al., 1999; SCHRÖDER, 2019)

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) NA AÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

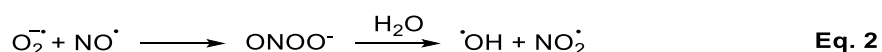
Como destacado anteriormente, os neutrófilos, como células de defesa, são funcionalizados para a captura de microrganismos e produzem, a partir de reações em cadeia, várias espécies oxidantes que atuam nos mecanismos redox das reações biológicas. (WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016)

A primeira etapa na produção de EROs (equação 1) ocorre pela transferência de elétrons da NADPH para a redução de oxigênio molecular, sintetizando o ânion

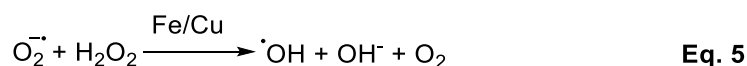
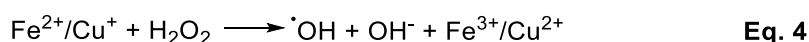
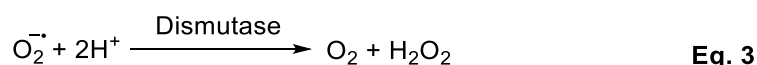
superóxido ($O_2^{\cdot-}$), precursor de todas as outras espécies reativas formadas, que se propagam e agem oxidando tecidos vivos.



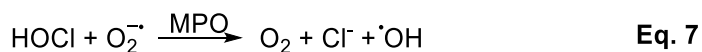
Frente às simultâneas reações secundárias deste processo, derivando-se do funcionamento de outros sistemas do organismo, o Óxido Nítrico, que funciona como vasodilatador, pode reagir (equação 2) suficientemente com o ânion superóxido para formação do ânion peroxinitrito, que se decompõe em fase aquosa para radical hidroxila e dióxido de nitrogênio, ambos com propriedade antimicrobiana. (HUIE; PADMAJA, 1993)



O Superóxido ainda pode sofrer transformação enzimática (equação 3) pela ação da dismutase, para geração de Oxigênio e Peróxido de Hidrogênio, que também tem função antimicrobiana. (BABIOR; KIPNES; CURNUTTE, 1973) Posteriormente, o peróxido formado pode reagir (equação 4) com Ferro ou Cobre para produzir o radical hidroxila (Reação de Fenton). Ou mesmo, a presença de metais de transição pode catalisar (equação 5) a produção deste radical (Reação de Haber-Weiss). (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004)



Por sua vez, grande parte do peróxido de hidrogênio formado ainda pode sofrer reação com íons cloreto (equação 6) por meio de mieloperoxidases (MPO) que catalisam a formação de Ácido Hipocloroso, seguida da formação do radical hidroxila (equação 7). (ERYILMAZ; PALABIYIK, 2013; RAMOS et al., 1992; WOLCOTT et al., 1994)



Com o detalhamento da produção destas moléculas de elevada reatividade, fica evidente que de forma evolutiva, as células de defesa têm seu papel principal na formação de um ambiente inóspito “com estresse oxidativo” para eliminação de patógenos. No entanto, quando não controlado, este ambiente oxidativo progride à alcances maiores, culminando em danos aos mais diversos tecidos vivos. (MITTAL et al., 2014)

Ao ressaltar os principais alvos moleculares das espécies reativas formadas durante o Estresse Oxidativo (tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos), pode-se perceber o paradoxo de que não somente a atividade antimicrobiana é observada neste sistema defensivo, mas também sua resposta adversa: a corrosão de tecidos vivos, causando injúria tecidual e doenças inflamatórias em todo o sistema biológico. (LI; JIA; TRUSH, 2016)

A exemplo deste efeito, as proteínas funcionais/estruturais aos sistemas vivos, quando oxidadas, sofrem mudanças físicas e têm suas funções celulares totalmente alteradas ou extinguidas. Ou mesmo a oxidação dos ácidos graxos existentes nas estruturas das membranas celulares ocorre progressivamente até à perda de seletividade nas trocas iônicas destas células, progredindo até a apoptose celular. (SILVA; GONÇALVES, 2010)

Atualmente, a literatura científica traz à tona diversas doenças causadas por injúrias teciduais pelo estresse oxidativo. Dentre maiores efeitos, podemos destacar: destruição de tecidos gastrointestinais; produção e multiplicação de células cancerosas do sistema hepático; modificação e destruição do genoma e do DNA mitocondrial; proliferação de células vasculares, indução de lesões no tecido vascular e redução da concentração de vasodilatadores, ocasionando doenças cardíacas, pulmonares e vasculares; inibição de funções enzimáticas; e progressão de patologias como aterosclerose. (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005; CAVE et al., 2005; QUINN;

AMMONS; DELEO, 2006)

1.3 AGENTES DE REGULAÇÃO DAS EROS

Com base na relevância da existência e funcionalidades da NADPH oxidase, se faz necessária a descoberta e o aperfeiçoamento de inibidores específicos e com elevada eficácia para os homólogos desta classe de enzimas. O que se tenta atingir atualmente, são modelos farmacológicos, que funcionem pelo bloqueio da transferência de elétrons, removendo ou prevenindo o acesso à NADPH oxidase pela interação com suas subunidades a nível molecular. (KLENIEWSKA et al., 2012; SELEMIDIS et al., 2008)

Segundo detalhamento de Chocry e Leloup (2019), os primeiros compostos a serem estudados para o tratamento das NOX foram direcionados inicialmente apenas ao controle do estresse oxidativo por meio de antioxidantes (espécies redutoras, tais como vitaminas e flavonoides) que reduziriam as EROs produzidas pelos sistemas do organismo.

De grande importância biológica, os antioxidantes desempenham papel de proteção quanto aos efeitos citotóxicos de radicais livres, podendo ser produzidos endogenamente ou mesmo consumidos de acordo com a dieta nutricional balanceada. (BARBOSA et al., 2010; LIGUORI et al., 2018)

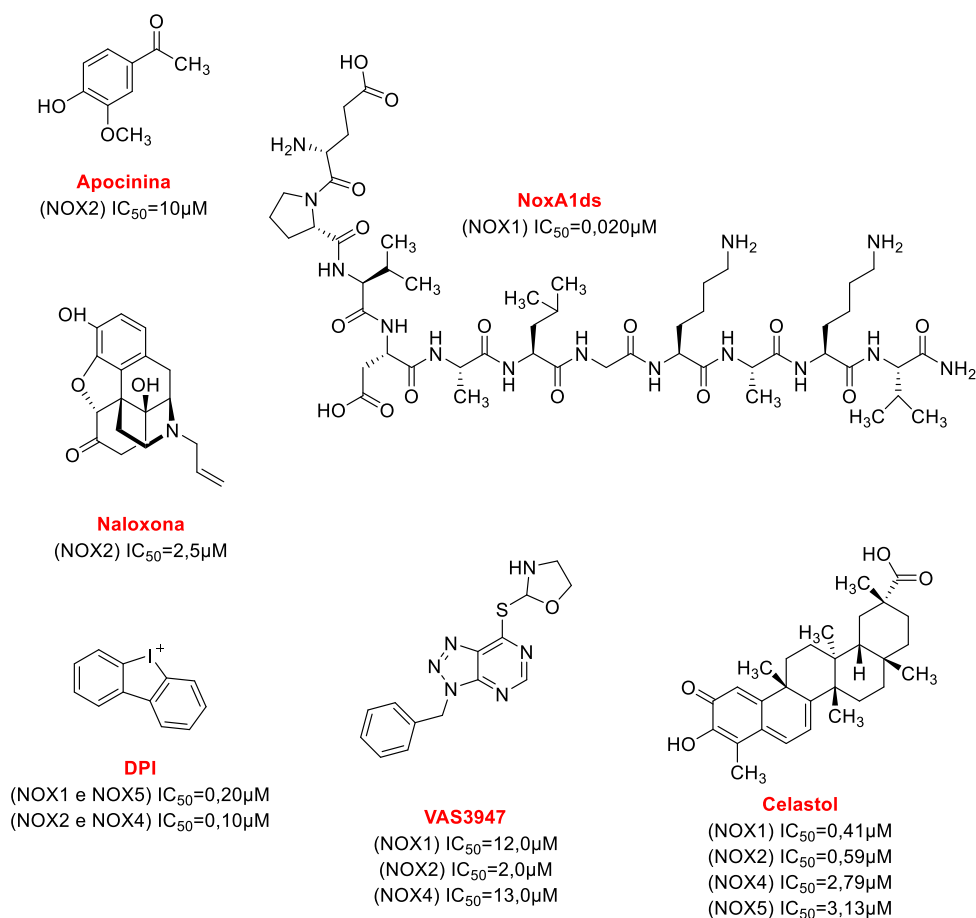
De modo geral, os antioxidantes agem doando elétrons às EROs, neutralizando seus efeitos adversos. Podem agir tanto na prevenção da progressão do estresse oxidativo, mantendo minimizada a formação de radicais livres, quanto na interceptação e eliminação de espécies reativas usando moléculas catalíticas, e ainda, agem na reparação de certos alvos moleculares. (KUNWAR; PRIYADARSINI, 2011)

Em contrapartida, a ação inespecífica dos compostos antioxidantes, leva as pesquisas mais atuais, que envolvem o controle do estresse oxidativo a se direcionarem para o estudo das estruturas biológicas (tais como a NOX2), que são formidáveis alvos moleculares para a inibição da produção de EROs.

Algumas características semelhantes (estruturais e químicas) podem ser destacadas em possíveis inibidores da NOX, como por exemplo um sítio redox e/ou uma porção eletrofílica, além de comumente serem compostos aromáticos e lipofílicos, tais como observadas nos compostos flavonoides, catecóis e nos derivados de iodo. (FARIA et al., 2012; WINGLER et al., 2011)

Desde a descoberta das NOXs, diversos inibidores foram estudados e muitos, ainda hoje são demonstrados, sem entendimento esclarecido dos seus mecanismos precisos de inativação. Na figura 4 são indicadas as estruturas moleculares de alguns compostos que agem como inibidores das NOX.

Figura 4 – Estrutura química de alguns inibidores de homólogos da NOX e/ou que atuam em outras vias de inibição para o estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de Altenhöfer et al. (2015); Chocry e Leloup (2020); Wind et al. (2010)

Pode-se notar a diversidade estrutural das moléculas utilizadas como inibidores dos diferentes homólogos da NADPH oxidases: a apocinina, que se trata de um composto fenólico; o composto derivado da pirimidina VAS3947; a Naloxona, que é derivada de compostos fenantrenicos; o Celastol, que é derivado de compostos com anéis quinonoidicos; o DPI, que representa a classe de compostos derivados de iodo; e por fim, o composto NoxA1ds, representando os inibidores peptídicos.

1.3.1 A Ação dos Compostos Fenólicos

No espectro de ação para controle do estresse oxidativo, os compostos fenólicos são comumente muito apreciados por suas atuações antioxidantes (capturando e reduzindo EROs), uma vez que são capazes de formar espécies energeticamente estabilizadas pelo efeito de ressonância aromática. (SOARES, 2002)

Na década dos anos 80, o composto natural 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, conhecido por Apocinina (figura 4), foi extraído e isolado das raízes da planta *Picrorhiza kurroa*. (ATAL et al., 1986; STOLK et al., 1994) Apenas na década seguinte, a primeira hipótese sobre seu mecanismo de atuação biológica foi levantada: tratando-se da interferência na locomoção intracelular das unidades citosólicas para formação do complexo ativado da NOX2. (STOLK et al., 1994)

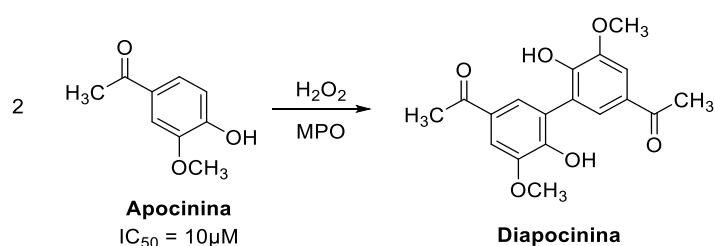
No entanto, nos anos seguintes, os testes clínicos em diferentes tipos de células, comprovaram que a apocinina agiria apenas na captura (redução) de EROs e não diretamente como antagonista (bloqueador) da NOX2. (RABÉLO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, 2010; WIND et al., 2010)

Na comunidade científica houve uma cisão, em que os dois mecanismos de ação eram defendidos. Neste tempo, foi descrito que a capacidade inibitória da apocinina à NOX2 estava associada à sua ativação por mieloperoxidases (MPO), uma vez que o apocinina não é capaz de inibir processos de oxidação em células com deficiência de MPO. (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008)

Estudos posteriores confirmaram esta narrativa, demonstrando que um processo de dimerização (esquema 1) por meio das MPO seria o mecanismo de

ativação do pró-fármaco apocinina.

Esquema 1 – Processo de dimerização da Apocinina.



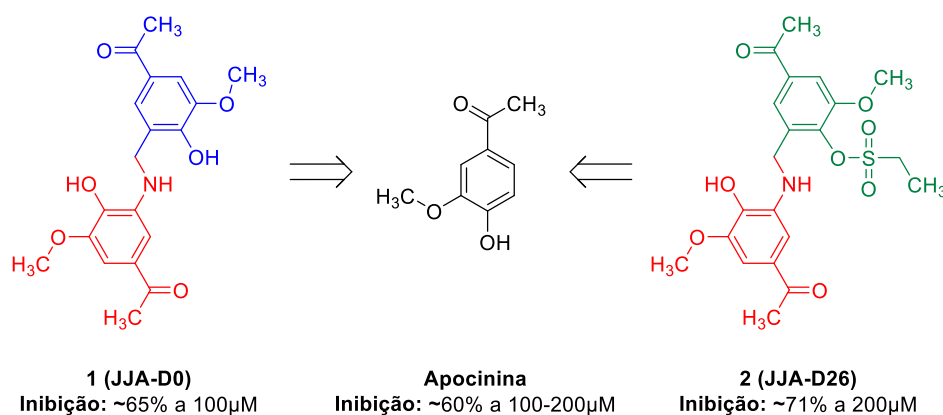
Fonte: Adaptado de Stefanska e Pawliczak (2008)

Deste modo, hoje é conhecido que a apocinina age principalmente como antioxidante e, após sua entrada no ambiente intracelular, seu dímero seria formado e apenas este é capaz de inibir a ativação da NADPH oxidase. (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008) A potente inibição deste composto, que sofre alteração por ação da MPO, foi descrita em neutrófilos humanos com IC_{50} de $10\mu M$. (CHOCRY; LELOUP, 2020)

Na área de síntese orgânica, Wang e colaboradores (2017), em um recente estudo, mostram a versatilidade de compostos derivados da diapocinina: 14 novos derivados diméricos apresentam fortes indícios de atividade antioxidante, anti-inflamatória e de inibição da NOX.

