

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Planejamento, síntese e avaliação bioquímico-farmacológica de chalconas e
seus derivados visando à atividade antitumoral**

CÍNTIA JANINE KIEKOW

PORTO ALEGRE, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Planejamento, síntese e avaliação bioquímico-farmacológica de chalconas e
seus derivados visando à atividade antitumoral**

Dissertação apresentada por
Cíntia Janine Kiekow
para a obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Grace Gosmann

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24.03.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo Seibert Lüdtke

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rafael Fernandes Zanin

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Kiekow, Cíntia Janine

Planejamento, síntese e avaliação bioquímico-farmacológica de chalconas e seus derivados visando à atividade antitumoral / Cíntia Janine Kiekow. -- 2014. 121 f.

Orientador: Grace Gosmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Chalcona. 2. Glioma. 3. Apoptose. 4. NF-kB. I. Gosmann, Grace, orient. II. Título.

*Agradecimentos à CAPES,
órgão que financiou a bolsa de estudos
para o desenvolvimento deste trabalho,
ao Laboratório 22- Bioquímica/ UFRGS,
à Central de RMN/ UFRGS
e à Central de Espectrometria de Massas / UFRGS,
os quais disponibilizaram equipamento e material necessários
para a realização dos experimentos práticos
na elaboração da presente dissertação.*

Agradecimentos

Aos meus pais, pela educação que me deram e pelo exemplo de luta, persistência e dedicação.

Aos meus irmãos e cunhados, pelo incentivo, carinho e companheirismo de sempre.

Ao meu namorado Milton, pelo companheirismo, paciência, momentos de descontração e apoio emocional.

Às minhas amigas e colegas Mônica, Soraia, Daniele, Lucimara, Bruna, Aline, Alexandra, Karine e Dioni pelos momentos de descontração e por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos colegas Pedro e Tatiane, pelo apoio, dedicação e otimismo ao nosso trabalho.

À Luciana Dalla Vechia pela amizade e por ter me incentivado no início da minha trajetória na Síntese Orgânica Medicinal.

À Professora Simone Gnoatto e aos colegas Cedric e Mauro pela amizade e discussões científicas.

Aos demais colegas do Laboratório de Fitoquímica: Cristiane, Denise, Bianca, Elenilson, Rafael, Laura, Adrine, Glória, Simone, Carulina, Diego, Artur, Caroline, Ivan, Francine e Thayse, pela amizade.

Aos colegas do Laboratório 22 da Bioquímica/ UFRGS, em especial ao Fabrício, pela paciência e dedicação ao me auxiliar nas avaliações bioquímico-farmacológicas.

À Professora Grace Gosmann pela orientação desde a iniciação científica, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo nas horas de desânimo e pelo carinho e afeto usual com os alunos.

Às técnicas Gabriela Wentz e Maribete Holtzschuh pela colaboração na obtenção dos espectros de RMN e massas.

Resumo

Gliomas malignos são os tumores mais comuns do sistema nervoso central em adultos sendo glioblastoma multiforme (GBM) o mais agressivo e o mais freqüente. Estudo preliminar do nosso grupo de pesquisa demonstrou que as chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40** foram compostos muito ativos em ensaios de viabilidade e contagem celular, utilizando células C6 de glioma de rato. Desta forma, propôs-se a avaliação bioquímico-farmacológica das chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40**, além do planejamento e síntese de duas séries respectivas de derivados desses últimos compostos, visando à atividade antitumoral em glioma. Essas séries foram planejadas a fim de avaliarmos o efeito de modificações estruturais na atividade biológica e resultaram na síntese de cinco compostos com rendimentos entre 4 e 55% que tiveram suas estruturas elucidadas por dados espectroscópicos. Desses últimos compostos, três são inéditos. **LAFIS 31** e **LAFIS 40** foram avaliados quanto aos seus efeitos na proliferação celular, citotoxicidade e mecanismo de ação em linhagens de glioma humana (U138) e de rato (C6). Ambos compostos também apresentaram efeitos citotóxicos em células U138. Embora sejam citotóxicos para as células de glioma, **LAFIS 31** e **LAFIS 40** não apresentaram atividade nestas mesmas células não tumorais, em concentrações aproximadamente duas vezes maior que a concentração ativa em glioma. Em todas as concentrações testadas (5 a 20 μM para **LAFIS 31** e 10 a 100 μM para **LAFIS 40**), estas chalconas não alteraram o ciclo celular de células C6 de glioma e o ensaio de morte de anexina/PI indicou a ausência de morte celular por necrose. Por outro lado, ambos os compostos aumentaram a morte apoptótica precoce. Entretanto, apenas **LAFIS 31** mostrou inibição de NF- κ B em células de glioma que poderia ser, pelo menos parcialmente, a causa de morte de apoptose. Assim, **LAFIS 31** e **LAFIS 40** são promissores protótipos para o tratamento de GBM no futuro.

Palavras- chave: chalcona, glioma, apoptose, NF- κ B.

Design, synthesis and biochemico-pharmacological evaluation of chalcones and derivatives for antitumor activity

Abstract

Malignant gliomas are the most common primary central nervous system tumors in adults and glioblastoma multiforme is the most aggressive and more frequent one. Our preliminary studies selected the chalcones **LAFIS 31** and **LAFIS 40** as active compounds in viability and cell counting assays using C6 rat glioma cells. Therefore, it was proposed the biochemico-pharmacological evaluation of chalcones **LAFIS 31** and **LAFIS 40** and, in addition, the design and synthesis of two series of their derivatives aiming to antitumor activity in glioma. These series were designed to evaluate the effect of structural modifications to the biological activity obtaining five compounds with yields between 4 and 55% which chemical structures were elucidated by spectroscopic data. Among these latter ones, three are new compounds. **LAFIS 31** and **LAFIS 40** were subjected to assays in order to explore their effects on cell proliferation, cytotoxicity and mechanism of action in human (U138) and rat (C6) glioma cell lines. Both compounds also presented cytotoxic effects in U138 human glioma cells. Although they were cytotoxic to glioma cells, **LAFIS 31** and **LAFIS 40** showed no activity in these same non-tumor cells at concentrations approximately twice the active one in glioma. In all tested concentrations (5 at 20 μ M in **LAFIS 31** and 10 at 100 μ M for **LAFIS 40**), these chalcones did not alter the cell cycle of C6 glioma cells and the annexin/PI death assay, indicating the absence of necrotic cell death. On the other hand, both compounds increased early apoptotic death. Moreover, only **LAFIS 31** showed inhibition of NF- κ B in glioma cells which could be, at least partially, the cause of apoptosis death. Thus, **LAFIS 31** and **LAFIS 40** are promising prototypes for the treatment of GBM in the future.

Keywords: chalcone, glioma, apoptosis, NF- κ B.

Lista de Figuras e Esquemas

ESTADO-DA-ARTE

Figura 1. Chalconas LAFIS 31 e LAFIS 40	23
Figura 2. Estruturas moleculares dos flavonoides.....	30
Figura 3. Derivados de chalconas com atividade antitumoral	32
Figura 4. Chalconas inibidoras diretas ou indiretas de NF- κ B.....	34
Figura 5. Chalconas inibidoras de glioblastoma	35
Figura 6. Flavonoides testados.....	36

CAPÍTULO II

Esquema 1. Estratégias para o planejamento de compostos com potencial atividade em glioma.	80
Esquema 2. Compostos da Série LAFIS 31	81
Esquema 3. Compostos propostos da Série LAFIS 40	81
Esquema 4. Abordagens disponíveis para síntese de ésteres.	86
Esquema 5. Síntese do LAFIS 313	87
Esquema 6. Mecanismo de reação da condensação aldólica em meio básico.	89
Esquema 7. Síntese do LAFIS 314	89
Esquema 8. Hidrogenação catalisada por Paládio.	90
Esquema 9. Síntese do LAFIS 404	91
Esquema 10. Mecanismo de reação da Acilação de Friedel-Crafts.	92
Esquema 11. Síntese do LAFIS 315	93
Esquema 12. Mecanismo de reação para a síntese de LAFIS 315	94
Esquema 13. Síntese de LAFIS 405	94
Figura 1. Espectro de infravermelho (ATR) do composto LAFIS 313	96
Figura 2. Espectro de RMN de ¹ H do composto LAFIS 313 (CDCl ₃ , 400 MHz).	97
Figura 3. Espectro de COSY do composto LAFIS 313 (CDCl ₃).	97
Figura 4. Espectro de APT do composto LAFIS 313 (CDCl ₃ , 101 MHz).	98
Figura 5. Espectro de HSQCAD do composto LAFIS 313 (CDCl ₃).	98
Figura 6. Espectro de infravermelho (ATR) do composto LAFIS 314	100
Figura 7. Espectro de RMN de ¹ H do composto LAFIS 314 (CDCl ₃ , 400 MHz).	100
Figura 8. Espectro de COSY do composto LAFIS 314 (CDCl ₃).	101
Figura 9. Espectro de APT do composto LAFIS 314 (CDCl ₃ , 101 MHz).	101
Figura 10. Espectro de HSQCAD do composto LAFIS 314 (CDCl ₃).	102
Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H do composto LAFIS 315 (CDCl ₃ , 400 MHz). ...	103
Figura 12. Espectro de COSY do composto LAFIS 315 (CDCl ₃).	103
Figura 13. Espectro de APT do composto LAFIS 315 (CDCl ₃ , 101 MHz).	104
Figura 14. Espectro de HSQCAD do composto LAFIS 315 (CDCl ₃).	104
Figura 15. LAFIS 313	106
Figura 16. LAFIS 314	107
Figura 17. LAFIS 404	108
Figura 18. LAFIS 315	109
Figura 19. LAFIS 405	110

Lista de Abreviaturas

- 5-FU- 5-Fluorouracil
- BHE- Barreira hematoencefálica
- COX- cicloxigenase
- DCC- *N,N'*- díciclo-hexilcarbodiimida
- DHU- Díciclohexilureia
- DMAP- 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina
- DMF- dimetilformamida
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- EGF- Fator de crescimento epidermal
- GBM- Glioblastoma multiforme
- GI₅₀- Concentração inibitória de 50 %
- IC₅₀- Concentração inibitória de 50 %
- IL-1 β - Interleucina 1beta
- IL-6- Interleucina 6
- iNOS- Óxido nítrico sintase induzível
- IV- Infravermelho
- LPS- Lipopolissacarídeos
- NF- κ B- Fator de transcrição nuclear kappa B
- OMS- Organização mundial da saúde
- PDGF- Fator de crescimento derivado de plaqueta
- PEGE2- Prostaglandina E2
- REA- Relação estrutura atividade
- RMN- Ressonância magnética nuclear
- RNS- Espécies reativas de nitrogênio
- ROS- Espécies reativas de oxigênio
- SNC- Sistema nervoso central
- TEA- Trietilamina
- TMS- Tetrametilsilano
- TMZ- Temozolomida
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. ESTADO-DA-ARTE	25
2.1. Glioma	27
2.2. NF- κ B	28
2.3. Flavonoides	30
2.4. Chalconas e atividade antitumoral	31
2.5. Referências	37
3. OBJETIVOS	43
4. CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICO-FARMACOLÓGICA DAS CHALCONAS LAFIS 31 E LAFIS 40	47
5. CAPÍTULO II: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DOS DERIVADOS SINTÉTICOS	77
5.1. Introdução.....	79
5.2. Estratégia para o planejamento racional de novos compostos antitumorais em glioma	79
5.3. Revisão da Literatura.....	81
5.4. Resultados e Discussão	87
5.5. Parte experimental.....	105
5.6. Conclusões.....	111
5.7. Referências	111
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
7. ANEXO	119
7.1. Parecer do Comitê de Ética para o uso de animais.....	121

1. INTRODUÇÃO

Gliomas malignos são os tumores mais comuns do sistema nervoso central em adultos sendo glioblastoma multiforme (GBM) o mais agressivo e o mais freqüente. Sua classificação pela organização mundial da saúde é astrocitoma de grau IV, o mais maligno tumor cerebral (Nones *et al.*, 2010).

Devido sua localização e características de invasividade, gliomas são conhecidos pelo seu difícil tratamento, fazendo-se necessários mais estudos que contribuam com avanços terapêuticos e, aumentem a sobrevida média dos pacientes que é de aproximadamente um ano (Nones *et al.*, 2010). Além da invasividade, mecanismos de resistência a químico e radioterapia também são relatados, dificultando ainda mais o tratamento dos pacientes (Erstad e Cusack Jr, 2013).

Em busca de um alvo para o tratamento de tumores, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) têm sido destacado uma vez que atua na expressão de diversos genes responsáveis pelo desenvolvimento e progressão tumoral (Erstad e Cusack Jr, 2013). Em glioblastoma parece ser um alvo ainda mais promissor por encontrar-se superexpresso em tais tumores, além de estar relacionado com mau prognóstico e estar envolvido com resistência a químico e radioterapia (Brown e Law, 2006; Raychaudhuri *et al.*, 2007).

Atividade antitumoral de flavonoides tem sido bastante relatada e estudo preliminar do nosso grupo, avaliando as diferentes estruturas moleculares dos flavonoides na viabilidade e morte celular em linhagem C6 de glioma de rato, apontou as chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40** (Figura 1) como as mais promissoras em glioma.

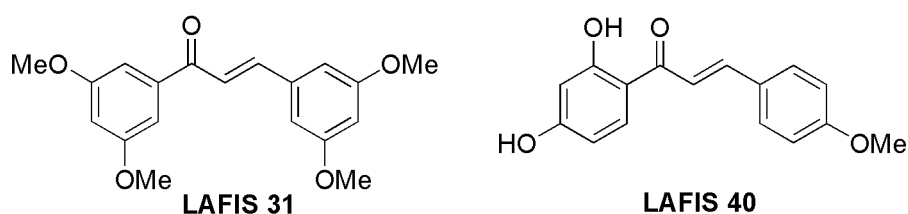


Figura 1: Chalconas LAFIS 31 e LAFIS 40.

Pelos resultados apresentados e pelo grande potencial de flavonoides como agentes antitumorais, e em especial pelos padrões moleculares menos complexos e

pelas moléculas mais flexíveis de chalconas, o planejamento e a síntese de derivados desses últimos compostos está sendo proposta, bem como a avaliação da atividade antitumoral de **LAFIS 31** e **LAFIS 40** visando elucidar seus mecanismos de ação, incluindo a atividade sobre NF- κ B.

Assim, neste trabalho, primeiramente será apresentado o estado-da-arte sobre o tema, destacando os aspectos relevantes para o desenvolvimento deste estudo, e seus objetivos.

Em seguida, no Capítulo I será apresentada a avaliação bioquímico-farmacológica das chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40** visando elucidar o mecanismo de ação da atividade antitumoral.

No Capítulo II será introduzida a estratégia de planejamento racional utilizada, a revisão de literatura dos mecanismos sintéticos utilizados para a síntese desses derivados, finalizando com a apresentação e discussão da síntese das moléculas planejadas.

Desta forma, se espera contribuir para a descoberta de novos protótipos para avanços terapêuticos em glioma.

2. ESTADO-DA-ARTE

2.1. Glioma

Gliomas são tumores originados de células da neuroglia (Goodenberger e Jenkins, 2012). Entre as células gliais, temos os astrócitos que são os mais abundantes tipos celulares presentes no cérebro e medula espinhal e exercem funções importantes relacionadas com a manutenção da homeostasia do sistema nervoso central (SNC), incluindo suporte do metabolismo neuronal, regulação excitatória e inibitória da transdução sináptica e absorção de neurotransmissores (Morioka *et al.*, 2014).

Os gliomas compõem aproximadamente 30% dos tumores do SNC e 80% dos tumores malignos cerebrais (Goodenberger e Jenkins, 2012). Pela Organização Mundial da Saúde (OMS), podem ser classificados em astrocitoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma misto e ependimoma. Adicionalmente são subdivididos em diferentes graus (I a IV) levando em consideração a histopatologia dos tumores, especialmente presença de pleomorfismo nuclear, aumento da atividade mitótica e celularidade, proliferação de células endoteliais e necrose (Goodenberger e Jenkins, 2012). Esta classificação é importante devido sua associação com o potencial de malignidade, resposta ao tratamento e sobrevida dos pacientes (Wang e Jiang, 2013).

Glioblastoma multiforme (GBM) é o glioma mais comum do SNC em adultos, sendo classificado pela OMS como astrocitoma de grau IV, o mais maligno tumor cerebral com sobrevida média de aproximadamente um ano (Nones *et al.*, 2010). Como características, GBM apresenta-se altamente vascularizado, invasivo, agressivo, heterogêneo tanto na citologia quanto na genética e resistente a fármacos, entretanto, é considerado um tumor local, uma vez que muito raramente proporcionam metástases (Wang e Jiang, 2013; Mohme *et al.*, 2014).

O tratamento sugerido para esses tumores é a cirurgia, associada à radioterapia e seguida de quimioterapia, entretanto, a excisão completa é praticamente impossível devido à natureza infiltrativa destes tumores nos tecidos normais circundantes (Behin *et al.*, 2003) e são tumores conhecidos pela sua resistência a quimioterapia e radioterapia (Iwanaga *et al.*, 1998).

A utilização da quimioterapia é limitada devido às restrições impostas pela barreira hematoencefálica (BHE) (Braganhol *et al.*, 2007). Tal impedimento faz com que poucos fármacos quimioterápicos demonstrem alguma atividade contra

glioblastoma, sendo assim, os compostos geralmente utilizados são temozolomida (TMZ) e nitrosoureia, agentes alquilante e cloroetilante, respectivamente, cujas características altamente lipofílicas permitem sua passagem pela BHE (Leonetti *et al.*, 2012).

Em resposta à tensão induzida pela irradiação, proteínas com capacidade protetora são sintetizadas ou ativadas pelas células, induzindo resistência (Iwanaga *et al.*, 1998; Erstad e Cusack Jr, 2013).

Apesar dos avanços nos tratamentos convencionais, a incidência e mortalidade para glioma pouco mudou nas últimas décadas, fazendo-se necessária a busca por medicamentos que sejam mais específicos, eficazes e que aumentem a sobrevida dos pacientes (Mohme *et al.*, 2014).

Na busca por novos agentes antitumorais, destaca-se a supressão da atividade de NF- κ B como alvo promissor, uma vez que este fator de transcrição controla a expressão de vários genes envolvidos na evasão de apoptose, regulação do crescimento, promoção do ciclo celular e angiogênese, processos que auxiliam no desenvolvimento e progressão tumoral. Além disto, evidências recentes sugerem sua contribuição no desenvolvimento de quimio e radioterapia, que são causas de falhas em tratamentos e mortes em vários cânceres (Erstad e Cusack Jr, 2013).

2.2. NF- κ B

NF- κ B é um fator de transcrição que controla a expressão de genes envolvidos em vários processos fisiológicos incluindo desenvolvimento, regulação da imunidade, inflamação aguda e crônica, remodelação de citoesqueleto, adesão celular, sobrevida e apoptose (Erstad e Cusack Jr, 2013). Formada por homo ou heterodímeros que compreendem membros da família de proteínas Rel. (p50/p105, p52/p100, p65, c-Rel e RelB). NF- κ B em condições não estimuladas, está sob a forma de um complexo citoplasmático ternário e inativo, interagindo com proteínas inibidoras da família de I κ B. Após a estimulação por citocinas (fator de necrose tumoral alfa-TNF- α e interleucina-1beta - IL-1 β), fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal-EGF e fator de crescimento derivado de plaqueta-PDGF), lipopolissacarídeos (LPS), fármacos anticâncer (cisplatina, doxorubicina e vincristina) e outros estímulos de estresse, I κ Bs são fosforilados por proteínas IKK (proteínas quinase de I κ B) liberando NF- κ B ativo, que desloca para o núcleo e se liga à

seqüências promotoras de genes no DNA, desempenhando o controle de suas expressões (Zanotto-Filho *et al.*, 2011; Venkateswararao *et al.*, 2012).

Na busca por novos agentes anticancerígenos, NF- κ B tem se destacado como um potencial alvo terapêutico. Neste âmbito, pesquisadores procuram bloquear a atividade de NF- κ B através de inibidores diretos de IKK, evitando a fosforilação de I κ B e conseqüente ativação de NF- κ B, ou inibidores indiretos que atuem nas vias que levam a fosforilação de I κ B, como compostos antioxidantes, antiinflamatórios, entre outros (Zanotto-Filho *et al.*, 2011; Erstad e Cusack Jr, 2013).

Em situação não patológica, NF- κ B regula o estado de oxidação promovendo enzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), como a cicloxigenase (COX) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), respectivamente, mas em alguns cânceres, embora o mecanismo não esteja estabelecido, NF- κ B regula ROS de maneira a ativar continuamente NF- κ B, prevenindo apoptose (Erstad e Cusack Jr, 2013). Neste sentido, destacam-se os agentes antioxidantes, pois a presença de ROS e RNS, no organismo, podem levar a danos oxidativos e nitração das bases de DNA, aumentando o risco de mutações no DNA e levando ao câncer (Prasad *et al.*, 2010), ou podem atuar nas vias de sinalização para ativação de NF- κ B, dando suporte à manutenção e desenvolvimento de tumores (Prasad *et al.*, 2010).

Embora não se saiba exatamente o mecanismo pelo qual os agentes antiinflamatórios não esteroides (AINES) previnem a formação e o desenvolvimento tumoral, parte pode ser atribuída à inibição de COX-2 e conseqüente diminuição da atividade de NF- κ B. Além da inibição de COX-2, agentes antiinflamatórios podem inibir a atividade de NF- κ B via supressão de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e (IL-1 β), presentes na via de ativação clássica de NF- κ B (Erstad e Cusack Jr, 2013).

Em glioblastoma, estudos utilizando análise de biópsia identificaram a superexpressão de NF- κ B em comparação com tecidos cerebrais normais (Raychaudhuri *et al.*, 2007). Outros relatos, identificaram uma correlação positiva entre a atividade de NF- κ B e um mau prognóstico em GBM (Brown e Law, 2006). Além disso, o conhecido envolvimento de NF- κ B na resistência em radioterapia (Erstad e Cusack Jr, 2013) e na resistência induzida por agentes quimioterápicos,

tornam o NF- κ B um alvo de estudo promissor na busca por agentes antitumorais eficazes (Prasad *et al.*, 2010).

