



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL
E MODELAGEM MOLECULAR

VALÉRIA ARAÚJO BARROS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E APLICAÇÕES DE DERIVADOS
NAFTOSALICÍLICOS COMO ANTIOXIDANTES**

BELÉM – PARÁ
2017

VALÉRIA ARAÚJO BARROS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E APLICAÇÕES DE DERIVADOS
NAFTOSALICÍLICOS COMO ANTIOXIDANTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Data da Defesa ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Rosivaldo dos Santos Borges – UFPA/PPGQMMM – Orientador

Cleydson Breno Rodrigues dos Santos – UNIFAP/PPGQMMM – Membro Interno

Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva – USP-RP/PPGQMMM – Membro Externo

Anderson Bentes de Lima – UEPA – Membro (Suplente)

BELÉM – PARÁ
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B277p Barros, Valéria Araújo
Planejamento, Síntese e aplicações de Derivados Naftosalicílicos como Antioxidantes / Valéria Araújo
Barros. - 2017.
51 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular
(PPGQM3), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges

1. Salicilatos. 2. Antioxidante. 3. Câncer. 4. Inflamação. 5. Novos derivados. I. Borges, Rosivaldo dos
Santos, *orient.* II. Título

CDD 615.1

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, me guiando, protegendo e dando forças para vencer os obstáculos.

Aos meus pais, Vital de Aquino Barros e Maria Regina Teixeira de Araújo, pelo amor, proteção e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Ao meu Filho, Danylo Denner Barros Raiol, por sua existência, por ser minha fonte de inspiração, por todos os dias de alegria, brincadeiras e muita felicidade. Amor eterno e incondicional...

Aos meus irmãos, Viviane Araújo Barros e Romário Araújo Barros pela amizade, pelo carinho e cumplicidade.

Ao meu esposo, Denys Raiol, pelo amor, dedicação, carinho e paciência.

A toda minha família, pela força, amizade e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges, pela orientação, paciência, pelos sábios conselhos e pelo conhecimento repassado.

À Universidade Federal do Pará- UFPA, pela oportunidade de qualificação na minha formação.

Aos colegas de laboratório, pela companhia e trocas de experiências.

Ao NESBio/UFPA pela infraestrutura cedida para execução deste trabalho.

Aos professores integrantes da banca.

Meu muito obrigada!

RESUMO

Os derivados de salicilatos são aplicados com sucesso como analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatórios e na prevenção do câncer, principalmente de colón retal. Reduzem os riscos de muitas doenças associadas com a idade avançada. No entanto, apresentam efeitos adversos principalmente os eventos gastrintestinais que estão relacionados com seu principal constituinte ácido acetilsalicílico, assim como também os aspectos que abrangem sua estabilidade química e afinidade pelos receptores biológicos. O objetivo do trabalho é o planejamento, síntese e aplicações de derivados naftaleno-salicílicos como antioxidantes. Um estudo teórico dos doze compostos estudados foi realizado. Os cálculos de propriedades eletrônicas tais como dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, potencial de ionização (PI), energia de dissociação de ligação fenólica ($ED_{L_{OH}}$) e contribuição das densidades de spin foram realizados usando os pacotes Gaussview e Gaussian, através da teoria do funcional de densidade (DFT), no nível B3LYP/6-31G(d,p). Alguns destes compostos foram sintetizados usando métodos clássicos. Os resultados mostraram que tanto a presença de uma hidroxila adicional quanto a substituição do anel benzeno por naftaleno aumentam a capacidade antioxidante na mesma proporção, com pequenas variações entre derivados ácido, éster e amida. Um efeito sinérgico foi observado quando ambos estão presentes, produzindo as moléculas mais potentes. Além disso, os cálculos de densidade de spin indicaram que um caminho regioseletivo pode ser obtido a partir de derivados monohidroxilados, com alta possibilidade de gerar *in vitro* derivados dihidroxilados preferencialmente na posição *para* relativa ao grupo fenólico, através de reações enzimáticas ou não enzimáticas. Finalmente, a presença do anel naftaleno em substituição ao anel benzeno aumenta tanto a reatividade quanto a estabilidade química de intermediários do tipo quinona, as quais podem explicar o modo como estes compostos poderiam atuar nos mecanismos preventivos e tratamento do câncer. As atividades anticancer e anti-inflamatória ainda estão sendo realizadas para alguns dos compostos sintetizados.

Palavras-chaves: salicilatos, antioxidante, câncer, inflamação, novos derivados.

ABSTRACT

Salicylate derivatives are successfully applied as analgesics, antipyretics, anti-inflammatories and in cancer prevention, especially rectal colon. They reduce the risks of many diseases associated with elderly. However, adverse effects related to gastrointestinal events are always associated to its main constituent acetylsalicylic acid. These aspects are linked to their chemical stability and affinity for some biological receptors. The aims of this work are the design, synthesis and applications of naphthalene-salicylic derivatives as antioxidants. Thus, a theoretical study of the studied compounds was carried out. Calculations of electronic properties such as frontier orbitals HOMO-LUMO, ionization potential (IP), bond dissociation energy of phenolic moiety (BDE_{OH}), and spin density contributions were performed by using density functional theory (DFT) at the B3LYP/6-31G (d, p) level of theory on Gaussview and Gaussian computational packages. Some of these compounds were synthesized by using classical methods. The theoretical results showed that both additional hydroxyl or substitution on benzene ring for naphthalene increase the antioxidant capacity in the same values with small dissimilarities among acid, ester, and amide derivatives. A synergistic effect was observed when both are used together, producing the most potent molecules. In addition, spin density calculations indicated a regioselective pathway can be gotten from monohydroxylic derivatives, with high possibility of *in vivo* generating of dihydroxy derivatives mainly at the *para* position relative to the phenolic group, through enzymatic or non-enzymatic reactions. Finally, the replacement of the naphthalene ring instead of the benzene ring increases both reactivity and chemical stability for the quinone-type intermediates, explaining how these compounds will play a role in the preventive mechanisms and way treatment of cancer. Anti-cancer and anti-inflammatory activities are being performed for some of the synthesized compounds.

Key-words: salicylates, antioxidant, cancer, inflammation, new derivatives.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1. DERIVADOS DE SALICILATOS:.....	13
3.2. FARMACOCINÉTICA DOS SALICILATOS:.....	13
3.3. ACETILAÇÃO DE PROTEÍNA MEDIADA PELA ASPIRINA	14
3.3. CARACTERÍSTICAS DAS CICLO-OXIGENASES (COX-1 e COX-2).....	15
3.5. RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM SALICILATOS:	16
3.6. EFEITO ANTICÂNCER NO TRATAMENTO COM SALICILATOS:	17
3.7 ATIVIDADE ANTIRRADICALAR DE SALICILATOS:	19
3.8. EXEMPLOS DE DERIVADOS DE SALICILATOS	20
3.9. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE	23
3.10. MODELAGEM MOLECULAR	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1.1. COMPOSTOS ESTUDADOS	26
4.1.2. ENERGIA DOS ORBITAIS MOLECULARES DE FRONTEIRA.....	27
4.1.3. CÁLCULOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	27
4.2. METODOLOGIA SINTÉTICA	28

4.2.1. COMPOSTOS PROPOSTOS PARA SÍNTESE.....	28
4.2.2. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS	28
4.2.3. OBTENÇÃO DO ÁCIDO ACETIL-NAFTOSALICILATO	29
4.2.4. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS DERIVADOS	29
4.2.5. DETERMINAÇÃO DO PONTO DE FUSÃO.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
5.2. MECANISMO DE OXIDAÇÃO E HIDROXILAÇÃO	35
5.3. MECANISMO REDOX	38
5.4. SÍNTESE ORGÂNICA	41
5.4.1. ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GENTÍSICO E NAFTOGENTÍSICO	41
5.4.2. ESTERIFICAÇÕES DO ÁCIDO NAFTOSALICÍLICO	42
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	43
REFERÊNCIA	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural de derivados de salicilatos.....	11
Figura 2: Proposta de modificação molecular de derivados de salicilatos.....	12
Figura 3: Reação de hidrólise do ácido acetilsalicílico (The Merck Index, 1996).....	13
Figura 4: Principais vias de biotransformação dos salicilatos.....	14
Figura 5: Modelo para o sítio ativo da prostaglandina endoperóxido sintase.....	14
Figura 6: Estrutura Cristalina da Aspirina acetiladando a Ciclooxigenase-2 Humana.	15
Figura 7: Representação das estruturas de COX-1 e COX2 por Cristalografia de Raios X .	16
Figura 8: Fórmula estrutural de outros derivados anti-inflamatórios.....	16
Figura 9: Estruturas químicas do paracetamol, ácido salicílico e ácido 5-amino-salicílico....	19
Figura 10: Alguns derivados salicílico e fórmulas.....	21
Figura 11: Derivado híbrido resveratrol-salicilato.	22
Figura 12: Composto estudados por modelagem molecular.	26
Figura 13: Compostos sintetizados: gentísico (S5) naftogentísicos (S8, S11 e S13).....	28
Figura 14: Derivados de salicilatos estudados por modelagem molecular.....	30
Figura 15: Estruturas otimizadas pelo método B3LYP/6-31G(d,p) de derivados de salicilatos.	31
Figura 16: Orbitais de fronteira e energia de transferência de HOMO-LUMO para salicilatos.	33
Figura 17: Reações do metabolismo de derivados dos salicilatos.....	35
Figura 18: Compostos de partida para síntese (S1, S4, S7, S10).	36
Figura 19: Densidades de spins para os cátions radicais livres dos derivados de salicilatos. .	37
Figura 20: Densidades de spins para as semiquinonas dos derivados de salicilatos (S1 e S7).37	
Figura 21: Derivados de quinona como anticancerígenos.....	38
Figura 22: Mecanismo redox geral de derivados quinona.	38
Figura 23: Mecanismo de bioativação de derivados de quinona.....	39
Figura 24: Propriedade redox do ácido gentísico por doação de hidrogênio.	39
Figura 25: Propriedade redox do ácido naftogentísico por doação de hidrogênio.....	40

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de esterificação para obtenção dos derivados (S5, S8 e S11).....	28
Esquema 2: Reação para obtenção do éster de naftosalicílico.	29
Esquema 3: Reação de obtenção de derivados ésteres.	41
Esquema 4: Reação para obtenção do derivado naftosalicílico.....	42
Esquema 5: Estruturas conformacionais do acetil-naftogentisato naftosalicílico.	42
Esquema 6: Proposta de desenvolvimento de derivado naftalênico do piroxican.....	43

LISTA DE ABREVIACOES

AAS	Ácido Acetilsalicílico
AS	Ácido salicílico
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AGT	Ácido gentísico
DNMT	ADN-metiltransferase.
COX	Ciclo-oxigenase
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
eV	Elétron-volt
ERO	Espécie reativa de oxigênio
kcal/mol	Kilocalorias por mol
LogP	Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
HO[•]	Radical Hidroxil
HOMO	Mais alto orbital molecular ocupado
LUMO	Maia baixo orbital molecular desocupado
NGT	Glicina <i>N</i> -acetilase
PI	Potencial de ionização
PGES	Prostaglandina endoperóxido sintase
REA	Relação estrutura e atividade
DFT	Teoria do funcional de densidade
UC	Colite ulcerativa

1. INTRODUÇÃO

Os salicilatos (Figura 1) foram introduzidos na terapêutica há mais de 100 anos, quando Maclagan (1876) usou a salicina **1**, um princípio ativo amargo extraído do salgueiro branco comum, reduzindo com sucesso a febre, a dor e a inflamação na febre reumática. As pesquisas prosseguiram com a obtenção laboratorial do ácido salicílico (AS) **2** a partir do fenol por Kolbe e colaboradores, seguido pela obtenção do ácido acetilsalicílico (AAS) **3** através da acetilação do ácido salicílico por Felix Hoffman (MACLAGAN, 1876).

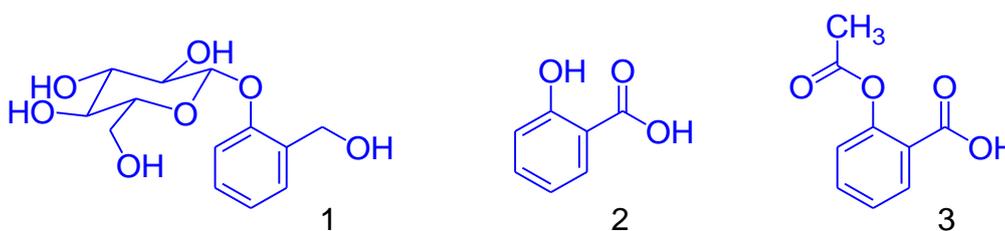


Figura 1: Fórmula estrutural de derivados de salicilatos.

Apesar de ainda ser uma das classes de fármacos mais comercializadas no mundo, extensamente estudada e ser uma das mais antigas, com aplicação clínica conhecida desde de 1898, esta classe de compostos ainda hoje, possui muitos trabalhos publicados após mais de 100 anos de uso, devido a seus efeitos terapêuticos na inflamação e quimioproteção como anticâncer, acidente vascular cerebral e agregação plaquetária (HERBERT, 2000; GASCHÉ, 2004; MARCUS, 1995; LOWE, 2001).

O mecanismo de ação proposto para os salicilatos foi desenvolvido a partir do estudo da acetilação do grupo hidroxila de um resíduo de Serina (Ser 530) da ciclo-oxigenase (COX), pela aspirina (AAS) (ROTH, 1975). No entanto, ele não explica o mecanismo dos demais salicilatos que não apresentam em suas estruturas químicas grupamentos acetilantes, que são todos os demais compostos, exceto a aspirina. Assim, uma vez que tanto a aspirina como os demais salicilatos apresentam também diferenças significativas na inibição das isoformas de COX, com maior inibição sobre a COX-1 e fraca inibição sobre a COX-2 (SOMVANSHI *et al.*, 2007). Além disso, a gastrotoxicidade, dentre outros efeitos adversos tem sido um grande motivo para a busca por novos fármacos derivados de salicilato (KASHANI e SHIH, 2012).

De fato, a busca por fármacos mais seguros, no que se refere à especificidade, potência e baixa toxicidade, tem evoluído muito graças aos avanços nos métodos e técnicas utilizados. A modelagem molecular é uma ferramenta para o estudo e planejamento de novos fármacos, a qual permite a construção de relação, estrutura-atividade (REA) utilizando gráficos computacionais tridimensionais e valores numéricos (CARVALHO *et al.* 2003).

Em geral, os salicilatos apresentam baixa estabilidade química em reações de hidrólise e o fraco efeito antioxidante. Assim, o projeto propõe o desenvolvimento de derivados de salicilatos de maior volume atômico, incorporando o anel naftaleno no lugar do benzeno e uma hidroxila adicional (ácido gentísico), visando aumentar a reatividade química, o efeito antioxidante e a afinidade pelo receptor COX-2 (BORGES & CASTLE, 2015).

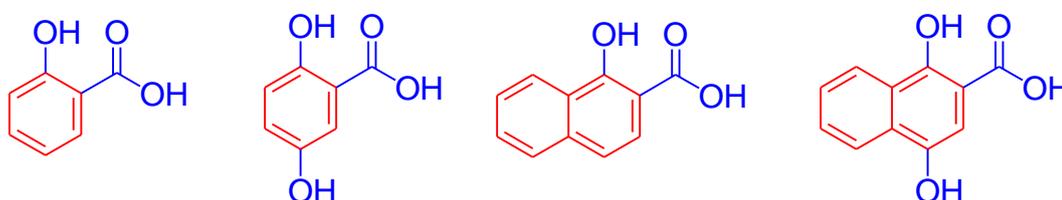


Figura 2: Proposta de modificação molecular de derivados de salicilatos.

Portanto, nosso interesse inicial baseia-se na aplicação dos métodos teóricos para elucidação das propriedades físico-químicas e de reatividade, de novos derivados de salicilatos, bem como seleção de parâmetros físico-químicos fundamentais para o planejamento racional de novos derivados e de novos candidatos a fármacos, com maior atividade e baixa toxicidade. Assim como também, sintetizar os derivados para avaliar atividade antioxidante *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Planejar e sintetizar derivados do metabolismo do ácido salicílico contendo o anel naftaleno, com possível aplicação como antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Planejar e sintetizar os derivados planejados usando modelagem molecular;
- Estimar a capacidade antioxidante pelos métodos teóricos;
- Determinar o mecanismo de oxidação e hidroxilação;
- Avaliar teoricamente sua capacidade redox;
- Estudar a relação estrutura e atividade antioxidante *in vitro*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. DERIVADOS DE SALICILATOS:

O ácido salicílico apresenta fórmula molecular $C_7H_6O_3$ e peso molecular de 138,12g/mol. A solubilidade de 1g da substância a 25°C em 460mL de água e 15mL de clorofórmio, caracteriza o composto como polar. O pKa de 2,4 a 25°C demonstra sua natureza ácida. É formado pela hidrólise gradual da aspirina e quando armazenada por longos períodos na presença de umidade, libera o ácido acético, apresentando odor de vinagre, segundo reação na Figura 3 (THE MERCK INDEX, 1996).