Os autores destacam a potencial utilização dos derivados **1** e **2** com melhores atividades nos testes de viabilidade celular em citotoxicidade induzida, ou seja durante a verificação de suas capacidades de ação na diminuição da produção de EROs, (esquema 2) como candidatos para desenvolvimento de novos produtos terapêuticos para o tratamento de injúrias por estresse oxidativo. Destacam ainda que seus efeitos são melhores que os da diapocinina quanto a inibição da translocação das subunidades citosólicas ($p47^{phox}$ e $gp91^{phox}$) para ativação da NOX2.

Esquema 2 – Derivados da apocinina/diapocinina com atividade significativa na inibição da NOX2 e a sua capacidade de inibição da produção de EROs.

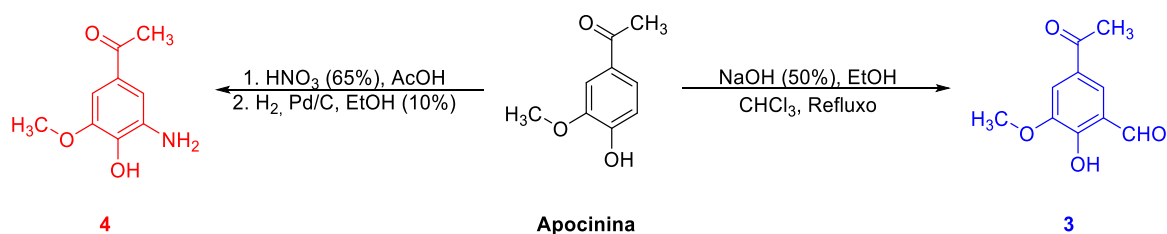


Fonte: Adaptado de Wang et al. (2017)

1.3.2 Compostos Fenólicos e sua Ação Inibitória

Na rota de síntese apresentada por Wang e colaboradores (2017), a apocinina foi funcionalizada previamente para a formação dos precursores **3** e **4** (Esquema 3). Desta forma, o composto **3** foi obtido pela reação de *orto*-formilação e o composto **4** foi obtido pela nitração da apocinina, seguido da reação de redução.

Esquema 3 – Procedimento de funcionalização da apocinina, para formação de precursores dos derivados diméricos.

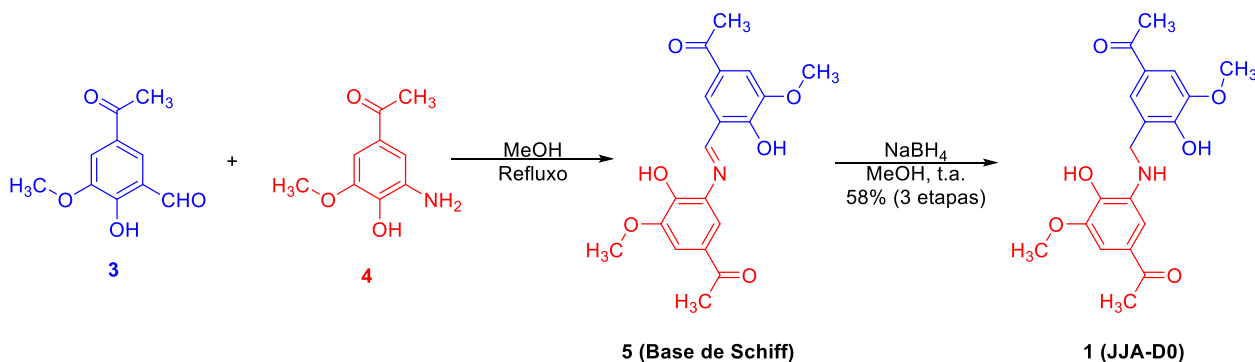


Fonte: Adaptado de Wang et al. (2017)

Os compostos **3** e **4** (Esquema 4) foram submetidos a formação de uma base de Schiff, por meio de uma reação de adição nucleofílica do grupo amino de **4** à carbonila em **3**, seguido de redução da imina na presença de NaBH₄, levando à

formação de JJA-D0 (**1**) em 58% de rendimento para 3 etapas. (WANG et al., 2017)

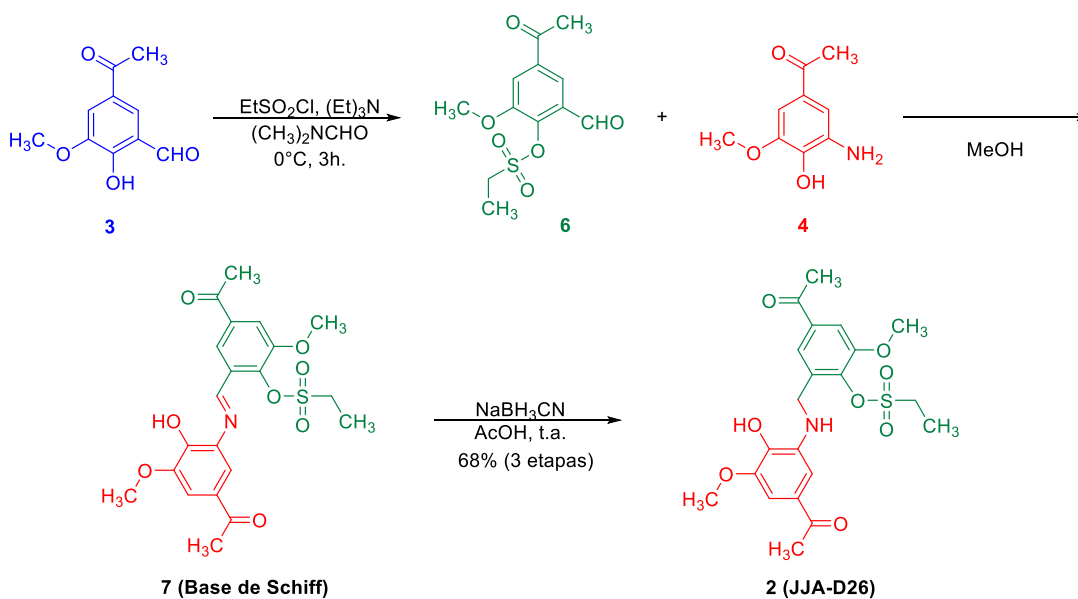
Esquema 4 – Procedimento de síntese do composto **1** (JJA-D0)



Fonte: Adaptado de Wang et al. (2017)

O composto **3** ao ser submetido a uma reação de substituição, e após a entrada do grupo etanosulfonila, levou à formação de **6** (Esquema 5). Posteriormente uma nova base de Schiff (**7**) foi obtida através de uma condensação entre os compostos **4** e **6**, cuja redução utilizando NaBH_3CN e ácido acético glacial levou à formação do derivado JJA-D26 (**2**), em 68% de rendimento global para 3 etapas. (QI et al., 2017; WANG et al., 2017)

Esquema 5 – Procedimento de síntese do composto **2** (JJA-D26)



Fonte: Adaptado de Wang et al. (2017)

Um campo de estudo, mais específico dentro dos compostos fenólicos, são os ácidos carboxílicos fenólicos, que possuem a vantagem de serem encontrados em abundância na natureza e premissas antioxidantes, além de comprovada atuação em mecanismos antivirais, antibacterianos e anticarcinogênicos. (MERKL et al., 2010; SOARES, 2002)

Sua ação mais comum é prevista pela captura (redução) de radicais livres e na formação de quelatos com metais associados ao processo de Estresse Oxidativo. Acredita-se que a atuação dos ácidos fenólicos na captura destes radicais seja principalmente devido à favorável doação do átomo de hidrogênio por interações do grupo fenólico dentro das “engrenagens” de desempenho dos neutrófilos. Deste modo, os substituintes do anel aromático destes ácidos têm papel fundamental na estabilização dos intermediários, afetando diretamente a capacidade de redução de EROs. (KUMAR; GOEL, 2019; SOARES, 2002)

A exemplo dessa classe de compostos carboxílicos fenólicos, veja-se o ácido 3,4-hidroxi-benzóico, usualmente conhecido como ácido protocatecuico (APC, figura 5), que pode ser encontrado em diversas plantas medicinais e comestíveis, tendo comprovada atividade sobre a captura de radicais, além de funcionar como analgésico e anti-inflamatório. (LENDE et al., 2011; ZERAIK et al., 2014)

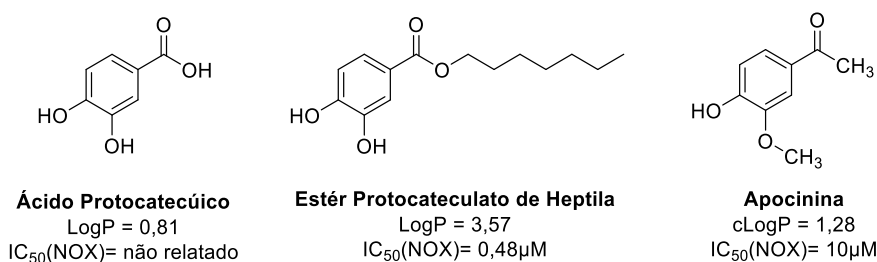
Existem ainda estudos que demonstram evidências positivas na atuação da propriedade hidrofóbica dos compostos fenólicos como ponto fundamental na eficácia de seu mecanismo de ação inibitória da NOX. A esterificação de compostos fenólicos tem sido utilizada para induzir melhores efeitos antioxidantes destes compostos, além de ser uma metodologia clássica de aumento do caráter hidrofóbico de um ácido carboxílico. A exemplo de esterificações utilizadas para este fim, podemos citar a conversão do ácido protocatecuico ao éster protocateculato de heptila (EPH, figura 5): aumentando seu grau de lipofilicidade e seu fator de inibição em relação a apocinina em aproximadamente 10 vezes. (FARIA et al., 2012)

Este efeito benéfico, devido à ampliação da porção lipofílica, destacou aos autores a evidência de que a ação deste éster teria dependência na sua

permeabilidade à membrana celular, para acessar as subunidades da NOX no citosol.

O grau de medição da lipofilicidade que pode ser utilizado, para comparação entre os compostos, é o coeficiente de partição (LogP). Na literatura, no entanto, não há indicação o IC₅₀ do ácido protocatecuico, para comparação com o éster, entende-se que, talvez, por conta das hidroxilas presentes, o composto não consiga acessar a subunidades da enzima, funcionando apenas como um antioxidante, mas não como inibidor da NOX.

Figura 5 – Estruturas Moleculares do APC e EPH, dados de LogP e IC₅₀ (inibição da NOX 2).



Fonte: Adaptado de Faria et al. (2012); Petrônio et al. (2013); Stefanska e Pawliczak (2008).

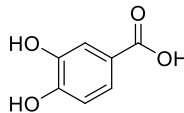
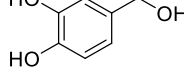
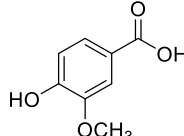
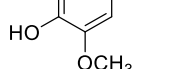
Ainda, Faria e colaboradores (2012) mostram que os resultados de inibição não devem ser devido à captura e redução de EROs (especificamente O₂^{-•}, originário no processo fagocítico), uma vez que a concentração do éster utilizada nos ensaios *in vitro* não seria suficiente para a ação desta maneira. E ainda, apelam à atenção que deve ser dada a compostos derivados de ésteres fenólicos, quanto a sua ótima permeação na membrana celular, para acesso ao alvo molecular.

Na pesquisa de Merkl e colaboradores (2010), as ideias convergem aos resultados de Faria e colaboradores (2012), mostrando também que existe uma diminuição da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em relação ao aumento da cadeia carbônica dos ésteres fenólicos, frente a diferentes tipos de microrganismos (esquema 6).

Estes efeitos, mais uma vez, são explicados pela grande proporção lipídica

das paredes celulares, permitindo a entrada facilitada dos compostos esterificados. (MERKL et al., 2010)

Esquema 6 – Relação entre diferentes ésteres derivados de ácidos carboxílicos, e seus respectivos dados de CIM (em mM) frente aos microrganismos *Fusarium culmorum* (em azul) e *Saccharomyces cerevisiae* (em vermelho).

		Ácido	Ésteres			
			Metílico	Etílico	Propílico	Butílico
Ácido Protocatecúico		>20,00	5,00	2,50	2,50	<1,25
		>20,00	5,00	2,50	2,50	<1,25
Ácido Vanílico		20,00	5,00	2,50	2,50	2,50
		10,00	2,50	<1,25	<1,25	<1,25

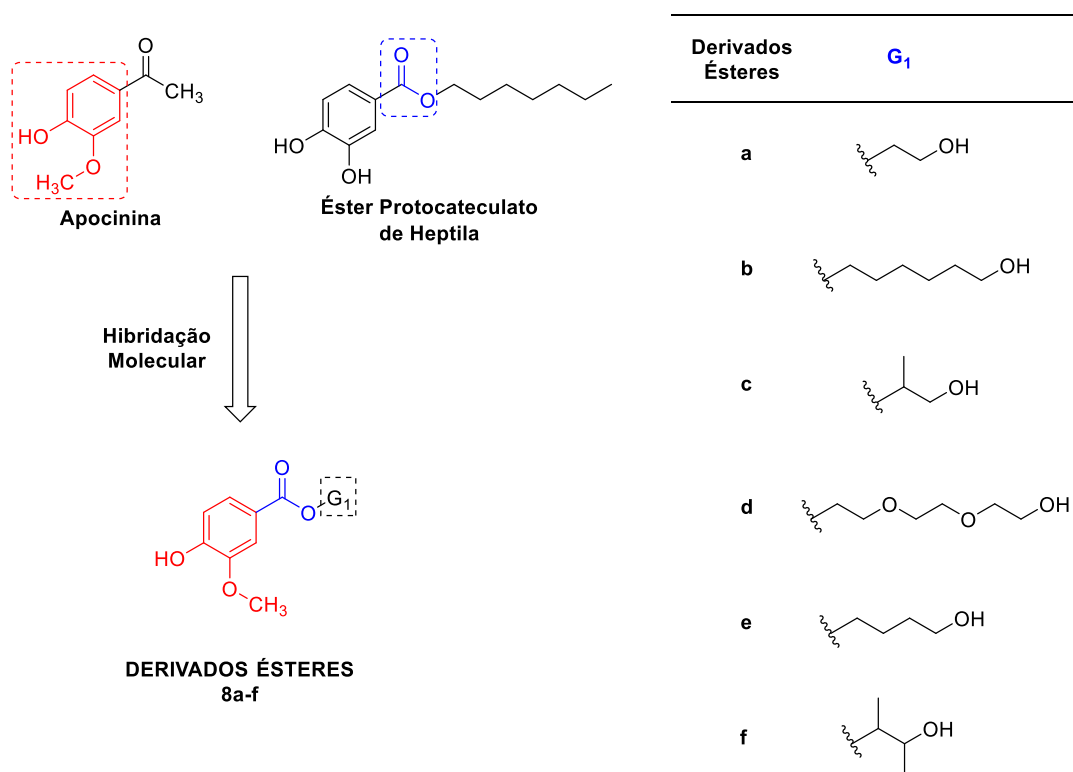
Fonte: Adaptado de Merkl et al. (2010).

