

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E QUÍMICA

CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

ÉRIKA CASSIA DE ALMEIDA SOARES KURPEL DARON

DESIGN, SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA *IN VITRO* DA TAIWANINA C.

Ilha Solteira

2021

ÉRIKA CASSIA DE ALMEIDA SOARES KURPEL DARON

DESIGN, SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA *IN VITRO* DA TAIWANINA C.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia do Câmpus de Ilha Solteira – UNESP como parte do requisito para obtenção do título de doutora em Ciência dos Materiais. Área de concentração: Química dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela da Silva de Laurentiz.

Ilha Solteira

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

D224D Daron, Érika Cassia de Almeida Soares Kurpel.
Design, síntese e atividade antiplaquetária in vitro da taiwanina C / Érika
Cassia de Almeida Soares Kurpel. Daron. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2021
116 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia
de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais, 2021

Orientador: Rosângela da Silva de Laurentiz
Inclui bibliografia

1. Atividade antiplaquetária . 2. COX-1. 3. Lignana arilnaftalênica. 4. PAR-1.

Raiane da Silva Santos

Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Design, síntese e atividade antiplaquetária in vitro da taiwanina C

AUTORA: ÉRIKA CÁSSIA DE ALMEIDA SOARES KURPEL DARON

ORIENTADORA: ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA DOS MATERIAIS, área: Química dos Materiais pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ (Participação Virtual)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP

Profa. Dra. FLAVIA CRISTINA RODRIGUES LISONI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. WILSON ROBERTO CUNHA (Participação Virtual)
Núcleo de Pesquisas Em Ciências Exatas e Tecnológicas / Universidade de Franca - UNIFRAN

Profa. Dra. MIRELA INÊS DE SAIRRE (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC

Profa. Dra. VANESSA DE ANDRADE ROYO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral / Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes

Ilha Solteira, 08 de outubro de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos Matheus Yan, Daniel Caynã e Livia Yuka, tesouros da minha vida, por todo apoio, incentivo e paciência recebidos para a realização deste.

Aos meus pais Vera e Edy (*in memoriam*), à minha irmã Elydyeny, ao meu cunhado Alan, e aos meus “sobrinhos-afilhados” Laís e Samuel, por todo o apoio, palavras de incentivo, diversão e por acreditarem na luta e realização de mais um sonho.

Agradecimentos

A Deus,

Pela vida e por sua misericórdia em me capacitar para mais esta etapa da vida.

A todos os meus familiares que sempre estão presentes em todos os momentos, incentivando as batalhas que surgem.

Agradecimento mais que especial à Profa Dra. Rosangela da Silva de Laurentiz por sua dedicação, paciência, ensinamentos, carinho, disposição e boa vontade além dos limites e da confiança.

Ao Prof. Dr. Alexandre Borges por toda ajuda e tempo dispensados ao meu aprendizado com os programas Studio Discovery, Maestro e Gold, necessários para este trabalho.

Aos professores do Departamento de Física e Química da FEIS, pela acolhida e ensinamentos recebidos.

Em especial à Lucas e Douglas por me receberem em Ilha, dispensar cuidados e amizade eterna.

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa em Sínteses Orgânicas E Produtos Naturais - GPSOPN, em especial à Fernanda, Wellington e Beatriz, pela paciência, carinho, disposição para me auxiliarem, e principalmente por mostrarem o lado divertido em todos estes anos e os ensinamentos que levarei para vida toda.

Aos amigos do Coral UNESP-FEIS, em especial Erci, Mateus, Fernandinha, pela amizade e toda ajuda quando precisei.

Aos Profs. Márcio Zuanazzi, Sílvia Kagesawa, Emanuel Piatto e Fábio Willian, por acolherem e ensinarem a dividir o peso das emoções através da música, sessões de yoga e danças, permitindo-me alcançar a leveza na alma.

À Elizabete Regina Rossetto, amiga e incansável apoiadora presente nesta realização.

À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso – SEDUC/MT, por conceder a Licença para Qualificação (IN Nº 005/2018/GS/SEDUC/MT) e possibilitar o desenvolvimento desta pesquisa.

“Algumas vidas têm a sua razão de existir; outras são como são. Umam criam a sua razão de existir. Os que já nascem com desígnio definido são raros. Sabe-se lá por que; talvez o meio ambiente influa. Esses, raros, geralmente se dedicam a esse desígnio como missão a cumprir por toda a vida e se sentem felizes e completos realizando tal tarefa”.

Danilo Zanirato

Resumo

As plaquetas são ativadas quando há rompimento do epitélio vascular pela exposição a uma série de fatores que mudam sua forma e levam ao processo de agregação. A ativação e agregação das plaquetas forma o trombo (coágulo) que impede o extravasamento do sangue. Após o estancamento do sangue a desativação das plaquetas é feita pela ação de prostaciclina, mas quando o processo de ativação e desativação é descontrolado ocorre a formação de trombos que afetam o fluxo sanguíneo nas artérias e veias que podem levar a inúmeras patologias. A fim de controlar esse processo inúmeros fármacos têm sido desenvolvidos, porém muitos apresentam limitações quanto a efeitos colaterais, idade do paciente e alto custo. Portanto, o desafio de muitos pesquisadores é obter moléculas que possam ser eficientes, seguras e mais acessíveis. Dentro deste contexto os produtos naturais têm sido uma fonte inesgotável de moléculas com potencial biológico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi sintetizar a taiwanina C, uma lignana arilnaftalênica extraída da *Taiwania cryptomerioides*, de forma mais eficiente do que relatado por outros autores, avaliar sua atividade antiplaquetária usando como agonistas o ácido araquidônico e o TRAP-6, além de estudar o mecanismo de ação sobre as COXs e PAR-1 que são, respectivamente, as proteínas envolvidas nas vias de ativação plaquetária mediadas por esses agonistas. Foram avaliadas duas rotas sintéticas nas quais a taiwanina C foi obtida em rendimento total de 40,4% e 52%, portanto maiores do que aqueles descritos na literatura. Nos ensaios usando plaquetas humanas a taiwanina C inibiu significativamente a agregação plaquetária na presença de ácido araquidônico com $CI_{50} = 0,46 \mu M$ e na presença de TRAP-6 com $CI_{50} = 0,56 \mu M$. Esses estudos indicaram maior atividade da taiwanina C do que a indometacina usada como controle positivo. Estudos de docking molecular usando as COX-1 e COX-2 sugerem que a taiwanina C interage em ambas as COX, porém com maior afinidade com a COX-1. Em relação a PAR-1 os estudos sugerem que a taiwanina C apresenta mecanismo de interação diferente da indometacina e do vorapaxar (medicamento referência). Esses resultados demonstram que a taiwanina C atua em duas vias de sinalização da agregação plaquetária o que não é comum para a maioria dos fármacos utilizados. Embora preliminares, esses resultados indicam que a taiwanina C pode ser uma molécula alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antiplaquetários.

Palavras-chave: Atividade antiplaquetária, COX-1, Lignana arilnaftalênica, PAR-1.

Abstract

Platelets are activated when there is disruption of the vascular epithelium due to exposure to a series of factors, changing their shape and initiating a process of aggregation. Platelet activation and aggregation form the thrombus (clot) that prevents blood leakage. After the blood is stopped, platelets are deactivated by the action of prostacyclins, but when the activation and deactivation process is uncontrolled, thrombi can form, which affect the blood flow in the arteries and veins, which can lead to numerous pathologies. In order to control this process, many drugs have been developed, but many have limitations in terms of side effects, patient age and high cost. Therefore, the challenge for many researchers is to obtain molecules that can be efficient, safe and more accessible. Within this context, natural products have been an inexhaustible source of molecules with biological potential. Thus, the objective of this work was to synthesize taiwanin C, an aryl-naphthalene lignan extracted from *Taiwania cryptomerioides*, more efficiently than reported by other authors, to evaluate its antiplatelet activity using arachidonic acid and TRAP-6 as agonists, in addition to study the mechanism of action on COXs and PAR-1, which are, respectively, the proteins involved in platelet activation pathways mediated by these agonists. Two synthetic routes were evaluated in which taiwanin C was obtained in total yields of 40.4% and 52%, therefore in higher than those described in the literature. In assays using human platelets, taiwanin C significantly inhibited platelet aggregation in the presence of arachidonic acid with $IC_{50} = 0.46 \mu M$ and in the presence of TRAP-6 with $IC_{50} = 0.56 \mu M$. These studies indicated greater activity of taiwanin C than indomethacin used as a positive control. Molecular docking studies using COX-1 and COX-2 suggest that taiwanin C interacts with both COX, but with greater affinity with COX-1. Regarding PAR-1, studies suggest that taiwanin C has an interaction mechanism different from that of indomethacin and vorapaxar (reference drug). These results demonstrate that taiwanin C acts on two signaling pathways for platelet aggregation, which is not common for most drugs used. Although preliminary, these results indicate that taiwanin C may be a target molecule for the development of new antiplatelet drugs.

Keywords: Antiplatelet Activity, COX-1, Arylnaphthalene Lignan, PAR-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese do TXA ₂	20
Figura 2. Espectro de RMN de ¹ H da taiwnina C em DMSO-d ₆	60
Figura 3. Ampliação do espectro RMN de ¹ H da taiwanina C no intervalo de 8 a 6 ppm dos sinais referentes aos H dos grupos metilenodioxí	61
Figura 4. Ampliação do espectro RMN de ¹ H da taiwanina C no intervalo de 8 a 6 ppm dos sinais referentes aos H aromáticos	61
Figura 5. Espectro de RMN de ¹³ C da taiwanina C em DMSO-d ₆	62
Figura 6. DEPT-135 da taiwanina C em DMSO-d ₆	63
Figura 7. Espectro de RMN de ¹ H da lactona 8 em mistura com o isômero 8a após purificação	67
Figura 8. Efeito inibidor da taiwanina C na agregação plaquetária humana <i>in vitro</i> . As plaquetas foram incubadas com taiwanina C (0,003 - 100 µM) por 10 min, seguida de ativação com AA 500 µM. Os dados representam os valores médios ± SEM; N = 5–7 indivíduos. #p < <0,05 em comparação ao grupo AA; * p <0,05 em comparação com o grupo veículo. AA: ácido araquidônico, VE: veículo (DMSO 1%), CTL: indometacina na concentração de 10 µM.....	70
Figura 9. Efeito inibidor da taiwanina C na agregação plaquetária humana <i>in vitro</i> . As plaquetas foram incubadas com taiwanina C (0,003 - 100 µM) por 10 min, seguido pela ativação com TRAP-6 (25 µM). Os dados representam os valores médios ± SEM; N = 5–7 indivíduos. #p <0,05 em comparação com o grupo TRAP-6; * p <0,05 em comparação com o grupo veículo. VE: Veículo (DMSO 1%), CTL: indometacina na concentração de 10 µM.....	71
Figura 10. Modos de ligação de taiwanina C com COX-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura.	73
Figura 11. Modos de ligação da indometacina com COX-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura.	74
Figura 12. Modos de ligação de taiwanina C com COX-2. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura.	76

- Figura 13. Modos de ligação da indometacina com COX-2. Linhas tracejadas pretas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas tracejadas azuis mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura. 77
- Figura 14. Modos de ligação do vorapaxar com a PAR-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura. 78
- Figura 15. Modos de ligação da taiwanina C com a PAR-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura. 79
- Figura 16. Modos de ligação da indometacina com PAR-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura. 79

LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

Esquema 1. Síntese de taiwanina C por Park et al. (2014). Reagentes e condições: (a) PPh ₃ , CBr ₄ , CH ₂ Cl ₂ , rt (b) n-BuLi, THF, -78 °C, então ClCO ₂ Me, -78 °C a rt (c) K ₂ CO ₃ , EtOH, rt (d) Trietil fosfonoacetato, NaH, THF, 0 °C (e) DIBAL-H, CH ₂ Cl ₂ , -78 °C; (f) DCC, CH ₂ Cl ₂ ; (g) Ac ₂ O, MW, 140 C; (h) DDQ.	42
Esquema 2. Síntese da taiwanina C por He et al. (2014). (a) THF (b) NaNO ₂ , HCl 0 °C (c) KI (d) Pd (OAc) ₂ , PPh ₃ , Cs ₂ CO ₃ , 1,4-dioxano.	43
Esquema 3. Síntese de lignanas arilnaftalênicas por Park et al. (2020).	44
Esquema 4. Rotas sintéticas para obtenção da taiwanina C (2020).	45
Esquema 5. Obtenção da taiwanina C pela rota sintética 1.	56
Esquema 6. Mecanismo de formação do ácido insaturado 3.	57
Esquema 7. Obtenção do taiwanina C pela rota sintética 2.	66
Tabela 1. Medicamentos antiplaquetários e alvos biológicos.	28
Tabela 2. Dados de caracterização por RMN e rendimento (%) dos compostos obtidos pela rota sintética 1.	63
Tabela 3. Dados de caracterização por RMN e rendimento (%) dos compostos obtidos pela rota sintética 2.	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µm	Micrometro
µM	Micromolar
AA	Ácido aracdônico
AC	Adenilil ciclase
ADP	Adenosina difosfato
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
ANO ₆	Canal iônico anoctamina 6
ATP	Adenosina trifosfato
AUTODOCK	Suite of automated docking tools
CalDAG – GEFI	Fator de troca de nucleotídeo guanina
CD63 e LAMP1	Glicoproteínas
CHEMPLP	Potencial linear por partes
CI ₅₀	Concentração inibitória a 50% - Concentração necessária para promover 50% de inibição da agregação plaquetária
CLEC2	Receptor 2 de lectina tipo C
COX-1	Ciclooxygenase-1
COX-2	Ciclooxygenase-2
cPLA2	Proteína quinase da fosfolipase A ₂ citosólica
CPLCβ	Proteína quinase C
DDQ	Diclorodicianoquinona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOCK	Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule
ECL	Extracellular loop
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
FLAP, ALOX5-AP	Proteína ativadora da 5 - lipoxigenase
FLEX	Flexible docking
GC	Guanilato ciclase
GOLD	Genetic Optimisation for Ligand Docking
GPIb-V-X	Glicoproteína

GPVI	Glicoproteína VI
G α 12 / 13	Proteínas
G α i	Proteína G
G α q	Proteína G α
HCl	Ácido clorídrico
IP	Receptor
KDa	Kilodalton
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
P2Y12; P2Y1	Purinoceptores
PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar
PARs	Receptores ativados por Proteases
PBS	Tampão fosfato salino
PDB	Protein Data Bank
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PI3KS	Fosfoinosítideo 3-quinases
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PLC γ	Fosfolipase C γ
PtdSer	Fosfatidilserina
RAS3A e RAP1B	Proteínas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz do quadrado médio do erro (Root-mean-square deviation)
RNA	Ácido ribonucleico
ROCK	Proteína quinase associada a Rho (associated coiled-coil kinase)
SFK e SYK	Proteínas
SFKs	Quinases da família SRC
SGRs	Reguladores de proteína G
SNARE	Soluble NSF attachment receptor ANO6

STKs	Quinases de proteína serina / treonina
SWISS-MODEL	Structure homology-modelling server
THF	Tetrahidrofurano
TM	Transmembrane segment
TP	Receptores
TPA	Potential therapeutic agents
TRAP6	Receptor mimético da trombina
TXA ₂	Tromboxano A ₂
$\alpha 6\beta 1$; $\alpha 2\beta 1$; $\alpha II\beta 3$	Receptores de adesão
AIIb $\beta 3$	Integrina

Aminoácidos

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato (Ácido aspártico)
Gln	Glutamina (Glutamida)
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina
Tyr	Tirosina
Val	Valina

Sumário

APRESENTAÇÃO	19
1 REVISÃO DA LITERATURA	23
1.1. <i>Sangue</i>	23
1.2. <i>Plaquetas</i>	23
1.3. <i>Papel das plaquetas na homeostase e trombose</i>	25
1.4. <i>Agentes antiplaquetários</i>	28
1.5. <i>Docking molecular</i>	29
1.6. <i>Proteína alvo</i>	32
1.7. <i>Ciclooxigenases como via de ativação plaquetária</i>	32
1.8. <i>PAR-1 como via de ativação plaquetária</i>	36
1.9. <i>Produtos naturais</i>	38
1.10. <i>Síntese da taiwanina C</i>	41
2 OBJETIVOS	45
2.1. <i>Objetivo geral</i>	45
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. <i>Materiais</i>	46
3.2. <i>Sínteses</i>	46
3.2.1. <i>Rota sintética 1</i>	46
3.2.1.1. <i>Metodologia de sínteses para obtenção do ácido (E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(metoxicarbonil)but-3-enoico (3)</i>	46
3.2.1.2. <i>Metodologia de síntese para obtenção do ácido 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metoxi-4-oxobutanóico (4)</i>	47

3.2.1.3. Metodologia de síntese para a obtenção da 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)diidrofuran-2(3H)-ona (5).....	48
3.2.1.4. Metodologia de síntese para a obtenção da 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il(hidroxi)metil)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)diidrofuran-2(3H)-ona (6).....	49
3.2.1.5. Metodologia de síntese para a obtenção da 5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5,5a,8,8a,9,9a-hexahidrofuro[3',4':6,7]nafto [2,3-d][1,3]dioxol-6(4aH)-ona (7).....	49
3.2.2.6. Metodologia de síntese para a obtenção da taiwanina C.....	50
3.2.2. Rota sintética 2.....	51
3.2.2.1. Metodologia de sínteses para obtenção da (E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)diidrofuran-2(3H)-ona (8).....	51
3.2.1.3. Metodologia de sínteses para obtenção da (Z)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il(hidroxi)metil)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)diidrofuran-2(3H)-ona (9).....	51
3.2.1.4. Metodologia de síntese para obtenção da taiwanina C.....	52
3.3. Ensaio biológico.....	53
3.3.1. Participantes.....	53
3.3.2. Preparação de plasma rico em plaquetas.....	53
3.3.3. Design experimental.....	54
3.4. Análise Estatística.....	54
3.5. Docking molecular.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1. Sínteses.....	56
4.1.1. Rota sintética 1.....	56
4.1.2. Rota sintética 2.....	66
4.2. Ensaio biológico.....	70
4.3. Docking molecular.....	72
4.3.1. Interações de ligação da taiwanina C e indometacina com a COX-1.....	73
4.3.2. Interações de ligação da taiwanina C e da indometacina com a COX-2.....	75

4.3.4. Interações de ligação da taiwanina C e da indometacina com a PAR-1	77
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO A	92
ANEXO B	93
ANEXO C	109

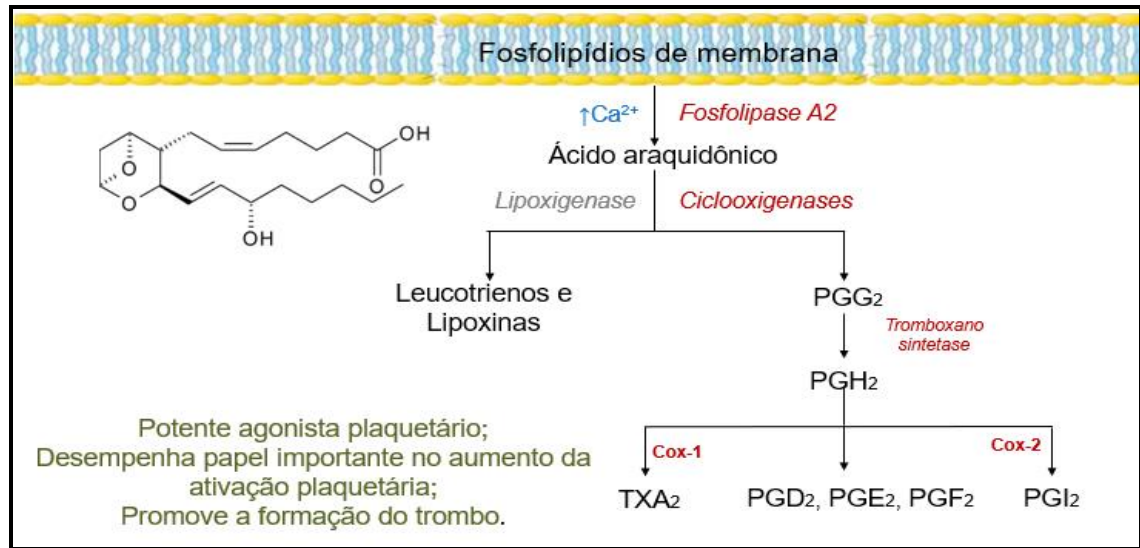
APRESENTAÇÃO

A trombose é uma condição que afeta o corpo humano por meio da formação descontrolada de coágulos que podem impedir o fluxo sanguíneo de fluir normalmente pelas veias e artérias que integram o sistema circulatório. A diminuição do fluxo sanguíneo pode desencadear um grande número de doenças e até mesmo o óbito. Esses coágulos são formados pela agregação plaquetária que acontece após sua ativação a partir de estímulos específicos (Koupenova et al., 2017).

As plaquetas em condições normais circulam através dos vasos com endotélio intacto e permanecem no estado inativado (separadas). Este estado inativado é sustentado pela liberação de prostaciclina (PGI_2) do endotélio intacto, bem como pela ausência de vários fatores de ativação. Quando as plaquetas encontram uma ruptura no endotélio, entretanto, elas são expostas a moléculas como colágeno, ADP, trombina e TXA_2 que desencadeiam a ativação e posterior agregação formando o coágulo (trombo) (Rucker & Dahmoon, 2020).

A síntese do TXA_2 (um dos mais potentes ativadores plaquetários) ocorre a partir de uma série de reações como o aumento de Ca^{2+} intraplaquetário que estimula a fosfolipase A_2 (PLA_2) que hidrolisa e libera o ácido araquidônico presente nos lipídeos da membrana das plaquetas (Figura 1). A COX-1 presente nas plaquetas converte o ácido araquidônico em prostaglandinas. A enzima tromboxano sintetase age sobre a prostaglandina produzindo o TXA_2 que ativa as plaquetas e quando essa ativação não é controlada pode haver sérias consequências ao indivíduo. Também a partir do ácido araquidônico é sintetizada a PGI_2 (prostaciclina A_2 , via principal de síntese envolve a COX-2) que controla o processo de formação do trombo sendo um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária (Kroll et al., 1991; Rucker & Dahmoon, 2020).

Tanto a síntese do TXA_2 quanto a da PGI_2 dependem da ação das COXs trabalhando em sintonia para que a manutenção dos processos de ativação e a desativação plaquetária ocorram de forma controlada. Porém, quando esses processos não estão controlados existe a necessidade de se administrar substâncias antiplaquetárias que atuam em vários alvos moleculares inclusive as COX. Entretanto, compostos seletivos tanto para COX-1 quanto para a COX-2 podem causar sérios efeitos colaterais, pois essas proteínas são responsáveis por muitos processos fisiológicos e a inibição seletiva de uma delas pode afetar esses processos (Yusuf et al., 2017; Rucker & Dhamoon, 2020).

Figura 1. Síntese do TXA₂

Fonte: Próprio autor.

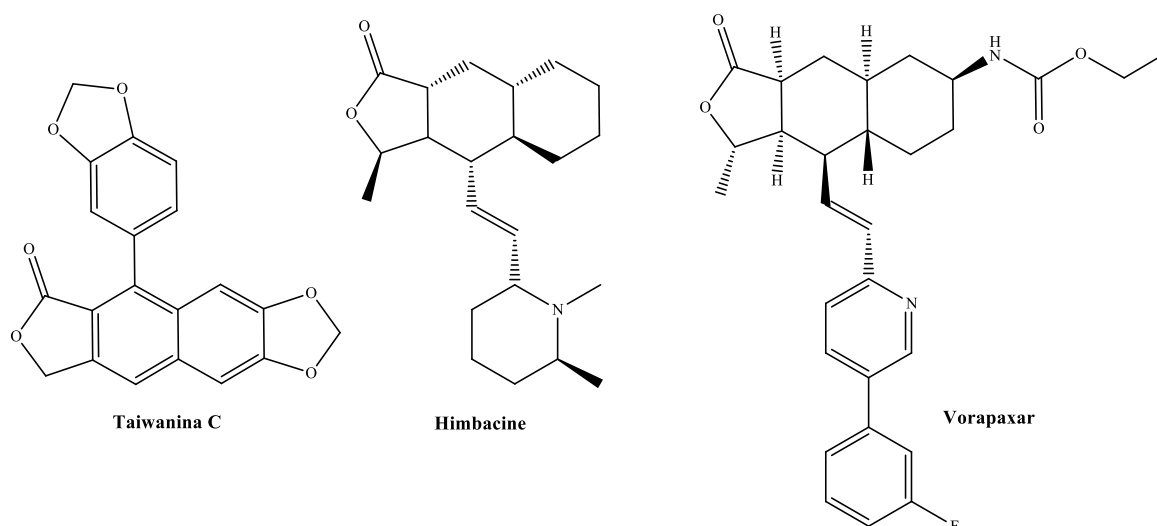
Além da via de ativação plaquetária que envolve as COXs, a via da proteína PAR-1 (receptor ativado por protease ligado a proteína G) tem sido avaliada também como um novo alvo no desenvolvimento de fármacos antiplaquetários. A PAR-1, assim como outros três membros dessa classe, são receptores acoplados à proteína G que são ativados pela clivagem de parte do domínio extracelular. Eles são altamente expressos em plaquetas e também em células endoteliais, miócitos e neurônios. Durante a ruptura do endotélio ocorre liberação de trombina que é agonista da PAR-1 e quando a trombina se liga à PAR-1 ocorre a ativação plaquetária. O antagonista da PAR-1, representado pelo vorapaxar - alcalóide com anel lactônico - (Figura 2), inibe a agregação plaquetária dependente de trombina, pois se liga ao mesmo sítio ativo da PAR-1 impedindo a ligação da trombina à proteína. Ainda que eficaz o vorapaxar tem efeitos colaterais sendo que os principais são aqueles relacionados a hemorragias (Frampton, 2015). Apesar de sua ação sobre a PAR-1 o tratamento com vorapaxar deve ser associado ao uso de medicamentos que inibem a COX-1 como forma de tratamento para pessoas que já tiveram problemas cardiovasculares. Outros medicamentos que atuam sobre outras vias de ativação plaquetária tem algumas restrições de uso como idade, doenças pré-existentes e alto custo (Abdulsattar et al., 201; Van der Meijden & Heemskerk, 2019).

Desta forma existe a necessidade de se buscar novas moléculas para avaliação antiplaquetária para o desenvolvimento de fármacos que possam agir sob vários alvos moleculares envolvidos nos processos de ativação plaquetária. Dentro deste contexto, a

natureza é uma fonte promissora de moléculas que podem ser avaliadas. A literatura traz várias classes de metabólitos secundários (Lee et al., 2005; Kim et al., 2010; Zhao et al., 2018; Kim et al., 2019; Zaragoza et al., 2021) que já foram avaliados e alguns deles foram alvo para o desenvolvimento de fármacos como o vorapaxar que teve parte da estrutura baseada na estrutura do produto natural himbacine, extraído da *Australian magnólia*, que apresenta atividade antiplaquetária (Frampton, 2015).

Um produto natural também com similaridade estrutural ao himbacine é a taiwanina C que, segundo alguns trabalhos publicados (Ban et al., 2012; Lin et al., 2017), também apresenta ação sobre as COXs (Figura 2). A taiwanina C é uma lignana arilnaftalênica extraída da *Taiwania cryptomerioides* Hayata, planta asiática e endêmica em Taiwan (Tsao et al., 2021). A extração da taiwanina C a partir desta planta tornou-se muito difícil depois da proibição pela China e Taiwan, de qualquer tipo de uso. Assim, existem várias rotas sintéticas para a síntese total da taiwanina C, mas as etapas reacionais envolvidas nessas rotas têm baixos rendimentos, utilização de reagentes de difícil obtenção e formação de subprodutos. Todos esses fatores tornam essas sínteses pouco eficientes na obtenção dessa lignana (He et al., 2014; Park et al., 2014; Cow et al., 2020; Park et al., 2020; Park et al., 2021).

Figura 2. Estrutura da taiwanina C, himbacine e vorapaxar



Fonte: Próprio autor.

Portanto, para contribuir com o estudo sobre o potencial antiplaquetário da taiwanina C, este trabalho teve por objetivo sintetizar a taiwanina C de forma mais eficiente do que as rotas sintéticas descritas na literatura através da proposta de duas rotas sintéticas, avaliar sua

atividade antiplaquetária *in vitro* usando como agonista o ácido araquidônico, que atua diretamente na via da COX-1, e o TRAP-6 que atua na via da PAR-1. O mecanismo de ação da taiwanina C foi investigado utilizando como alvos moleculares a COX-1, COX-2 e PAR-1. Os estudos de docking molecular foram realizados através do programa GOLD visando o entendimento do modo de ligação da taiwanina C com essas proteínas utilizando como modelos de interação a indometacina e o vorapaxar, respectivamente, para as interações com a COX-1/COX-2 e PAR-1.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1. *Sangue*

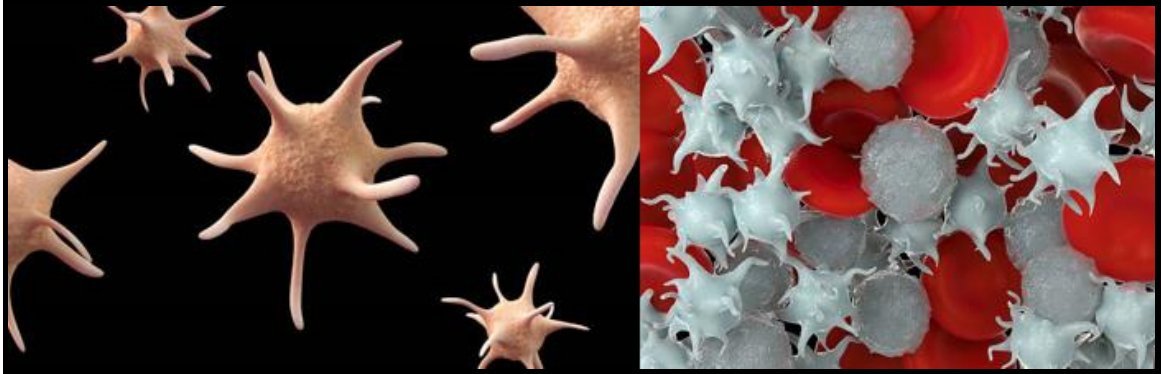
O sangue é um fluido corporal que percorre o sistema circulatório em animais vertebrados; formado por uma porção celular de natureza diversificada. Em animais vertebrados o sangue, tipicamente vermelho, é geralmente produzido na medula óssea. O sangue tem como função a manutenção da vida do organismo no que tange ao transporte de nutrientes, excretas (metabólitos), oxigênio, gás carbônico, hormônios, anticorpos, e demais substâncias ou corpúsculos cujos transportes se façam essenciais entre os mais diversos e mesmo remotos tecidos e órgãos do organismo (Conley & Schwartz, 2020).

O sangue é formado por diversos tipos de células, que constituem a parte "sólida" do sangue, cada tipo com anatomia e funções próprias; essas imersas em uma parte líquida chamada plasma. As células sanguíneas são classificadas em três grupos básicos: os leucócitos ou glóbulos brancos, que são células de defesa integrantes do sistema imunitário; as hemácias, glóbulos vermelhos ou eritrócitos, responsáveis pelo transporte de oxigênio; e as plaquetas, responsáveis pela coagulação sanguínea (Sharma & Sharma, 2021).

1.2. *Plaquetas*

As plaquetas são formadas na medula óssea por segmentação do citoplasma das células conhecidas como megacariócitos, as maiores células da medula. As plaquetas sanguíneas são as menores células do sangue, com um diâmetro médio de cerca de 2 a 4 μm . Embora muito mais numerosas (150.000 a 400.000 por m^3) do que os glóbulos brancos, elas ocupam uma fração muito menor do volume do sangue devido ao seu tamanho relativamente pequeno. Como as hemácias, as plaquetas carecem de núcleo e são incapazes de divisão celular (mitose), mas apresentam metabolismo e estrutura interna mais complexos do que as hemácias. Quando vistas ao microscópio apresentam filamentos semelhantes a fios de cabelo saindo de suas membranas (Figura 3). Elas aderem umas às outras, mas não a glóbulos vermelhos e glóbulos brancos. Os grânulos minúsculos dentro das plaquetas contêm substâncias importantes para a atividade de coagulação sanguínea (Conley & Schwartz, 2020).

Figura 3. Plaquetas e agregação plaquetária



Fonte: <https://www.istockphoto.com/br/fotos/plaqueta-sanguínea>.

A função das plaquetas está relacionada à hemostasia, prevenção e controle do sangramento. Quando a superfície endotelial (revestimento) de um vaso sanguíneo é lesada, a ruptura do vaso expõe o tecido conjuntivo subjacente. As plaquetas aderem ao colágeno presente neste tecido através de uma proteína plasmática secretada pelas células endoteliais e pelas plaquetas (o factor de von Willebrand). Após a ligação das plaquetas ao colágeno uma série de substâncias (ativadores) começam a ser liberadas como ADP, TXA_2 e trombina. Esses ativadores atuam iniciando a agregação de plaquetas em um trombo crescente por meio da ação de várias vias de sinalização mediadas pela proteína G. Uma mudança na forma das plaquetas é a resposta inicial ao TXA_2 (Rucker & Djamoom, 2020).

Estas substâncias agem sobre as próprias plaquetas alterando o metabolismo, forma e proteínas superficiais, num processo chamado de agregação plaquetária (Guyton & Hall, 2006).

A resistência normal das membranas capilares ao vazamento de hemácias (sangue) depende das plaquetas. A deficiência no processo de agregação plaquetária afeta a resistência das paredes capilares e conseqüentemente pode ocorrer sangramento anormal dos capilares, de forma espontânea ou por pequenas lesões ocorridas de forma externa (Guyton & Hall, 2006).

A secreção do TXA_2 estimula a formação do trombo, porém a expansão descontrolada é impedida pela secreção contínua de prostaciclina pelas células endoteliais sãs que rodeiam a lesão. As prostaciclina inibem a agregação plaquetária pelo aumento nos níveis de AMP cíclico (Yusuf et al., 2019).

1.3. Papel das plaquetas na homeostase e trombose

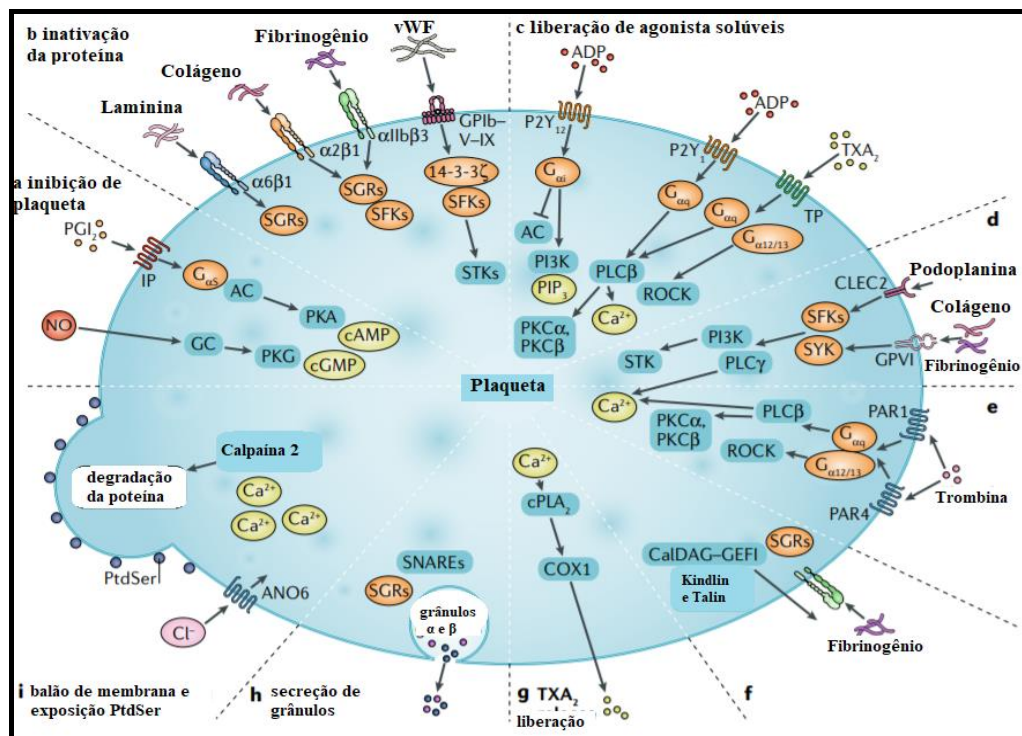
A trombose seja genética ou adquirida, é a formação de um coágulo que obstrui o fluxo sanguíneo podendo ocasionar isquemia ou infarto dos órgãos, consequência de lesão vascular, ativação do processo de coagulação e de distúrbios da corrente sanguínea (De Wit et al., 2014).