2.3. Flavonoides

Flavonoides são compostos polifenólicos amplamente presentes na natureza, sendo os mais abundantes antioxidantes utilizados na dieta humana (Nones *et al.*, 2010). Estruturalmente podem ser subdivididos em: chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas. Como podemos observar na figura 2, as chalconas são flavonoides sem o anel C, enquanto os demais apresentam este anel. Esta característica química das chalconas determina uma maior flexibilidade de sua estrutura (Prasad *et al.*, 2010).

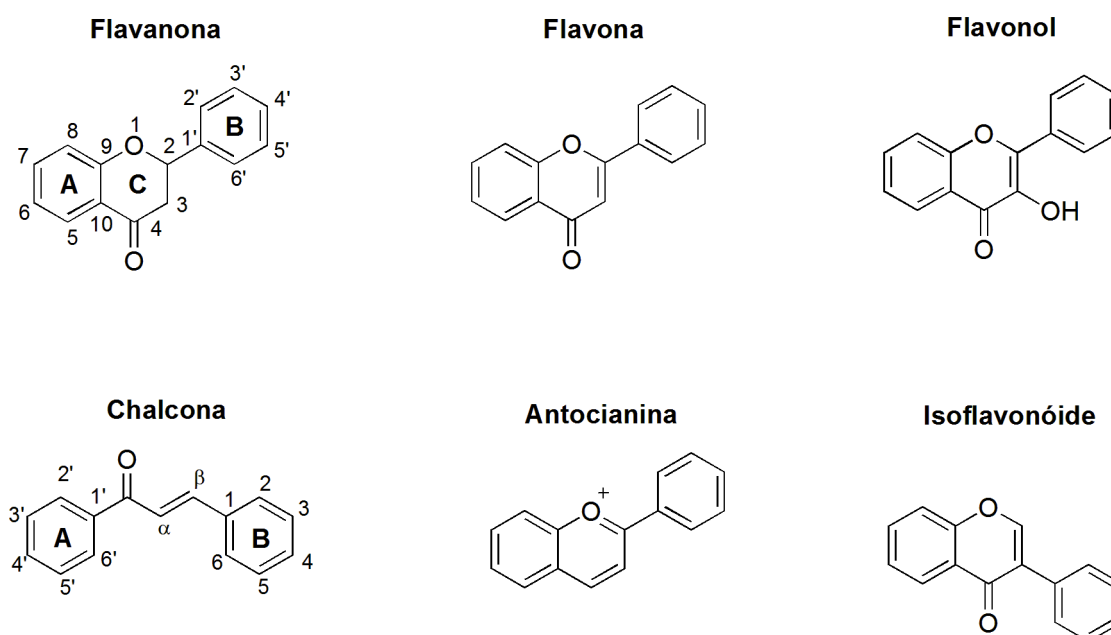


Figura 2. Estruturas moleculares dos flavonóides.

Além da atividade antioxidante, aos flavonoides são relatadas as atividades: antiinflamatória, gastroprotetora, cardioprotetora, antibiótica, antiprotozoária, inseticida, antileishmania, anticolinérgica, anticoagulante, antimutagênica, quimiopreventiva e anticâncer. Em relação à atividade anticâncer, há relatos de que flavonoides inibem a diferenciação, a proliferação e a angiogênese, induzem apoptose, reduzem a migração, a invasão e a aderência, reverterem a

multirresistência, além de suprimirem processos inflamatórios que estão relacionados às neoplasias (Mojzis *et al.*, 2008b; Prasad *et al.*, 2010; Ravishankar *et al.*, 2013).

Prasad e colaboradores (2010) relacionaram as atividades de vários flavonoides na prevenção e tratamento de câncer indicando como alvos da sua importante atividade antiinflamatória, a inibição tanto de NF- κ B como de COX-2, iNOS, óxido nítrico (NO), IKK, ou prostaglandina E2 (PGE2) que são enzimas e proteínas que podem levar a ativação de NF- κ B (Prasad *et al.*, 2010).

Tentando relacionar a atividade antitumoral de flavonoides com suas estruturas químicas, um estudo *in vitro* com células de carcinoma renal, adenocarcinoma mamário e adenocarcinoma de cólon avaliou as diferentes estruturas moleculares dos flavonoides e observou a diminuição da atividade antitumoral no sentido chalcona > flavanona > flavona, sugerindo a importância da flexibilidade dos compostos na atividade antitumoral (Cabrera *et al.*, 2007).

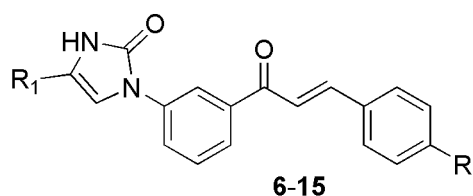
2.4. Chalconas e atividade antitumoral

Da literatura se tem relatos das atividades antioxidante (Bandgar *et al.*, 2012b; Narsinghani *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2013; Serifi *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013), citotóxica (Sahu *et al.*, 2012), anticancerígena (Tronina *et al.*, 2013b), antimicrobiana (Raj *et al.*, 2013; Tronina *et al.*, 2013a), antidiabética (Park *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2013), anti-úlceras (Choudhary *et al.*, 2012), antiparasitária (Roussaki *et al.*, 2013), anti-histamínica (Sahu *et al.*, 2012), antimalárica (Kumar *et al.*, 2010), cardioprotetora (Annapurna *et al.*, 2012) e antiinflamatória (Choudhary *et al.*, 2012). Tais atividades aliadas aos ensaios pré-clínicos demonstrando que estes compostos atingem concentrações plasmáticas razoáveis e são bem tolerados (Sahu *et al.*, 2012), colocam as chalconas como alvo de numerosas pesquisas.

Em relação à atividade antitumoral de chalconas sintéticas, podemos destacar a série de dez chalconas com anel imidazólico (presente em compostos com amplo espectro de atividades biológicas incluindo atividade anticâncer) (Entrada 1. Figura 3) que foram testadas para 53 linhagens celulares de câncer, incluindo leucemia, pulmão, cólon, SNC, melanoma, ovário, renal, próstata e mama, e três compostos (**6**, **7** e **8**) se destacaram com boa atividade anticâncer, fornecendo valores de GI₅₀ entre 1,26 e 13,9 μ M (Kamal *et al.*, 2010).

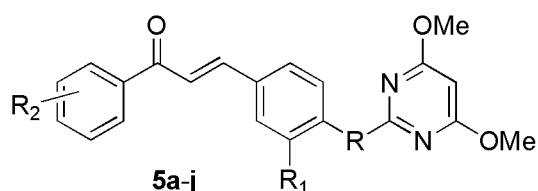
Em outro trabalho, onze derivados de chalconas contendo grupo pirimidinila (representante de uma classe de compostos heterocíclicos com vastas aplicações biológicas) (Entrada 2. Figura 3) foram sintetizados e testados quanto ao efeito citotóxico em algumas linhagens celulares de câncer humano, incluindo carcinoma oral (KB), nasofaríngeo (CNE2), gástrico (MGC_803), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e leucemia (K562), e três compostos (**5b**, **5g** e **5i**) apresentaram atividade citotóxica contra certas células de câncer mais potente que 5-Fluorouracil (5-FU), quimioterápico utilizado para câncer de mama (Jin *et al.*, 2013).

Entrada 1. Derivado imidazólico.



6: R= 4-OH,3-OMe R₁= Fenil
7: R= 4-OH,3-OMe R₁= 4-Metóxi-fenil
8: R= 4-OH,3-OMe R₁= 4-Cloro-fenil

Entrada 2. Derivado pirimidinila.



5b: R₁= H R₂= 4-Me
5g: R₁= OMe R₂= 4-OMe
5i: R₁= Cl R₂= H

Figura 3. Derivados de chalconas com atividade antitumoral.

A implicação de chalconas na dinâmica de NF- κ B também tem sido demonstrada. Isoliquiritigenina, (Figura 4) uma chalcona isolada de *Glycyrrhiza uralensis*, com conhecida atividade supressora de COX-2 em células RAW 264.7 e efeito antiproliferativo em células de câncer de cólon por induzir apoptose, foi investigada quanto a atividade sobre NF- κ B. Sua atividade antiinflamatória foi atribuída à *down-regulation*, concentração dependente (0,4 a 1,6 μ M), de iNOS, COX-2, TNF- α e interleucina-6 (IL-6) por inibição de NF- κ B via supressão da fosforilação de IKK, ERK1/2 e p38 em macrófagos RAW 264.7 (Kim *et al.*, 2008).

Em outro estudo, foram sintetizadas três séries de chalconas a partir de chalconas com conhecida atividade inibidora de NF- κ B para estabelecer a relação entre estrutura e atividade antitumoral em câncer de pulmão. Como resultado, o

padrão de substituição de hidroxilas e metoxilas nos anéis influenciam a citotoxicidade em células cancerosas de pulmão (A-549). A chalcona **11a** (Figura 4), além de ser a mais citotóxica (IC_{50} de 5,1 μ M) também foi capaz de suprimir o crescimento do câncer pulmonar em estudo *in vivo* de xenoenxerto na dose intraperitoneal de 1mg/rato/dia durante 6 dias, com tratamento bem tolerado, não apresentando sinais de toxicidade. Parte da atividade da chalcona foi atribuída à inibição de NF- κ B devido ao efeito inibitório em IKK β e IRAK4, duas cinases ativadoras de NF- κ B. A redução da insaturação da chalcona acarretou perda da atividade biológica, desta forma, foi proposto que a atividade das chalconas como supressora da via de NF- κ B estaria no seu potencial em inibir diretamente a IKK β , por modificações covalentes em IKK β devido à presença de α - β insaturação na sua estrutura (Srinivasan *et al.*, 2009). A presença da α , β -insaturação também foi considerada crucial em estudo de relação estrutura atividade (REA) de chalconas na inibição de NF- κ B em macrófagos (RAW 264.7) (Venkateswararao *et al.*, 2012).

Como outros indicativos da relação direta ou indireta de chalconas com a via de NF- κ B, podemos citar a atividade de 4,2',5'-triidróxi-4'-metóxi-chalcona (**TMC**) (Figura 4), isolada de *Dalbergia odorifera*, na supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios NO, PGE2, TNF- α , IL-1, degradação e fosforilação de I κ B- α , podendo ser um agente benéfico no tratamento de doenças inflamatórias (Lee *et al.*, 2013).

Em outro trabalho, a atividade de 2',4',6'-tris(metoximetoxi) chalcona (**TMMC**) (Figura 4) na redução da produção de NO por inibição da expressão de iNOS, diminuiu a degradação de I κ B, levando a inibição do deslocamento de NF- κ B para o núcleo em macrófagos ativados por LPS (IC_{50} de 2,6 μ M) (Lee *et al.*, 2006). Outro estudo demonstra a atividade de 3'-bromo-2'-hidróxi-4',6'-dimetóxi-3-piridinil-chalcona (**4k**) (Figura 4) na inibição de TNF- α com IC_{50} de 0,1 μ M (Bandgar *et al.*, 2012a).

A pronunciada atividade de chalconas em inibir NF- κ B, que sabemos estar superexpresso (Raychaudhuri *et al.*, 2007) e relacionado a um mau prognóstico em glioblastoma (Brown e Law, 2006), nos chamou a atenção para a atividade de chalconas em glioblastoma.

Dos poucos estudos relatados tem-se que *trans*-4-iodo-4'-boranil-chalcona (**TLBC**) (Figura 5) foi capaz de inibir de maneira dose dependente a proliferação de linhagens celulares de glioma (A172, U87MG, T98G, U251, YH13, SF126, C6 e 9L) com IC₅₀ entre 5,5 e 25,5 µM. Também induziu apoptose e parada no ciclo celular independente de alterações no gene de supressão tumoral p53, mas o efeito citotóxico foi caspase dependente. Em ensaio *in vivo*, num modelo de xenotransplante em rato com células de glioma (U251), a administração intraperitoneal do composto na dose de 20 mg/kg por 14 dias reduziu o volume do tumor à 44% comparado ao controle (Sasayama *et al.*, 2007).

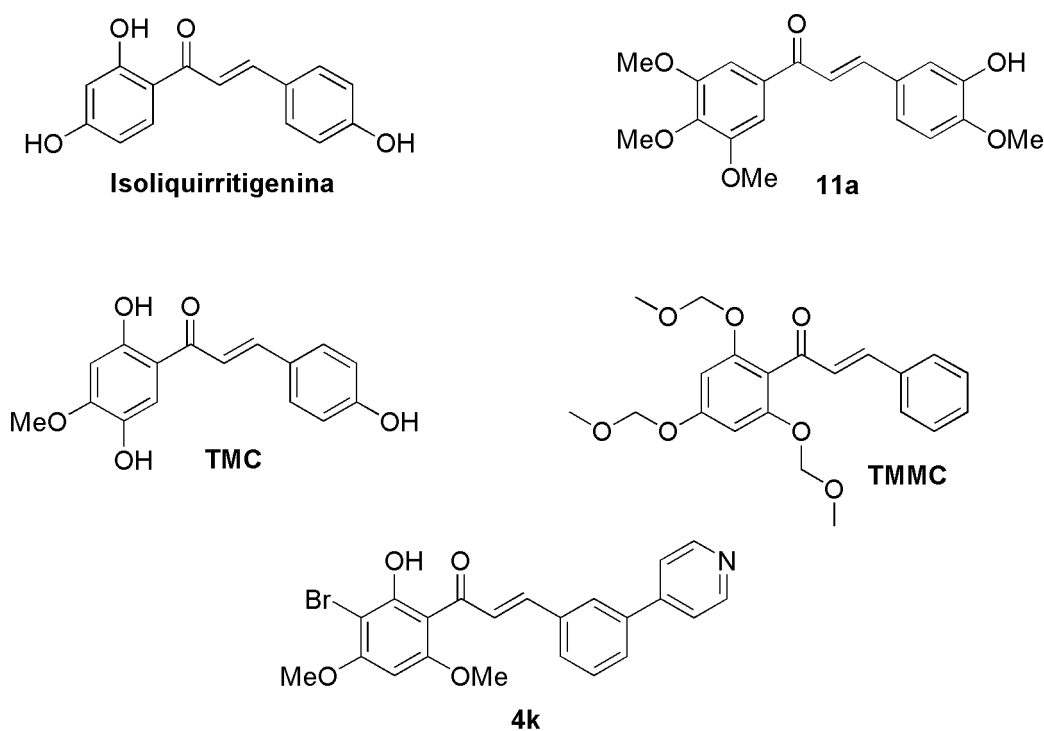


Figura 4. Chalconas inibidoras diretas ou indiretas de NF-κB.

O composto 4'-acetoamido,4-hidróxi-chalcona (**AHC**) (Figura 5) reduziu a migração, invasão e formação de colônia em células de glioma U87MG, U373MG e T98G de maneira concentração dependente (1 a 100 µM), por aumento da expressão de tropomiosina. A administração intraperitoneal de 1 mg/kg, 5 dias por semana durante 4 semanas inibiu o crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto tumoral (U87MG) em ratos (Ku *et al.*, 2010).

A atividade antiproliferativa de duas chalconas (**1** e **2**) (Figura 5) análogas à combretastatina A4, uma hidroxilada e outra complexada com platina, foi avaliada em linhagens neurais normais (astroglia) e em linhagens de glioma (U87MG e C6). Ambos compostos causaram pronunciada inibição da proliferação celular com IC_{50} variando de 0,17 a 0,5 μ M, entretanto a chalcona complexada com platina teve maior especificidade (Zoldakova *et al.*, 2010).

Em um recente estudo uma série de compostos foi planejada, a partir da união estrutural de chalconas e o anel quinoxalina, ambos compostos com potencial anticâncer, sintetizadas e testadas em linhagem celular de glioma humano (U138MG) e de rato (C6). Como resultado, quatro compostos (**1**, **6**, **7** e **8**) (Figura 5) exibiram alta eficácia, inibindo tanto a proliferação quanto a viabilidade celular de maneira tempo e concentração dependentes (0,1 a 10 μ g/mL) e sendo mais eficazes que o controle positivo AS605240 (Mielcke *et al.*, 2012).

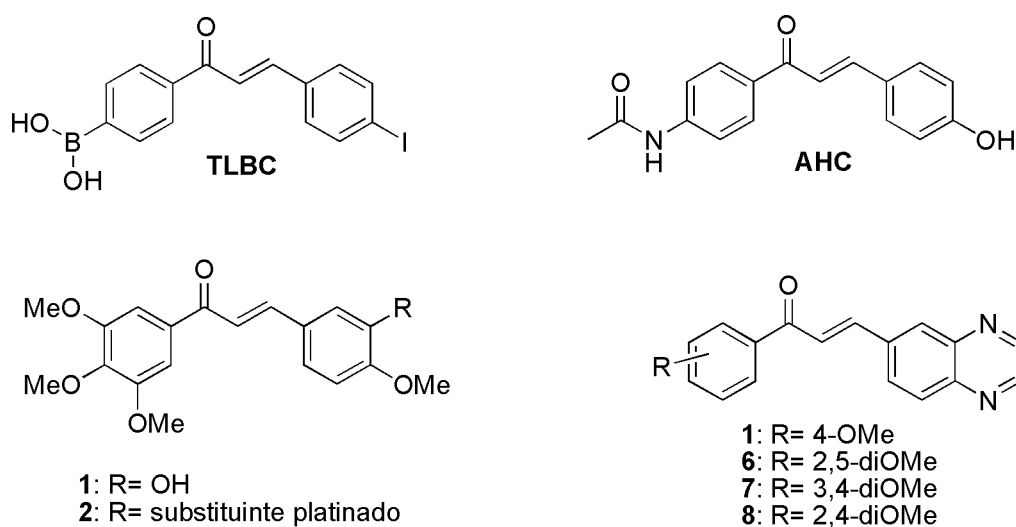


Figura 5. Chalconas inibidoras de glioblastoma.

O uso de chalconas para atividade antitumoral aliada a estratégias que possibilitem incremento na sua atividade podem auxiliar na busca por protótipos com maior especificidade e eficácia.

Em um estudo preliminar, nosso grupo de pesquisa submeteu uma série de flavonoides com diferentes graus de substituição de grupamentos hidroxila e metoxila, frente à atividade antitumoral em células de glioma C6 de rato, através da avaliação da viabilidade celular, usando MTT como método analítico. Foram

avaliadas quatro chalconas (**LAFIS 30**, **31**, **36** e **40**), uma flavanona (**LAFIS 401**) e uma flavona (**LAFIS 402**), sintetizadas pelo grupo, juntamente com o flavonol morina, representados na figura 6, nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 μM .

Os métodos e resultados encontram-se detalhados no capítulo I desta dissertação, entretanto, observou-se que as chalconas reduziram a viabilidade celular em concentrações mais baixas quando comparadas aos demais compostos cíclicos e tal atividade foi dependente da substituição do composto, destacando-se a chalcona polimetoxilada **LAFIS 31**, molécula mais ativa na redução da viabilidade celular, sendo significativamente ativa ($p \leq 0,01$) a partir da concentração de 25 μM , e a chalcona **LAFIS 40**, que apresentou um efeito dose dependente na viabilidade celular.

As chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40** foram submetidas a ensaio de contagem celular, onde seus efeitos em morte celular foram confirmados nas concentrações de 5, 10 e 20 μM para **LAFIS 31** e 25, 50 e 100 μM para **LAFIS 40** (dados não publicados).

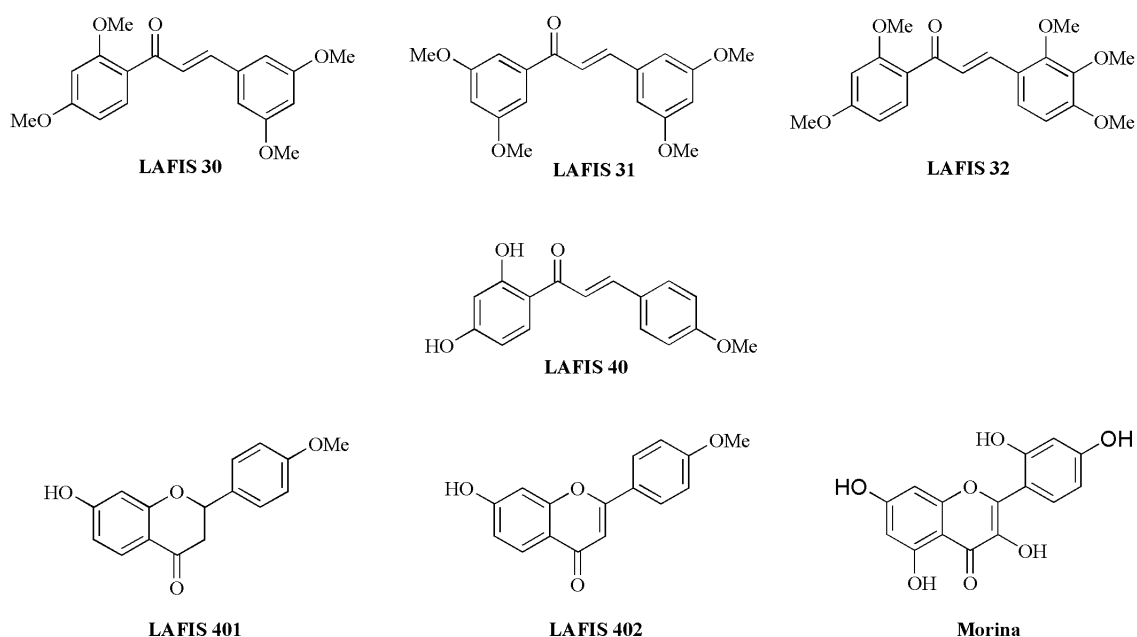


Figura 6. Flavonoides testados.

Pelos resultados apresentados e pelo grande potencial de flavonoides como agentes antitumorais, e em especial pelos padrões moleculares menos complexos e

mais flexíveis apresentados pelas chalconas, a investigação da atividade antitumoral desses últimos derivados está sendo proposta, visando também o estudo do mecanismo de ação dos mesmos.