1.4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Em busca de um melhor equilíbrio entre os fatores de hidrossolubilidade e lipofilicidade, a fim de mensurar a importância lipofílica na permeabilidade celular e seu contrabalanço com a hidrofiliabilidade, foi planejada, nesse trabalho, a síntese de uma série de compostos esterificados, idealizados por hibridação molecular: novas moléculas que mantêm os dois possíveis grupos farmacofóricos diretamente unidos (metoxicatecol da apocinina e carboxila do EPH) com modificações na cadeia carbônica (que funcionam como incremento de lipofilicidade), além da avaliação *in silico* destes compostos para verificar sua capacidade de permeação na membrana celular para atingir as subunidades citosólicas da NOX2.

A série planejada está apresentada na Figura 6, contendo ésteres com cadeias laterais (lineares e ramificadas) derivatizadas com adicionais grupos hidroxila terminais (polares) e oxigênios de éteres.

Figura 6 – Planejamento Estrutural dos derivados ésteres.



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Sintetizar e avaliar *in silico* derivados híbridos da apocinina e do éster EPH, para, posteriormente, avaliar seus possíveis efeitos frente à NADPH oxidase 2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e mensurar, de acordo com estudos *in silico*, as propriedades físico-químicas dos ésteres sintetizados e suas capacidades de permeação.

- Destacar a importância da “cauda” hidrofóbica dos ésteres sintetizados na permeação molecular.

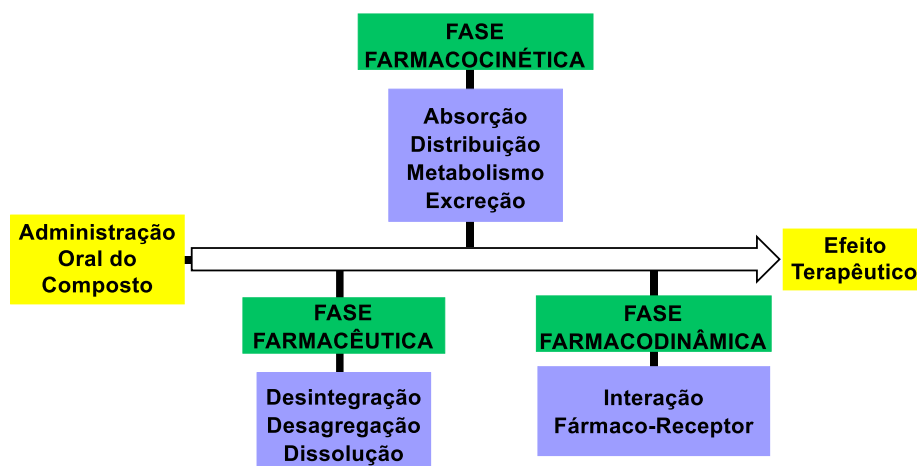
- Sintetizar e caracterizar derivados híbridos da apocinina e éster EPH com diferentes cadeias carbônicas lineares ou ramificadas, contendo oxigênio de éter e/ou álcool.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AS REGRAS DE LIPINSKI *IN SILICO*

Na aplicação prática da descoberta de novos compostos líderes dentro da Química Farmacêutica e Medicinal requer-se, pela indústria farmacêutica, estudos que mostrem a influência dos compostos na etapa farmacocinética (Figura 7).

Figura 7 – Fases percorridas pelo fármaco em sua administração oral até a produção do efeito terapêutico.



Fonte: Adaptado de Barreiro e Fraga (2015).

Estes estudos têm a função principal de prever a biodisponibilidade oral das moléculas, uma vez que esta é a principal via de utilização dos medicamentos atualmente, com vantagens de baixos custos, facilidade de adesão pelos pacientes e maior segurança. (DE SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; RODRIGUES et al., 2021; SILVERMAN; HOLLADAY, 2015)

O ato de mensurar, por meio de medidas e regras pré-estabelecidas, o fator de biodisponibilidade de um composto, é uma estratégia válida para que não ocorram possíveis falhas na proposta e planejamento de um bom composto líder. Essa necessidade pode se basear no fato de que pouco menos de 10% dos candidatos são levados aos testes clínicos e que grande parte dos compostos líderes falham desde seu desenvolvimento devido a lapsos em seus perfis farmacodinâmicos e

farmacocinéticos. (DAINA; ZOETE, 2016)

Em geral, conforme enunciado por Silverman e Holladay (2015), à medida que se progride nas fases clínicas, o número de candidatos aprovados às próximas etapas, se torna cada vez menor. Por isso, é imprescindível se valer de teorizações que aproximem as propriedades farmacológicas dos compostos estudados aos fármacos já no mercado, examinando seus potenciais farmacocinéticos e até metabólicos.

Compostos com perfil altamente hidrossolúvel apresentam, na fase farmacêutica, uma boa dissociação nos líquidos do trato gastrointestinal, fator que aumenta ainda mais a sua probabilidade de absorção (que ocorre na fase seguinte). Contudo, a fase farmacocinética fica comprometida, pois a baixa lipofilicidade deste composto pode indicar que apenas uma pequena porção será capaz de permear membranas celulares (lipofílicas) e, portanto, pouco distribuído pelo organismo. (BARREIRO; FRAGA, 2015; SILVERMAN; HOLLADAY, 2015)

Em contrapartida, o elevado índice lipofílico de um composto mantém a ideia de que na fase farmacêutica, a sua dissociação não seja efetiva, resultando em uma fácil associação às proteínas plasmáticas, e tornando-o um melhor substrato às enzimas metabólicas (presentes no intestino e fígado), que agem, por sua vez, como função inerente ao metabolismo humano, resultando na diminuição do tempo de meia-vida do composto circulante no organismo. (SILVERMAN; HOLLADAY, 2015)

Utilizando-se de estimativas computacionais sobre hidrossolubilidade e permeabilidade celular, as Regras de Lipinski foram formuladas observando-se que a baixa absorção de um composto ocorre comumente quando a molécula deste composto tem: mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio; mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio; massa molecular maior que 500 unidades; e valor de LogP calculado (cLogP) maior que 5. (LIPINSKI et al., 1997) Em condições de expandir as regras postuladas por Lipinski, sob conceituações semelhantes, Veber e colaboradores (2002) pesquisaram sobre a biodisponibilidade de uma biblioteca de 1100 candidatos a fármacos. Dentre as suas descobertas, foi possível prever/determinar que este fator está intrinsecamente ligado ao número de 10 ou

menos ligações rotacionáveis, assim como a baixa Área de Superfície Polar (PSA). Foi determinado ainda neste trabalho um valor ótimo de PSA para a absorção do composto no intestino (menor ou igual a 140 Å). (SILVERMAN; HOLLADAY, 2015; VEBER et al., 2002)

Em termos gerais, uma molécula não deve apresentar duas ou mais violações das Regras de Lipinski (e extensões de Veber) para que suas características sejam adequadas a uma boa biodisponibilidade oral (em adjacências de solubilidade e permeabilidade). E ainda, compostos que atendem aos critérios de Lipinski e Veber são comumente referenciados como *drug-like*. (SILVERMAN; HOLLADAY, 2015)

Neste trabalho utilizamos destas predisposições teóricas com a intenção de mensurar a capacidade das moléculas sintetizadas de serem absorvidas, via transporte passivo, pelas membranas celulares para acesso as subunidades citosólicas da NOX.

A Tabela 2 foi construída a partir dos dados coletados para os derivados propostos nesse trabalho, utilizando as plataformas *SwissADME* e *OSIRIS Property*. Possibilitando uma visão prévia da interação com as paredes hidrofóbicas das membranas celulares para a sua absorção ao citosol.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas da série de compostos esterificados. (Destaque em azul os melhores dados e em vermelho a violação às regras.)

COMPOSTO	8a	8b	8c	8d	8e	8f
Nº de Violações	0	0	0	1	0	0
LogP consensual	1,04	2,27	1,34	1,11	1,70	1,65
TPSA (Å)	75,99	75,99	75,99	94,45	75,99	75,99
Massa Molar	212,20	268,31	226,23	300,30	240,25	240,25
Aceptores de H	5	5	5	7	5	5
Doadores de H	2	2	2	2	2	2
Ligações Rotacionáveis	5	9	5	11	7	5

Como já esperado, devido ao tamanho da cadeia do diol utilizado: dentre a série de moléculas sintetizadas, apenas o composto **8d** apresentou uma violação das regras Lipinski e Veber, decorrente da quantidade de ligações rotacionáveis.

Conforme mostrado nos dados da tabela, as propriedades dos compostos estão dentro do esperado para as Regras de Lipinski (e extensões de Veber). E, neste primeiro momento, o que mais nos interessa é a probabilidade de permeação desses compostos pela membrana (lipofílica) celular.

Os dados de LogP (consensual) foram obtidos a partir da junção entre diferentes métodos de cálculo deste índice, calculados a partir de fragmentos moleculares e contribuições atômicas. Este índice, utilizado para mensurar a lipofilicidade, mostram aqui um aspecto de boa permeação dos compostos pelo membranas celulares, com valores menores que 5 (variando entre 1,04 e 2,27).

Ainda, de encontro a estes dados, os ótimos valores calculados das demais propriedades relativizam ainda mais a boa permeabilidade pelas membranas celulares. Por exemplo, os dados de TPSA (do inglês *Topological Polar Surface Area*, um cálculo de PSA na superfície tridimensional), que indicam uma soma em modelo tridimensional das áreas polares das moléculas que são usados para avaliar diretamente sua possibilidade de dissolução em ambiente hidrofílico e permeação de membrana.

A Massa Molecular, a quantidade de Ligações Rotacionáveis e de Doadores e Aceptores de ligação de hidrogênio, atuam também sobre o entendimento dos dados de permeação pelas membranas lipofílicas, uma vez que são propriedades intrínsecas de medição da polaridade e solubilidade das moléculas.

Uma descrição mais clara pode ser pensada: a quantidade de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio e o número de ligações rotacionáveis tende a aumentar com o aumento da massa molecular e estes são fatores que implicam diretamente no coeficiente de partição (LogP).

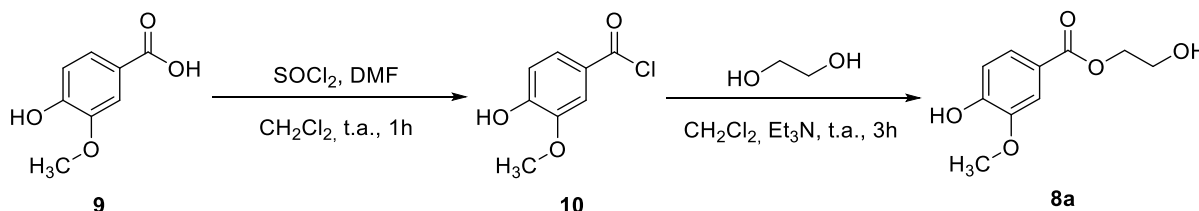
Além de que os átomos de grupos doadores e aceptores de ligação de

hidrogênio, comumente nitrogênio e oxigênio, aumentam a polaridade da molécula, e conseqüentemente, modificam o valor de LogP e aumentam o valor de TPSA.

3.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS ESTERIFICADOS

A síntese dos derivados iniciou com a preparação de **8a** a partir do ácido vanílico (**9**), onde foi empregada uma adaptação (Esquema 7) da metodologia descrita por Bispo et al. (2012). Utilizou-se diclorometano como solvente reacional, na presença de cloreto de tionila (SOCl_2) e dimetilformamida (DMF) para a formação do respectivo cloreto de ácido (**10**) após 1h de agitação à temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente e nova solubilização em diclorometano, foi adicionado etilenoglicol e trietilamina (Et_3N), mantendo-se a agitação durante 3h à temperatura ambiente.

Esquema 7 – Esterificação do ácido vanílico com etilenoglicol, com DMF.



Fonte: Adaptado de Bispo et al., (2012)

O acompanhamento da reação por CCD (cromatografia em camada delgada) evidenciou a formação de manchas com R_f muito próximos, indicando a produção de subprodutos e apenas o consumo parcial do ácido vanílico (**9**). Com essa mistura de difícil separação, partiu-se para tentativas de modificações no procedimento experimental para uma melhor condição reacional.

Ao testar a reação sem DMF e solvente, a placa de CCD evidenciava manchas bem definidas e com boa separação, indicando que essa alteração poderia favorecer a formação de menos compostos secundários. Assim, novas tentativas foram realizadas avaliando-se a quantidade de equivalentes de SOCl_2 , a temperatura e o tempo reacional para se consumir todo o material de partida sem a geração de

produtos secundários (Tabela 3). Em todas as entradas a reação foi realizada com o preparo de uma solução contendo SOCl_2 em etilenoglicol e posteriormente adicionado ácido carboxílico.

Pode-se observar nas entradas 1 e 4 da Tabela 3 que a obtenção do produto é favorecida em menores quantidades de cloreto de tionila e maiores temperaturas, respectivamente.

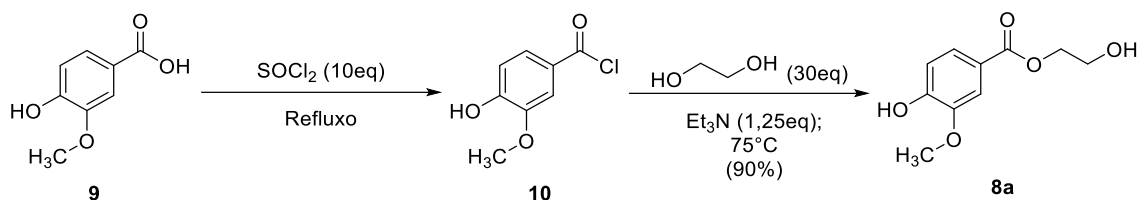
Tabela 3 – Dados experimentais para formação de **8a**, comparando diferentes escolhas de temperatura, equivalentes de Cloreto de Tionila e tempos de reação.