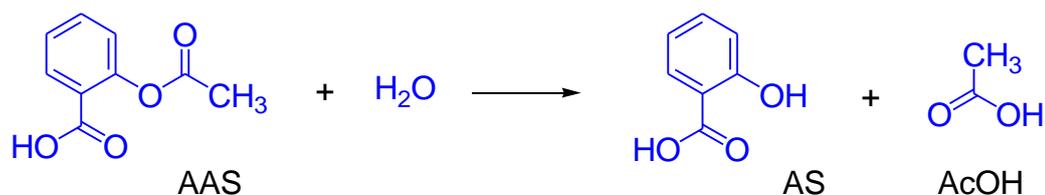


Figura 3: Reação de hidrólise do ácido acetilsalicílico (The Merck Index, 1996).

O ácido acetilsalicílico consiste em um grupo acetil esterificado ao grupo hidroxila fenólica do ácido salicílico. É o agente analgésico, antitérmico e antiinflamatório mais consumido no mundo. Por ser medicamento de venda livre e fácil acesso, ajuda na utilização e comercialização (COUDRAY & FAVIER, 2000).

3.2. FARMACOCINÉTICA DOS SALICILATOS:

Após a ingestão oral, uma quantidade substancial de AAS é hidrolisada ao AS, por esterases no tubo gastrointestinal, fígado e em menor extensão no soro (LEONARDS, 1962). Ele alcança seu pico no plasma em 0,5-1,5 h após a administração oral de AAS. O AS é metabolizado em maior quantidade pela conjugação com glicina, através da glicina *N*-acetilase (NGT) hepática, formando ácido salicílico (ASal). A hidroxilação, através de hidroxilases microsossomais hepáticas forma os compostos mais polares, tais como o ácido gentísico (AGT) e glicuronídeo fenólico (AS-FGlu) e acil-glicuronídeo (AS-AGlu), através da uridina difosfato do ácido glicurônico (UDPGA).

Entretanto, aproximadamente 60% do salicilato remanescente podem reagir com HO[•] (de enzimas hepáticas) para produzir além do AGT, dois derivados, o ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) e em menor extensão, o catecol (Cat) (GROOTVELD & HALLIWELL, 1986; BLACKBURN et al., 1998), produtos estes não relatados no metabolismo enzimático (Figura 4).

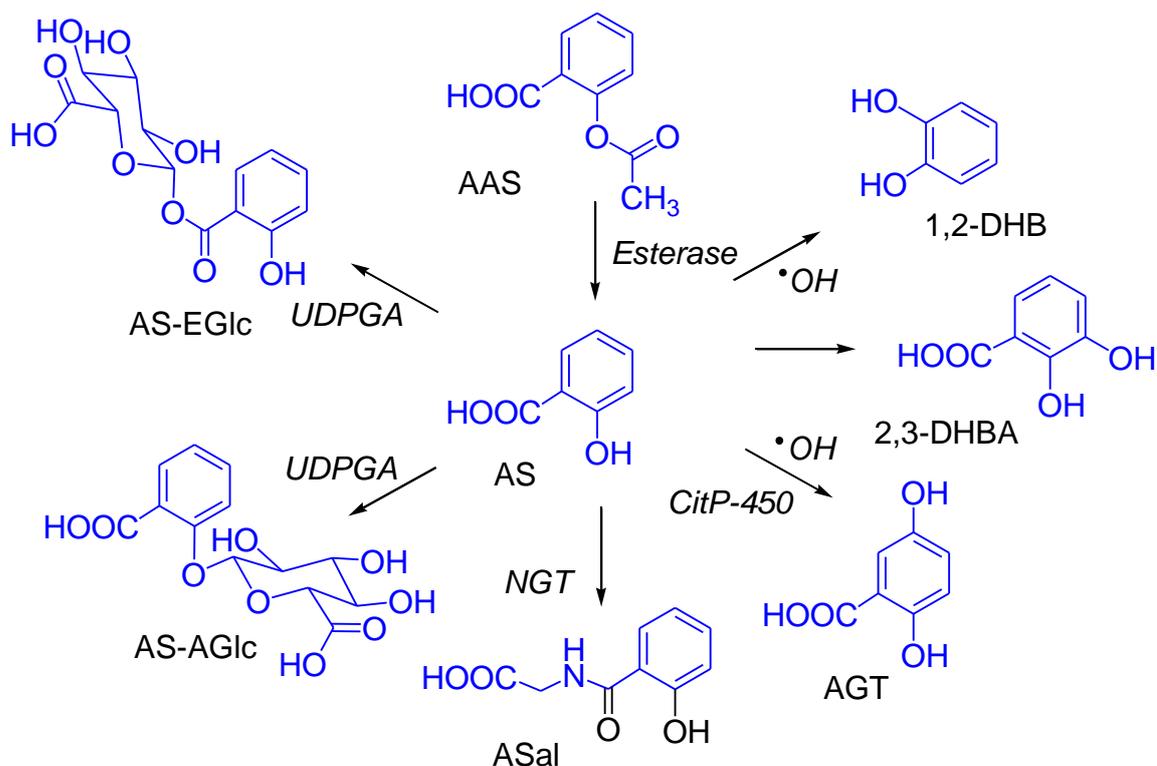


Figura 4: Principais vias de biotransformação dos salicilatos.

3.3. ACETILAÇÃO DE PROTEÍNA MEDIADA PELA ASPIRINA

A aspirina através da ligação covalente modifica e inativa a síntese das prostaglandinas, acetilando seletivamente o grupo hidroxila de um resíduo de Serina (Ser 530), entre os 70 aminoácidos terminais da cadeia da enzima PGES (ROTH, 1975).

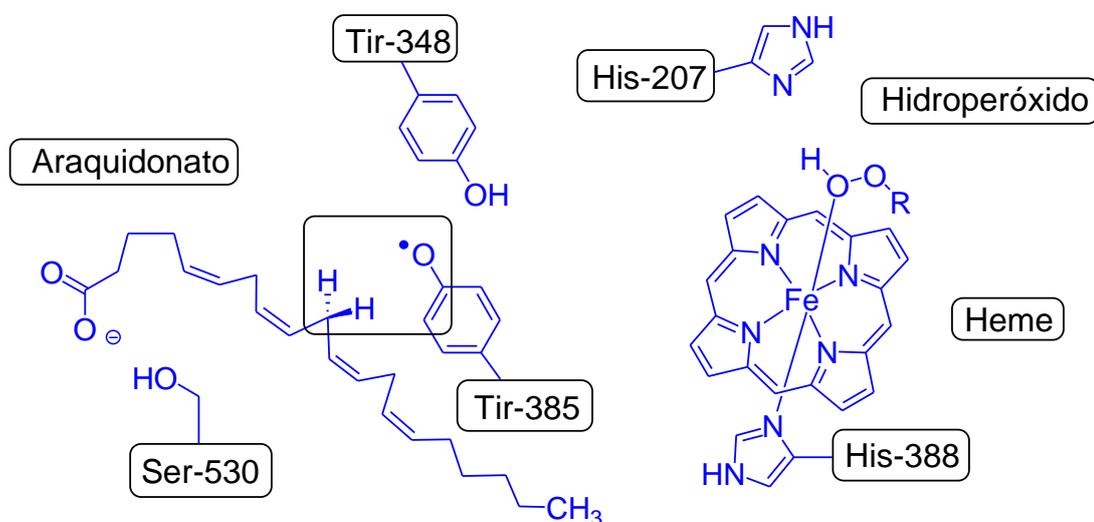


Figura 5: Modelo para o sítio ativo da prostaglandina endoperóxido sintase (SMITH, 1991).

A acetilação pelo AAS adiciona um substituinte volumoso na hidroxila da Ser 530, que inibe o acoplamento do ácido araquidônico (Figura 5) (DE WITT, 1990). A estequiometria

desta reação em baixas concentrações é 1:1, com um grupo acetil transferido de forma rápida e seletivamente para um monômero desta proteína dimérica. Em concentrações elevadas, por período de tempo prolongado, o AAS também acetila, não especificamente, uma variedade de proteínas e ácidos nucléicos (SMITH, 1989 e 1991). As estruturas (figura 6) fornecem as primeiras observações experimentais das interações moleculares feitas pela cadeia lateral acetilada Ser-530 e ácido salicílico no canal de ciclooxigenase do huCOX-2.

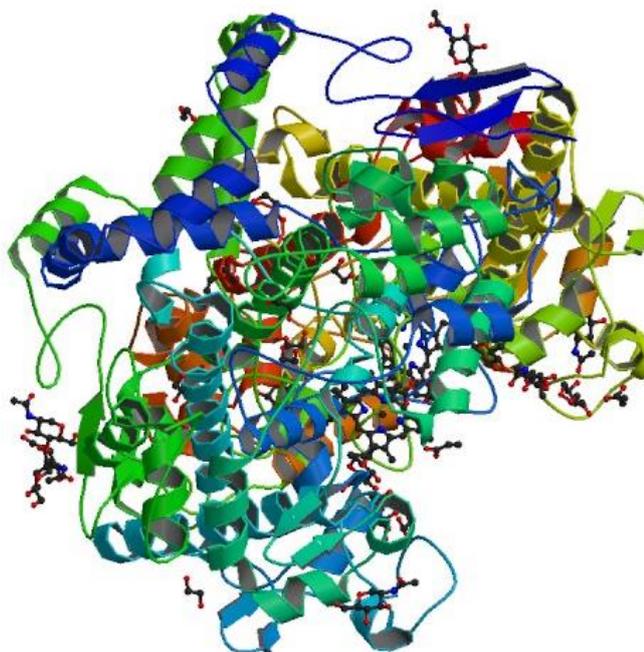


Figura 6: Estrutura Cristalina da Aspirina acetilando a Ciclooxigenase-2 Humana. (LUCIDO, 2016).

3.4. CARACTERÍSTICAS DAS CICLO-OXIGENASES (COX-1 e COX-2)

Em relação a COX-1 e a COX-2, são duas proteínas estruturalmente distintas, apresentando uma homologia de 60% na sequência de aminoácidos, com diferenças no sítio ativo, onde a COX-2 apresenta um bolsão hidrofóbico maior comparado a COX-1. As diferenças entre estas duas isoformas de ciclooxigenase podem ser observadas na Figura 7 (VANE, 1998).

Além disso, dentro desse canal hidrofóbico da ciclooxigenase, uma diferença de aminoácido na posição 523 (isoleucina na COX-1 e valina na COX-2) pode ser de importância crítica na seletividade de diversas drogas, isto é importante para compreender porque alguns fármacos são mais seletivos para a isoforma COX-2, especialmente aqueles com grupos laterais volumosos, contendo diferenças no anel aromático como nos fármacos ibuprofeno **4**, naproxeno **5**, fenoprofeno **6**, cetoprofeno **7**, rofecoxibe **8** e celocoxibe **9** (Figura 8) (VANE, 1998; KULKARNI, 2000; JOUZEAU, 1997).

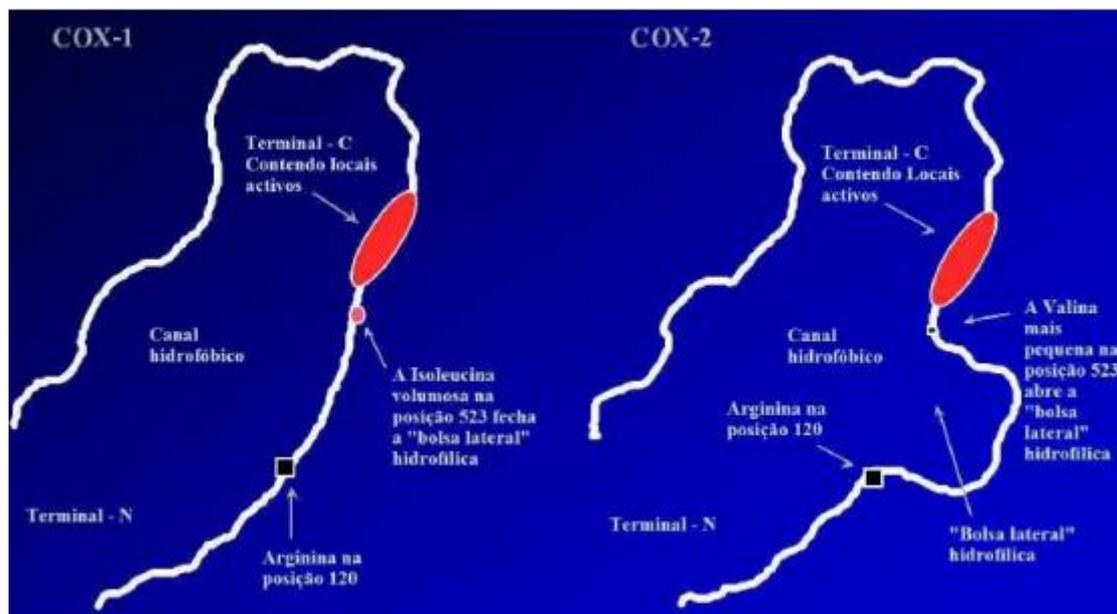


Figura 7: Representação esquemática da COX-1 e COX2 determinada por Cristalografia de Raios-X (SOUZA, 2008)

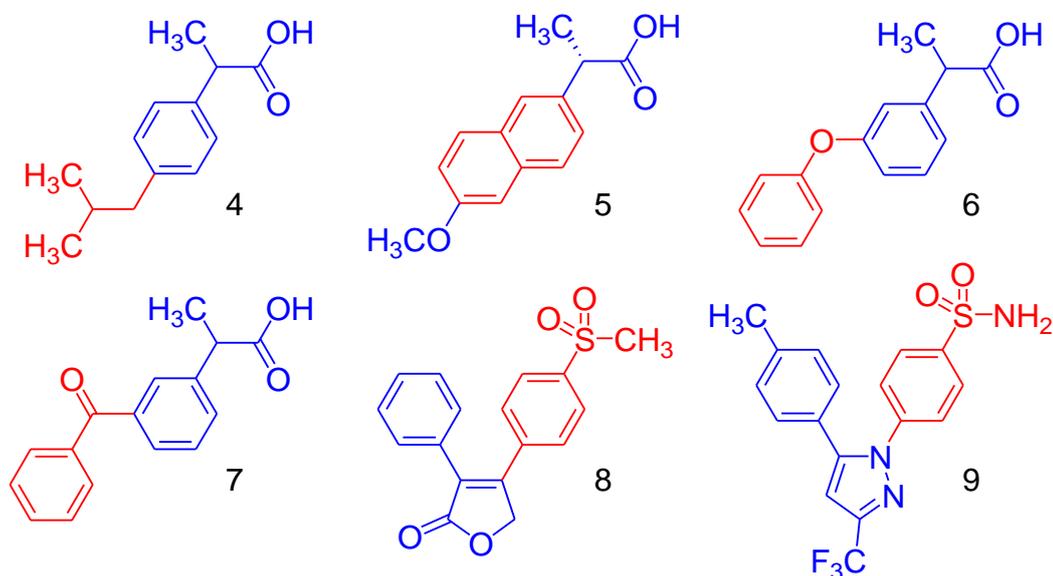


Figura 8: Fórmula estrutural de alguns derivados anti-inflamatórios.

3.5. RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM SALICILATOS:

A agregação plaquetária em pacientes com doença coronariana e riscos de acidente vascular cerebral está relacionada com a resistência ao tratamento, em pacientes que utilizam baixas doses de AAS, pois não impedem a formação de trombos. Os mecanismos da resistência à aspirina ainda são pouco conhecidos, uma vez que as plaquetas contêm, além da ciclooxigenase COX -1, uma variável quantidade de COX-2 (WEBER *et al.*, 1999; 2002) que é

pelo menos duas ordens de magnitude menos sensível à inibição por aspirina do que COX- 1 (MITCHELL *et al.*, 1994; ROCCA *et al.*, 2002). Além disso, outros aspectos podem estar envolvidos, dentre os quais os mecanismos via produção de isoprostaglandinas através de radicais livres.

De fato, embora a agregação plaquetária inibida pelo AAS ocorra primariamente pela COX, decrescendo a síntese de metabólitos pró-agregantes do ácido araquidônico como TxA₂; uma segunda via não enzimática foi identificada, na qual os derivados de isoprostanos oxidados a partir do ácido araquidônico exibiram potente ação vasoconstritora e efeito pró-agregante similar aos apresentados por TxA₂.

Condições fisiopatológicas que promovam doença vascular aterosclerótica como hipercolesterolemia, diabetes, hiperhomocisteinemia, podem estar associadas com o aumento de espécies reativas de oxigênio, elevando os níveis plasmáticos de isoprostanos como uma hipótese para o aumento independente da formação de agentes pró-agregantes em plaquetas, na resistência ao AAS (CSISZAR *et al.*, 2002).

3.6. EFEITO ANTICÂNCER NO TRATAMENTO COM SALICILATOS:

O câncer é atualmente responsável por uma em cada seis mortes no mundo. Mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos, e esse número deve subir para mais de 21 milhões de pessoas em 2030 (OMS, 2017). Em 1988, pela primeira vez demonstrou-se que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) preveniam o câncer de cólon (KUNE *et al.*, 1988). O uso prolongado dos AINES e os resultados obtidos com os estudos foram divididos em duas séries de dados: os estudos epidemiológicos que documentaram a associação entre o uso de AINES e o risco de desenvolvimento da doença e as triagens clínicas demonstrando que atualmente a administração dos AINES previne o câncer (RIGAS & KASHFI, 2005).