2.5. Referências

Annapurna, A.; Mudagal, M. P.; Ansari, A.; Rao, S. Cardioprotective activity of chalcones in ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats. *Experimental & Clinical Cardiology*, v. 17, p. 110-114, 2012.

Bandgar, B.; Hote, B.; Dhole, N.; Gacche, R. Synthesis and biological evaluation of novel series of chalcone derivatives as inhibitors of cyclooxygenase and LPS-induced TNF- α with potent antioxidant properties. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, p. 2292-2299, 2012a.

Bandgar, B.; Jalde, S.; Adsul, L.; Shringare, S.; Lonikar, S.; Gacche, R.; Dhole, N.; Nile, S.; Shirfule, A. Synthesis of new olefin chalcone derivatives as antitumor, antioxidant and antimicrobial agents. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, p. 4512-4522, 2012b.

Behin, A.; Hoang-Xuan, K.; Carpentier, A. F.; Delattre, J.-Y. Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, v. 361, p. 323-331, 2003.

Braganhol, E.; Tamajusuku, A. S. K.; Bernardi, A.; Wink, M. R.; Battastini, A. M. O. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1770, p. 1352-1359, 2007.

Brown, R. E.; Law, A. Morphoproteomic Demonstration of Constitutive Nuclear Factor-kappaB Activation in Glioblastoma Multiforme with Genomic Correlates and Therapeutic Implications. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 36, p. 421-426, 2006.

Cabrera, M.; Simoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M. L.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; de Ceráin, A. L.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; González, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 3356-3367, 2007.

Choudhary, A. N.; Kumar, A.; Juyal, V. Design, Synthesis and Evaluation of Chalcone Derivatives as Anti-Inflammatory, Antioxidant and Antiulcer Agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 9, p. 479-488, 2012.

Erstad, D. J.; Cusack Jr, J. C. Targeting the NF-kB Pathway in Cancer Therapy. *Surgical Oncology Clinics of North America*, v. 22, p. 705-746, 2013.

Goodenberger, M. L.; Jenkins, R. B. Genetics of adult glioma. *Cancer Genetics*, v. 205, p. 613-621, 2012.

Iwanaga, M.; Mori, K.; Iida, T.; Urata, Y.; Matsuo, T.; Yasunaga, A.; Shibata, S.; Kondo, T. Nuclear Factor Kappa B Dependent Induction of Gamma Glutamylcysteine Synthetase by Ionizing Radiation in T98G Human Glioblastoma Cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 24, p. 1256-1268, 1998.

Jin, C.; Liang, Y.-J.; He, H.; Fu, L. Synthesis and antitumor activity of novel chalcone derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 67, p. 215-217, 2013.

Kamal, A.; Ramakrishna, G.; Raju, P.; Viswanath, A.; Janaki Ramaiah, M.; Balakishan, G.; Pal-Bhadra, M. Synthesis and anti-cancer activity of chalcone linked imidazolones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, p. 4865-4869, 2010.

Kim, J.-Y.; Park, S. J.; Yun, K.-J.; Cho, Y.-W.; Park, H.-J.; Lee, K.-T. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology*, v. 584, p. 175-184, 2008.

Ku, B. M.; Ryu, H. W.; Lee, Y. K.; Ryu, J.; Jeong, J. Y.; Choi, J.; Cho, H. J.; Park, K. H.; Kang, S. S. 4'-Acetoamido-4-hydroxychalcone, a chalcone derivative, inhibits glioma growth and invasion through regulation of the tropomyosin 1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 402, p. 525-530, 2010.

Kumar, R.; Mohanakrishnan, D.; Sharma, A.; Kaushik, N. K.; Kalia, K.; Sinha, A. K.; Sahal, D. Reinvestigation of structure–activity relationship of methoxylated chalcones as antimalarials: Synthesis and evaluation of 2,4,5-trimethoxy substituted patterns as lead candidates derived from abundantly available natural β -asarone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 5292-5301, 2010.

Lee, D.-S.; Li, B.; Im, N.-K.; Kim, Y.-C.; Jeong, G.-S. 4,2',5'-Trihydroxy-4'-methoxychalcone from *Dalbergia odorifera* exhibits anti-inflammatory properties by inducing heme oxygenase-1 in murine macrophages. *International Immunopharmacology*, v. 16, p. 114-121, 2013.

Lee, S. H.; Seo, G. S.; Kim, J. Y.; Jin, X. Y.; Kim, H.-D.; Sohn, D. H. Heme oxygenase 1 mediates anti-inflammatory effects of 2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone. *European Journal of Pharmacology*, v. 532, p. 178-186, 2006.

Leonetti, C.; Biroccio, A.; Graziani, G.; Tentori, L. Targeted Therapy for Brain Tumours: Role of PARP Inhibitors. *Current Cancer Drug Targets*, v. 12, p. 218-236, 2012.

Mielcke, T. R.; Mascarello, A.; Filippi-Chiela, E.; Zanin, R. F.; Lenz, G.; Leal, P. C.; Chirardia, L. D.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Battastini, A. M. O.; Morrone, F. B.; Campos, M. M. Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 255-264, 2012.

Mohme, M.; Neidert, M. C.; Regli, L.; Weller, M.; Martin, R. Immunological challenges for peptide-based immunotherapy in glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, v. 40, p. 248-258, 2014.

Mojzis, J.; Varinska, L.; Mojzisova, G.; Kostova, I.; Mirossay, L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacological Research*, v. 57, p. 259-265, 2008b.

Morioka, N.; Abe, H.; Araki, R.; Matsumoto, N.; Zhang, F. F.; Nakamura, Y.; Hisaoka-Nakashima, K.; Nakata, Y. A β 1/2 Adrenergic Receptor-Sensitive Intracellular Signaling Pathway Modulates CCL2 Production in Cultured Spinal Astrocytes. *Journal of Cellular Physiology*, v. 229, p. 323-332, 2014.

Narsinghani, T.; Sharma, M.; Bhargav, S. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, v. 22, p. 4059-4068, 2013.

Nones, J.; Stipursky, J.; Costa, S.; Gomes, F. Flavonoids and Astrocytes Crosstalking: Implications for Brain Development and Pathology. *Neurochemical Research*, v. 35, p. 955-966, 2010.

Park, H. G.; Bak, E. J.; Woo, G.-H.; Kim, J. M.; Quan, Z.; Kim, J. M.; Yoon, H.-K.; Cheon, S. H.; Yoon, G.; Yoo, Y.-J.; Na, Y.; Cha, J.-H. Licochalcone E has an antidiabetic effect. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, p. 759-767, 2012.

Prasad, S.; Phromnoi, K.; Yadav, V. R.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. Targeting Inflammatory Pathways by Flavonoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Planta Med*, v. 76, p. 1044-1063, 2010.

Raj, C.; Sarojini, B.; Hegde, S.; Sreenivasa, S.; Ravikumar, Y.; Bhanuprakash, V.; Revanaiah, Y.; Ragavendra, R. In vitro biological activities of new heterocyclic chalcone derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, v. 22, p. 2079-2087, 2013.

Ravishankar, D.; Rajora, A. K.; Greco, F.; Osborn, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, p. 2821-2831, 2013.

Raychaudhuri, B.; Han, Y.; Lu, T.; Vogelbaum, M. Aberrant constitutive activation of nuclear factor κ B in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 85, p. 39-47, 2007.

Rossi, M.; Caruso, F.; Crespi, E. J.; Pedersen, J. Z.; Nakano, G.; Duong, M.; McKee, C.; Lee, S.; Jiwrajka, M.; Caldwell, C.; Baffour, F.; Karlin, D. A.; Lidoff, G.; Leone, S.; Balducci, V.; Miler, J.; Incerpi, S. Probing antioxidant activity of 2'-hydroxychalcones: Crystal and molecular structures, in vitro antiproliferative studies and in vivo effects on glucose regulation. *Biochimie*, v. 95, p. 1954-1963, 2013.

Roussaki, M.; Hall, B.; Lima, S. C.; da Silva, A. C.; Wilkinson, S.; Detsi, A. Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone–chalcone series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, p. 6436-6441, 2013.

Sahu, N. K.; Balbhadra, S. S.; Choudhary, J.; Kohli, D. V. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 209-225, 2012.

Sasayama, T.; Tanaka, K.; Mizukawa, K.; Kawamura, A.; Kondoh, T.; Hosoda, K.; Kohmura, E. Trans-4-Iodo,4'-boranyl-chalcone induces antitumor activity against malignant glioma cell lines in vitro and in vivo. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 85, p. 123-132, 2007.

Serifi, O.; Tsopelas, F.; Kypreou, A.-M.; Ochsenkühn-Petropoulou, M.; Kefalas, P.; Detsi, A. Antioxidant behaviour of 2'-hydroxy-chalcones: a study of their electrochemical properties. *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 26, p. 226-231, 2013.

Srinivasan, B.; Johnson, T. E.; Lad, R.; Xing, C. Structure–Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its Analogues as Potent Nuclear Factor κ B Inhibitors and Their Anticancer Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 7228-7235, 2009.

Tronina, T.; Bartmańska, A.; Filip-Psurska, B.; Wietrzyk, J.; Popłoński, J.; Huszcza, E. Fungal metabolites of xanthohumol with potent antiproliferative activity on human cancer cell lines in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 2001-2006, 2013a.

Tronina, T.; Bartmańska, A.; Milczarek, M.; Wietrzyk, J.; Popłoński, J.; Rój, E.; Huszcza, E. Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, p. 1957-1960, 2013b.

Venkateswararao, E.; Sharma, V. K.; Lee, K.-C.; Sharma, N.; Park, S.-H.; Kim, Y.; Jung, S.-H. A SAR study on a series of synthetic lipophilic chalcones as Inhibitor of transcription factor NF- κ B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 379-386, 2012.

Wang, Y.; Jiang, T. Understanding high grade glioma: Molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer Letters*, v. 331, p. 139-146, 2013.

Ye, C.-L.; Liu, X.-G.; Huang, Q. Antioxidant activity and protection of human umbilical vein endothelial cells from hydrogen peroxide-induced injury by DMC, a chalcone from buds of *Cleistocalyx operculatus*. *South African Journal of Botany*, v. 86, p. 36-40, 2013.

Zanotto-Filho, A.; Braganhol, E.; Schröder, R.; de Souza, L. H. T.; Dalmolin, R. J. S.; Pasquali, M. A. B.; Gelain, D. P.; Battastini, A. M. O.; Moreira, J. C. F. NF κ B

inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochemical Pharmacology*, v. 81, p. 412-424, 2011.

Zoldakova, M.; Kornyei, Z.; Brown, A.; Biersack, B.; Madarász, E.; Schobert, R. Effects of a combretastatin A4 analogous chalcone and its Pt-complex on cancer cells: A comparative study of uptake, cell cycle and damage to cellular compartments. *Biochemical Pharmacology*, v. 80, p. 1487-1496, 2010.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho propõe a avaliação bioquímico-farmacológica das chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40**, além do planejamento e síntese de duas séries de seus derivados sintéticos: **Série LAFIS 31** e **Série LAFIS 40**, visando à atividade antitumoral em glioma.

**4. CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICO-FARMACOLÓGICA DAS
CHALCONAS LAFIS 31 E LAFIS 40**

Este capítulo contempla a avaliação bioquímico-farmacológica das chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40**, intituladas chalconas **2** e **4**, respectivamente, neste capítulo.

Cíntia J. Kiekow, Fabrício Figueiró, Luciana D. Vechia, Fabrícia Dietrich, Elisa N. Simões Pires, Elisa Helena F. Jandrey, Christianne Salbego, Ana Maria O. Battastini, Grace Gosmann. Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF- κ B expression.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*

Páginas correspondentes na dissertação: 50 - 76

**Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating
NF- κ B nuclear translocation.**

Abstract

Treated glioblastoma multiforme (GBM) patients only survive 6 to 14 months after diagnosis, therefore, the development of novel therapeutic strategies to treat gliomas remains critically necessary. Considering that phenolic compounds have the potential to be used in the chemoprevention and chemotreatment of gliomas and that some flavonoids exhibit the ability to cross the BBB, in the present study, we designed and synthesized hydroxylated and methoxylated flavonoids (including chalcones, flavones, flavanones and flavonols), using quercetin as a prototype, and further compared their cytotoxic profiles and determine the signaling pathway involved. Initially their activities were tested in C6 glioma cells screened using the MTT method, resulting in the selection of chalcones **2** and **4** whose feasibility was confirmed by a Trypan Blue exclusion assay in the low μ M range. Cell cycle and apoptotic death analyses were also performed, and chalcones **2** and **4** increased the apoptosis of the cells but did not alter the cell cycle progression. In addition, treatments with these two compounds were not cytotoxic to hippocampal organotypic cultures, a model of healthy neural cells. Furthermore, only chalcone **2** showed inhibition of NF- κ B in glioma cells that could be, at least partially, the cause of apoptosis. These compounds are great prototypes and show promise for the treatment of GBM in the future.

Keywords: Chalcone, glioma, apoptosis, NF- κ B.

5. CAPÍTULO II: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DOS DERIVADOS SINTÉTICOS

Neste capítulo primeiramente apresentaremos as estratégias utilizadas para o planejamento dos derivados das chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40** visando sua atividade antitumoral em glioma. Em seguida, uma breve revisão sobre os métodos disponíveis para a síntese dos derivados propostos. E, posteriormente, a síntese dos compostos planejados será discutida.

5.1. Introdução

Os resultados obtidos com as chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40**, a partir do *screening* da série de flavonoides na viabilidade de células C6 de glioma de rato e confirmação de seus efeitos em morte celular em ensaio de contagem celular despertaram nosso interesse no planejamento de novos compostos ativos frente à glioma.

A análise dos resultados indica que os grupamentos hidroxila e metoxila são importantes para a atividade e ressalta a importância de suas posições para a mesma.

Dessa forma, o presente capítulo tem como objetivo o planejamento e síntese de duas séries de derivados sintéticos: **Série LAFIS 31** e **Série LAFIS 40**, visando à atividade antitumoral em glioma.

5.2. Estratégia para o planejamento racional de novos compostos antitumorais em glioma

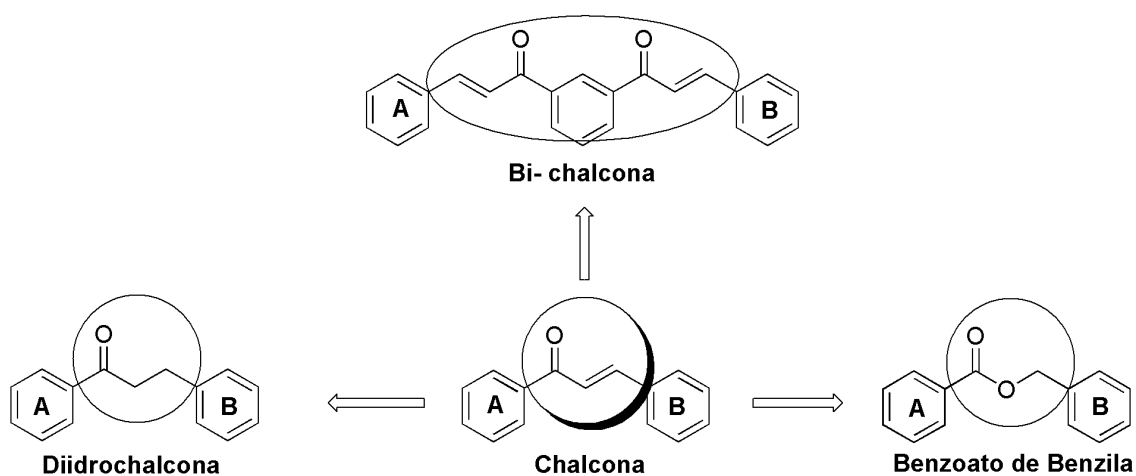
Os compostos **LAFIS 31** e **LAFIS 40** foram escolhidos como protótipos no planejamento de novos candidatos ativos para se obter as duas séries correspondentes: **Série LAFIS 31** e **Série LAFIS 40**.

A síntese de cinco novos compostos em duas séries de derivados das respectivas chalconas foi proposta, mantendo os mesmos substituintes e grau de substituição das moléculas protótipos, mas modificando sua estrutura na cadeia espaçadora entre os anéis, conforme Esquema 1, a fim de avaliarmos:

- A importância da α,β -insaturação e o aumento do grau de liberdade rotacional, sendo proposta a síntese da diidrochalcona, visto que a α,β -insaturação

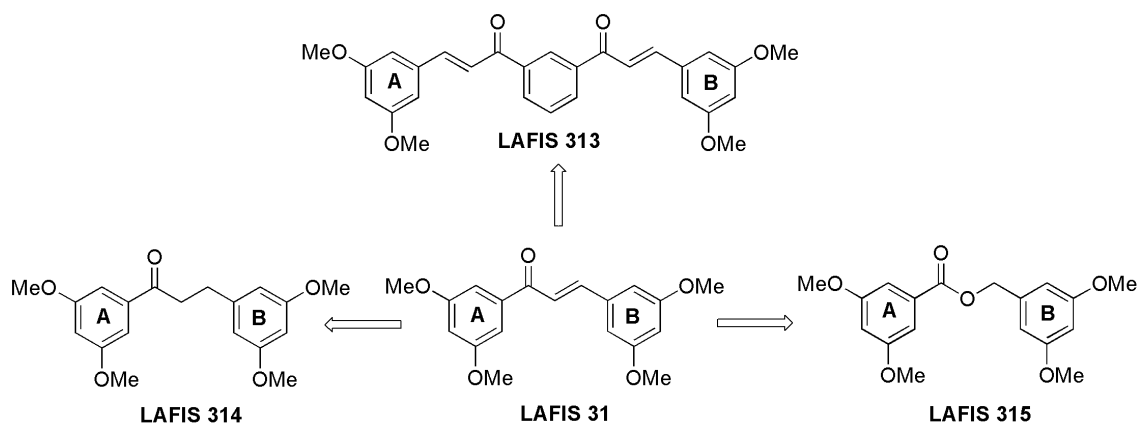
tem sido descrita como um possível grupamento farmacofórico de chalconas na inibição de NF- κ B (Srinivasan *et al.*, 2009; Venkateswararao *et al.*, 2012).

- A importância de modificações na cadeia espaçadora entre os anéis A e B das chalconas, sendo proposta a síntese do dímero (bi-chalcona) e benzoato de benzila, visto na literatura que análogos de bi-chalconas apresentaram atividade citotóxica em linhagens de câncer de pulmão (A549), próstata (DU-145), carcinoma nasofaríngeo (KB) e carcinoma nasofaríngeo resistente a vincristina (KB-VIN) com IC₅₀ variando de 1,57 a 5,14 μ M e potente atividade antiinflamatória, inibindo a produção de NO (IC₅₀ entre 0,95 e 8,65 μ M) em consequência à *down-regulation* da expressão de iNOS por inibição da ativação de NF- κ B devido prevenção da degradação de I κ B α (Reddy *et al.*, 2011). Embora a esterificação de compostos seja adotada na literatura como estratégia para aumento de biodisponibilidade de compostos ativos (Singh *et al.*, 2013), a introdução de oxigênio foi proposta a fim de proporcionar diversidade química aos compostos protótipo.



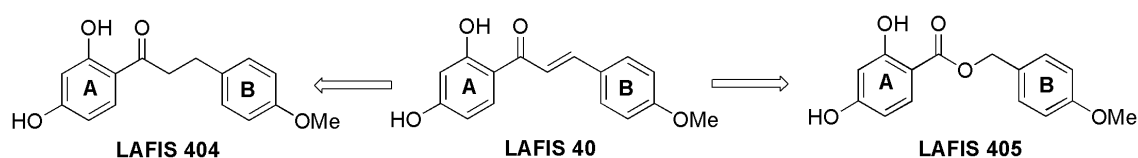
Esquema 1. Estratégias para o planejamento de compostos com potencial atividade em glioma.

A **Série LAFIS 31** constitui-se de uma bi-chalcona (**LAFIS 313**), uma diidrochalcona (**LAFIS 314**) e um benzoato de benzila (**LAFIS 315**) como apresentado no Esquema 2.



Esquema 2. Compostos da **Série LAFIS 31**.

A **Série LAFIS 40** constitui-se de uma diidrochalcona (**LAFIS 404**) e um benzoato de benzila (**LAFIS 405**) como apresentado no Esquema 3.



Esquema 3. Compostos propostos da **Série LAFIS 40**.

5.3. Revisão da Literatura

5.3.1. Síntese de derivado bi-chalcona

A síntese de chalconas pode ser realizada através de uma única etapa em uma reação conhecida por condensação aldólica entre benzaldeído e acetofenona (Reação de Claisen-Schmidt). Esta reação pode ser catalisada em meio ácido ou em meio básico, entretanto, o meio básico é mais comumente utilizado, sendo as soluções aquosas de NaOH e KOH as mais prevalentes (Lee *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Apesar das reações de Claisen-Schmitt datarem os anos 1880, avanços consideráveis têm sido descritos na busca por novos catalisadores que contribuam para a química verde. Neste sentido, citamos bissulfato de potássio e dióxido de silício (KHSO₄-SiO₂) que foram descobertos como sendo catalisadores recicláveis em reação de condensação de Claisen-Schmitt ativadas em microondas, fornecendo

rendimentos entre 78 e 93 % (Kakati e Barua, 2014). Ou nanopartículas de óxido de magnésio como excelentes catalisadores também reutilizáveis na reação de condensação de Claisen-Schmitt, cujo meio reacional é livre de solventes e a reação fornece rendimentos entre 70 e 85 % (Patil e Bhanage, 2013).

5.3.2. Síntese de diidrochalconas

O método mais comum para obtenção de diidrochalconas consiste na redução de suas respectivas chalconas. Tal redução pode ser catalisada de duas maneiras: enzimática ou metálica.