ENTRADA	TEMPERATURA	SOCl_2 (eq)	Tempo (h)	Rendimento
1	Ambiente	2	20	45,3 %
2	Ambiente	5	84	15,0 %
3	Ambiente	10	132	42,1 %
4	100 °C	5	2	71,6 %

Apesar de um rendimento moderado de aproximadamente 72%, decidiu-se testar a reação em duas etapas verificando a formação do cloreto de ácido antes da adição do diol. Nessa proposta utilizou-se a temperatura de refluxo do SOCl_2 (75 °C) em ambas as etapas, ainda sem a adição de diclorometano (Esquema 8), em procedimento adaptado de Costa et al. (2012), Alokam et al. (2014) e Fabris (2019).

Nesta nova condição, o total consumo do ácido vanílico (**8**) foi verificado via CCD. Ao transferir uma pequena alíquota da mistura reacional para um *ependorf* e adicionar algumas gotas de metanol, foi possível observar na placa cromatográfica (eluente hexano:acetato de etila, 4:6) a presença de uma mancha de maior R_f (0,57) quando comparado ao R_f (0,28) do ácido precursor, evidenciando a formação de um éster metílico na placa cromatográfica e, conseqüentemente, do cloreto de ácido na reação. Assim, a agitação da mistura foi interrompida e os produtos voláteis foram removidos por evaporador rotativo à pressão reduzida. Depois, seguiu-se com a adição de etilenoglicol e trietilamina, mantendo-se sob agitação à 75 °C, para formação do éster correspondente em 90% de rendimento após purificação por coluna cromatográfica.

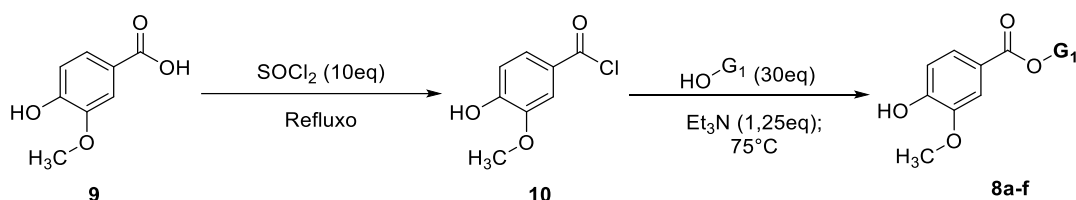
Esquema 8 – Rota Sintética para obtenção do derivado éster 8a.



Ao verificar o alcance do excelente rendimento de 90%, seleccionou-se essa condição para a preparação dos outros derivados propostos (**8b-f**).

Assim, após formação do cloreto de ácido vanílico (aproximadamente 3 h de reação), o poliálcool correspondente foi adicionado ao balão reacional e mantido sob agitação à 75 °C até que fosse consumido todo o material de partida. O tempo reacional da etapa de esterificação, rendimento e características dos produtos obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados reacionais de tempo (em horas) e rendimento em duas etapas (em porcentagem) para os compostos 8a-f.

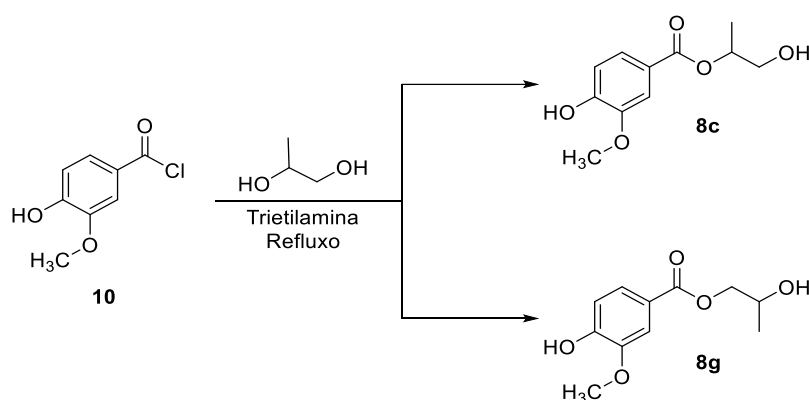


Composto	G ₁	Característica Física	Tempo (h)	Rendimento (%)
8a		Óleo Castanho	3	90
8b		Sólido Branco	47	63
8c		Óleo Castanho	23	40
8d		Óleo Branco	3	33
8e		Óleo Amarelado	38	85
8f		Óleo Amarelado	3	82

Ao baixo rendimento observado no caso de **8d**, associa-se ao fato de que o bruto reacional continha subprodutos com fatores de retenção (Rf) muito próximos, dificultando a sua purificação.

No caso específico da síntese do composto **8c** (Esquema 9), a reação foi inicialmente pensada utilizando o propilenoglicol na presença do cloreto de ácido para gerar o composto **8g**. Essa proposta se baseava no fato da hidroxila primária, devido ao fator estérico, ser mais nucleofílica que a secundária e, conseqüentemente, atacaria a carbonila na reação de substituição acílica.

Esquema 9 – Possibilidades de formação de dois ésteres (**8c** e **8g**) a partir do cloreto de ácido vanílico (**10**) e do propilenoglicol na metodologia aplicada.



Contudo, após o consumo do material de partida, finalização da reação e purificação por coluna cromatográfica, o único produto caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C, surpreendentemente, foi o **8c**. Nesse contexto, uma nova modificação experimental foi proposta para a obtenção do composto desejado **8g**.

Para se evitar o aumento no número de etapas reacionais que resultaria da utilização de grupos de proteção da hidroxila secundária, foi idealizado que um abaixamento na temperatura da reação pudesse favorecer o ataque apenas da hidroxila primária, mais reativa, o que levaria à formação de **8g**. Assim, nova tentativa de síntese de **8g** foi feita de modo que a segunda etapa reacional fosse mantida à temperatura ambiente. O bruto reacional foi purificado em coluna cromatográfica, mas não foi possível observar a formação de nenhum dos compostos **8c** ou **8g**.

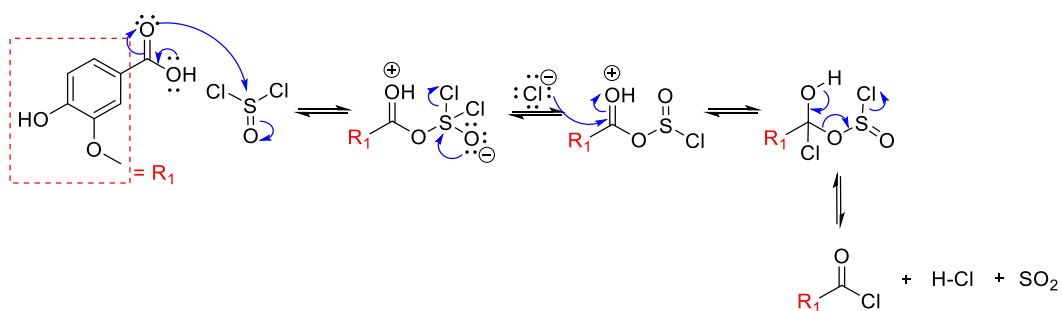
Na tentativa de buscar uma explicação para a ocorrência deste fato, utilizamos o software Firefly/GAMESS para realizar um cálculo de otimização geométrica para cada molécula. Este tipo de cálculo computacional leva em consideração dados como modos vibracionais das ligações e energia potencial da superfície molecular. (SA'ID; BABAJI, 2017)

No entanto, os dados de energia obtidos para as duas moléculas foram praticamente idênticos, o que inviabilizaria uma explicação pela energia contida nos produtos **8c** e **8g**. Uma proposta seria de que o composto **8c** seja mais facilmente formado, mesmo que pelo ataque da hidroxila secundária como nucleófilo, pois a energia do estado de transição para sua formação seria menor. No entanto a comprovação desta proposta requer cálculos mais avançados sobre os estados de transição nos mecanismos envolvendo os dois compostos.

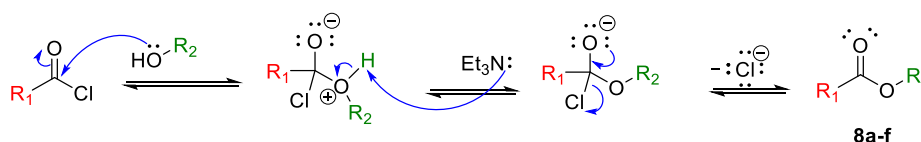
Ao final, uma proposta geral de mecanismo para a formação dos produtos apresentados está delineada no Esquema 10.

Esquema 10 – Proposta de mecanismo para esterificação de ácido vanílico.

ETAPA 1



ETAPA 2



Neste, é mostrado que ocorrem dois mecanismos sucessivos de adição-eliminação na etapa 1. Na primeira etapa reacional, o ácido vanílico age como nucleófilo, atacando o enxofre do cloreto de tionila e deslocando um par de elétrons

da ligação dupla (S=O) para o oxigênio. Com o movimento de deslocalização eletrônica, o aduto formado libera o íon cloreto (grupo abandonador). Esse íon ataca a carbonila ativada, passando por um segundo mecanismo de adição-eliminação, no qual o intermediário tetraédrico formado colapsa para a liberação de íon cloreto e dióxido de enxofre molecular. (CLAYDEN et al., 2001)

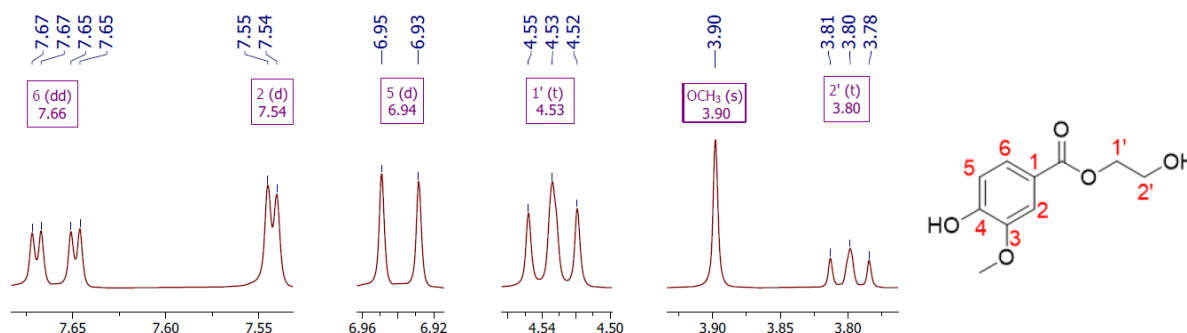
A segunda etapa reacional ocorre após a formação do cloreto do ácido vanílico, mais reativo que o ácido inicial. Nesta, o poliálcool age como nucleófilo em um novo mecanismo de adição-eliminação, atacando inicialmente a carbonila e formando o intermediário tetraédrico. A este ponto, após a regeneração da carbonila e liberação do grupo abandonador (Cl⁻) o éster desejado é formado (CLAYDEN et al., 2001)

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS ESTERIFICADOS

Os compostos sintetizados foram analisados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C em clorofórmio deuterado (CDCl₃), e os hidrogênios foram classificados pelos sinais do espectro, com base na sua desblindagem eletrônica. Deste modo, a fim de exemplificar as caracterizações por RMN, ilustra-se a seguir os sinais em espectros de RMN ¹H e ¹³C do derivado **8a**, que não possui caracterização completa publicada.

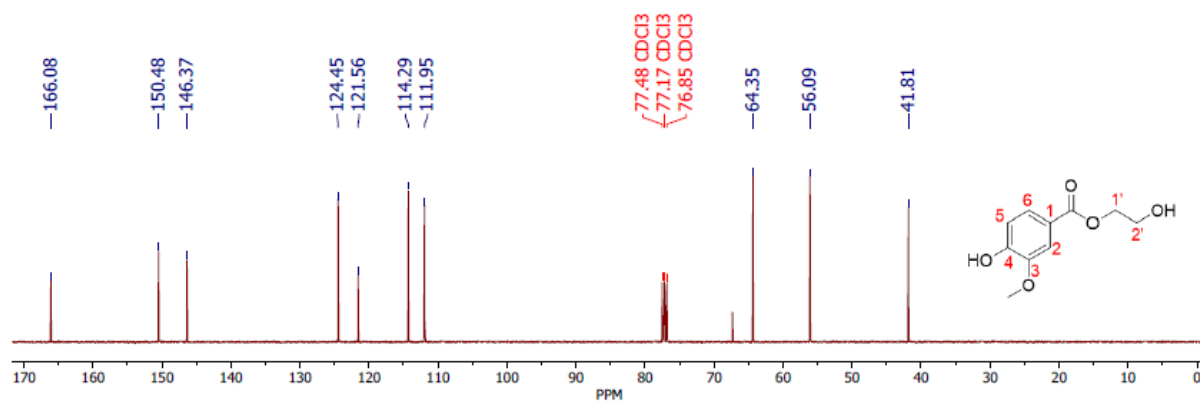
Conforme demonstrado na Figura 8, uma expansão do espectro de RMN de ¹H para o composto **8a** (completo no apêndice A, Figura A 1), pode-se perceber o duplo duplete em 7,66 ppm (⁴J = 2,0 Hz e ³J = 8,3 Hz) referente ao H6 aromático; o duplete em 7,54 ppm (⁴J = 2,0 Hz) referente ao H2 aromático; o duplete em 6,94 ppm (³J = 8,3 Hz) referente ao H5 aromático; o tripleto em 4,53 ppm (³J = 5,8 Hz) referente aos hidrogênios metilênicos H1', mais desblindados na cadeia do éster devido à sua proximidade a este grupo; o simpleto em 3,90 ppm, referente aos hidrogênios metílicos da metoxila; e por fim, o tripleto em 3,80 ppm (³J = 5,8 Hz) referente aos hidrogênios metilênicos H2', mais blindados da cadeia do éster pela proximidade à hidroxila terminal.

Figura 8 – Expansão dos sinais no espectro de RMN de ^1H do composto **8a**.



Os sinais dos hidrogênios aromáticos (6, 2 e 5) assim como o sinal da metoxila, demonstrados anteriormente, são sinais comuns a todos os compostos da série (**8a-f**), assim como os dois tripletos são comuns aos compostos **8a**, **8b**, **8d** e **8e**. As expansões e espectros completos estão dispostos no apêndice A, assim como os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C para todos os compostos, que estão descritos no item 5.4.

Conforme demonstrado na expansão do espectro de RMN de ^{13}C para o composto **8a** (Figura 9), pode-se notar os sinais em 166,08 ppm referente ao carbono da carbonila, dois sinais em 155,48 e 146,37 ppm referentes aos carbonos sp^2 aromáticos ligados à hidroxila e à metoxila (C4 e C3, respectivamente), sinais de 124,45 a 111,95 ppm referentes aos demais carbonos sp^2 aromáticos (C1, C6, C2 e C5, respectivamente), sinal em 64,35 ppm referente ao carbono sp^3 mais próximo ao grupo éster (C1'), sinal em 56,09 ppm referente ao carbono da metoxila ligada a anel aromático e, finalmente, o sinal em 41,81 ppm referente ao carbono na extremidade da cadeia do éster diretamente ligado à hidroxila terminal (C2').