Os AINES são bem conhecidos pela ação antipirética, anti-inflamatória e analgésica, mas também existem estudos que demonstram que o uso prolongado dos salicilatos apresentaram uma redução no risco de câncer, como o de cólon, mama, próstata, pulmão e pele (CHOI *et al.*, 2013). Os artigos mais recentes citados abaixo demonstraram que os efeitos do AAS não se mantiveram apenas na inibição da COX, mecanismo pelo qual é descrito como clássico para esse fármaco (LAI *et al.*, 2008; SPITZ *et al.*, 2009; THUN *et al.*, 2012; GRONICH & RENNERT, 2013).

Pesquisadores investigaram o efeito do AAS na proliferação e apoptose de células SW480, uma linhagem celular de câncer de cólon retal humano que não expressa COX-2 (LAI

et al., 2008). Os autores mostraram que o AAS poderia inibir a expressão da proteína de mamíferos Bcl2 e aumentar a expressão de Bax, ambas são proteínas que modulam a apoptose de maneira negativa e positiva, respectivamente, sendo que o declínio na taxa de Bcl2/Bax contribuiu para a indução de apoptose (LAI *et al.*, 2008). Assim como no mecanismo proposto por Chung e colaboradores, também confirmou a apoptose em células tumorais, neste caso, a apoptose é desencadeada por um excesso na produção de ERO que levou à despolarização da mitocôndria por ação do AS (CHUNG *et al.*, 2003).

É importante relatar que a inflamação, na sua fase crônica é uma das causas possíveis para o desenvolvimento de câncer. Assim como também as infecções persistentes causadas por determinados agentes patogênicos, como no caso do papilomavírus humano (HPV) (MEDZHITOV, 2008). Em relação ao processo da carcinogênese, este depende da intensidade e agressividade do agente promotor. Sendo que se apresenta, na maioria das vezes, como um processo rapidamente progressivo, especialmente em certos tumores, quando estes expõem alta agressividade biológica (SILVA, 2006).

Em 2003 Taylor e colaboradores elucidaram duas vias que poderiam explicar a atuação das citocinas no desenvolvimento do câncer. A primeira ocorreria pela interação com fatores de proliferação, indução da atividade de angiogênese do tumor e promoção de metástase pelo aumento da adesão celular. Já a segunda via, refere-se à inibição da expressão de moléculas e receptores, que pode ocorrer tanto das células do sistema imunológico quanto tumoral, o que poderia dificultar a identificação e a destruição da célula tumoral (TAYLOR *et al.*, 2003)

Fisiologicamente, as citocinas ativam as proteínas que estão expressas em tecidos musculares estriados esqueléticos (MURF-1), que também ativam um sistema que induz a degradação de proteínas. O NF-kappaB é uma citocina que age como uma espécie de mensageiro do câncer. Apresenta um papel central, como mediador pró-inflamatório, e é hoje tão bem conhecido que “Quase todos os agentes anticancerígenos são inibidores de NF-kappaB” (BALDWIN, 2001)

Estudos realizados por Harris e Thun concluíram que as pessoas que utilizam regularmente medicamentos anti-inflamatórios (Brufen, Advil, Ibuprofen, Indocid, Nifluril, Voltaren) são consideradas menos vulneráveis ao câncer, do que as que não utilizam (HARRIS, 1999; THUN, 1996). Tudo isso, por que os AINES irão inibir as prostaglandinas e conseqüentemente inibir a produção dos mediadores químicos da inflamação, provocando uma diminuição considerável no desenvolvimento e propagação das células tumorais.

3.7. ATIVIDADE ANTIRRADICALAR DE SALICILATOS:

As espécies reativas de oxigênio são conhecidas pela contribuição no dano tecidual durante o fermento e a inflamação, ativação da fosfolipase A2 e mobilização do ácido araquidônico, dependente ou não de Ca^{2+} e a participação de rotas alternativas como o estresse oxidativo no processo inflamatório (BALBOA & BALSINDE, 2006).

Estudos realizados com salicilatos apresentaram diferentes reatividades com a 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e diferente capacidade de proteção na peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} /Ascorbato medida pelo nível de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os compostos exibiram também atividade sequestrante contra radicais peroxil gerados pela decomposição da 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dicloridrato, um azo-iniciador de radicais peroxil. Os resultados mostraram que o 5-ASA apresentou uma inibição dependente da concentração similar ao trolox e cisteína, sugerindo uma atividade antioxidante por inibir a fase de propagação, enquanto que o paracetamol (PAR) foi menos ativo e o ácido salicílico demonstrou uma fraca atividade (Figura 9). Estudo de relação estrutura e atividade mostraram que o grupo *para* amina aumenta o poder antioxidante e estabiliza o fenoxil radical formado, a *para* amida apresenta ressonância com a carbonila e grupo orto carboxilato não é um bom doador de elétrons (DINIS *et al.*, 1994).

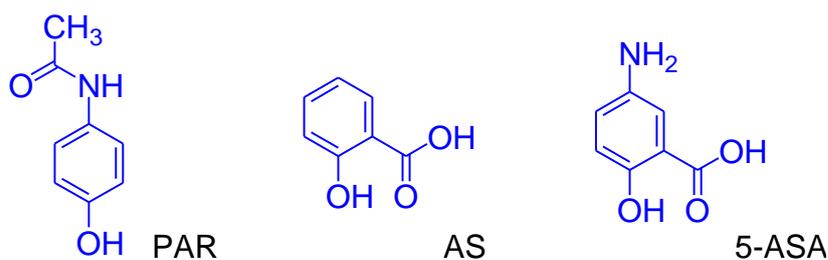


Figura 9: Estruturas químicas do paracetamol, ácido salicílico e ácido 5-amino-salicílico.

Estudos *in vitro* mostraram a atividade antioxidante dessas moléculas, enfocando principalmente a capacidade geral de o paracetamol diminuir a formação do malondialdeído em modelos de peroxidação lipídica (ORHAN & SAHIN, 2001; MAHARAJ *et al.*, 2004) e o salicilato pode funcionar como sequestrador de radicais hidroxil, observados nos modelos biológicos de Dinis *et al.*, (1994) e Maharaj *et al.*, (2006), mas não observado neste modelo. Mais recentemente, foi mostrado que a administração do paracetamol em ratos induz um aumento nos níveis de serotonina e norepinefrina cerebral e peroxidação lipídica induzida em eritrócitos humanos (CASPER *et al.*, 2000). Foi mostrado por Daya *et al.*, (2000) que a associação do paracetamol com aspirina exibe um efeito antioxidante em homogenados de cérebro de ratos, possivelmente devido ao efeito do paracetamol como antioxidante.

Em outro estudo o paracetamol apresentou uma significativa redução da geração do anion superóxido induzido por KCN assim como a peroxidação lipídica e quando é usada em combinação com a aspirina este efeito é potencializado (CASPER *et al.*, 2000). Similarmente, a aspirina administrada previamente com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) apresentou uma atenuação na depleção de dopamina estriatal em camundongos (AUBIN *et al.*, 1998; TEISMANN *et al.*, 2001). O metabólito da aspirina, ácido salicílico apresentou uma significativa proteção contra a indução de toxicidade dopaminérgica pelo MPTP ou 1-metil-4-fenil piridínio (MPP+) em camundongos (MOHANAKUMAR *et al.*, 2000) ou ratos (SAIRAM *et al.*, 2003), respectivamente. Em outros modelos de estudo, os salicilatos apresentaram uma capacidade sequestrante sobre os radicais hidroxil (GROOTVELD & HALLIWELL, 1996; HERMANN *et al.*, 1999) impedindo a oxidação radicalar do LDL induzida por óxido nítrico e superóxido (HERMANN *et al.*, 1999). O HO[•] tem uma alta reatividade e conseqüentemente está presente em concentrações extremamente baixas nos sistemas biológicos, mas a reação de hidroxilação aromática foi usada na medida de sua produção *in vitro* (LUO & LEHOTAY, 1997; COUDRAY & FAVIER, 2000).

3.8. EXEMPLOS DE DERIVADOS DE SALICILATOS

O derivado do ácido salicílico mais conhecido e mais utilizado é o ácido acetilsalicílico. Embora o ácido acetilsalicílico, seja bem conhecido para aplicações médicas, pouco se sabe sobre outros derivados do ácido salicílico, e há falta de dados e informações sobre os efeitos e avaliação biológica que os conectam. Nos últimos anos, diferentes derivados do ácido salicílico foram sintetizados para diversos fins (CHOWDHURY *et al.*, 2009).

O ácido salicílico é amplamente utilizado em síntese orgânica, e seus derivados sendo substâncias fenólicas, são biologicamente muito ativos. Além das atividades antipirética, analgésica e anti-inflamatória, alguns derivados podem apresentar citotoxicidade contra algumas linhagens de células tumorais e propriedades antioxidantes. E em muitos casos, estas duas atividades estão relacionadas (EKINCI, 2011; FUJIMORI, 2005).

O ácido acetilsalicílico (3) provoca vários efeitos diferentes no corpo, sua capacidade de suprimir a produção de prostaglandinas e tromboxanos é devida à inativação irreversível da enzima COX. Seu mecanismo de ação a difere de outros AINES, os quais são inibidores reversíveis (EKINCI, 2011). Outro derivado é o salicilato de metila (2), um produto natural de muitas espécies de plantas e usado para aromatizar alimentos, doces, bebidas, e produtos farmacêuticos. Pode ser obtido a partir da esterificação do ácido salicílico. Na medicina é usado como analgésico e antiinflamatório. O diflunisal (4) é um derivado benzeno difluorado

que atua através da inibição da produção de prostaglandinas usado como analgésico forte e antipirético, enquanto que o ácido 4-amino-salicílico (5) é usado para o tratamento da tuberculose (EKINCI, 2011).

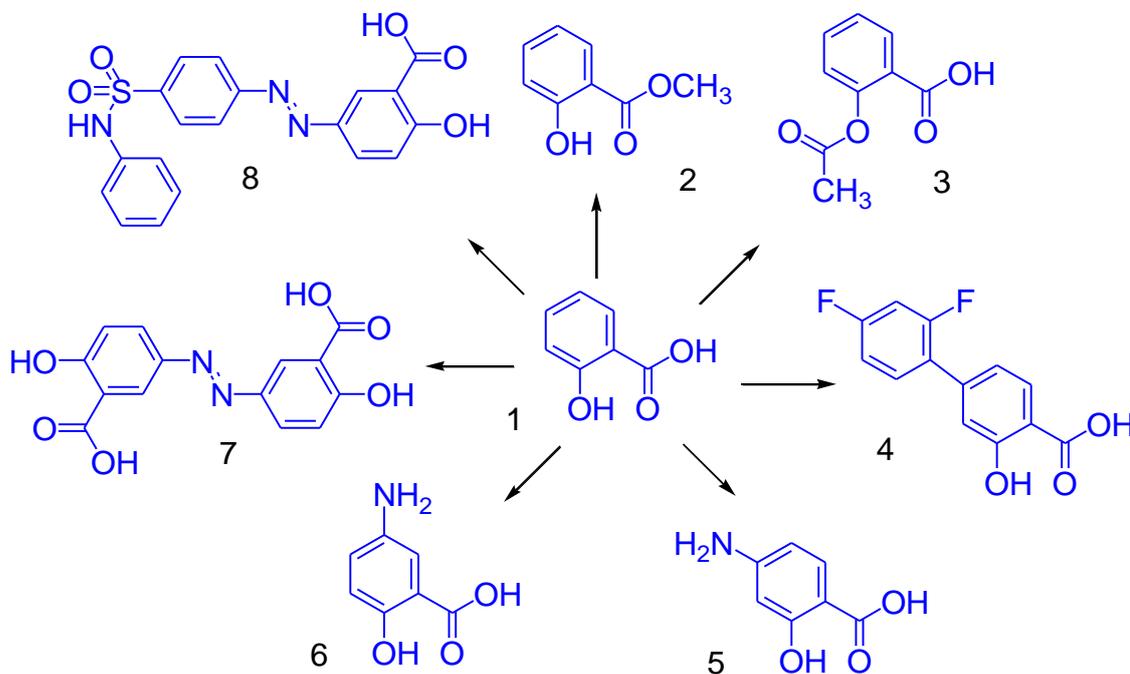


Figura 10. Alguns derivados salicílico e fórmulas.

A Mesalazina, (5-amino-salicílico ácido (5-ASA)) (6) é um fármaco anti-inflamatório utilizado para tratar a inflamação do trato digestivo, nomeada de colite ulcerativa (UC) (KLOTZ *et al.*, 1980). Olsalazina (7) é um pró-fármaco derivado da mesalazina que também libera 5-ASA pelas bactérias no intestino grosso (INSEL, 1996). É um fármaco específico aminossalicilato-intestinal que atua localmente e tem as suas ações predominantes no intestino, tendo, assim, poucos efeitos secundários sistêmicos. Como derivado do ácido salicílico, o 5-ASA é também pensado para ser um antioxidante, que intercepta radicais livres. O mecanismo de ação de mesalazina ainda não é bem estabelecido, acredita-se ser por redução da inflamação no cólon. Como a colite ulcerativa e outras doenças inflamatórias podem causar a produção excessiva de produtos químicos, como os mediadores da inflamação, à mesalazina pode funcionar bloqueando a atividade da ciclooxygenase e lipoxigenase, reduzindo a produção de prostaglandinas, e conseqüente diminuição da inflamação no cólon e nos sintomas associados com a UC (ACTIS *et al.*, 2008).

A sulfasalazina (8) é um fármaco sulfa, um derivado de mesalazina (6), utilizado principalmente como um agente anti-inflamatório para o tratamento de doença inflamatória do intestino, bem como para a artrite reumatóide. A sulfasalazina (8), um conjugado de azo de 5-

ASA com a sulfapiridina, é uma droga que é utilizada principalmente para o tratamento da UC. É um pró-fármaco que sofre degradação por bactérias no cólon, liberando o princípio ativo (5-ASA) e sulfapiridina (SCHAEFER, 1988; VILASECA, 1986).

A literatura apresenta muitas patentes sobre os derivados do ácido salicílico e seus. Como por exemplo, a criação de Gasco *et al* (2008), que se refere a novos derivados O-acyl de ácido salicílico com uma unidade doadora de NO. Eles relataram que estes compostos podem ser usados para prevenir e tratar eventos cardiovasculares e trombóticos, causados por agregação plaquetária, eventos isquêmicos subsequentes, acidente vascular cerebral tromboembólico, infarto agudo do miocárdio, angina de peito, acidente isquêmico transitório e reversível, déficits neurológicos e também que esses derivados são úteis na prevenção e tratamento de câncer, em particular os do trato gastrointestinal, que acaba afetando e aparelho urogenital, como câncer de cólon, câncer de bexiga e câncer de próstata (GASCO, 2008).

Com o objetivo de potencializar e expandir a atividade biológica do resveratrol, muitos trabalhos estão sendo realizados com moléculas híbridas de resveratrol- salicilatos. Aldawsari *et al.* (2015) planejaram moléculas de resveratrol e salicilato, com possível ação sobre a enzima ADN-metiltransferase (DNMT). Utilizaram ensaio de inibição da DNMT *in vitro*, alguns dos análogos de resveratrol-salicilato mostraram que a inibição seletiva contra enzimas DNMT3 eram maiores do que o resveratrol.

Um estudo de encaixe molecular revelou interações de ligação chave com enzimas DNMT3A e DNMT3B. Além disso, o análogo mais ativo (10) mostrou citotoxicidade considerável contra três células cancerosas humanas; HT-29, HepG2 e SK-BR-3, que era maior do que o resveratrol. Porém, são necessários mais estudos para compreender os mecanismos anticâncer destes derivados (ALDAWSARI *et al.*, 2015).

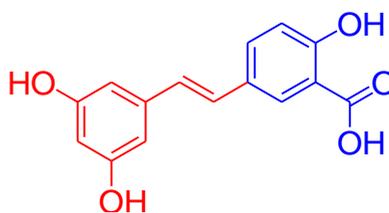


Figura 11: Derivado híbrido resveratrol-salicilato.

O trabalho mais recente foi realizado por Goldhahn *et al.*, (2016) com o objetivo de investigar os efeitos desse mesmo derivado em células T CD4 + humanas. Resveratrol e derivado suprimiram a secreção de citocinas e a proliferação de células T CD4 +. Os efeitos supressores parecem basear-se na supressão parcial da fosforilação de várias moléculas de sinalização importantes envolvidas na expressão das citocinas e no crescimento celular. Uma

vez que o híbrido amplificou significativamente os efeitos do resveratrol estes dados sugerem, tal molécula seja um composto candidato a fármaco interessante para o tratamento de artrite reumatóide e outras doenças auto-imunes conduzidas por células T (GOLDHAHN, 2016).