Porém, o endotélio vascular impede continuamente que as plaquetas sofram processos de ativação por meio de vários mecanismos, dos quais os mais bem estudados são: ectonucleotidases (que degradam ATP e ADP), trombomodulina (que inativa trombina), a liberação de prostaglandina I₂ (prostaciclina PGI₂) e óxido nítrico. PGI₂ e o óxido nítrico suprimem a maioria dos processos de ativação plaquetária, incluindo adesão, formação de pseudópodes, secreção, agregação e atividade pró-coagulante. O prevalente conceito é que essa supressão é prejudicada em locais de lesão vascular, por erosão ou ruptura de uma placa aterosclerótica ou por inflamação vascular (citocina e liberação do fator de von Willebrand (vWF) (Van der Meijden & Heemskerk, 2019).

A figura 4 ilustra as principais vias de sinalização da ativação plaquetária sendo que os receptores das plaquetas são ordenados no sentido horário de acordo com os estágios de aumento da ativação plaquetária em: A) A inibição plaquetária ocorre via óxido nítrico (NO) e prostaglandina I₂ (PGI₂) receptor IP, age via guanilato ciclase (GC) e adenilil ciclase (AC), com subsequente ativação de proteína quinase G (PKG) e proteína quinase A (PKA), respectivamente. B) A ativação plaquetária é iniciada pela interação de receptores de adesão (integrinas $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e glicoproteína (GP) Ib - V - IX complexo) com seus ligantes, como colágeno e fator de von Willebrand (vWF). A sinalização por meio desses receptores é limitada neste estágio e envolve vários pequenos reguladores de proteína G (SGRs), quinases da família SRC (SFKs) e quinases de proteína serina / treonina (STKs). C) A liberação dos agonistas solúveis ADP e tromboxano A₂ (TXA₂) leva à ativação dos purinoceptores P2Y₁₂ e P2Y₁ e do receptor TXA₂ (TP). P2Y₁₂, atuando através da proteína G G_{ai}, que inibe a AC, mas estimula as fosfoinositídeo 3-quinases (PI₃Ks). P2Y₁ e TP sinalizam através das proteínas G α_q seguidas por estimulação da fosfolipase C β (PLC β), induzindo a liberação de Ca²⁺ no citoplasma, ativação da proteína quinase C (PKC) e outros eventos. Os receptores TP também estimulam as proteínas G $\alpha_{12/13}$, desencadeando a ativação da proteína quinase associada a Rho (ROCK), implicada na mudança e disseminação da forma das plaquetas. D) Amplificação da ativação plaquetária. O GPVI e o receptor 2, semelhante à lectina do tipo C (CLEC₂),

induzem a uma forte sinalização através das vias da proteína tirosina quinase envolvendo as proteínas SFK e SYK que resultam na ativação de PI₃K e PLC γ e liberação de Ca²⁺ no citoplasma. E) A trombina é um forte agonista plaquetária e ativa os receptores acoplados a G α_q PAR-1 e PAR-4 (PAR-3 e PAR-4 em camundongos). F) Alterações conformacionais de integrinas, incluindo α IIb β 3, de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade para seus ligantes, em parte a jusante de PLC, PKC e PI₃K, e envolvendo CalDAG - GEF1 (Ca²⁺ - e nucleotídeo de guanina regulado por diacilglicerol- fator de troca I). Esta via inclui outros SGRs (RAS_{3A} e RAP_{1B}) e moléculas de sinalização ligadas ao citoesqueleto (isoformas kindlin e talin). G) A liberação do TXA₂ é mediada pela ativação dependente de Ca²⁺ e dependente de proteína quinase da fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) e ativação da ciclooxygenase 1 (COX-1). H) A indução da secreção do grânulo α e do grânulo δ por fortes agonistas depende de Ca²⁺ e PKC e envolve os complexos SGR e receptor SNAP (SNARE). H) O balonamento da membrana plaquetária e a exposição à fosfatidilserina (PtdSer) ocorrem em resposta a combinações de agonistas de alta mobilização de Ca²⁺, mediados pelo canal iônico anoctamina 6 (ANO₆). A degradação intracelular de proteínas é mediada pela calpaína 2, PIP₃ e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.

Figura 4. Principais eventos de sinalização e respostas durante a ativação plaquetária



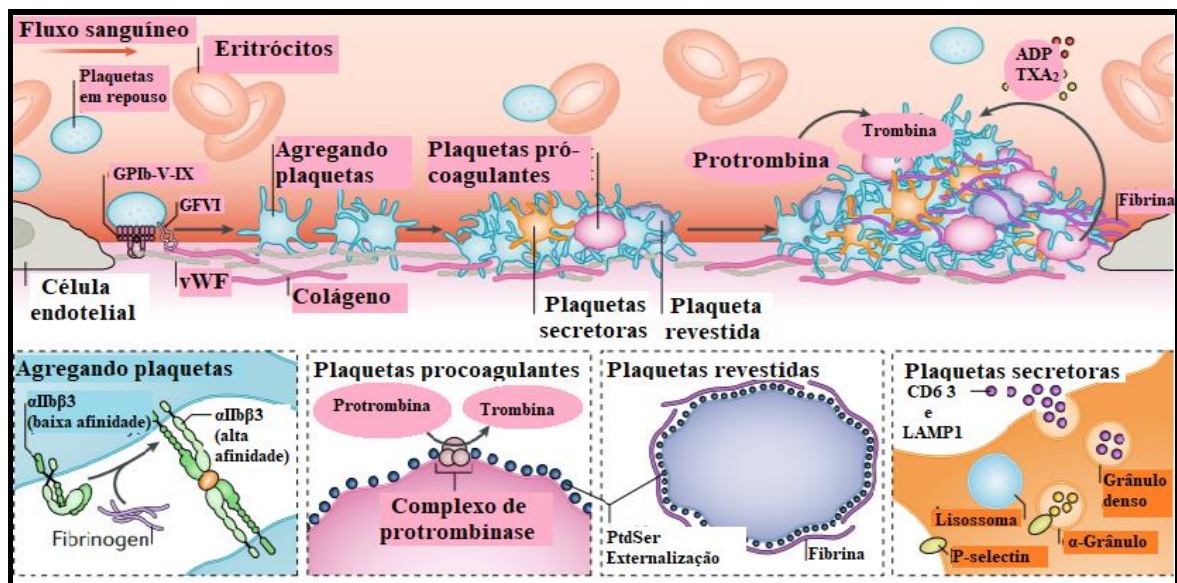
Fonte: Van der Meijden & Heemskerk (2019).

Recentes estudos de fluxo sanguíneo indicaram que colágenos fibrilares (tipo I e tipo III), presente na camada vascular íntima e média e nas placas ateroscleróticas, estão entre as substâncias mais potentes no processo de ativação de plaquetas. Esta comprovação explica porque em lesões vasculares mais profundas ou desintegração de uma placa aterosclerótica ocorre a formação completa de trombo oclusivo (De Witt et al., 2014).

Modelos de trombose animal indicam ainda que a ativação plaquetária induzida por colágeno e a formação de trombos são bastante aumentadas pela trombina gerada via fator de tecido. O fator de tecido é altamente expresso nas células do músculo liso subendotelial e macrófagos, e em extensão limitada também no endotélio inflamado. No que diz respeito à hemostasia, este estudo suporta um modelo multi-hit em que, além da trombocitopenia, outro gatilho (como inflamação) é necessário para o sangramento ocorrer (Boulaftali et al., 2014).

Durante o desenvolvimento de um trombo, as plaquetas incorporadas são expostas de forma diferente ao colágeno e à trombina, o que contribui para a heterogeneidade em respostas plaquetárias (Figura 5). A heterogeneidade em composição do trombo é promovida por fatores extrínsecos (ambientais), como a dinâmica do fluxo sanguíneo, ambiente vascular, e disponibilidade local de agonistas plaquetários e por fatores intrínsecos específicos das plaquetas (Van der Meijden & Heemskerk, 2019).

Figura 5. Fatores ambientais e plaquetários influenciando a heterogeneidade plaquetária no trombo



Fonte: Van der Meijden & Heemskerk (2019).

1.4. Agentes antiplaquetários

Os agentes antiplaquetários são fármacos que promovem a inibição das funções plaquetárias através de diferentes vias metabólicas, com destaque para a inibição da ciclooxigenase, da tromboxano sintetase e da fosfodiesterase. Também sofrem ação as vias de inibição do ADP e da ligação do fibrinogênio com receptores das glicoproteínas IIb/IIIa, a dos antagonistas dos receptores das glicoproteínas IIb/ IIIa e inibidores de agonistas específicos como a trombina, serotonina e adrenalina (Patrono et al., 2001; Castro et al., 2006).

Os medicamentos atuais usados contra a agregação plaquetária têm uma boa resposta farmacológica (Tabela 1) e muitas vezes o tratamento é realizado pela combinação de dois ou mais medicamentos que atuam em diferentes vias metabólicas, porém ainda com efeitos colaterais indesejados (Van der Meijden & Heemskerk, 2019).

Tabela 1. Medicamentos antiplaquetários e *alvos biológicos*

Fármacos	Mecanismo inibitório
<i>Alvos atuais</i>	
COX1 (aspirina e AINEs)	Formação TXA ₂ bloqueada (autócrina)
P2Y ₁₂ (cloridogrel e prasugel)	Receptores ADP irreversivelmente inibidos
P2Y ₁₂ (ticagrelor)	Receptores ADP reversivelmente inibidos
Integrina α IIb β 3 (abciximab, eptifibatida e tirofiban)	Integrina α IIb β 3 bloqueada (agregação)
PAR1 (vorapaxar)	Receptores de trombina bloqueados (coagulação)
<i>Alvos potenciais</i>	
Fator Xa ou trombina	Coagulação suprimida (anticoagulantes)
GPIb-V-IX	Adesão bloqueada ao vWF (dependente do fluxo)
GPVI e CLEC2 (revacept)	Receptor de sinalização semelhante a ITAM bloqueado
TKIs (> 20 drogas)	Sinalização semelhante a ITAM bloqueada (SFK, BTK e SYK)
PI3K β e PDI	Integrina α IIb β 3 inibida (agregação)
Ecto-nucleotidases	ADP e ATP autócrino inativado
PAR-1 e PAR-4 (pepducinas)	Receptores de trombina bloqueados (coagulação)

Fonte: Van der Meijden & Heemskerk (2019).

Os diferentes fármacos atuam em várias vias de ativação plaquetária já estudadas como adesão, sinalização, secreção, atividade pró-coagulante e interação com componentes de coagulação. Entretanto, muitas outras vias podem ser utilizadas como alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos antiplaquetários que sejam eficazes, com menos efeitos colaterais e mais acessíveis em relação a custo (Chiarito & Stefanini, 2021).

Neste sentido a utilização de estudos de docking molecular utilizando como alvos moleculares proteínas envolvidas nessas vias de sinalização pode ser ferramenta muito importante para a seleção e design de compostos com potencial antiplaquetário para estudos *in vitro* e *in vivo*.

1.5. Docking molecular

Após o desenvolvimento dos primeiros algoritmos na década de 1980, o docking molecular tornou-se ferramenta essencial de virtual *screening* na descoberta de medicamentos com base na estrutura, devido à sua capacidade de prever, com certo grau substancial de precisão, a conformação de ligantes de pequenas moléculas dentro do local de ligação do alvo apropriado (Ferreira et al., 2015).

O estudo de docking molecular, pode ser feito por meio de programas como DOCK, AUTODOCK, GOLD e FLEX, que buscam soluções com base nos algoritmos determinísticos ou estocásticos. Os algoritmos de docking molecular executam previsões quantitativas de energia de ligação, fornecendo classificações de compostos acoplados com base na afinidade de ligação de complexos ligante-receptor, e as correspondentes interações intermoleculares que estabilizam o complexo ligante-receptor podem ser convenientemente realizadas. Tais estudos são importantes, não só do ponto de vista teórico, para explicar a relação entre a estrutura do ligante e a função da proteína, mas também em termos de aplicações práticas, pois permitem interpretar o processo de transporte e eficácia terapêutica dos fármacos, e faz com que sejam escolhidas as moléculas que demonstrarem, *in silico*, ter maior afinidade com o receptor antes mesmo da realização de ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* (Sochacka, 2014).

As soluções apresentadas pelo programa GOLD, se baseiam em um Algoritmo Genético (AG) de método estocástico, aplicando conceitos da teoria da evolução e seleção natural de Darwin, reproduzindo múltiplas cópias de um modelo flexível do ligante no sítio ativo do

receptor (proteína) e recombinando segmentos destas cópias aleatoriamente até que um conjunto convergente de estruturas seja gerado (Borges, 2006).

A seleção da pose é acompanhada pelo uso de função de pontuação, como a ChemScore que leva em consideração o ΔG (energia livre de Gibbs), a área de contato hidrofóbico-hidrofóbico, ligação de hidrogênio do complexo, da energia interna do ligante e da energia torsional, criando assim um ranking das melhores poses dos modelos de interação proteína-ligante obtidos (Verdonk et al., 2003).

As técnicas de *docking* molecular fornecem estimativas da energia livre de ligação entre a proteína e o ligante, antes mesmo que esses sejam sintetizados, sendo que os custos computacionais com esses estudos são bem menores, se comparados aos gastos laboratoriais para sintetizar e testar farmacologicamente várias substâncias (Rodrigues et al., 2012).

Essa abordagem nos permite caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, e elucidar as interações moleculares, basicamente em duas etapas: (1) predição da conformação, posição, orientação do ligante dentro dos sítios e (2) de avaliação da afinidade de ligação. A ferramenta de *docking* molecular também pode ser utilizada para realizar uma triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos, classificar resultados e propor hipóteses estruturais de como os ligantes se ligam aos alvos (Meng et al., 2011).

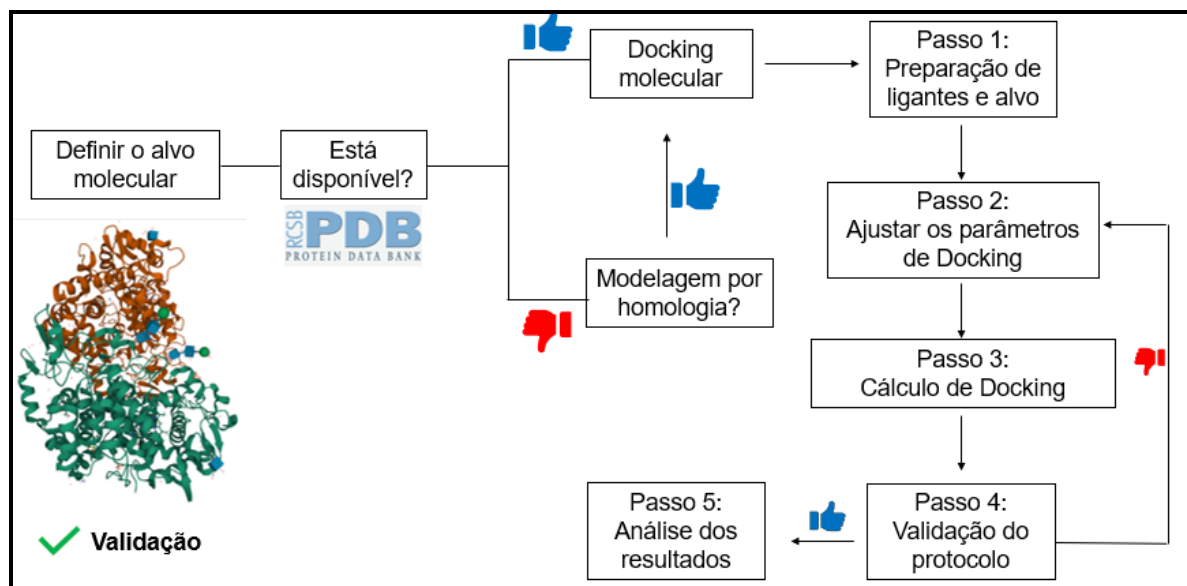
As interações entre o fármaco e alvo proteico se dão através de forças intermoleculares do tipo dipolo, dipolo induzido e permanente. Dentre as forças dipolo-dipolo permanente as mais comuns nesses sistemas são as ligações de hidrogênio e as dipolo-dipolo induzidos podem ser forças de Van Der Waals (Florence & Attwood, 2011).

No estudo de *docking*, o objetivo é modificar o “modus operandi” do sistema endógeno para obter o efeito desejado, sendo que o ligante é selecionado para ter ação agonista ou antagonista da proteína alvo selecionada, cujas propriedades biológicas são conhecidas, assim como em estudos da relação estrutura-atividade dos compostos modelando as estruturas previamente analisadas para analisar as novas interações, permitindo que haja saída ou entrada de novos grupos químicos na molécula e assim modifiquem as potenciais propriedades biológicas (Lu et al., 2011).

O processo de *docking* pode ser realizado basicamente em cinco etapas (Figura 6): a primeira delas é o planejamento do experimento *in silico*, ou seja, a escolha dos receptores e ligantes a serem empregados no estudo; a segunda etapa é a seleção do sítio de ligação e raio

da esfera de trabalho, que serão essenciais para determinar a região específica em que a melhor colocação do ligante deverá ser buscada; a terceira etapa envolve a realização do experimento computacional com objetivo de formar complexos entre ligante e proteína, uma vez executado o cálculo, o protocolo utilizado deve ser validado, ou seja, deve-se verificar a acurácia desse protocolo, o que significa verificar se as funções de busca e pontuação aplicadas foram capazes de reproduzir poses compatíveis com dados experimentais (quarta etapa). Caso o protocolo não tenha sido capaz de reproduzir tais dados, deve-se retornar aos passos 2 e 3 para a realização dos devidos ajustes dos parâmetros e dos cálculos. Caso o protocolo tenha sido validado, segue-se então para a análise dos resultados obtidos no experimento, levando em conta as poses em tela gráfica, os escores resultantes dos cálculos, análise detalhada das interações receptor-ligante, utilizando telas gráficas, e sua correlação com dados experimentais (Caracelli et al., 2018).

Figura 6. Etapas para realização de Docking Molecular



Fonte: Próprio autor.

Antes, de iniciar os cálculos de *docking*, com as amostras, é necessário validar a simulação (*redocking* - reprodução da estrutura do complexo cristalográfico ligante-proteína utilizando o *docking* molecular), para a determinação dos parâmetros a serem utilizados nos cálculos, como a escolha do sítio de ligação e o raio da esfera que será utilizado, de forma que

todos os resíduos de aminoácidos importantes para a inibição sejam incluídos (Caracelli et al., 2018).

Tendo como exemplo as ciclooxigenases, o *redocking* (COX-1-Celecoxibe (PDB ID 3KK6) e COX-2-Rofecoxibe (PDB ID 5KIR) é realizado pelo programa GOLD 5.1 para o alinhamento das respectivas COXs através dos programas MUSCLE e SWISS-MODEL, onde os complexos cristalográficos das proteínas são inicialmente transformados em duas moléculas isoladas, COX-1 e celecoxibe, e COX-2 e rofecoxibe, respectivamente. Os complexos virtuais proteína-ligantes são então, reconstruídos mediante *docking molecular*, e comparados ao complexo cristalográfico, sendo as poses coincidentes e os valores de RMSD abaixo de 2,0 Å, parâmetros de validação da estrutura (Morgon & Coutinho, 2007; Borges, 2016).

1.6. Proteína alvo

A identificação e validação de moléculas potencialmente bioativas são cruciais na pesquisa de novos fármacos. Para compreender melhor sobre os princípios dos mecanismos de interação de uma molécula com seu ligante específico, muitos estudos têm sido conduzidos sobre a análise das características droga-alvo (Feng et al., 2017).

Hung & Chen (2014), destacam que o docking molecular auxilia na compreensão da relação que a proteína alvo e o ligante possuem, bem como os efeitos biológicos oriundos dessa interação, e possibilita o avanço nos estudos como uma alternativa para prever alvos potenciais ou extrair não alvos para testar um novo composto de forma eficiente e econômica.

Os principais alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos são as proteínas (principais catalisadores, elementos estruturais, mensageiros de sinalização e máquinas moleculares dos tecidos biológicos, receptores e proteínas de transporte) e os ácidos nucleicos (DNA e RNA) (Feng et al., 2017).

1.7. Ciclooxigenases como via de ativação plaquetária

As duas principais isoformas das ciclooxigenases são a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-1 (Figura 7) é uma enzima constitutiva, expressa em muitos tecidos e, sob condições fisiológicas, produz prostaglandinas (PGs) necessárias à modulação das funções gastrintestinais, renais e a homeostase vascular (Orlando & Malkowski, 2016).

Figura 7. COX-1 em complexo com o celecoxibe



Fonte: <https://www.rcsb.org/3d-view/3KK6>.

A COX-2 (Figura 8), está presente, principalmente, no cérebro e na medula espinhal. É induzida, em células inflamatórias, considerada a enzima que produz os mediadores da inflamação da classe dos prostanoides. O gene da COX-2 é expresso em resposta a vários agentes pró-inflamatórios, citocinas, endotoxinas, fatores de crescimento e promotores de tumor (Yaqub et al., 2008).

Figura 8. COX-2 em complexo com rofecoxibe



Fonte: <https://www.rcsb.org/3d-view/5KIR>.

As COX-1 e COX-2 são homodímeros contendo respectivamente 576 e 581 aminoácidos sendo cada dímero constituído de três unidades de dobramento independentes: um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico, um domínio de ligação à membrana e um domínio enzimático. Dentro do domínio enzimático, existe o sítio catalítico da peroxidase e um sítio separado, mas adjacente, para a atividade COX no ápice de um longo canal hidrofóbico (Picot et al., 1994).

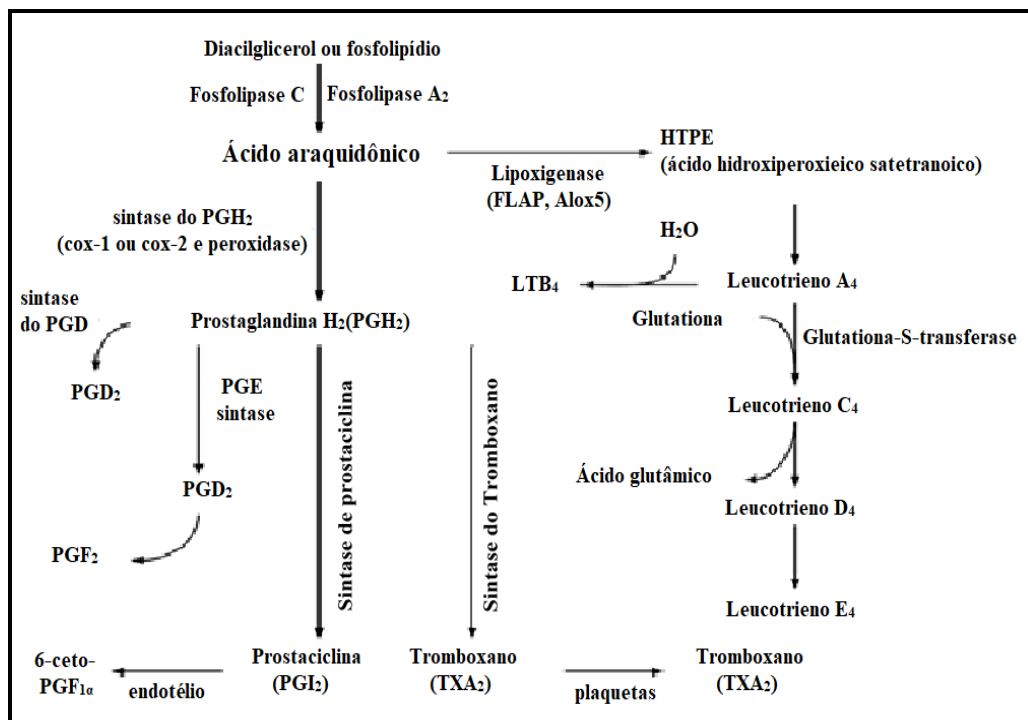
A COX-1 e COX-2 são cerca de 60% idênticas, e as diferenças se encontram nos aminoácidos que revestem o sítio ativo da ciclooxigenase. A diferença mais significativa entre as duas isoformas é o tamanho e a forma dos locais de ligação do inibidor dentro do local ativo COX. A COX-2 tem uma bolsa interna secundária fora do local de ligação do inibidor que não é observada na COX-1. O sítio de ligação do inibidor na COX-2 é 25% maior do que na COX-1. A bolsa secundária contribui significativamente para o maior volume do local de ligação do

inibidor na COX-2, embora o canal central do local de ligação também seja 17% maior na COX-2 do que na COX-1, devido à substituição na COX-2 de Ile523, que existe na COX-1, por um menor resíduo de cadeia lateral a Val523 (Oniga et al., 2017). Essa diferença contribui para a especificidade do inibidor. Foi demonstrado que a COX-2 é inibida por compostos que ocupam esta bolsa adicional chamada de bolso hidrofílico (Rouzer & Marnett, 2009).

Na via onde os mediadores são as ciclooxygenases, o ácido araquidônico (AA) plaquetário é metabolizado pela ciclooxygenase e convertido em prostaglandinas (PG) (Trostchansky et al., 2019). COX é a enzima chave e limitadora da taxa na conversão de AA em prostaglandina PGH_2 que, através da enzima tromboxano sintase, é metabolizada em tromboxano A_2 (TXA_2), que é um potente agonista plaquetário e desempenha papel importante no aumento da ativação plaquetária e promoção da formação do trombo (Yuhki et al., 2011; Esteves et al., 2017).

As ciclooxygenases (COX-1 e COX-2) estão envolvidas no processo de formação de PGH_2 (Figura 9), no entanto, a produção de TXA_2 plaquetária é dependente da COX-1 (Abeles et al., 2015).

Figura 9. Cascata do ácido araquidônico, formação do TXA_2



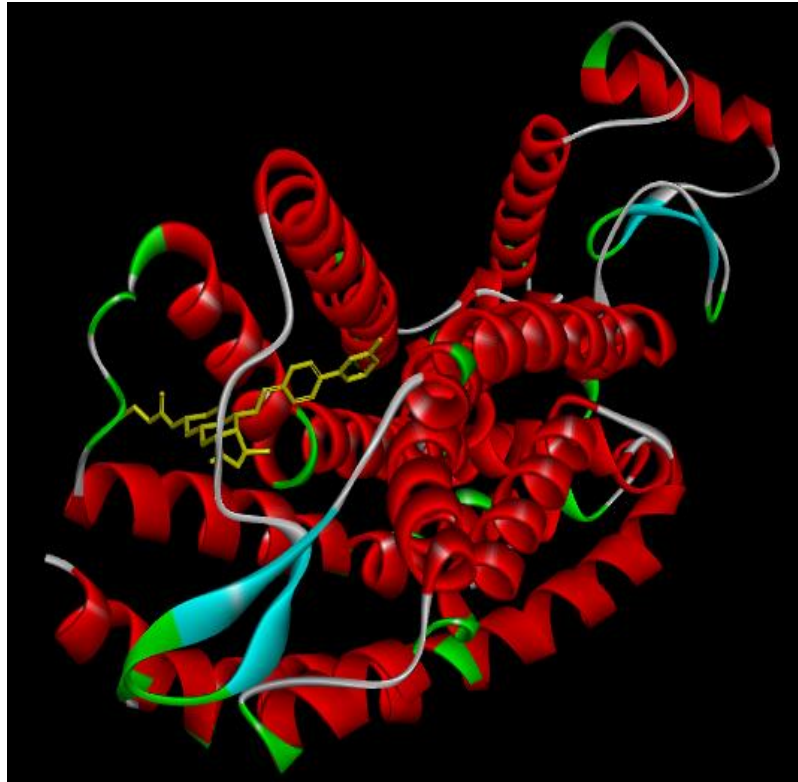
Fonte: Adaptado de Gilman, 2005.

O sítio da COX-1 está enterrado profundamente no domínio catalítico e a entrada é constituída pelos aminoácidos Arg120, Tyr355 e Glu524. A inibição da COX-1 está relacionada à interação do ligante com esses resíduos, principalmente com a Arg120 através de ligações de hidrogênio clássicas. O bloqueio da entrada do sítio ativo impede o ácido araquidônico de entrar e ser convertido em TXA₂. Desta forma, a inibição da COX-1 leva à inibição da agregação plaquetária (Rang et al., 2015; Tomić et al., 2017). Todos os fármacos que atuam sobre a COX-1 inibem a biossíntese do TXA₂ como a maioria dos AINES, porém o uso como antiplaquetários raramente é prescrito devido aos efeitos colaterais gástricos. O ácido acetilsalicílico (ASS) é utilizado como antiplaquetário, ou seja, evita a ativação e agregação das plaquetas para prevenir trombose em pacientes de risco. No entanto, o FDA (Food Drugs Administration) recomenda que o AAS seja usado apenas na prevenção secundária de doenças cardiovasculares como infarto ou AVC em pessoas que correm o risco de um novo evento. Somente nessa situação os benefícios da terapia superam os riscos de efeitos adversos ligados à homeostasia (Campbell et al., 2007).

1.8. PAR-1 como via de ativação plaquetária

A PAR-1 (Receptor Ativado por Protease tipo 1) (Figura 10) é membro de uma família de receptores acoplados à proteína G que medeiam as respostas celulares à trombina e proteases relacionadas à ativação plaquetária.

Figura 10. Estrutura da PAR-1 em complexo com vorapaxar



Fonte: <https://www.rcsb.org/3d-view/3VW7>.

A trombina ativa a PAR-1 por clivagem específica do exodomínio N-terminal do receptor para gerar um novo N-terminal. Este novo N-terminal funciona então como um agonista ligado ao peptídeo que se liga intramolecularmente ao feixe transmembrana de sete hélices do receptor para afetar a ativação da proteína G1. Em mamíferos adultos, os quatro membros da família PAR ligam o dano ao tecido e a geração local de proteases de coagulação ativas às respostas celulares que ajudam a orquestrar a hemostasia, trombose, inflamação e talvez a reparação do tecido (Zhang et al., 2012).

O receptor PAR-1 ganhou interesse uma vez que o bloqueio do PAR-1 pode produzir efeitos antiplaquetários potentes sem afetar a capacidade da trombina de gerar fibrina e sem inibir a ativação plaquetária pelo colágeno (Goto et al., 2010). Teoricamente, esta via alternativa bloqueia a ativação plaquetária durante formação de coágulos preservando o reparo vascular essencial e a função hemostática protetora afetada pelos inibidores da COX-1.

O vorapaxar (Figura 2), potente inibidor da PAR-1, possui estrutura análoga à do produto natural himbacine, é um inibidor competitivo, oralmente ativo, não proteico e altamente seletivo (Abdulsattar et al., 2011; Gryka et al., 2017). Inibe a agregação plaquetária induzida pelo

peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) de maneira dose-dependente. Estudos pré-clínicos indicaram que o vorapaxar não afeta a agregação plaquetária induzida por ADP, TXA₂ ou colágeno e não altera o tempo de protrombina ou tempo de tromboplastina parcial ativada (Abdulsattar et al., 2011). Seu uso é eficaz, geralmente associado a outro antiplaquetário, porém apresenta também efeitos colaterais relacionados a sangramentos e efeitos sobre o sistema nervoso central (Van der Meijden, 2019).

Desta forma, existe a necessidade em se buscar novas moléculas que possam ser utilizadas como alvos para o desenvolvimento de novos agentes antiplaquetários visando melhor resposta biológica associada a menores efeitos colaterais.

1.9. *Produtos naturais*

Durante muito tempo produtos naturais extraídos de plantas têm sido alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Destes estudos surgiram moléculas como a do taxol, artemisinina, morfina, podofilotoxina e himbacine que deram origem a fármacos em uso atualmente para tratamento contra várias enfermidades (Chackalamannil, 2016; Atanazov et al., 2021).

O desenvolvimento do antiplaquetário vorapaxar foi baseado no produto natural himbacine (Chackalamannil, 2016) e muitos outros produtos naturais têm sido avaliados para essa mesma atividade (Hirsch et al., 2017; Kim & Park, 2019; Zaragozá et al., 2021).

A taiwanina C (Figura 2) é uma lignana arilnaftalênica extraída do cerne da *Taiwania cryptomerioides* que é uma planta asiática endêmica com distribuição natural em Taiwan, numa área contígua no sul da China, em Mianmar e no Vietnã (Figura 11).

Figura 11. Fotos da *Taiwania cryptomerioides* de onde se extrai a taiwanina C



Fonte: https://botanyphoto.botanicalgarden.ubc.ca/2007/12/taiwania_cryptomerioides/

A *T. cryptomerioides* despertou o interesse por anos devido a excelente qualidade e durabilidade de sua madeira, além da presença de centenas de compostos como terpenóides, lignanas, flavonóides e esteróides presentes na raiz, casca, madeira e agulhas (Figura 11) (Chien e Kuo, 2009). Porém, devido à sua raridade e crescimento lento, a *T. cryptomerioides* é protegida legalmente nos locais onde ocorre tornando a extração legal da taiwanina C muito difícil (Thomas & Farjon, 2011).

O interesse nesta lignana arilnaftalênica reside em suas propriedades biológicas (Ban et al., 2002; Park et al., 2014; Lin et al., 2017; Park et al., 2021), e na similaridade com a estrutura da himbacine em relação ao sistema tricíclico e anel butirolactônico (Figura 2).

A principal atividade biológica da taiwanina C é sua ação inibitória sobre as ciclooxigenases, a qual já foi estudada por vários autores utilizando diferentes modelos de ensaios biológicos (Ban et al., 2002; Hong et al., 2008; Lin et al., 2017; Tsai et al., 2018)

Ban et al. (2002), investigaram os efeitos da taiwanina C na produção de PGE₂ induzida por TPA em macrófagos peritoneais de rato e relataram que a produção de PGE₂ dependente de COX-2 foi inibida pela taiwanina C com um valor de CI₅₀ de 0,23 μM, enquanto a produção de PGE₂ dependente de COX-1 foi reduzida em 46,9% a 1 μM. Os autores também relataram que as atividades das COX-1 e COX-2 isoladas foram inibidas pela taiwanina C (valores de CI₅₀: 1,06 μM e 9,31 μM, respectivamente), refletindo a inibição de COX-1- e COX-2, dependente da produção de PGE₂ no sistema de cultura de macrófagos peritoneais de ratos. Este

resultado mostrou maior interação da taiwanina C com a COX-1 nos ensaios com a proteína isolada.

Hong et al. (2008), avaliaram a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) em macrófagos peritoneais de ratos na presença de taiwanina C e analisaram seu mecanismo de ação. Os autores concluíram que a taiwanina C inibiu a produção de PGE₂ por inibição direta da COX-1 e da COX-2.