Figura 9 – Expansão dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C do composto 8a.

4 CONCLUSÃO

Com a metodologia de esterificação otimizada nesse trabalho, foi possível sintetizar 6 derivados híbridos da apocinina e éster EPH. Os derivados **8a** – **8f** foram obtidos com rendimentos de moderados a excelentes (33 a 90%).

Ressalta-se que os compostos **8b**, **8c**, **8d**, **8e** e **8f** são inéditos na literatura, e o composto **8a**, mesmo que já relatado, não possui dados espectroscópicos publicados para comparação com os dados obtidos em nosso trabalho.

Os dados *in silico* mostram a viabilidade de utilização destes compostos em futuros testes de *docking molecular* e assim como teste *in vitro* frente a ensaios antioxidantes e aplicação direta na NADPH oxidase, para avaliar respectivamente seus efeitos na captura de EROs, dentre outras espécies radicalares precursoras do estresse oxidativo e potencial ação inibitória de homólogos da NOX.

Dos testes para inibição da NOX, estima-se que os dados sejam convergentes aos relatos da literatura: que as hidroxilas terminais acentuem a inibição enzimática, uma vez que os grupos polares devem melhorar o acesso dos compostos às subunidades da NOX dispersas no citosol.

5 METODOLOGIA

5.1 AVALIAÇÃO *IN SILICO* DOS DERIVADOS

O desenho das moléculas para previsão de suas propriedades frente às regras de Lipinski foi realizada na plataforma de livre acesso *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>), usualmente utilizada para realizar uma triagem virtual, a fim de assegurar que os compostos em estudo possuem propriedades semelhantes aos de fármacos comerciais. Os compostos desenhados passam pelo software de cálculos e suas propriedades previstas são dispostas e podem ser analisadas, de acordo com os termos abaixo:

- **Coeficiente de Partição em Octanol/Água (LogP):** Diferentes métodos estão disponíveis na plataforma para previsão da lipofilicidade dos compostos. Entre eles: o iLOGP é baseado na Energia Livre de Gibbs da solvatação em água e *n*-octanol; o XLOGP3 e WLOGP que têm dados obtidos em um método atomístico; o MLOGP é baseado em métodos topológicos; e por fim, SILICOS-IT que é um método híbrido baseado em fragmentações e metodologias topológicas. Para este trabalho, utilizou-se os dados de LogP consensual, que trata da média aritmética dos diferentes valores obtidos nas metodologias de previsão do coeficiente de partição. (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017)
- **Área de Superfície Polar Molecular (TPSA):** utilizando-se a metodologia publicada e validada no trabalho de Ertl e colaboradores (2000), que demonstra as somatórias das áreas polares da substância, de modo a indicar uma melhor absorção (em termos de dissolução em ambiente hidrofílico, por via oral) e permeação de membrana (acentuando que menor área superficial polar, aumenta a permeação e igualmente a alta lipofilicidade). (SILVERMAN; HOLLADAY, 2015)
- **Massa Molecular:** Medição que vai ao acordo de pesquisas que relativizam a permeabilidade celular de compostos com sua massa molecular. (LIPINSKI et al., 1997)
- **Doadores e Aceptores de Ligação de Hidrogênio (nOHNH e nON):** Sinalizando as ligações de hidrogênio possíveis no encaixe do composto com

um alvo molecular, além da sua solubilidade em meio aquoso.

- **Ligações Rotacionáveis:** Medição da flexibilidade do composto, que pode ser intrinsecamente relacionada à descrição da biodisponibilidade oral de compostos. (VEBER et al., 2002)

5.2 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes e reagentes, para fins sintéticos, foram tratados, destilados e secos, conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas. O monitoramento das reações foi realizado com técnica de mini-extrações¹, e aplicação da fase orgânica em cromatografia de camada delgada (CCD), em folhas de sílica gel de suporte em alumínio com espessura de 0,25 mm e a revelação das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada de UV (254-366 nm). Todos os compostos foram purificados em coluna cromatográfica empacotada em sílica gel 60 (0,063-0,040 mm) e utilizando eluentes (hexano:acetato de etila ou metanol:diclorometano) preparados em diferentes proporções de volume à volume (v/v).

5.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III, com operações rodando a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, estando equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Os espectros foram obtidos utilizando CDCl₃ como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O software utilizado para o processamento dos espectros de RMN foi o MestReNova (Versão 14.1.2). Para calibração de todos os espectros de RMN de ¹H o valor de 0,00 ppm foi adotado para

¹ As mini-extrações para monitoramento da reação de formação do cloreto de ácido, foram realizadas retirando-se uma gota do bruto reacional, e adicionando-a a um *eppendorf* contendo gotas de metanol. Por fim, adicionou-se algumas gotas de Bicarbonato de Sódio, e após agitação extraiu-se a fase orgânica para aplicação em placa cromatográfica.

o padrão TMS. As áreas dos sinais foram obtidas por integração e suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (qt), sexteto (sxt), duplo duplete (dd) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) foram relatadas em Hz.

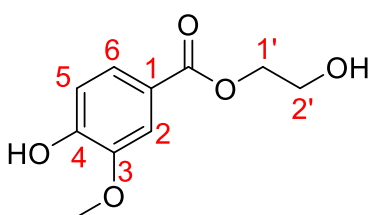
5.4 SÍNTESE DOS DERIVADOS

Inicialmente, para formação do cloreto de ácido vanílico, em um balão de fundo redondo de 25 mL, foi adicionado ácido vanílico (202 mg, 1 eq) e excesso de cloreto de tionila (SOCl_2 , 860 μL , 10 eq), sob temperatura de refluxo (75 °C) durante 2 horas. Após a comprovação da formação do cloreto de ácido por CCD (em eluente hexano:acetato de etila; 4:6), os compostos voláteis foram removidos por rotaevaporador. Sequencialmente, antes de retornar ao aquecimento, ao balão reacional é gotejado o respectivo poliálcool (30 eq), seguido pela adição de trietilamina (200 μL , 1,25 eq). Ao final da reação, que é acompanhada por CCD, é verificada a formação do composto esterificado.

Após, a mistura reacional é neutralizada com 15 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, extraído com 3x10 mL de diclorometano e lavado com 3x10 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica é seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em rotaevaporador.

Os produtos sintetizados, em sua maioria, são todos obtidos como óleos. Exceto o composto **8b** que foi obtido como um sólido. Seus rendimentos, após purificação por coluna cromatográfica, variam entre 33% a 90%.

4-hidroxi-3-metoxibenzoato de 2-hidroxietila (**8a**): Óleo Castanho.



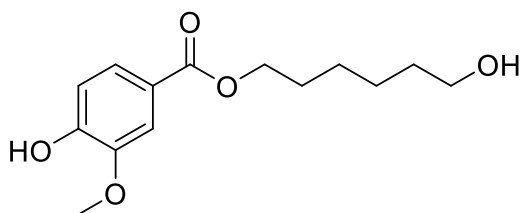
RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ : 7,66 (dd, $J = 8,3, 2,0$ Hz, 1H, H6), 7,54 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H2), 6,94 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, H5), 4,53 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, H1'), 3,90 (s, 3H), 3,80 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H, H2').

RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ : 166,08 (C=O), 150,48

(C4), 146,37 (C3), 124,45 (C1), 121,56 (C5), 114,29 (C2), 111,95 (C6), 64,35 (C1'), 56,09 (OCH₃), 41,81 (C2').

CCD: Rf 0,36 (Hex:AcOEt; 7:3)

4-hidroxi-3-metoxibenzoato de 6-hidroxi-hexila (8b): Sólido Branco.

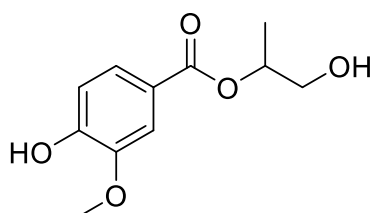


RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ: 7,65 (dd, *J* = 8,3, 2,0 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,31 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,68 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 1,79 (qt, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,62 (qt, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,56 – 1,39 (m, 4H).

RMN de ¹³C [CDCl₃, 100 MHz] δ: 166,50 (C=O), 149,99 (C), 146,21 (C), 124,09 (C), 122,58 (CH), 114,06 (CH), 111,76 (CH), 64,79 (CH₂), 56,11 (OCH₃), 62,84 (CH₂), 32,62 (CH₂), 28,77 (CH₂), 25,85 (CH₂) e 25,43 (CH₂).

CCD: Rf 0,60 (Hex:AcOEt; 2:8)

4-hidroxi-3-metoxibenzoato de 1-hidroxi-2-propanoila (8c): Óleo Castanho.

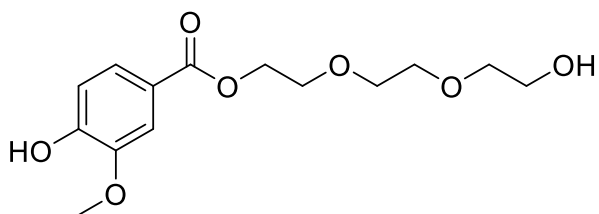


RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ: 7,68 (dd, *J* = 8,4, 1,9 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 5,35 (sxt, *J* = 6,4 Hz, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,72 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H), 1,47 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H).

RMN de ¹³C [CDCl₃, 100 MHz] δ: 165,60 (C=O), 150,24 (C), 146,21 (C), 124,38 (C), 122,10 (CH), 114,10 (CH), 111,81 (CH), 69,99 (CH), 56,13 (OCH₃), 47,12 (CH₂), 17,75 (CH₃).

CCD: Rf 0,70 (Hex:AcOEt; 4:6)

4-hidroxi-3-metoxibenzoato de 2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etila (8d): Óleo Amarelado.

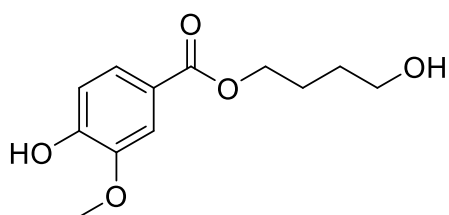


RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ : 7,68 (dd, $J = 8,3, 1,9$ Hz, 1H), 7,58 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 4,48 (t, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,86 (t, 2H), 3,78 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 3,75 – 3,69 (m, 4H), 3,63 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H).

RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ : 166,32 (C=O), 150,12 (C), 146,18 (C), 124,34 (C), 122,21 (CH), 114,04 (CH), 111,84 (CH), 71,44 (CH_2), 70,71 (2CH_2), 69,41 (CH_2), 63,93 (CH_2), 56,15 (OCH_3) e 42,72 (CH_2).

CCD: Rf 0,68 (Hex:AcOEt; 4:6)

4-hidroxi-3-metoxibenzoato de 4-hidroxibutila (8e): Óleo Branco.

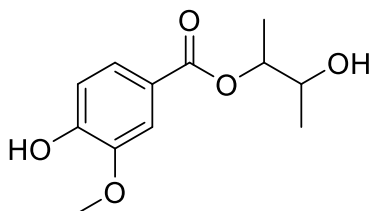


RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ : 7,65 (dd, $J = 8,3, 2,0$ Hz, 1H), 7,57 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 4,36 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,64 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 1,96 (qt, $J = 3,0$ Hz, 4H).

RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ : 166,34 (C=O), 150,08 (C), 146,21 (C), 124,14 (C), 122,34 (CH), 114,07 (CH), 111,74 (CH), 63,99 (CH_2), 56,13 (OCH_3), 44,54 (CH_2), 29,33 (CH_2), 26,20 (CH_2).

CCD: Rf 0,42 (Hex:AcOEt; 7:3)

4-hidroxi-3-metoxibenzoato de 2-hidroxi-3-butanila (8f): Óleo Amarelado.



RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ : 7,69 (dd, $J = 8,3, 2,0$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,97 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 5,27 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 1,57 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H), 1,44 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C [CDCl_3 , 100 MHz] δ : 165,54 (C=O), 150,26 (C), 146,25 (C), 124,35 (C), 122,15 (CH), 114,13 (CH), 111,86 (CH), 73,03 (CH), 59,09 (CH), 56,11 (OCH₃), 20,77 (CH₃), 16,63 (CH₃).

CCD: R_f 0,45 (Hex:AcOEt; 7:3)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOKAM, R.; JEANKUMAR, V. U.; SRIDEVI, J. P.; MATIKONDA, S. S.; PEDDI, S.; ALVALA, M.; YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Identification and structure–activity relationship study of carvacrol derivatives as Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 547–554, 2014.

ALTENHÖFER, S.; RADERMACHER, K. A.; KLEIKERS, P. W. M.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. H. W. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 406–427, 2015.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. De; SOUZA, R. B. De; SANTOS, S. A. Dos; ANDRADE, D. R. De. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 60–68, 2005.

ATAL, C. K.; SHARMA, M. L.; KAUL, A.; KHAJURIA, A. Immunomodulating screening agents of plant origin. i: preliminary screening. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 18, p. 133–141, 1986.

BABIOR, B. M. NADPH Oxidase: An Update. **Blood**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 1464–1476, 1999.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. The Production by Leukocytes Of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent. **Biological Defense Mechanisms THE**, [s. l.], v. 52, n. March, p. 741–744, 1973.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BELAMBRI, S. A.; ROLAS, L.; RAAD, H.; HURTADO-NEDELEC, M.; DANG, P. M.-C.; EL-BENNA, J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. **European Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 48, n. May, p. 1–9, 2018.

BISPO, M. de L. F.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. da S.; FARIA, L. N. de C.; LOURENÇO, M. C. S.; SOUZAA, M. V. N. De. Synthesis and Antitubercular Evaluation of N-Arylpyrazine and N,N'-Alkyl-diylpyrazine-2-carboxamide Derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [s. l.], v. 49, p. 1317–1322, 2012.

CAVE, A.; GRIEVE, D.; JOHAR, S.; ZHANG, M.; SHAH, A. M. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 360, n. 1464, p. 2327–2334, 2005.

CHOCRY, M.; LELOUP, L. The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 332–353, 2020.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. First ed. [s.l.] : Oxford University Press, 2001.

COSTA, C. F. Da; ALESSANDRA, C.; ALMEIDA, M. V. De; MARIA, C.; LOURENC, S.; SOUZA, M. V. N. De. Synthesis and Antitubercular Activity of Novel Amino Acid Derivatives. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 79, p. 216–222, 2012.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1117–1121, 2016.

DE SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção.

Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 515–527, 2007.