3.9.RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

Estudar a relação da estrutura com a atividade biológica de um composto-protótipo e seus análogos auxilia principalmente na determinação de quais partes da molécula são responsáveis pela atividade em sistemas biológicos, ou seja, o grupo farmacóforo (Thomas, 2000). As relações estrutura-atividade geralmente são ordenadas pela alteração de parte da estrutura química do protótipo, cuja finalidade é observar qual a influência na atividade sob o ponto de vista quali e quantitativo. Pode-se alterar a dimensão e a conformação do esqueleto de carbono, a natureza e o grau de substituição, ou ainda a estereoquímica (THOMAS, 2000).

Em relação à atividade antioxidante, está intimamente relacionada à capacidade da molécula de doar elétrons. A etapa de transferência do hidrogênio se destaca bastante, mas a atividade antioxidante não depende apenas da força de energia da ligação O-H. A estabilização das espécies cátion-radicalar e radicalar formadas também devem ser consideradas (WRIGHT *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2005).

Do ponto de vista químico, muitos fatores influenciam a atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, em especial a posição de substituição e o número de grupos hidroxila (OH), assim como também as propriedades de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio.

A posição de substituição da hidroxila no anel fenólico, considerada em relação a uma posição fixa, influencia diretamente a atividade antioxidante. Compostos contendo a hidroxila em *para* (posição 4) são mais ativos do que aqueles substituídos em *orto* ou *meta* (posições 1 e 2, respectivamente) (PANNALA *et al.* 2001; CHENG *et al.*,2003).

Alguns autores relataram que, compostos com dois (mais comum) ou três substituintes grupos (hidroxilas) no anel benzênico possuem maior atividade antioxidante do que os monohidroxilados, de acordo com a relação apresentada (PANNALA *et al.* 2001; CHENG *et al.*, 2003). Assim, há necessidade de estudos mais aprofundados e seleção de compostos com maior atividade e seletividade, novos derivados devem ser concebidos, sintetizados e avaliados, em especial, derivados de ácido salicílico que possam ser utilizados clinicamente como inibidores seletivos de COX-2.

3.10. MODELAGEM MOLECULAR

Química computacional, ocasionalmente chamada de modelagem molecular, é uma série de técnicas utilizadas na investigação de problemas químicos em um computador. É uma ferramenta do planejamento racional envolvendo a compreensão da interação ao nível molecular de uma substância com seu receptor, sob os pontos de vista quali e quantitativo. Permite que se analise profundamente, não só a estrutura molecular compreendida em determinado sistema biológico, como também fornece meios para prever a potencialidade de moléculas candidatas a compostos bioativos (LEWARS, 2011).

Atualmente há uma grande variedade de métodos de cálculos computacionais, os quais são caracterizados pela presença de diferentes métodos computacionais e níveis de teoria, além de como estes métodos são implantados (O'BOYLE; TENDERHOLT, 2008). Estes métodos podem ser classificados em métodos semi-empíricos, SE, (THIEL, 2003), métodos *Ab Initio* (ZHANG *et al.*, 2013), e o método da teoria do funcional da densidade, DFT (SCHWINGENSCHLÖGL; SCHUSTER, 2012). O método utilizado nesse estudo foi o método da teoria do funcional da densidade (DFT).

A teoria do funcional da densidade (da sigla inglesa *Density Functional Theory*), tem causado um impacto sem precedentes na aplicação da mecânica quântica (COHEN *et al.*, 2012), sendo que ao longo dos últimos 20 anos, foi uma das ferramentas mais utilizadas na investigação e solução de problemas nas áreas de atuação da química (BURKE, 2012).

A maior fonte de erro em DFT está na natureza aproximada da energia de troca e de correlação. Por isso, numerosos esquemas têm sido desenvolvidos para obter formas aproximadas do funcional para esta energia, sendo que atualmente ainda há esforços na busca por funcionais mais precisos para aplicação em áreas específicas (ATKINS; FRIEDMAN, 2005). Como exemplo, houve a formulação de funcionais como LDA (*Local Density Approximation*); GGA (*Generalized Gradient Approximation*); dentre outros, como mPWPW91, B3LYP, MPW1K, PBE1PBE, BLYP, BP91, e PBE, que foram desenvolvidos para cálculos DFT (ATKINS; FRIEDMAN, 2005).

Em especial o funcional B3LYP, que é atualmente um dos funcionais de DFT mais utilizado e citado na literatura (MUSSO *et al.*, 2011; NAZARPARVAR *et al.*, 2012; HUANG; LEE, 2012; KUMAR *et al.*, 2012; JIMENEZ-IZAL *et al.*, 2012; ICHINO; YOSHIOKA, 2012), é um funcional híbrido, que contém em sua formulação funcionais GGA de troca e correlação e que inclui uma contribuição vinda do método de HF. Ele foi desenvolvido por Becke (indicado pela letra B), e um termo de correlação desenvolvido por Lee, Yang e Parr

(sigla LYP) e ainda possui três parâmetros empíricos escolhidos para otimizar sua performance (indicado pelo número 3) (PEREIRA, 2008).

A relativa energia das espécies moleculares é fundamental para o conhecimento do comportamento cinético e termodinâmico, e isso pode ser importante para a síntese destas espécies. As frequências vibracionais de uma molécula fornece informação sobre a natureza eletrônica das ligações químicas, e a predição do espectro representado pode ser útil para químicos experimentais. Outra importante característica da molécula é a densidade de distribuição eletrônica, que possibilita a predição do momento dipolar, ordem de ligação, distribuição da carga líquida e a forma dos orbitais moleculares (LEWARS, 2011).

O software Gaussview e Gaussian são dois programas complementares. No programa Gaussview, plota-se o composto (ou o átomo desejado) ajusta-se a geometria inicial, e se especifica os cálculos futuros a serem realizados. Este arquivo, após salvo, gera-se um ficheiro com extensão gif, que é chamado de *input*, no qual contém todas as informações sobre o composto, como por exemplo, as coordenadas cartesianas dos núcleos, quais átomos (utiliza-se apenas os símbolos dos elementos, Ex.: H para hidrogênio, He para hélio, Li para lítio, e assim sucessivamente), tipos de cálculo dentre outras informações (FRISH, 2013).

Ele pode ser aberto em um programa editor de texto comum (como por exemplo, bloco de notas e wordpad) para edição manual, caso for necessário adicionar parâmetros, editar a estrutura do composto, especificar fatores de convergência, etc. Este ficheiro, *input*, é então aberto com o programa Gaussian, o qual irá apenas realizar os cálculos pré-estabelecidos com o programa Gaussview.

O tempo de cálculo irá depender da quantidade e de quais átomos estão na molécula, do método de cálculo e das funções bases escolhidas, além de que tipo de cálculo está realizando. Em geral, para cálculos de energias de moléculas pequenas, como para a água, por exemplo, demora-se apenas alguns segundos, porém, para cálculo de espectros ultra-violeta (UV) e Raman, para moléculas maiores, como compostos orgânicos aromáticos, por exemplo, pode chegar a 2 horas, dependendo, é claro, do método de cálculo e das funções bases além da velocidade de processamento do computador utilizado para se realizar o cálculo (ORTOLON, 2014).

Ao fim do cálculo, o programa irá pedir se deseja abrir o arquivo com os cálculos realizados, o que contém os resultados solicitados. Este arquivo de saída, chamado de *output*, pode também ser aberto com um programa editor de texto, ou então aberto com um programa específico que analisa graficamente estes resultados, como o próprio Gaussview ou outros programas, como o Gabedit dentre outros vários disponíveis.

Os cálculos de propriedades eletrônicas tais como orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), potencial de ionização (PI), energia de dissociação de ligação fenólica (EDL_{OH}) foram realizados usando os pacotes Gaussview e Gaussian 2003 (FRISCH *et al.* 2004), usando teoria do funcional de densidade (DFT), no nível B3LYP com o conjunto de base 6-31G(d,p) (PARR *et al.* 1989).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. COMPOSTOS ESTUDADOS

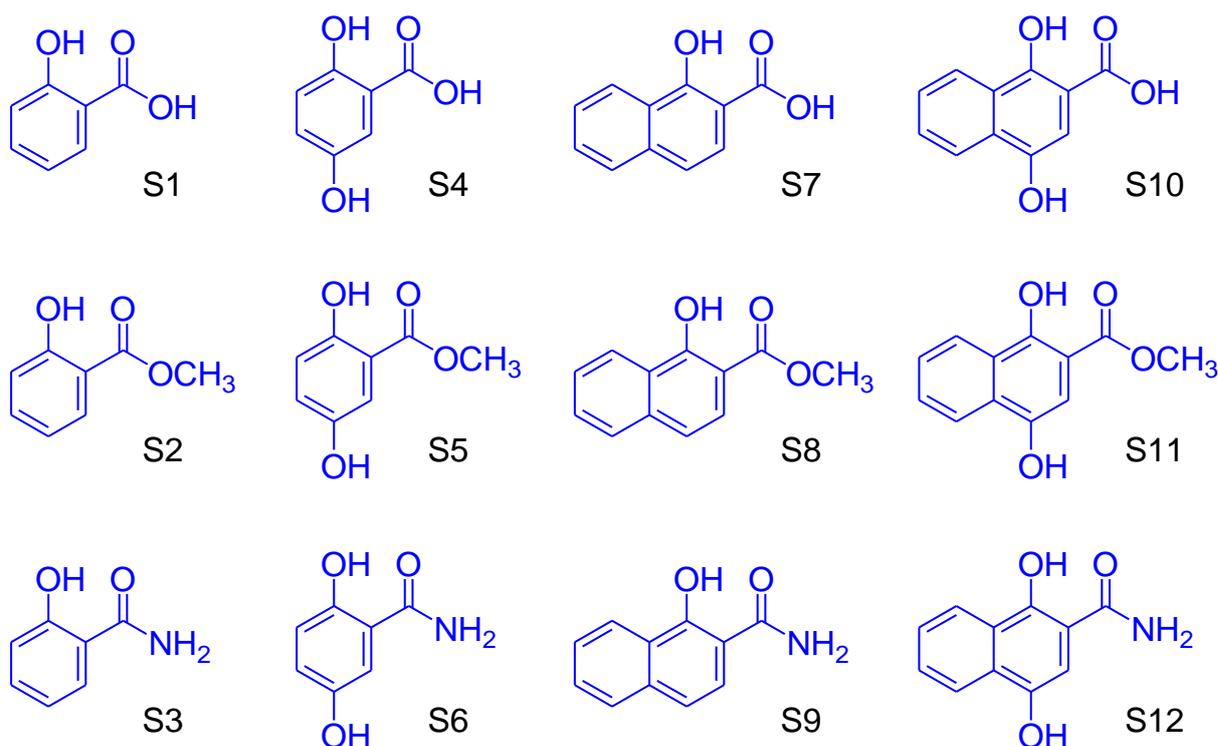


Figura 12: Composto estudados por modelagem molecular: ácidos (S1, S4, S7 e S10) ésteres (S2, S5, S8 e S11) e amidas (S3, S6, S9 e S12)

Os compostos selecionados para estudo estão descritos nas Figuras 12. Os quais teoricamente deverão ter um aumento de sua lipossolubilidade e volume, necessário para uma maior interação no sítio ativo da COX, uma enzima com vários aminoácidos hidrofóbicos (GARG *et al.*, 2003). A Distribuição de spin aplicada, avalia quanto maior a capacidade de hiper-conjugação de spin no anel aromático da espécie radicalar intermediária formada, maior sua estabilização e maior seu efeito anti-radicalar (CHENG *et al.*, 2003).

4.1.2. ENERGIA DOS ORBITAIS MOLECULARES DE FRONTEIRA

A atividade antioxidante encontra-se diretamente relacionada às propriedades eletrônicas das substâncias, que podem ser representadas nos estudos de modelagem molecular, por meio de cálculos de parâmetros, mencionados a seguir:

O HOMO está relacionado com a capacidade doadora de elétrons, caracterizando a molécula como nucleofílica. Altos valores de HOMO indicam maior nucleofilicidade. Enquanto que o LUMO está relacionado com a capacidade aceptora de elétrons, caracterizando a molécula como eletrófila. Baixos valores de LUMO indicam maior eletrofilicidade. Seus valores são expressos em elétron-volt (eV).

Estes parâmetros estão relacionados com as regiões em que a estrutura química do fármaco pode ser atraída por pontos específicos do receptor biológico como regiões ricas ou deficientes em elétrons. É um importante parâmetro que contribui para uma maior compreensão da reatividade química de um candidato a ligante em um conjunto de moléculas em estudo (KUBINYI, 2002). Já o GAP (L-H) representa a reatividade do composto. Quanto mais reativo, menor o intervalo (Gap). É obtido pela diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO (CHENG *et al.*, 2003).

4.1.3. CÁLCULOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Uma vez que a atividade farmacológica para alguns compostos fenólicos decore da transferência de elétron ou hidrogênio, os cálculos do potencial de ionização (PI) e energia de dissociação da ligação fenólica (EDL_{OH}) serão realizados. O PI de uma molécula é a energia necessária para remover um elétron de sua estrutura atômica ou molecular. Enquanto que a EDL_{OH} é a energia necessária para remover um hidrogênio radical da estrutura molecular.

O PI pode ser calculado pela diferença de energia da molécula neutra (EM^0) e seu respectivo cátion radical (EM^{*+}), segundo a equação 1. Enquanto que a EDL_{OH} é calculada pela diferença de energia da semiquinona (EM^*) mais o hidrogênio radical (EH^*), menos a energia de sua respectiva molécula neutra (EMH^0), segundo a equação 2 (FRISCH *et al.* 2004).

$$PI = [EM^{*+}] - [EM^0] \text{ (Eq. 1)}$$

$$EDL_{OH} = [EM^* + EH^*] - [EMH^0] \text{ (Eq. 2)}$$

Os valores de PI e EDL_{OH} serão relacionados à estabilidade química do cátion radical ou semiquinona, respectivamente, com um aumento no número de estruturas de ressonância devido a substituição do anel benzeno por naftaleno (HOYT, 2010).

4.2. METODOLOGIA SINTÉTICA

Os derivados dos ácidos salicílicos e gentísico foram preparados através das reações clássicas de esterificação, segundo a literatura descrita previamente por nosso grupo (BORGES & CASTLE, 2015).

4.2.1. COMPOSTOS PROPOSTOS PARA SÍNTESE

Os compostos derivados de salicilatos propostos para a síntese química são mostrados na Figura 13.

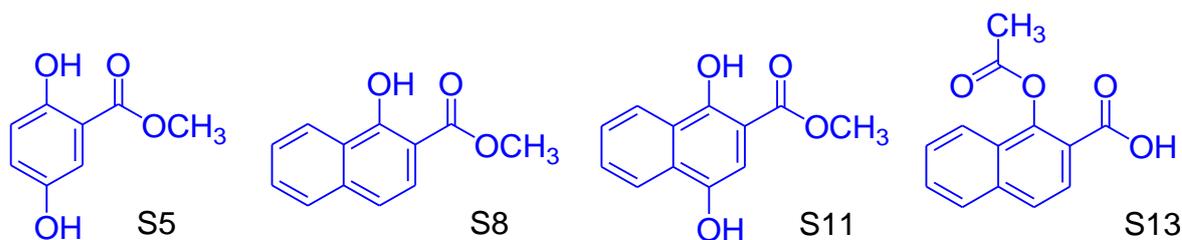
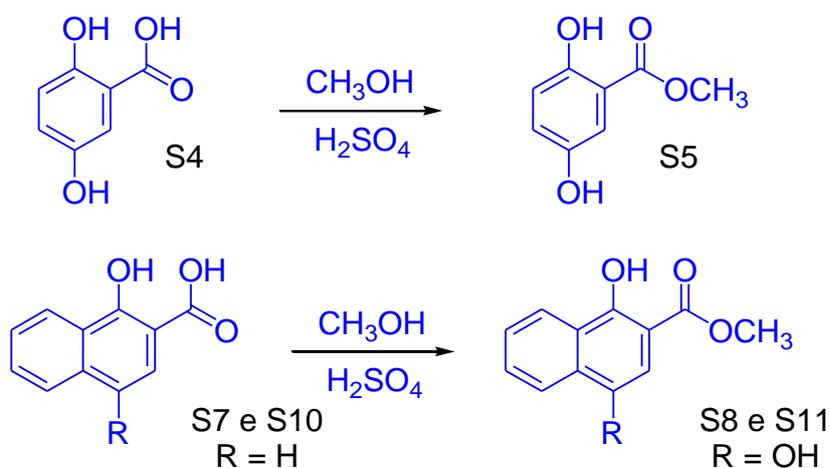


Figura 13. Compostos sintetizados: gentísico (S5) e naftogentísicos (S8, S11 e S13).

4.2.2. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS

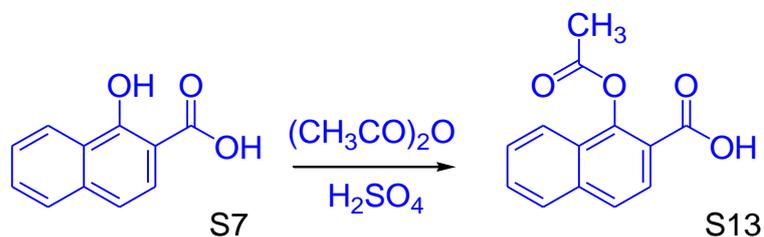
Os derivados do tipo éster gentisato **S5**, naftosalicilato **S8** e naftogentisato **S11** de metila foram preparados a partir da reação de esterificação dos ácidos gentísico **S4**, naftosalicílico **S7** e naftogentísico **S10**, usando metanol como reagente e ácido sulfúrico como catalisador, de acordo com o Esquema 1.