Lin et al. (2017) também relatam o potencial inibidor da expressão de COX-2 da taiwanina C em estudos com células de câncer oral T28 onde os níveis de COX-2 são anormalmente elevados. As modulações na expressão de proteínas relevantes foram determinadas para entender o mecanismo induzido pela taiwanina C para inibir a proliferação das células T28. Os níveis de EGFR e COX-2 ativados foram encontrados anormalmente elevados nas células cancerosas. No entanto, constatou-se que a taiwanina C inibiu a ativação de EGFR e regulou outras proteínas relacionadas a jusante e, assim, inibiu a proliferação de células T28. Em conclusão, os autores avaliam que a taiwanina C suprime COX2-EGFR e aumenta as vias de P27 para suprimir a proliferação de células de câncer oral induzida por arecolina via inativação de ERK1/2.

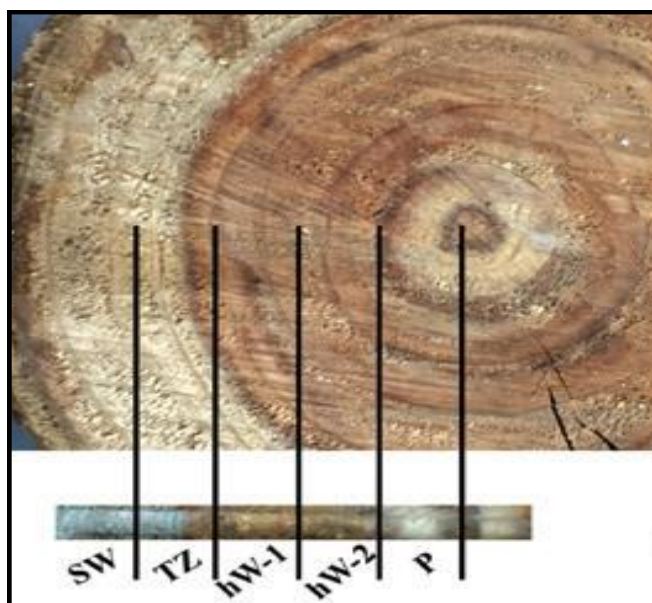
Tsai et al. (2018), usaram uma linha celular tumoral T28 e uma linha celular não tumoral N28 derivada de modelos OSCC de camundongos para estudar o efeito da taiwanina C na expressão de COX-2 associada a PGE₂ e reguladores do ciclo celular. No estudo realizado constatou-se que a expressão da proteína p21 foi ativada pela taiwanina C, que as proteínas regulatórias do ciclo celular foram reguladas negativamente, a apoptose foi elevada e o mecanismo de sobrevivência p-PI3K / p-Akt foi regulado negativamente em células de câncer oral T28. A partir dos resultados encontrados os autores enfatizaram o potencial terapêutico da taiwanina C contra o câncer oral induzido por arecolina.

Como as COXs são enzimas chaves diretamente envolvidas na produção do TXA₂ (Yuhki et al., 2011; Esteves et al., 2017) e que a taiwanina C tem potencial inibitório sobre as COXs essa lignana pode ser uma forte candidata para ensaios de atividade antiplaquetária.

Apesar de ser uma lignana de grande importância devido às suas propriedades biológicas ela é encontrada na *T. cryptomerioides* em diferentes quantidades, sendo que as maiores quantidades se encontram nas camadas mais interna do tronco que varia de 7 µg/g de madeira na camada SW até 95 µg/g de madeira na camada P (Figura 12). Portanto, a quantidade necessária da lignana para a realização de ensaios biológicas demandaria uma quantidade muito

grande de madeira o que devida à proteção da espécie tornaria esses estudos praticamente impossíveis de serem realizados, por isso a melhor maneira de se obter a taiwanina C é através da síntese total.

Figura 12. Cones de crescimento e seção transversal coletados de um *T. cryptomerioides* de 30 anos. SW, Sapwood – porção mais clara da madeira; TZ, zona de transição; hW-1, cerne externo; hW-2, cerne interno; P, medula



Fonte: Tsao et al., 2015.

1.10. Síntese da taiwanina C

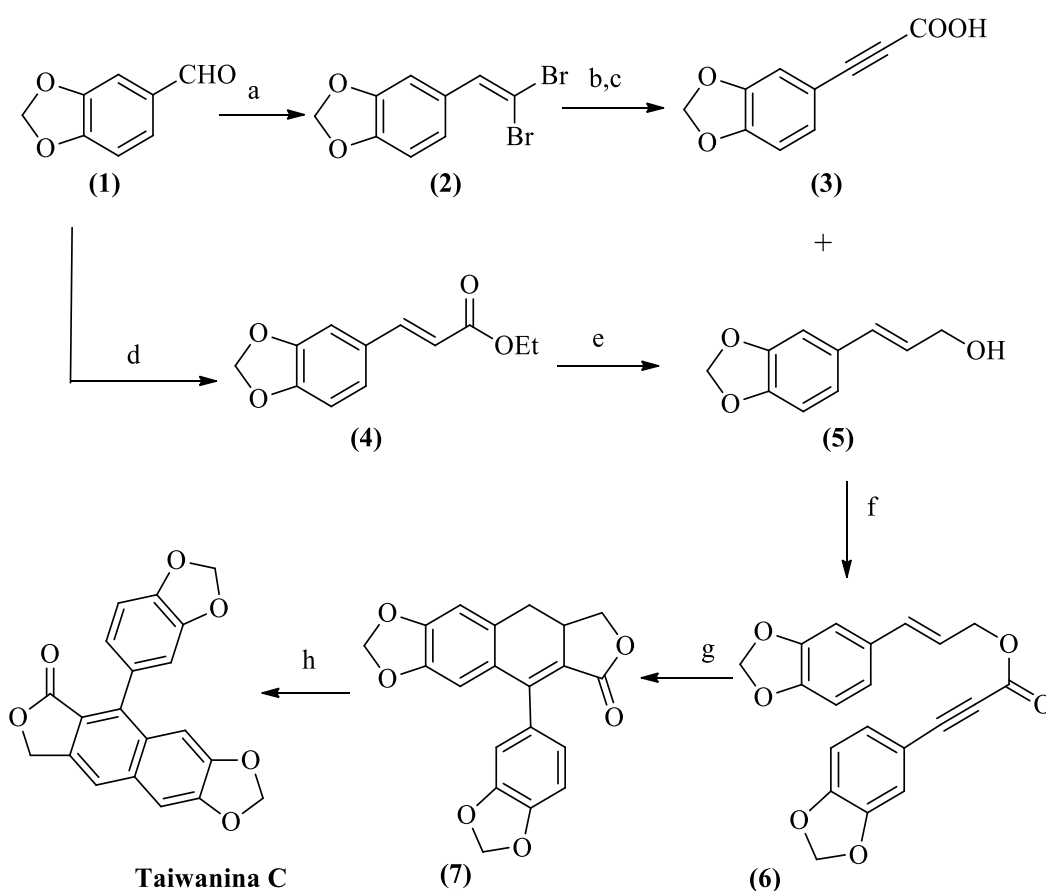
Muitas são as estratégias para a extração de metabólitos secundários de plantas, porém muitos destes são produzidos em pequenas quantidades o que dificulta a realização de ensaios *in vivo*. Desta forma, uma das estratégias para obtenção de metabólitos secundários em maior quantidade é a síntese parcial ou total da molécula alvo. Porém nem sempre é possível desenvolver rotas sintéticas que sejam efetivas e acessíveis. Além disso algumas moléculas possuem estruturas muito complexas com longas cadeias carbônicas, vários sistemas cíclicos e inúmeros centros assimétricos o que demanda uma síntese com muitas etapas e alto custo dificultando sua execução (Chang et al., 2000).

No caso da taiwanina C a síntese total é uma das melhores opções, visto que sua extração da *T. cryptomerioides* foi proibida. Devido à sua raridade e crescimento lento, a *T.*

cryptomerioides é protegida legalmente nos locais onde ocorre tornando a extração legal da taiwanina C muito difícil (Thomas & Farjon, 2011).

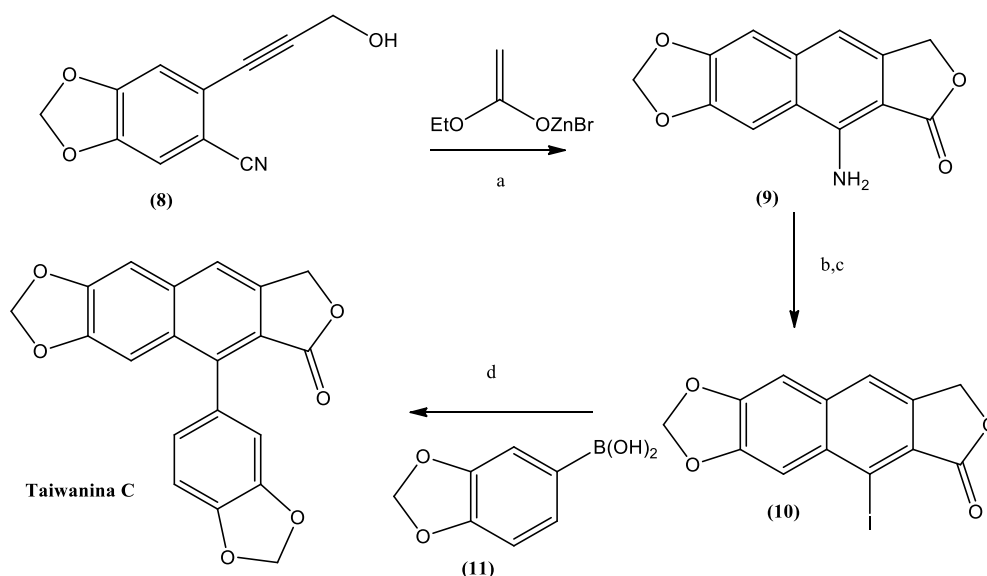
Desta forma, várias são as propostas de rotas sintéticas para a obtenção dessa lignana como as descritas por Cow et al. (2000), He et al. (2014), Park et al. (2014) e Park et al. (2020).

Park et al. (2014), sintetizaram a taiwanina C depois de 7 etapas, obtendo rendimento global de 45%, porém contando somente as duas últimas etapas de reação. Essa síntese segundo os autores tem baixo rendimento na obtenção de alguns intermediários o que a torna menos eficiente (Esquema 1).



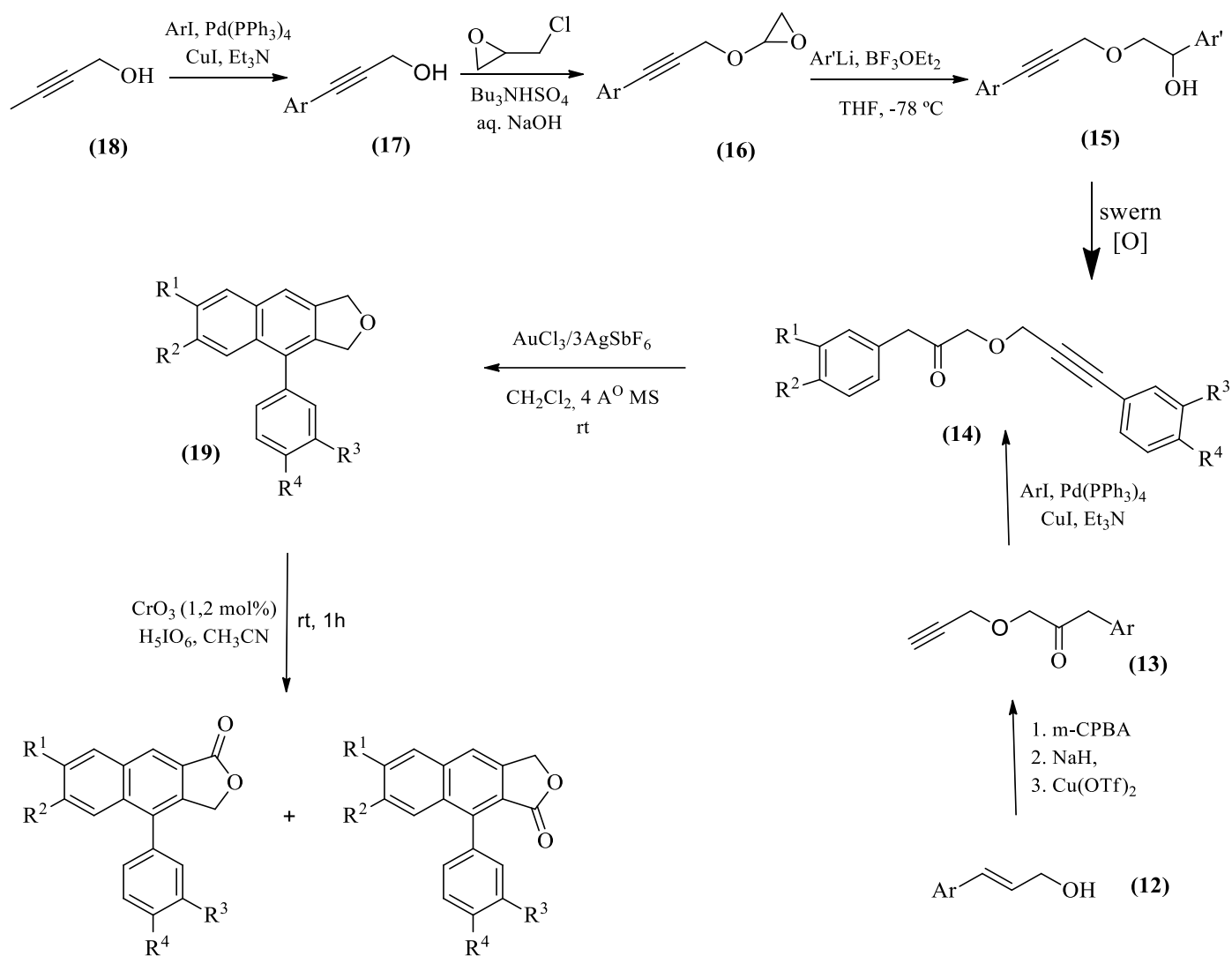
Esquema 1. Síntese de taiwanina C por Park et al. (2014). Reagentes e condições: (a) PPh_3 , CBr_4 , CH_2Cl_2 , rt (b) $n\text{-BuLi}$, THF, -78°C , então ClCO_2Me , -78°C a rt (c) K_2CO_3 , EtOH, rt (d) Trietil fosfonoacetato, NaH, THF, 0°C (e) DIBAL-H, CH_2Cl_2 , -78°C ; (f) DCC, CH_2Cl_2 ; (g) Ac_2O , MW, 140°C ; (h) DDQ.

Em outro estudo, He et al. (2014) desenvolveram um protocolo para a síntese total da taiwanina C partindo de 2-(feniletinil) benzonitrila, com rendimento de 42%, mas sem contabilizar o rendimento das etapas de preparo dos reagentes. Esta rota apesar de conter poucos passos é uma rota que envolve alguns reagentes de alto custo e por isso mais dispendiosa (Esquema 2).



Esquema 2. Síntese da taiwanina C por He et al. (2014). (a) THF (b) NaNO₂, HCl 0 °C (c) KI (d) Pd (OAc)₂, PPh₃, Cs₂CO₃, 1,4-dioxano.

Outras rotas sintéticas desenvolvidas para a obtenção de lignanas arilnaftalênicas além de conter várias etapas reacionais fornecem a mistura da taiwanina C (18%) e da justicidina E (73%), seu retro isômero, como na rota descrita por Park et al. (2020) (Esquema 3).



a. $\text{R}^1 = \text{R}^2 = -\text{OCH}_2\text{O}-$, $\text{R}^3 = \text{R}^4 = -\text{OCH}_2\text{O}-$

Justicina E (73%) + Taiwanina C (18%)

Esquema 3. Síntese de lignanas arilnaftalênicas por Park et al. (2020).

Devido à importância biológica dessa lignana, outros métodos de síntese tornam-se necessários visando a obtenção da taiwanina C de forma mais rápida e eficiente do que as metodologias descritas na literatura.

Aliado à importância química dessa lignana, seu efeito sobre as COX torna esse composto um interessante alvo para a sua avaliação antiplaquetária.

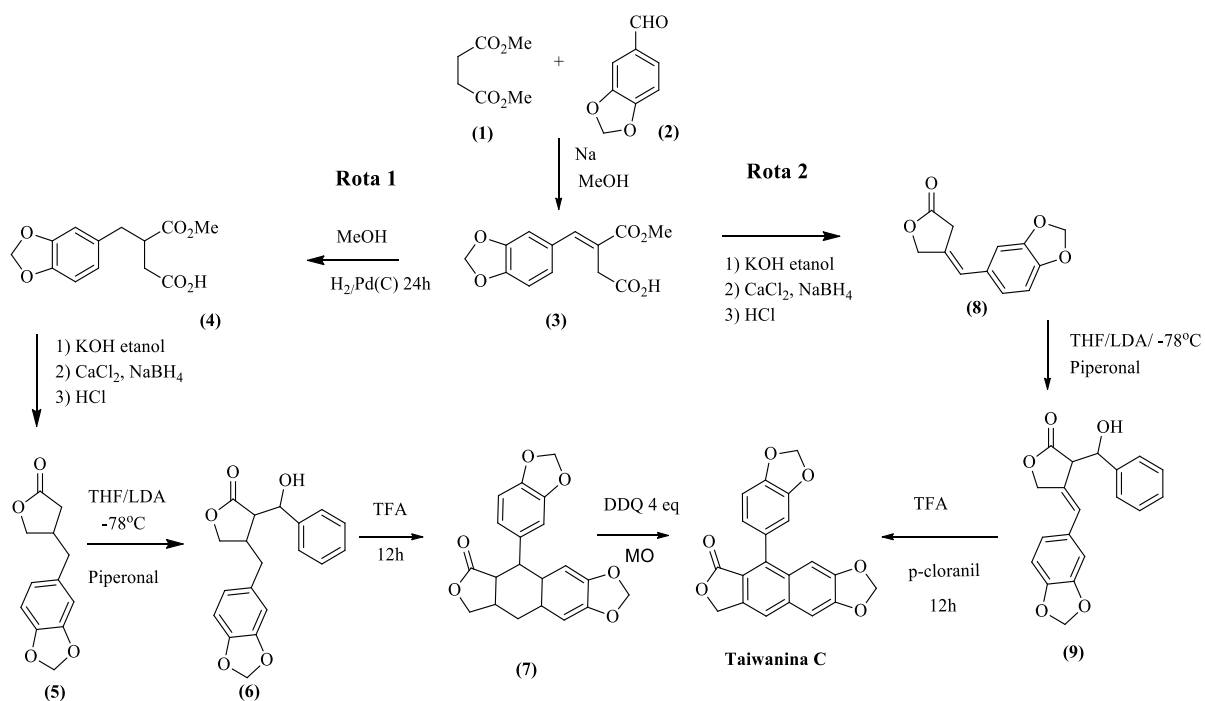
2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi sintetizar a taiwanina C através de uma nova rota sintética e avaliar a atividade antiplaquetária utilizando ensaios *in vitro* com plaquetas humanas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar duas possíveis metodologias sintéticas para a obtenção da taiwanina C (Esquema 4);
- Avaliar a atividade da taiwanina C através de ensaios *in vitro* usando plaquetas humanas na presença dos agonistas ácido araquidônico e TRAP-6;
- Estudar os mecanismos de ação da taiwanina C sobre as COXs e a proteína PAR-1, ambas envolvidas nas vias de ativação plaquetária, através de docking molecular.



Esquema 4. Rotas sintéticas para obtenção da taiwanina C.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

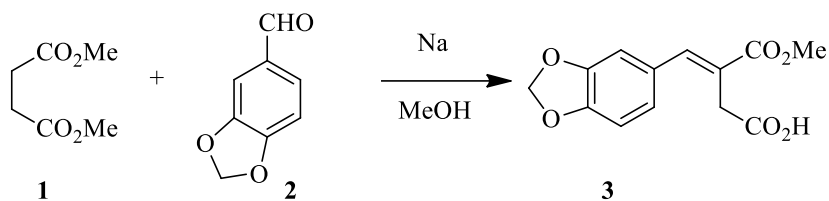
3.1. *Materiais*

Os reagentes e solventes foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem purificação adicional. O ácido araquidônico (AA, cat.90010) e o receptor-mimético da trombina (TRAP-6, cat. 24125) foram fornecidos pela Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA). Todas as reações não aquosas foram realizadas sob condições anidras usando atmosfera de nitrogênio e solventes anidros da Sigma-Aldrich. Todas as reações assistidas por micro-ondas foram realizadas no reator Discover Reflux (CEM corporation, 200 W) com energia de irradiação contínua de 0 a 200 W em vaso aberto. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em placas de sílica gel 60F₂₅₄ da Merck e visualizada por irradiação UV 365 nm. A cromatografia foi realizada em sílica gel 70-230 mesh (Merck) utilizando misturas de hexano e acetato de etila em diferentes proporções. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram determinados em um espectrômetro Bruker ARX 400 ou 500 MHz em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO d₆) ou clorofórmio deuterado (CDCl₃) usando o software de processamento de dados de RMN SpinWorks 4. Os valores de deslocamento químico (δ) estão em ppm, constantes de acoplamento (J) estão em Hz e os padrões de divisão de prótons são descritos como s (singlete), d (duplete), dd (duplete de dupletos), t (triplete) e m (multiplete). A análise elementar foi realizada em um Analisador Elementar Thermo Scientific FlashSmart usando como padrão 2,5-Bis (5-terc-butil-benzoxazol-2-il) tiofeno.

3.2. *Sínteses*

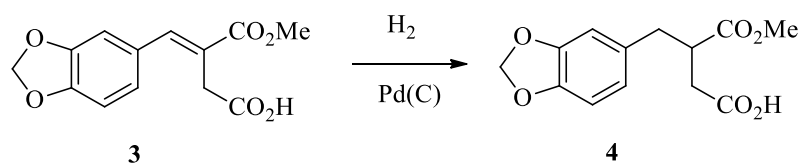
3.2.1. *Rota sintética 1*

3.2.1.1. *Metodologia de sínteses para obtenção do ácido (E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(metoxicarbonil)but-3-enoico (3)*



A um balão de 50 ml adaptado com condensador de refluxo, agitação magnética e sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 20 ml de metanol anidro e 1,8402 g (0,08 mol) de sódio metálico (pequenos pedaços por vez). Após completa dissolução do sódio metálico a solução foi refluxada e 15,476 g (0,106 mol) de succinato de dimetila foram adicionados. Depois de 15 minutos sob refluxo uma solução de 11,4004 g (0,076 mol) de piperonal em 15 ml de metanol anidro foi adicionada ao frasco reacional. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. Após 5 horas de aquecimento sob refluxo, a mistura reacional foi resfriada e acidificada com uma solução de HCl (6 M). O metanol foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi extraído com diclorometano. Extraíu-se a fase orgânica com solução aquosa de bicarbonato de sódio à 10% e acidificou-se a fase aquosa com ácido clorídrico concentrado até pH 1. Neste momento ocorreu a decantação de um óleo amarelo que foi extraído com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e filtrada. A evaporação do solvente forneceu o produto como um sólido amarelo que foi purificado a partir de várias recristalizações em metanol. A estrutura foi determinada por RMN.

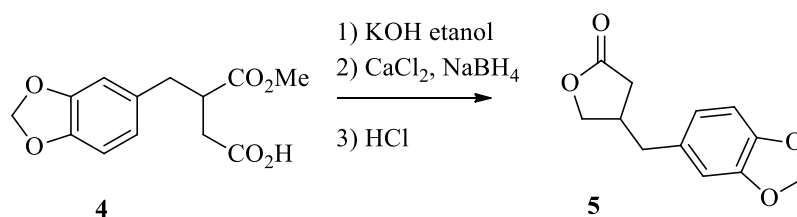
3.2.1.2. Metodologia de síntese para obtenção do ácido 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-metoxi-4-oxobutanóico (4)



A uma autoclave de aço inox foram adicionados 2,5081 g (9,5 mmol) do ácido **3**, 25 ml de metanol anidro e 0,1003 g de paládio sobre carvão (5%). A autoclave foi fechada e a suspensão submetida a 10 atm de H₂ à temperatura ambiente sob agitação e, após 24 horas (CCD) foi filtrada através de celite e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O óleo obtido foi dissolvido em metanol a quente e após resfriamento ocorreu a precipitação de um

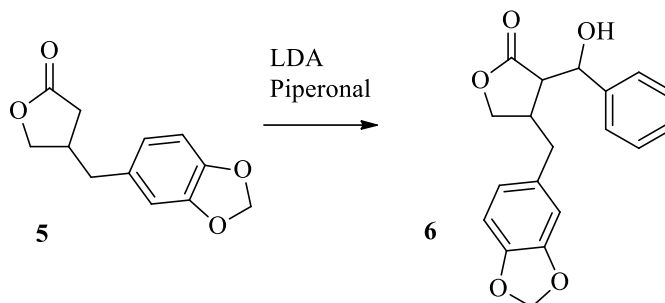
sólido branco. Esse sólido foi filtrado e seco sob pressão reduzida. A estrutura foi determinada por RMN.

3.2.1.3. Metodologia de síntese para a obtenção da 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)diidrofuran-2(3H)-ona (5)



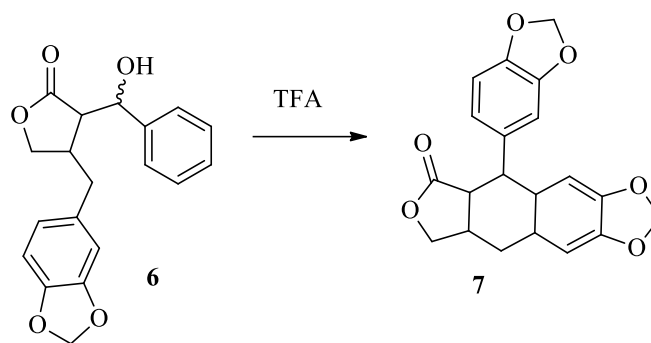
Em um balão de 25 ml sob atmosfera de N₂ foram adicionados 0,6781 g (2,55 mmol) do ácido **4**, 15 ml de etanol absoluto, 1 gota de fenolftaleína e 0,146 g (2,6 mmol) de KOH. A mistura foi agitada por 15 minutos à temperatura ambiente até a viragem do indicador para o pH básico (coloração rosa) indicando a formação do sal. Em outro balão sob atmosfera de N₂ foram adicionados 0,6882 g (6,2 mmol) de CaCl₂ e 50 ml de etanol absoluto, a seguir a mistura foi resfriada a -10°C e, vagarosamente, foram adicionados 0,3745 g (9,9 mmol) de NaBH₄ dissolvidos em 30 ml de etanol absoluto. A mistura reacional foi agitada a -10°C por 30 minutos e, depois disso, o sal de potássio do ácido **4** foi adicionado. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 5 horas e então acidificada com uma solução de HCl (6 M). A esta mistura foi adicionada água destilada até que a solução se tornasse clara (20 ml). O etanol foi a seguir removido sob pressão reduzida e a fase aquosa extraída com diclorometano. As fases foram separadas e fase orgânica foi lavada com água, seca com sulfato de magnésio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o óleo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente uma mistura de hexano: acetato de etila (7:3), fornecendo o produto como um óleo incolor. A estrutura foi determinada por RMN.

3.2.1.4. Metodologia de síntese para a obtenção da 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il(hidroxi)metil)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)diidrofuran-2(3H)-ona (6)



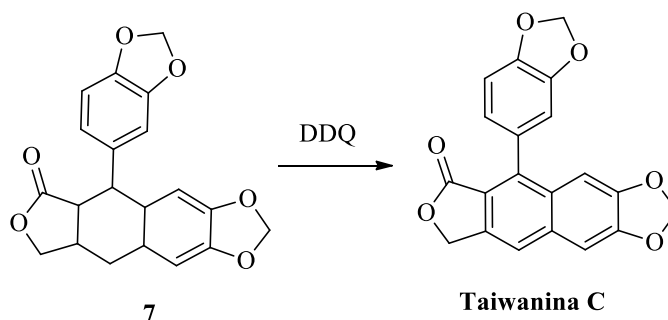
Em um balão de 25 ml sob atmosfera de nitrogênio e mantido a 0 °C, foram adicionados 5 ml de THF anidro, 0,183g (1,82 mmol) de diisopropilamina e 1,2 ml de uma solução de *n*-butil-lítio (1,5 M em *n*-hexano; 1,82 mmol). Após 15 minutos a solução foi resfriada a -78 °C e a seguir a ela foi adicionada uma solução de 0,2002 g (0,91 mmol) da lactona **5** dissolvida em 1 ml de THF. Após a formação do enolato (1 hora de agitação), 0,136 g (0,91 mmol) de piperonal dissolvido em 2 ml THF foram adicionados à mistura reacional. A reação foi acompanhada por CCD constatando-se a formação de dois produtos com fator de retenção muito próximos após 4 horas de reação a -78 °C. A mistura reacional foi então tratada com solução saturada de NH₄Cl e extraída com acetato de etila. As fases foram separadas e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para a obtenção de um óleo amarelo que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura de acetato de etila: hexano (6:4). Foram obtidos 2 isômeros que foram separados por recristalização em metanol. O isômero sólido obtido após recristalização teve sua estrutura determinada por RMN.

3.2.1.5. Metodologia de síntese para a obtenção da 5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5,5a,8,8a,9,9a-hexahidrofuro[3',4':6,7]nafto [2,3-d][1,3]dioxol-6(4aH)-ona (7)



A um balão de 5 ml de fundo redondo contendo 0,0500 g (0,135 mmol) do composto **6** (mistura dos isômeros) foram adicionados 2 ml de $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$. A reação foi acompanhada por CCD e após 12 h de agitação à temperatura ambiente o solvente foi removido e o resíduo lavado com hexano: acetato de etila (8: 2). A estrutura do produto obtido após purificação foi determinada por RMN.

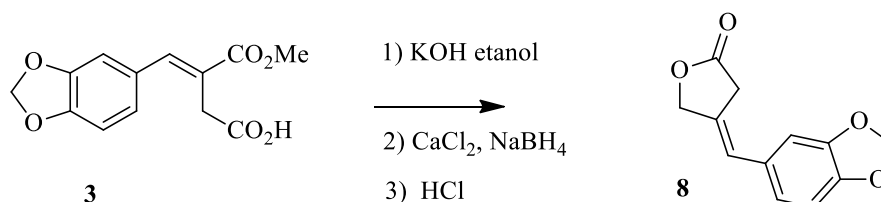
3.2.2.6. Metodologia de síntese para a obtenção da taiwanina C



A um balão de fundo redondo de 5 ml contendo o 0,035 g (0,10 mmol) do composto **7** e 3 ml de etanol absoluto foram adicionados 4 equivalentes de DDQ. A mistura reacional foi aquecida a refluxo em micro-ondas (potência 200 W) e acompanhada por CCD. Após 1,5 h sob refluxo o solvente foi removido e o resíduo submetido à cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente a mistura hexano: acetato de etila (8: 2). O produto obtido após purificação teve sua estrutura elucidada por RMN.

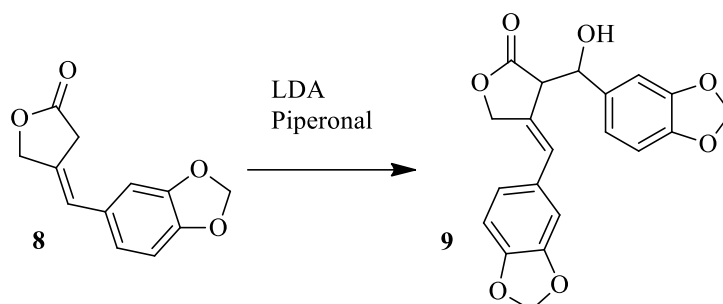
3.2.2. Rota sintética 2

3.2.2.1. Metodologia de sínteses para obtenção da (E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)diidrofuran-2(3H)-ona (8)



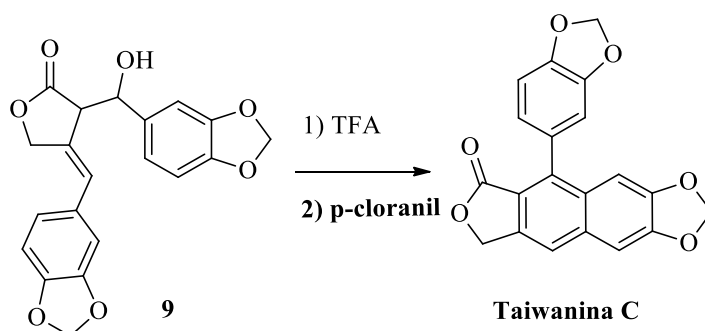
Em um balão de 25 ml sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio, foi adicionada uma solução de 0,3276 g (1,3 mmol) do ácido **3** em etanol absoluto (8 ml), 1 gota de fenolftaleína e então 0,0728 g de KOH (1,3 mmol). Esta mistura foi agitada por 15 minutos à temperatura ambiente até a viragem do indicador para o pH básico (coloração avermelhada) indicando a formação do sal do ácido **3**. Em outro balão provido de funil de adição sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados 0,346 g (3,1 mmol) de CaCl₂ e 25 ml de etanol absoluto, a mistura foi resfriada a -10 °C e, vagarosamente, adicionou-se uma solução de 0,3735g (4.8 mmol) de NaBH₄ em 20 ml de etanol absoluto. A mistura reacional foi agitada a -10 °C por 30 minutos e, depois disso, adicionou-se o sal de potássio do ácido **3**. A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 5 horas e então acidificada com uma solução de HCl (6 M) e agitada por mais 15 minutos, para promover a formação da lactona **8**. Água destilada foi adicionada até a solução se tornar clara e a seguir o etanol foi removido sob pressão reduzida. A fase aquosa foi extraída com diclorometano, o extrato orgânico foi lavado com água e seco com sulfato de magnésio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o óleo obtido foi utilizado na etapa seguinte sem purificação. Parte desse composto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente a mistura de hexano acetato de etila (8:2) para confirmação da estrutura por RMN.

3.2.1.3. Metodologia de sínteses para obtenção da (Z)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il(hidroxi)metil)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)diidrofuran-2(3H)-ona (9)



Em um balão de 25 ml, sob agitação magnética a 0 °C e atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 5 ml de THF anidro, 0,183g (1,82 mmol) de diisopropilamina e 1,2 ml de uma solução de *n*-butil-lítio (1,5 M em *n*-hexano; 1,82 mmol). Esta mistura foi agitada por 15 minutos e em seguida resfriada a -78 °C seguida pela adição de uma solução de 0,1981 g (0,91 mmol) da lactona **8** em 1 ml de THF anidro. Após 1 h de agitação foi adicionada uma solução de 0,1362 g (0,91 mmol) de piperonal (**2**) em 2 ml de THF. A reação foi acompanhada por CCD e mantida a -78 °C por 4 horas. A seguir a reação foi tratada com solução saturada de NH₄Cl, e a mistura extraída com acetato de etila, os extratos orgânicos foram combinados, secos com sulfato de magnésio anidro. Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida obteve-se um resíduo na forma de óleo amarelo, que foi utilizado posteriormente sem purificação.

3.2.1.4. Metodologia de síntese para obtenção da taiwanina C



A um balão de fundo redondo de 5 ml contendo 0,0500 g do composto **9** (0,135 mmol) foram adicionados 2 ml de CF₃CO₂H. A mistura foi agitada e acompanhada por CCD e após 12 h o solvente foi removido em rotaevaporador. O resíduo obtido foi purificado por lavagem com a mistura de hexano: acetato de etila em várias proporções. Esse sólido teve sua estrutura confirmada por RMN. Para a reação de obtenção da taiwanina C a mesma reação foi realizada

entre o composto **9** e o $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, porém o produto obtido não foi purificado após as 12 h de reação e a esse frasco reacional foi adicionado sob agitação à temperatura ambiente 0,0501g (0,2 mmol) de *p*-cloranil. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e após constatação do consumo do material por CCD (12h) o solvente foi removido e o resíduo lavado com hexano: acetato de etila (8: 2). A confirmação da estrutura foi realizada por RMN.