DELEO, F. R.; ALLEN, L. A.; APICELLA, M.; NAUSEEF, W. M. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. **Journal of immunology**, [s. l.], v. 163, n. 12, p. 6732–40, 1999.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 43, n. 20, p. 3714–3717, 2000.

ERYILMAZ, M.; PALABIYIK, İ. M. Antimicrobial Activity of Hypochlorous Acid and It ' s Determination With Different Analytical Methods ,. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 12(1), n. February, p. 123–126, 2013.

FABRIS, M. **Síntese e Avaliação Antibacteriana de Derivados Cumarínicos Funcionalizados**. 2019. Universidade Estadual de Londrina, [s. l.], 2019.

FARIA, C. M. Q. G. De; NAZARE, A. C.; PETRÔNIO, M. S.; PARACATU, L. C.; ZERAIK, M. L.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; DA FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Protocatechuic Acid Alkyl Esters: Hydrophobicity As a Determinant Factor for Inhibition of NADPH Oxidase. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 28, p. 4885–4893, 2012.

FAUST, L. R. P.; EL BENNA, J.; BABIOR, B. M.; CHANOCK, S. J. The phosphorylation targets of p47(phox), a subunit of the respiratory burst oxidase: Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 1499–1505, 1995.

FERREIRA, A. L. .; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEIL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 29, n. part 2, p. 345–350, 2001.

HUIE, R. E.; PADMAJA, S. The Reaction of NO With Superoxide. **Free Radical Research Communications**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 195–199, 1993.

KLENIEWSKA, P.; PIECHOTA, A.; SKIBSKA, B.; GORAÇA, A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 277–294, 2012.

KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 24, p. 1–10, 2019.

KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of Medical & Allied Sciences**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 53–60, 2011.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 181–189, 2004.

LENDE, A. B.; KSHIRSAGAR, A. D.; DESHPANDE, A. D.; MULEY, M. M.; PATIL, R. R.; BAFNA, P. A.; NAIK, S. R. Anti-inflammatory and analgesic activity of protocatechuic acid in rats and mice. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 255–263, 2011.

LI, Y. R.; JIA, Z.; TRUSH, M. Defining ROS in Biology and Medicine. **Reactive Oxygen Species**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 9–21, 2016.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; DELLA-MORTE, D.; GARGIULO, G.; TESTA, G.; CACCIATORE, F.; BONADUCE, D.; ABETE, P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, [s. l.], v. Volume 13, p. 757–772, 2018.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and

computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 23, p. 3–25, 1997.

MANIKUMAR, G.; JIN, C.; REHDER, K. S. Convenient synthesis of tolcapone, a selective catechol-O-methyltransferase inhibitor. **Synthetic Communications**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 810–815, 2008.

MERKL, R.; HRÁDKOVÁ, I.; FILIP, V.; ŠMIDRKAL, J. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. **Czech Journal of Food Sciences**, [s. l.], v. 28, n. No. 4, p. 275–279, 2010.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014.

PETRÔNIO, M. S.; ZERAIK, M. L.; FONSECA, L. M. Da; XIMENES, V. F. Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. **Molecules**, [s. l.], v. 18, p. 2821–2839, 2013.

QI, J.; OU, Y.; GUO, M.; ZHU, L.; LI, S.; JIANG, J. Synthesis of Novel Apocynin Dimer Derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 330–337, 2017.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C. B.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical Science**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 1–20, 2006.

RABÊLO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, W. O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, [s. l.], v. 94, n. 5, p. 684–693, 2010.

RAMOS, C. L.; POU, S.; BRITIGAN, B. E.; COHEN, M. S.; ROSEN, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 267,

n. 12, p. 8307–8312, 1992.

RODRIGUES, G.; AVELINO, J.; SIQUEIRA, A.; RAMOS, L.; SANTOS, G. O USO DE SOFTWARES LIVRES EM AULA PRÁTICA SOBRE FILTROS MOLECULARES DE BIODISPONIBILIDADE ORAL DE FÁRMACOS. **Química Nova**, [s. l.], v. X, n. 00, p. 1–9, 2021.

SA'ID, M.; BABAJI, G. Geometry optimization, cohesive energy and harmonic vibration of $Al_9Cu_{41}Cu_{12}Fe$ And $Al_{13}Fe$ icosahedral metallic alloys. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 292, 2017.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. De. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 308–313, 2004.

SCHRÖDER, K. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: Dosis facit venenum. **Wiley Experimental Physiology**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 447–452, 2019.

SELEMIDIS, S.; SOBEY, C. G.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. H. W.; DRUMMOND, G. R. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 254–291, 2008.

SILVA, A. A. Da; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.

SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 3. ed. [s.l.] : Elsevier, 2015.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: Molecular aptitudes. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2008, 2008.

STOLK, J.; HILTERMANN, T. J.; DIJKMAN, J. H.; VERHOEVEN, A. J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 95–102, 1994.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

WANG, S.; WANG, G.; FU, X.; QI, J.; ZHU, L.; LI, S.; JIANG, J. NADPH Oxidase Inhibition of Novel Apocynin Dimer Derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, [s. l.], v. 07, n. October, p. 341–346, 2017.

WIND, S.; BEUERLEIN, K.; EUCKER, T.; MÜLLER, H.; SCHEURER, P.; ARMITAGE, M.; HO, H.; SCHMIDT, H.; WINGLER, K. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 161, n. 4, p. 885–898, 2010.

WINGLER, K.; HERMANS, J. J. R.; SCHIFFERS, P.; MOENS, A. L.; PAUL, M.; SCHMIDT, H. H. H. W. NOX1, 2, 4, 5: counting out oxidative stress. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 164, n. 3, p. 866–883, 2011.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 765–792, 2016.

WOLCOTT, R. G.; FRANKS, B. S.; HANNUM, D. M.; HURST, J. K. Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological environments. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 269, n. April, p. 9721–9728, 1994.

ZERAIK, M. L.; PETRÔNIO, M. S.; COELHO, D.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; DA FONSECA, L. M.; MACHADO, S. A. S.; BOLZANI, V. S.; XIMENES, V. F. Improvement of pro-oxidant capacity of protocatechuic acid by esterification. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1–9, 2014.

APÊNDICES

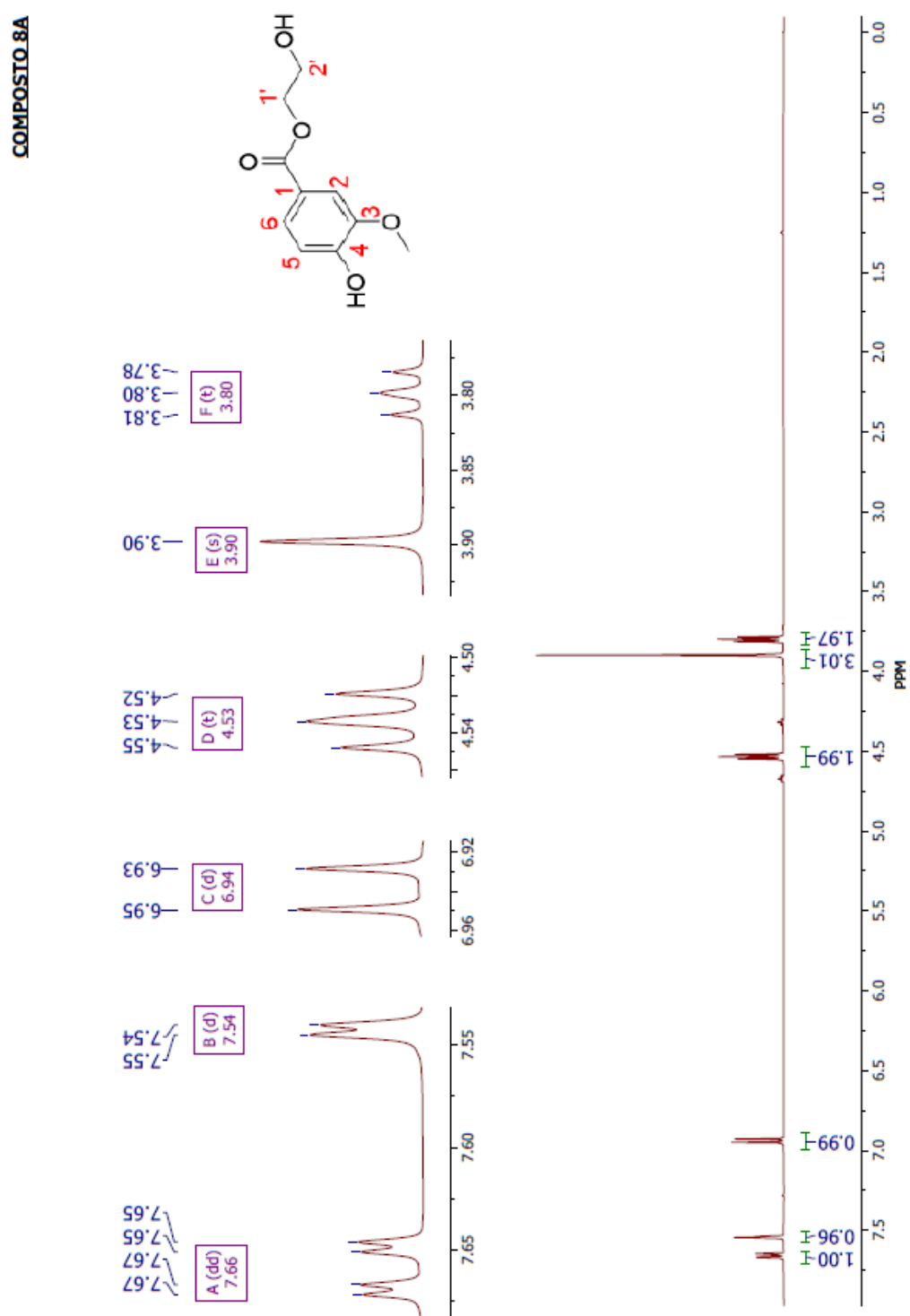
APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DOS DERIVADOS DA SÉRIE.Figura A 1 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8a.

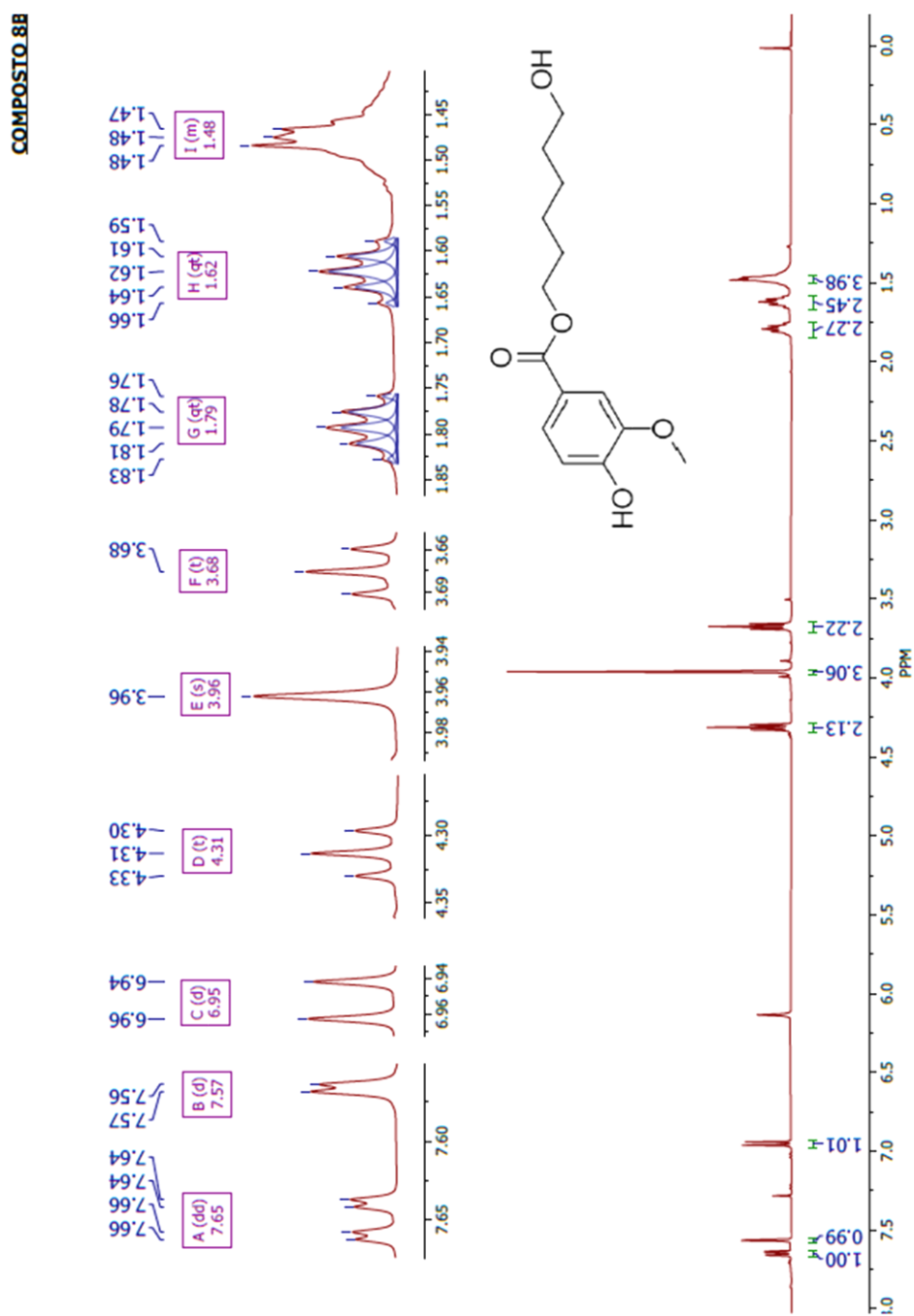
Figura A 2 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8b.