Esquema 1: Reações de esterificação para obtenção dos derivados (S5, S8 e S11).

4.2.3. OBTENÇÃO DO ÁCIDO ACETIL-NAFTOSALICILATO

O segundo grupo de derivados do tipo éster foram obtidos através da reação entre o ácido naftosalicílico **S7** usando anidrido acético como reagente e ácido sulfúrico como catalizador, de acordo com o Esquema 2.



Esquema 2: Reação para obtenção do éster de naftosalicílico.

4.2.4. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS DERIVADOS

A identificação e a caracterização físico-química dos novos derivados dos ácidos naftosalicílico e gentísico foram realizadas através do ponto de fusão. Os demais dados foram comparados com os dados da literatura (BORGES & CASTLE, 2015).

4.2.5. DETERMINAÇÃO DO PONTO DE FUSÃO

O ponto de fusão é utilizado para identificação do composto e como critério de pureza. A determinação do ponto de fusão é um dos métodos de identificação mais antigos para substâncias orgânicas. O valor obtido é um dado que pode ser facilmente determinado e também facilmente tabulado e classificado. As substâncias puras fundem-se a uma temperatura constante.

O ponto de fusão foi determinado utilizando uma pequena quantidade do sólido entre lamínulas, sendo que a substância estava sem água, para que não houvesse erros analíticos. Posteriormente a lamínula foi colocada no aparelho de modelo MQFAD 203 a uma temperatura inicial de 28.5°C.

A substância foi observada por meio de uma lupa, até que se iniciasse o processo de fusão. Era observado o início do processo de fusão em uma determinada temperatura e posteriormente a substância fundia-se totalmente em uma temperatura mais elevada, em seguida calculavam, a média, que é o ponto de fusão (SZPOGANICZ. 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi estimada para os derivados ácidos, éster e amida de salicilatos apresentados da Figura 14, através dos cálculos de modelagem molecular usando o funcional híbrido B3LYP e conjunto de base 6-31G (d,p). A substituição do anel benzeno por naftaleno visa alterar o efeito eletrônico, especialmente a nucleofilicidade pelo aumento da capacidade doadora de elétrons e/ou hidrogênios, acentuando seu efeito antioxidante.

Além disso, o hidrogênio adicional na posição da hidroxila *para* relacionada foi também considerada. De fato, os salicilatos apresentaram uma capacidade sequestrante sobre os radicais hidroxil (GROOTVELD & HALLIWELL, 1996; HERMANN *et al.*, 1999), seus derivados ácido salicílico **1** e o ácido gentísico **4** são a primeira e segunda linha de metabólitos da aspirina, que impediram a oxidação radicalar do LDL induzida por óxido nítrico e superóxido (HERMANN *et al.*, 1999). Entretanto, a capacidade antioxidante de seus naftosalicilatos nunca foi avaliada.

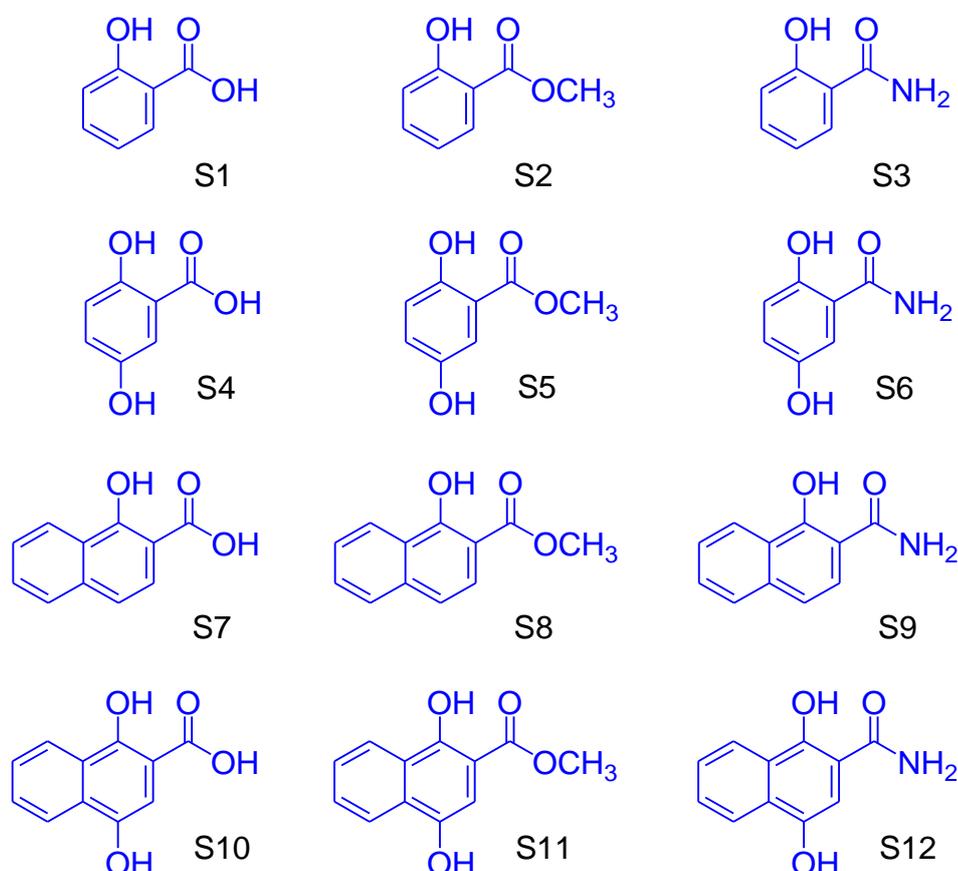


Figura 14. Derivados de salicilatos estudados por modelagem molecular.

As estruturas de menor energia obtidas para os derivados estudados foram calculadas pelo método B3LYP/6-31G(d,p) e são apresentados da Figura 15. Este método tem mostrado boa correlação com dados cristalográficos (STRENALYUK, SAMDAL & VOLDEN, 2008).

Nossos resultados mostraram a formação de uma ponte de hidrogênio intramolecular entre os hidrogênios da posição *orto* e os grupos carbonilas dos grupamentos ácidos, ésteres e amidas. Enquanto que a hidroxila da posição *para* apresentou uma inversão entre os derivados gentisatos (S4-S6) e naftogentisatos (S10-S12), devido às repulsões estereo-eletrônicas com o anel aromático. Esses resultados foram obtidos por estudos anteriores realizados por membros do nosso grupo de pesquisa. As estruturas que apresentaram maior estabilidade nas suas energias são mostrada na figura 15. Essas estruturas são relativamente simples e apresentam uma certa rigidez, impedindo ataques eletrofílicos e nucleofílicos.

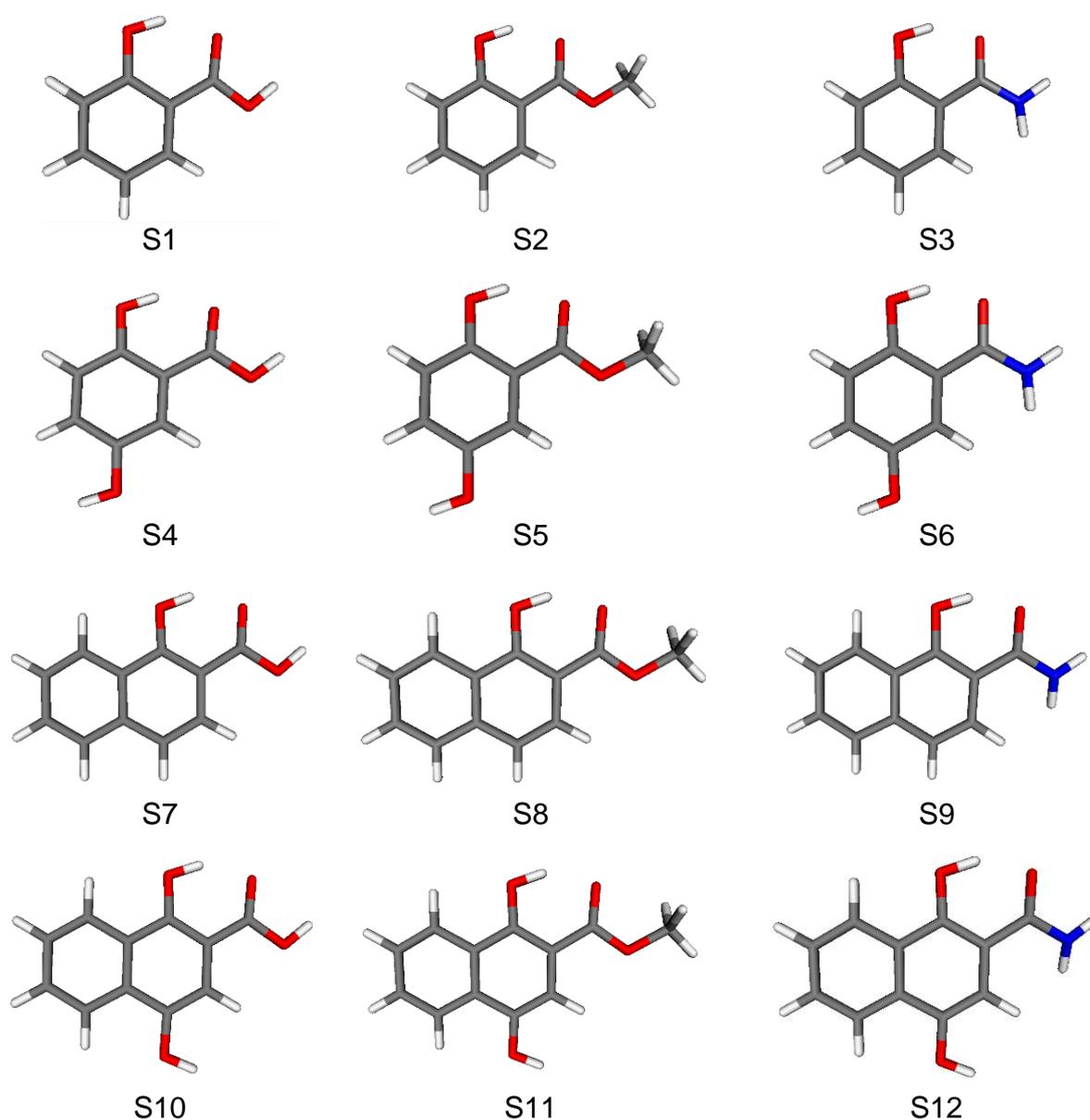


Figura 15. Estruturas otimizadas pelo método B3LYP/6-31G(d,p) de derivados de salicilatos.

A capacidade antioxidante para os compostos foi predita usando a energia dos orbitais moleculares de fronteira orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO), orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO), a capacidade doadora de elétrons ou hidrogênio foram determinadas pelo potencial de ionização (PI) e energia de dissociação de ligação fenólica (EDL_{OH}), respectivamente. Estes valores são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades teóricas de derivados dos salicilatos.

Compounds	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP (eV)	PI (kcal/mol)	EDL OH (kcal/mol)
1	-6,24	-1,46	4,77	192,62	116,33
2	-6,13	-1,32	4,80	189,16	111,55
3	-6,04	-1,18	4,85	187,61	114,49
4	-5,68	-1,49	4,19	178,95	113,24
5	-5,58	-1,36	4,22	175,83	106,88
6	-5,53	-1,22	4,30	175,16	110,23
7	-5,73	-1,54	4,19	173,61	108,75
8	-5,64	-1,43	4,21	170,76	108,71
9	-5,58	-1,27	4,30	169,82	112,31
10	-5,36	-1,50	3,85	165,19	104,26
11	-5,27	-1,39	3,88	162,45	104,21
12	-5,25	-1,25	3,99	162,22	107,75

Legenda: HOMO (Mais alto orbital molecular ocupado), LUMO (Mais baixo orbital molecular desocupado), PI (Potencial de ionização), EDL OH (Energia de dissociação da ligação O-H).

Os valores de HOMO, LUMO e GAP indicam um aumento significativo na capacidade doadora de elétrons. Os resultados mostraram que a adição do grupamento hidroxila aumenta a nucleofilicidade e que a substituição do anel aromático benzeno por naftaleno aumenta ainda mais, uma vez que estes compostos apresentaram os maiores valores de HOMO e os menores valores de GAP. De fato, os valores entre -6,24 a -6,04eV para o ácido salicílico e seus derivados (1-3) são muito inferiores quando comparados com os valores de -5,68 a -5,53eV para o ácido gentísico e derivados (4-6) e de -5,73 a -5,58eV para os derivados naftosalicílico (7-9). A combinação destes dois grupos nas moléculas do naftogentísico e seus derivados (10-12) apresentou os maiores valores de HOMO de -5,36 a -5,25eV e os menores valores de GAP de 3,85 a 3,99eV, indicando que estes compostos são os mais nucleofílicos e apresentam menor energia de transferência de HOMO para LUMO.

De fato, as diferenças nos valores obtidos e as regiões dos orbitais bem como dos grupos funcionais envolvidos na capacidade nucleofílica podem ser observados na disposição dos orbitais de HOMO, bem como os valores de GAP e as regiões de LUMO. Os resultados mostram os ácidos estudados, onde houve uma contribuição do anel aromático adicional e da hidroxila na posição *para*. Um aumento nas estruturas de ressonância pela presença dos grupos hidroxila adicional e mais especialmente pelo naftaleno (Figura 16).

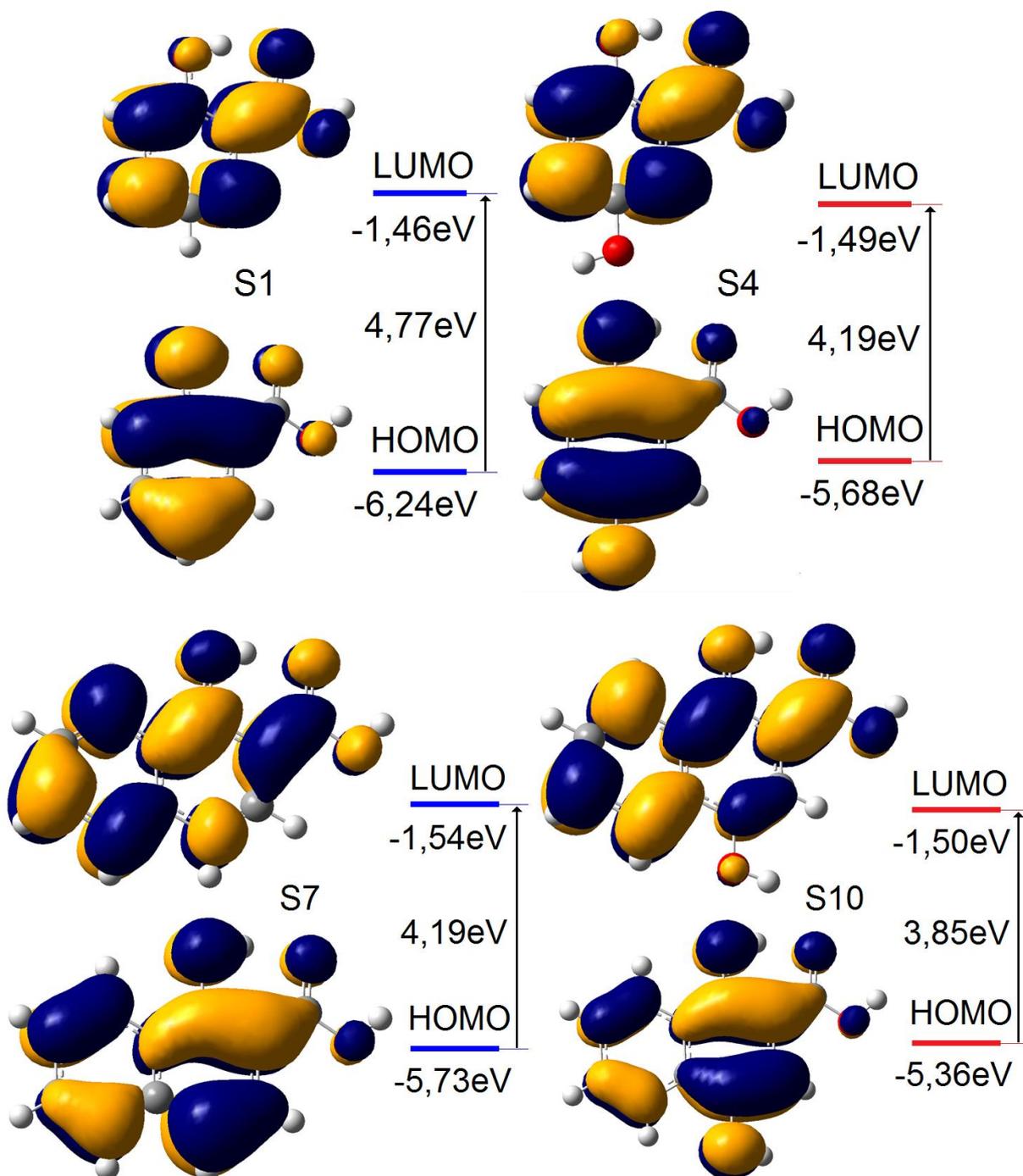


Figura 16. Orbitais de fronteira e energia de transferência de HOMO-LUMO para salicilatos (S1, S4, S7 e S10).