3.3. *Ensaio biológicos*

3.3.1. *Participantes*

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Número do Protocolo: 12898919.8.0000.5404). Os critérios de inclusão foram: voluntários saudáveis do sexo masculino e feminino, com idades entre 25 e 35 anos, que não apresentavam doenças crônicas ou usavam qualquer medicamento por pelo menos 10 dias antes do experimento. Critérios de exclusão: voluntários que declararam alguma doença crônica e / ou uso de algum medicamento pelo menos 10 dias antes do experimento e / ou fumantes e / ou que não assinaram o termo de consentimento. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, e a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008. Os voluntários, que não receberam nenhum medicamento 10 dias antes do experimento, foram recrutados e, aproximadamente, 30 mL de sangue foram coletados para obter plasma rico em plaquetas (PRP) para os ensaios experimentais.

3.3.2. *Preparação de plasma rico em plaquetas*

O sangue foi retirado dos voluntários por flebotomia (agulha 21G \times 1½ ' ') em citrato de sódio 3,8% (9: 1 v / v). Plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação de sangue total a 400 x g por 12 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e o precipitado centrifugado a 800 x g por 12 min para obter o plasma pobre em plaquetas (PPP) usado para calibrar o agregômetro (Honaiser et al., 2021).

3.3.3. *Design experimental*

A agregação plaquetária (200 μ L) foi realizada com um agregômetro óptico (Profler, 8 canais PAP-8 V2.0 óptico. Bio-Data Corporation, Horsham, PA, EUA) a 37 °C usando PRP em cubetas de vidro contendo uma barra de agitação descartável para agitação constante. O PRP foi pré-incubado por 10 min com a taiwanina C (0,003–100 μ M) ou seu veículo DMSO (a concentração final não excedeu 1%). A agregação plaquetária foi realizada em plaquetas estimuladas com ácido araquidônico (AA - 500 μ M) ou receptor de trombina mimético TRAP-6 (25 μ M). Indometacina foi usada como controle positivo na concentração de 10 μ M (Honaiser et al., 2021).

3.4. *Análise Estatística*

Os dados foram analisados usando o software GraphPad PRISM 4.0 (San Diego, CA, EUA). A significância estatística foi calculada usando ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparar os tratamentos. Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Para estudos de agregação, a porcentagem máxima de agregação foi usada para análise de dados; os valores de CI_{50} foram determinados por um modelo de inclinação variável de análise de regressão não linear.

3.5. *Docking molecular*

Estudos de docking molecular dos complexos proteína-taiwanina C, proteína-indometacina e proteína-vorapaxar foram realizados com o software GOLD 5.3 usando algoritmos de busca baseados em teorias originalmente postuladas nos campos da genética natural e evolução biológica (Jones et al., 1995; Jones et al., 1997; Verdonk et al., 2003). Os locais de ligação dos ligantes foram calculados usando o programa Discovery Studio 2021. As estruturas cristalográficas do PDB dos complexos celecoxib-COX-1 (3KK6), rofecoxib-COX-2 (5KIR) e vorapaxar-PAR-1 (3VW7) foram utilizadas para validar as análises. As proteínas COX-1, COX-2 e PAR-1 foram preparadas excluindo moléculas de água e outros ligantes, seguido da adição de hidrogênio polar. A modelagem de homologia para COX-1 (3KK6) foi

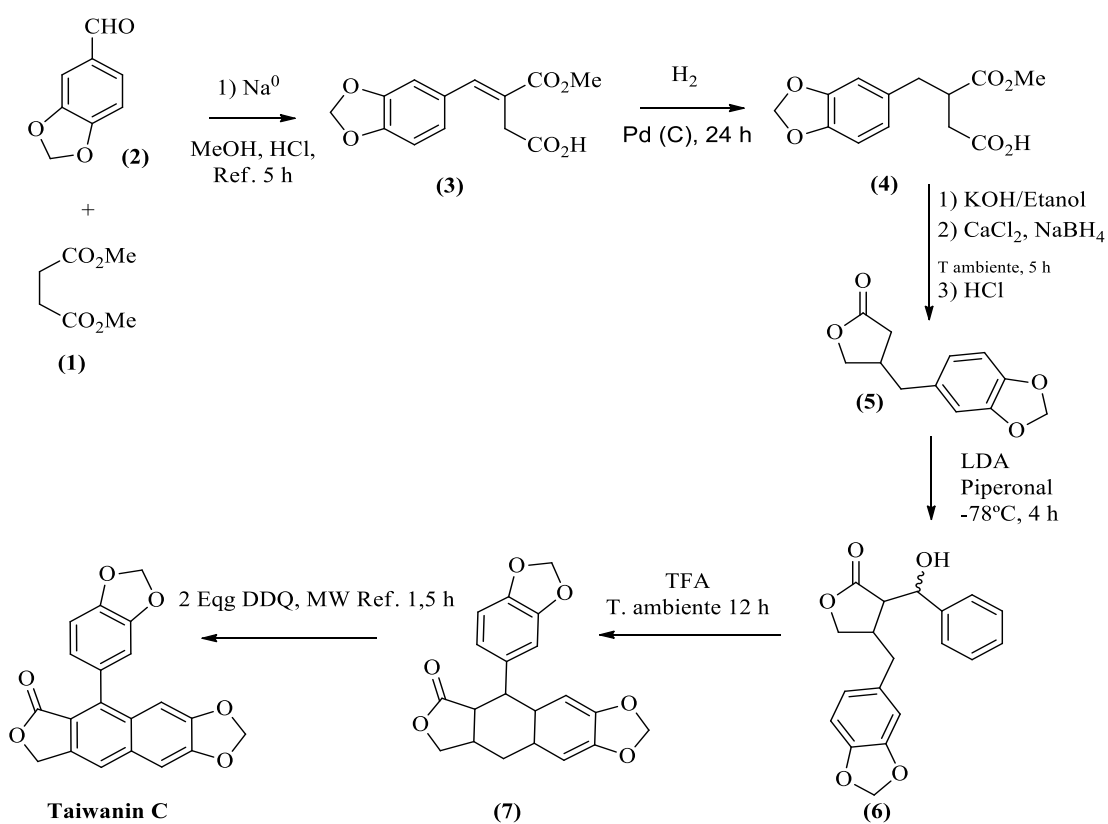
realizada previamente, com o auxílio dos programas MUSCLE e SWISSMODEL, processo que não foi necessário para COX-2 e PAR-1, uma vez que as estruturas cristalográficas dessas duas proteínas são humanas. Os resultados observados para COX-1 (0,74% e 63%, respectivamente) validam o modelo construído. Os cálculos foram realizados pela função de pontuação CHEMPLP, e as matrizes de melhor pontuação foram selecionadas para análise de pose. Os fichários foram preparados no programa Chemdraw e sua carga calculada no Discovery Studio 2021.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sínteses

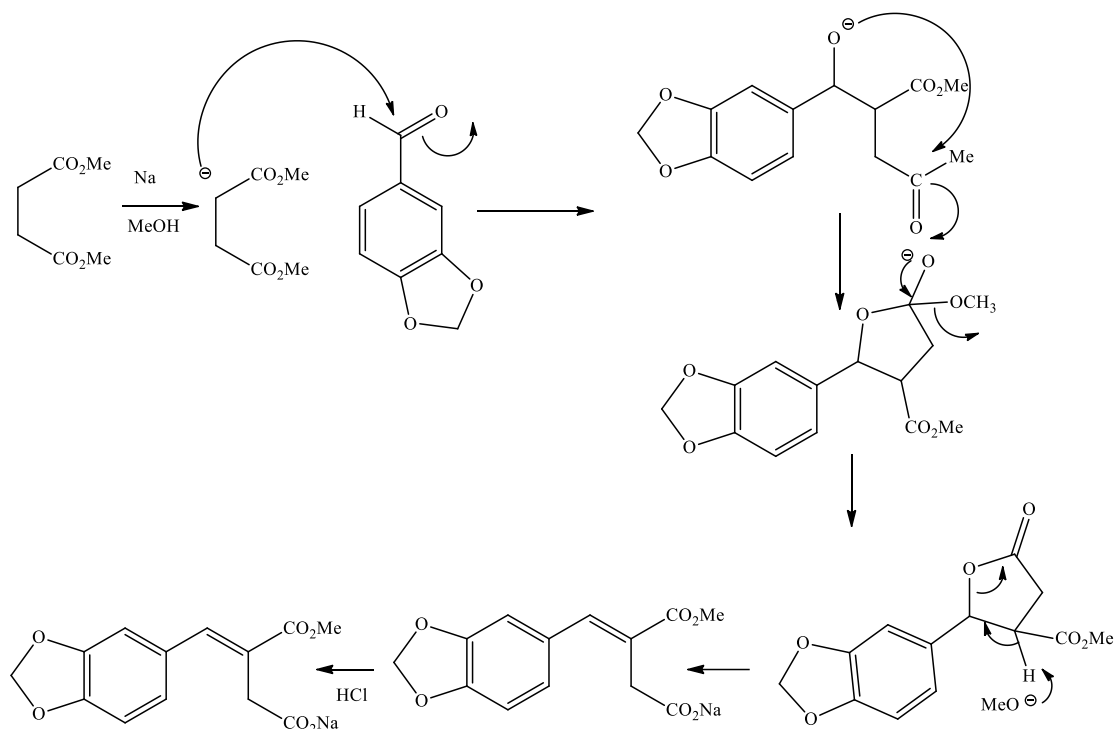
4.1.1. Rota sintética 1

Pela rota sintética 1 (Esquema 5) a taiwanina C foi obtida após 5 etapas sendo a primeira delas a reação de Stobbe entre piperonal (**2**) e succinato de metila (**1**).



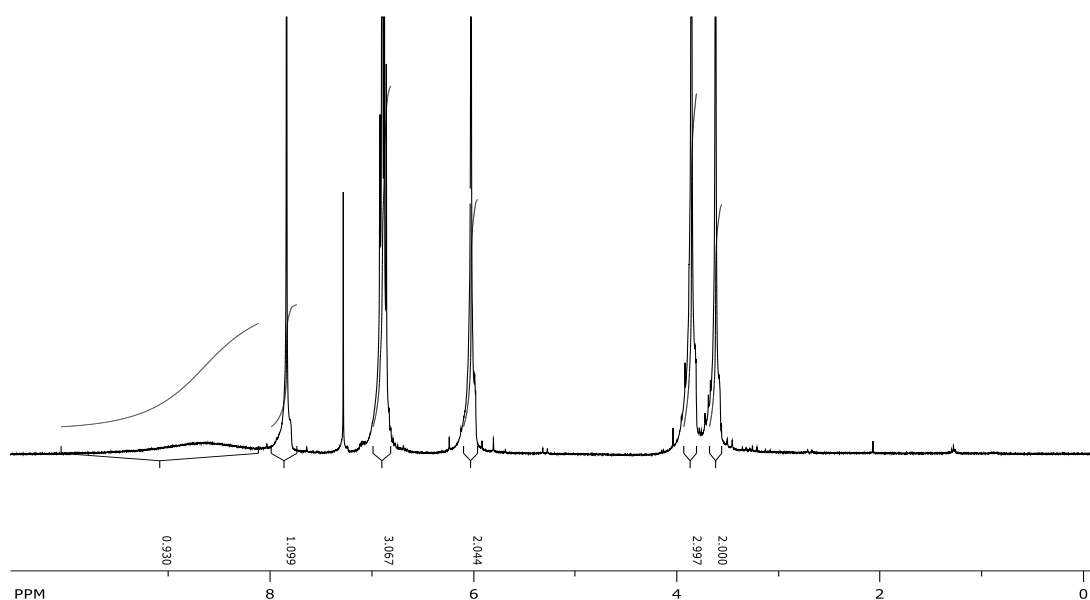
Esquema 5. Obtenção da taiwanina C pela rota sintética 1.

A reação de Stobbe gera um intermediário sintético não isolável que se rearranja para a formação do ácido insaturado **3** que foi obtido em rendimento de 87% (Esquema 5).



Esquema 6. Mecanismo de formação do ácido insaturado 3.

A estrutura do ácido 3 foi confirmada por análises de RMN de ^1H e ^{13}C .



O sinal largo em 8,8 ppm foi atribuído ao próton da hidroxila do grupo carboxila. O singlete em 7,82 ppm corresponde ao próton vinílico e o multiplete no intervalo de 6,93-6,83 ppm corresponde aos prótons aromáticos. O singlete em 6,0 ppm integrando para 2H

corresponde aos prótons do CH₂ do grupo metilenodioxí ligado ao anel aromático. Em 3,68 ppm aparece o singlete relativo aos 3H do grupo CH₃ do grupo éster. O sinal em campo mais alto foi atribuído aos prótons do grupo CH₂ vizinho à carboxila. No espectro de ¹³C os sinais em campo mais baixo são os da carbonila da carboxila em 176,4 ppm e da carbonila do grupo éster 168,1 ppm. O sinal em 148,5 ppm corresponde aos carbonos quaternários do anel aromático ligados aos oxigênios do grupo metilenodioxí. O sinal em 142,4 ppm corresponde CH da ligação dupla e em 123,6 ppm ao carbono quaternário da ligação dupla. Os sinais no intervalo de 124 a 101,4 ppm corresponde aos prótons do anel aromático. O sinal em 96,1 ppm corresponde ao carbono do CH₂ do grupo metilenodioxí e aparece invertido no DEPT-135, assim como o sinal em 33,6 ppm, que corresponde ao carbono do CH₂ vizinho à carboxila. O sinal em 52,4 ppm corresponde ao carbono do grupo CH₃ do éster.

Após identificação o ácido **3** foi hidrogenado e forneceu o ácido saturado **4** em rendimento de 92%. A identificação estrutural de **4** foi feita com base nos espectros de RMN de ¹H pelo aparecimento dos sinais relativos aos prótons do grupo CH₂ e do CH gerados pela adição de hidrogênio à ligação dupla. O sinal dos prótons dos dois grupos grupo CH₂ aparecem duplos dupletos em 2,97ppm, 2,70 ppm, 2,67 ppm e 2,45 ppm, enquanto o sinal relativo ao próton ligado ao carbono (CH) vizinho à carbonila do éster aparece como um multipletto em 3,08-3,01 ppm. Os espectros de carbono confirmam a estrutura pelo surgimento de um sinal invertido no DEPT 135 equivalente ao CH₂ benzílico e ausência dos sinais relativos a carbonos de ligação dupla.

O ácido **4** então em reação com KOH/ etanol fornece o respectivo sal que tem a carbonila do éster reduzido a álcool pela reação com Ca (BH₄)₂ (gerado *in situ*). A etapa seguinte de acidificação com HCl, para formação do anel butirolactônico, foi repetida várias vezes até se chegar as melhores condições. Após todas as etapas de reação a lactona **5** foi obtida em rendimento de 70%. Essa é uma reação bastante sensível à qualidade dos reagentes e ao tempo reacional. Os solventes e reagentes devem estar extremamente secos e deve ser feita sob atmosfera de N₂. O espectro de RMN de ¹H da lactona **5** mostra os sinais dos prótons aromáticos H5' como um dupletto em 6,75 ppm com *Jorto* de 7,8 Hz, H2' em 6,65 ppm como um dupletto com *J meta* de 1,3 Hz e H6' como um duplo dupletto em 6,60 ppm com *J* de 7,8 Hz e 1,3 Hz. O singlete em 6,00 ppm corresponde aos H10' do grupo metilenodioxí. O duplo dupletto em 4,35 ppm corresponde ao H9'a e o outro duplo dupletto em 4,05 ppm ao H9'b. O multipletto em 2,8 ppm corresponde a H8' acoplado com H7', H9' e H8. O dupletto em 2,71 ppm pertence ao

H8a e o outro em 2,69 ppm ao H8b'. Os H7'a e H7'b acoplam entre si e também com H8' originando duplos dupletos que aparecem em 2,60 ppm e 2,25 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C confirma a estrutura pela presença apenas da carbonila da lactona em 177,4 ppm, o sinal em 72,9 ppm alternado no DEPT 135 indicando CH_2 a associação desses dados de RMN confirma a estrutura de **5** (Anexo B).

O enolato da lactona **5**, gerado pela reação com LDA, após reação com piperonal forneceu a mistura de diastereoisômeros **6** em rendimento de 89%. Os diastereoisômeros **6** foram separados por recristalização em metanol, apenas para facilitar a caracterização por RMN, sendo um deles um sólido e outro um óleo viscoso, A caracterização por RMN foi feita com isômero sólido (Anexo B). A reação de condensação do anel lactônico de **5** com a carbonila do piperonal dá origem ao carbono carbinólico **7**. No espectro de RMN de ^1H é possível verificar a presença do próton ligado a esse carbono pelo duplete em 5,20 ppm que surge do acoplamento de H7 com H8 com um J de 3,0 Hz que demonstra uma configuração cis entre esses prótons. A presença de C7 foi também confirmada no espectro de RMN de ^{13}C em 72,3 ppm. A presença do segundo anel aromático também foi confirmada tanto nos espectros de RMN de ^1H quanto de ^{13}C (Anexo B, Figuras 29-33). Na etapa seguinte para ciclização os dois diastereoisômeros foram utilizados, visto que a estereoquímica não afeta de forma significativa essa reação. Desta forma, a mistura de diastereoisômeros **6** após reação com TFA forneceu a lignana ariltetralínica **7** em 90% de rendimento. A estrutura de **7** foi determinada com base nos principais sinais dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Nessa reação o C6' ataca o carbono carbinólico **7** (protonação com TFA) com a saída de água e fechamento do anel de 6 membros. No espectro de RMN de ^1H é possível ver a diferença de deslocamento do duplete de H7 no material de partida de 5,20 ppm para 4,04 ppm indicando a saída do grupo OH. É possível verificar que a estereoquímica de H7 em relação a H8 no produto **7** é agora trans devido ao valor de J de 11 Hz. Os demais sinais nos espectros sofreram leves alterações de deslocamento (Anexo B, Figuras 34-36).

O composto **7** foi então oxidado com 4 equivalentes de DDQ para produzir a taiwanina C em rendimento de 90%. Através desta rota sintética a taiwanina C foi obtida em rendimento global de 40,4%. O espectro de RMN de ^1H mostra um espectro bem mais simples do que o do material de partida **7**, apresentando apenas os sinais relativos a prótons aromáticos, os singletos dos CH_2 dos grupos metilenodioxí e o singlete referente ao CH_2 do anel lactônico, o que indica que a reação com DDQ promoveu a aromatização do anel de 6 membros. No espectro de próton (Figuras 13-15) é possível observar singletos em 7,94 ppm e 7,53 ppm correspondendo

respectivamente aos H8' e H5', em 7,04 o duplete com J de 7,9 Hz corresponde ao H5 em acoplamento com H6. Em 6,89 ppm o singlete corresponde ao H2' e o duplete em 6,88 ppm ao H2 em acoplamento com H6. O duplo duplete em 6,75 ppm foi atribuído ao H6 em acoplamento com H5 e H2, respectivamente com J de 7,9 Hz e 1,6 Hz. Na sequência no intervalo de 6,19 - 6,11 ppm aparecem uma serie de 4 singletos largos referentes ao H10a, H10b, H10'a e H10'b. O singlete em 5,43 ppm é referente os prótons do grupo CH₂ do anel lactônico.

Figura 13. Espectro de RMN de ¹H da **taiwnina C** em DMSO-d₆

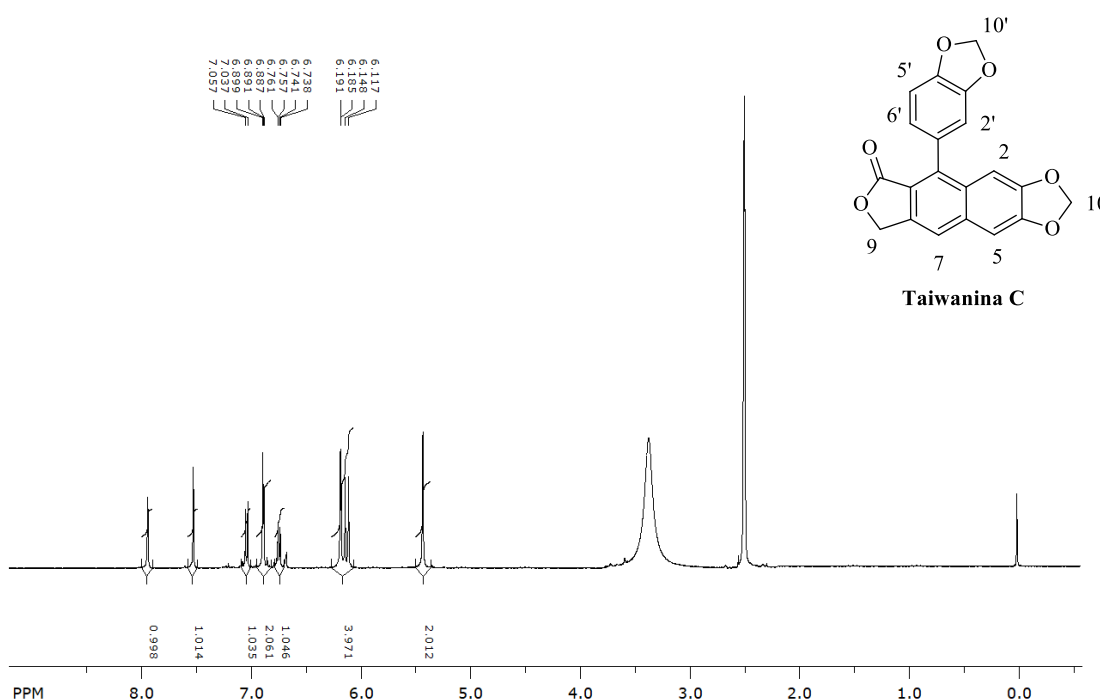


Figura 14. Ampliação do espectro RMN de ^1H da **taiwanina C** no intervalo de 8 a 6 ppm dos sinais referentes aos H dos grupos metilenodioxi

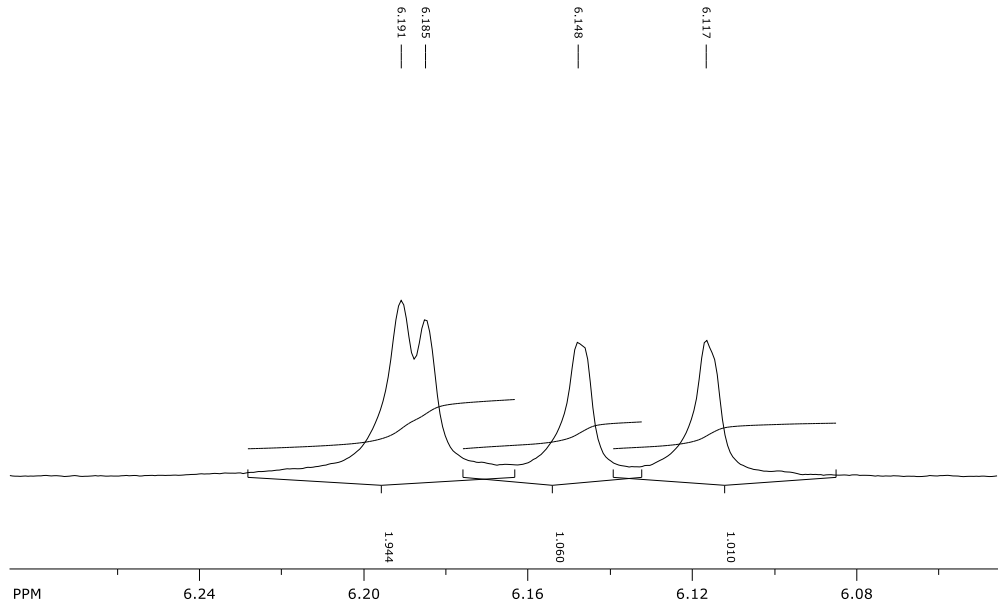
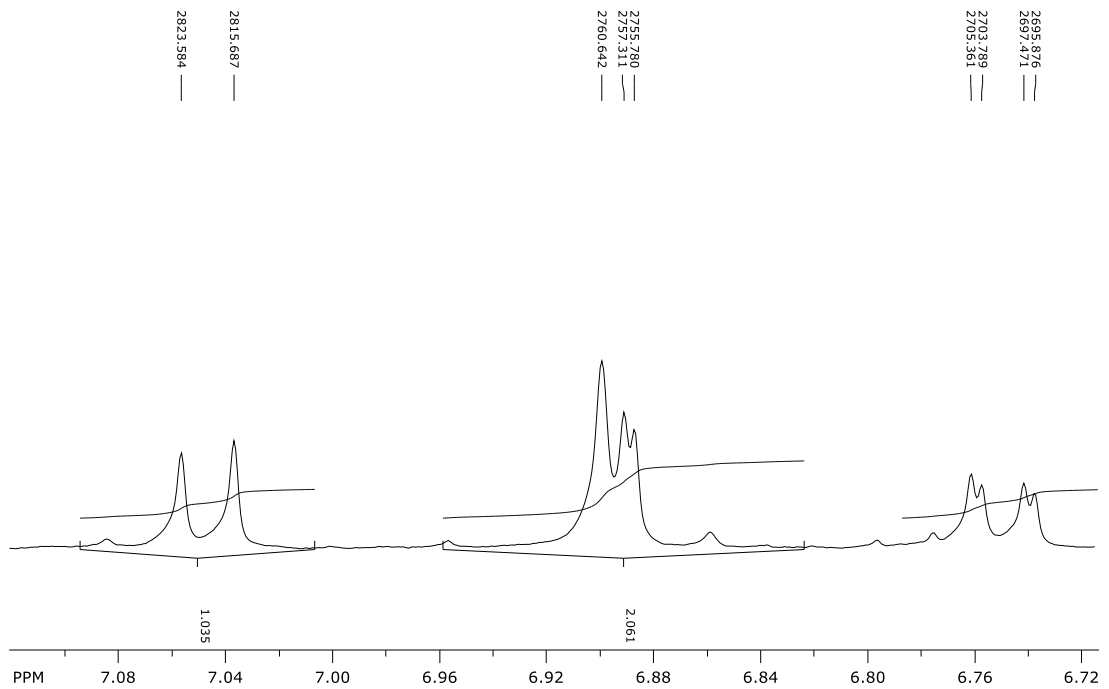


Figura 15. Ampliação do espectro RMN de ^1H da **taiwanina C** no intervalo de 8 a 6 ppm dos sinais referentes aos H aromáticos



Os sinais do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16) assim como no espectro de RMN de ^1H confirmam a estrutura da taiwanina C. Os principais sinais no espectro de ^{13}C são aqueles referentes à carbonila da lactona em 169,2 ppm, os sinais no intervalo de 149,57 a 146,9 ppm que correspondem a C3, C3', C4 e C4', os sinais em 101,1 ppm e 102,0 ppm, são referentes aos C10 e C10' e o sinal em 67,9 ppm referente ao C9. Os sinais no DEPT-135 (Figura 17) ajudam a confirmar a estrutura da taiwanina C, onde os sinais que apareciam no espectro de ^{13}C no intervalo de 140 ppm a 129 ppm não aparecem, portanto, são dos carbonos quaternários (C7', C8', C8, C1, C1', C6). Os sinais no intervalo de 110 ppm a 104 ppm são de C-H (C5', C6', C2', C5 e C2), os sinais em 102,2 ppm e 101,6 ppm são de CH_2 (C10 e C10') e o sinal em 68,3 ppm também de CH_2 (C9).

Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C da taiwanina C em DMSO- d_6

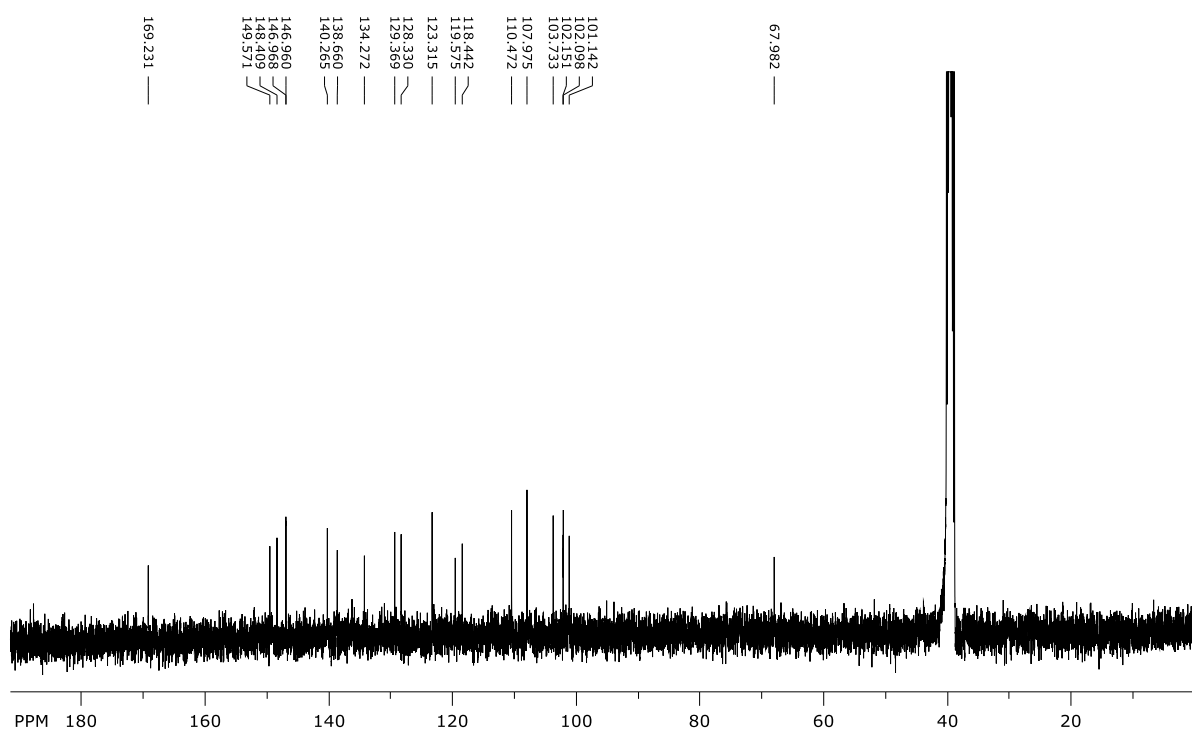
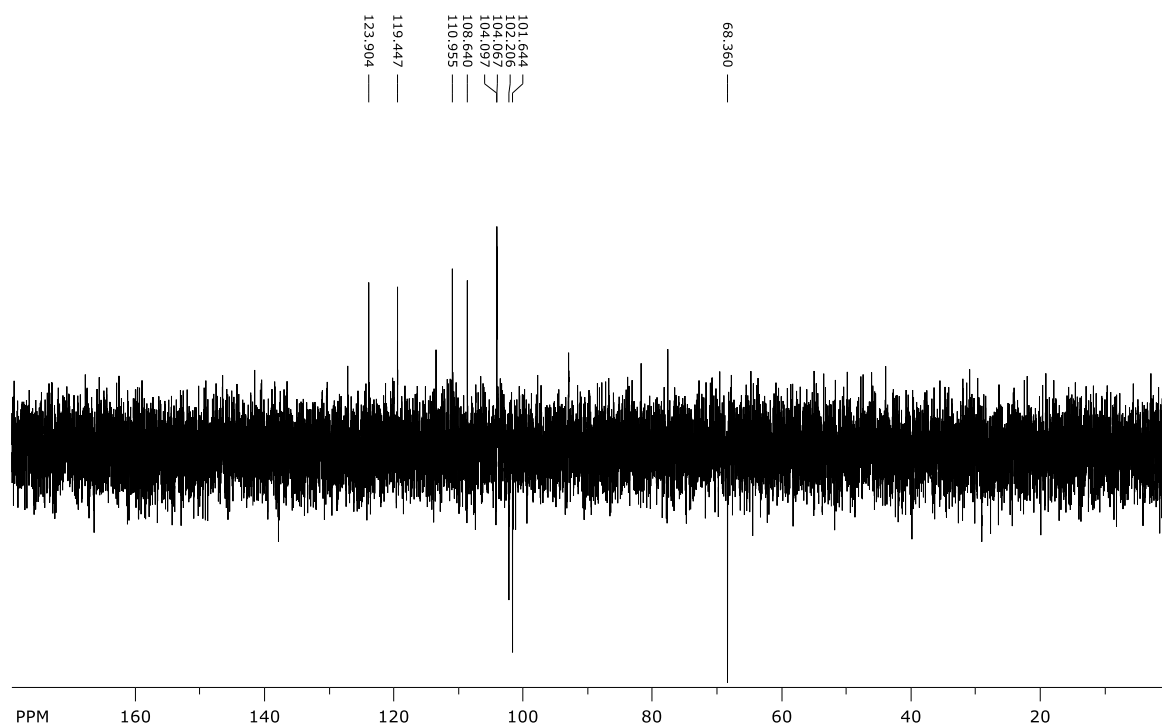


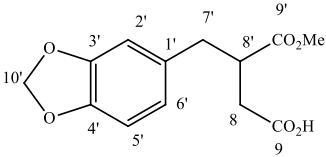
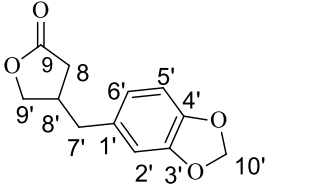
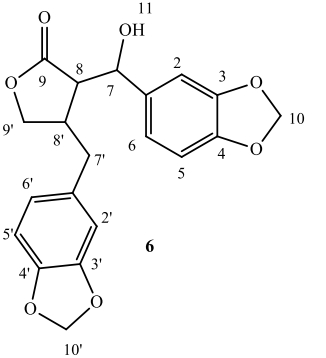
Figura 17. DEPT-135 da *taiwanina C* em DMSO-d6

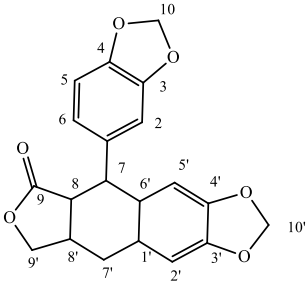
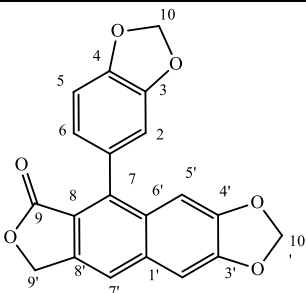


Os dados de RMN dos compostos obtidos são apresentados na Tabela 2 e os espectros no Anexo B.