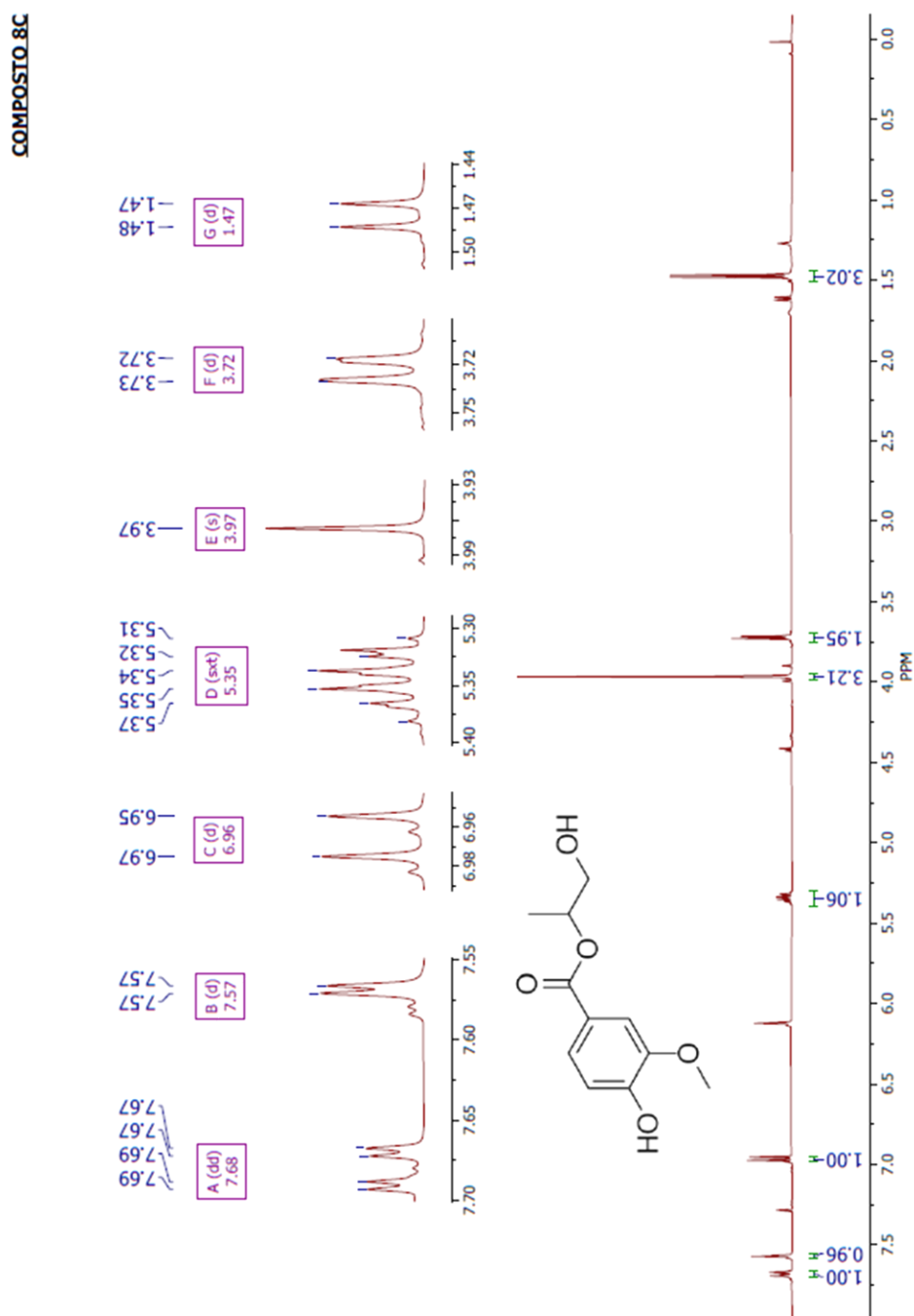
Figura A 3 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8c.

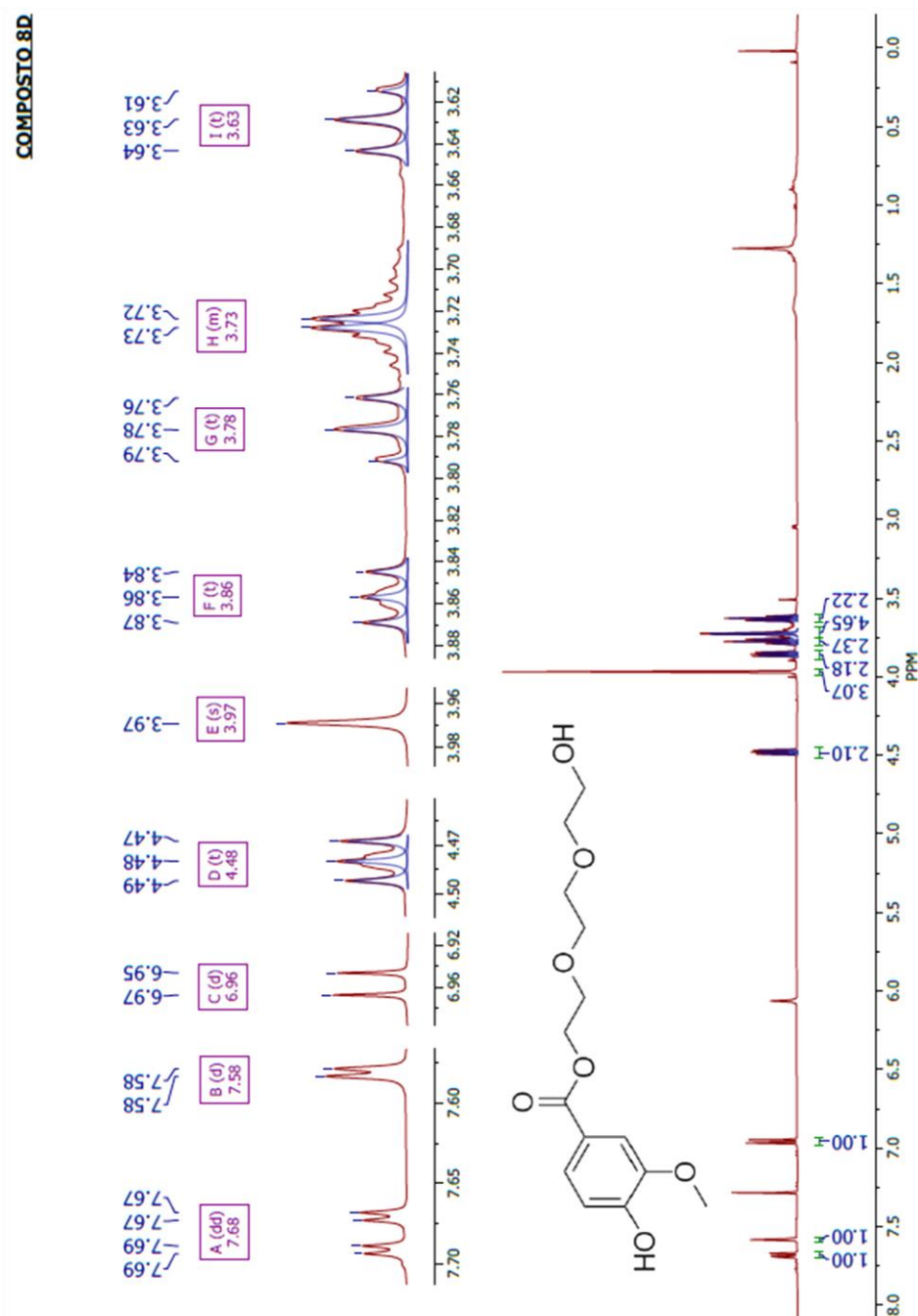
Figura A 4 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8d.

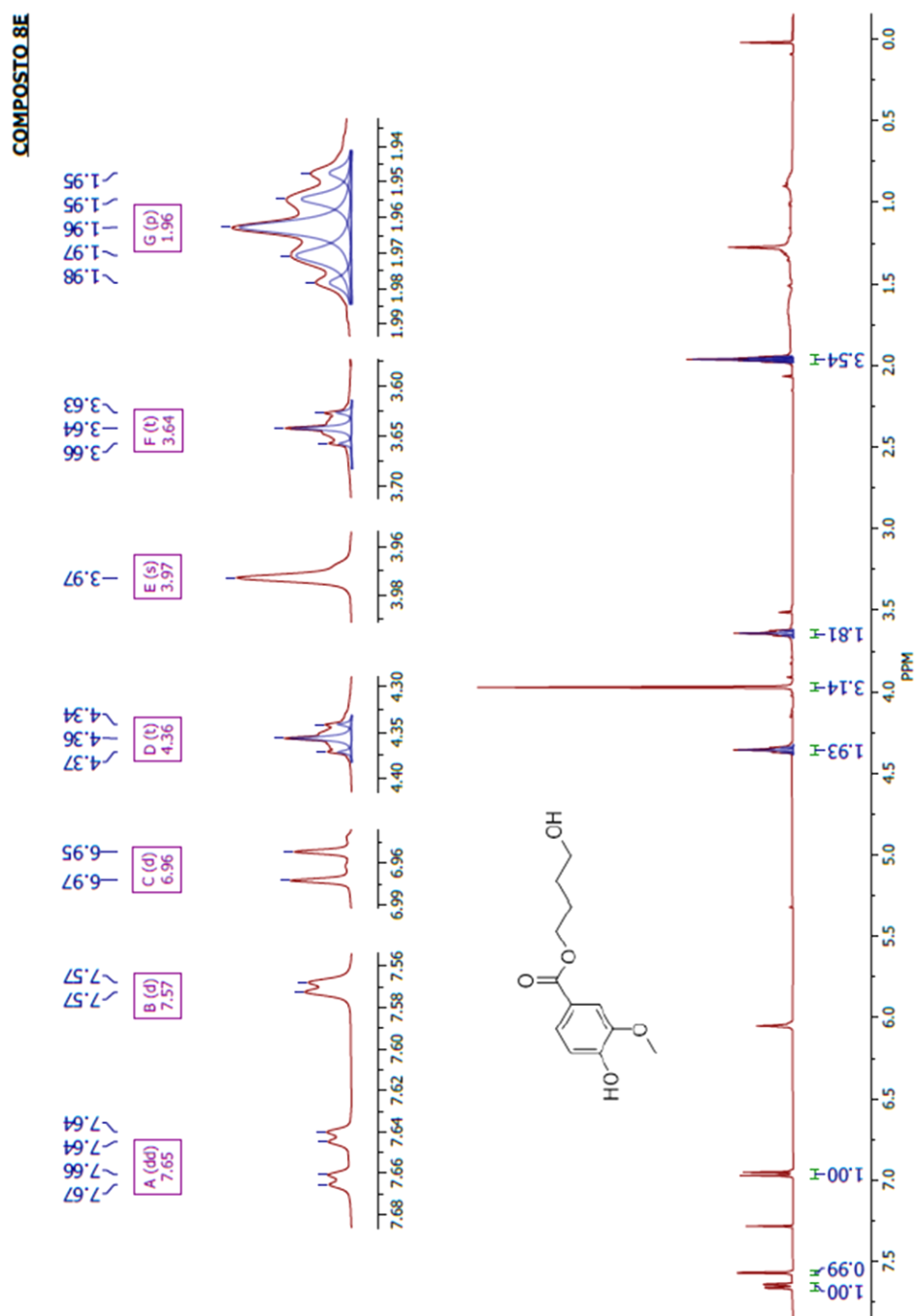
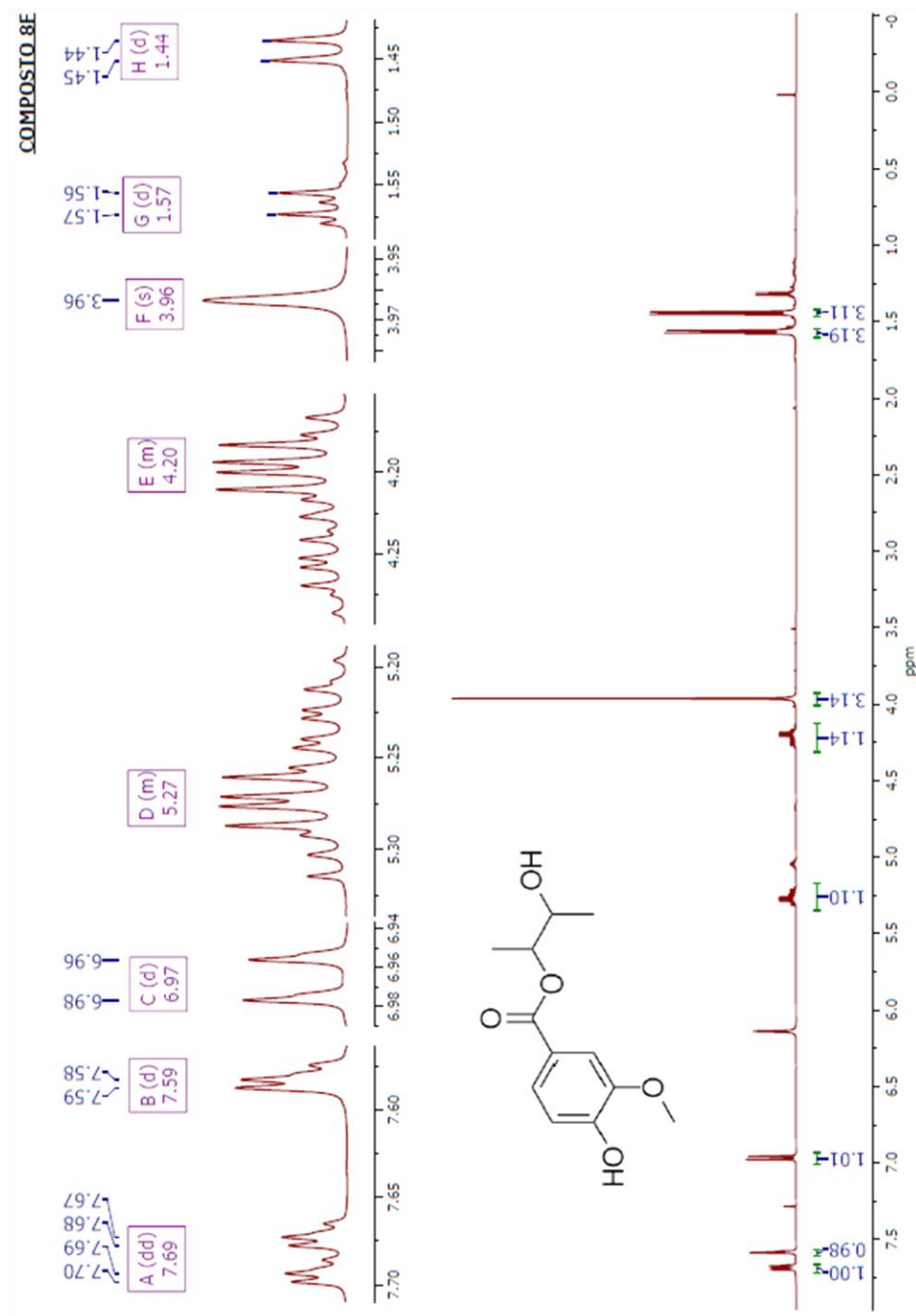
Figura A 5 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8e.

Figura A 6 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8f.