Catálise enzimática: processo chamado de biotransformação onde a redução da α,β - insaturação das chalconas é catalizada por enzimas presentes em bactérias (Stompor *et al.*, 2013) ou fungos (leveduriformes ou filamentosos) (Janeczko *et al.*, 2013). O rendimento e o tempo necessários para a biotransformação dependerá tanto do microorganismo quanto do composto a ser biotransformado. Isso pode ser visto no trabalho de Stompor e colaboradores (2013) onde foram testados 12 microorganismos na redução de chalconas e flavanonas e apenas *Rhodococcus* sp. e *Gordonia* sp. forneceram bons rendimentos (13- 94%). Outro trabalho avaliou a redução de uma chalcona sem substituintes e 2'-hidróxi-chalcona e, apesar da chalcona sem substituinte ser reduzida mais rapidamente pelas leveduras do que pelos fungos filamentosos, fornecer bons rendimentos (80-99%) e ocorrer por cepas distintas, com o passar do tempo, há a produção de álcool e seu enantiômero como subprodutos a partir da diidrochalcona formada. Por outro lado, 2'-hidróxi-chalcona necessita de um tempo maior para biotransformação (3 dias), levando a bons rendimentos (97 %) e não formando subprodutos de reação (Janeczko *et al.*, 2013).

Catálise metálica: consiste na redução da α,β - insaturação das chalconas permeando H_2 , em reação catalisada por metais. Uma ampla variedade de catalisadores pode ser utilizada (Pd, Pt, Rh, por exemplo), entretanto Pd leva a redução quimioseletiva da α,β - insaturação das chalconas (rendimento médio de 80-85 %) enquanto Rh e Pt tendem a reduzir também o grupo carbonila, especialmente a elevadas pressões de hidrogênio e temperatura (Gutierrez *et al.*, 2010; Stolle *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012).

Algumas alternativas têm sido vistas nas reduções catalisadas por paládio com a permeação de hidrogênio em aparato constituído por um eletrodo Pd/Pd (79 % de rendimento) (Gutierrez *et al.*, 2010) ou formação de paládio *in situ* a partir de uma fonte homogênea de paládio (89 % de rendimento) (Felpin e Fouquet, 2010) ou sem permeação de hidrogênio usando borohidreto de sódio (NaBH₄) combinado com Pd/C, ácido acético e solventes menos polares (99 % de rendimento) (Russo *et al.*, 2011)

A literatura descreve a utilização de aditivos como controladores da atividade do catalisador de forma a manter a seletividade da redução C=C na presença de carbonilas e outros grupamentos. Como exemplo destes aditivos, temos o sulfeto de difenila (Ph₂S) utilizado no sistema catalítico Pd/C-Ph₂S em reação de hidrogenação, reduzindo seletivamente olefinas, acetilenos e azidas na coexistência de carbonilas aromáticas, haletos aromáticos, grupo ciano, benzil ésteres e grupos protetores benzilóxi-carbonilos (rendimento médio: 90- 100 %) (Mori *et al.*, 2006).

5.3.3. Síntese de benzoatos de benzila

Ésteres podem ser obtidos por quatro métodos diferentes:

➤ Esterificação

Esterificação de Fischer: Esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois catalizada por ácidos de Lewis ou Bronsted. Nela há um equilíbrio entre produtos e reagentes que pode ser quebrado pela remoção de um dos produtos (remoção da água formada, por exemplo, por destilação azeotrópica ou adsorção por peneiras moleculares) ou emprego de um excesso de reagente (Entrada 1. Esquema 4) (Ganeshpure *et al.*, 2008; Müller, 2013).

Esterificação de Steglich: Ésteres são formados a partir da reação de ácidos carboxílicos e alcoóis na presença de *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e/ou 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP), sendo DCC um promotor de reação e DMAP um catalisador (Entrada 2. Esquema 4) (Rivero-Cruz *et al.*, 2007).

➤ Transesterificação:

Transesterificação: Reação química de um éster e um álcool na qual resulta um novo éster e álcool (Entrada 3. Esquema 4) (Aavula *et al.*, 2013). Tal reação sofre deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do álcool de menor ponto de ebulição que é destilado da mistura reacional (Solomons, 2009).

➤ Acilação:

Esterificação de Yamaguchi: Inicialmente ocorre a formação de um anidrido misto entre o reagente de Yamaguchi (cloreto de 2,3,4-triclorobenzoila) e o ácido carboxílico e, posteriormente, segue a reação do anidrido com o álcool na presença de uma quantidade estequiométrica de DMAP para formação do éster pretendido (Entrada 4. Esquema 4) (Dhimitruka e SantaLucia, 2005; Müller, 2013).

➤ Esterificação oxidativa/ redox:

Reação de Tishchenko: reação que permite a preparação de ésteres a partir de dois equivalentes de aldeído (Entrada 5. Esquema 4) (Tsuji e Hattori, 2006). Nesta reação, o alcóxido de alumínio atua como um ácido de Lewis para coordenar uma molécula de aldeído e facilitar a adição do segundo equivalente de aldeído, gerando um hemiacetal. Esta espécie sofre um deslocamento de 1,3-hidreto intramolecular resultando na produção do éster. Um inconveniente da reação é a possível formação de um éster secundário devido ao envolvimento de um dos grupos alcóxido do catalisador, mas isto pode ser minimizado se a reação for realizada a baixas temperaturas e concentração do catalisador (Müller, 2013).

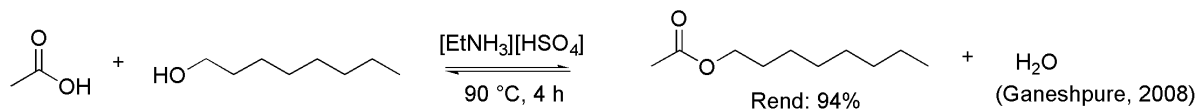
Catálise metálica: Com o tempo, houve uma revolução na esterificação oxidativa onde ésteres também puderam ser sintetizados em reações de acoplamento oxidativo utilizando substratos comuns C-H e ácidos carboxílicos como materiais de partida. Para tanto, os metais de transição apresentavam uma excelente atividade catalítica na ativação da ligação C-H dos substratos (Entrada 6. Esquema 4) (Ye *et al.*, 2009).

Catálise livre de metais: Recentemente, os inconvenientes provenientes do uso de metais de transição como catalisadores inspirou um grupo a desenvolver uma nova reação de esterificação oxidativa livre de metais. Nesta reação, substratos benzílicos puderam reagir com ácidos carboxílicos através da ação de iodeto de tetrabutylamônio como catalisador e hidroperóxido de *tert*-butila como co-oxidante para fornecerem ésteres com bons a excelentes rendimentos (Entrada 7. Esquema 4) (Feng *et al.*, 2012). O potencial catalisador de iodeto de tetrabutylamônio foi novamente explorado e aplicado no desenvolvimento de uma nova esterificação, sendo esta um método direto da síntese de ésteres a partir de alcoóis e derivados do tolueno onde investigações mecanicistas indicaram que os álcoois são sequencialmente oxidados em aldeídos, ácidos carboxílicos, e em seguida, ésteres de benzilo (Liu *et al.*, 2013). Podemos citar ainda o protocolo *one pot* rápido e conveniente para conversão de alcoóis e fenóis em seus correspondentes benzoatos utilizando imidazol e peróxido de benzoíla (agente oxidante) como novos reagentes (Nowrouzi e Alizadeh, 2013).

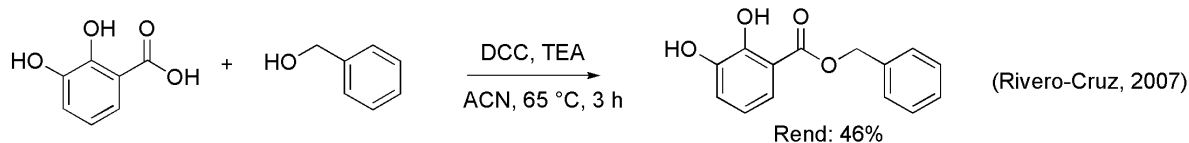
Novas alternativas nas reações de esterificação foram relatadas, entre eles, podemos citar a conversão de ácidos carboxílicos nos seus ésteres correspondentes, utilizando hidrogenação sob condição catalisada por Pd/C na presença quantidade catalítica de bromobenzeno como aditivo. A esterificação baseia-se na geração *in situ* de ácido bromídrico (HBr) que proporciona um ambiente de reação levemente ácido. Como peculiaridade do método que leva de bons a excelentes rendimentos, temos a aplicabilidade do método, também, para reações de transesterificação de ésteres (Aavula *et al.*, 2013).

Na síntese de ésteres polimetoxilados, o uso de microondas também tem sido descrito, otimizando tempo e proporcionando ótimos rendimentos em reações entre ácidos carboxílicos e álcoois na presença de bissulfato de sódio (Fang *et al.*, 2011).

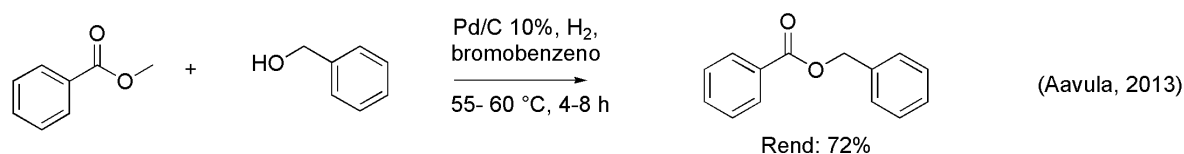
Entrada 1. Esterificação. Esterificação de Fischer



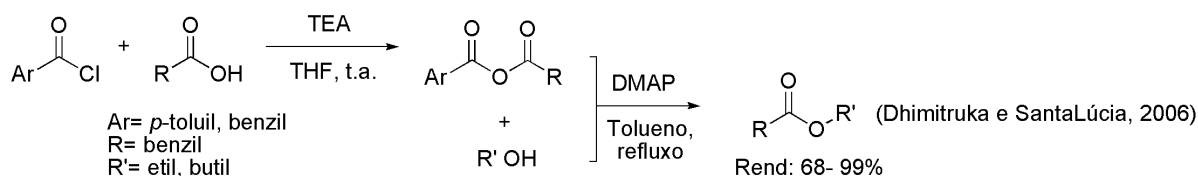
Entrada 2. Esterificação. Esterificação de Steglich



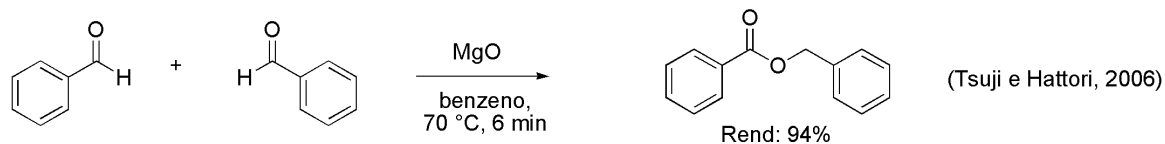
Entrada 3. Transesterificação



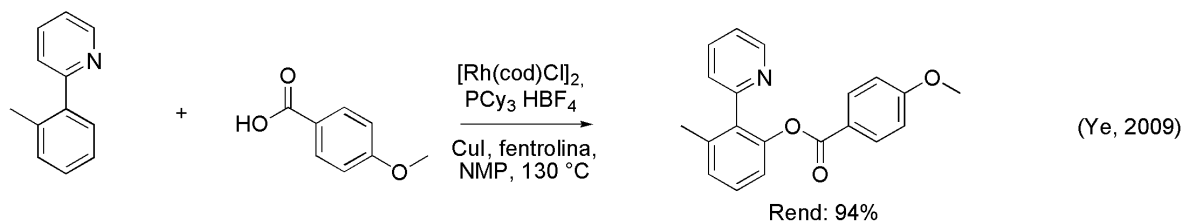
Entrada 4. Acilação. Esterificação de Yamaguchi



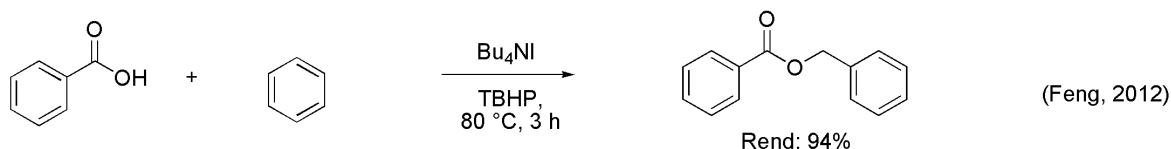
Entrada 5. Esterificação oxidativa/ redox. Reação de Tishchenko



Entrada 6. Esterificação oxidativa/ redox. Catálise metálica



Entrada 7. Esterificação oxidativa/ redox. Catálise livre de metais



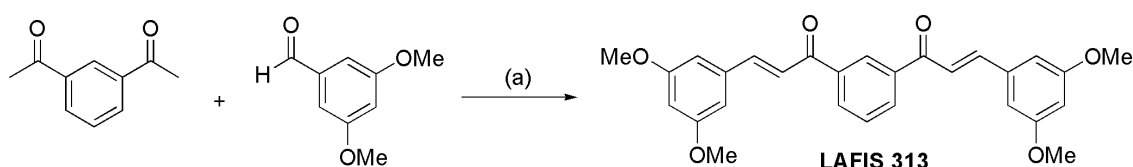
Esquema 4. Abordagens disponíveis para síntese de ésteres. Esterificação, transesterificação, acilação e esterificação oxidativa.

5.4. Resultados e Discussão

A partir dos protótipos ativos **LAFIS 31** e **LAFIS 40**, a síntese de cinco novos compostos foi proposta, de modo a manter os mesmos substituintes e grau de substituição das moléculas protótipos, mas apresentando modificações estruturais na cadeia espaçadora entre os anéis. Sabendo-se que o esqueleto das moléculas protótipo foi escolhido a partir de *screening* de estruturas e substituintes, nosso planejamento é racional e complementar ao estudo de mecanismo de ação apresentado no capítulo I desta dissertação.

A síntese de chalconas e derivados *di-meta* substituídos não é muito explorada na literatura, sendo apenas relatada a síntese da própria chalcona **LAFIS 31** em outro trabalho (Lee *et al.*, 2011). Já a síntese de compostos *o,p*- diidróxi e *p*-metóxi substituídos, semelhante ao **LAFIS 40** é mais explorada, entretanto, não se tem relatos dos compostos aqui apresentados para a atividade antitumoral em glioma.

Através de uma estratégia de duplicação molecular, a bi-chalcona **LAFIS 313**, dímero do **LAFIS 31**, foi planejada e sintetizada neste trabalho. Apresentando-se como um composto linear de alto peso molecular e bastante flexível representa um esqueleto diferenciado a ser avaliado quanto à atividade antitumoral. Sua síntese consistiu na condensação de Claisen-Schmitt, com catálise básica entre 1,3-diacetilbenzeno e 3,5-dimetóxi-benzaldeído como demonstrado no esquema 5 (Lee *et al.*, 2011).



Esquema 5. Síntese do **LAFIS 313**. Condições de reação: (a) NaOH, Etanol, 0°C, 12 h.

A reação de condensação de Claisen-Schmitt é muito utilizada para síntese de chalconas e bi-chalconas (Lee *et al.*, 2011; Mobinikhaledi *et al.*, 2012; Vijaya Bhaskar Reddy *et al.*, 2012). Em uma tentativa preliminar, buscou-se a condensação de 1 eq. de 1,3-diacetilbenzeno com 2 eq. de 3,5-dimetóxi-benzaldeído utilizando solução aquosa de NaOH 40 % como base e metanol como solvente no meio reacional (Khatib *et al.*, 2005), mas como resultado, ambos os reagentes de partida não foram totalmente consumidos e houve a formação de muitos subprodutos de reação, prejudicando os processos de purificação.

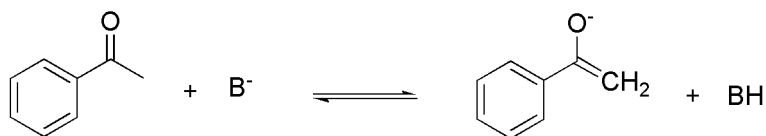
Em seguida, empregamos a mesma condensação de Claisen-Schmitt, porém utilizando uma solução aquosa de NaOH 19 % como base e etanol como solvente de reação (Lee *et al.*, 2011). Apesar de os reagentes de partida não terem sido totalmente consumidos, houve a formação de um produto majoritário (amarelo), visível na CCD sem auxílio de reagentes reveladores, e identificado como sendo a bi-chalcona **LAFIS 313**, com 20% de rendimento. Baixos rendimentos também foram observados na síntese de chalconas di-*meta* substituídas, sugerindo que isto seja devido à baixa solubilidade do 3,5-dimetóxi-benzaldeído em etanol (Dalla-Vechia *et al.*, 2014).

O mecanismo reacional da condensação em meio básico de benzaldeído e acetofenona, está exposto no esquema 6. O meio alcalino leva a enolização da acetofenona. A condensação se dá a partir de um ataque nucleofílico do enolato à carbonila do benzaldeído e posterior transferência de um próton do meio reacional. A desidratação ocorre como uma última etapa, levando a formação da *trans*-chalcona exclusivamente. A estereoseletividade desta etapa da reação deve-se a fatores estéricos (Carey e Sundberg, 2001).

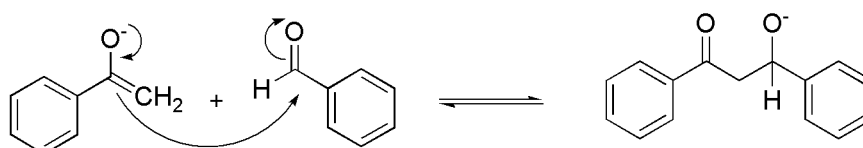
A condensação de acetofenona e benzaldeído leva apenas a formação de um produto de condensação. O benzaldeído não é enolizável e desta maneira não pode agir como o nucleófilo da reação, e nem mesmo auto-condensar. E, a acetofenona, por sua vez, apesar de poder sofrer auto-condensação, tem a etapa de adição para a formação do cetol desfavorecida. O cetol formado rapidamente dissocia a cetona na presença do catalisador básico (Clayden *et al.*, 2001).

1. Fase de adição:

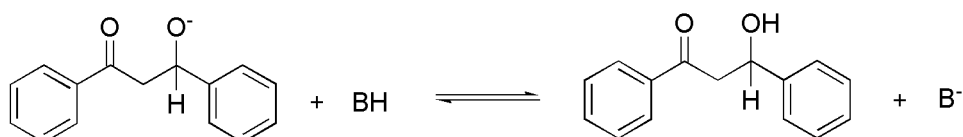
a) Formação do enolato:



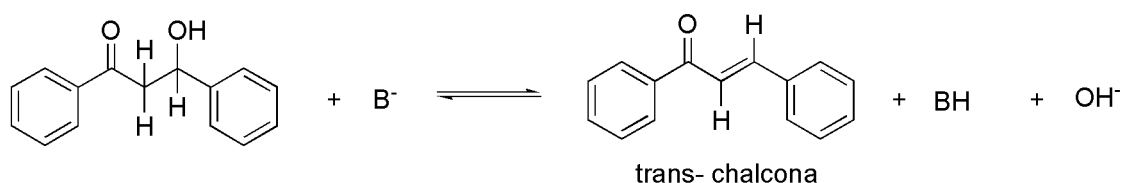
b) Adição nucleofílica:



c) Transferência de próton:



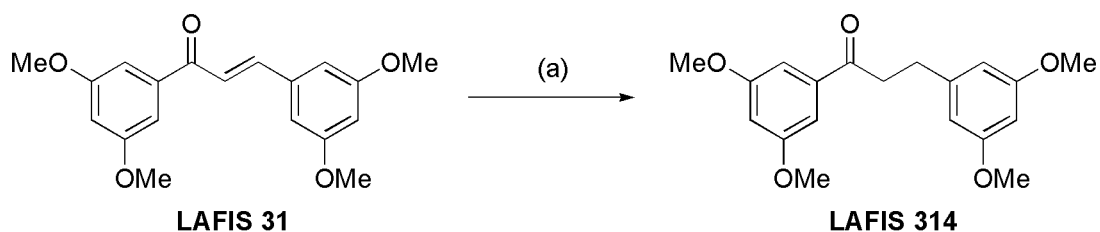
2. Fase de desidratação:



Esquema 6. Mecanismo de reação da condensação aldólica em meio básico (adaptado de Carey e Sunberg, 2001).

A fim de avaliarmos a importância da α,β - insaturação na atividade antitumoral em glioma, as diidrochalconas **LAFIS 314** e **LAFIS 404** foram sintetizadas.

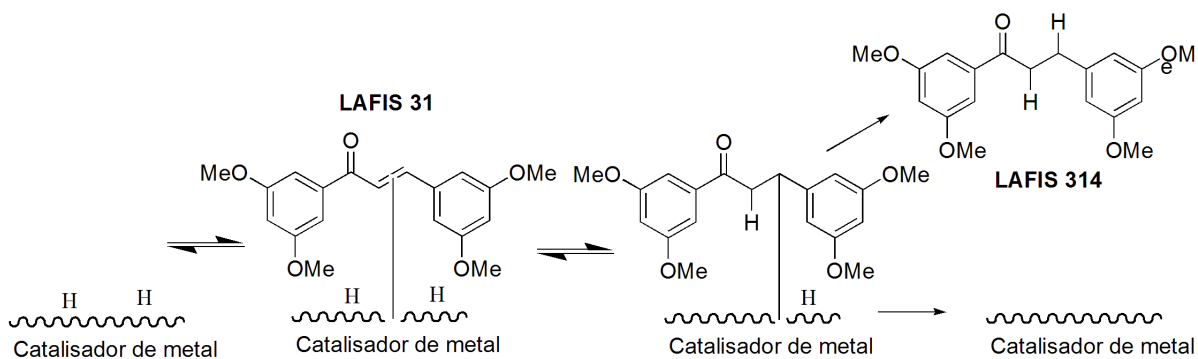
LAFIS 314, diidrochalcona polimetoxilada, foi sintetizada a partir da hidrogenação de sua respectiva chalcona (**LAFIS 31**) em uma reação catalisada por Pd/C 10 %, como demonstrado no esquema 7 (Kumar *et al.*, 2012).