Tabela 2. Dados de caracterização por RMN e rendimento (%) dos compostos obtidos pela *rota sintética 1*

Compostos	^1H RMN (400 MHz) δ , J (Hz)	^{13}C RMN (100 MHz) δ	(%)
<p style="text-align: center;">3</p>	(CDCl ₃): δ 8,8 (sl, O-H) 7,82 (s, H7'); 6,93-6,83 (m, H2', H5', H6'); 6,0 (s, 2H10'); 3,68 (s, 3H (CH3)); 3,59 (s, H8).	(CDCl ₃): δ 176,4 (C9); 168,1 (C9'); 148,5 (C3'); 148,5 (C4'); 142,4 (C7'); 128,5 (C8'); 124,0 (C1'); 123,6 (C6'); 109,1 (C2'); 108,6 (C5'); 101,4 (C10'); 52,4 (O-CH3); 33,6 (C8)	87

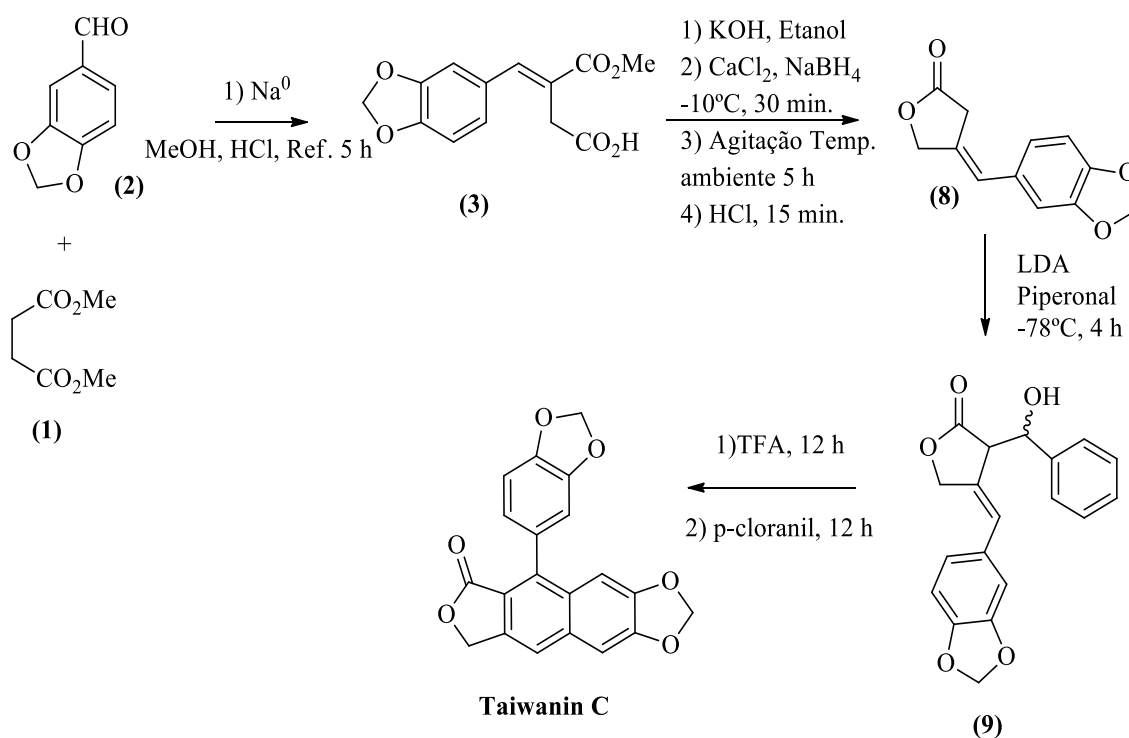
 <p style="text-align: center;">4</p>	<p>(CDCl₃): δ 6,72 (d, H5'; J=7,8); 6,64 (d, H2'; J=1,6); 6,59 (dd, H6'; J=7,8; J=1,6); 5,93 (s, H10'); 3,68 (s, 3H -CH₃); 3,01-3,08 (m, H8'); 2,97 (dd, H7'a; J=13,0; J=6,0); 2,70 (dd, H7'b; J=13,0; J=9,0); 2,67 (dd, H8a; J=17,0; J=9,0); 2,45 (dd, H8b; J=17,0; J=5,0).</p>	<p>(CDCl₃): δ 177,4 (C9'); 174,4 (C9); 147,8 (C3'); 146,4 (C4'); 131,6 (C1'); 122,0 (C6'); 109,2 (C2'); 108,3 (C5'); 100,9 (C10'); 52,0 (OCH₃); 42,9 (C8'); 37,3 (C7'); 34,5 (C8')</p>	92
 <p style="text-align: center;">5</p>	<p>(CDCl₃): δ 6,75 (d, H5'; J=7,8); 6,65 (d, H2', J=1,3); 6,60 (dd, H6'; J=7,8; e 1,3); 6,00 (s, H10'); 4,35 (dd, H9a'; J=9,1; J=6,8); 4,05 (dd, H9'b; J=9,1; J=6,1); 2,8 (m, H8'); 2,71 (d, H8a, J=4,3); 2,69 (d, H8b', J=2,7); 2,60 (dd, H7'a; J=17,4; J=8,1); 2,25 (dd, H7'b; J=17,4; J=7,1).</p>	<p>(CDCl₃): δ 177,4 (C9); 148,3 (C3'); 146,8 (C4'); 132,3 (C1'); 122,0 (C6'); 109,3 (C2'); 108,8 (C5'); 101,4 (C10'); 72,9 (C9); 38,9 (C7'); 37,7 (C8); 34,5 (C8')</p>	70
 <p style="text-align: center;">6</p>	<p>(CDCl₃): δ 6,65 (s, 3H (H2', H5' H6')); 6,55 (d, H5, J=7,8); 6,28 (dd, H6, J=1,7; J=7,8); 6,24 (d, H2, J=1,7); 5,90 (d, H10a, J=1,5 Hz); 5,89 (d, H10b, J=1,5); 5,85 (d, H10'a, J=1,5); 5,83 (d, H10'b, J=1,5); 5,20 (d,</p>	<p>(CDCl₃): δ 178,5 (C9); 148,3 (C3); 148,1 (C3'); 147,4 (C4); 146,6 (C4'); 135,3 (C1); 131,9 (C1'); 121,9 (C6 e C6'); 109,1 (C2 e C2'); 108,5 (C5 e C5'); 101,6 (C10); 101,4</p>	89

	H7, J= 3,0), 4,26 (dd, H9'a, J = 8,8; J = 7,8), 3,88 (dd, H9'b, J = 8,8; J = 5,8); 2,72 (m, H8'); 2,51 (dd, H8, J = 6,3; J = 3,0); 2,36 (dd, H7'a, J = 13,9; J = 8,1); 2,22 (dd, H7'b, J = 13,9; J = 7,8), 1,70-1,30 (sl, H-O).	(C10'); 73,1 (C9'); 72,3 (C7); 53,1 (C8); 39,8 (C8'); 36,8 (C7').	
 <p style="text-align: center;">7</p>	(CDCl ₃): δ 6,78 (sl, 2H); 6,58 (sl, 2H); 6,32 (sl, 1H); 5,96-5,91 (m, 2H); 5,89-5,66 (m, 2H); 4,51 (dd, 1H, J = 6,5 e 8,5); 4,04 (dl, 1H, J = 11,0); 3,97 (1H, dd, J = 8,5 e 10,5); 3,00-2,84 (m, 2H), 2,66-2,53 (m, 1H); 2,48 (dd, 1H, J = 11,0 e 13,5).	(CDCl ₃): δ 174,5 (C9); 146,8 (C3 e C3'); 145,7 (C4); 145,5 (C4'); 135,9 (C1); 131,7 (C6'); 126,8 (C1'); 122,1 (C6); 109,0 (C2); 108,1 (C5); 107,5 (C5'); 107,2 (C2'); 100,1 (C10); 100,0 (C10'); 70,0 (C9'); 46,8 (C7); 45,1 (C8); 39,0 (C8'); 32,5 (C7).	90
 <p style="text-align: center;">Taiwanina C</p>	(DMSO d ₆): δ 7,94 (s, H8'); 7,53 (s, H5'); 7,04 (d, H5, J = 7,9); 6,89 (s, H2'); 6,88 (d, H2, J = 1,6); 6,75 (dd, H6, J = 7,9 e 1,6); 6,19 (sl, H10a); 6,18 (sl, H10b); 6,14 (sl, H10'a); 6,11 (sl, H10'b); 5,43 (s, 2H9').	(DMSO d ₆): δ 169,2 (C9); 149,5 (C3 e C3'); 148,4 (C4); 146,9 (C4'); 140,2 (C1'); 138,6 (C7); 134,2 (C6'); 129,3 (C1); 128,3 (C8'); 123,3 (C8); 119,5 (C6); 118,4 (C7'); 110,4 (C2); 107,5	90

	Análise elementar: calculado para C ₂₀ H ₁₂ O ₆ : C, 68,97; H, 3,47; O, 27,56. Encontrado: C, 68,78 H, 3,56; O, 27,66.	(C5); 103,7 (C5'); 102,1 (C2'); 102,0 (C10); 101,1 (C10'); 67,9 (C9').	
--	---	---	--

4.1.2. Rota sintética 2

Na rota sintética 2 (Esquema 7), o ácido **3** foi submetido a redução com Ca(BH₄)₂ gerado *in situ* para a obtenção da lactona insaturada **8** em 84% de rendimento (determinado por CG-MS). A obtenção da lactona **8** é o passo chave no desenvolvimento dessa rota sintética, onde a localização da ligação dupla (exocíclica) é estratégica e, portanto, não pode isomerizar para dentro do anel lactônico.

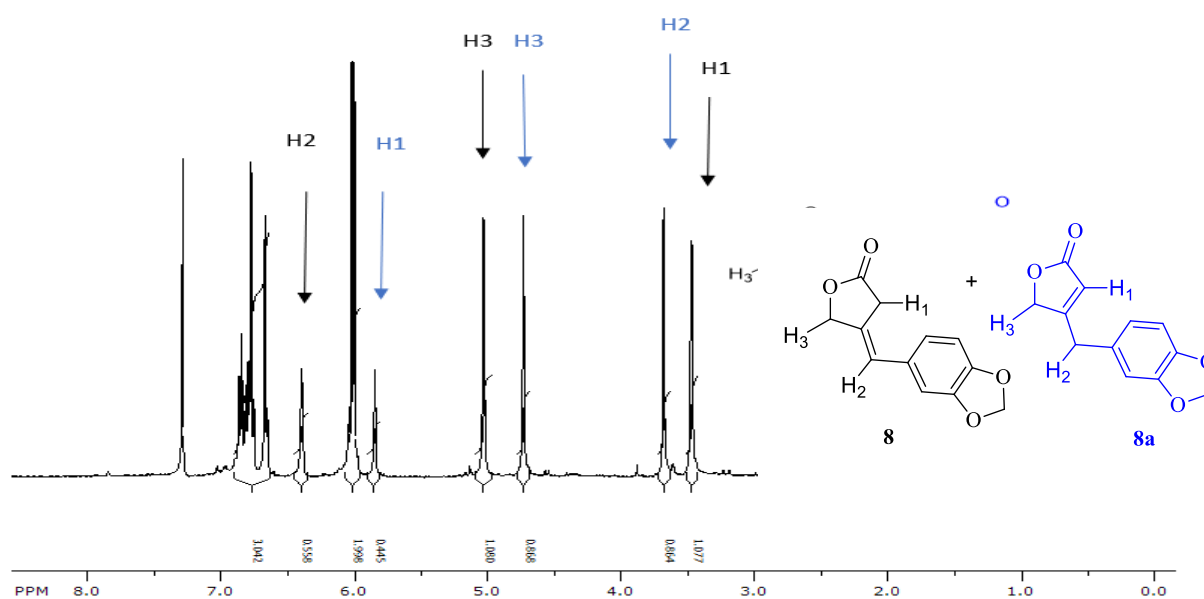


Esquema 7. Obtenção do taiwanina C pela rota sintética 2.

Várias tentativas de purificar essa lactona foram realizadas, porém o uso da cromatografia em coluna usando sílica gel ou alumina favorece a conversão da ligação dupla exocíclica em endocíclica com a obtenção da mistura de isômeros (Figura 18).

A isomerização da ligação dupla compromete a formação do enolato para a etapa posterior, por isso a lactona **8** foi utilizada na etapa seguinte sem purificação. A purificação em sílica gel foi realizada apenas para a caracterização. No espectro de RMN de ^1H (Figura 18) é possível verificar a presença de pares de sinais que são relativos aos isômeros **8** e **8a**. O multiplete em 6,86-6,67 ppm corresponde aos prótons aromáticos. O singlete em 6,39 ppm corresponde ao H2 e o singlete em 6,02 ppm aos prótons do grupo metilenodioxi do isômero **8**. O duplete em 5,03 corresponde ao H3 e o duplete em 3,47 ppm ao H1 ambos do isômero **8**.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da lactona **8** em mistura com o isômero **8a** após purificação



A comparação entre as integrais dos sinais dos prótons do isômero **8** em relação aos sinais do isômero **8a** mostram que eles estão na proporção de 1:1. Porém essa proporção só é obtida quando, como já mencionado, ocorre purificação por cromatografia em coluna de sílica gel. Quando a reação para a obtenção de **8** termina é possível observar apenas um produto na CCD, enquanto após coluna de sílica gel são observados os dois isômeros com Rfs próximos.

Seguindo a rota 2, a reação de **8** com LDA forneceu o enolato correspondente que reagiu então com piperonal produzindo o composto **9** em rendimento de 82% (determinado por CG-

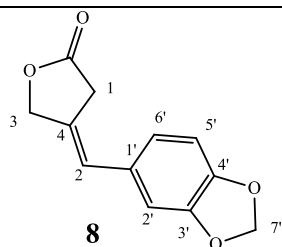
MS) como uma mistura diastereoisomérica. A mistura de diastereoisômeros **9** em reação com TFA e *p*-cloranil forneceu a taiwanina C em rendimento de 87%. Nesta reação ocorre inicialmente a formação de um intermediário cíclico insaturado **10**, pela reação com TFA, que pode ser observado por CCD. Este intermediário em seguida sofre oxidação pela perda do hidrogênio benzílico promovida pelo *p*-cloranil com consequente aromatização produzindo a taiwanina C.

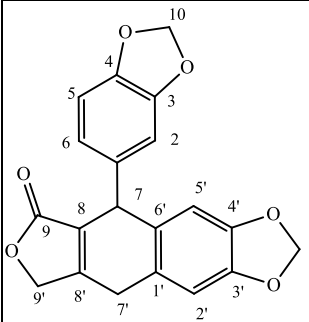
O intermediário **10** foi isolado por cromatografia em coluna de sílica gel somente para confirmação da estrutura, mas o uso da sílica pode ser responsável pela obtenção do composto cíclico com a ligação dupla endocíclica como observado nos espectros, ou seja, houve isomerização, porém, essa isomerização não afetaria a obtenção da taiwanina C a partir de **10**.

A taiwanina C sintetizada através da sintética 2 foi obtida em rendimento global de 52,1% considerando todas as etapas descritas no esquema 7.

Os compostos purificados obtidos via rota sintética 2 tiveram as estruturas confirmadas por análises de RMN (Tabela 3). Os espectros de RMN dos compostos sintetizados são apresentados no Anexo C. Os dados de caracterização dos composto 3 e da taiwanina C já foram apresentados na tabela 2.

Tabela 3. Dados de caracterização por RMN e rendimento (%) dos compostos obtidos pela *rota sintética 2*

Compostos	¹ H RMN δ (CDCl ₃), J (Hz)	¹³ C RMN δ (CDCl ₃)	Rendimento (%)
	(400 MHz, CDCl ₃) δ 6,86-6,67 (m, 3H); 6,39 (s, H2); 6,02 (s, H7'); 5,03 (d, H3, J=1,5 Hz); 3,47 (d, H1, J=1,5 Hz).	(100 MHz, CDCl ₃) δ 175,3 (C=O); 148,0 (C3'); 147,2 (C4'); 129,8 (C4); 127,8 (C1'); 123,8 (C2'); 116,6 (C6'); 109,0 (C2'); 108,6 (C5'); 101,3 (C7'); 73,3 (C3); 35,0 (C1).	82

 <p style="text-align: center;">10</p>	<p>(500 MHz, CDCl₃) δ 6,76 - 6,68 (m, H2, H5 e H6); 6,59 (s, H2'); 6,52 (s, H5'); 5,94 (s, H10a); 5,91 (s, H10b); 5,89 (s, H10'b); 5,88 (s, H10'a); 4,89 (d, H9'a, J = 17); 4,82 (d, H9'b, J = 17); 4,77 (sl, H7); 3,87 (dd, H7'a, J = 4,2 e 22); 3,66 (dd, H7'b, J = 4,2 e 22)</p>	<p>(125 MHz, CDCl₃): δ 172,0 (C9); 157,0 (C8'); 147,8 (C3); 147,2 (C3'); 146,9 (C4); 146,5 (C4'); 136,6 (C1); 130,0 (C1'); 128,0 (C8); 123,3 (C6); 121,7 (C6); 109,4 (C2'); 108,4 (C2); 108,2 (C5'); 107,72 (C5); 101,2 (C10); 100,9 (C10'); 70,9 (C9'); 42,2 (C7); 29,1 (C7').</p>	<p>Intermediário não isolado durante a reação</p>
--	--	--	---

Comparando-se as duas rotas propostas, a rota 2 é mais interessante, pois além de apresentar menor número de etapas, as reações são mais limpas, o que torna desnecessária a purificação de alguns intermediários.

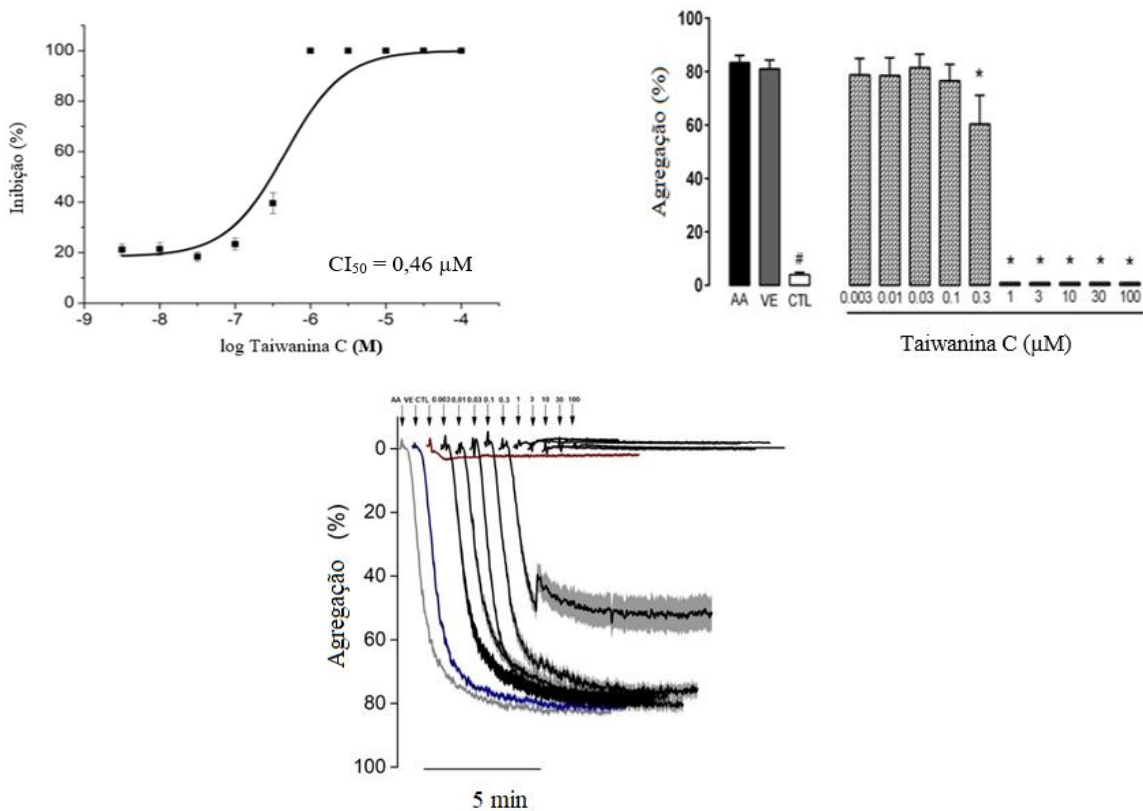
Os resultados obtidos mostram que ambas as rotas desenvolvidas no trabalho são superiores àquelas descritas na literatura por envolverem um menor número de etapas, uso de reagentes mais acessíveis tanto em relação às fontes de obtenção (comerciais) quanto ao custo, além de reações mais limpas o que permite etapas de purificação mais simples.

As duas rotas sintética podem ser aplicadas à obtenção da taiwanina C em substituição ao processo de extração, pois para a obtenção de 100 mg de taiwanina C por extração seria necessário cerca de 1Kg de madeira (parte mais interna do tronco) o que corresponderia a 0,01% de rendimento e o corte da planta. Desta forma, a síntese traz a vantagem de maior rendimento e menos trabalho devido ao longo processo de extração, além disso ainda contribui para a preservação da espécie.

4.2. Ensaios biológicos

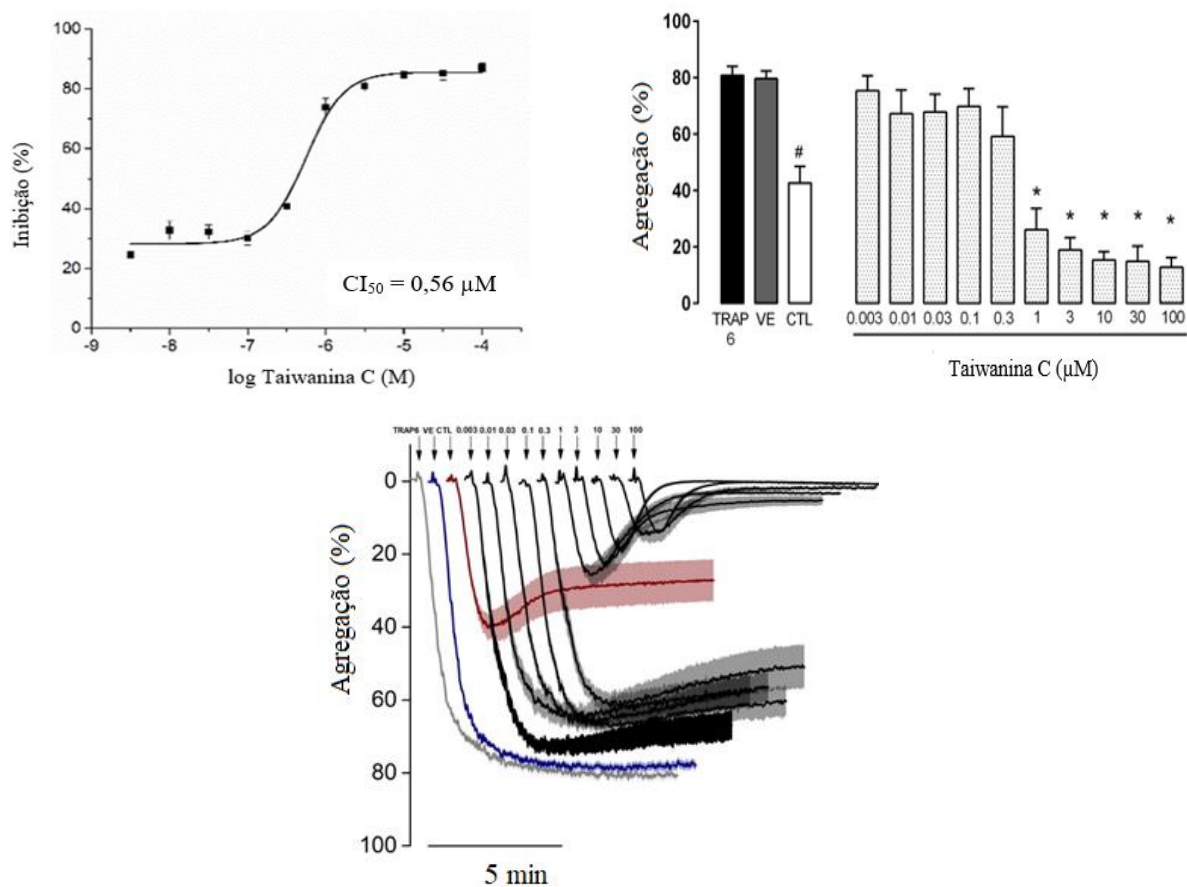
Para investigar o papel da taiwanina C na agregação plaquetária *in vitro*, examinamos a ativação plaquetária induzida pelo agonista ácido araquidônico que atua diretamente na via da ciclooxigenase 1 nas plaquetas. Na presença somente do AA ou DMSO ocorreu 90 % de agregação plaquetária, assim como quando as plaquetas foram expostas à taiwanina C em concentrações de 0,03 - 0,1 μM , porém quando a concentração é aumentada para 0,3 μM começa a haver inibição significativa em comparação com o controle DMSO ($p < 0,05$). A partir de 1 μM a inibição da agregação chega a ser de 100 %, ou seja, a taiwanina C impede a agregação plaquetária de maneira dose-dependente com um CI_{50} de 0,46 μM após a exposição de PRP humano ao AA (Figura 19).

Figura 19. Efeito inibidor da taiwanina C na agregação plaquetária humana *in vitro*. As plaquetas foram incubadas com taiwanina C (0,003 - 100 μM) por 10 min, seguida de ativação com AA 500 μM . Os dados representam os valores médios \pm SEM; N = 5–7 indivíduos. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo AA; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo veículo. AA: ácido araquidônico, VE: veículo (DMSO 1%), CTL: indometacina na concentração de 10 μM



Este estudo, também foi realizado com o agonista TRAP-6, receptor de trombina, para investigar se a inibição observada seria apenas via COX-1 ou através da via da PAR-1. O TRAP-6 age como um agonista do receptor PAR-1 induzindo a agregação plaquetária. A Figura 20 mostra as curvas representativas da agregação plaquetária em resposta ao TRAP-6 na presença da taiwanina C. Similarmente ao AA, a taiwanina C inibiu substancialmente a agregação plaquetária induzida por TRAP-6 com CI_{50} de $0,56 \mu\text{M}$. A agregação plaquetária foi atenuada significativamente pela taiwanina C a partir de $1 \mu\text{M}$ e na concentração de $10 \mu\text{M}$ o valor da inibição foi de $84,7 \pm 7,4\%$, enquanto o fármaco de referência, indometacina, apresentou $57\% \pm 7,0$ de inibição da agregação plaquetária na mesma concentração.

Figura 20. Efeito inibidor da taiwanina C na agregação plaquetária humana *in vitro*. As plaquetas foram incubadas com taiwanina C ($0,003 - 100 \mu\text{M}$) por 10 min, seguido pela ativação com TRAP-6 ($25 \mu\text{M}$). Os dados representam os valores médios \pm SEM; $N = 5-7$ indivíduos. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo TRAP-6; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo veículo. VE: Veículo (DMSO 1%), CTL: indometacina na concentração de $10 \mu\text{M}$



Nos ensaios biológicos os resultados demonstram que a taiwanina C é um composto bioativo que exibe atividade antiplaquetária na presença dos agonistas AA e TRAP-6. A taiwanina C, como previamente demonstrado, foi capaz de inibir a atividade da COX-1, uma enzima chave no metabolismo do AA, resultando na diminuição da produção de tromboxano nas respostas plaquetárias (Lee et al., 2005).

Além de inibir a agregação plaquetária via COX-1, nossos estudos com o TRAP-6 sugerem que a atividade antiplaquetária da taiwanina C pode ser mediada pela inibição de duas das principais vias de ativação plaquetária. Comparando a os valores de CI_{50} da taiwanina C na inibição da agregação plaquetária, na presença de AA e TRAP-6, respectivamente $0,46 \mu\text{M}$ e $0,56 \mu\text{M}$, é possível observar que a via de ativação da COX-1 é mais sensível ao efeito da taiwanina C do que a ativação pela via PAR-1, o que corrobora estudos anteriores que mostram os efeitos da taiwanina C na inibição da COX (Lee et al., 2005; Ban et al., 2002). No entanto, até o momento, nenhum estudo demonstrou os efeitos antiplaquetários da taiwanina C nas plaquetas humanas nem através das COXs ou da PAR-1, ou seja, nosso estudo é o primeiro a relatar essa atividade.

Entretanto, alguns estudos foram feitos com a taiwanina E onde foram observados efeitos inibidores significativos na agregação de plaquetas induzida por PAF em coelho e principalmente contra a agregação induzida por AA. (Chen et al., 1996), porém a diferença entre a taiwanina C e a E é que na taiwanina E existe um grupo OH ligado ao carbono 7 que pode alterar o mecanismo de ação deste composto em relação ao da taiwanina C.

Os resultados são muito promissores visto que a taiwanina C atua sobre duas vias da ativação plaquetária enquanto a maioria dos fármacos antiplaquetários atuam em apenas uma delas e que em vários tratamentos inclusive com vorapaxar existe a indicação do uso associado ao ácido acetilsalicílico (inibidor da COX-1) (Van der Meijden & Heemskerk, 2019).

Os mecanismos de ação foram estudados por docking molecular utilizando as proteínas COX-1, COX-2 e PAR-1 envolvidas nas vias de ativação plaquetária estudadas *in vitro*.

4.3. Docking molecular

A precisão dos programas de docking em relação à geração precisa das poses de ligação foi validada por redocking, (Renner et al., 2008), onde um valor de “root mean square deviation” (RMSD) de $2,0\text{\AA}$ foi estabelecido como o limite (Kagami et al., 2017).

Os valores obtidos para COX-1 (3KK6), COX-2 (5KIR) e PAR-1 (3VW7) foram, respectivamente, 0,98, 0,70 e 0,42. Para a análise dos resultados, foram escolhidas as poses com os melhores escores de docking molecular para taiwanina C-COX-1, taiwanina C-COX-2 e taiwanina C-PAR-1, com valores, respectivamente, de 42,14, 55,03 e 132,27. As melhores posturas em relação à indometacina com COX-1, COX-2 e PAR-1 apresentaram, respectivamente, os escores de 69,1, 69,00 e 80,79.

4.3.1. Interações de ligação da taiwanina C e indometacina com a COX-1

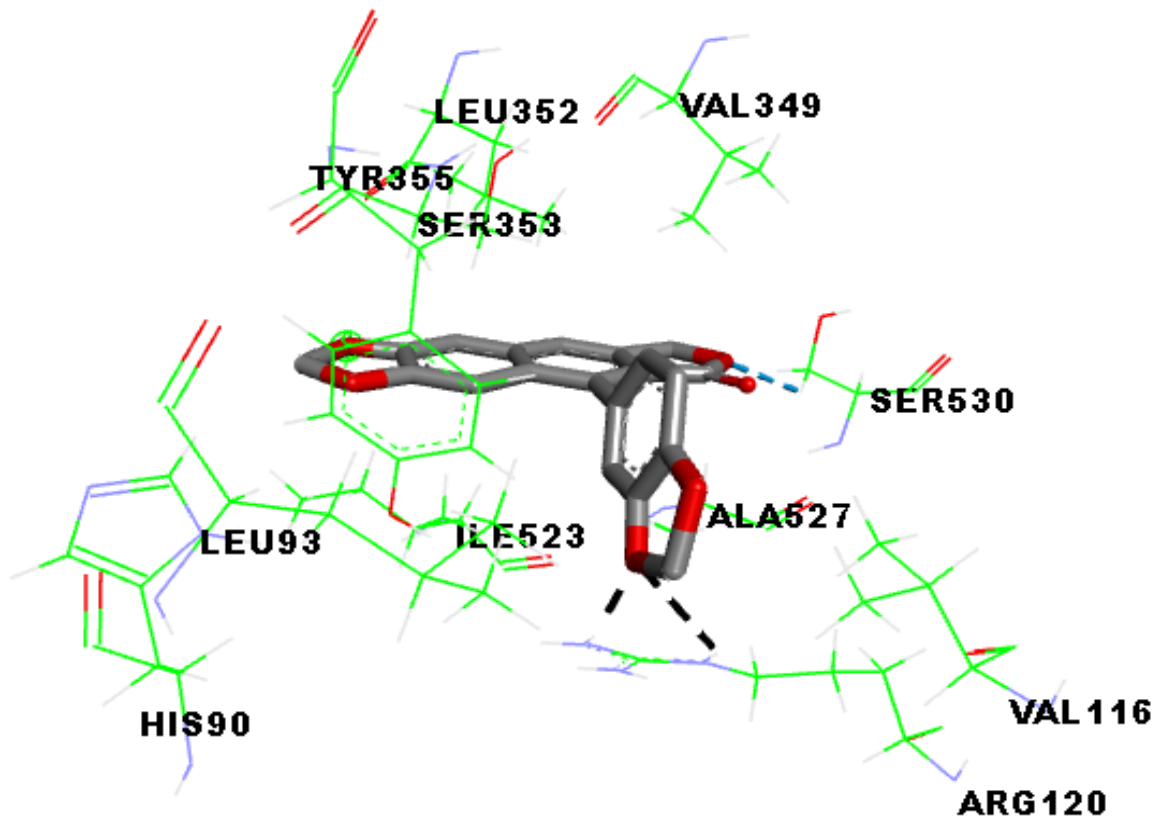
Na COX-1, os resultados observados mostram interações hidrofóbicas com os resíduos Leu93, Val116, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Leu359, Phe518, Ile523 e Leu531. Duas interações por ligações de hidrogênio são observadas com o resíduo Arg120 e uma ligação de hidrogênio não clássica com o resíduo Ser530 (Figura 21).

Essa ligação com a Arg120 é comum também quando temos os antiinflamatórios não esteroidais, mas o principal problema com esses medicamentos que atuam sobre a COX-1 é justamente o quanto eles se ligam nela, ou seja, o quanto são seletivos ou não em relação à proteína, uma vez que, a alta seletividade inibe a proteína e atrapalha os processos fisiológicos aos quais ela tem ligação.

Analisando o modo de interação da taiwanina C com a COX-1 é possível observar que todas as porções (grupos) da estrutura interagem com os resíduos do sítio, sugerindo uma interação simétrica entre o composto e o sítio ativo da proteína. A taiwanina C e a indometacina têm modelos de interação muito semelhantes, como mostrado nas Figuras 21 e 22, com várias interações hidrofóbicas em comum.

Na taiwanina C, observa-se a interação por ligação de hidrogênio clássica com o resíduo Arg120, que, segundo a literatura, é de grande importância na interação do AA com COX-1 para a desativação da proteína (Mancini et al., 1995), além da ligação de hidrogênio não clássica com o resíduo Met530.

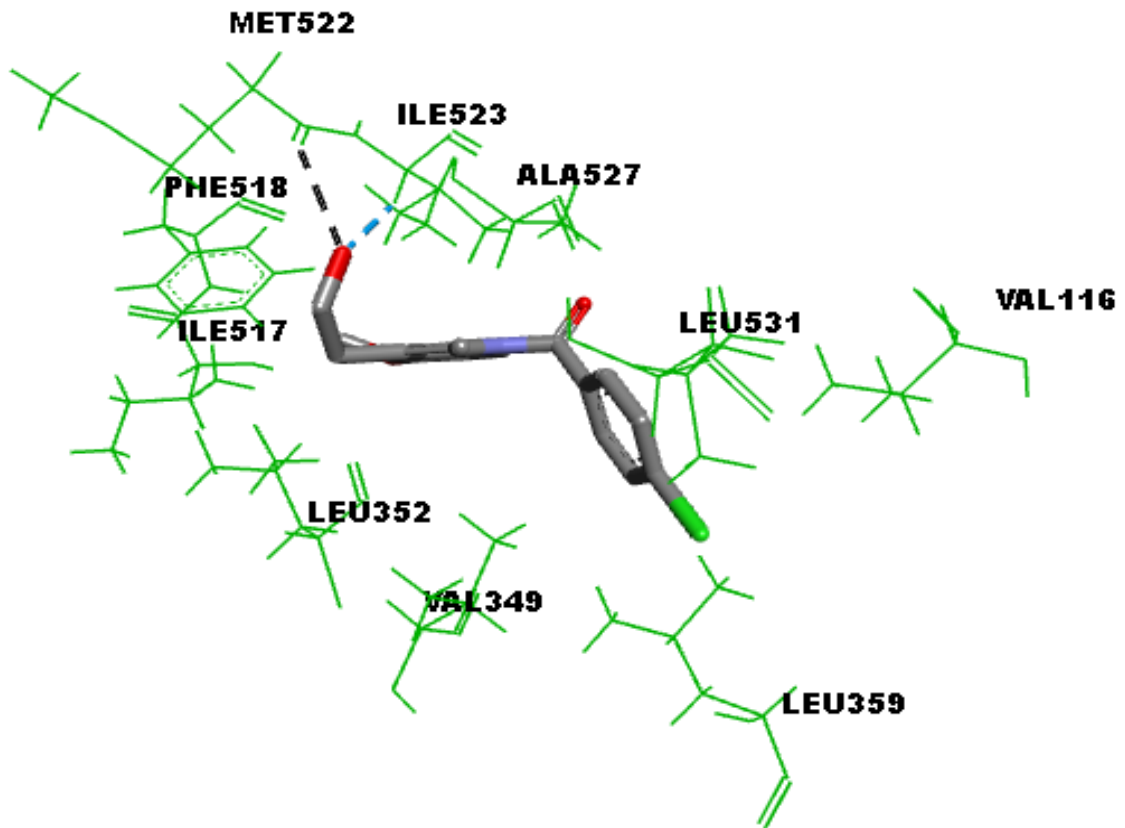
Figura 21. Modos de ligação de taiwanina C com COX-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura



A indometacina (Figura 22) apresenta várias interações hidrofóbicas com os resíduos Val116, Val349, Leu352, Leu359, Ile517, Phe518, Ile523, Ala527 e Leu531. Sete desses resíduos hidrofóbicos são comuns também no modelo de interação da taiwanina C. A indometacina faz uma ligação de hidrogênio com o resíduo Met522, mas não com a Arg120.