A mesma tendência foi observada para o potencial de ionização (PI), uma vez que esta propriedade está bem relacionada com as energias do orbital molecular de fronteira por se tratar

de uma propriedade relacionada com a capacidade doadora de elétrons. Assim, os valores de PI indicaram um aumento significativo na capacidade doadora de elétrons pela adição do grupo hidroxila e da substituição do anel benzeno por naftaleno.

Os resultados descritos na Tabela 1 mostraram um valor médio de $189,79 \pm 2,56$ kcal/mol para o ácido salicílico e seus derivados (1-3), sendo estes bem superiores quando comparados com os valores médios de $176,64 \pm 2,02$ kcal/mol para o ácido gentísico e derivados (4-6) e de $171,39 \pm 1,97$ kcal/mol para os derivados naftosalicílico (7-9).

Os compostos com maior capacidade doadora de elétrons mostraram valores médios entre $163,28 \pm 1,65$ kcal/mol para as moléculas derivadas do ácido naftogentísico e seus derivados (10-12), confirmando que os grupos hidroxila adicional e a alteração biossosterismo entre o anel benzeno por naftaleno aumenta o caráter elétron doador e a capacidade antioxidante por transferência de elétrons para estes compostos.

A transferência de hidrogênio é um segundo mecanismo de neutralização de radicais livres e a energia de dissociação de ligação fenólica ou outro átomo doador de hidrogênios podem ser calculadas para estimar a capacidade antioxidante de moléculas orgânicas (VAGÁNEK, 2014; XUE, 2014).

Assim, os menores valores de dissociação de ligação fenólica (EDL_{OH}) para estes compostos indicaram um aumento significativo na capacidade doadora de hidrogênios e da capacidade antioxidante. Assim, nesse cálculo também pode ser observada a estabilidade da semiquinona formada pela deslocalização de elétrons a partir do grupo fenoxil para os demais grupos funcionais.

Os resultados na Tabela 1 para o EDL_{OH} apresentaram a mesma capacidade que na transferência de elétrons. Um valor médio de $114,12 \pm 2,41$ kcal/mol para o ácido salicílico e seus derivados (1-3), enquanto que os valores médios de $110,11 \pm 3,18$ kcal/mol para o ácido gentísico e derivados (4-6) e de $109,92 \pm 2,06$ kcal/mol para os derivados naftosalicílico (7-9), sendo mais baixos e potencialmente com maior capacidade. No entanto, os compostos com maior capacidade antioxidante por doação de hidrogênios mostraram valores médios entre $105,40 \pm 2,02$ kcal/mol para as moléculas derivadas do ácido naftogentísico e seus derivados (10-12), confirmando a importância dos grupos hidroxila adicional e alteração anel naftaleno para o aumento da capacidade antioxidante por transferência de hidrogênios.

5.2. MECANISMO DE OXIDAÇÃO E HIDROXILAÇÃO

Aproximadamente 60% do ácido salicílico S1 não metabolizado pode reagir com o radical livre hidroxil (HO^\bullet) produzindo derivados hidroxilados como ácido gentísico S4. Os derivados hidroxilados ácido 2,3-dihidroxi-benzóico **9** e catecol **10** são compostos não relacionados ao metabolismo enzimático, formados especialmente através de reações via radicais livres, especialmente do HO^\bullet (Figura 17) (GROOTVELD & HALLIWELL, 1986; BLACKBURN *et al.*, 1998). O ácido gentísico S4 pode também ser gerado da oxidação enzimática via citocromo P-450 *in vivo*, enquanto que o ácido 2,3-dihidroxi-benzóico **3** pode ser produzido somente pelo ataque do HO^\bullet no anel salicilato e o catecol **4** é formado pela reação de descarboxilação (HALLIWELL, 1999).

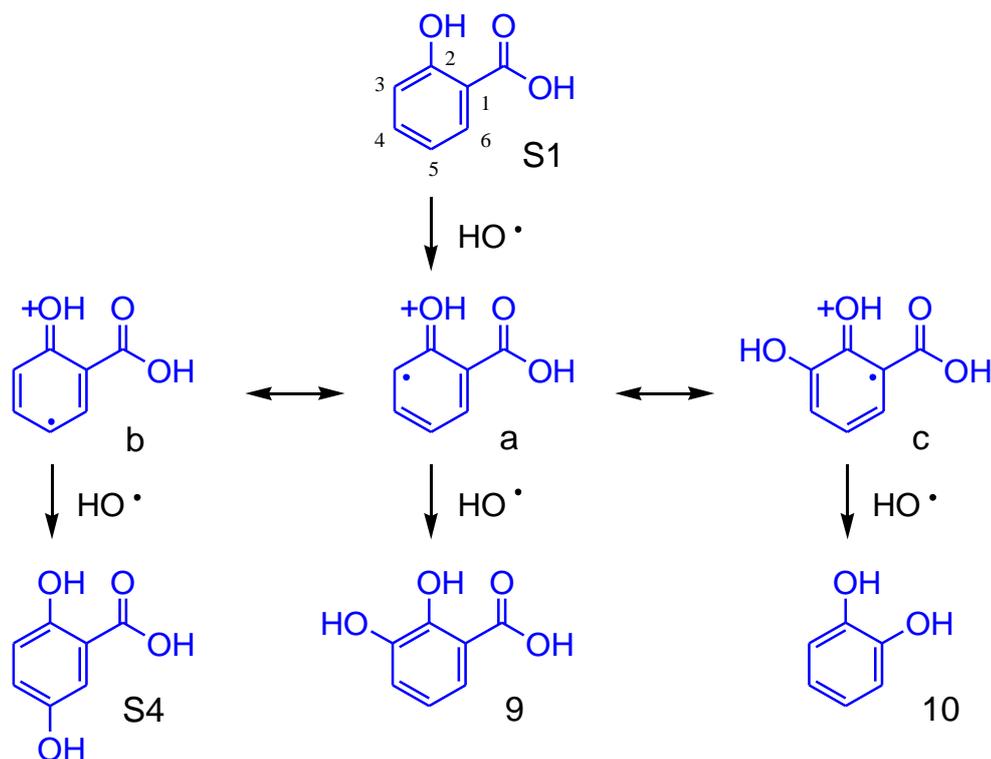


Figura 17. Reações do metabolismo do Ácido salicílico.

Este caminho hipotético foi proposto para a oxidação do ácido salicílico (HALLIWELL *et al.*, 1991) onde uma inicial abstração de elétron pode ocorrer através da reação do radical hidroxil ou citocromo P-450 com o ácido salicílico formando ácido salicílico cátion radical e ânion hidroxila. A carga positiva radicalar é estabilizada por ressonância. A reação do citocromo-hidroxil com o cátion radical na posição 5 produz o ácido 2,5-dihidroxi-benzóico via citocromo P-450. Enquanto que a recombinação durante a peroxidação lipídica nas posições 3 e 1 entre o cátion radical e outro radical hidroxil, geram o ácido 2,3-dihidroxi-benzóico e catecol, respectivamente.

Estas reações de hidroxilação aromática são mediadas pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GROOTVELD & HALLIWELL, 1986; BLACKBURN *et al.*, 1998). Estas reações foram bem caracterizadas por Freire *et al.* (2009) e Borges *et al.* (2011). Assim, nosso objetivo é comparar a hidroxilação regioesletiva do ácido salicílico S1 como o ácido naftosalicílico S7, visando a possível produção *in vivo* dos ácidos gentísico S4 e naftogentísico S10, respectivamente (Figura 18).

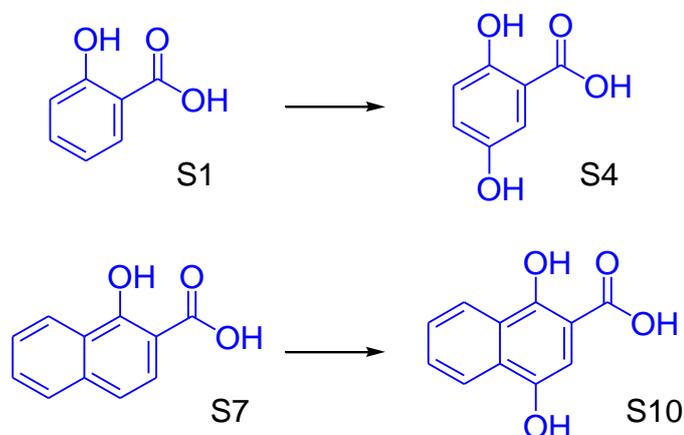


Figura 18. Derivados de partida para síntese (S1, S4, S7 e S10).

Os compostos na forma neutra foram calculados no programa computacional Gaussian 03, usando a metodologia da Teoria do Funcional da Densidade no nível de teoria DFT/B3LYP/6-31G(d,p). Em seguida, a energia para a retirada de um elétron ou um hidrogênio foi calculada usando a função UB3LYP, produzindo o cátion radical livre e a semiquinona, onde as posições mais reativas foram identificadas nestas formas reacionais através da localização dos elétrons desemparelhados, sendo plotados como valores de contribuição das densidades de spin (DINIZ *et al.*, 2004)

Os valores de densidade de spin mostrados na Figura 19, inicialmente para os cátions radicais do ácido salicílico S1 e seu derivado naftosalicílico S7, foram utilizados para comparar as diferenças entre os grupos aromáticos benzeno e nafteno. Os resultados mostraram que as maiores contribuições no ácido salicílico S1 foram para o oxigênio fenólico (0,26), carbono C1 ligado ao grupo carbonila (0,12), carbono C2 ligado ao grupo hidroxila (0,15), carbono C3 (0,22) e carbono C5 (0,40).

Na molécula do ácido naftosalicílico S7 as mesmas contribuições foram observadas tanto para o oxigênio fenólico, quanto para o carbono C1 (0,11). Os demais grupos mostraram uma contribuição de 0,15 para o carbono C2, 0,04 para C3, 0,32 para C4, 0,21 para C5, 0,11 para C7 e 0,13 para C8, indicando um aumento do número de estruturas de ressonância no anel naftalênico.

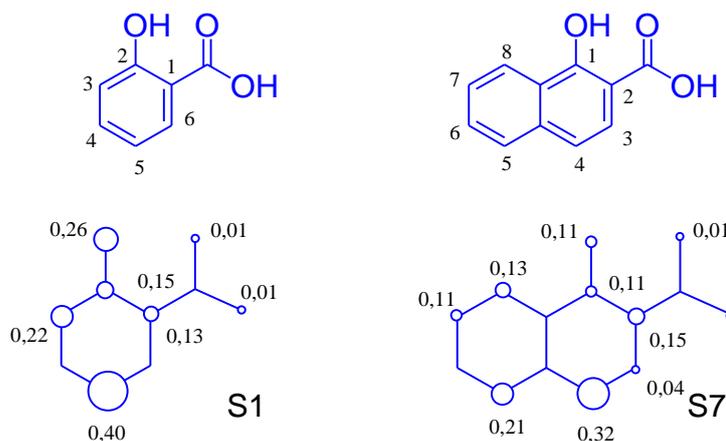


Figura 19. Densidades de spins para os cátions radicais livres dos derivados de salicilatos (S1 e S7).

Ambos os compostos mostraram uma maior reatividade química na posição *para* relativa ao grupo hidroxila, indicando uma regioseletividade. As demais posições não mostraram uma contribuição significativa.

Um resultado similar foi observado para as formas semiquinonas, exceto para a maior contribuição no grupamento fenoxil. Os valores de densidade de spin mostrados na Figura 20 para a forma semiquinona dos ácidos salicílico S1 e naftosalicílico S7, mostraram as maiores contribuições no ácido salicílico S1 foram para o fenoxil (0,68), carbono C1 ligado ao grupo carbonila (0,22), carbono C3 (0,25) e carbono C5 (0,26). Na molécula do ácido naftosalicílico S7 as contribuições na posição do fenoxil (0,52), carbono C2 (0,34), carbono C4 (0,33), carbono C5 (0,09), carbono C7 (0,10) e carbono C8 (0,13).

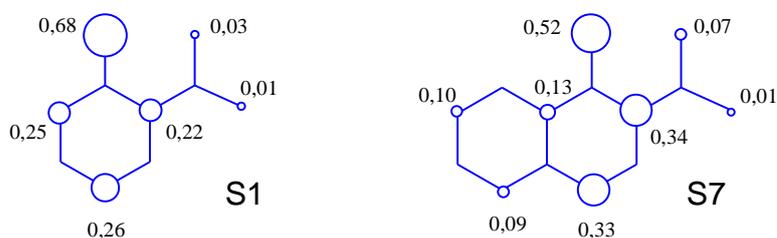


Figura 20. Densidades de spins para as semiquinonas dos derivados de salicilatos (S1 e S7)

O radical hidroxil (HO^\bullet) tem uma meia-vida muito curta e, conseqüentemente, presente em concentrações extremamente baixas nos sistemas biológicos. Devido sua alta reatividade química, tem sido usado nas reações de hidroxilação aromática, como um método analítico de medida de sua produção *in vitro* (LUO & LEHOTAY, 1997; COUDRAY & FAVIER, 2000). Os resultados podem explicar a hidroxilação regioseletiva para a formação dos ácidos gentísico e naftogentísico.

5.3. MECANISMO REDOX

Algumas moléculas são capazes de atuar através de espécies reativas de oxigênio e podem ser usadas na terapia do câncer. Dentre estas moléculas destacamos a classe das quinonas como compostos anticancerígenos. Os principais compostos são mostrados na Figura 21, para ilustrar este conceito, destacamos a mitomicina C **11** e doxorubicina **12**, como exemplo desta classe ((HOYT, 2010).

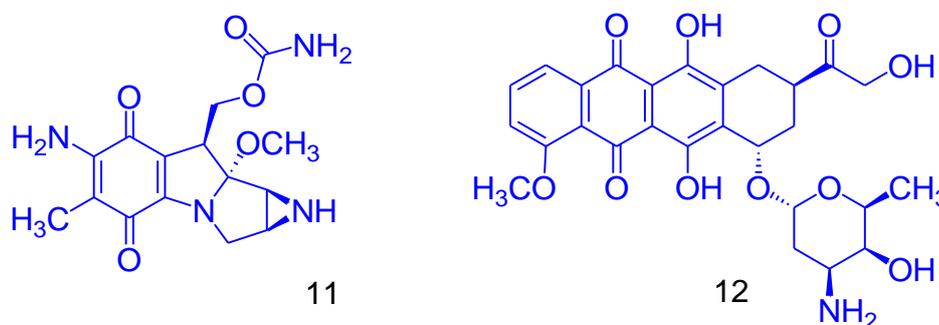


Figura 21. Derivados de quinona como anticancerígenos.

A ativação redutiva de quinonas pode ocorrer por enzimas ou no meio ambiente através de mecanismo de transferência de hidrogênio e elétron (Figura 22). As quinonas podem ser reduzidas por um elétron produzindo uma semiquinona. Ao contrário, a redução de dois elétrons formando a correspondente hidroquinona. Em níveis normais de oxigênio, a semiquinona pode ser oxidada para a forma quinona, em um processo de redução de oxigênio molecular (O_2), produzindo anion superóxido. De igual modo, um equilíbrio pode existir entre as formas hidroquinonas e quinonas (BOYLE & TRAVERS, 2006; DENNY, 2004).

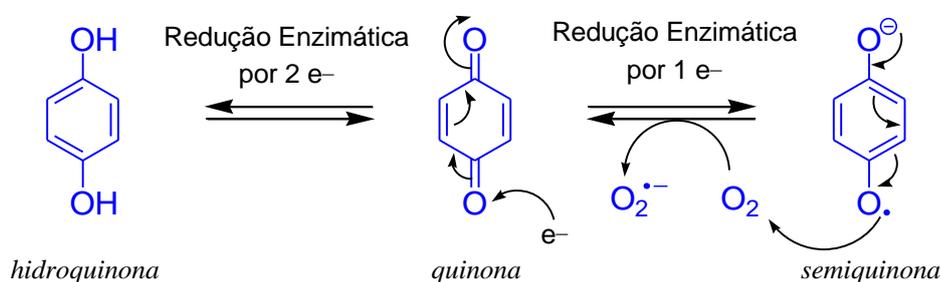


Figura 22. Mecanismo redox geral de derivados quinona.

Recentemente, um estudo de simulação computacional para o mecanismo redox de derivados quinônicos, realizado em nosso grupo, selecionou as propriedades quânticas e descritores estruturais capazes de separar os compostos tóxicos de não tóxicos (BORGES *et al.*, 2014). O mecanismo de oxidação de derivados de quinona pode ocorrer através do citocromo p450 redutase, que reduz os derivados de quinona a uma semiquinona, revertendo o oxigênio molecular para produzir anions superóxido tóxicos (Figura 23) (COHEN, 1996).