Esquema 7. Síntese do **LAFIS 314**. *Condição de reação:* (a) Pd/C 10 %, H_2 , Acetato de Etila, t. a., 1 h.

Tal reação de redução de **LAFIS 31** obtendo o composto **LAFIS 314** confirmou ser uma alternativa rápida, eficaz e eficiente, levando ao rendimento satisfatório de 55%.

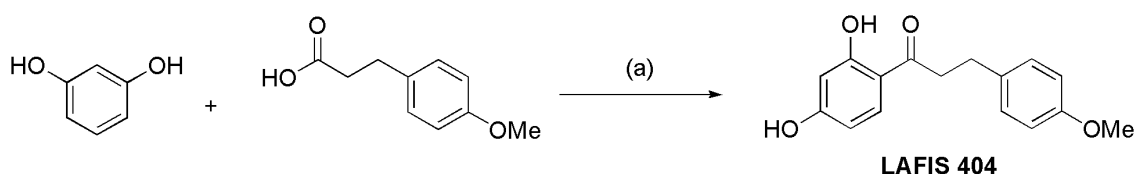
Na reação, o Paládio fica depositado numa superfície de carbono (carvão) e o gás hidrogênio introduzido na atmosfera do recipiente de reação adsorve-se ao metal através de uma reação química onde os elétrons desemparelhados na superfície do metal se emparelham com os elétrons do hidrogênio e ligam o hidrogênio à superfície. A colisão de um alceno a superfície contendo o hidrogênio adsorvido também provoca a adsorção do alceno com posterior transferência por etapas dos átomos de hidrogênio formando um alceno antes que a molécula do alceno deixe a superfície do catalisador (esquema 8) (Solomons, 2009). Por ser um catalisador heterogêneo de hidrogenação, ou seja, é insolúvel no solvente de reação em comparação com o substrato que é solúvel, paládio acaba sendo facilmente removido do meio reacional por meio de uma simples filtração.



Esquema 8. Hidrogenação catalisada por Paládio (adaptado de Clayden *et al.*, 2001).

Apesar da síntese de diidrochalcona dar-se normalmente pela redução da chalcona correspondente, tal procedimento é inadequado para síntese de diidrochalconas poliidroxiladas, pois este método requer prévia proteção das hidroxilas fenólicas (Siddaiah *et al.*, 2006). Uma alternativa referida na literatura é a síntese da diidrochalcona poliidroxilada através da arilação mediada por paládio de

1-aryl-2-pronan-1-óis com iodobenzenos hidroxilados (Briot *et al.*, 2004). Esta reação foi baseada na Reação de Heck que consiste no acoplamento C-C catalisado por paládio entre haleto de arila ou haleto de vinila e alcenos ativados na presença de uma base (Müller, 2013). Entretanto, para a síntese da diidrochalcona polihidroxilada **LAFIS 404**, adotamos a reação de acilação de Friedel-Crafts, a partir de resorcinol e ácido-4-metóxi-fenil proniônico, utilizando trifluoreto de boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) como ácido de Lewis e solvente da reação, conforme esquema 9 (Siddaiah *et al.*, 2006).



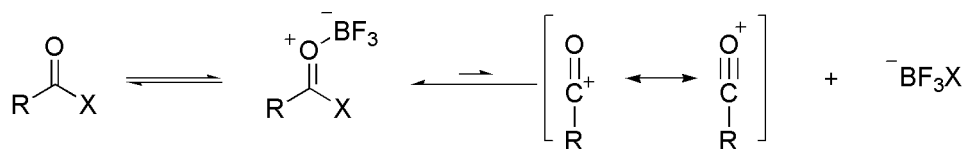
Esquema 9. Síntese do **LAFIS 404**. *Condição de reação:* (a) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, 80- 90°C, 90 min.

Além da reação não necessitar a proteção prévia das hidroxilas fenólicas, evitando novas etapas de reação, ela demonstrou ser rápida, sem formação de muitos subprodutos e efetiva, levando ao rendimento de 44 %.

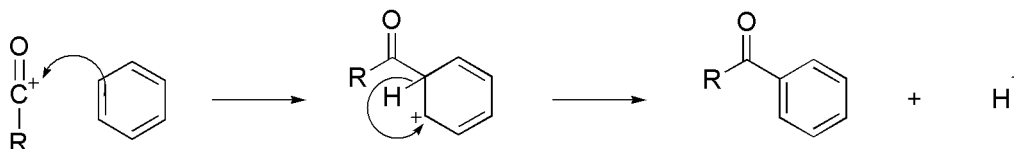
A reação de acilação de Friedel-Crafts, bastante descrita na literatura, permite a síntese de produtos monoacilados através da reação entre composto aromático e haleto de acila (normalmente cloretos de acila ou anidridos) utilizando um ácido de Lewis como catalisador, conforme demonstrado no esquema 10 (Solomons, 2009).

Acilação de Friedel-Crafts:

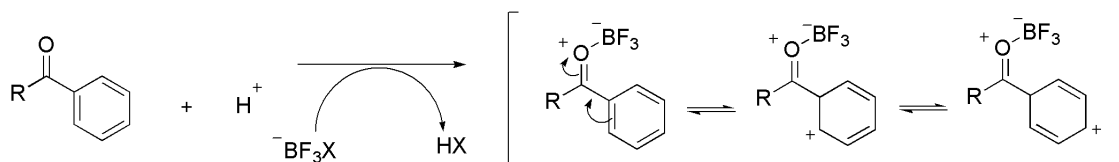
a) Formação de um íon acílio a partir de um haleto de acila



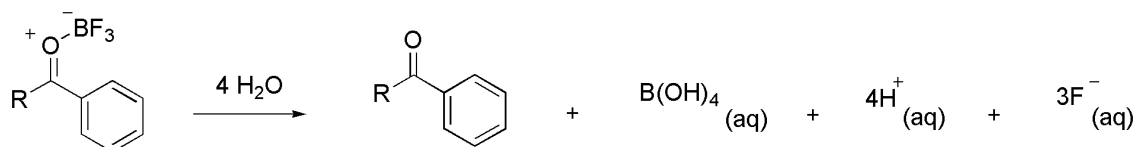
b) O íon acílio, agindo como um eletrófilo, reage com o benzeno para formar o íon arênio e a remoção de um próton leva a formação de arilcetona



c) A aril cetona, agindo como uma base de Lewis, reage com o cloreto de alumínio (ácido de Lewis) para formar um complexo



d) O tratamento do complexo com água libera a cetona e hidrolisa o ácido de Lewis



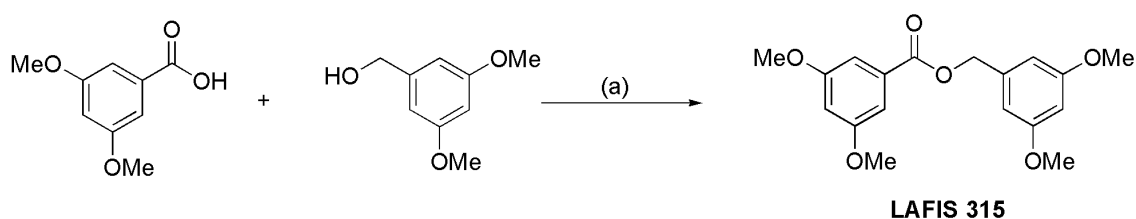
Esquema 10. Mecanismo de reação da Acilação de Friedel-Crafts (adaptado de Solomons, 2009; Müller, 2013).

Visando avaliar a importância de modificações na cadeia espaçadora entre os anéis A e B das chalconas, buscou-se a síntese dos benzoatos de benzila **LAFIS 315** (polimetoxilada) e **LAFIS 405** (poliidroxilada e metoxilada).

Tratando-se de benzoatos de benzila metoxilados, a síntese mais comumente utilizada é a reação de acilação, baseada na esterificação de Yamaguchi, entre cloretos de acila e álcoois na presença de trietilamina (TEA) ou piridina (Rivero-Cruz *et al.*, 2007; Ohno *et al.*, 2008). Como cloretos de acila são muito mais reativos frente à adição nucleofílica- eliminação que os ácidos carboxílicos, a esterificação ocorre rapidamente e não necessita de um catalisador ácido. TEA como base em

tais reações reage com o ácido clorídrico resultando no sal hidrocloreto de trietilamina, comumente chamado de cloreto de trietilamônio. Já a piridina, pode reagir com o ácido clorídrico que se forma durante a reação ou reagir com o cloreto de acila para formar um íon acilpiridínio, um intermediário de reação que é inclusive mais reativo frente ao nucleófilo do que o cloreto de acila (Solomons, 2009).

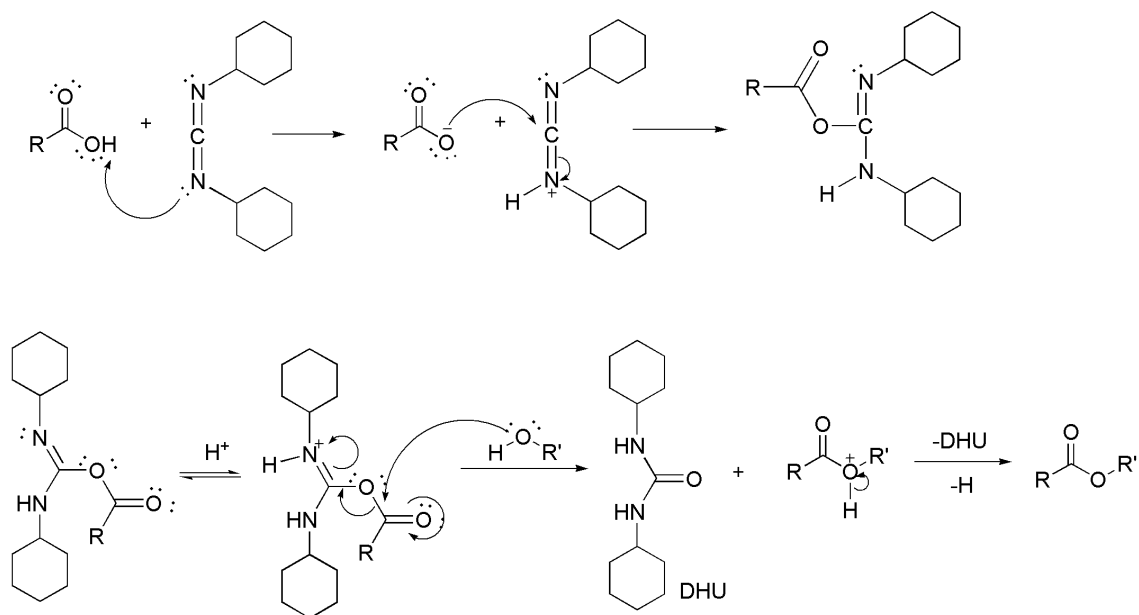
Entretanto, como a venda de cloreto de oxalila e cloreto de tionila vem sendo descontinuada e tais reagentes são os mais utilizados para síntese de cloreto de acila, optamos pela esterificação de Steglich para a síntese de **LAFIS 315** (Rivero-Cruz *et al.*, 2007) partindo da condensação de derivados de ácido benzóico com derivados de alcoóis benzílicos na presença de TEA numa reação em meio a DCC, segundo esquema 11 (Rivero-Cruz *et al.*, 2007).



Esquema 11. Síntese do **LAFIS 315**. *Condição de reação:* (a) TEA, DCC, dimetilformamida (DMF), t.a., 3 h.

Nesta reação, o DCC e o ácido carboxílico são capazes de formar o intermediário *O*-acilisoureia, que oferece reatividade semelhante ao correspondente anidrido de ácido carboxílico. Dessa forma, o álcool age como nucleófilo e ataca o ácido carboxílico ativado para formação do composto estável diciclohexilureia (DHU) e éster (Esquema 12) (Müller, 2013).

Ao verificar que o ácido 3,5-dimetóxi benzóico não foi solúvel em acetonitrila, solvente utilizado na síntese de benzoatos de benzila polimetoxilados (Rivero-Cruz *et al.*, 2007), optamos por utilizar DMF como solvente e conseguimos observar, por RMN, tanto a formação do composto intermediário *O*-acilisoureia, quanto a formação de dois produtos, um deles sendo identificado como **LAFIS 315**, com rendimento de 26 %.



Esquema 12. Mecanismo de reação para a síntese de **LAFIS 315**.

O rendimento fornecido pela reação é considerado satisfatório uma vez que álcoois não são nucleófilos fortes para atacar o intermediário de reação O-acylisourea e formar o respectivo éster. Uma solução seria a adição de DMAP na reação, proporcionando a formação de uma amida reativa entre DMAP e O-acylisourea que reage rapidamente com álcoois, fornecendo os respectivos ésteres (Müller, 2013).

Para a síntese do **LAFIS 405**, adotamos a metodologia mencionada por Rivera-Cruz e colaboradores (2007) conforme descrito anteriormente para a síntese do **LAFIS 315** e apresentada no esquema 13.



Esquema 13. Síntese de **LAFIS 405**. *Condição de reação:* (a) TEA, DCC, Acetonitrila, t.a., 3 h.

Apesar de ser o método comumente utilizado para a síntese de benzoatos de benzila poliidroxilados (Rivero-Cruz *et al.*, 2007), a esterificação de Steglich de ácido 2,4-dihidróxi-benzóico com 4-metóxi-benzil álcool na presença de DCC e acetonitrila como solvente na síntese de **LAFIS 405** levou ao baixo rendimento de 4%. Um dos motivos para isso pode ser a baixa solubilidade do DCC em acetonitrila, pois houve apenas a dispersão de DCC no meio reacional. O consumo dos materiais de partida foi baixo e, ao mesmo tempo, houve a formação de vários subprodutos de reação.

Como alternativa para o aumento do rendimento da reação poderia ser a troca de solvente por outro que solubilize tanto o DCC quanto o ácido 2,4-dihidróxi-benzóico já que acetonitrila apenas solubiliza o ácido ou a adição de DMAP ao meio reacional como catalisador, conforme mencionado anteriormente.

Da proposta de síntese dos cinco compostos, todos foram obtidos com sucesso, embora com rendimentos moderados.

Os resultados de caracterização de todos os compostos sintetizados estão apresentados em seguida na parte experimental. Discutimos aqui, a caracterização dos compostos inéditos **LAFIS 313**, **LAFIS 314** e **LAFIS 315**.

O composto **LAFIS 313** foi obtido como um pó amarelo e apresentou um pico do íon molecular em m/z 459.1808 $[M+H]^+$, consistente com a fórmula molecular $C_{28}H_{26}O_6$. O espectro de infravermelho (IV) apresentou a banda de deformação axial da ligação C=O em 1657 cm^{-1} e a banda referente às metoxilas em 1271 cm^{-1} (Figura 1). O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H apresentou sinais referentes aos dois hidrogênios olefínicos em δ 7,54- 7,47 (*m*, $H_{\alpha+\alpha'}$) e δ 7,77- 7,71 ppm (*m*, $H_{\beta+\beta'}$) (Figura 2) cuja correlação foi confirmada no espectro de COSY (Figura 3). Os quatro grupos metoxila foram observados em δ 3,82 (*s*, 12H) e em δ 55,5 ppm no espectro de APT (Figura 4). O duplete em δ 6,78 (*d*, 4H) ppm foi atribuído aos hidrogênios $H_{2'+6'+2''+6''}$, sendo que o sinal apresenta constante de acoplamento $J= 2,2$ Hz devido ao acoplamento com os hidrogênios em *meta* H_4' e H_4'' , os quais apareceram como sinal em δ 6,52 (*t*, $J = 2,3$ Hz, 2H) e sua correlação também pode ser observada no espectro de COSY. O duplo duplete em δ 8,20 (*dd*, $J = 7,7$ e $1,7$ Hz, 2H) ppm foi atribuído aos hidrogênios H_4 e H_6 , sendo que o sinal apresenta constante de acoplamento $J= 7,7$ Hz devido acoplamento com H_5 que aparece como sinal em δ 7,63 (*dt*, $J = 7,8$ e $3,8$ Hz, 1H) ppm e $J= 1,7$ Hz devido acoplamento com H_2 que aparece como sinal em δ 8.60 (*t*, $J = 1,7$ Hz, 1H) ppm. O

espectro de COSY mostrou os sinais de interação entre os hidrogênios H_{4+6} e H_5 , enquanto que o espectro de HSQCAD confirmou as atribuições δ 128,3, 129,1 e 132,4 ppm para os carbonos C_2 , C_5 e C_{4+6} , respectivamente (Figura 5). Os sinais em δ 122,0 e δ 145,7 ppm no espectro de APT foram atribuídos aos carbonos $C_{\alpha+\alpha'}$ e $C_{\beta+\beta'}$, respectivamente, cuja correlação também pode ser vista no espectro de HSQCAD, enquanto que o sinal em δ 189,7 ppm foi atribuído às carbonilas da cetona α,β -insaturada.

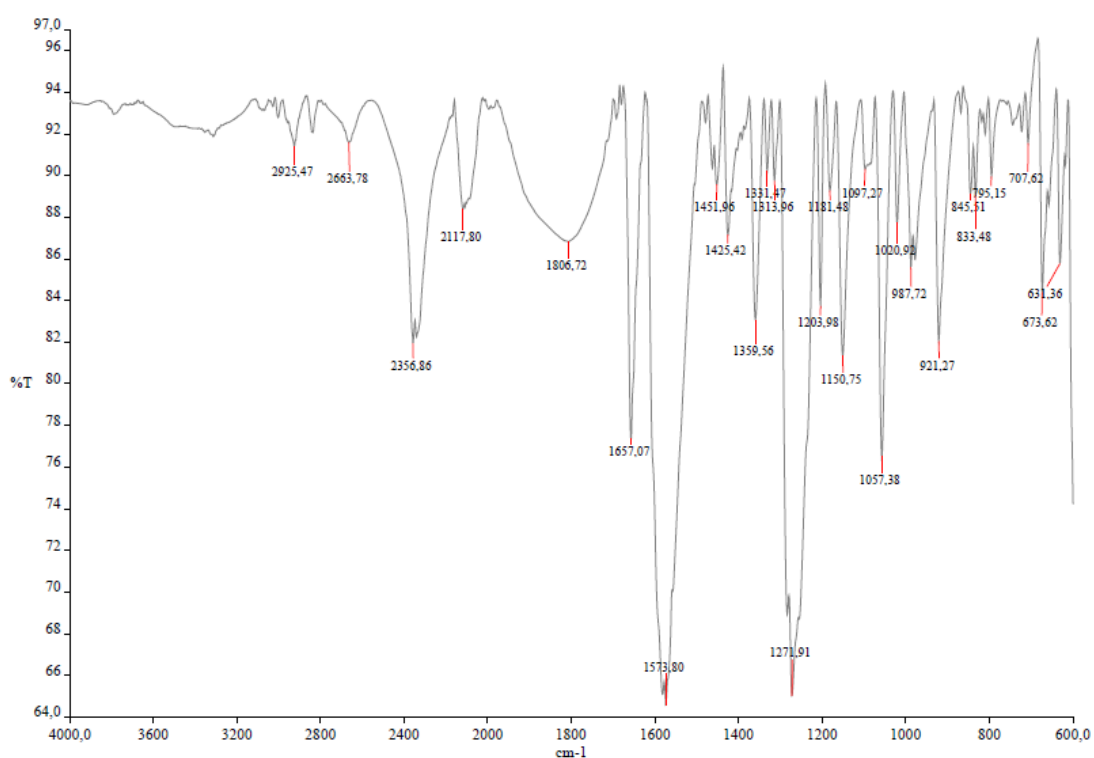


Figura 1. Espectro de infravermelho (ATR) do composto **LAFIS 313**.

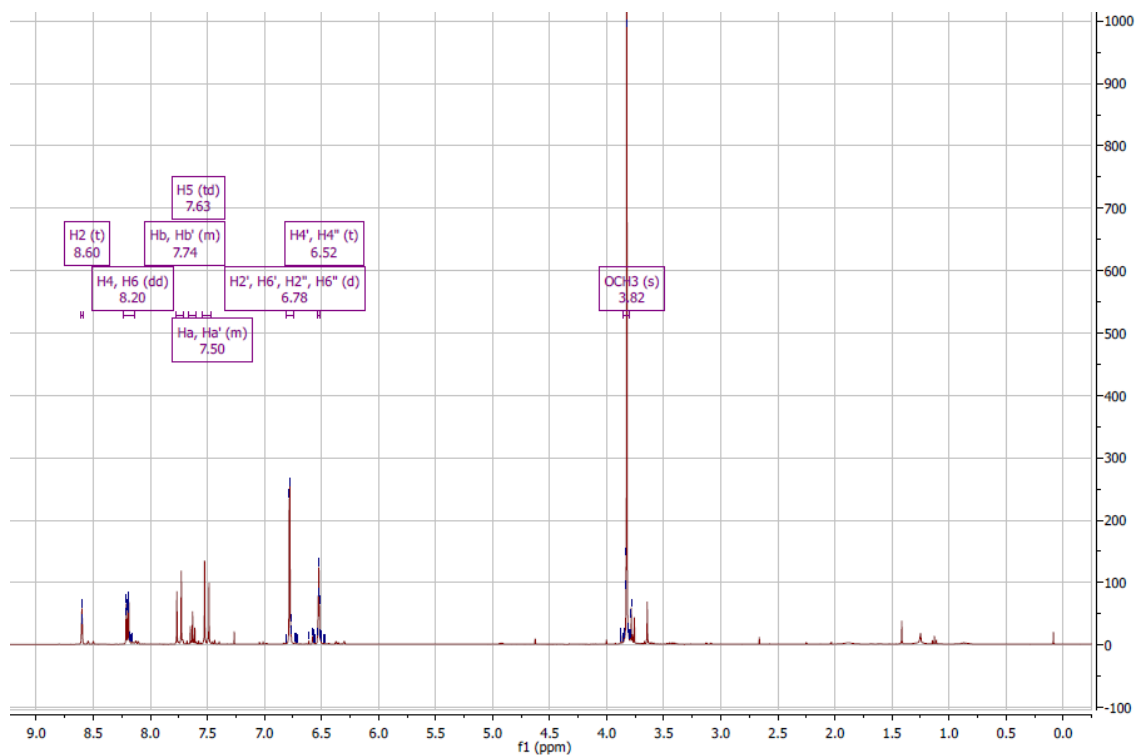


Figura 2. Espectro de RMN de ¹H do composto LAFIS 313 (CDCl₃, 400 MHz).