Esses resultados sugerem que a taiwanina C possui maior interação com a COX-1 do que a indometacina, assim como observado no ensaio *in vitro*, quando se comparam as duas substâncias na mesma concentração.

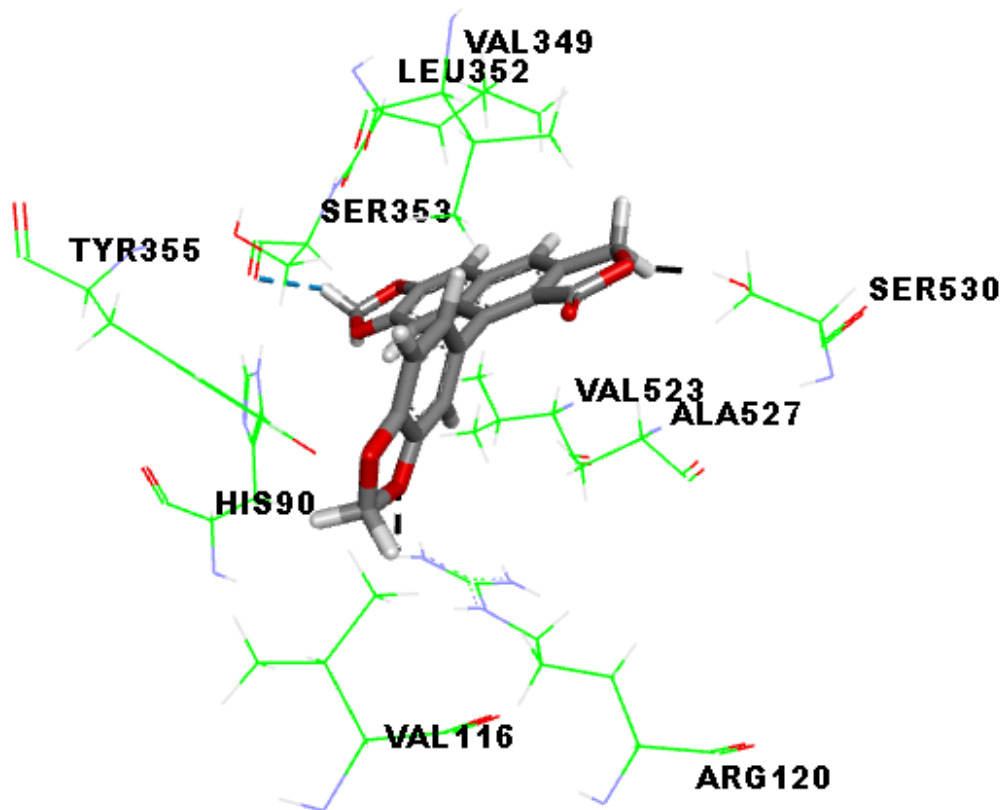
Figura 22. Modos de ligação da indometacina com COX-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura



4.3.2. Interações de ligação da taiwanina C e da indometacina com a COX-2

O modelo de interação da taiwanina C com a COX-2 mostrou interações hidrofóbicas com os resíduos Val349, Leu352, Tyr355, Tyr385, Phe518, Ile523, Ala527, Leu531, descritas na literatura como ligações importantes para a desativação da proteína. O modelo também mostrou uma ligação de hidrogênio clássica com o resíduo Arg120 e uma ligação de hidrogênio não clássica com os resíduos His90 e Val116 (Figura 23).

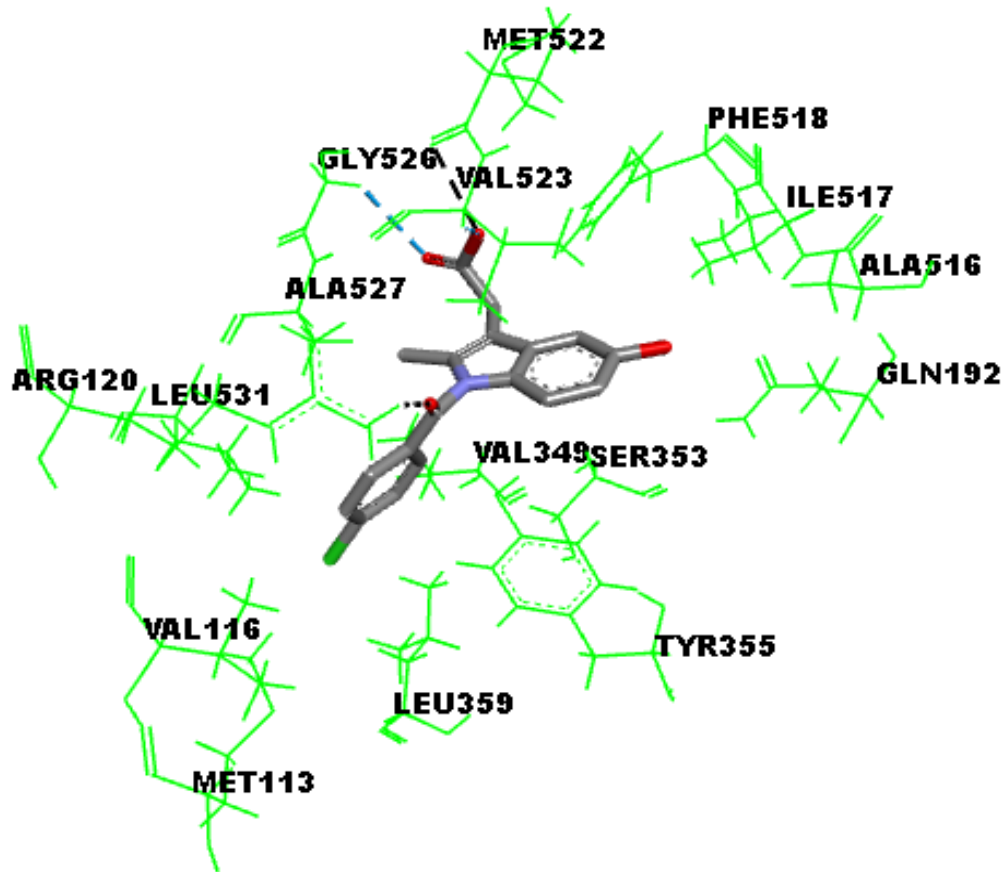
Figura 23. Modos de ligação de taiwanina C com COX-2. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura



Em relação à COX-2, embora a indometacina e taiwanina C mostrem um modelo de interação semelhante (Figuras 23 e 24), a taiwanina C tem uma interação hidrofóbica com o resíduo Phe518 e uma ligação de hidrogênio não clássica com His90, dois resíduos localizados no bolso hidrofílico do sítio dessa isoforma, e que são importantes na inibição da atividade dessa proteína. A indometacina mostrou interações hidrofóbicas com os resíduos Met113, Val116, Val349, Ser353, Tyr355, Leu359, Ala516, Ile517, Phe518, Val523, Ala527 e Leu531. Ligações de hidrogênio foram observadas com os resíduos Arg120 e Met522. Além de ligações de hidrogênio não clássicas com resíduos Gln192 e Gly526 (Figura 24).

Esses resultados sugerem maior interação de taiwanina C com a COX-2 do que a indometacina. Todos os resíduos com os quais a indometacina e a taiwanina C interagem estão localizados no sítio ativo da COX-2.

Figura 24. Modos de ligação da indometacina com COX-2. Linhas tracejadas pretas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas tracejadas azuis mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura



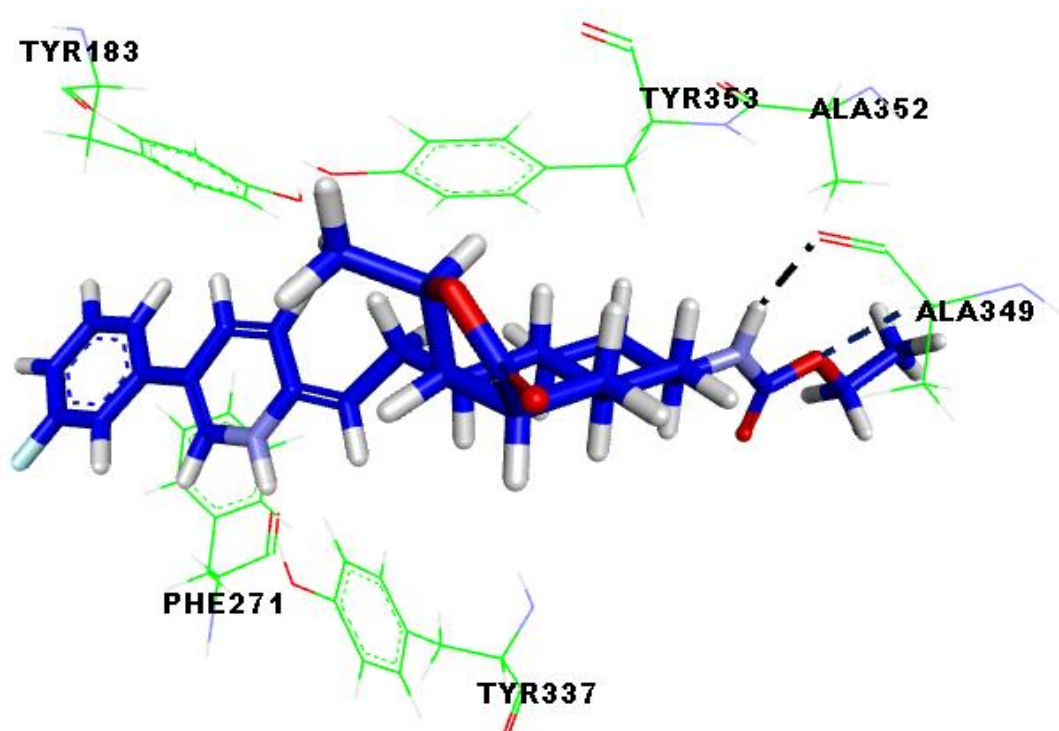
O fato da taiwanina C também atuar sobre a COX-2 e de maneira mais forte do que a indometacina pode causar algum receio quanto às suas propriedades antiplaquetárias, pois existe a ideia de que a inibição da COX-2 impede a produção de PGI₂, cujo papel inclui a inibição da agregação plaquetária e vasodilatação, duas funções importantes para o desenvolvimento do trombo (Day, 2004). Entretanto, esta hipótese permanece controversa, pois a COX-2 imunorreativa geralmente está ausente no endotélio de indivíduos saudáveis *in vivo* e *in vitro*, enquanto COX-1 é relativamente abundante (Armstrong et al., 2011).

4.3.4. Interações de ligação da taiwanina C e da indometacina com a PAR-1

Em relação a PAR-1, os resultados obtidos pelo docking molecular para o vorapaxar observamos até muitas interações por se tratar de uma molécula grande e rígida. O modelo

mostrou interações hidrofóbicas com Tyr183, Leu237, His255, Leu258, Leu262, Phe271, Leu333, His336, Ala352, Tyr353, ligações de hidrogênio não clássicas com Asp256 e ligação de hidrogênio clássica com Ala349 (Figura 25).

Figura 25. Modos de ligação do vorapaxar com a PAR-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura



O estudo com a taiwanina C utilizou o mesmo sítio ativo de ligação do vorapaxar, fazendo apenas três interações com os resíduos His255, Val257, Leu258 (Figura 26) em um modelo diferente daquele observado para o vorapaxar. Entretanto, duas delas são interações fortes de hidrogênio que podem contribuir para a inibição dessa proteína.

A indometacina apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos Tyr183, Leu237, His255, Leu262, Phe271, Leu333, His336 e Tyr353, ligações de hidrogênio não clássicas com o resíduo Ala349 e ligações de hidrogênio clássicas com os resíduos Asp256, Val257, Leu258 e Tyr337 (Figura 27).

Figura 26. Modos de ligação da taiwanina C com a PAR-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura

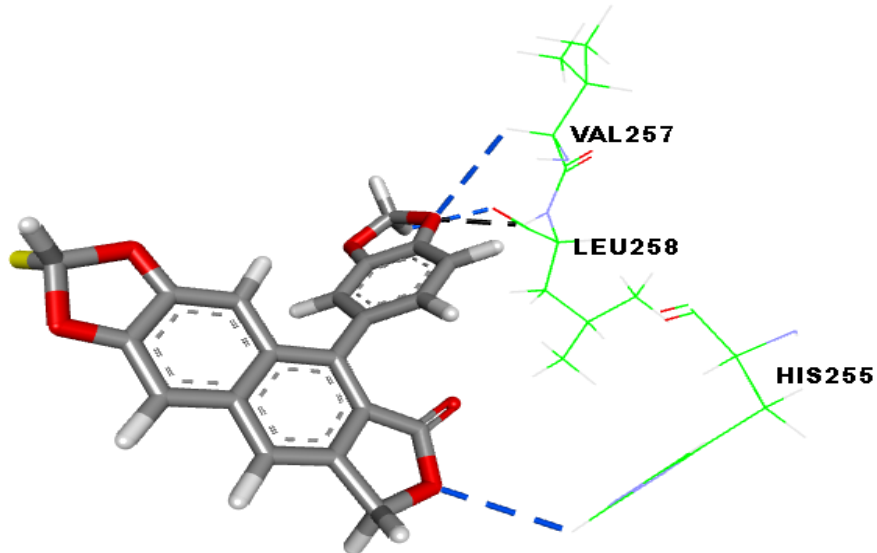
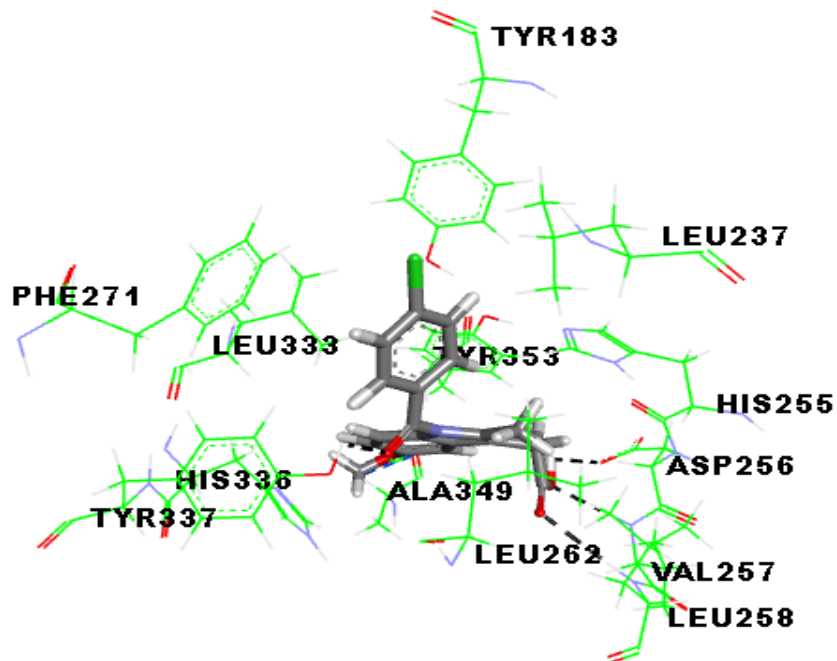


Figura 27. Modos de ligação da indometacina com PAR-1. Linhas pretas tracejadas mostram ligações de hidrogênio clássicas, linhas azuis tracejadas mostram ligações de hidrogênio não clássicas e as interações hidrofóbicas não são destacadas na figura



Tanto o vorapaxar quanto a indometacina mostram interações com resíduos do sítio da proteína envolvendo as estruturas como um todo. No caso da taiwanina C, uma pequena porção da molécula interage com apenas três resíduos de sítio. Observa-se também que a taiwanina C, ao contrário da indometacina, não interage com os resíduos Tyr183 e Phe 271, que de acordo com a literatura (Zhang et al., 2012), são ambos importantes para a atividade inibitória do vorapaxar. No entanto, as interações da taiwanina C com esses três resíduos são interações fortes ocorrendo a partir de ligações de hidrogênio clássicas e não clássicas. Esses estudos sugerem que a taiwanina C tem ação sobre o PAR-1, conforme demonstrado nos ensaios biológicos, porém com modelo de interação diferente de vorapaxar e da indometacina.

Assim, os resultados observados no docking molecular tanto para COXs quanto para PAR-1 corroboram com os resultados dos ensaios *in vitro*.

5 CONCLUSÕES

A taiwanina C foi sintetizada de forma mais eficiente e com reagentes mais acessíveis pela rota 2, sendo que apresentou ainda um rendimento maior do que nas rotas descritas na literatura, utilizando reagentes com menor custo, de fácil obtenção e manipulação. A redução de parte dos custos foi possível pela eliminação das etapas de purificação, evitando gastos com solventes e sílica, uma vez que por esta rota, geralmente os produtos e subprodutos são facilmente removidos por lavagem do sólido;

As duas rotas sintéticas propostas apresentaram rendimentos superiores aos descritos na literatura para a síntese total da taiwanina C.

A obtenção da taiwanina C via síntese total é mais vantajosa (quantidade, tempo, custo, preservação da espécie) do que a obtenção por extração da planta onde o rendimento chega a 0,01% considerando a extração a partir da camada mais interna do tronco que é onde a taiwanina C é encontrada em maior quantidade.

Os ensaios *in vitro* com plaquetas humanas usando os agonistas AA e TRAP-6, mostraram importante atividade antiplaquetária da taiwanina C;

Estudos de docking molecular estão de acordo com os resultados dos *in vitro* e sugerem que a taiwanina C atua na inibição da COX-1, mas também inibe a COX-2 em menor grau;

A taiwanina C mostrou maior ação antiplaquetária na presença de TRAP-6 do que a indometacina usada como controle, porém, os estudos de docking molecular sugerem diferentes mecanismos de ação para os dois compostos;

Nos estudos de docking molecular também pode-se observar a ação da taiwanina C sobre a PAR-1, porém com interação menor e mecanismo diferente daquele observado para o vorapaxar, o que pode indicar que a taiwanina utilize um outro sítio de ligação diferente do vorapaxar;

Esses resultados demonstram que a taiwanina C atua de forma muito eficiente em duas vias de sinalização de agregação plaquetária diferentes, o que não foi observado em outros compostos que já foram estudados. Embora preliminares, os resultados são promissores e indicam que a taiwanina C tem potencial para mais estudos sobre seu uso como possível alvo no desenvolvimento de novos compostos que possam atuar como agentes antiplaquetários.

REFERÊNCIAS

Abdulsattar, Y.; Ternas, T.; Garcia, D. Vorapaxar: targeting a novel antiplatelet pathway. *P&T*. **2011**, 36(9), 564-568.

Abeles, A. M.; Pillinger, M. H.; Abramson, S. B. Inflammation and its mediators, Editor(s): Marc C. Hochberg, Alan J. Silman, Josef S. Smolen, Michael E. Weinblatt, Michael H. Weisman, *Rheumatology (Sixth Edition)*, Mosby. **2015**, 169-182, ISBN 9780323091381, doi: [10.1016/B978-0-323-09138-1.00023-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-09138-1.00023-1).

Armstrong, P. C.; Kirkby, N. S.; Zain, Z. N.; Emerson, M.; Mitchell, J. A.; Warner, T. D. Thrombosis is reduced by inhibition of COX-1, but unaffected by inhibition of COX-2, in an acute model of platelet activation in the mouse. *PLoS One* **2011**, 6(5), e20062. doi: [10.1371/journal.pone.0020062](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020062).

Atanasov, A. G.; Zotchev, S. B.; Dirsch, V. M.; Supuran, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, 20, 200-216.

Ban, H. S.; Lee, S.; Kim, Y. P.; Yamaki, K.; Shin, K. H.; Ohuchi, K. Inhibition of prostaglandin E(2) production by taiwanin C isolated from the root of *Acanthopanax chiisanensis* and the mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 64(9), 1345-1354.

Borges, A. *Estudos de Modelagem Molecular de Lignanais em Complexos com Ciclooxygenases – 1 e 2*. **2016**. Tese (Doutorado em Química dos Materiais), Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira – UNESP.

Boulaftali, Y.; Hess, P. R.; Kahn, M. L.; Bergmeier, W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity. *Circ. Res.* **2014**, 114, 1174-1184.

Campbell, C. L.; Smyth, S.; Montalescot, G.; Steinhubl, S. R. Aspirin Dose for the Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *JAMA*. **2007**, 297(18), 2018-2024.

Caracelli, I.; Maganhi, S. H.; de Oliveira Cardoso, J.; Cunha, R. L.; Vega-Tejido, M. A.; Zukerman-Schpector, J. & Tiekink, E. R. Crystallographic and docking (Cathepsins B, K, L and S) studies on bioactive halotelluroxetanes. *Z. Kristallogr. Cryst. Mater.* **2017**, 113-124.

Castro, H. C.; Santos, D. O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2006**, 42, 321-332.

Chackalamannil, S.; Chelliah, M. Vorapaxar: From Lead Identification to FDA Approval. In.: Holenz, J. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. Germany: Lead Generation, **2016**, 19, 547-574.

Chen, C. C.; Hsin, W. C.; Ko, F. N.; Huang, Y. L.; Ou, J. C.; Teng, C. M. Antiplatelet Arylnaphthalide Lignans from *Justicia procumbens*. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 1149-1150.

Chiarito, M.; Stefanini, G. G. Antiplatelet therapy for secondary prevention of cardiovascular disease: challenging the certainties. *The Lancet* **2021**, 397, 2443-2444.

Chien, S. C.; Kuo, Y. H. Review of chemical constituents of *Taiwania cryptomerioides*. *CHM.* **2009**, 67, 33-44.

Conley, C. Lockard and Schwartz, Robert S. "blood". *Encyclopedia Britannica.* **2020**, <https://www.britannica.com/science/blood-biochemistry>. Accessed 20 August 2021.

Cow, C.; Leung, C.; Charlton, J. L. Antiviral activity of aryl-naphthalene and aryl-dihydronaphthalene lignans. *Can. J. Chem.* **2000**, 78(5), 553-561.

Day, R. O.; Graham, G. G. The vascular effects of COX-2 selective inhibitors. *Aust. Prescr.* **2004**, 27, 142-145.

De Witt, S. M.; Swieringa, F.; Cavill, R.; Lamers, M. M. E.; Van Kruchten, R.; Mastenbroek, T.; Baaten, C.; Coort, S.; Pugh, N.; Schulz, A.; Scharrer, K. J.; Zieger, B.; Clemetson, K. J.;

Farndale, R. W.; Heemskerk, J. W. M.; Cosemans, J. M. E. M. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4257.

Esteves, B.; Du, X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Sig. *Physiology.* **2017**, *32*, 162-177.

Feng, Y.; Wang, Q. and Wang, T. Drug Target Protein-Protein Interaction Networks: A Systematic Perspective. *Biomed. Res. Int.* **2017**, Article ID 1289259, 13 pag.

Ferreira, L. G.; Santos, R. N.; Oliva, G. and Andricopulo, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **2015**, *20*(7), 13384-13421.

Florence, A. T.; Attwood, D. *Princípios físico-químicos em farmácia.* **2011**, 2ª Edição. São Paulo, Pharmabooks.

Frampton, J. E. Vorapaxar: A Review of Its Use in the Long-Term Secondary Prevention of Atherothrombotic Events. *Drugs* **2015**, *75*(7), 797-808.

Fuentes, E.; Moore-Carrasco, R.; de Andrade Paes, A. M.; & Trostchansky, A. Role of Platelet Activation and Oxidative Stress in the Evolution of Myocardial Infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2019**, *24*, 509-520.

Fuentes, E.; Palomo, I. Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions. *J. Funct. Foods.* **2014**, *6*, 73-81.

Gilman, A. G. *As bases farmacológicas da terapêutica.* **2005**, 10ª Edição. Ed Mc Graw Hill, RJ.

Goto, S.; Yamaguchi, T.; Ikeda, Y.; Kato, K.; Yamaguchi, H.; Jensen, P. Safety and exploratory efficacy of the novel thrombin receptor (PAR-1) antagonist SCH530348 for non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *J. Atheroscler. Thromb.* **2010**, *17*, 156–164.

Gryka, R. J.; Buckley, L. F.; Anderson, S. M. Vorapaxar: The Current Role and Future Directions of a Novel Protease-Activated Receptor Antagonist for Risk Reduction in Atherosclerotic Disease. *Drugs R. D.* **2017**, 65-72.

Guyton, A.C.; Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier. **2006**, 12^a edição, cap 36, 475-486.

He, Y.; Zhang, X.; Fan, X. Synthesis of naphthalene amino esters and aryl-naphthalene lactone lignans through tandem reactions of 2-alkynylbenzonnitriles. *ChemComm.* **2014**, 50, 5641-643.

Hirsch, E.; Viecili, P. R. N.; Almeida, A. S.; Nascimento, S.; Porto, F. G.; Otero, J.; Schmidt, A.; Silva, B.; Parisi, M. M.; Klafke, J. Z. Natural Products with Antiplatelet Action. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, 23, 1228-1246.

Honaiser, C. L.; Lima, F. F.; Cardoso, C. A. L.; Vieira, S. C. H.; Mónica, F. Z.; Oliveira, I. P. Rutin present in *Alibertia edulis* extract acts on human platelet aggregation through inhibition of cyclooxygenase/thromboxane. *Food Funct.* **2021**, 802-814.

Hong, M. Y.; Seeram, N. P.; Zhang, Y.; Heber, D. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, 448-458.

Hung, C. L.; Chen, C. C. Computational approaches for drug discovery. *Drug. Dev. Res.* **2014**, 412-418.

Jones, G.; Willet, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727-748.

Jones, G.; Willet, P.; Glen, R. Molecular recognition of receptor site using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, 245, 43-53.

Kagami, L. P.; Neves, G. M.; Rodrigues, R. P.; Silva, V. B.; Eifler-Lima, V. L.; Kawano, D. F. Identification of a novel putative inhibitor of the *Plasmodium falciparum* purine nucleoside

phosphorylase: exploring the purine salvage pathway to design new antimalarial drugs. *Mol. Divers.* **2017**, 21, 677-695.

Kim, K.; Park, K. A Review of Antiplatelet Activity of Traditional Medicinal Herbs on Integrative Medicine Studies. *Evid.-based Complement. Altern. Med.* **2019**, Article ID 7125162, 18 pages.

Kim, M. G.; Lee, C. H.; Lee, H. S. Anti-platelet Aggregation Activity of Lignans Isolated from *Schisandra chinensis* Fruits. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2010**, 53, 740-745.

Koupenova, M.; Kehrel, B. E.; Corkrey, H. A.; Freedman, J. E. Thrombosis and platelets: an update, *Eur. Heart J.* **2017**, 38(11), 785-791.

Kroll, M. H.; Harris, T. S.; Moake, J. L.; Handin, R. I.; Schafer, A. I. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J. Clin. Invest.* **1991**; 88(5), 1568-1573.

Landais, Y.; Robin, J. & Lebrun, A. Ruthenium Dioxide in Fluoro Acid Medium: I. A New Agent in the Biaryl Oxidative Coupling. Application to the Syntesis of Non-Phenolic Bisbenzocyclooctadiene Lignan Lactones. *Tetrahedron.* **1991**, 47, 3887-3804.

Lee, S.; Ban, H. S.; Kim, Y. P.; Kim, B. K.; Cho, S. H.; Ohuchi, K.; Shin, K. H. Lignans from *Acanthopanax chiisanensis* having an inhibitory activity on prostaglandin E2 production. *Phytother. Res.* **2005**, 19, 103-106.

Lin, K. H.; Shibu, M. A.; Kuo, Y. H.; Chen, Y. C.; Hsu, H. H.; Bau, D. T.; Chen, M. C.; Tu, C. C.; Viswanadha, V. P.; Huang, C. Y. Taiwanin C selectively inhibits arecoline and 4-NQO-induced oral cancer cell proliferation via ERK1/2 inactivation. *Environ. Toxicol.* **2017**, 62-69.

Lu, S. H.; Wu, J. W.; Liu, H. L.; Zao, J. H.; Liu, K. T.; Chuang, C. K.; Lin, H. Y.; Tsai, W. B.; Ho, Y. The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: A combination of

pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. *J. Biomed. Sci.* **2011**, 18(1), 8.

Malkowski, M. G.; Ginell, S. L.; Smith, W. L.; Garavito, R. M. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science.* **2000**, 1933-1937.

Mancini, J. A.; Riendeau, D.; Falgoutyret, J. P.; Vickers, P. J.; O'Neill, G. P. Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 49, 29372-29377.

Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided Drug.* **2011**, 7(2), 146-157.

Michaux, C.; Charlier, C.; Julémont, F.; Leval, X.; Dogn, J. M.; Pirotte, B.; Durant, F. A new potential cyclooxygenase-2 inhibitor, pyridinic analogue of nimesulide. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 1316-1324.

Morgon, N. H.; Coutinho, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. São Paulo: Livraria da Física. **2007**, 540 pg.

O'Byrne, P. M. Inflammatory Mediators and Pathways. In: Barnes, P. J.; Drazen, J.; Rennard, S. I.; Thomson, N. C. *Prostanoids. Asthma and COPD. Basic Mechanisms and Clinical Management.* **2009**, 2^a Edição, 275-282.

Oniga, S. D.; Pacureanu, L.; Stoica, C. I.; Palage, M. D.; Crăciun, A.; Rusu, L. R.; Crisan, E. L. and Araniciu, C. COX Inhibition Profile and Molecular Docking Studies of Some 2-(Trimethoxyphenyl) -Thiazoles. *Molecules.* **2017**, 22, 1507, 15 pages.

Orlando, B. J.; Malkowski, M. G. Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. *Acta. Cryst.* **2016**, 772-776.

Park S.; Kim J. H.; Kim S. H.; Shin, D. Transition Metal-Mediated Annulation Approaches for Synthesis of Arylnaphthalene Lignan Lactones. *Front. Chem.* **2020**, 8, 628, 1-15.

Park, J. E.; Lee, J.; Seo, S. Y.; Shin, D. Regioselective route for aryl naphthalene lactones: convenient synthesis of taiwanin C, justicidin E, and daurinol. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 818-820.

Park, S.; Kim, S.; Shin, D. Arylnaphthalene lactones: structures and pharmacological potentials. *Phytochem. Rev.* **2021**. doi: [10.1007/s11101-020-09735-z](https://doi.org/10.1007/s11101-020-09735-z).

Patrono, C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase 2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2016**, 82(4), 957-964.

Patrono, C.; Collier, B.; FitzGerald, G. A.; Hirsh, J.; Roth, G. Platelet-active drugs: the relationships among doses, effectiveness, and side effects. *Chest.* **2001**, 119(1), 39S-63S.

Patrono, C.; Rocca, B. Measurement of Thromboxane Biosynthesis in Health and Disease. *Front. Pharmacol.* **2019**, 10, 1244.

Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature.* **1994**, 367, 243-249.

Rang, H. P.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson G. Local hormones 1: histamine and the biologically active lipids. In: Rang, H. P.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. *Rang & Dale pharmacology*. London, International edition, **2015**, 212-221.

Renner, S.; Derksen, S.; Radestock, S.; Morchen, F. Maximum common binding modes (MCBM): consensus docking scoring using multiple ligand information and interaction fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, 48, 319-332.

Rodrigues, R. P.; Mantoani, S. P.; Almeida, J. R.; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; Silva, V. B.; Silva, C. H. T. P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Rev. Virtual Quim.* **2012**, 4(6), 739-776.

Rouzer, C. A. & Marnett, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.* **2009**, 50, S29–S34.

Rucker, D.; Dhamoon, A. S. Physiology, Thromboxane A2. [Updated 2020 Sep 13]. In: StatPearls [Internet]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishin.* **2021**, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817/>.

Sharma R.; Sharma S. *Physiology, Blood Volume*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. **2021**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526077/>. Accessed 15 september 2021.

Smith, W. L.; Malkowski, M. G. Interactions of fatty acids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and coxibs with the catalytic and allosteric subunits of cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **2019**, 294(5), 1697-1705.

Sochacka, M.; Giebultowicz, J.; Remiszewka, M.; Suchocki, P.; Wroczynski, P. Effects of Selol 5% supplementation on the activity or concentration of antioxidants and malondialdehyde level in the blood of healthy mice. *Pharmacol. Rep.* **2014**, 66(2), 301-310.

Thomas, P.; Farjon, A. "*Taiwania cryptomerioides*". The IUCN Red List of Threatened Species. **2011**: e. T31255A9620141. doi: 10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T31255A9620141.en.

Tomić, M.; Micov, A.; Pecikoza, U.; Stepanović-Petrović, R. Clinical uses of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and potential benefits of NSAIDs modified-release preparations. In: *Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs.* **2017**, 1-29.

Trostchansky, A.; Moore-Carrasco, R.; Fuentes, E. Oxidative pathways of arachidonic acid as targets for regulation of platelet activation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2019**, doi: [10.1016/j.prostaglandins.2019.106382](https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106382).

Tsai, S.; McOlash, L.; Palen, K.; Johnson, B.; Duris, C.; Yang, Q.; Dwinell, M. B.; Hunt, B.; Evans, D. B.; Gershan, J.; James, M. A. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Canc.* **2018**, 18(1), 335.

Tsao, N.-W.; Chien, S.-C.; Sun, Y.-H.; Chu, F.-H.; Chang, S.-T.; Kuo, Y.-H. and Wang S.-Y. Content and distribution of lignans in *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *De Gruyter - Holzforschung.* **2016**, 70, 511-518.

Tsao, N.-W.; Chien, S.-C.; Kuo, Y.-H.; Wang, S.-Y. Extractives elucidation of *Taiwania cryptomerioides* sapwood. *J. Inst. Wood Sci.* **2021**, 67, Article number: 16.

Van der Meijden, P.; Heemskerk, J. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, 16, 166-179.

Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. *Proteins* **2003**, 52(4), 609-623.

Yaqub, S.; Henjum, K.; Mahic, M.; Jansen, F. L.; Aandahl, E. M.; Bjornbeth, B. A.; Taskén, K. Regulatory T Cells in Colorectal Cancer Patients Suppress Anti-Tumor Immune Activity in a COX-2 Dependent Manner. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, 57(6), 813-821.

Yuhki, K.; Kojima, F.; Kashiwagi, H.; Kawabe, J.; Fujino, T.; Narumiya, S.; Ushikubi, F. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol. Ther.* **2011**, 129(2), 195-205.

Yusuf, M. Z.; Raslan, Z.; Atkinson, L.; Aburima, A.; Thomas, S. G.; Naseem, K. M.; Calaminus, S. D. J. Prostacyclin reverses platelet stress fibre formation causing platelet aggregate instability. *Sci. Reports* **2017**, 7, 1-11.

Zaragoza, C.; Zaragoza, F.; Gayo-Abeleira, I. and Villaescusa, L. Antiplatelet activity of coumarins: *in vitro* assays on COX-1. *Molecules* **2021**, 26(10), 3036.

Zhang, C.; Srinivasan, Y.; Arlow, D. H.; Fung, J. J.; Palmer, D.; Zheng, Y.; Green, H. F.; Pandey, A.; Dror, R. O.; Shaw, D. E.; Weis, W. I.; Coughlin, S. R.; Kobilka, B. K. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* **2012**, 492(7429), 387-392.

Zhao, C.; Rakesh, K. P.; Mumtaz, S.; Moku, B.; Asiri, A. M.; Marwani, H. M.; Manukumar, H. M. and Hua-Li Qin. Arylnaphthalene lactone analogues: synthesis and development as excellent biological candidates for future drug discovery. *RSC Adv.* **2018**, 17, 9487-9502.