Na ausência de ascorbato exógeno, ela exerce sua ação anticancerígena, do contrário teremos efeito protetor (CRIDDLE *et al.*, 2006) Os derivados de quinonas também podem ser modificados pela redução da enzima, produzindo hidroquinona não tóxica, com propriedades antioxidantes e citoprotetora (THOR *et al.*, 1982).

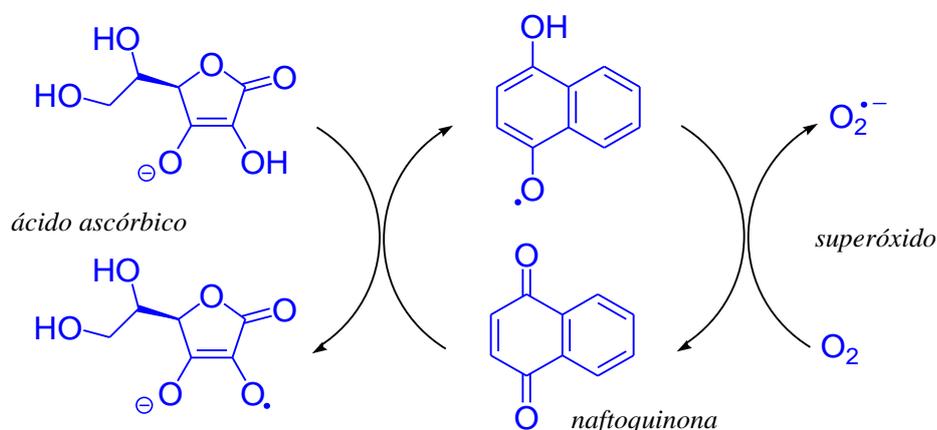


Figure 23. Mecanismo de bioativação de derivados de quinona.

Assim, os mecanismos redox foram propostos para os derivados ácido gentísico S4 em comparação com seu análogo ácido naftogentísico S10. Os valores de energia de dissociação de ligação fenólica (EDL_{OH}) para o ácido gentísico **S4** estão descritos na Figura 24. Os resultados indicam que o caminho reacional **b** apresenta o maior valor para a primeira reação, enquanto que caminho reacional **a** apresenta o menor valor para a segunda reação. O valor global destas reações foi de 164,92 kcal/mol.

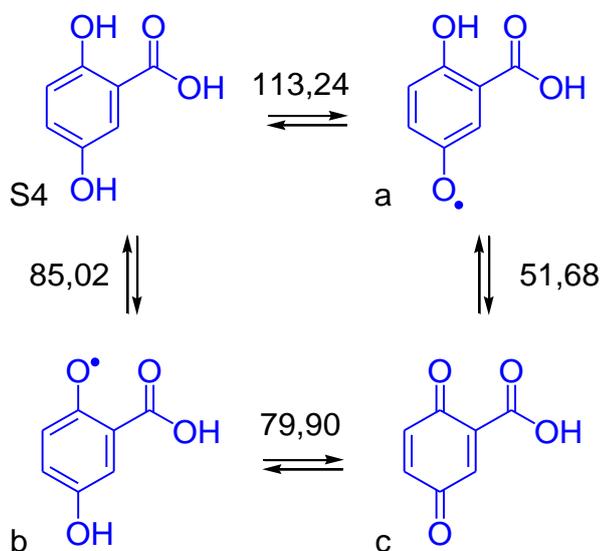


Figura 24. Propriedade redox do ácido gentísico (S4) por doação de hidrogênio.

Essa diferença de energia modifica conforme a localização da hidroxila, onde pode-se observar que no caminho reacional **b** apresenta maior energia devido o impedimento estérico

que ocorre com a hidroxila fenólica e o oxigênio da carbonila. Essa característica não é observada na reação a, uma vez que o hidrogênio é facilmente arrancado, necessitando de menor energia para formação da semiquinona. O mesmo comportamento foi esperado para o derivado ácido naftogentísico **S10** e os valores de EDL_{OH} estão descritos na Figura 25. Os resultados indicaram novamente que o caminho reacional **b** apresentou o maior valor para a primeira reação, enquanto que caminho reacional **a** apresentou o menor valor para a segunda reação. Enquanto que o valor global destas reações foi de 154,94 kcal/mol.

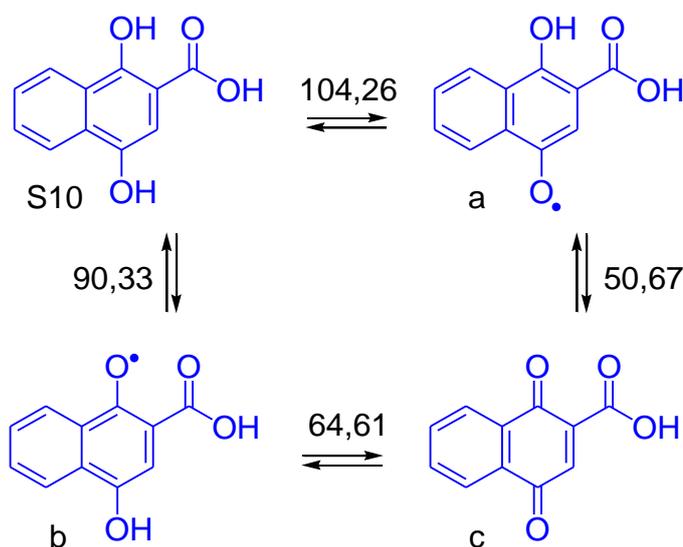


Figura 25. Propriedade redox do ácido naftogentísico (S10) por doação de hidrogênio.

Desse modo, quando comparamos apenas os valores globais das duas energias de dissociação das ligações fenólicas para os dois compostos, percebemos que a alteração no benzeno para naftaleno representa uma redução nos valores destas energias em quase 10 kcal/mol, representando uma maior reatividade química e melhor capacidade de estabilização das cargas radiculares intermediárias.

Os resultados biológicos para a atividade anticâncer do gentisato de metila **S5** mostraram o potencial desta droga na terapêutica anticâncer através de diferentes mecanismos, dentre os quais os efeitos quimioprotetores, o mecanismo redox ou sinalização para outras células, mediadas por estes derivados fenólicos.

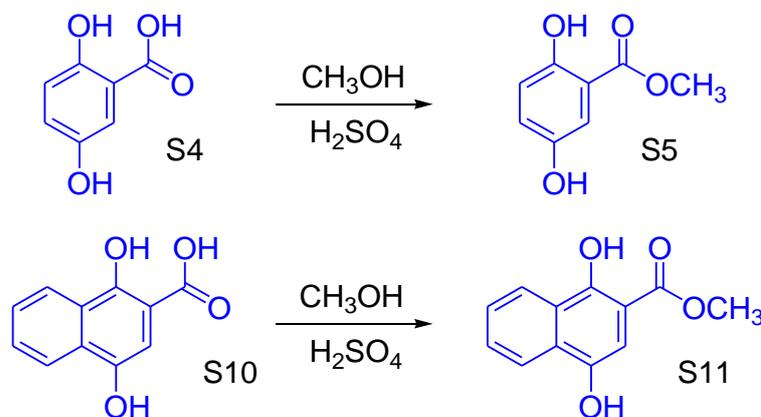
Desse modo, esperamos uma atividade superior dos derivados do ácido naftogentísico devido ao aumento de sua capacidade redox, possibilidade de ser formado in vivo a partir do ácido naftosalicílico e maior reatividade e estabilidade química em reações do tipo redox, quando comparados com o ácido gentísico e seus derivados. Portanto, estes novos compostos podem ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de novos derivados de salicilatos.

5.4. SÍNTESE ORGÂNICA

5.4.1. ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GENTÍSICO E NAFTOGENTÍSICO

O derivado gentisato de metila **S5** foi obtido através da esterificação do ácido gentísico **S4** (Esquema 3), segundo metodologia descrita por Borges e Castle (2015). O éster metílico do ácido gentísico é uma substância com fórmula e peso molecular de $C_8H_8O_4$ e 168,148 g/mol, respectivamente. A reação ocorreu com um rendimento de 82,4%. O composto se apresenta como cristais amarelos pálidos na forma de agulha, quando recristalizado em metanol e água (2:1). Ele apresentou um ponto de fusão de 78-84°C.

Estudos mostram que sua estrutura cristalina (pf 86-88°C) foi encontrada na forma plana (BROWN et al. 2003). Além disso, o gentisato de metila demonstrou potente ação inibitória da enzima tirosinase, redução da citotoxicidade em relação à hidroquinona, não apresentando potencial mutagênico em células de mamíferos. Esses resultados qualificam o gentisato de metila como um forte candidato a fármaco como agente clareador da pele (CURTO *et al.* 1999).

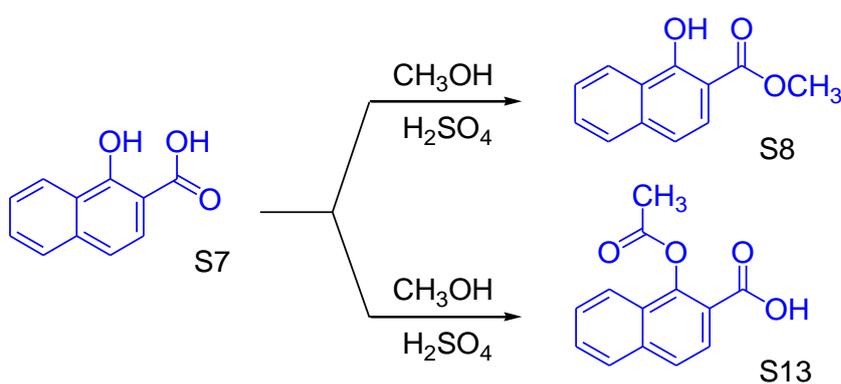


Esquema 3: Reação de obtenção de derivados ésteres.

O segundo derivado éster ou naftogentisato de metila **S11** foi obtido através da esterificação do ácido 1,4-hidroxi-2-carboxi-naftóico **S10**. Ele é uma substância com fórmula e peso molecular de $C_{12}H_{10}O_4$ e 218,21 g/mol respectivamente. O composto apresentou ponto de fusão de 288°C, acima do valor descrito pela literatura (192°C-193°C), indicando a presença de impurezas ou decomposição. Os resultados mostraram uma mudança forte de coloração (castanho) indicativa de reação de oxidação, possivelmente devido a reações de polimerização, ainda no balão de reação (Ayyagari *et al.*, 1995). Os compostos e as reações estão em fase de caracterização usando espectrometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.

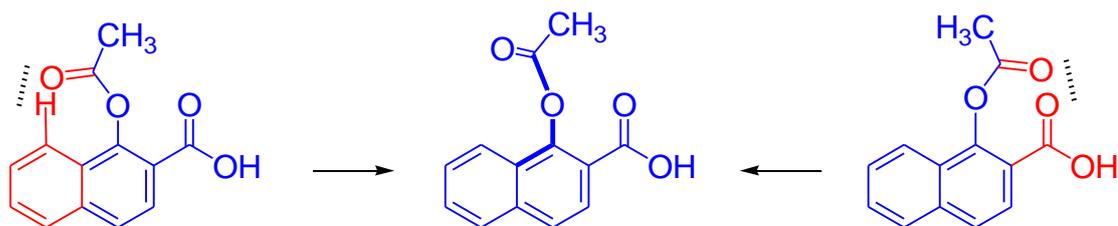
5.4.2. ESTERIFICAÇÕES DO ÁCIDO NAFTOSALICÍLICO

Dois derivados do ácido naftosalicílico **S7** foram propostos através da reação clássica de esterificação das posições ácida e fenólica, naftosalicilato de metila **S8** e ácido acetil-naftosalicílico **S13** (PEDERSEN & MYERS, 2011). O éster carboxílico do ácido naftosalicílico **S7**, denominado naftosalicilato de metila **S8** é uma substância com fórmula e peso molecular de $C_{12}H_{10}O_3$ e 202,21 g/mol, respectivamente. A reação ocorreu com um rendimento inferior a 50%. O composto se apresenta como cristais irregulares amarelos. Ele apresentou um ponto de fusão de (142-151 °C). Estudos mostram que sua estrutura cristalina apresenta (pf 76-80 °C).



Esquema 4: Reação para obtenção do derivado naftosalicílico.

Enquanto o derivado éster fenólico ácido acetil-naftosalicílico **S13** foi obtido através da esterificação do ácido naftosalicílico **S7**. Ele é uma substância com fórmula e peso molecular de $C_{13}H_{10}O_4$ e 230,22 g/mol respectivamente. Infelizmente este composto apresentou uma baixa estabilidade química. Os fatores relacionados com estas propriedades serão considerados posteriormente, mas parece que há uma forte restrição conformacional estéreo-eletrônica entre o grupo acetil com o hidrogênio ou o carboxilato (Esquema 5).



Esquema 5: Estruturas conformacionais do acetil-naftogentisato naftosalicílico.

Os estudos prosseguirão no projeto de doutorado, que serão complementados com os respectivos testes farmacológicos em modelos de inflamação, analgesia e câncer.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, novos derivados de salicilatos foram propostos. A presença de uma hidroxila adicional aumenta a capacidade antioxidante na mesma proporção que o grupo naftaleno, com pequenas variações entre derivados ácidos, ésteres e amidas.

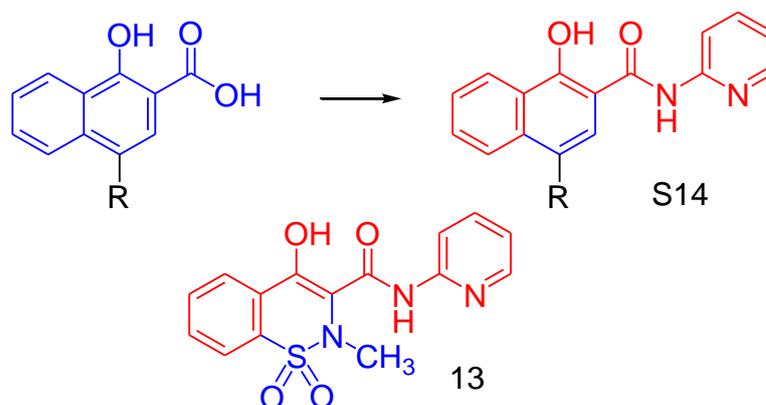
Uma reação regioseletiva pode ser obtida a partir de derivados monohidroxilados, como predita através dos cálculos de densidade de spin, gerando dois derivados dihidroxilados preferencialmente para a posição *para* relativa ao grupo fenólico, os quais poderão ser obtidos *in vivo*, através de reações enzimáticas ou não enzimáticas.

A presença do anel naftaleno em substituição ao anel benzeno aumentou a reatividade química e a estabilidade de intermediários do tipo quinona, as quais podem explicar os mecanismos anticâncer destes compostos.

Os valores obtidos demonstram a possibilidade de que o derivado naftogentísico seja mais potente que os derivados do ácido gentísico. As melhores propriedades teóricas do ácido naftogentísico podem aumentar sua capacidade redox, possibilidade de ser formado *in vivo* a partir do ácido naftosalicílico e maior reatividade e estabilidade química em reações do tipo redox, quando comparados com o ácido gentísico e seus derivados.

Alguns destes compostos estudados neste trabalho foram sintetizados e estão em fase de avaliação anticâncer e anti-inflamatória e elucidação estrutural.

Dentre os derivados que serão propostos em projetos futuros, esperamos desenvolver um derivado da associação molecular entre o piroxican **13** e o ácido naftosalicílico e derivados, através da modificação do anel heterocíclico por um homocíclico (Esquema 6), especialmente devido a baixa estabilidade química do piroxican, tendo em vista sua elevada fotoestabilidade (BARTSCH, *et al.*, 1999), onde R pode ser hidrogênio, hidroxila ou grupo nitro, dentre outros.



Esquema 6: Proposta de desenvolvimento de derivado naftalênico do piroxican.

REFERÊNCIA

ACTIS, G. C.; PAZIENZA. P.; ROSINA. F. Mesalamine for inflammatory bowel disease: recent reappraisals. *Inflamm Allergy Drug Targets*;7:1-5. 2008.

ALDAWSARI, F. S.; AGUAYO-ORTIZ. R.; KAPILASHRAMI. K.; YOO. J.; LUO. M.; MEDINA-FRANCO. J. L.; AND. VELAZQUEZ-MARTINEZ. C.A. Resveratrol-salicylate derivatives as selective DNMT3 inhibitors and anticancer agents. Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. University of Alberta. Edmonton. Alberta. Canada. 2015.

ATKINS, P.; FRIEDMAN, R. MOLECULAR QUANTUM MECHANICS. 4th editio ed. New York: Oxford University Press Inc., 2005.

AYYAGARI, M. S.; MARX, K. A.; TRIPATHY, S. K.; AKKARA, J. A.; KAPLAN, D. L. Controlled free-radical polymerization of phenol derivatives by enzyme-catalyzed reactions in organic solvents. *Macromolecules*, 28 (15): 5192–5197, 1995.

BALBOA, M. A.; BALSINDE. J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761. 385–391. 2006.

BALDWIN, A. Controlofoncogenesis and câncer therapy resistance by the transcription factor NF-kB. *J. Clin. Invest.* 107: 241-246. 2001.