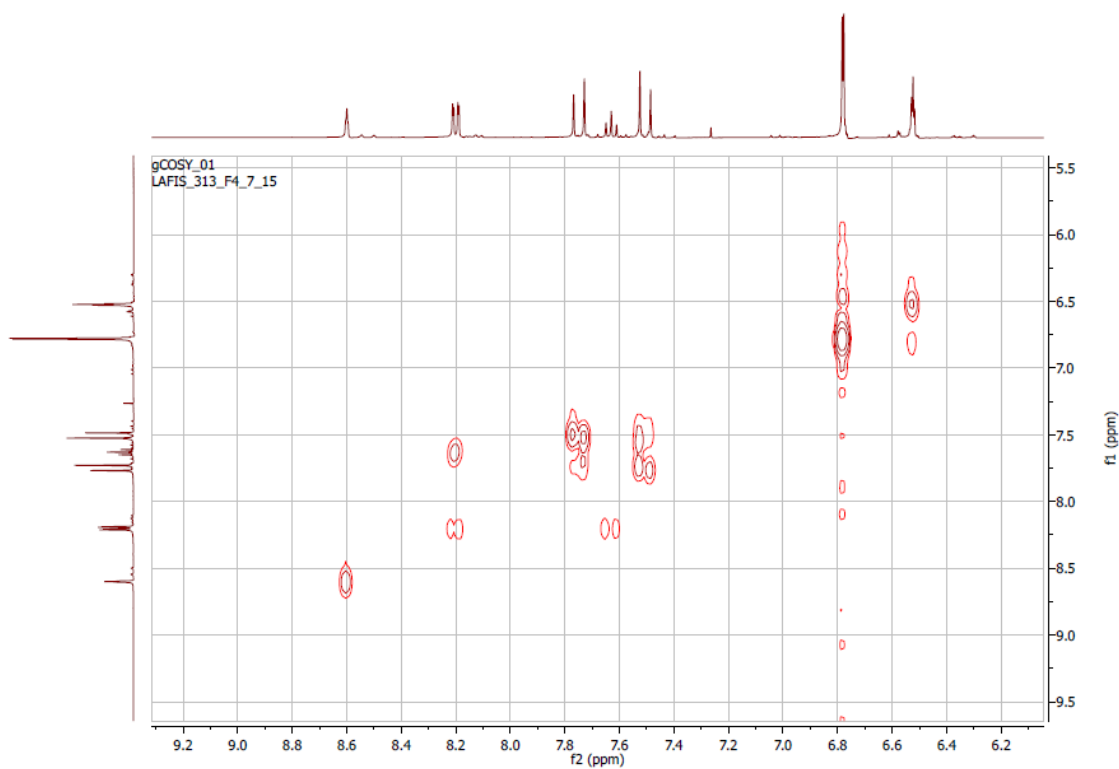


Figura 3. Espectro de COSY do composto LAFIS 313 (CDCl₃).

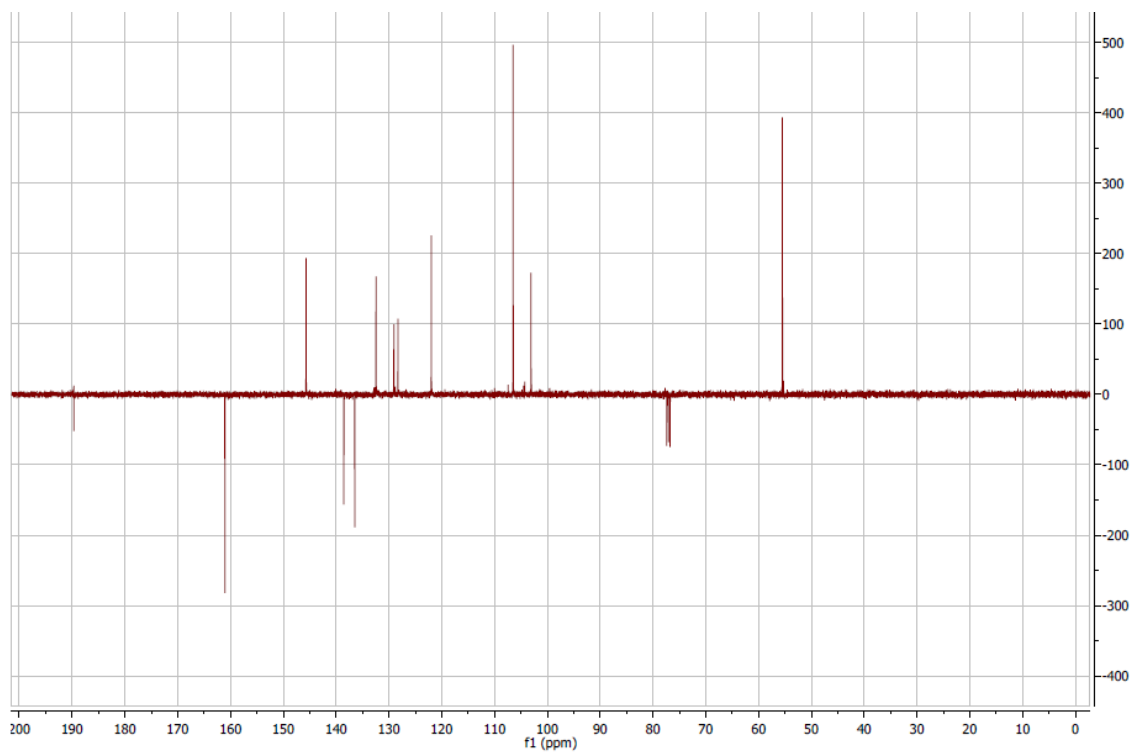


Figura 4. Espectro de APT do composto **LAFIS 313** (CDCl_3 , 101 MHz).

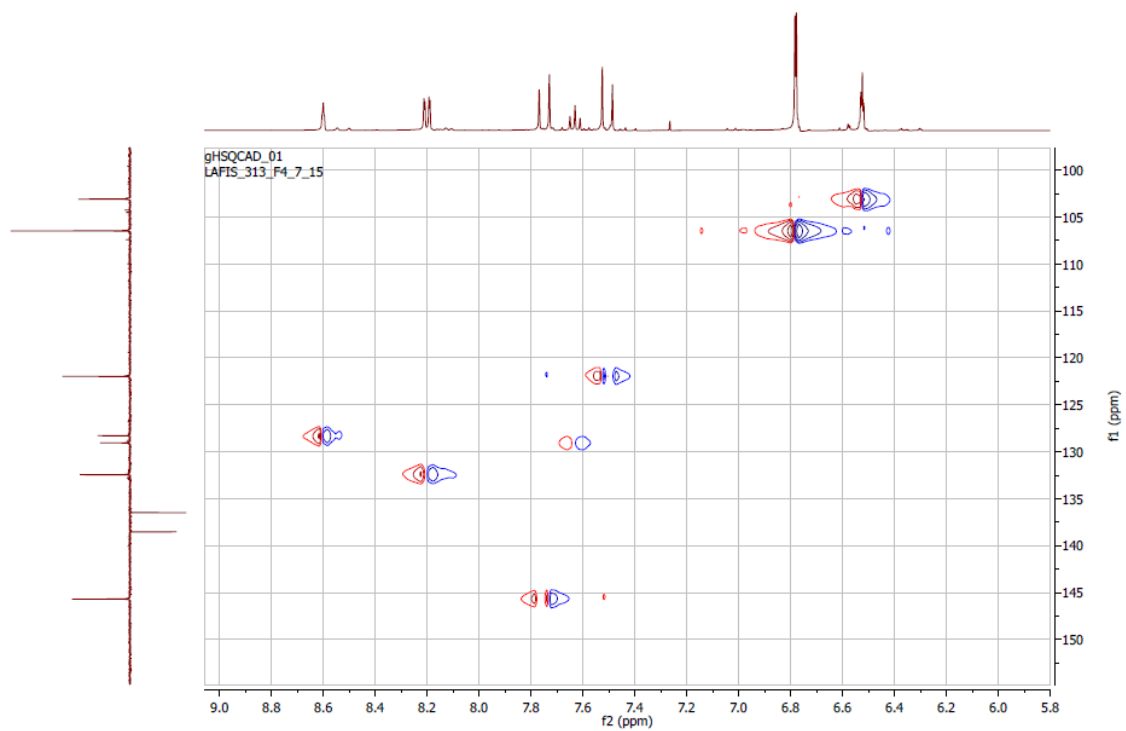


Figura 5. Espectro de HSQCAD do composto **LAFIS 313** (CDCl_3).

O composto **LAFIS 314** foi obtido como um pó branco e apresentou um pico do íon molecular em m/z 331.1538 $[M+H]^+$, consistente com a fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_5$. O espectro de IV apresentou a banda referente à ligação C=O em 1681 cm^{-1} e em 1202 cm^{-1} foi observada a banda referente às metoxilas (Figura 6). O espectro de RMN de ^1H revelou a presença dos hidrogênios H_α e H_β em δ 3,23 (dt , $J = 15,4$ e $8,0$ Hz, 2H) e δ 2,99 ppm (m , 2H), respectivamente, com constantes de acoplamento $J = 15,4$ MHz devido ao acoplamento *trans* com H_β e $J = 8,0$ Hz devido ao acoplamento *sis* com o outro H_β (Figuras 7). A integração dos simpletos entre δ 3,79-3,77 ppm indicou a presença de doze hidrogênios das metoxilas. Os sinais dos hidrogênios H_{2+6} e H_4 do anel B foram observados em δ 6,40 (d , $J = 2,3$ Hz, 2H) e δ 6,32 ppm (t , $J = 2,3$ Hz, 1H), respectivamente, ambos com uma constante de acoplamento atribuída a uma correlação *meta*. Da mesma forma, os hidrogênios $H_{4'}$ e $H_{2'+6'}$ do anel A, foram observados como sinais em δ 6,64 (t , $J = 2,3$ Hz, 1H) e δ 7,08 (d , $J = 2,3$ Hz, 2H), respectivamente, evidenciando uma substituição *meta* desse anel cuja correlação dos hidrogênios pode ser confirmada no espectro de COSY (Figura 8). O sinal referente à carbonila foi observado em δ 198,8 ppm, e os sinais referentes aos carbonos C_α e C_β em δ 40,3 e δ 30,5 ppm, respectivamente (Figura 9). Além disso, os dois sinais em δ 55,6 e δ 55,3 ppm foram atribuídos aos quatro grupamentos metoxila, já que C_{3+5} e $C_{3'+5'}$ apareceram ambos como sinais únicos. Com o auxílio do espectro de HSQCAD foi possível correlacionar os sinais δ 106,5, 105,8 e 105,4 ppm aos carbonos C_{2+6} , $C_{2'+6'}$ e $C_{4'}$, respectivamente (Figura 10).

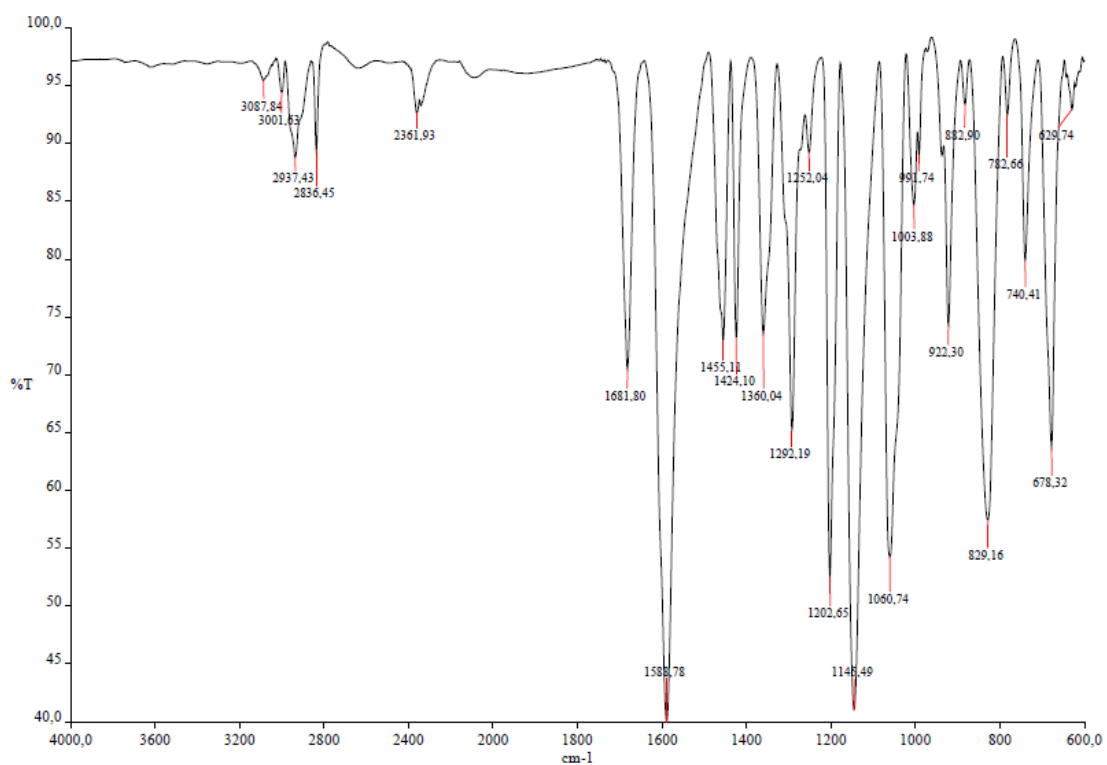


Figura 6. Espectro de infravermelho (ATR) do composto **LAFIS 314**.

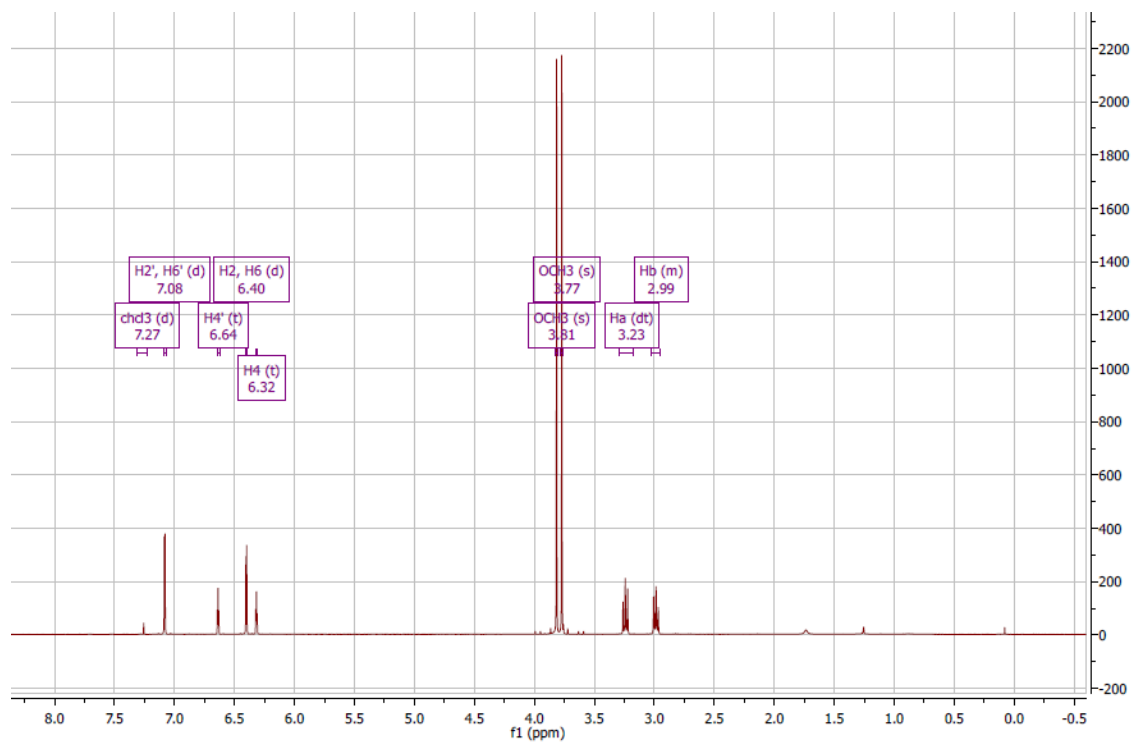


Figura 7. Espectro de RMN de ¹H do composto **LAFIS 314** (CDCl₃, 400 MHz).

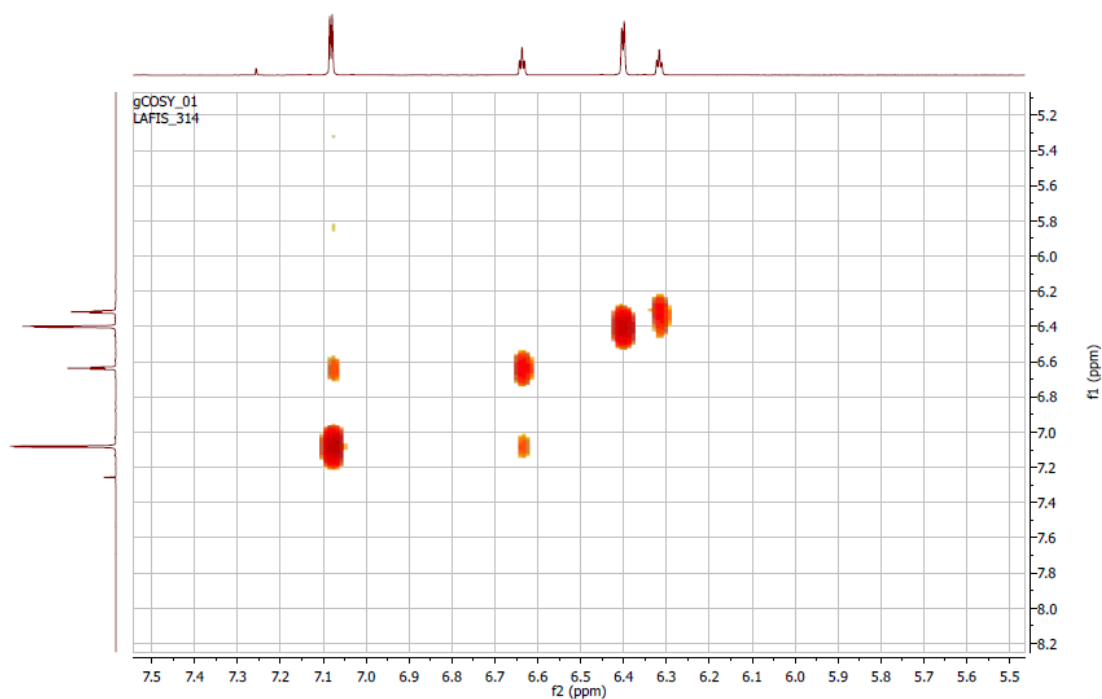


Figura 8. Espectro de COSY do composto LAFIS 314 (CDCl₃).

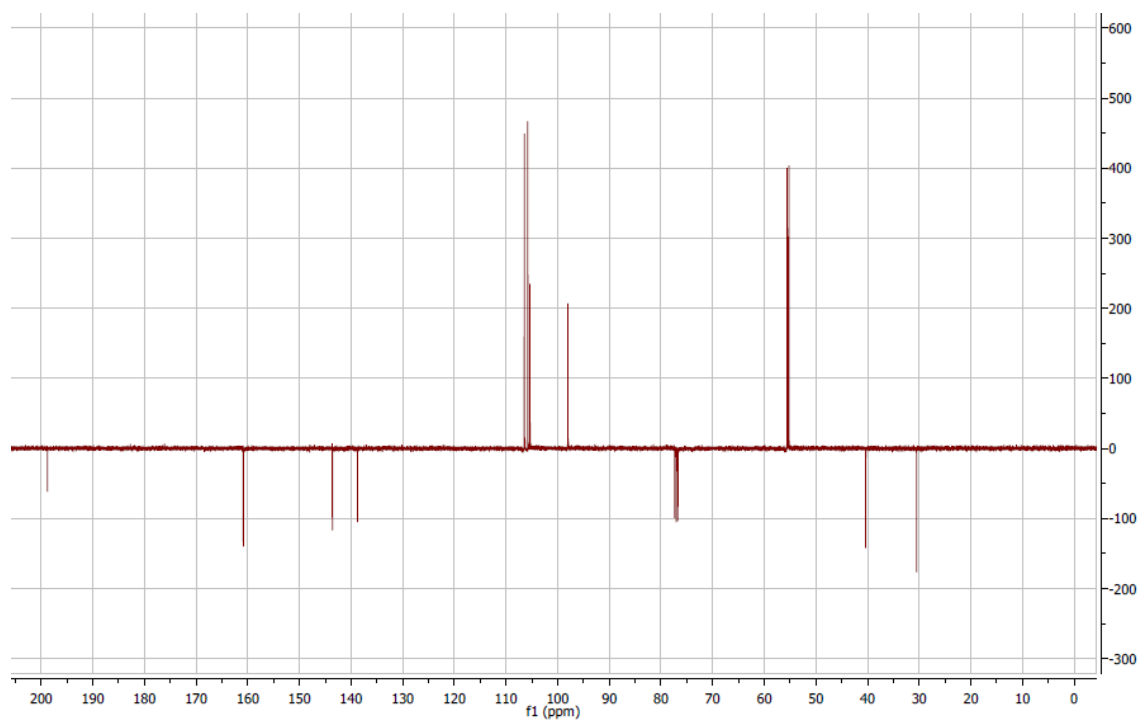


Figura 9. Espectro de APT do composto LAFIS 314 (CDCl₃, 101 MHz).