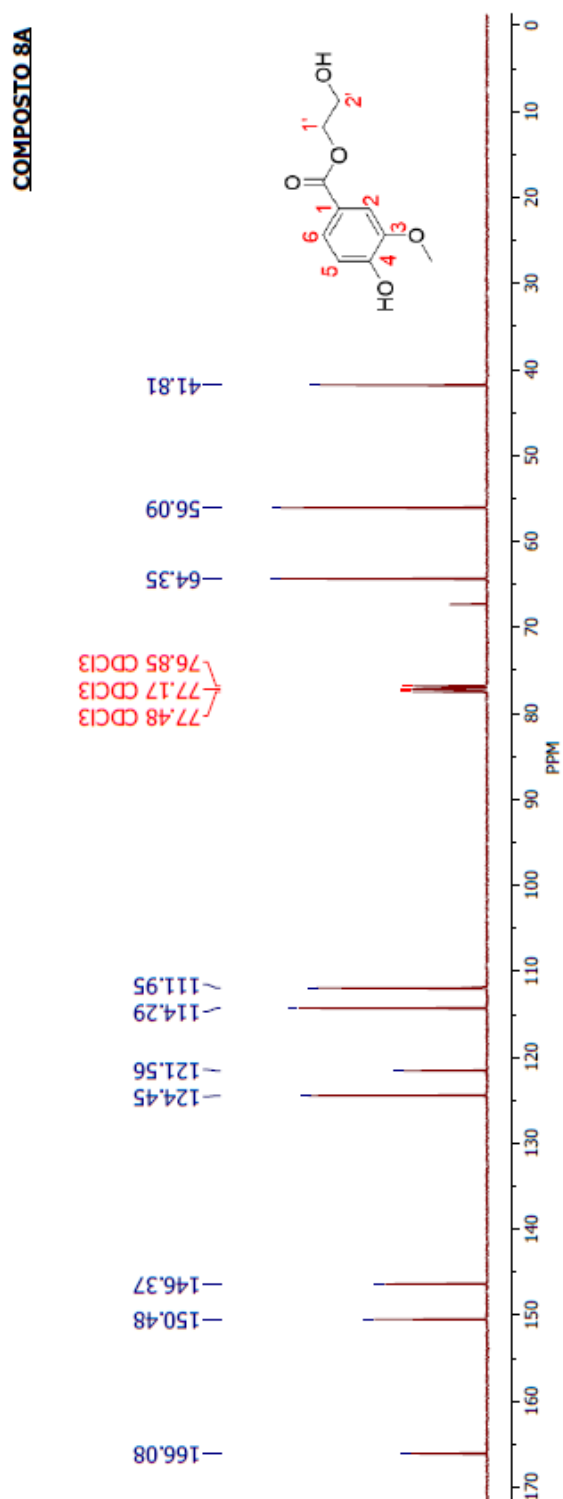
APÊNDICE B – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DOS DERIVADOS DA SÉRIE.**Figura B 1** – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 8a.

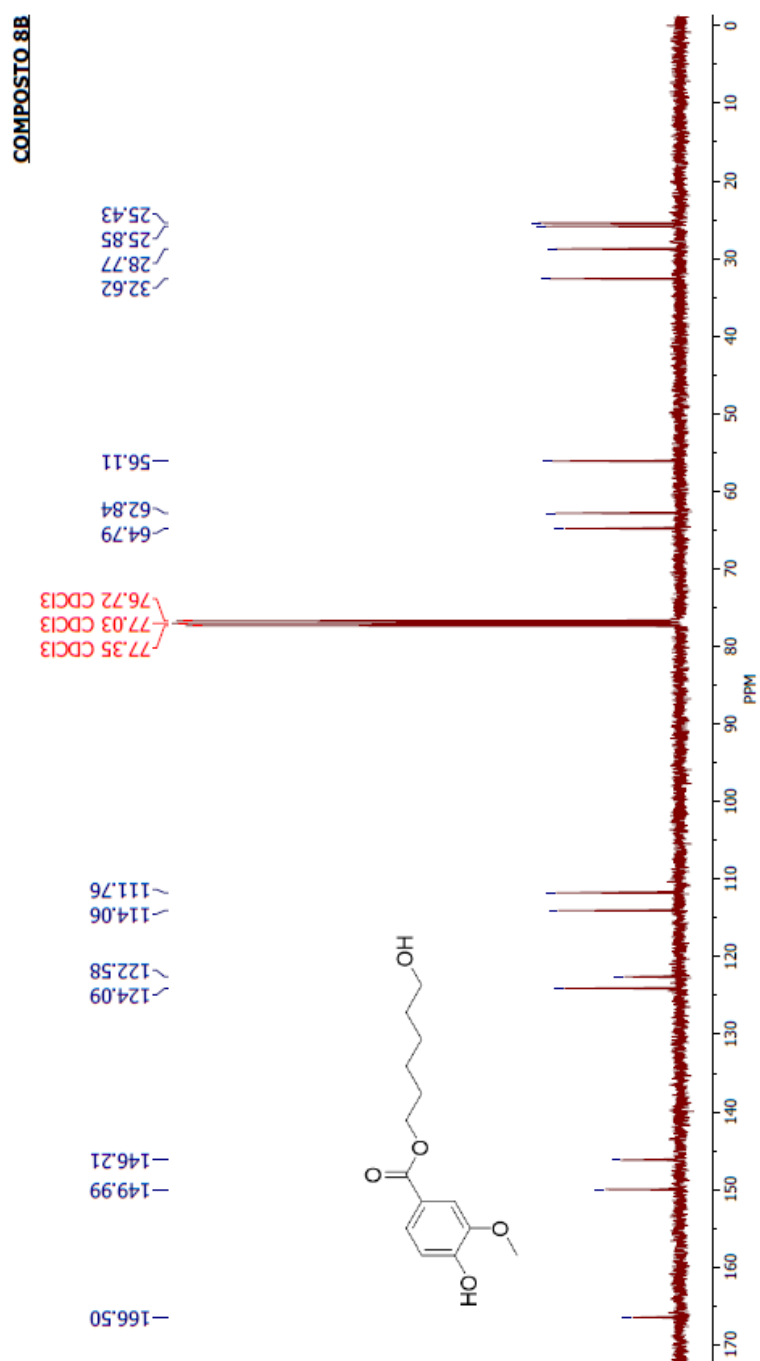
Figura B 2 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 8b.

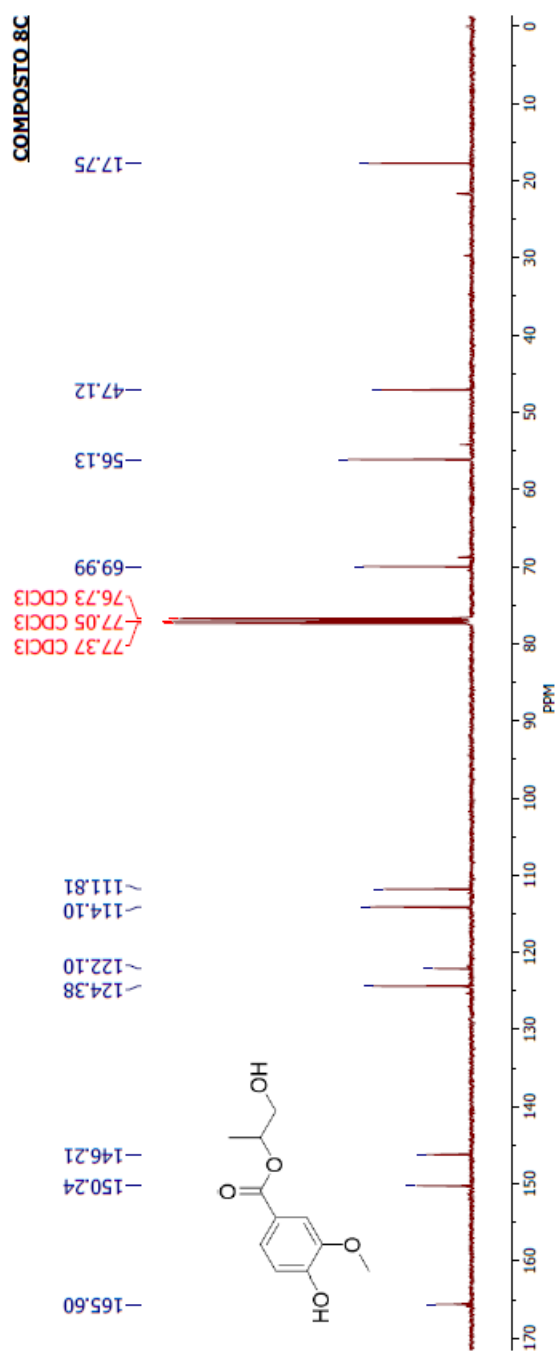
Figura B 3 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 8c.

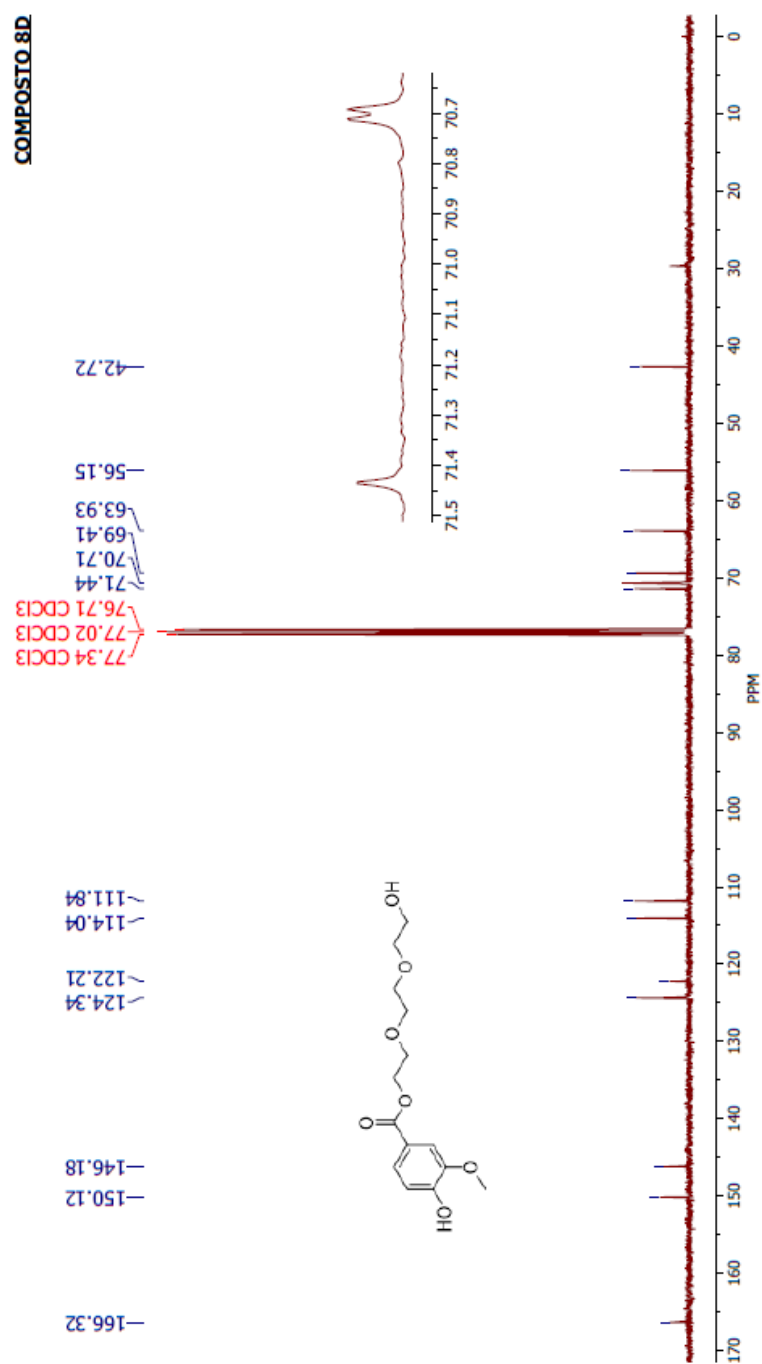
Figura B 4 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 8d.

Figura B 5 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 8e.

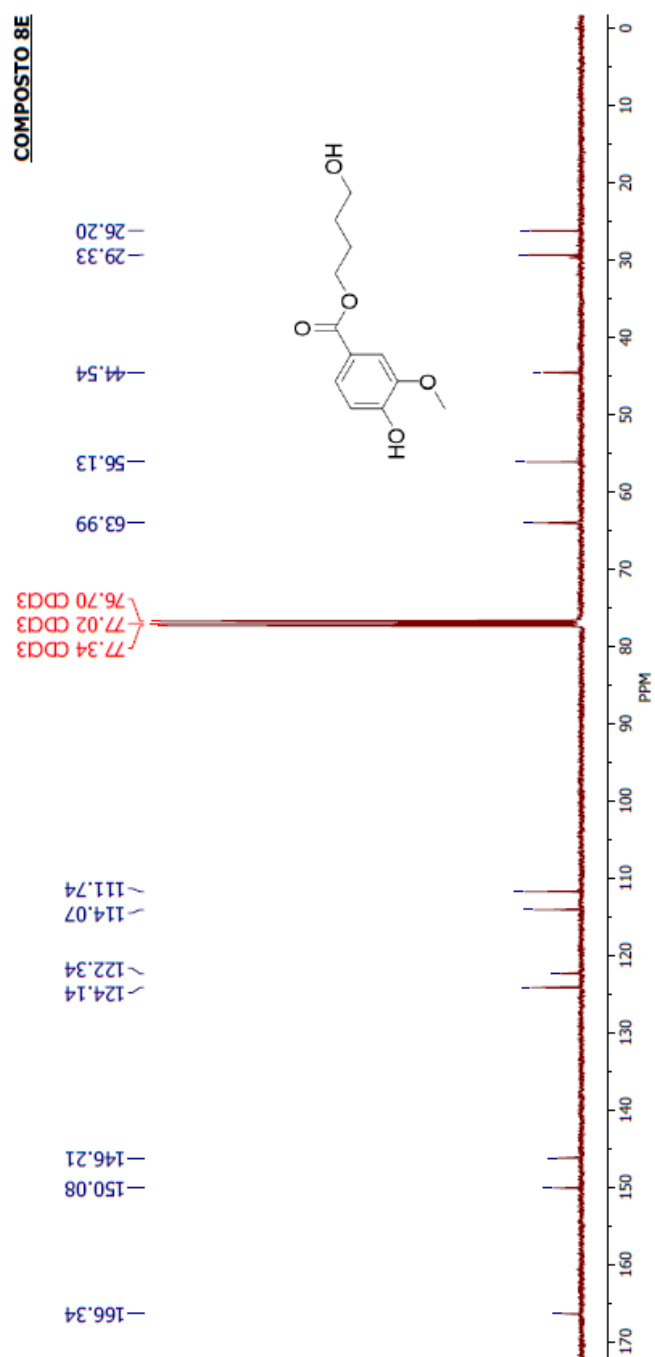


Figura B 6 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 8f.