ANEXO A

Impacto econômico e social

Estudos sobre o desenvolvimento de novos agentes antiplaquetários tem se intensificado nos últimos anos, no entanto, muitos medicamentos lançados no mercado têm restrições de uso, efeitos colaterais indesejáveis e alto custo.

Desta forma, existe a necessidade de buscar novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos que possam agir sob vários alvos moleculares envolvidos nos processos de ativação plaquetária. Dentro deste contexto, a natureza é uma fonte promissora de moléculas com potencial biológico. Entretanto, muitas das moléculas de interesse farmacológico são difíceis de serem obtidas a partir da extração da planta ou por serem espécies protegidas ou pela diminuta quantidade biosintetizada.

Assim, desenvolver rotas sintéticas mais eficientes para a obtenção de compostos baseados na estrutura de produtos naturais que possam ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos antiplaquetários são cruciais para avaliar seus efeitos, prever futuras aplicações mais seguras e diminuir custos de produção, na tentativa de fazer com esses fármacos possam ter um preço mais acessível à toda população.

Desta forma, o presente estudo visou justamente a obtenção mais eficiente e segura do produto natural taiwanina C que apresentou excelentes propriedades antiplaquetária sendo um composto candidato para futuros estudos mais aprofundados usando modelos *in vivo* para o desenvolvimento de novos agentes antiplaquetários.

ANEXO B*Espectros de RMN dos compostos obtidos pela rota sintética 1*

Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do composto 3 em CDCl_3	94
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3 em CDCl_3	95
Figura 26. DEPT-135 do composto 3 em CDCl_3	96
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do composto 4 em CDCl_3	97
Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4 em CDCl_3	98
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do composto 5 em CDCl_3	99
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5 em CDCl_3	100
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H do composto 6 em CDCl_3	89
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 em CDCl_3	102
Figura 33. DEPT-135 do composto 6 em CDCl_3	103
Figura 34. Espectros de RMN de ^1H do composto 7 em CDCl_3	104
Figura 35. Espectros de RMN de ^{13}C do composto 7 em CDCl_3	105
Figura 36. DEPT-135 do composto 7 em CDCl_3	106
Figura 37. Espectros de RMN de ^1H da taiwanina C em DMSO-d_6	107
Figura 38. Espectros de RMN de ^{13}C da taiwanina C em DMSO-d_6	108