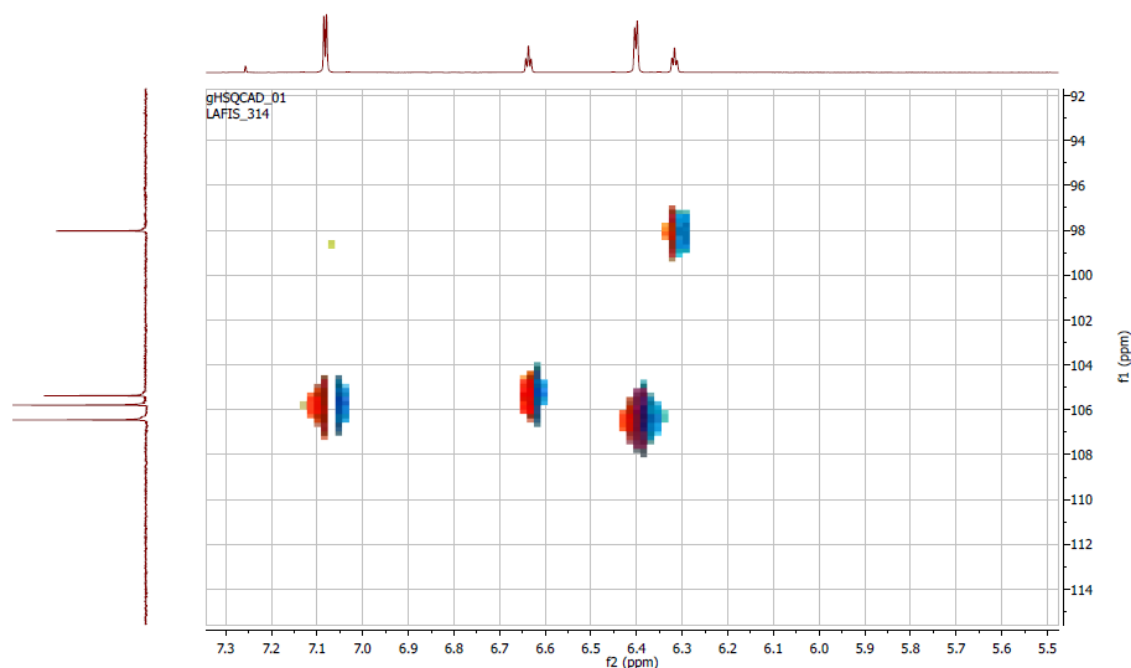


Figura 10. Espectro de HSQCAD do composto **LAFIS 314** (CDCl_3).

O composto **LAFIS 315** foi isolado com um pó branco e apresentou um pico do íon molecular em m/z 333.1349 $[\text{M}+\text{H}]^+$, consistente com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6$. No espectro de RMN de ^1H , os hidrogênios adjacentes ao grupamento éster foram observados como simpleto em δ 5,28 (s, 2H) ppm (Figura 11). Os sinais dos hidrogênios H_{2+6} e H_4 do anel B foram observados em δ 6,58 (dd, $J = 2,3$ e 0,6 Hz, 2H) e δ 6,43 ppm (t, $J = 2,3$ Hz, 1H), respectivamente, ambos com uma constante de acoplamento atribuída a uma correlação *meta* (Figura 11). Da mesma forma, o hidrogênio $\text{H}_{2'+6'}$ do anel A aparece como sinal em δ 7,22 (dd, $J = 2,2$ e 0,5 Hz, 2H) ppm revelando a presença de um acoplamento *meta* com o hidrogênio $\text{H}_{4'}$ cujo sinal aparece em δ 6,64 (t, $J = 2,2$ Hz, 1H) ppm. Ambas as correlações dos hidrogênios H_{2+6} com H_4 e $\text{H}_{2'+6'}$ com $\text{H}_{4'}$, foram observadas no espectro de COSY (Figura 12). Os quatro grupamentos metoxila foram observados em δ 3,80 (s, 6H) e δ 3,82 (s, 6H) no espectro de RMN de ^1H e em δ 55,4 e δ 55,6 ppm no espectro de APT (Figura 13). Ainda, no espectro de APT foram observados os sinais referentes à carbonila em δ 166,1 ppm e os sinais referentes ao carbono adjacente ao grupamento éster em δ 66,7 ppm. E pelo espectro de HSQCAD as correlações dos

hidrogênios H₂₊₆ e H_{4'} com os carbonos C₂₊₆ e C_{4'}, respectivamente, pode ser observada (Figura 14).

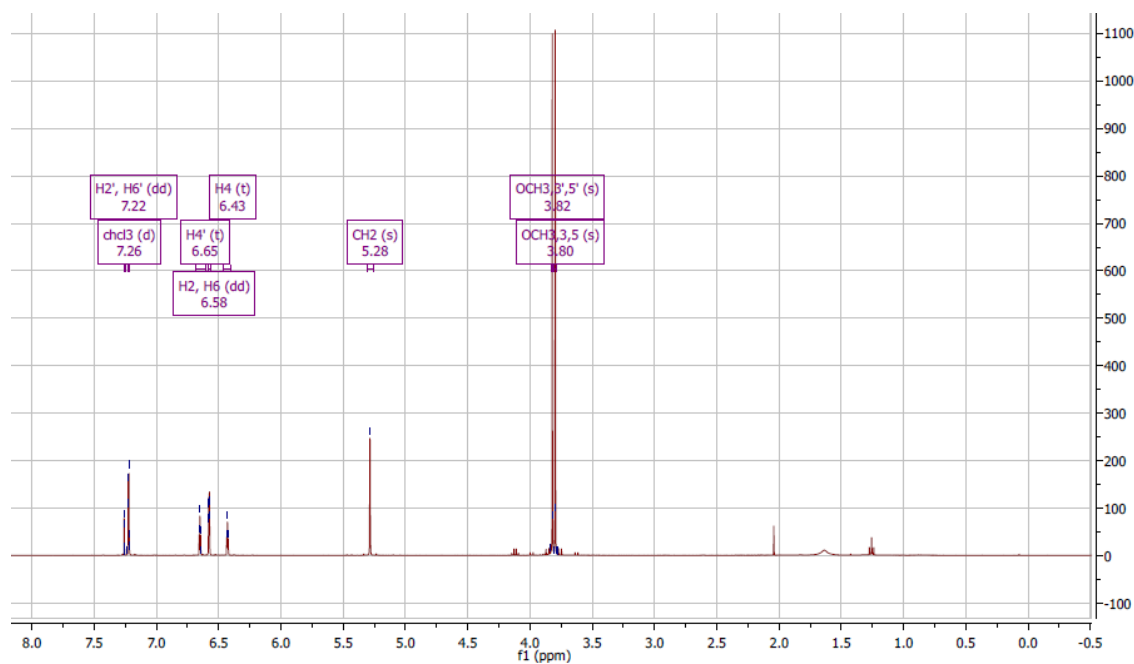


Figura 11. Espectro de RMN de ¹H do composto LAFIS 315 (CDCl₃, 400 MHz).

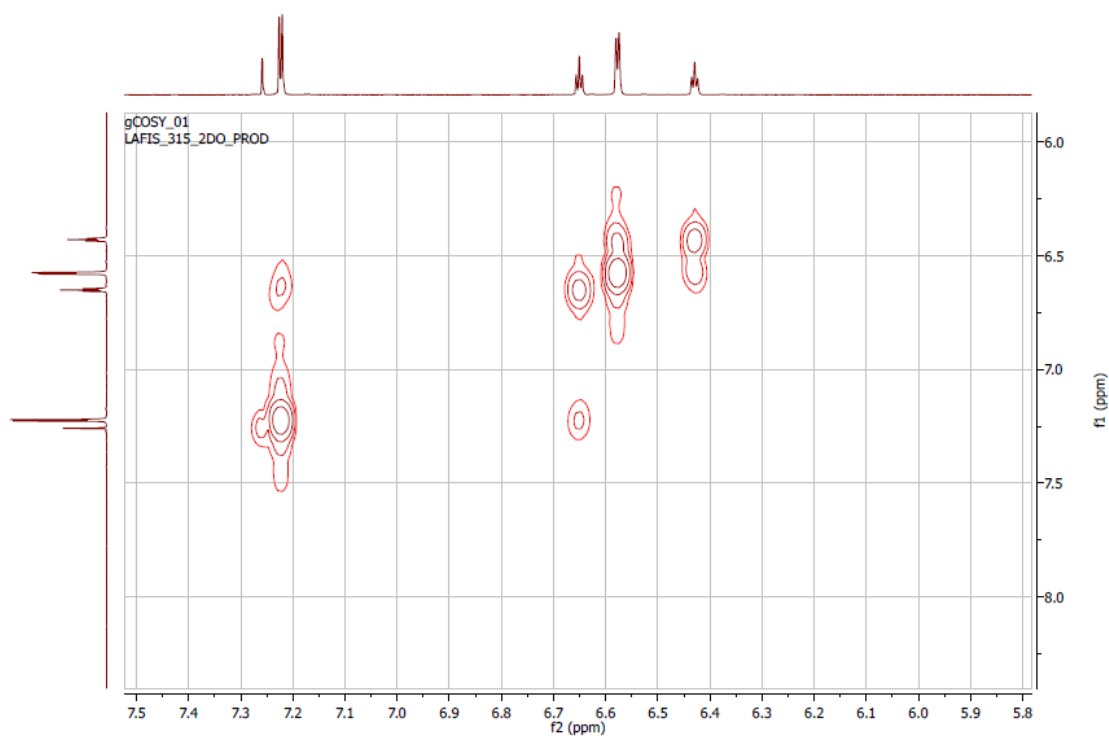


Figura 12. Espectro de COSY do composto LAFIS 315 (CDCl₃).

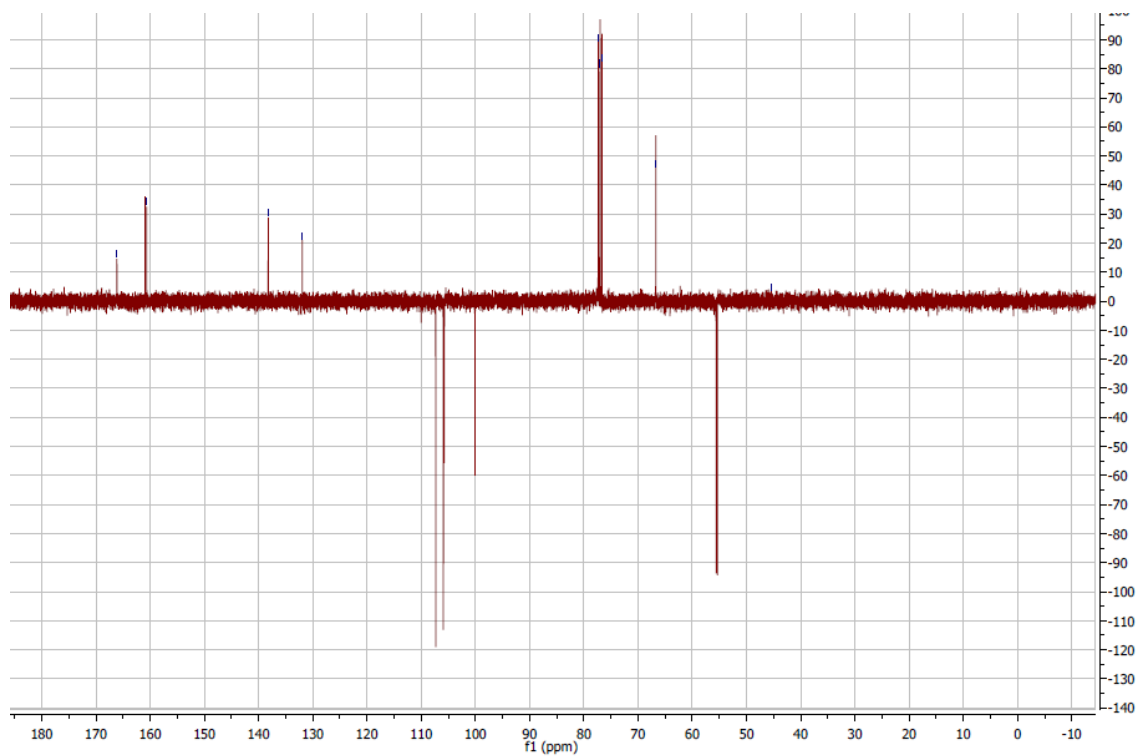


Figura 13. Espectro de APT do composto **LAFIS 315** (CDCl_3 , 101 MHz).

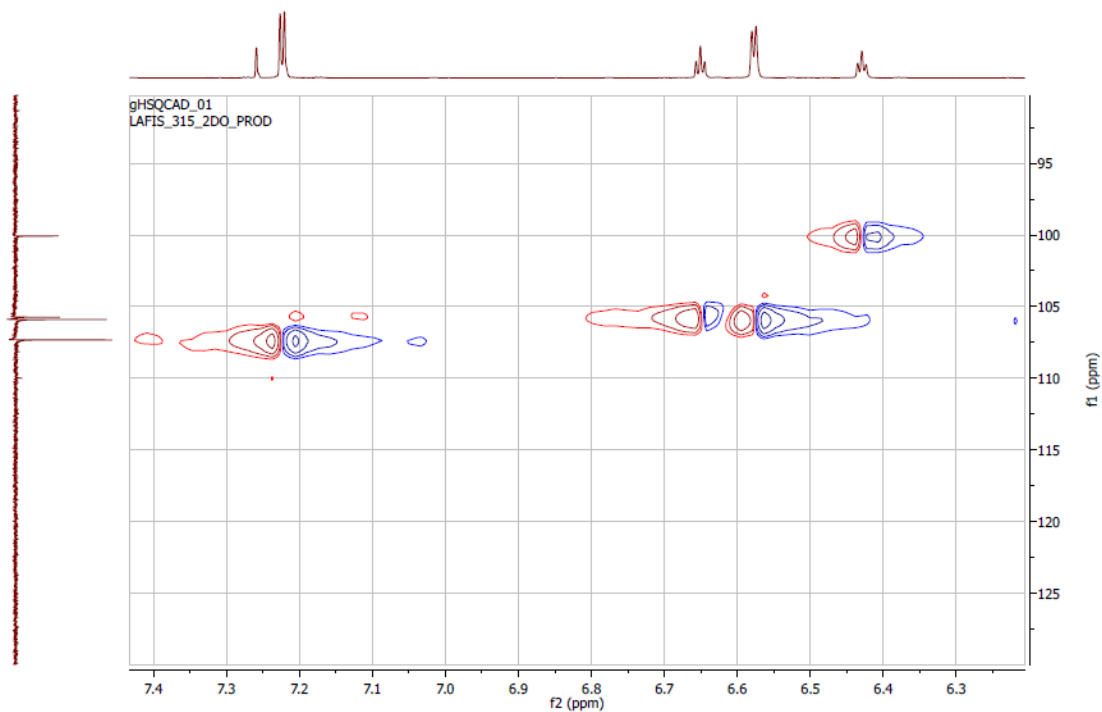


Figura 14. Espectro de HSQCAD do composto **LAFIS 315** (CDCl_3).

5.5. Parte experimental

5.5.1. Equipamentos e Reagentes

O ponto de fusão dos compostos sintetizados foi determinado com o aparato manual Reichert. O coeficiente de partição ($\log P$) foi determinado utilizando o programa de acesso livre na rede mundial: ACD/LogP (www.acdlabs.com/products/phys_chem_lab/logp/) (Bennett *et al.*, 2009). Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer modelo FT-Spectrum BRXII/Miracle ATR e a faixa de 4000 a 600 cm^{-1} . Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de alta resolução Q-ToF micro Waters, operando em modo de ionização electrospray. Os espectros de RMN de ^1H (400 MHz), RMN de ^{13}C (101 MHz), APT (101 MHz), COSY, HMQC e HSQCAD foram obtidos em um espectrômetro Varian. Os deslocamentos químicos estão apresentados em termos de partes por milhão com tetrametilsilano (TMS) como referência interna. O padrão de multiplicidade dos sinais estão descritos como simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), multiplete (m), duplo duplete (dd) e duplo tripleto (dt). Todos os reagentes disponíveis comercialmente foram utilizados sem prévia purificação, exceto quando especificado o contrário. Todos os solventes utilizados possuíam grau AR e foram destilados com pressão positiva de nitrogênio quando necessário. Todas as reações que exigiam atmosfera inerte foram realizadas em aparato previamente seco e sob atmosfera de nitrogênio. O curso das reações foi monitorado através de cromatografia em camada delgada (CCD), as quais foram realizadas em placas de gel de sílica 60 F254 Merck. A visualização foi obtida através de uma lâmpada de luz ultravioleta. Cromatografia em coluna foi realizada utilizando matriz de gel de sílica 60 (35–70 μm). E a cromatografia em camada delgada preparativa foi realizada em placas de vidro (20x20 cm) com gel de sílica 60 GF254.

5.5.2. Síntese de Bi-chalconas (**LAFIS 313**)

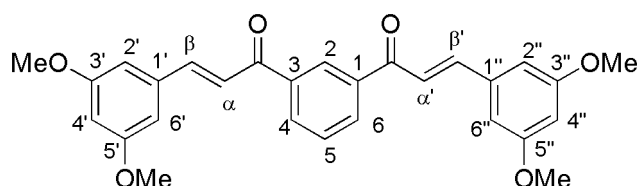


Figura 15. LAFIS 313

1-(3-(3',5'-dimetóxi-charconil))-3-(3,5-dimetóxi-fenil)prop-2-en-1-ona (**LAFIS 313**) (Figura 15). A uma solução de 1,3-diacetilbenzeno (131 mg; 0,81 mmol) em etanol (0,5 mL) à 0 °C foi adicionado 3,5-dimetóxi-benzaldeído (269 mg; 1,62 mmol) e uma solução aquosa de NaOH 19 % (0,2 mL). Depois de ter sido agitada por 12 h em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com adição de água (10 mL), acidificada com solução aquosa de HCl 10 % e seu volume diminuído em evaporador rotatório. Procedeu-se a extração com diclorometano (3 x 20 mL) e as fases orgânicas foram secas em Na₂SO₄ e concentradas sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando ciclohexano - acetato de etila (80:20) como fase móvel. Desta maneira o composto **LAFIS 313** foi obtido (76 mg), 20 % rendimento, pó amarelo; PF: 123- 127 °C; Log *P*: 5,75 ± 0,48; IV (ATR): 2925 (CH₂), 1553 (C=C), 1657 (C=O), 1271 (OCH₃) cm⁻¹; EM: *m/z* 459.1808 [M+H]⁺ (Calculado para C₂₈H₂₆O₆: 459.1808); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,60 (*t*, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂), 8,20 (*dd*, *J* = 7,7 e 1,7 Hz, 2H, H₄₊₆), 7,77 – 7,71 (*m*, 2H, H_{β+β'}), 7,63 (*dt*, *J* = 7,8 e 3,8 Hz, 1H, H₅), 7,54 – 7,47 (*m*, 2H, H_{α+α'}), 6,78 (*d*, *J* = 2,2 Hz, 4H, H_{2'+6'+2''+6''}), 6,52 (*t*, *J* = 2,3 Hz, 2H, H_{4'+4''}), 3,83 (*s*, 12H, 4 x OCH₃); APT (101 MHz, CDCl₃): δ 189,7 (C=O), 161,1 (C_{3'+5'+3''+5''}), 145,7 (C_{β+β'}), 138,5 (C_{1'+1''}), 136,5 (C₁₊₃), 132,4 (C₄₊₆), 129,1 (C₂), 128,3 (C₅), 122,0 (C_{α+α'}), 106,5 (C_{2'+6'+2''+6''}), 103,1 (C_{4'+4''}), 55,5 (4 x OCH₃).

5.5.3. Síntese de diidrochalconas (**LAFIS 314** e **LAFIS 404**)

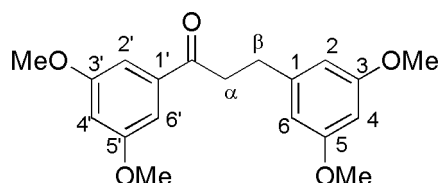


Figura 16. LAFIS 314

1-(3,5-dimetóxi-fenil)-3-(3,5-dimetóxi-fenil)-propan-1-ona (**LAFIS 314**) (Figura 16). A uma solução de 3,5,3',5'-tetrametóxi-chalcona (**LAFIS 31**) (102mg; 0,31 mmol) em acetato de etila seco (1 mL) e Pd/C 10% (7 mg; 0,31 mmol) foi borbulhado H₂ até enchimento de um balão previamente acoplado ao balão de reação. Após 1 h de vigorosa agitação, procedeu-se a filtração para eliminação do paládio e secagem do solvente em rota evaporador. O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando cicloexano - acetato de etila (85:15) como fase móvel. Desta maneira o composto **LAFIS 314** foi obtido (56 mg), 55 % rendimento, pó branco; PF: 60-65 °C; Log *P*: 3,77 ± 0,45; IV (ATR): 2937 (CH₂), 2836 (CH₃), 1681 (C=O), 1588 (C=C), 1202 (OCH₃) cm⁻¹; EM: *m/z* 331.1538 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₉H₂₂O₅: 331.1545); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,08 (*d*, *J* = 2,3 Hz, 2H, H_{2'+6'}), 6,64 (*t*, *J* = 2,3 Hz, 1H, H_{4'}), 6,40 (*d*, *J* = 2,3 Hz, 2H, H₂₊₆), 6,32 (*t*, *J* = 2,3 Hz, 1H, H₄), 3,79 (*s*, 6H, 2 x OCH₃), 3,77 (*s*, 6H, 2 x OCH₃), 3,23 (*dt*, *J* = 15,4 e 8,0 Hz, 2H, H_α), 2,99 (*m*, 2H, H_β); APT (101 MHz, CDCl₃): δ 198,8 (C=O), 160,9 (C_{3'+5'+3+5}), 143,6 (C₁), 138,8 (C_{1'}), 106,5 (C₂₊₆), 105,8 (C_{2'+6'}), 105,4 (C₄), 98,0 (C₄), 55,3 (4 x OCH₃), 40,4 (C_α), 30,5 (C_β).