BARTSCH, H.; EIPER, A.; KOPELENT-FRANK, H. Stability indicating assays for the determination of piroxicam--comparison of methods. *J Pharm Biomed Anal.* 20(3):531-41, 1999.

BLACKBURN, A. C.; DOE. W. F.; BUFFINTON. G. D. Salicylate hydroxylation as an indicator of hydroxyl radical generation in dextran sulfate-induced colitis. *Free Rad. Biol. & Med.* 25-3: 305-313. 1998.

BORGES, R. S.; CARNEIRO, A. S.; BARROS, T. G.; BARROS, C. A.; NETO, A. M.; DA SILVA, A. B. Understanding the cytotoxicity or cytoprotective effects of biological and synthetic quinone derivatives by redox mechanism. *J Mol Model.* Dec;20(12):2541. 2014.

BORGES, R. S.; CASTLE. S. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* The antioxidant properties of salicylate derivatives: A possible new mechanism of anti-inflammatory activity. 2015.

BOYLE, R. G.; TRAVERS, S. Hypoxia: targeting the tumour. *Anticancer Agents Med Chem* 2006, 6, 281-6.

BROWN. C. L. *et al.* Methyl 2,5-dihydroxybenzoate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* 59(5). 630-631. 2003.

BURKE, K. Perspective on density functional theory. *The Journal of chemical physics*, v. 136, n. 15, p. 150901,2012.

CAO. H.; CHENG. W-X.; LI. C.; PAN. X-L.; XIE. X-G.; LI. T-H. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. *J. Mol. Struct.. THEOCHEM.* v.719. n.1. p.177-183. 2005.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. Quím. Nova 26 (3) 2003.

CASPER, D.; YAPARPALVI. U.; REMPEL. N.; WERNER. P. Ibuprofen protects dopaminergic neurons against glutamate toxicity in vitro. *Neurosci. Lett.* 11: 201–204. 2000.

CHENG, Z.; REN. J.; YAN. G.; LI. Y.; CHANG. W.; CHEN. Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. *Bioorg. Chem.* v.31. n.2. p.149-162. 2003.

CHOI, B. H.; CHAKRABORTY. G.; BAEK. K.; YOON. H. S. Aspirin-induced Bcl-2 translocation and its phosphorylation in the nucleus trigger apoptosis in breast cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine.* v. 45. 2013.

CHOWDHURY, M. A.; ABDELLATIF. K.R. A.; DONG. M. Y et al. Synthesis and biological evaluation of salicylic acid and N-acetyl-2-carboxybenzenesulfonamide regioisomers possessing a N-difluoromethyl-1,2-dihydropyrid-2-one pharmacophore: dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*;19:6855-61.B. 2009.

CHUNG, Y. M.; BAE. Y.S.; LEE. S. Y. Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med.* v.34. p.434-42. 2003.

COHEN, N. C. *Guidebook on molecular modeling in drug design.* San Diego: Academic Press. 361p, 1996.

COHEN, A. J.; MORI-SÁNCHEZ, P.; YANG, W. Challenges for density functional theory. *Chemical reviews*, v. 112, n. 1, p. 289–320, 2012.

COUDRAY, C.; FAVIER. A. Determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo oxidative stress marker. *Free Rad. Biol. & Med.* 29-11: 1064–1070. 2000.

CRIDDLE, D. N.; GILLIES, S.; BAUMGARTNER-WILSON, H. K.; JAFFAR, M.; CHINJE, E. C.; PASSMORE, S.; CHVANOV, M.; BARROW, S.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. "Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells". *J Biol Chem*, 281, 40485-92, 2006.

CSISZAR, A.; STEF. G.; PACHER. P.; UNGVARI. Z. Oxidative stress-induced isoprostane formation may contribute to aspirin resistance in platelets. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 66: 557-558. 2002.

CURTO, E. V.; KWONG, C.; HERMERSDORFER, H.; GLATT, H.; SANTIS, C.; VIRADOR, V.; HEARING, J. J. R.; DOOLEY, T. P. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 57: 663–672, 1999.

DE WITT, D. L.; EL-HARITH. E. A.; KRAEMER. S. A.; ANDREWS. M. J.; YAO. E. F.; ARMSTRONG. R. L. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Biol. Chem.* 265: 5192-5198. 1990.

DENNY, W. A. "Prospects for hypoxia-activated anticancer drugs". *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 4, 395-9. 2004.

DINIS, T. C. P.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315. 1. 161-169. 1994.

DINIZ, J.E.M.; BORGES, R.S.; NAHUM, C.N. A DFT study for paracetamol and 3,5-disubstituted analogues *J. Mol. Struct. (TheoChem)*, 673, 93-97, 2004.

EKINCI, D. SENTURK M. KUŞFREYİOĞLU Ö. İ. Salicylic acid derivatives: synthesis, features and usage as therapeutic tools. *Expert Opin Ther Pat* 21(12):1831–1841. 2011.

FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H. B. Gaussian 03. Revision C.02. Gaussian, Inc., Wallingford, CT. 2004.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; et al. Gaussian 09. ,2013. Wallingford CT.

FUJIMORI, T.; YAMADA, S.; YASUI, H.; SAKURAI, H.; ISHIDA, Y.I.T. (Orally active antioxidative copper(II) aspirinate: synthesis, structure characterization, superoxide scavenging activity, and in vitro and in vivo antioxidative evaluations. *J Biol Inorg Chem* 10:831–841. 2005.

GARG, R.; KURUP, A.; MEKAPATI, S.B.; HANSCH, C. Cyclooxygenase (COX) inhibitors: a comparative QSAR study. *Chem Rev*; 103:703-31. 2003.

GASCHE, C. Review article: the chemoprevention of colorectal carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 20:31–35. 2004.

GASCO, A.; FRUTTERO, R.; LAZZARATO, R.; DONNOLA, M. Salicylic acid derivatives. US0293781; 2008.

GOLDHAHN, K.; KLOESCH, B.; ALDAWSARI, F.; VELAZQUEZ-MARTINEZ, C.; SCHMETTERER, K.; STEINER, G. Resveratrol and a resveratrol-salicylate hybrid molecule suppress cytokine production and proliferation of human CD4⁺ T-cells. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75: A60. 2016.

GRONICH, N.; RENNERT, G. Beyond aspirin- cancer prevention with statins, metformin and bisphosphonates. *Clinical Oncology*. 2013.

GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl radical formation in vivo. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. *Biochem. J*. 237: 499–504. 1986.

HARRIS, T. B., FERRUCCI, L., TRACY, R. P., CORTI, M. C., WACHOLDER, S., ETTINGER, W. H. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *The American Journal of Medicine*. New York. v. 106. n. 5. p. 506-512. 1999.

HERBERT, P. R.; HENNEKENS. C. H. An overview of the 4 randomized trials of aspirin therapy in the primary prevention of vascular disease. *Arch Intern Med* 160:3123–3127. 2000.

HERMANN, M.; KAPIOTIS. S.; HOFBAUER. R.; EXNER. M.; SEELOS. C.; HELD. I.; GMEINER. B. Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Lett.* 445: 212-214. 1999.

HOYT, M. T. The anticancer mode of action of the quinone natural product cribrostatin 6. Dissertation . University of Illinois at Urbana-Champaign. 2010.

HUANG, Y.-W.; LEE, S.-L. The B3LYP and BMK studies of CO adsorption on Pt(111): An insight through the chemical bonding analysis. *Chemical Physics Letters*, v. 530, p. 64–70, 2012.

INSEL, P. A.; Em Goodman & Gilman's. The pharmacological bases of therapeutics. J. G.Hardman. et al. Eds.; Mc Graw Hill. New York. 1996. 9.ed.; p. 617-57 wiley-VCH Verlag GmbH E Co. KGaA Weinheim. Alemanha. 2006.

KASHANI, J.; SHIH, R. D. Salicylate overdose. *Encyclopedia of Intensive Care Medicine* (2012): 2011-2014.

KLOTZ, U. *et al.*; *N. Engl. J. Med.* 1980. 303. 1499.

KUBINYI, H. Nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character: the bilinear model. *Farmacol.* 34(3): 248-76. 1979.

KULKARNI, S. K.; JAIN. N.K.; SINGH. A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 22:291-298. 2000.

KUMAR, R. M.; BASKAR, P.; BALAMURUGAN, K.; DAS, S.; SUBRAMANIAN, V. On the perturbation of the H-bonding interaction in ethylene glycol clusters upon hydration. *The journal of physical chemistry. A*, v. 116, n.17, p. 4239–47, 2012.

KUNE, G. A.; KUNE, S.; WATSON, L. F. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res.* 48:4399–4404, 1988.

LAI, M. Y.; HUANG. J. A.; LIANG. Z. H.; JIANG. H. X.; TANG. G. D. Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480. *World. J. Gastroenterol.* v. 14. p. 4227-4233. 2008.

LEONARDS, J. R. Presence of acetylsalicylic acid in plasma following oral ingestion of aspirin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110: 304–308. 1962.

LEWARS, E. G. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics.* 2nd ed. ed. New York: Springer, 2011.

LOWE, G. D. O. Who should take aspirin for primary prophylaxis of coronary heart disease? *Heart* 85:245–246. 2001.

LUO, X. P.; LEHOTAY. D. C. Determination of hydroxyl radicals using salicylate as a trapping agent by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 30: 41-46. 1997.

MACLAGAN, T. J. The treatment of rheumatism by salicin and salicylic acid. *Lancet* I. p. 342. 1876.

MAHARAJ, D. S.; SARAVANAN. K. S.; MAHARAJ. H.; MOHANAKUMAR. K. P.; DAYA. S. Acetaminophen and aspirin inhibit superoxide anion generation and lipid peroxidation. and protect against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Neurochemistry International*. 44. 355–360. 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*.;454(7203):428-35. 2008.

MITCHELL, J. A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C *et al.* Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*.90: 11693–11697,1994.

MOHANAKUMAR, K. P.; MURALIKRISHNAN. D.; THOMAS. B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1.2.3.6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res.*. 864. 281–290. 2000.

MUSSO, F.; UGLIENGO, P.; SODUPE, M. Do H-bond features of silica surfaces affect the H₂O and NH₃ adsorption? Insights from periodic B3LYP calculations. *The journal of physical chemistry. A*, v. 115, n. 41, p. 11221–8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21895017>>.

NAZARPARVAR, E.; ZAHEDI, M.; KLEIN, E. Density Functional Theory (B3LYP) Study of Substituent Effects on O–H Bond Dissociation Enthalpies of trans-Resveratrol Derivatives and the Role of Intramolecular. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 77, p. 10093–10104, 2012.

O'BOYLE, N. M.; TENDERHOLT, K. M. L. cclib: A library for package-independent computational chemistry algorithms. *Journal of computational chemistry*, v. 29, n. 5, p. 839–845, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.20823/full>>. Acesso em: 4/9/2017.

OMS. Organização mundial de saúde. Disponível em < <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>>. Acesso em: 30 de junho de 2017.

ORHAN, H.; SAHIN. G. In vitro effects of NSAIDs and paracetamol on oxidative stress-related parameters of human erythrocytes. *Exp. Toxic. Pathol.* 53. 133–140. 2001.

ORTOLAN, A. O. Apostila de Práticas de Química Computacional. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

PANNALA, A. S.; CHAN. S.T.; O'BRIEN. J.P.; RICEEVANS. A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*. v.282. n.5. p.1161-1168. 2001.

PARR, R. G.; YANG. W. Density Functional Theory of Atoms and Molecules; Oxford University Press: New York. 1989.

PEDERSEN, S. F.; MYERS, A. M. Understanding the Principles of Organic Chemistry: A Laboratory Course, Reprint (Available Titles CengageNOW) 1st Edition. 2011.

PEREIRA, A. M. ESTUDO AB-INITIO E DFT DAS NITROSAMINAS, 2008. Universidade Federal da Paraíba.

RIGAS, B.; KASHFI. K. Molecular targets of nitric-oxide-donating aspirin in cancer. *The Molecular Biology of Colorectal Cancer*. v. 314. p.1–8. 2005.

ROCCA, B.; SECCHIERO, P.; CIABATTONI, G *et al.* Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7634–7639, 2002.

ROTH, G. J.; MAJERUS. P. W. The mechanism of the effect of Aspirin on human platelets: 1 Acetylation of a particulate fraction protein. *J. Clin. Invest.* 56: 624– 632. 1975.

SAIRAM, K.; SARAVANAN. K. S.; BANERJEE. R.; MOHANAKUMAR. K. P. Nonsteroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate. but not diclofenac or celecoxib. protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Res.* 966: 245–252. 2003.

SCHAEFER, W. Ger. (East) DD. 255.941 (CIC07C101/74). 20 Apr. 1988. Appl. 298.386.24 Dec. 1986.

SCHWINGENSCHLÖGL, U.; SCHUSTER, C. Doping and defects in YBa₂Cu₃O₇: Results from hybrid density functional theory. *Applied Physics Letters*, v. 100, n. 25, p. 253111, 2012.

SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *RevBrasCancerol.* 52(1):59-77. 2006.

SMITH, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.* 259: 315–324. 1989.

SOMVANSHI, R. K.; KUMAR. A.; KANT. S.; GUPTA. D.; SINGH. S.B.; DAS. U.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P.; DEY, D. Surface plasmon resonance studies and biochemical evaluation of a potent peptide inhibitor against cyclooxygenase-2 as an anti-inflammatory agent. *BiochemicalandBiophysicalResearch Communications*. v. 361. p. 37-42. 2007.

SOUZA, J. B. A. S. P. Atividade biológica de derivados do ácido cafeico: Efeito antioxidante e anti-inflamatório. Mestrado em controle de qualidade. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2008.

SPITZ, G.A.; FURTADO. C. M.; SOLA-PENNA. M.; ZANCAN. P-acetylsalicylic acid. salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochemical Pharmacology*. v.77. p.46-53. 2009.

STRENALYUK, T.; SAMDAL, S.; VOLDEN, H. V. Molecular Structures of Chloro(phthalocyaninato)-aluminum(III) and -gallium(III) as Determined by Gas Electron Diffraction and Quantum Chemical Calculations: Quantum Chemical Calculations on Fluoro(phthalocyaninato)-aluminum(III) and - gallium(III), Chloro. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 112, n. 38, p. 9075–9082, 2008.

SZPOGANICZ, B.; DEBACHER, N. A.; STADLER, E. *Experiências de Química Geral*. Fundação do Ensino da Engenharia em Santa Catarina: p.151, 2001.

TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C.; LYONS, K. S.; STANSON, J.; WHITESIDE, T. L. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3- by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *ClinCancer Res.*9:5113-5119, 2003.

TEISMANN, P.; FERGER, B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39:167-174, 2001.

THIEL, W. Semiempirical quantum-chemical methods in computational chemistry. In: C. D. et Al. (Ed.); *Theory and Applications of Computational Chemistry: The First Forty Years*. Elsevier B ed., p.559-580, 2005.

THE MERCK INDEX. 12th edition. 1996.

THOMAS, G. *Medicinal chemistry: an introduction*. Chichester. New York: Wiley and Sons. 2000. p.23-48.

THOR, H.; SMITH, M. T.; HARTZELL, P.; BELLOMO, G.; JEWELL, S. A.; ORRENIUS, S. "The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells". *J Biol Chem* 1982, 257, 12419-25, 1982.

THUN, M. J.; JACOBS. E.J.; PATRONO. C. The role of aspirin in cancer prevention. *Nature Reviews*. v. 9. p. 259-266. 2012.

VAGÁNEK, A.; RIMARČÍK, J.; DROPKOVÁ, K.; LENGYEL, J.; KLEIN, E. Reaction enthalpies of O-H bonds splitting-off in flavonoids: The role of non-polar and polar solvent. *Comput. Theor. Chem.* **1050**, 31-38, 2014.

VANE, J. R.; BOTTING. R. M. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Res.* 110: 255-258. 1998.

VILASECA, J. *et al.*; *Gastroenterology*. 98. 269. 1990.

WEBER, A-A.; PRZYTULSKI, B.; SCHUMACHER, M *et al.* Flow cytometry analysis of platelet cyclooxygenase-2 expression: induction of platelet cyclooxygenase-2 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Br J Haematol.*117:424-426, 2002.

WEBER, A-A.; ZIMMERMANN, K.; MEYER-KIRCHRATH, J *et al.* Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet.*;353:900, 1999.

WHITE, J.D *et al.* Total Synthesis of (+-)-Euonyminol. the Sesquiterpenoid Nucleus of Cathedulin K-19. via an Epoxide Cascade Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* 117(38). 9780-9781.1995.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON. E. R.; DiLABIO. G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method. analysis of substituent effects. and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, v.123. n.6. p.1173-1183. 2001.

XUE, Y.; ZHENG, Y.; AN, L.; DOU, Y.; LIU, Y. Density functional theory study of the structure–antioxidant activity of polyphenolic deoxybenzoins. *Food Chem.* 151, 198–206, 2014.

ZHANG, G.; CANNING, A.; GRØNBECH-JENSEN, N.; DERENZO, S.; WANG, L.-W. Shallow Impurity Level Calculations in Semiconductors Using Ab Initio Methods. *Physical Review Letters*, v. 110, n. 16, p. 166404, 2013.