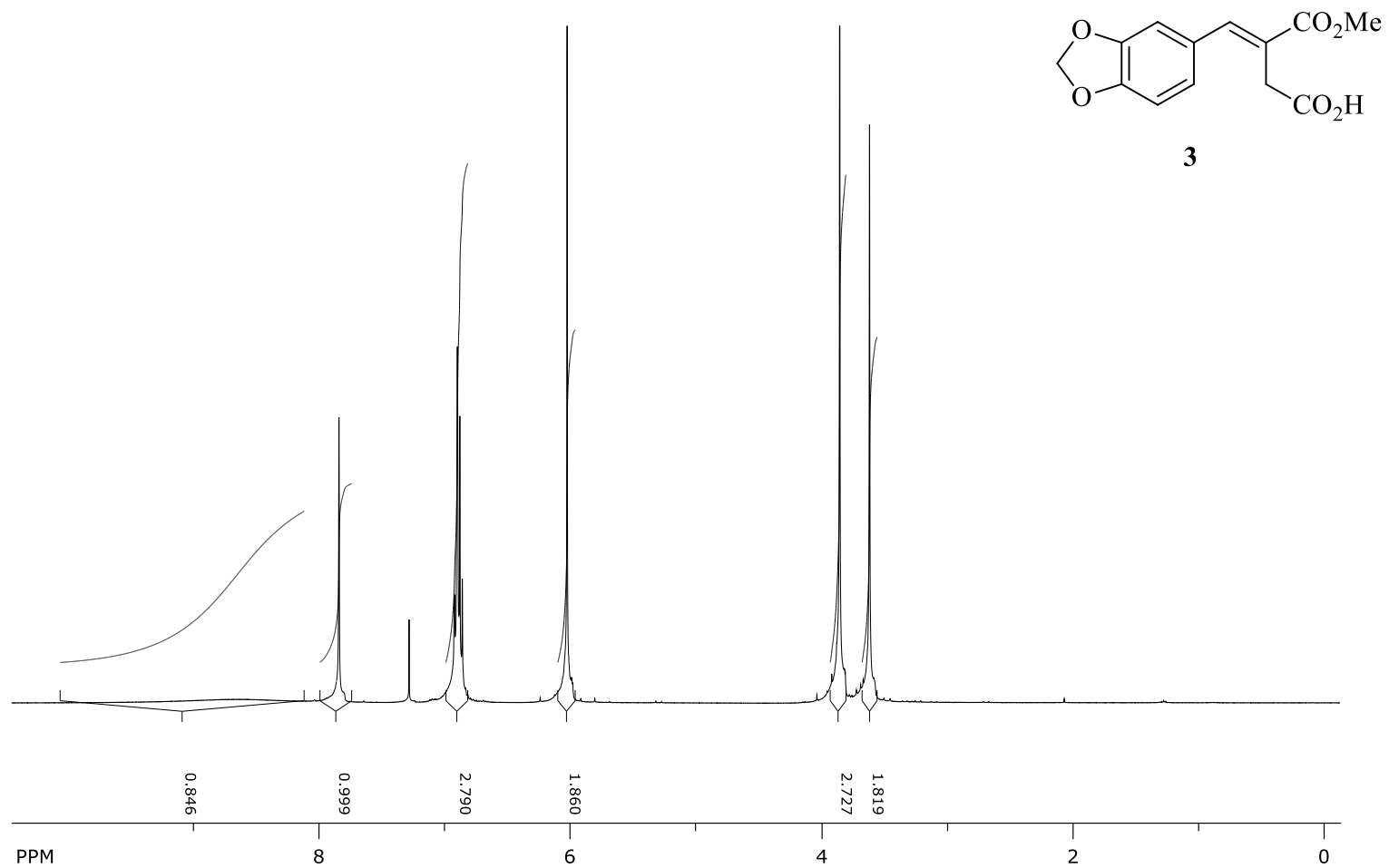


Figura 24. Espectro de RMN de ¹H do composto **3** em CDCl₃

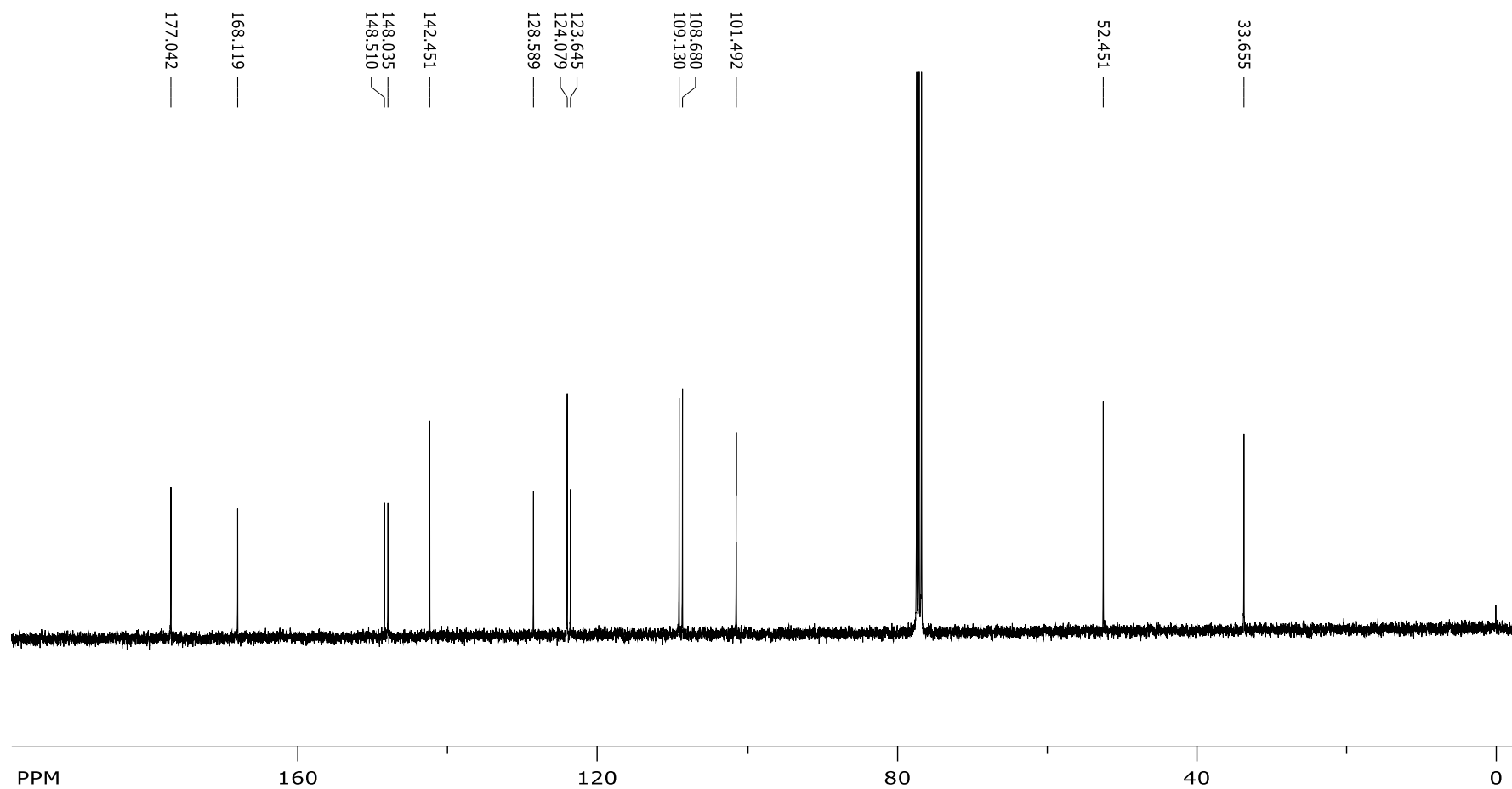


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** em CDCl_3

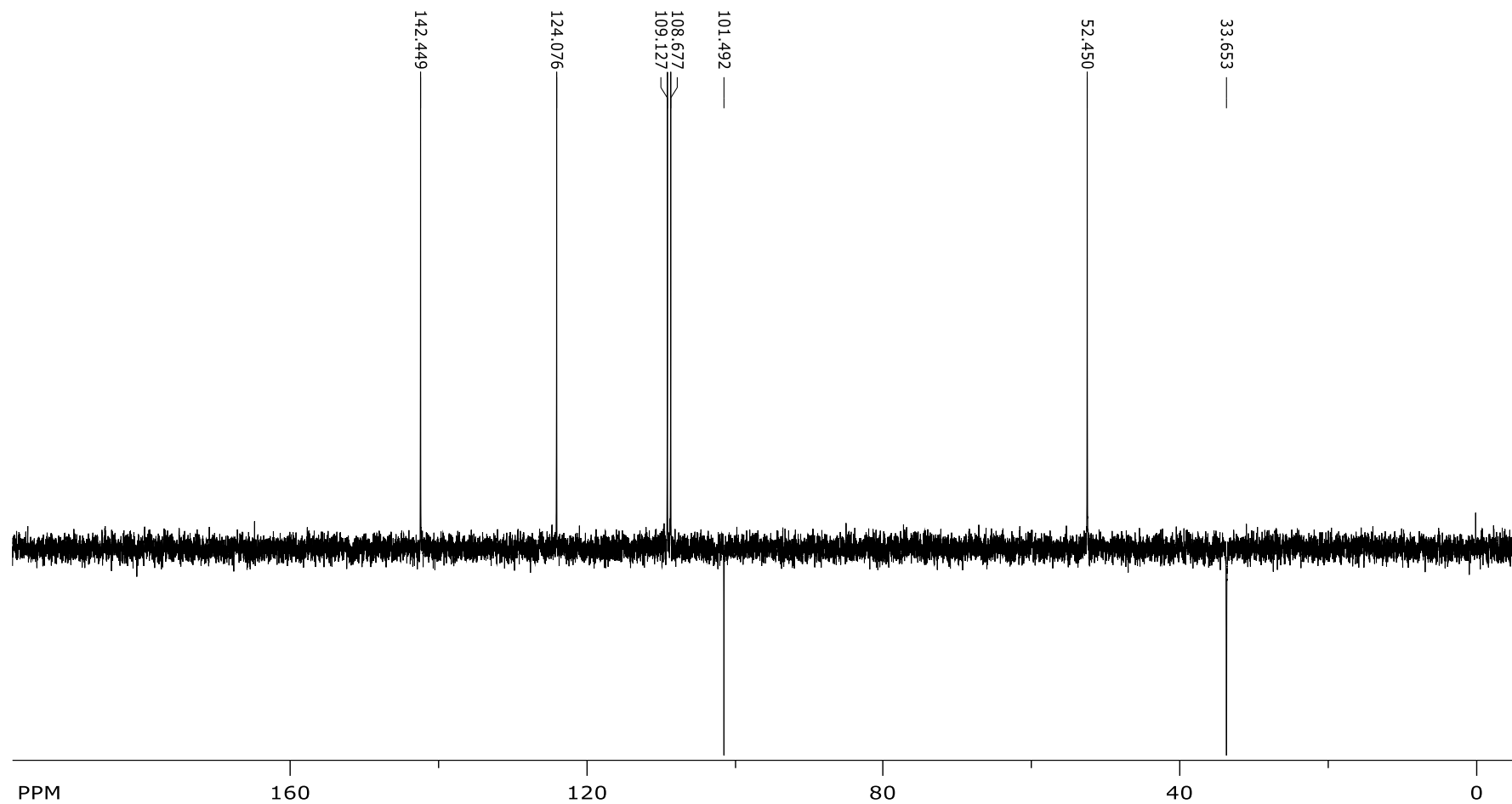


Figura 26. DEPT-135 do composto 3 em CDCl₃

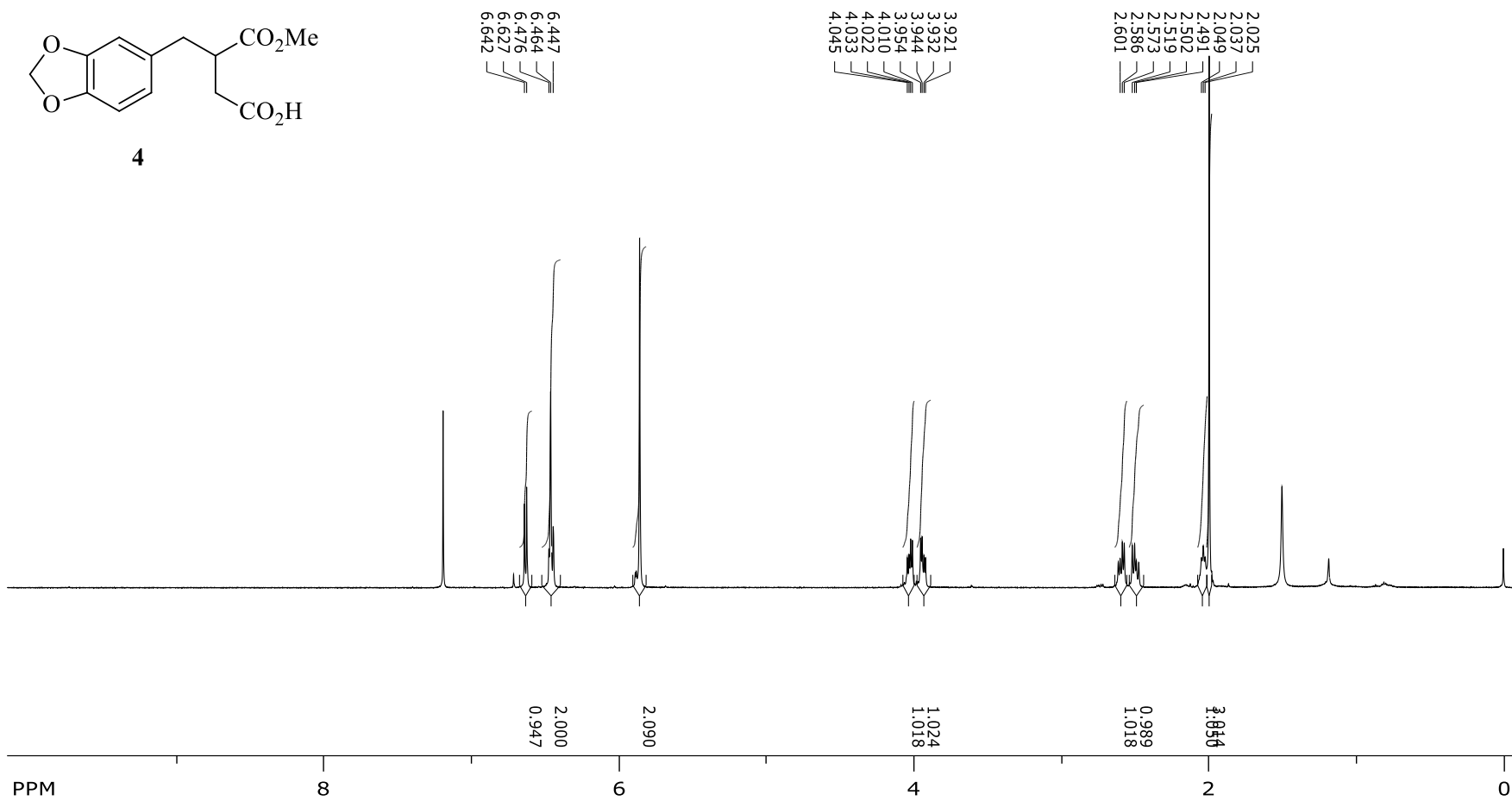


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do composto **4** em CDCl_3

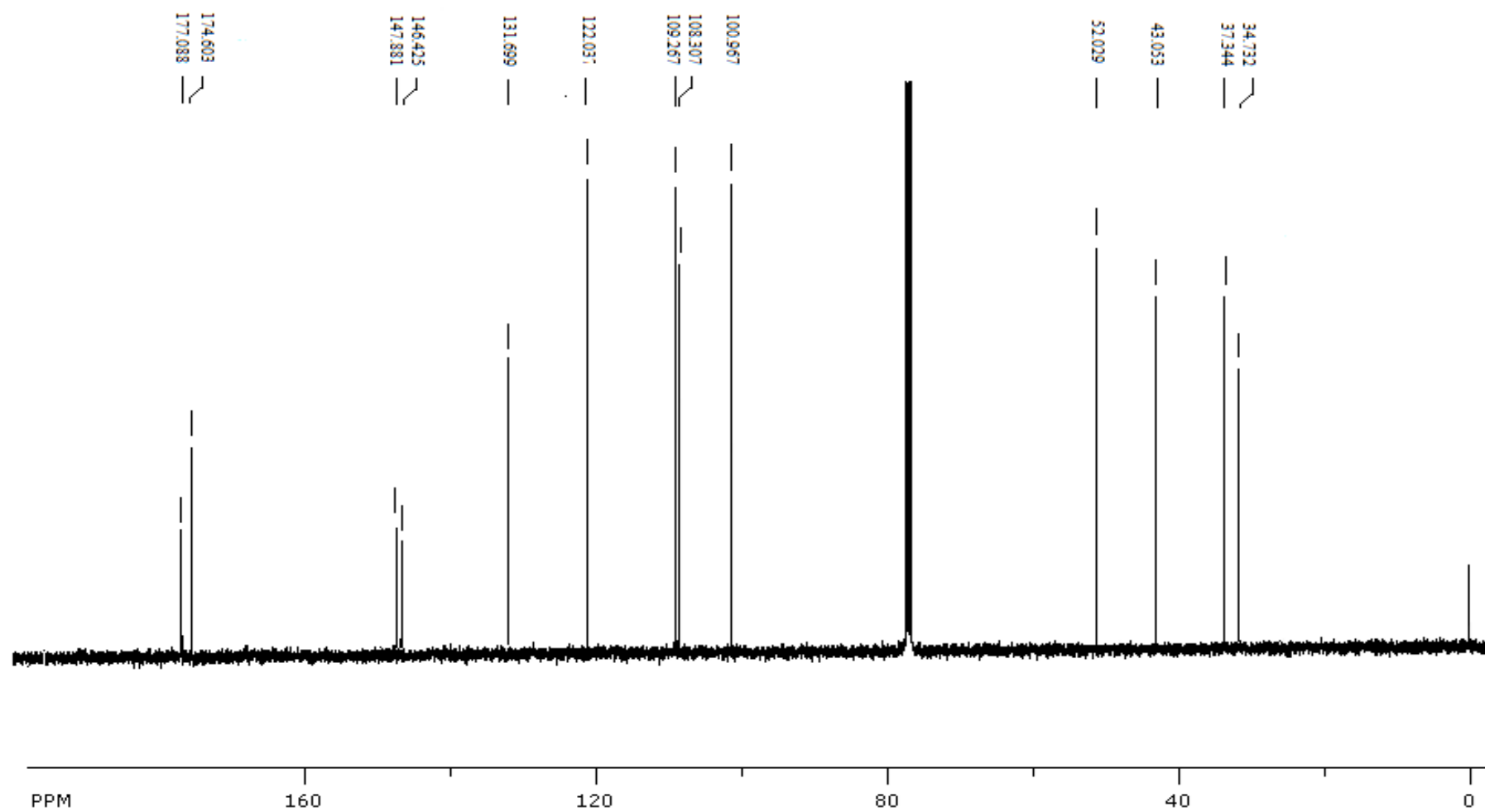


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **4** em CDCl_3

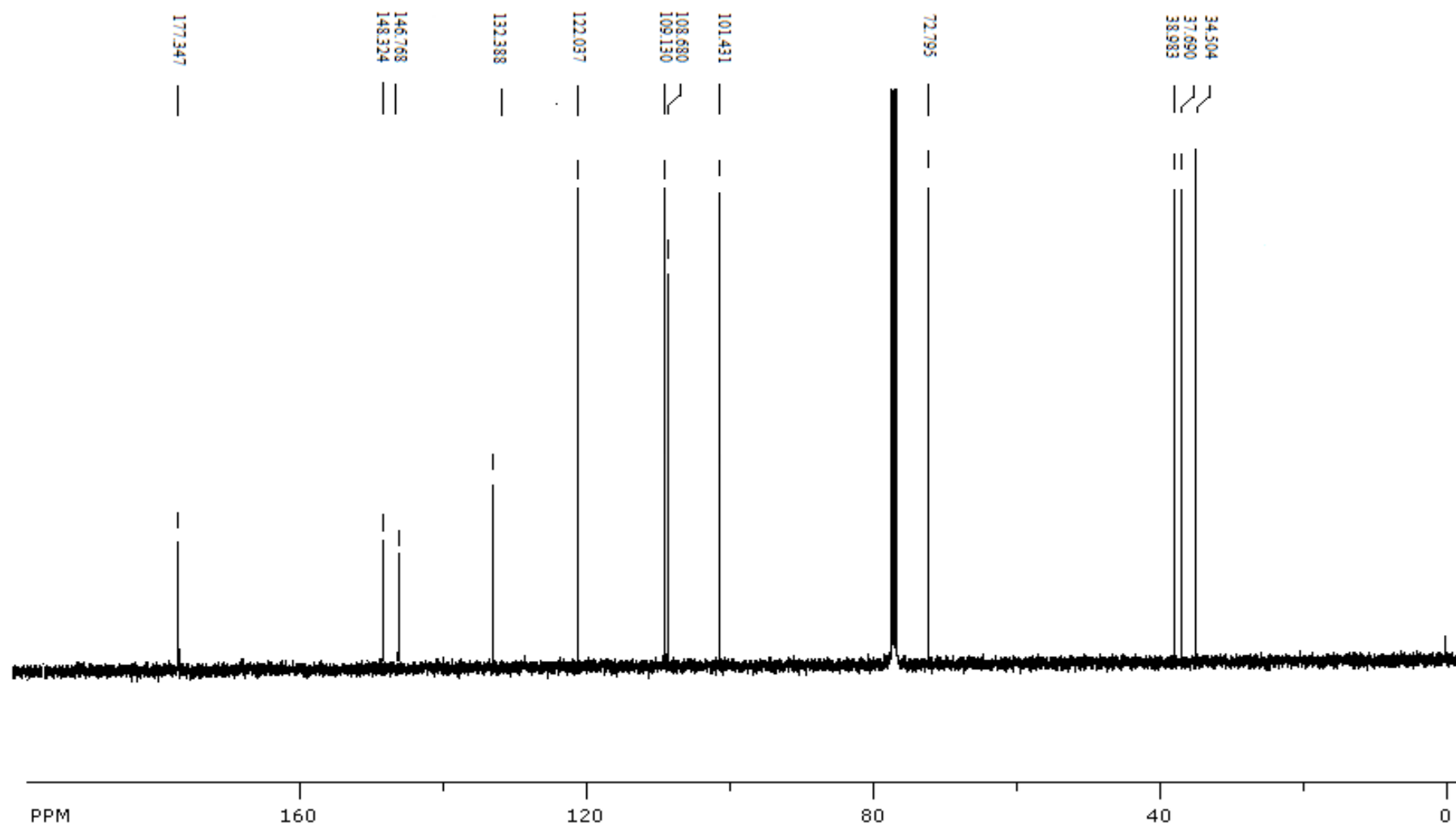


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5** em CDCl_3

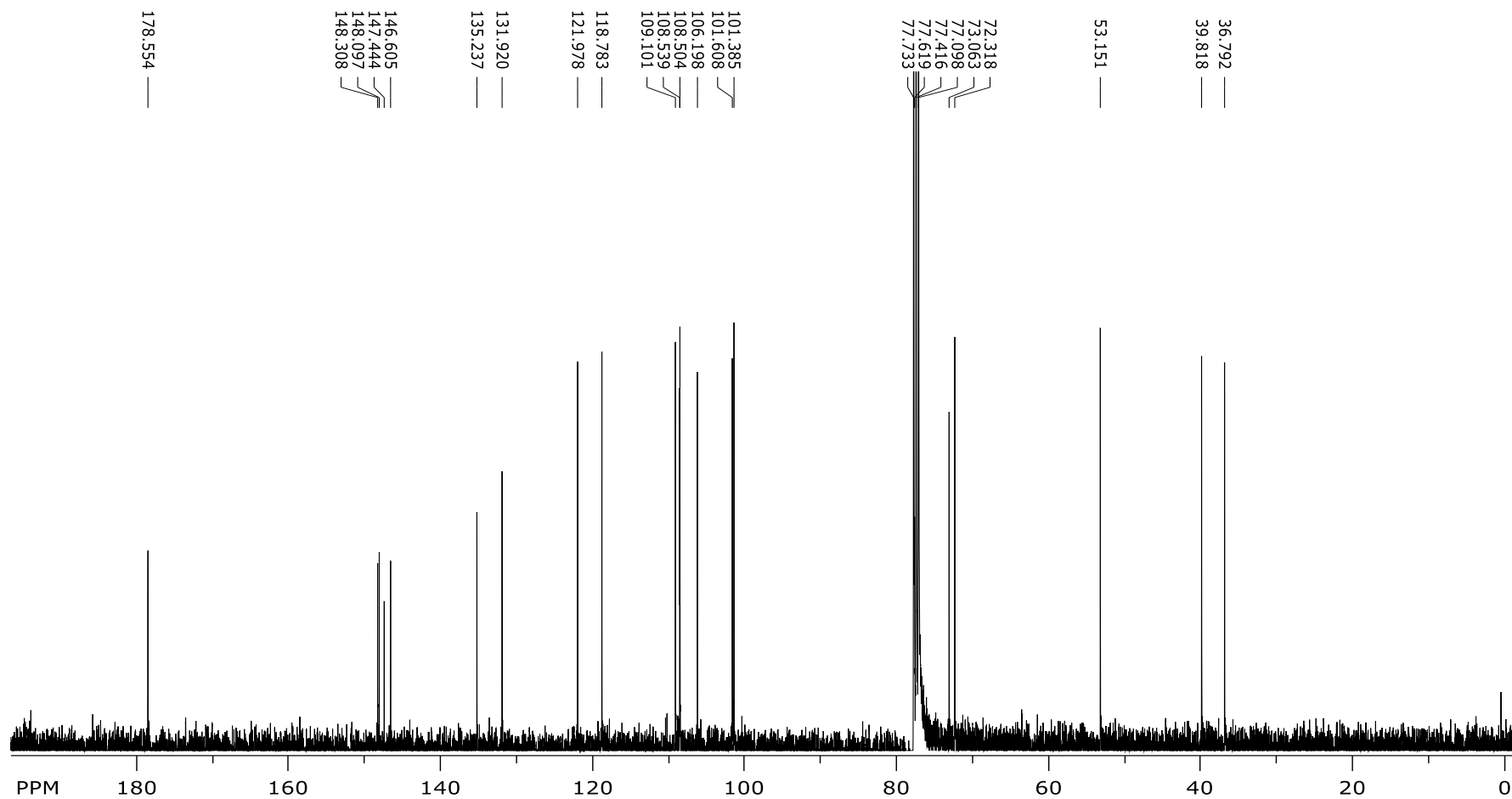


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6** em CDCl_3

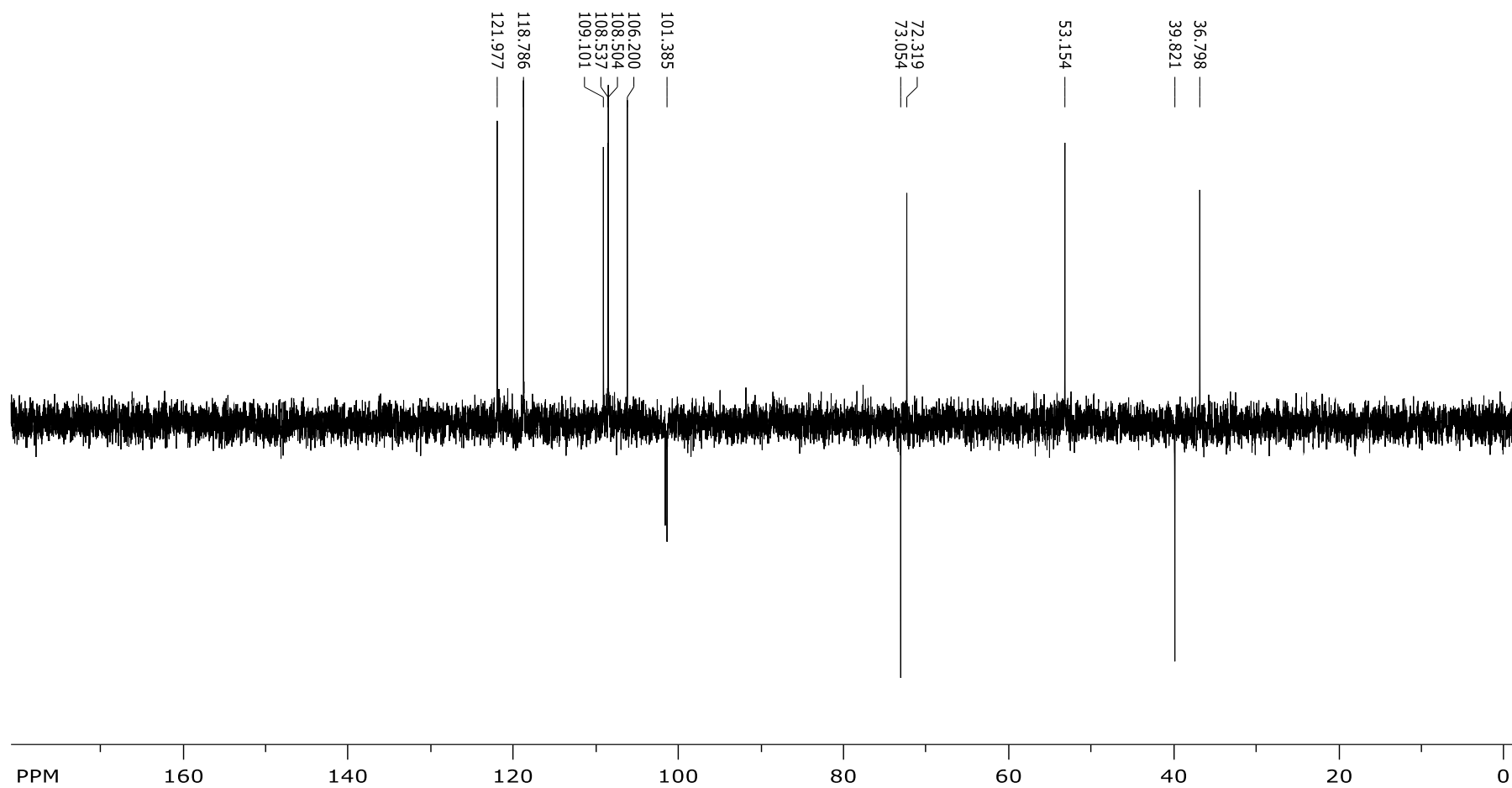


Figura 33. DEPT-135 do composto **6** em CDCl₃

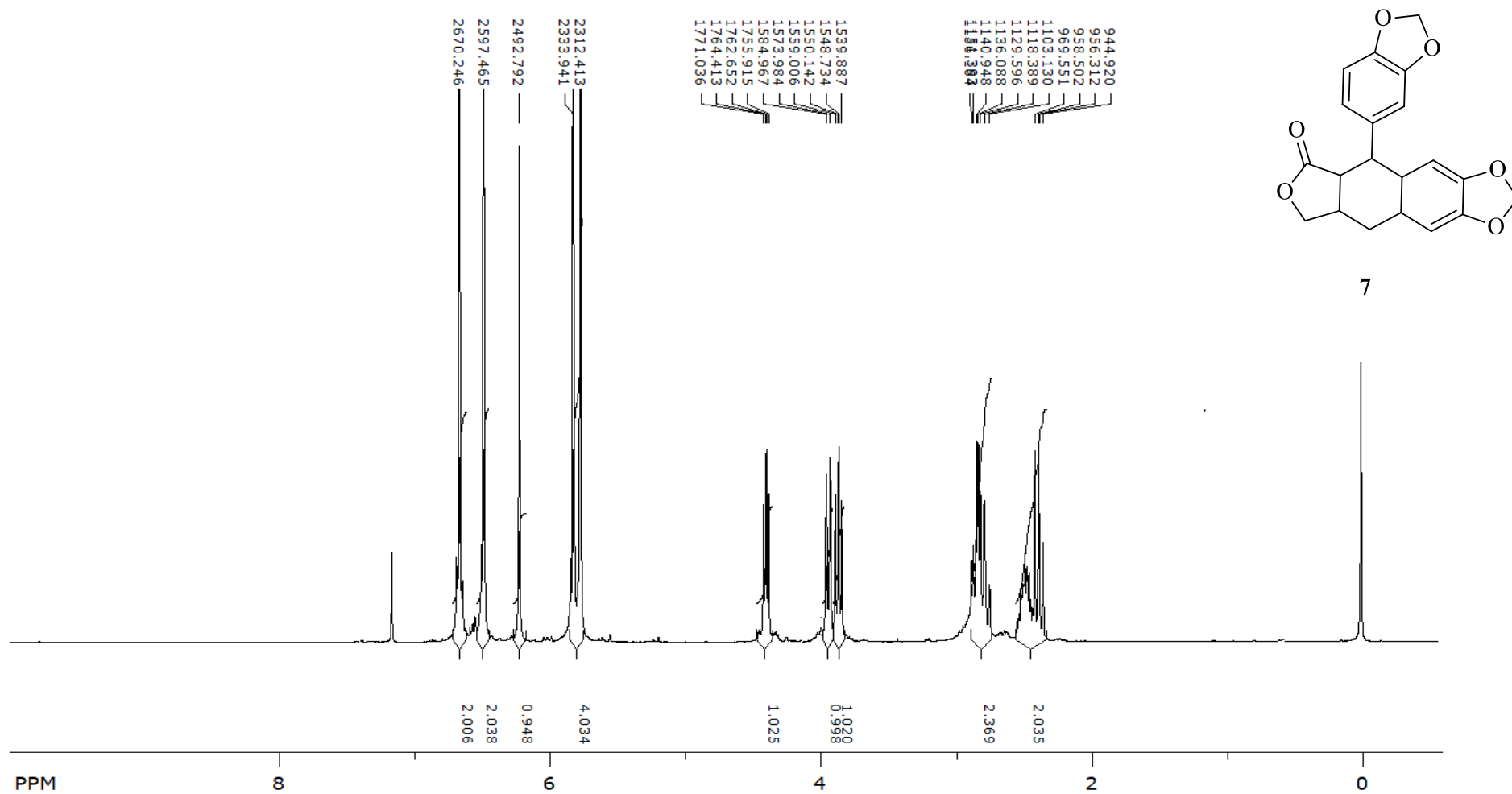


Figura 2. Espectros de RMN de ^1H do composto **7** em CDCl_3

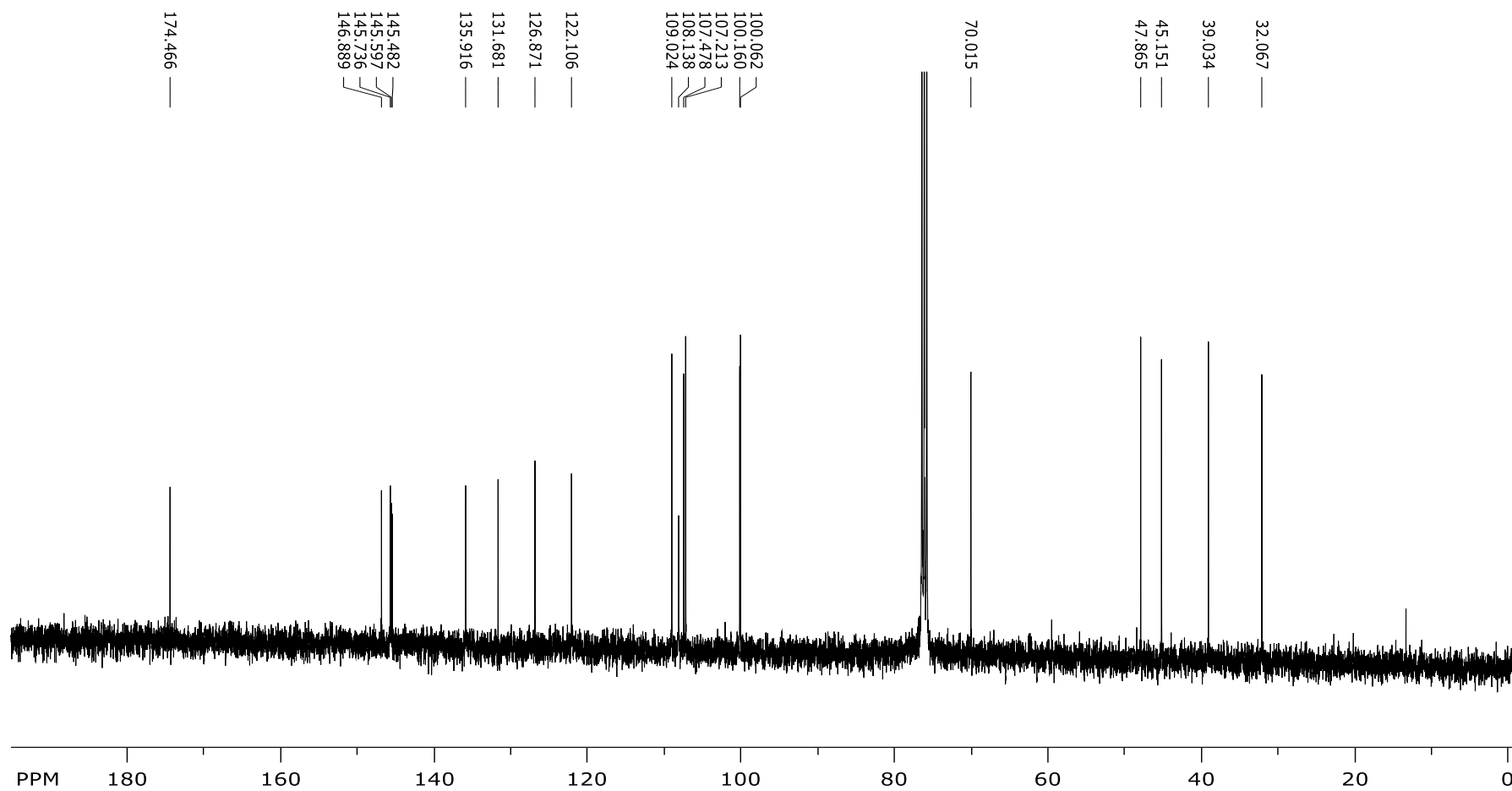


Figura 3. Espectros de RMN de ^{13}C do composto **7** em CDCl_3

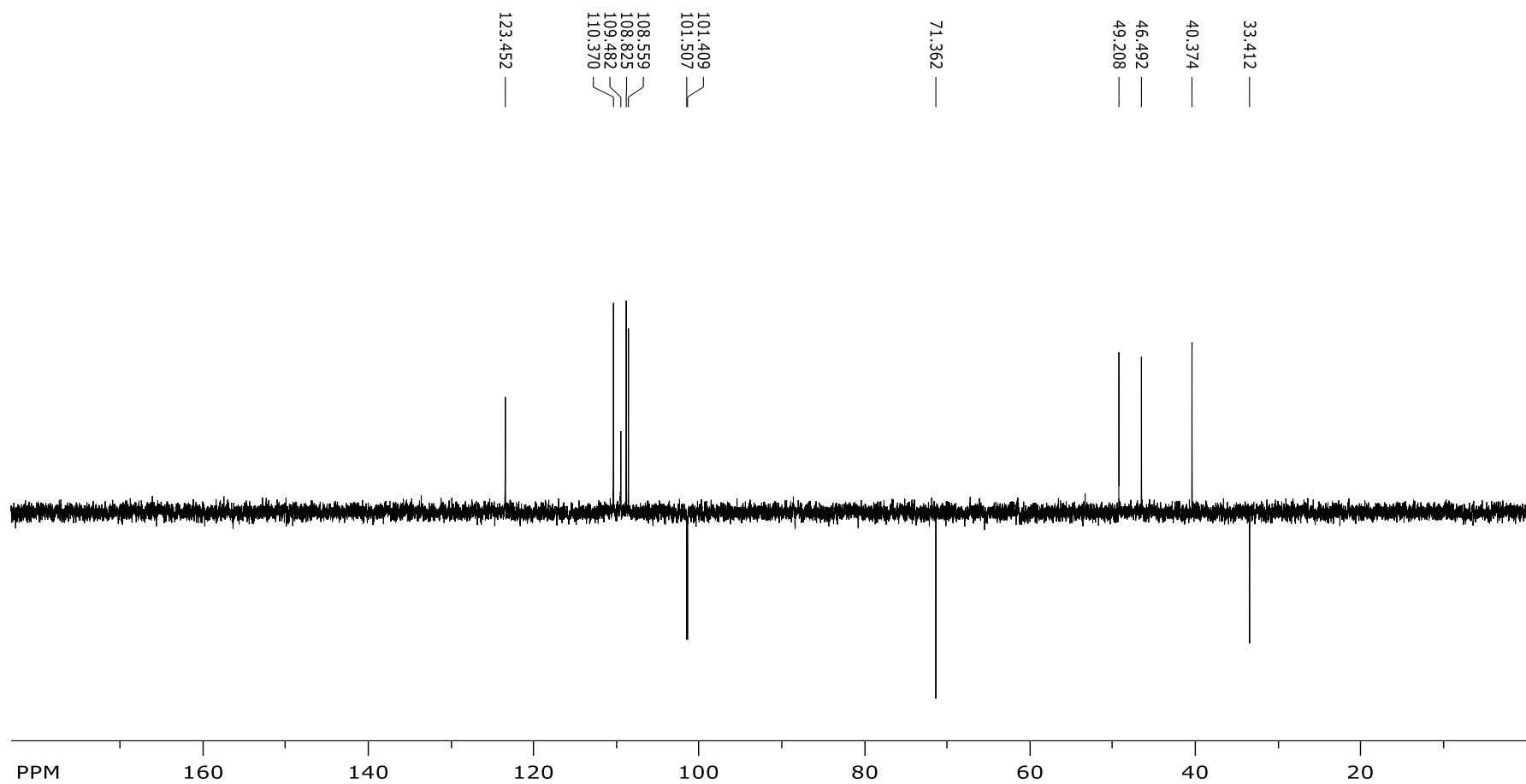


Figura 36. DEPT-135 do composto 7 em CDCl₃

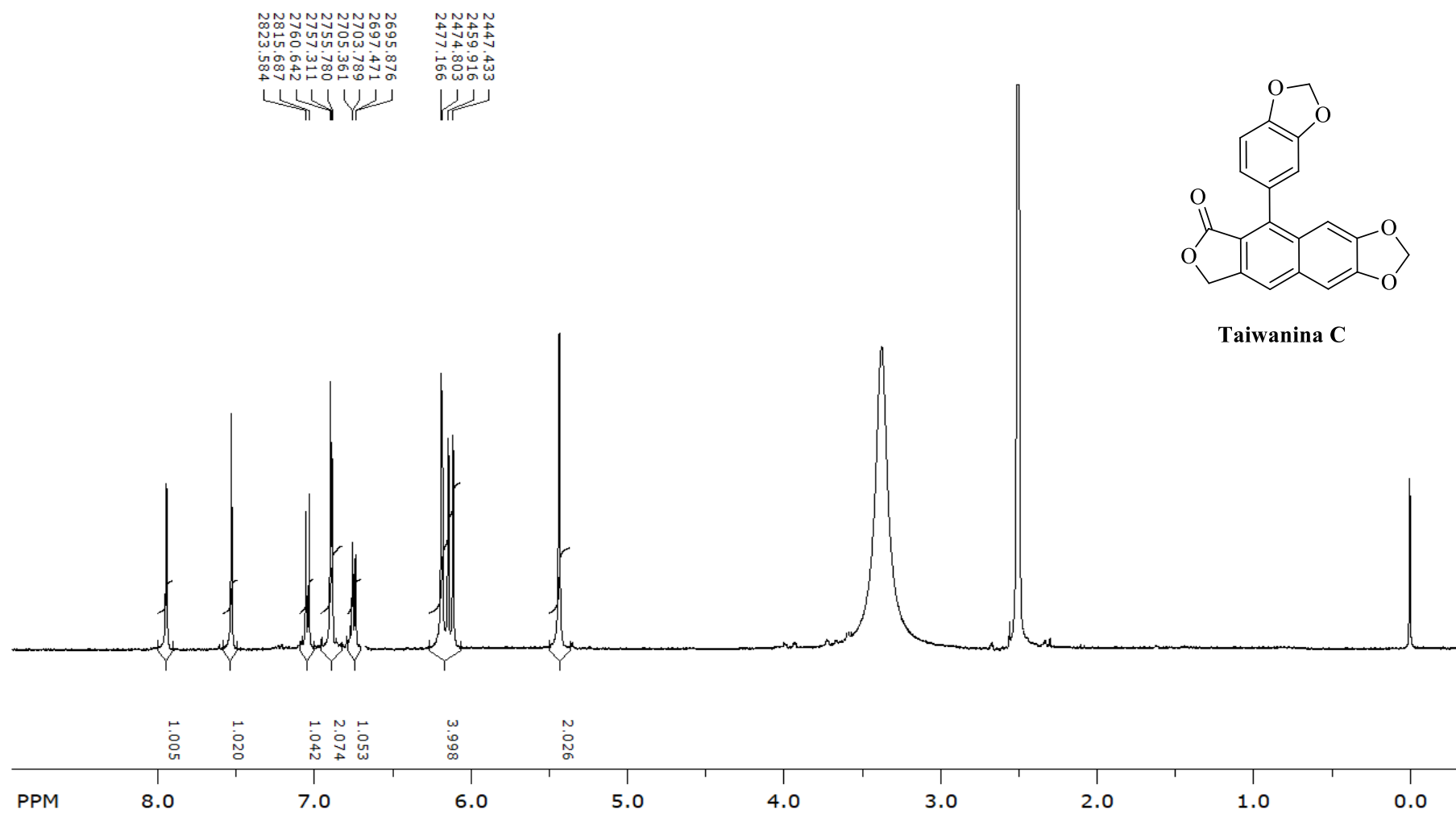


Figura 4. Espectros de RMN de ¹H da taiwanina C em DMSO-d₆

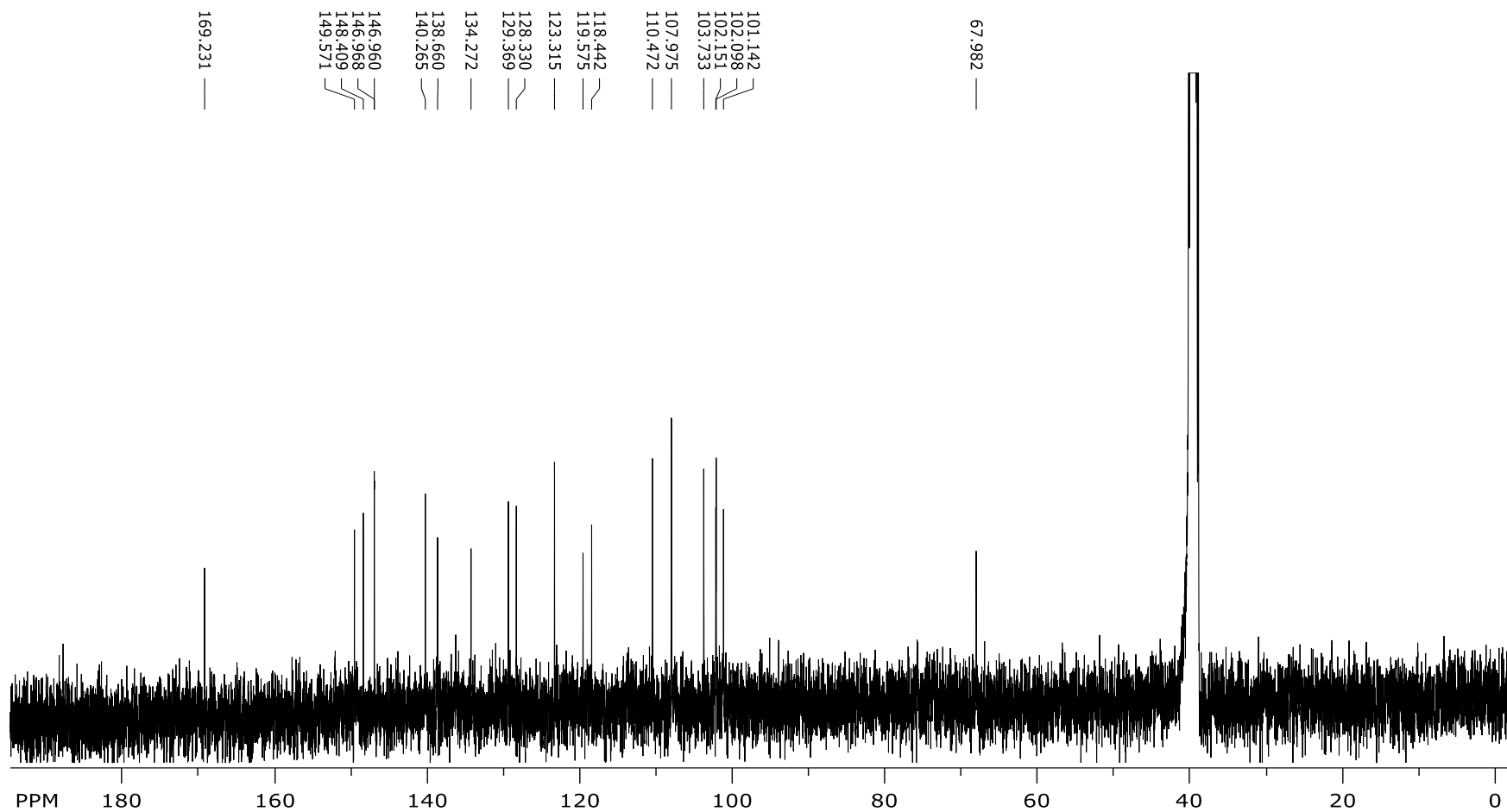


Figura 5. Espectros de RMN de ^{13}C da **taiwanina C** em DMSO- d_6

ANEXO C*Espectros de RMN dos compostos obtidos pela rota sintética 2*

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H do composto 8 após purificação em mistura com 8a em CDCl_3	110
Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8 após purificação em mistura com 8a em CDCl_3	103
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H do composto 10 em CDCl_3	112
Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10 em CDCl_3	113
Figura 43. DEPT-135 do composto 10 em CDCl_3	114

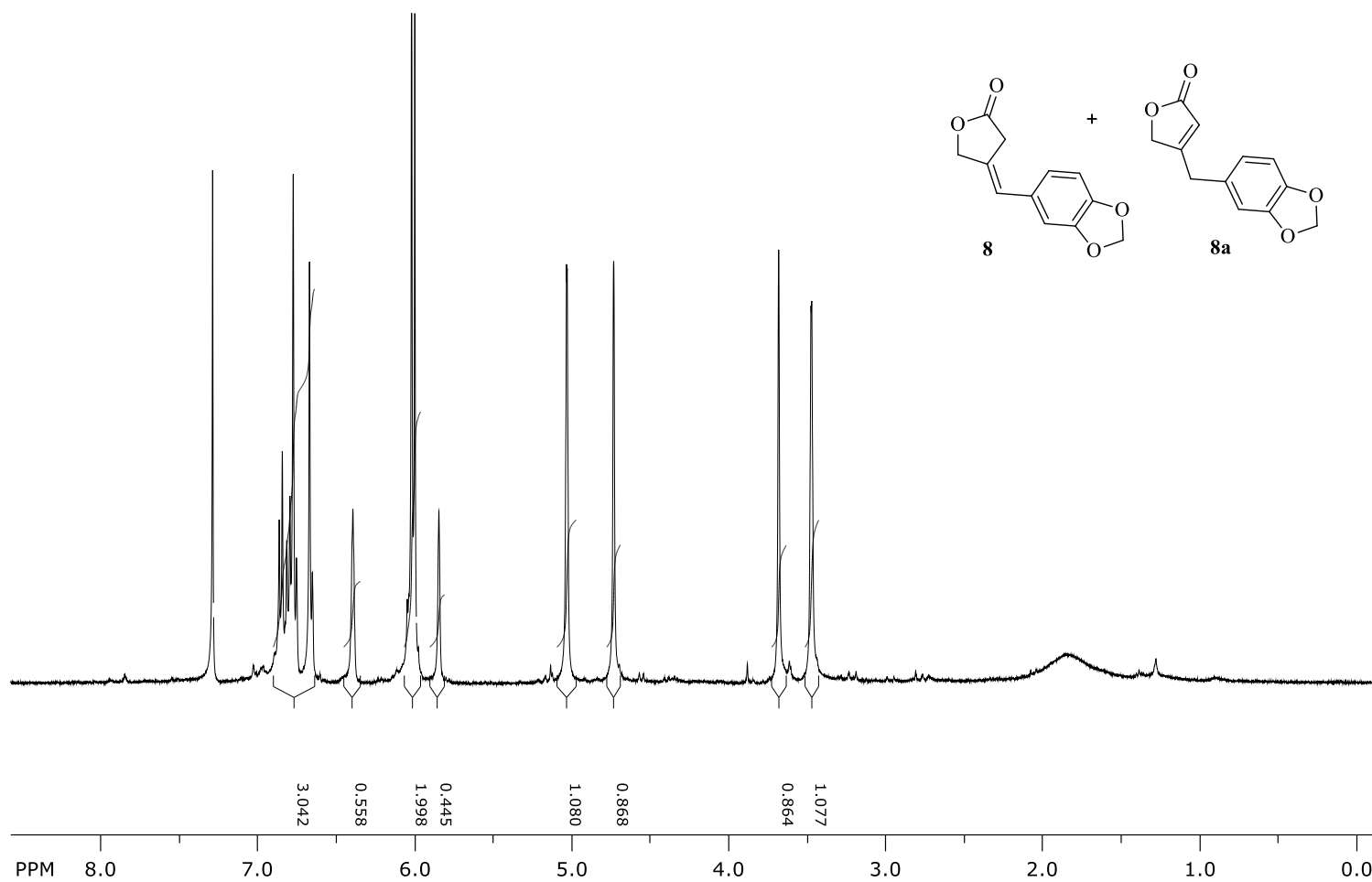


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H do composto **8** após purificação em mistura com **8a** em CDCl_3

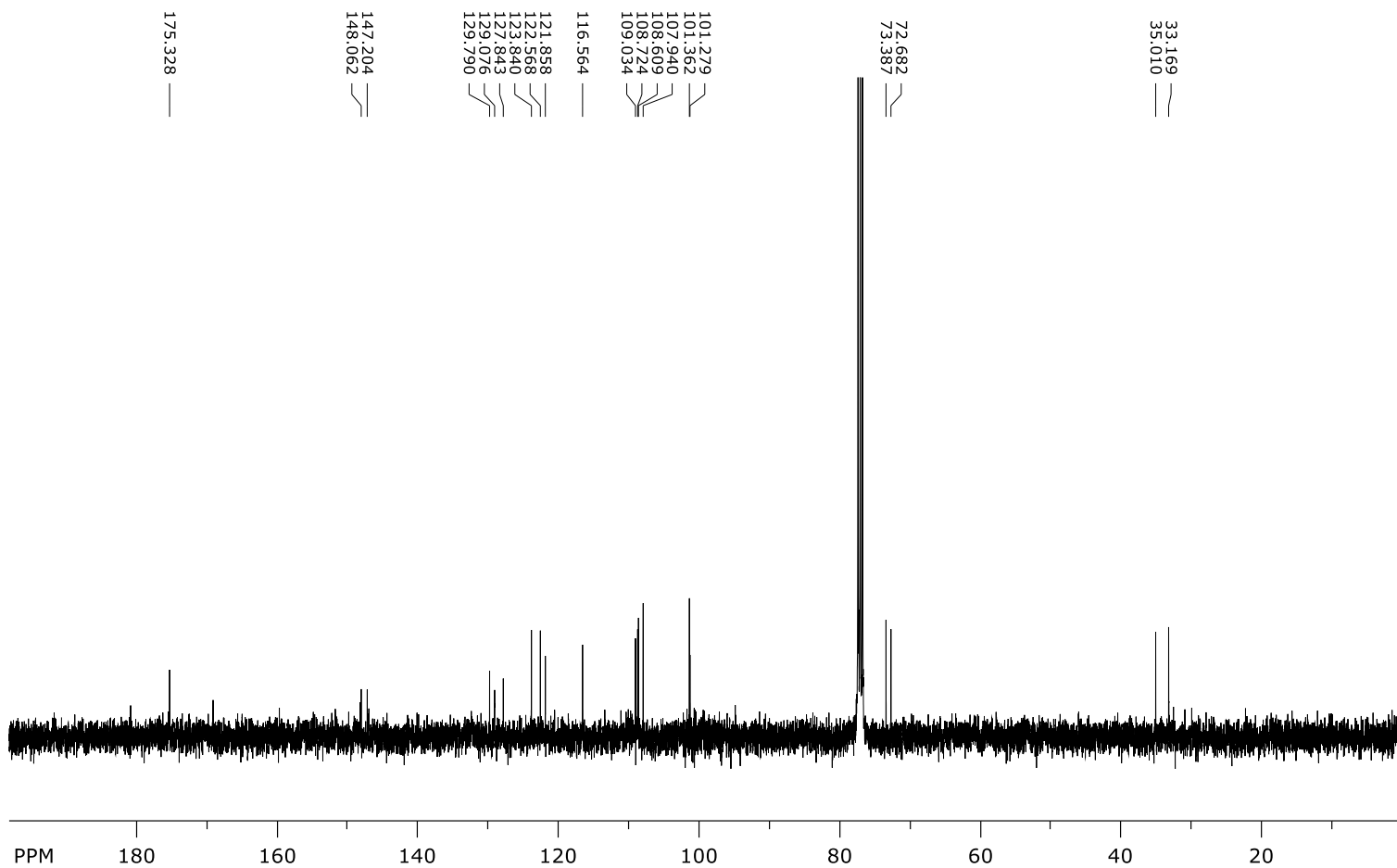


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8** após purificação em mistura com **8a** em CDCl_3

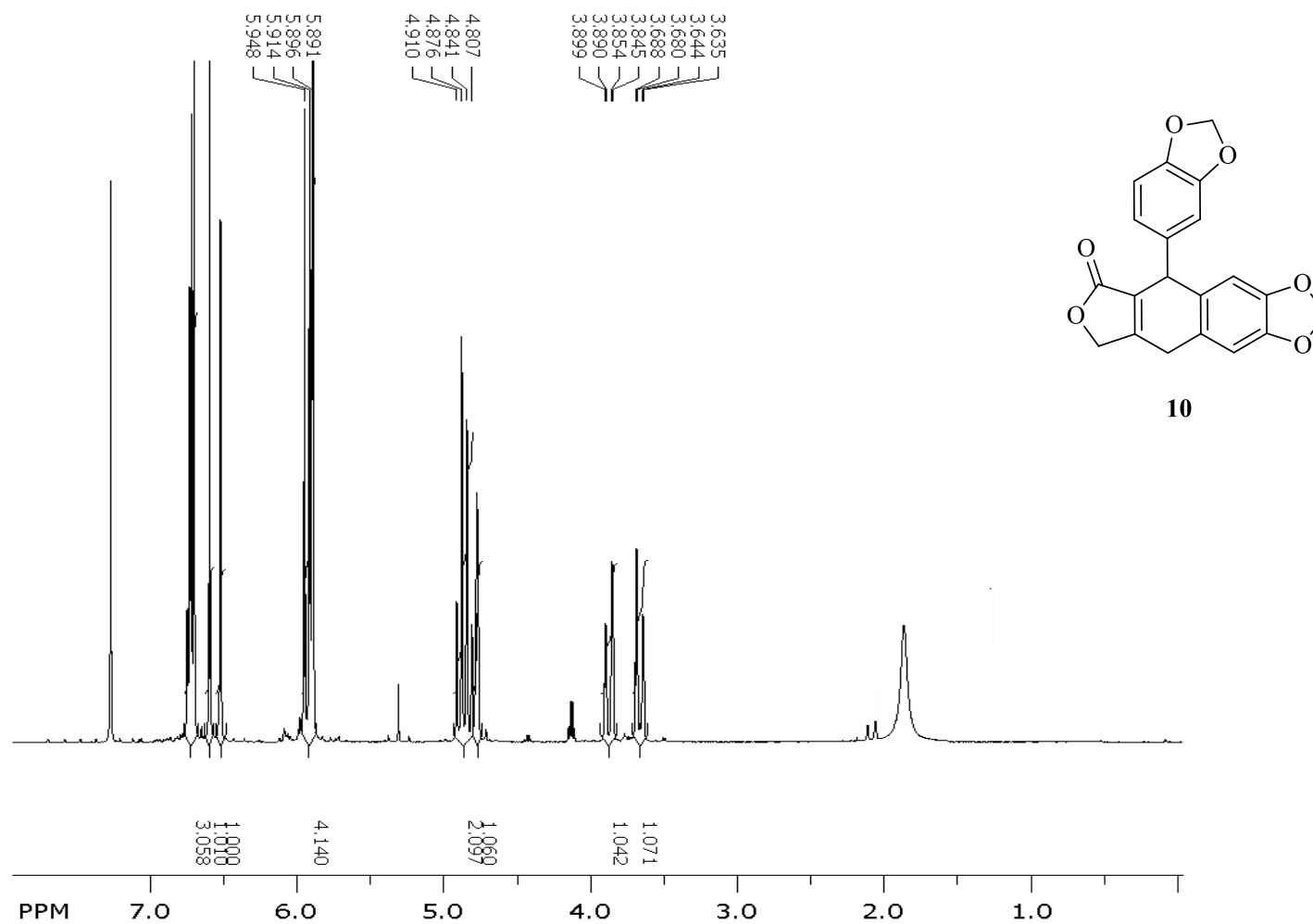


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H do composto **10** em CDCl_3

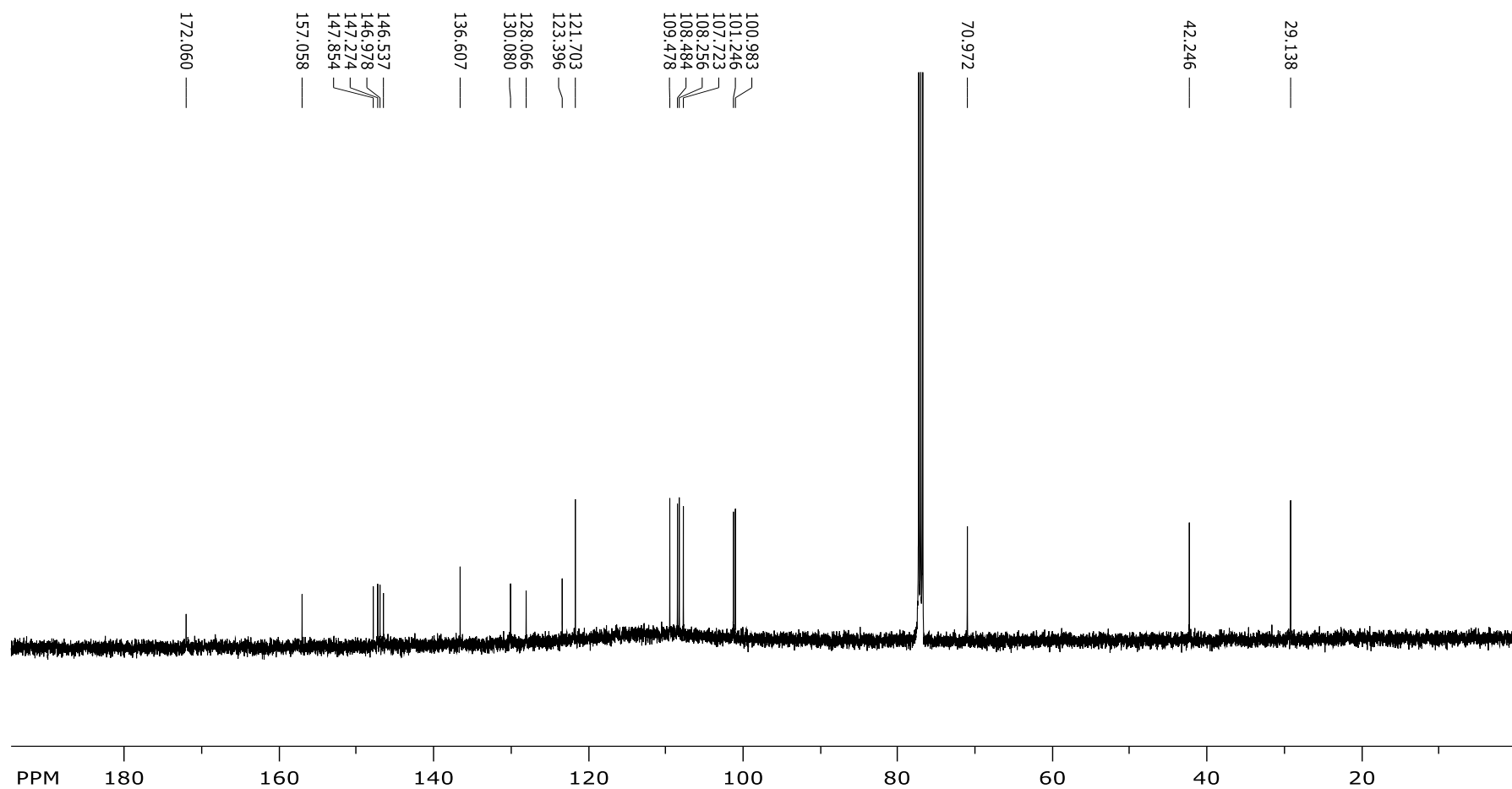


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** em CDCl_3

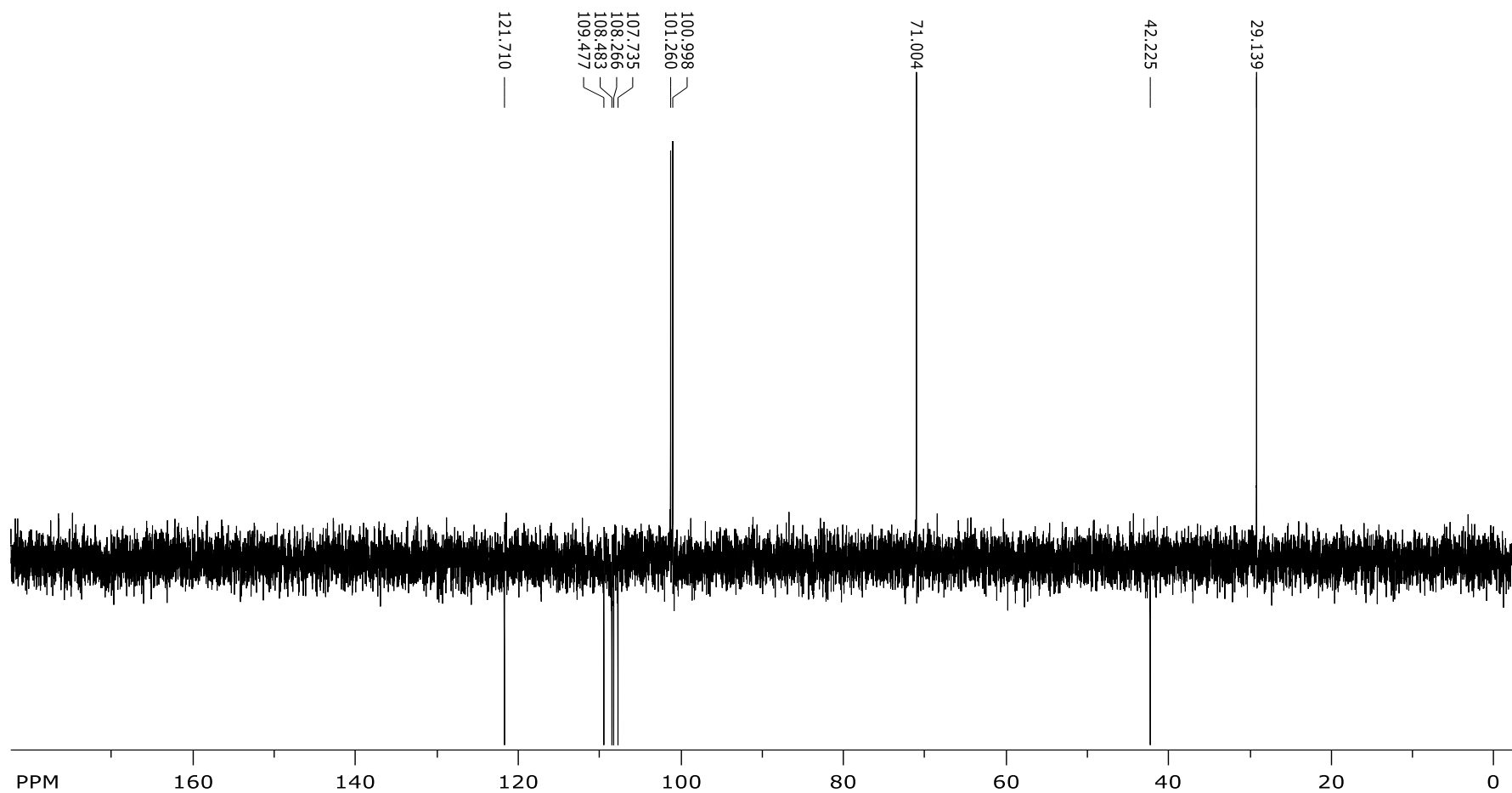


Figura 43. DEPT-135 do composto **10** em CDCl₃