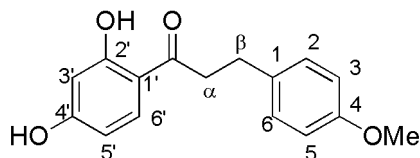


Figura 17. LAFIS 404

1-(2,4-dihidróxi-fenil)-3-(4-metóxi-fenil)-propan-1-ona (**LAFIS 404**) (Figura 17). Ao resorcinol (220 mg; 2 mmol) e ácido-4-metóxi-fenil proniônico (360 mg; 2 mmol) em trifluoreto de boro eterato (1,3 mL; 10,2 mmol) foi agitada entre 80- 90°C por 90 min sob atmosfera inerte. A mistura reacional foi vertida em uma solução aquosa de acetato de sódio 10 % (100 mL) e mantida sem agitação durante 4 h. Procedeu-se a extração utilizando acetato de etila (3 x 20 mL) e as fases orgânicas combinadas foram lavadas com água destilada (20 mL) e solução saturada de NaCl (20 mL), secas com Na₂SO₄ e concentradas sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando cicloexano - acetato de etila (8:2) como eluente. Desta maneira o composto **LAFIS 404** foi obtido (238,0 mg), 44 % rendimento, pó bege claro; PF: 87- 90 °C (literatura: 58-60 °C) (Siddaiah *et al.*, 2006); Log *P*: 3,82 ± 0,30; IV (ATR): 3322 (OH), 2929 (CH₂), 1609 (C=O), 1355 (C=C), 1242 (OCH₃) cm⁻¹; EM: *m/z* 296.1022 [M+Na]⁺ (Calculado para C₁₆H₁₆O₄Na: 296.1025); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 12,84 (s, 1H, OH), 7,60 (*d*, *J* = 8,7 Hz, 1H, H_{6'}), 7,15 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 2H, H₂₊₆), 6,84 (*d*, *J* = 8,4 Hz, 2H, H₃₊₅), 6,37 (*m*, 2H, H_{3'+5'}), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,18 (*t*, *J* = 7,7 Hz, 2H, H_β), 2,98 (*t*, *J* = 7,7 Hz, 2H, H_α); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 204,1 (C=O), 165,0 (C_{4'}), 163,3 (C_{2'}), 157,9 (C₄), 132,9 (C₁), 132,3 (C_{6'}), 129,3 (C₂₊₆), 114,0 (C₃₊₅), 113,5 (C_{1'}), 108,1 (C_{5'}), 103,5 (C_{3'}), 55,3 (OCH₃), 39,9 (C_α), 29,7 (C_β). Pelo espectro de COSY foi possível observar a correlação entre os hidrogênios H_α com H_β, H_{3'+5'} com H_{6'} e H₃₊₅ com H₂₊₆. No espectro de HMQC foi possível observar a correlação dos hidrogênios H_{3'+5'} com os carbonos C_{3'} e C_{5'}. As atribuições de elucidção do composto conferem com dados da literatura (Siddaiah *et al.*, 2006).

5.5.4. Síntese de benzoatos de benzila (LAFIS 315 e LAFIS 405)

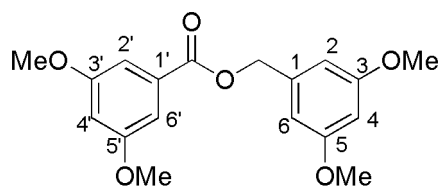


Figura 18. LAFIS 315

3,5-dimetóxi-benzoato de 3',5'-dimetóxi-benzila (LAFIS 315) (Figura 18). Ao ácido 3,5-dimetóxi-benzóico (182 mg; 1 mmol) em dimetilformamida (DMF) (6 mL) foi adicionado DCC (162 mg; 1 mmol). A mistura reacional foi agitada por 1 h a 50 °C até completa dissolução dos sólidos. Em seguida, 3,5-dimetóxi-benzilálcool (168 mg; 1 mmol) foi adicionado ao meio reacional seguindo a agitação por 3 h à 65 °C. O produto resultante foi vertido em água gelada e extraído com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi sucessivamente lavada com 5 % HCl 1N (3 x 20 mL), 5 % NaHCO₃ (3 x 20 mL), e água (3 x 20 mL). A fase orgânica resultante foi seca em Na₂SO₄ e concentrada em vácuo. O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, usando cicloexano e acetato de etila como eluentes. Desta maneira o composto **LAFIS 315** foi obtido (86,1 mg), 26 % rendimento, pó branco; PF: 75- 80 °C; Log *P*: 3,33 ± 0,52; EM: *m/z* 333.1349 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₈H₂₀O₆: 333.1338); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,22 (*dd*, *J* = 2,2 e 0,5 Hz, 2H, H_{2'+6'}), 6,65 (*t*, *J* = 2,3 Hz, 1H, H_{4'}), 6,58 (*dd*, *J* = 2,3 e 0,6 Hz, 2H, H₂₊₆), 6,43 (*t*, *J* = 2,3 Hz, 1H, H₄), 5,28 (*s*, 2H, CH₂), 3,82 (*s*, 6H, 2 x OCH₃), 3,80 (*s*, 6H, 2 x OCH₃); APT (101 MHz, CDCl₃): δ 166,1 (C=O), 160,9 (C₃₊₅), 160,6 (C_{3'+5'}), 138,2 (C₁), 131,9 (C_{1'}), 107,3 (C_{2'+6'}), 105,9 (C₂₊₆), 105,7 (C_{4'}), 100,1 (C₄), 66,7 (CH₂), 55,6 (2 x OCH₃), 55,4 (2 x OCH₃). No espectro de COSY foi possível observar a correlação dos hidrogênios H_{2'+6'} com H_{4'} e H₂₊₆ com H₄. Pelo espectro de HSQCAD as correlações dos hidrogênios H₂₊₆ e H_{4'} com os carbonos C₂₊₆ e C_{4'}, respectivamente, pode ser observada.

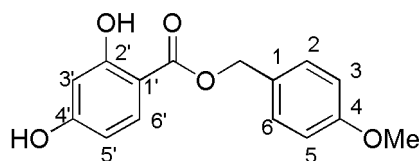


Figura 19. LAFIS 405

4-metóxi-benzoato de 2',4'-dihidróxi-benzila (LAFIS 405) (Figura 19). Ao ácido 2,4-dihidróxi-benzóico (154 mg; 1 mmol) em acetonitrila (6 mL) foi adicionado DCC (162 mg; 1 mmol). A mistura reacional foi agitada por 1 h a 50 °C até completa dissolução dos sólidos. Em seguida, 4-metóxi-benzilálcool (168 mg; 1mmol) foi adicionado ao meio reacional seguindo a agitação por 3 h à 65 °C. O produto resultante foi vertido em água gelada e extraído com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi sucessivamente lavada com 5 % HCl 1N (3 x 20 mL), 5 % NaHCO₃ (3 x 20 mL), e água (3 x 20 mL). A fase orgânica resultante foi seca em Na₂SO₄ e concentrada em vácuo. O resíduo bruto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, usando ciclohexano e acetato de etila como eluentes. Desta maneira o composto **LAFIS 405** foi obtido (11,2 mg), 4 % rendimento, pó bege claro; PF: 63- 67 °C; Log *P*: 3,61 ± 0,28; IV (ATR): 3092 (OH), 2917 (CH₂), 2849 (CH₃), 1667 (C=O), 1355 (C=C), 1134 (OCH₃) cm⁻¹; EM: *m/z* 275.0927 [M+H]⁺ (Calculado para C₁₅H₁₄O₅: 275.0919); RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 10,98 (s, 1H, OH), 7,74 (*d*, *J* = 8,7 Hz, 1H, H_{6'}), 7,37 (*d*, *J* = 8,6 Hz, 2H, H₂₊₆), 6,90 (*d*, *J* = 8,6 Hz, 2H, H₃₊₅), 6,40 (*d*, *J* = 2,4 Hz, 1H, H_{3'}), 6,35 (*dd*, *J* = 8,7 e 2,4 Hz, 1H, H_{5'}), 5,28 (s, 2H, CH₂), 3,81 (s, 3H, CH₃); APT (101 MHz, CDCl₃): δ 169,8 (C=O), 163,7 (C_{4'}), 162,3 (C_{2'}), 159,8 (C₄), 132,0 (C₁), 130,1 (C₂₊₆), 127,6 (C_{6'}), 114,0 (C₃₊₅), 107,9 (C_{5'}), 105,8 (C_{1'}), 103,1 (C_{3'}), 66,5 (CH₂), 55,3 (OCH₃). No espectro de COSY foi possível observar a correlação entre os hidrogênios H_{3'+5'} com H_{6'} e H₃₊₅ com H₂₊₆. Apesar de ser comercialmente obtida, não foram encontrados os dados de elucidação na literatura.

5.6. Conclusões

O planejamento de novos compostos, visando à atividade antitumoral, seguiu uma estratégia racional a partir dos protótipos **LAFIS 31** e **LAFIS 40**, os quais apresentaram atividade citotóxica em linhagem celular C6 de glioma de rato em ensaios preliminares de viabilidade celular (MTT) e morte celular (contagem celular).

Desta maneira, a **Série LAFIS 31**, constituída de uma bi-chalcona, uma diidrochalcona e um benzoato de benzila, e a **Série LAFIS 40**, constituída por uma diidrochalcona e um benzoato de benzila, foram planejadas de forma a proporcionar uma diversidade química suficiente para avaliar o potencial antitumoral desta classe de compostos.

Os derivados planejados foram sintetizados, obtendo-se rendimentos entre 4 e 55 % sendo os compostos **LAFIS 313**, **LAFIS 314** e **LAFIS 315** inéditos.

5.7. Referências

Aavula, S. K.; Chikkulapalli, A.; Hanumanthappa, N.; Jyothi, I.; Vinod Kumar, C. H.; Manjunatha, S. G. Palladium on carbon–bromobenzene mediated esterification and transesterification. *Tetrahedron Letters*, v. 54, p. 5690-5694, 2013.

Bennett, E. R.; Clausen, J.; Linkov, E.; Linkov, I. Predicting physical properties of emerging compounds with limited physical and chemical data: QSAR model uncertainty and applicability to military munitions. *Chemosphere*, v. 77, p. 1412-1418, 2009.

Briot, A.; Baehr, C.; Brouillard, R.; Wagner, A.; Mioskowski, C. Concise Synthesis of Dihydrochalcones via Palladium-Catalyzed Coupling of Aryl Halides and 1-Aryl-2-propen-1-ols. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 69, p. 1374-1377, 2004.

Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry. Part b: Reactions and Synthesis*. 4^a Ed ed. New York: Kluwer Academic Plenum Publishers, 2001. 965p.

Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 1508 p.p.

Dalla-Vechia, L.; Kiekow, C. J.; Leal, I. C. R.; Dos Santos, K. R. N.; Gnoatto, S. C. B.; Verli, H.; De Souza, R. O. M. A.; Gosmann, G. Synthesis of Oxygenated Chalcones with Anti-Staphylococcal Activity. *Letters in Drug Design & Discovery*, v., 2014.

Dhimitruka, I.; SantaLucia, J. Investigation of the Yamaguchi Esterification Mechanism. Synthesis of a Lux-S Enzyme Inhibitor Using an Improved Esterification Method. *Organic Letters*, v. 8, p. 47-50, 2005.

Fang, Y.; Chen, Y.; Feng, G.; Ma, L. Benzyl benzoates: New phlorizin analogs as mushroom tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 1167-1171, 2011.

Felpin, F.-X.; Fouquet, E. A Useful, Reliable and Safer Protocol for Hydrogenation and the Hydrogenolysis of O-Benzyl Groups: The In Situ Preparation of an Active Pd0/C Catalyst with Well-Defined Properties. *Chemistry – A European Journal*, v. 16, p. 12440-12445, 2010.

Feng, J.; Liang, S.; Chen, S.-Y.; Zhang, J.; Fu, S.-S.; Yu, X.-Q. A Metal-Free Oxidative Esterification of the Benzyl C–H Bond. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 354, p. 1287-1292, 2012.

Ganeshpure, P. A.; George, G.; Das, J. Brønsted acidic ionic liquids derived from alkylamines as catalysts and mediums for Fischer esterification: Study of structure–activity relationship. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 279, p. 182-186, 2008.

Gutierrez, M.; Nazareno, M. A.; Sosa, V.; López de Mishima, B. A.; Mishima, H. T. Hydrogenation of chalcones using hydrogen permeating through a Pd and palladized Pd electrodes. *Electrochimica Acta*, v. 55, p. 5831-5839, 2010.

Janeczko, T.; Gładkowski, W.; Kostrzewa-Susłow, E. Microbial transformations of chalcones to produce food sweetener derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 98, p. 55-61, 2013.

Kakati, D.; Barua, N. C. Total synthesis and assignment of the absolute stereochemistry of xanthoangelol J: development of a highly efficient method for Claisen–Schmidt condensation. *Tetrahedron*, v. 70, p. 637-642, 2014.

Khatib, S.; Nerya, O.; Musa, R.; Shmuel, M.; Tamir, S.; Vaya, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 433-441, 2005.

Kim, S.-J.; Kim, C. G.; Yun, S.-R.; Kim, J.-K.; Jun, J.-G. Synthesis of licochalcone analogues with increased anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, p. 181-185, 2014.

Kumar, S.; Reddy L, C. S.; Kumar, Y.; Kumar, A.; Singh, B. K.; Kumar, V.; Malhotra, S.; Pandey, M. K.; Jain, R.; Thimmulappa, R.; Sharma, S. K.; Prasad, A. K.; Biswal, S.; Van der Eycken, E.; DePass, A. L.; Malhotra, S. V.; Ghosh, B.; Parmar, V. S. Arylalkyl Ketones, Benzophenones, Desoxybenzoins and Chalcones Inhibit TNF- α Induced Expression of ICAM-1: Structure-Activity Analysis. *Archiv der Pharmazie*, v. 345, p. 368-377, 2012.

Lee, B. H.; Choi, Y. L.; Shin, S.; Heo, J.-N. Stereoselective Palladium-Catalyzed α -Arylation of 3-Aryl-1-Indanones: An Asymmetric Synthesis of (+)-Pauciflorol F. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 76, p. 6611-6618, 2011.

Liu, L.; Yun, L.; Wang, Z.; Fu, X.; Yan, C.-h. Transition metal free oxidative esterification of alcohols with toluene. *Tetrahedron Letters*, v. 54, p. 5383-5386, 2013.

Mobinikhaledi, A.; Kalhor, M.; Jamalifar, H. Synthesis, characterization and antimicrobial activities of some novel bis-chalcones. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, p. 1811-1816, 2012.

Mori, A.; Mizusaki, T.; Miyakawa, Y.; Ohashi, E.; Haga, T.; Maegawa, T.; Monguchi, Y.; Sajiki, H. Chemoselective hydrogenation method catalyzed by Pd/C using diphenylsulfide as a reasonable catalyst poison. *Tetrahedron*, v. 62, p. 11925-11932, 2006.

Müller, R. Organic Chemistry Portal. v., 2013.

Nowrouzi, N.; Alizadeh, S. Z. Benzoyl peroxide–imidazole: a novel and efficient reagent for the mild conversion of alcohols or phenols into benzoates. *Tetrahedron Letters*, v. 54, p. 2412-2414, 2013.

Ohno, O.; Ye, M.; Koyama, T.; Yazawa, K.; Mura, E.; Matsumoto, H.; Ichino, T.; Yamada, K.; Nakamura, K.; Ohno, T.; Yamaguchi, K.; Ishida, J.; Fukamizu, A.; Uemura, D. Inhibitory effects of benzyl benzoate and its derivatives on angiotensin II-induced hypertension. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 7843-7852, 2008.

Patil, A. B.; Bhanage, B. M. Novel and green approach for the nanocrystalline magnesium oxide synthesis and its catalytic performance in Claisen–Schmidt condensation. *Catalysis Communications*, v. 36, p. 79-83, 2013.

Reddy, M. V. B.; Shen, Y.-C.; Yang, J.-S.; Hwang, T.-L.; Bastow, K. F.; Qian, K.; Lee, K.-H.; Wu, T.-S. New bichalcone analogs as NF- κ B inhibitors and as cytotoxic agents inducing Fas/CD95-dependent apoptosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 1895-1906, 2011.

Rivero-Cruz, B.; Rivero-Cruz, I.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R. Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1147-1155, 2007.

Russo, A. T.; Amezcua, K. L.; Huynh, V. A.; Rousslang, Z. M.; Cordes, D. B. A simple borohydride-based method for selective 1,4-conjugate reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters*, v. 52, p. 6823-6826, 2011.

Siddaiah, V.; Rao, C. V.; Venkateswarlu, S.; Subbaraju, G. V. A concise synthesis of polyhydroxydihydrochalcones and homoisoflavonoids. *Tetrahedron*, v. 62, p. 841-846, 2006.

Singh, D. V.; Agarwal, S.; Singh, P.; Godbole, M. M.; Misra, K. (2013). Curcumin Conjugates Induce Apoptosis Via a Mitochondrion Dependent Pathway in MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines.

Solomons, G. T. W. *Química orgânica*. 9. ed ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

Srinivasan, B.; Johnson, T. E.; Lad, R.; Xing, C. Structure–Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its Analogues as Potent Nuclear Factor κ B Inhibitors and Their Anticancer Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, p. 7228-7235, 2009.

Stolle, A.; SchmÖGer, C.; Ondruschka, B.; Bonrath, W.; Keller, T. F.; Jandt, K. D. Liquid Phase Hydrogenation of Benzalacetophenone: Effect of Solvent, Catalyst Support, Catalytic Metal and Reaction Conditions. *Chinese Journal of Catalysis*, v. 32, p. 1312-1322, 2011.

Stompor, M.; Potaniec, B.; Szumny, A.; Zieliński, P.; Żołnierczyk, A. K.; Anioł, M. Microbial synthesis of dihydrochalcones using *Rhodococcus* and *Gordonia* species. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 97, p. 283-288, 2013.

Tsuji, H.; Hattori, H. Dynamic behavior of basic sites of MgO in Tishchenko reaction. *Catalysis Today*, v. 116, p. 239-243, 2006.

Venkateswararao, E.; Sharma, V. K.; Lee, K.-C.; Sharma, N.; Park, S.-H.; Kim, Y.; Jung, S.-H. A SAR study on a series of synthetic lipophilic chalcones as Inhibitor of transcription factor NF- κ B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 379-386, 2012.

Vijaya Bhaskar Reddy, M.; Shen, Y.-C.; Ohkoshi, E.; Bastow, K. F.; Qian, K.; Lee, K.-H.; Wu, T.-S. Bis-chalcone analogues as potent NO production inhibitors and as cytotoxic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 97-103, 2012.

Wang, H.; Yan, Z.; Lei, Y.; Sheng, K.; Yao, Q.; Lu, K.; Yu, P. Concise synthesis of prenylated and geranylated chalcone natural products by regiospecific iodination and Suzuki coupling reactions. *Tetrahedron Letters*, v. 55, p. 897-899, 2014.

Ye, Z.; Wang, W.; Luo, F.; Zhang, S.; Cheng, J. Rhodium-Catalyzed ortho-Benzoylation of sp² C–H Bond. *Organic Letters*, v. 11, p. 3974-3977, 2009.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Gliomas são conhecidos pelo seu difícil tratamento, mas apesar dos avanços nos tratamentos convencionais, a incidência e mortalidade para glioma pouco mudou nas últimas décadas, fazendo-se necessários mais estudos que contribuam com avanços terapêuticos e, aumentem a sobrevida média dos pacientes.

Estudo preliminar do nosso grupo de pesquisa demonstrou que as chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40** foram compostos muito ativos em ensaios de viabilidade e contagem celular, utilizando células C6 de glioma de rato.

Desta forma, neste trabalho apresentamos o planejamento e a síntese de duas séries de derivados a partir dessas duas chalconas, visando à atividade antitumoral em glioma. Essas séries foram planejadas a fim de avaliarmos o efeito de modificações estruturais na atividade biológica.

Compostos da **Série LAFIS 31** e **Série LAFIS 40** foram sintetizados com sucesso. Esses compostos serão posteriormente submetidos à avaliação bioquímico-farmacológica para possibilitar a proposição de uma relação estrutura-atividade para essas chalconas, considerando a inibição de NF- κ B um possível alvo de atuação destes compostos.

Posteriormente apresentamos a avaliação bioquímico-farmacológica das chalconas **LAFIS 31** e **LAFIS 40**. Para ambos os compostos sua citotoxicidade foi mantida em linhagem humana de glioma (U138), mas não foram citotóxicos para culturas organotípicas do hipocampo, um modelo de células neuronais normais, sugerindo que haja seletividade para as células cancerosas. Apesar de **LAFIS 31** atuar sobre NF- κ B em células de glioma que poderia ser, pelo menos parcialmente a causa de morte por apoptose, tal efeito não foi demonstrado para **LAFIS 40**, sendo assim, o mecanismo de ação pelo qual **LAFIS 40** causou apoptose em linhagem C6 de glioma de rato poderá ser explorado auxiliando no entendimento das vias pelas quais essas chalconas exercem sua atividade antitumoral.

Espera-se ter contribuído para a descoberta de novos protótipos para avanços terapêuticos em glioma.

7.1. Parecer do Comitê de Ética para o uso de animais

----- Mensagem encaminhada de ceua@propesq.ufrgs.br -----

Data: Wed, 13 Feb 2013 16:16:39 -0200

De: ceua@propesq.ufrgs.br

Responder para: ceua@propesq.ufrgs.br

Assunto: Projeto de pesquisa na Comissão de Ética no Uso de Animais

Para: grace.gosmann@ufrgs.br

Prezado Pesquisador GRACE GOSMANN,

Informamos que o projeto de pesquisa Planejamento, síntese e avaliação bioquímico-farmacológica e chalconas e seus derivados visando à atividade antitumoral, encaminhado para análise em 19/11/2012, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais com o seguinte parecer:

Todas as sugestões da CEUA foram realizadas pelo pesquisador e, portanto, somos de parecer favorável para a realização do projeto. Autorizamos a utilização de 9 ratos de 6 a 8 dias de idade.

CEUA/UFRGS

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais

----- Final da mensagem encaminhada -----